

Identificación de un nuevo Intermediario en la vía de señalización NRG - receptores ErbB en cáncer de mama

Tesis Doctoral

María Florencia Ré Louhau

Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer

CSIC-Universidad de Salamanca

Salamanca 2015

D. Atanasio Pandiella Alonso, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

CERTIFICA

Que la presente Tesis Doctoral que titulada “Identificación de un nuevo intermediario en la vía de señalización NRG - receptores ErbB en cáncer” presentada por la Licenciada Dña María Florencia Ré Louhau ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, centro mixto CSIC-Universidad de Salamanca, y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentada ante el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, a efectos legales, expide el presente certificado en Salamanca a 10 de Julio de 2015.

Fdo: Atanasio Pandiella Alonso

Financiación

El trabajo de tesis doctoral titulado “Identificación de un nuevo intermediario en la vía de señalización NRG - receptores ErbB en cáncer” ha sido realizado por María Florencia Ré Louhau en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC), centro mixto CSIC-Universidad de Salamanca (USAL).

La autora del trabajo ha sido beneficiaria de una beca predoctoral FPI (BES2010-034160) del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO). Esta beca está asociada a un proyecto concedido al doctor Atanasio Pandiella (director de este trabajo) por el MINECO (BFU2009-07728).

También han colaborado en la financiación de esta memoria la Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC; RD06/0020/0041), el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) y la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC).

Índice

Abreviaturas	5
Introducción	11
1. Glándula mamaria y cáncer	13
2. Subtipos de cáncer de mama	15
<i>Luminal</i>	15
<i>Luminal A</i>	16
<i>Luminal B</i>	16
<i>Basal-like</i>	16
<i>Her2</i>	17
<i>Normal-breast like</i>	18
3. La familia de receptores ErbB	18
3.1. Ligandos de la familia EGF	20
3.2. Rutas de señalización	22
3.3. ErbBs y cáncer	24
3.3.1. Mutaciones activadoras en el receptor	25
<i>Mutaciones activadoras en la región extracelular</i>	25
<i>Mutaciones activadoras en la región transmembrana</i>	25
<i>Mutaciones activadoras en la región citoplasmática</i>	25
<i>Mutaciones en sitios de fosforilación</i>	26
3.3.2. Sobreexpresión de receptores ErbB	26
3.3.3. Sobreexpresión de los ligandos de la familia ErbB	27
3.3.4. Mutaciones en los componentes de la red de señalización por debajo de los receptores ErbB	28
3.4. Terapias anti-ErbBs	28
<i>Anticuerpos monoclonales</i>	28
<i>Inhibidores de la actividad tirosina quinasa</i>	29
3.5. Inhibidores de intermediarios de la señalización por receptores ErbB	29
4. Un nuevo intermediario en la señalización por NRG	30
4.1. Vangl1 y su papel en el desarrollo	30
4.2. Vangl1, una tetraspanina de membrana	33
4.3. Vangl1 en cáncer	35

Objetivos	39
Materiales y Métodos	43
1. Reactivos, equipos y animales de experimentación	45
2. Anticuerpos	46
2.1. Generación de anticuerpos	48
2.1.1. Acoplamiento de los péptidos	48
2.1.2. Obtención de antisueros	49
2.1.3. Purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad	49
3. Cultivo Celular	50
3.1. Condiciones de cultivo y líneas celulares	50
3.2. Preservación de líneas celulares	53
4. Transfección y transducción de líneas celulares	53
4.1. Transfección con jetPEI™ (PolyPlus Transfection)	53
4.2. Transducción con lentivirus y retrovirus	53
5. Construcción de mutantes y vectores de expresión	54
5.1. Extracción de ARN total	55
5.2. Síntesis de ADNc a partir de ARN: RT-PCR	55
5.3. Amplificación de ADNc mediante PCR	56
5.4. Construcción de mutantes	57
5.5. Transformación y purificación de vectores de expresión	60
5.5.1. Transformación rápida	60
5.5.2. Transformación lenta	60
6. Preparación de extractos celulares e inmunoprecipitación	61
7. Electroforesis y Western blot	62
8. Tinción con plata	63
9. Protocolos de elución de proteínas a partir de inmunoprecipitados	63
9.1. Elución con pH ácido	63
9.2. Elución con péptido competidor	64
9.3. Elución por desnaturalización con urea	64
9.4. Elución por disociación en condiciones desnaturalizantes fuertes	65
10. Electroforesis en geles de dos dimensiones	65
11. Identificación de proteínas por Espectrometría de masas	66

11.1.	Escisión del punto proteico del gel y digestión trípica de las proteínas	66
11.2.	Escisión de la banda de la membrana de PVDF y digestión trípica de las proteínas	66
11.3.	Espectrometría de masas por NanoUPLC-LTQ Orbitrap Velos	66
11.4.	Análisis de datos	67
12.	Identificación de péptidos monofosforilados por Espectrometría de masas	67
13.	Ensayo fosfatasa <i>in vitro</i>	68
14.	Inmunofluorescencia (IF)	68
15.	Ensayos de actividad biológica	69
15.1.	Proliferación celular por metabolización de MTT	69
15.2.	Ensayo de migración por herida en placa	69
15.3.	Ensayo de invasión	70
15.4.	Ensayo de adhesión a fibronectina	71
15.5.	Ensayo de crecimiento 3D en matrigel	71
16.	Fraccionamiento celular	72
17.	Bioinformática	73
18.	Cuantificación y estadística	73
Resultados y Discusión		75
1.	Identificación de nuevas moléculas que responden a estímulo con NRG	77
1.1.	p70 en otras líneas celulares de cáncer	79
1.2.	¿Es p70 un fragmento de proteólisis parcial de P-Rex1?	80
1.3.	Identificación de p70 por técnicas de proteómica	82
1.3.1.	Geles de poliacrilamida en una dimensión	82
1.3.2.	Geles bidimensionales	84
2.	Vangl1 en líneas celulares	95
3.	Identificación del residuo de serina de Vangl1 reconocido por el anticuerpo α -pM1	97
3.1.	Identificación de péptidos fosforilados por espectrometría de masas	98
3.2.	Identificación del sitio pM1 por mutagénesis de Vangl1	101
4.	Generación de un anticuerpo específico para la serina de Vangl1 reconocida por el anticuerpo α -pM1	107

Índice

4.1.	Especificidad de los anticuerpos obtenidos	107
4.2.	Aplicación en WB e IP	109
5.	Regulación de la fosforilación del sitio pM1 de Vangl1	113
5.1.	Factores que estimulan la fosforilación en pM1	113
5.2.	Quinasas y fosfatasas implicadas en la fosforilación	115
6.	Papel biológico de Vangl1 en MCF7	131
6.1.	Vangl1 en proliferación celular	131
6.2.	Vangl1 en migración celular	132
6.3.	Vangl1 en invasión celular	134
6.4.	Vangl1 en adhesión a fibronectina	137
6.5.	Vangl1 en crecimiento en 3D	139
7.	Vangl1 en pacientes con cáncer de mama	141
	Conclusiones	143
	Bibliografía	147

Abreviaturas

Abl	<i>Abelson tyrosine-protein kinase</i> (Proteína tirosina quinasa de Abelson)
Abs	Absorbancia
ADAM	<i>A disintegrin and metalloproteinase</i> (Desintegrina y metaloproteasa)
ADCC	<i>Antibody dependent cell mediated cytotoxicity</i> (Toxicidad celular mediada por anticuerpo)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AP-1	<i>Activator protein 1</i> (Proteína activadora 1)
AREG	<i>Amphiregulin</i> (Anfiregulina)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> (Adenosín trifosfato)
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein</i> (Proteína relacionada con Rad3 y Ataxia Telangiectasia)
Bad	<i>Bcl2 antagonist of cell death</i> (Antagonista de Bcl2 de Muerte Celular)
BIM I	<i>Bisindolylmaleimide I</i> (Bisindolilmaleimida I)
BRCA	<i>Breast cancer type susceptibility protein</i> (Proteína susceptible de tipo de cáncer de mama)
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Albúmina de suero bovina)
BTC	<i>Betacellulin</i> (Betacelulina)
Cbl	<i>Casitas B lineage lymphoma</i> (Linfoma de linaje B-casitas)
CD	<i>Common docking</i> (Dominio común de acoplamiento)
CDIS	Carcinoma ductal in situ
CELSR1	<i>Cadherin, EGF LAG Seven-Pass G-Type Receptor 1</i>
CHAPS	<i>3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate</i> (3-[(3-colamidopropilo) dimetilamonio]-1-propano)
CIN	<i>Chronophin</i> (fosfatasa)
CK	<i>Cytokeratin</i> (Citoqueratinas)
CLIS	Carcinoma lobular in situ
CMI	Carcinoma de mama invasivo o infiltrante

Abreviaturas

CNBr	<i>Cyanogen bromide</i> (Bromuro de cianógeno)
COX-2	<i>Cyclooxygenase 2</i> (Ciclooxigenasa 2)
CXCL12	<i>Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 12</i>
CXCR4	<i>Chemokine (C-X-C Motif) Receptor 4</i>
Da	Dalton
DAG	Diacilglicerol
DAPI	<i>4'-6-Diamidino-2-Phenylindole</i> (Diclorhidrato de 4',6-Diamidino-2-Fenilindol)
DEPC	Dietilpirocarbonato
DHB	Ácido 2,5-dihydroxibenzoico
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
dNTP	<i>Deoxynucleotides triphosphate</i> (Deoxinucleotidos trifosfato)
Dsh/Dvl	Dishevelled
DTT	<i>DL-Dithiothreitol</i>
EDTA	<i>Ethylene diamine tetracetic acid</i> (Ácido etilendiamino tetra-acético)
EGA	The European Genome-phenome Archive
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> (Factor de crecimiento epidérmico)
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> (Receptor del factor de crecimiento epidérmico)
EPG	Epigen
EPR	<i>Epiregulin</i> (Epiregulina)
ErbB	<i>Erythroblastic leukemia viral oncogene B</i> (Oncogén B del virus de la leucemia eritroblástica)
Erk	<i>Extracellular signal regulated kinases</i> (Quinasas reguladas por señales extracelulares)
FAC	<i>Focal adhesion complex</i> (Complejo de adhesión focal)
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i> (Quinasa de adhesión focal)
FDR	<i>False discovery rate</i>
Fmi	Flamingo
Fz	Frizzled

GABP	<i>Growth associated binding protein</i> (Proteína de unión asociada al crecimiento)
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase</i> (Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa)
GDP	<i>Guanosine biphosphate</i> (Guanosín bifosfato)
GEO	Gene Expression Omnibus
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> (Proteína verde fluorescente)
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i> (Proteína unida a receptor de factor de crecimiento 2)
GTP	<i>Guanosine triphosphate</i> (Guanosín trifosfato)
HA	Hemaglutinina
HB-EGF	<i>Heparin-binding epidermal growth factor</i> (Factor de crecimiento epidérmico de unión a Heparina)
HDA	Hiperplasia ductal atípica
HEK	<i>Human embrionary kidney</i> (Riñón embrionario humano)
HER	<i>Human epidermal growth factor receptor</i> (Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano)
HNSCC	<i>Head and neck squamous cell carcinoma</i> (Carcinoma escamoso de cabeza y cuello)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Peroxidasa de rábano)
IF	Inmunofluorescencia
IGF-1	<i>Insulin growth factor 1</i> (Factor de crecimiento insulínico tipo)
IGF-1R	<i>Insulin growth factor 1 receptor</i> (Receptor para el factor de crecimiento insulínico tipo 1)
Ig	Inmunoglobulina
IP	Inmunoprecipitación
IP ₃	<i>Inositol Triphosphate</i> (Trifosfato de Inositol)
IPG	<i>Immobilized pH Gradient</i> (Gradiente de pH inmovilizado)
ITF	<i>Intestinal trefoil factor</i> (Factor intestinal trefoil)
JIP4	<i>JNK interacting protein 4</i>
JNK	<i>Jun N-terminal kinases</i> (Quinasas Jun N-terminal)
KAI-1	<i>Metastasis suppressor Kangai-1</i>
KITENIN	KAI1 COOH-terminal intercating tetraspanin
KLH	<i>Keyhole Limpet Hemocyanin</i> (Hemocianina de Lapa)

Abreviaturas

LB	<i>Luria Bertani</i>
LIMK	<i>LIM domain kinase</i> (Quinasa del dominio LIM)
LPP2	<i>Loop-Tail Protein 2 Homolog</i>
mA	Miliamperios
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i> (Desorción/ionización láser asistida por matriz)
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> (Proteínas quinasa activada por mitógenos)
MAPKK	<i>MAPK kinase</i> (MAPK quinasa)
MBS	<i>3-Maleimidobenzoic Acid N-Hydroxysuccinimide Ester</i> (Éster de N-hidroxisuccinimida del ácido m-maleibenzóico)
MEC	Matriz extracelular
MEK	<i>Meiosis-specific serine/threonine-protein kinase</i> (Proteína quinasa de serina/treonina específica de meiosis)
MMP13	<i>Matrix metalloproteinase 13</i> (Metaloproteasa de matriz 13)
MMLV-RT	<i>Moloney Murine Leukemia virus reverse transcriptase</i> (Transcriptasa reversa del virus de la Leucemia Murina de Moloney)
MS	<i>Mass spectrometry</i> (Espectrometría de masas)
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i> (Diana de la rapamicina en mamíferos)
MTT	<i>3-(4,5 dimethylthiazol-2-il)2,5 bromure dipheniltetrazolium</i> (Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF- κ b	<i>Nuclear factor κB ligand</i> (Ligando del factor nuclear κ B)
NRG	<i>Neuregulin</i> (Neuregulina)
NSCLC	<i>Non-small cell lung cancer</i> (Cancer de pulmón de células no pequeñas)
ON	<i>Overnight</i> (durante la noche)
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Electroforesis en gel de poliacrilamida)
PAK	<i>p21-Activated Kinase</i> (Quinasa Activada por p21)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampón salino con fosfato)
PBS/CM	<i>Phosphate buffered saline/calcium, magnesium</i> (Tampón salino con fosfato, calcio y magnesio)

PCP	<i>Planar cell polarity</i> (Polaridad planar celular)
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
PDZ	PSD95 (proteína de densidad postsináptica), DlgA (supresor de tumores en <i>Drosophila</i>), zo-1 (proteína zonula occludens-1)
PI	Punto isoeléctrico
PI3K	<i>Phosphatidyl inositol 3 kinase</i> (Fosfatidil inositol 3 quinasa)
PIP ₂	<i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i> (Fosfatidil inositol 4,5-bifosfato)
Pk	Prickle
PKC	<i>Protein kinase C</i> (Proteína quinasa C)
PLC γ	<i>Phospholipase Cγ</i> (Fosfolipasa C γ)
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i> (12-miristato 13-acetato de forbol)
PMSF	<i>Phenylmethylsulphonylfluoride</i> (Fenil-metil sulfonilfluoruro)
PP1	<i>Protein phosphatase 1</i> (Proteína fosfatasa 1)
PP2A	<i>Protein phosphatase 2A</i> (Proteína fosfatasa 2A)
ppm	Partes por millón
P-Rex1	<i>Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchange factor 1</i> (Intercambiador 1 de RAC dependiente de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato)
PTB	<i>Phosphotyrosine binding domain</i> (Dominio de unión a fosfotirosina)
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i> (Fosfatasa homóloga a la ensina)
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i> (Fluoruro de polivinilideno)
Ras	<i>Rat sarcome</i> (Sarcoma de rata)
RE	Receptor de estrógenos
RH	Receptor de hormona
ROCK	<i>Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase</i>
RP	Receptor de progesterona
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase PCR</i> (PCR de transcripción reversa)
SB 2X	<i>Sample buffer 2X</i>
SBF	Suero bovino fetal
SDF1 α	<i>Stromal cell-derived factor 1 α</i>

Abreviaturas

SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Dodecyl sulfato sódico)
SH2	<i>Src homology 2</i>
SHC	<i>(Src homology 2 domain containing) transforming protein</i>
shRNA	<i>Short hairpin ribonucleic acid</i> (Pequeña horquilla de ARN)
siRNA	<i>Small interference ribonucleic acid</i> (Pequeño ARN de interferencia)
SOS	<i>Son of sevenless</i>
Src	<i>v-src sarcome viral oncogene homolog-avian</i> (Homólogo al oncogen viral v-src sarcoma-ave)
SSH1	<i>Slingshot-1</i>
STB2/STBM2	<i>Strabismus 2</i>
SCLC	<i>Small cell lung cancer</i> (Cancer de pulmón de células pequeñas)
TAE	Tris, acetato, EDTA (tampón)
TBS-T	<i>Tris buffered saline tween 20</i>
TCA	Ácido tricloroacético
TCEP	Tris carboxietil fosfina hidrociorada
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TGF- α	<i>Transforming growth factor α</i> (Factor de crecimiento y transformación tipo α)
TNBC	<i>Triple negative breast cancer</i> (Cáncer de mama triple negativo)
UV	Ultravioleta
V	Voltios
Vangl1	<i>Van Gogh like 1</i>
WB	<i>Western blot</i>

Introducción

Introducción

1. Glándula mamaria y cáncer

La mama es, en los mamíferos, el órgano específico para la producción de leche para la lactancia. Está formada por un conjunto de glándulas mamarias que producen este alimento, a las que se les denomina lóbulos y lobulillos. Los lóbulos se encuentran conectados por unos conductos, los ductos galactóforos, que son los que conducen la leche al pezón (Figura 1). También forman parte de la estructura de la mama, el tejido conectivo, que provee soporte a la mama; los nervios, que permiten la sensibilidad; los vasos sanguíneos, y los vasos y nódulos linfáticos. A lo largo de la vida de la mujer, la mama está sujeta a una compleja regulación hormonal que conduce al desarrollo del tejido y tras el parto, a la producción de leche. Las tres hormonas principales que median estos cambios son los estrógenos, los progestágenos y la prolactina. En el varón la estructura de la mama es casi idéntica a la de la mujer, pero carece de los lóbulos especializados, dado que fisiológicamente no existe la necesidad de producir leche. (SEER Training Modules, 2015).

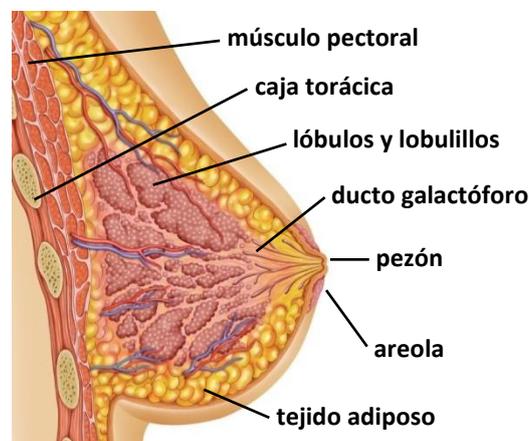


Figura 1. Esquema de la mama.

El cáncer de mama es una enfermedad compleja causada por la acumulación progresiva de mutaciones en los genes, cuyo resultado es la desregulación de la proliferación celular. Existe una sustancial variabilidad entre los individuos, tanto en la edad de diagnóstico como en la expresión fenotípica de la enfermedad, presentando mayor incidencia en mujeres. De acuerdo a los datos estimados por la Organización Mundial de la Salud en 2012, en mujeres tiene una incidencia global

Introducción

de 43,1 entre 100.000 y respecto de los otros cánceres es el primero en incidencia (25,1%) y mortalidad (14,7%).

Evidencias histológicas y moleculares han conducido a un modelo de progresión del cáncer de mama en el que las células de la unidad ducto-lobular terminal dan lugar a una hiperplasia ductal atípica (HDA), que puede progresar a un carcinoma ductal o lobular *in situ* (CDIS o CLIS respectivamente), y eventualmente a un carcinoma de mama invasivo o infiltrante (CMI). Esta transición, de una lesión pre-invasiva *in situ* a una lesión invasiva, es un paso crítico en la progresión de la enfermedad. Si se encuentran células cancerosas en los ganglios linfáticos, puede ocurrir que las células se hayan extendido a otras partes del organismo. Cuando esto ocurre se denomina cáncer metastático. (MacMillan *et al.*, 2014).

Los patrones histológicos observados durante la progresión de la enfermedad son indicadores fenotípicos de cambios moleculares subyacentes. Por tanto, es importante identificar los reguladores celulares y moleculares involucrados en la progresión del cáncer de mama, especialmente en los estadios tempranos no invasivos. La tecnología de microarreglos de ADN y otros métodos de análisis de la expresión génica a gran escala, están siendo utilizados en la caracterización biológica y el planeamiento terapéutico del cáncer de mama, que se combinan con la evaluación patológica tradicional. Sin embargo, el desafío inmediato sigue siendo aprender cómo utilizar las características moleculares de un individuo y su tumor, para desarrollar nuevas aproximaciones en la prevención, detección y tratamiento de la enfermedad. (Olopade *et al.*, 2008; MacMillan *et al.*, 2014).

Los perfiles de expresión génica utilizados en el análisis de los tumores de mama han permitido identificar marcas génicas asociadas con diferentes parámetros clínicos, dando lugar a la clasificación de dichos tumores en cinco subtipos (Tabla I): Luminal A, Luminal B, HER2-positivo, Basal-like y Normal breast-like o no clasificados (Prat y Perou, 2011). Además, un método de clasificación relevante en clínica es el análisis por inmunohistoquímica de la expresión de los receptores de estrógenos (RE), de progesterona (RP) y HER2 en los tumores, que permite identificar tres subtipos importantes de cáncer de mama:

RE/RP positivos o receptor de hormona positivo (RH positivo), que básicamente incluye los subtipos Luminal A y B, el subtipo HER2 positivo y el subtipo triple negativo (*TNBC-Triple negative breast cancer*), que carece de la expresión de RE y RP, y no sobreexpresa HER2. (De Laurentiis *et al.*, 2010).

Tabla I. Subtipos de cáncer de mama (adaptada de Rakha *et al.*, 2008).

Subtipo	Incidencia (%)	Características
Luminal A	19-39	Elevada expresión de RE y buen pronóstico.
Luminal B	10-23	Baja/moderada expresión de RE, expresión de genes compartidos con subtipos basal-like y HER2+, mayor proliferación y peor pronóstico.
Basal-like	13-25	Expresan CK5, CK17, laminina, c-Kit, EGFR, P-cadherina y NF-κB, mutaciones en BRCA1 y p53, son de mal pronóstico y no responden a terapia hormonal.
HER2+	4-10	Sobreexpresan HER2, elevada activación de NF-κB, mutaciones en p53, son de mal pronóstico y no responden a terapia hormonal.
Normal breast-like	6-10	Elevada expresión de genes implicados en la transición epitelio-mesénquima, baja expresión de genes característicos de células epiteliales luminales, mejor pronóstico que el subtipo basal-like, responden menos que los otros subtipos RE- a quimioterapia neoadyuvante.

2. Subtipos de cáncer de mama

Luminal

La mayoría de los cánceres de mama se originan desde las células luminales internas que se encuentran en los ductos mamarios. Se caracterizan por la expresión de receptores hormonales que incluyen a los receptores hormonales

activados por estrógenos (RE) y a los que son activados por progestágenos (RP). (Reddy, 2011; Schuchard *et al.*, 1993).

Luminal A

Este subtipo de tumor se caracteriza por tener elevados niveles de expresión del receptor de estrógenos y se asocia con un mejor pronóstico (Sorlie *et al.*, 2006). Su perfil inmunohistoquímico típico es positivo para ambos receptores hormonales, y negativo para HER2. Basándose en el perfil molecular, todos los casos con carcinoma lobular *in situ* son tumores Luminal A (Millikan *et al.*, 2008). Las mujeres con esta clase de tumor son generalmente diagnosticadas a edades más tempranas. Además, suelen tener el mejor pronóstico con tasas elevadas de supervivencia y niveles bajos de recurrencia (Reddy, 2011).

Luminal B

Contrariamente a lo que sucede con los tumores Luminales de tipo A, los de tipo B tienden a tener mayor grado histológico y peor pronóstico (Reddy, 2011). Junto a la expresión de ambos receptores hormonales, estrógenos y progesterona, estos tumores también expresan EGFR (*Epidermal growth factor receptor*), HER2 y ciclina E1 (Sorlie *et al.*, 2001; Laakso *et al.*, 2006).

Insensibles a la quimioterapia, los tumores luminales son tratados con numerosas terapias dirigidas al RE como tamoxifeno, inhibidores de aromatasas, fulvestrant (Faslodex ®, AstraZeneca, London, U.K.), y supresión ovárica acompañada o no de quimioterapia (Reddy, 2011).

Basal-like

Estos tumores se originan en las células exteriores (“basal”) que delimitan los ductos mamarios. La incidencia se estima entre un 13 y 25%. Estos tumores son diagnosticados con mayor frecuencia entre mujeres jóvenes y están relacionados con el cáncer de mama hereditario *BRCA1*. Usualmente son agresivos y están asociados con un pronóstico peor que los tumores Luminal A, Luminal B y Normal-like. (Reddy, 2011).

El cáncer de mama del subtipo Basal-like expresa genes que se encuentran normalmente en las células basales del tejido mamario normal; por lo tanto no hay un perfil universal de marcadores para este subtipo. Se han realizado estudios

comparando perfiles de transcripción e inmunohistoquímica, y se destacó que un panel negativo para RE y HER2, y positivo para citoqueratinas (CK) 5, 6, 14 y 17, y EGFR podría ser correctamente identificado como carcinoma Basal-like. Otros estudios proponen que algunos tumores Basal-like podrían ser positivos para RE y/o amplificación de HER2. (Minami *et al.*, 2011; Ocaña *et al.*, 2008).

El **cáncer de mama triple negativo**, se define por la ausencia de expresión de los receptores de estrógenos, progesterona y HER2, mediante análisis inmunohistoquímico. Pese a que algunos estudios reclaman que los tumores de subtipo Basal-like y TNBC sean considerados sinónimos, se ha demostrado repetidamente que aunque hay un solapamiento significativo entre ambos, los mismos no son idénticos. (De Laurentiis *et al.*, 2010; Minami *et al.*, 2011).

El TNBC corresponde al 15% de todos los cánceres de mama diagnosticados, pero es responsable del alto índice de mortalidad. Está usualmente caracterizado por una evolución clínica agresiva con mal pronóstico. La histología de los tumores de TNBC generalmente incluye alto grado, elevada proliferación y necrosis (De Laurentiis *et al.*, 2010). Actualmente la quimioterapia es la única modalidad de tratamiento disponible para los tumores Basal-like y Triple negativo, al ser resistentes a las terapias dirigidas contra RE, RP y HER2. (Reddy, 2011).

HER2

Los tumores HER2 tienen esta denominación debido a que son sobreexpresores de HER2 (*Human epidermal growth factor receptor 2*), receptor que pertenece a la familia de receptores ErbB/HER. Además, suelen ser negativos para RE y RP, y positivos para nódulos linfáticos con grados histológicos más bajos. Pueden tener también mutaciones en *p53*. Estos tumores tienen un pronóstico relativamente pobre y son propensos a sufrir recaídas frecuentes y tempranas, y metástasis distantes. (Reddy, 2011).

HER2 se volvió clínicamente relevante al demostrarse que los cánceres HER2 positivos poseen peor pronóstico que los tumores negativos para HER2. Entre el 15 y 20% de los cánceres de mama invasivos son HER2 positivos, la amplificación del gen y la consecuente sobreexpresión de HER2 ocurre durante el estadio *in situ* del desarrollo del tumor. Por lo tanto, HER2 generalmente se

encuentra sobreexpresado en el tumor primario y en la metástasis. (Burstein, 2010).

Las pacientes con tumores HER2+ son tratadas con terapias dirigidas a HER2 como trastuzumab (y lapatinib en algunos casos) con o sin quimioterapia. (Burstein, 2010).

Normal-breast like

Estos tumores no caen en ninguna de las categorías descritas anteriormente y corresponden al 6-10% de todos los cánceres de mama. Son normalmente pequeños y en general tienen buen pronóstico. Son más comunes en mujeres post-menopáusicas que en pre-menopáusicas. (Reddy, 2011).

Un nuevo subtipo intrínseco de cáncer de mama, conocido como ***Claudin-low***, ha sido identificado en tumores humanos, de ratones y en un panel de líneas celulares de cáncer de mama. En la clínica, la mayoría de los tumores Claudin-low son carcinomas ductales frecuentemente de diferenciación metaplásica y medular, son RE, RP y HER2 negativos y tienen mal pronóstico. Datos preliminares muestran que la tasa de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante estándar es intermedia entre los tumores Basal-like y Luminal. Además, los tumores Claudin-low poseen propiedades biológicas únicas asociadas a células madre de mama y muestran características de células iniciadoras de tumor. El estudio de las mismas está conduciendo a la formulación de una nueva hipótesis con respecto a la “célula iniciadora” de los distintos subtipos de cáncer de mama. (Prat *et al.*, 2010; Prat y Perou, 2011).

3. La familia de receptores ErbB

La familia de receptores ErbB y sus ligandos, juegan un papel crítico en el desarrollo de los mamíferos y en la homeostasis. Hoy en día, es ampliamente conocida la implicación que tiene la desregulación de estas rutas de señalización en la tumorigénesis y la progresión tumoral. De hecho, los componentes de estas vías de señalización constituyen dianas terapéuticas que han redireccionado las estrategias utilizadas en la clínica, proporcionando mayor especificidad, lo que resulta en tratamientos más eficaces, menos tóxicos y que brindan mejores perspectivas a futuro; y que además, dejan en evidencia un nuevo paradigma para

el diseño de tratamientos contra el cáncer y otras patologías. (Riese *et al.*, 2007; Yarden *et al.*, 2001; Ocaña *et al.*, 2010).

Los receptores ErbB median la amplia respuesta celular que ocurre frente a las señales ambientales y están presentes en todos los animales desde nemátodos hasta humanos, aunque el número de receptores y sus ligandos varía entre ellos (Citri *et al.*, 2006). En mamíferos esta familia está compuesta por cuatro receptores: receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR)/ErbB1/HER1, c-Neu/ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 y ErbB4/HER4 (Figura 2). Los cuatro receptores reconocen aproximadamente 40 proteínas codificadas por al menos 10 genes distintos (Hobbs *et al.*, 2002; Beerli *et al.*, 1996; Montero *et al.*, 2008). Estos ligandos se encuentran relacionados estructuralmente y median procesos en el desarrollo, la homeostasis y patologías como cáncer (EGF-*epidermal growth factor*, NRGs-neuregulinas), hipertensión (HB-EGF) y esquizofrenia (NRG-1) (Linggi *et al.*, 2006; Montero *et al.*, 2008).

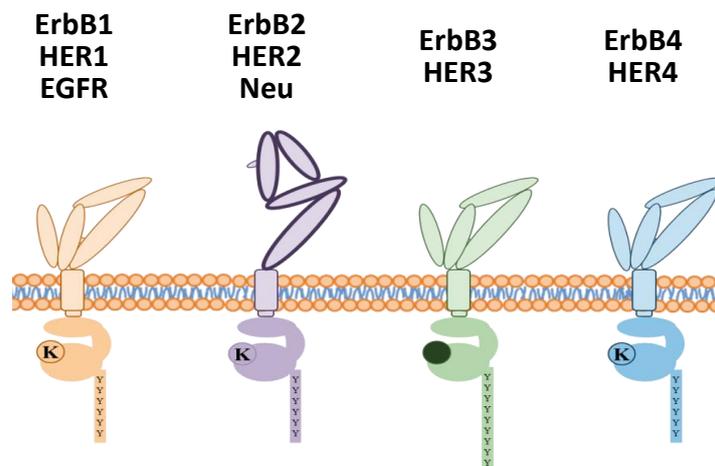


Figura 2. Receptores ErbB/HER en mamíferos.

Los receptores ErbB son proteínas transmembrana de tipo I. Su región extracelular está compuesta por cuatro subdominios con abundantes glicosilaciones y puentes disulfuro (Burgess *et al.*, 2003). Los subdominios I y III de la región extracelular están involucrados en la unión al ligando (Figura 3). El subdominio II posee el brazo de dimerización que se expone tras la unión del ligando al receptor. El subdominio IV interacciona con el subdominio II, bloqueando la exposición del brazo de dimerización en la conformación cerrada inactiva, que es cuando no está unido el ligando. A continuación del dominio

extracelular, los ErbBs presentan un único dominio transmembrana y una larga región citoplasmática que posee un dominio con actividad tirosina quinasa y múltiples sitios de fosforilación. Cabe mencionar que ErbB2 no tiene un ligando conocido, pero funciona como co-receptor de los otros tres receptores. (Hynes *et al.*, 2005; Linggi *et al.*, 2006).

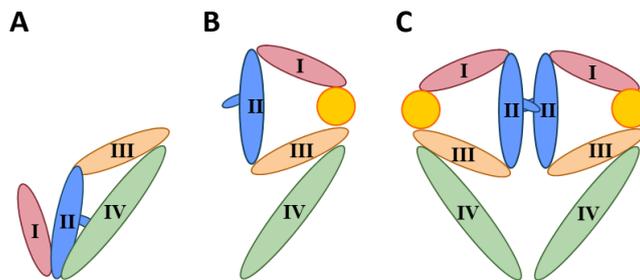


Figura 3. Esquema del dominio extracelular de los receptores ErbB. A. conformación cerrada inactiva. B. Conformación abierta unida al ligando, activa. C. Dímero. (Riese *et al.*, 2007)

La unión de factores de crecimiento al ectodominio activa la tirosina quinasa citoplasmática estimulando rutas de señalización que dirigen las respuestas celulares. La activación de los receptores ocurre tras la dimerización. Ha sido bien establecido que, con excepción de los mutantes constitutivamente activos, la dimerización es provocada por la unión del ligando y es esencial para la activación de la quinasa. La dimerización incluye tanto homo- como heterodimerización, particularmente ErbB1, ErbB3 y ErbB4 con ErbB2. La tirosina quinasa de ErbB3 posee muy baja actividad, y por lo tanto para la señalización depende de interacciones con ErbB2. (Linggi *et al.*, 2006).

Estos receptores se expresan en tejidos de origen epitelial, mesenquimal, o nervioso en adultos, y son imprescindibles en el desarrollo embrionario (Hynes *et al.*, 2005; Citri *et al.*, 2006). En condiciones fisiológicas normales, la activación de los receptores ErbB está controlada por la regulación espacial y temporal de la expresión de sus ligandos. (Hynes *et al.*, 2005).

3.1. Ligandos de la familia EGF

Los ligandos de los receptores ErbB pertenecen a la familia EGF dado que todos poseen al menos un motivo EGF en su estructura (Olayioye *et al.*, 2000). Dicho dominio está constituido por unos 40-50 aminoácidos, entre los que se

incluyen 6 cisteínas que establecen 3 puentes disulfuro entre sí. La estructura tridimensional (Figura 4) se compone de una hoja β antiparalela y una hélice α corta a cada lado (Huang *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2001). Este dominio es esencial para la correcta unión del ligando al receptor, de hecho se ha visto que dicho dominio sería suficiente por sí solo para la activación de los receptores. Además, algunos ligandos pueden tener dominios de tipo inmunoglobulina o dominios de unión a heparina, entre otros (Warren *et al.*, 2006; Massague *et al.*, 1993).

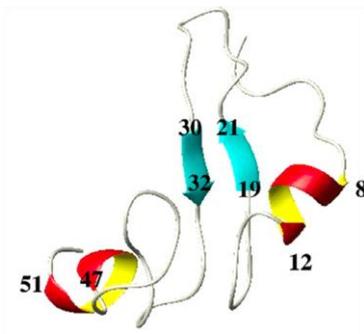


Figura 4. Representación tridimensional del dominio EGF. Las estructuras secundarias que componen el dominio EGF son una hoja β antiparalela (residuos 19–21 y 30–32) y dos hélices α (8–12 y 47–51). La estructura tridimensional de EGF adopta un plegamiento α - β - α , que se encuentra estabilizado por tres puentes disulfuro. (Huang *et al.*, 2010)

En la actualidad, en mamíferos se reconocen hasta 40 ligandos de la familia EGF (Figura 5): EGF, heparin-binding (HB)-EGF, factor de crecimiento y transformación tipo α (TGF- α), anfiregulina (AREG), epiregulina (EPR), epigen (EPG), betacelulina (BTC), caleb y las diferentes isoformas de las neuregulinas (NRG), también conocidas como heregulinas. EGF y TGF- α son ligandos clave de EGFR; BTC es capaz de unirse y activar a todos los receptores de la familia, y las NRG tienen preferencia por los receptores ErbB3 y ErbB4. (Eccles, 2011; Kinugasa *et al.*, 2004).

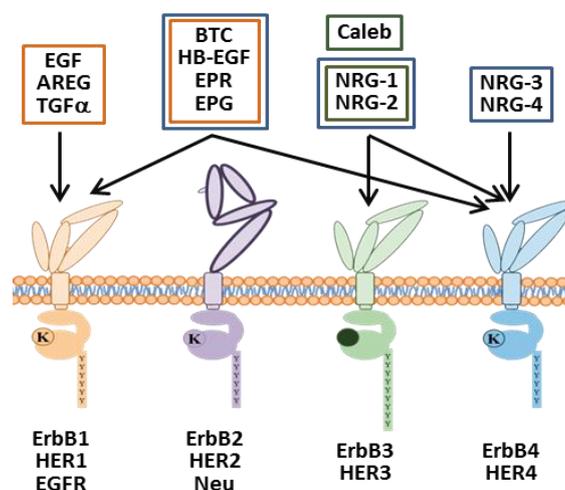


Figura 5. Ligandos de la familia EGF y receptores ErbB con los que interaccionan.

Todos los ligandos de la familia EGF, con la excepción de Cripto (Watanabe *et al.*, 2007), existen como precursores anclados a la membrana que son posteriormente procesados por metaloproteasas (principalmente ADAMs) que conducen a la liberación de factores solubles (Linggi *et al.*, 2006). Los productos procesados se han visto implicados en la transactivación de receptores ErbB adyacentes. El procesamiento de los ligandos de EGFR y la subsecuente activación del receptor puede ser estimulada por muchos factores, incluyendo citoquinas que se unen a receptores acoplados a proteínas G causando la activación de las vías de señalización de PKC (*Protein Kinase C*) y MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), o a través de los ligandos Wnt que se unen a los receptores Frizzled (Eccles, 2011). Los ligandos que no han sido procesados y por lo tanto permanecen unidos a la membrana también pueden estimular células adyacentes por un mecanismo de activación yuxtacrina, que puede tener especial importancia en la comunicación epitelio-estroma (Hynes *et al.*, 2005).

Se sabe que los distintos ligandos son capaces de promover patrones específicos de fosforilación de los receptores EGFR y dictar la duración de los eventos de señalización y las respuestas celulares divergentes (Eccles, 2011; Hynes *et al.*, 2005; Hobbs *et al.*, 2002). Por ejemplo, TGF- α y AREG son estimuladores más potentes que EGF para la motilidad y la invasión. Esto se debe a la activación sostenida de las vías PLC γ (*Phospholipase C*) y MAPK causada por dichos ligandos, mientras que EGF promueve una ubiquitinación y degradación más rápida de EGFR (Eccles, 2011).

Además de las diferencias en la especificidad de los ligandos por los receptores, y en su capacidad para inducir la fosforilación de un subgrupo concreto de residuos de tirosina, existen diferencias en la afinidad de los ligandos por el mismo receptor. Estas diferencias son también dependientes del tiempo y del espacio (tejido) en el que se expresan. Además, hay un grupo de proteínas que regulan la concentración relativa de los ligandos secuestrándolos, como son, por ejemplo, los proteoglicanos de la familia heparán-sulfato. (Wilson *et al.*, 2009).

3.2. Rutas de señalización

La unión de ligando induce cambios conformacionales en los receptores que exponen el brazo de dimerización, promoviendo la asociación tanto de homo-

como heterodímeros, seguido de la activación del dominio quinasa intracelular y la fosforilación de los residuos de tirosina en el extremo C-terminal (Linggi *et al.*, 2006; Hynes *et al.*, 2005). Dichos residuos fosforilados van a reclutar un amplio espectro de proteínas, que van a conducir a la activación de las diferentes vías de señalización (Figura 6). Qué sitios se autofosforilan y por lo tanto qué proteínas de señalización se asocian, son determinados por la identidad del ligando y por los receptores que componen el heterodímero. (Yarden *et al.*, 2001, Olayioye *et al.*, 2000).

El estudio sistemático del perfil de interacción de las fosfotirosinas ha demostrado que los cuatro receptores tienen patrones específicos de unión a proteínas, cada proteína puede ser reclutada a más de un sitio aunque con distinta afinidad y cinética. Este grado de flexibilidad permite respuestas diferentes ante estímulos externos en distintos contextos microambientales, y la integración del estímulo en funciones celulares coordinadas. (Eccles, 2011; Yarden *et al.*, 2001).

La vía de Ras y Raf-MAPK es una diana invariable de todos los ligandos de los receptores ErbB. Por otro lado, PI3K-Akt se encuentra corriente abajo de la mayoría de los dímeros activos de ErbB. La diferencia en potencia y cinética de la activación de PI3K puede deberse a que PI3K se acopla directamente a ErbB3 y ErbB4, pero lo hace de forma indirecta con los receptores ErbB1 y ErbB2, a través de moléculas intermediarias de la señalización. La activación simultánea de cascadas lineales, como las rutas de MAPK, la cascada de proteínas quinasas activadas por estrés, la PKC y la vía de Akt, conlleva en el núcleo a la activación de distintos programas transcripcionales. Estos involucran los proto-oncogenes *fos*, *jun*, *myc* y la familia de factores de transcripción con dedos de Zn, que incluye a las proteínas Sp1 y Egr1, así como también a miembros de la familia Ets como la proteína GABP (*growth associated binding protein*). Sin embargo, aunque comparten algunas rutas, cada receptor está acoplado a un grupo distinto de proteínas de señalización. (Yarden *et al.*, 2001).

Resulta interesante que EGFR y ErbB4, los únicos receptores completamente funcionales (en contraste con ErbB2 y ErbB3), son los que interaccionan con el mayor número de efectores cuesta abajo y probablemente llevan a cabo funciones similares en contextos celulares diferentes en respuesta a

sus ligandos. ErbB3 es activado principalmente por NRG1 y NRG2 y es un fuerte activador de la vía de PI3K, ya que posee seis sitios de unión para la subunidad reguladora p85. La ruta de PI3K es un punto principal en la señalización celular (especialmente a través de Akt y mTOR) que regula tamaño celular, metabolismo, supervivencia y proliferación. (Eccles, 2011; Hobbs *et al.*, 2002).

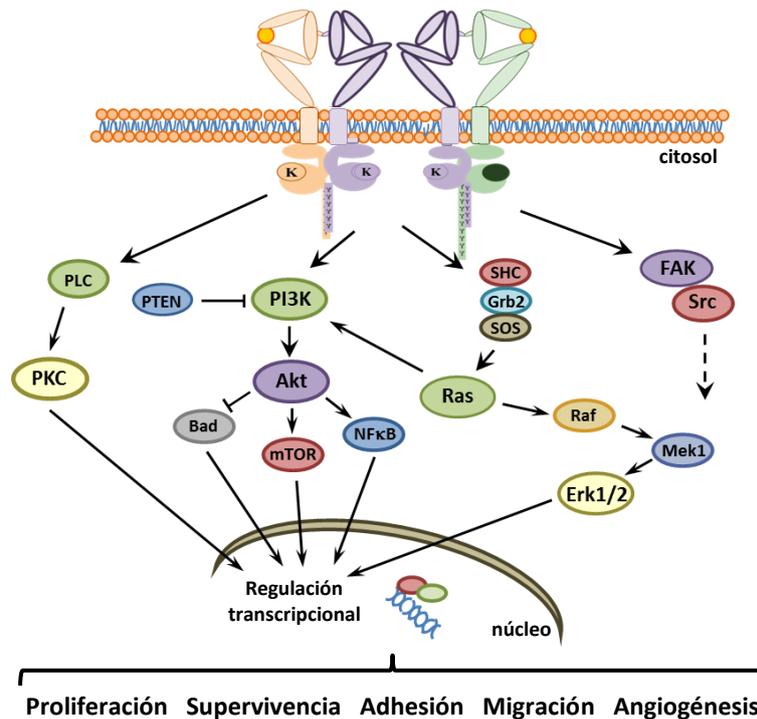


Figura 6. Activación de receptores ErbB y sus principales vías de señalización. (adaptada de Yarden *et al.*, 2001).

3.3. ErbBs y cáncer

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, queda claro el rol clave que tienen estos receptores y sus vías de señalización en el desempeño y control de las funciones fisiológicas a nivel celular y del organismo. Es por esto que cuando algún componente de esta vía se encuentra alterado surgen las patologías, como sucede en la oncogénesis y progresión tumoral. En la actualidad, esta red regulatoria y sus posibles alteraciones constituyen un campo intenso de estudio para lograr comprender con mayor profundidad las bases moleculares del cáncer, y permitir de esta forma el desarrollo de nuevas terapias y la identificación de nuevos marcadores predictivos y de pronóstico para esta compleja enfermedad. (Cai *et al.*, 2010).

3.3.1. Mutaciones activadoras en el receptor

Mutaciones activadoras en la región extracelular

Pueden ocurrir mutaciones que alteran la unión al ligando, modificando la afinidad y causando una desregulación en la señalización, o mutaciones de equilibrio conformacional, que alteran el balance entre la conformación abierta y cerrada de la región extracelular del receptor, favoreciendo la conformación abierta que permite la dimerización del mismo. Esto se manifiesta en un aumento de la señalización dependiente e independiente de ligando. En muestras de glioblastoma se han encontrado mutaciones puntuales en las subregiones II y IV del dominio extracelular del receptor EGFR que tienen este efecto. El mutante EGFRvIII, presente en algunos glioblastomas, carece de la subregión extracelular I y la mayoría de la subregión II, lo que permite la señalización independiente de ligando. (Riese *et al.*, 2007).

El oncogen v-ErbB de la eritroblastosis aviar carece de casi toda la región extracelular y posee señalización constitutiva a través de este receptor, por lo que aparentemente los dominios transmembrana y citoplasmático son suficientes para la dimerización del receptor y la señalización en ausencia de influencias negativas o positivas de la región extracelular. (Riese *et al.*, 2007).

Mutaciones activadoras en la región transmembrana

La región transmembrana es suficiente para mediar la dimerización del receptor y la señalización. En tumores de cerebro de rata se ha observado sustitución en el dominio transmembrana de ErbB2 en un residuo de Val664 por glutamato, esta alteración incrementa la afinidad de la dimerización, la señalización y la actividad transformante. Sin embargo, hasta el momento no se han reportado mutaciones análogas en el dominio transmembrana de los receptores ErbB en muestras de tumores humanos. (Riese *et al.*, 2007).

Mutaciones activadoras en la región citoplasmática

Se han detectado mutaciones en el dominio quinasa del receptor EGFR en un subgrupo de pacientes (10-30%) con carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, *non-small cell lung cancer*), que correlacionan con el grado de respuesta a moléculas pequeñas inhibitoras de la actividad quinasa de EGFR

(gefitinib y erlotinib). Estas mutaciones provocan un incremento de la señalización mediada por EGFR, que selectivamente compromete vías de supervivencia cuesta abajo del receptor y que causan la adicción de las células tumorales hacia estas alteraciones. Por lo tanto, la utilización en la clínica de inhibidores de la actividad quinasa que impiden la señalización mediada por EGFR en estas células, lleva a la muerte celular y a la regresión del tumor. (Riese *et al.*, 2007).

En muestras de tumores humanos se han identificado varias mutaciones en el dominio quinasa de los receptores ErbB2 y ErbB4. Gran parte de las mismas se encuentran cerca de la región de unión a ATP en el sitio activo del dominio quinasa, lo que sugiere que estas mutaciones causan un aumento de la actividad tirosina quinasa del receptor. (Riese *et al.*, 2007).

Mutaciones en sitios de fosforilación

La fosforilación de los residuos de tirosina del dominio citoplasmático de los receptores ErbB crea sitios de anclaje de proteínas de señalización citoplasmáticas que contienen dominios SH2 (*Src homology 2*) o PTB (*phosphotyrosine binding*). La mutación artificial Y1045F suprime la unión de c-Cbl a EGFR y la ubiquitinación de EGFR. Esto interrumpe la regulación negativa de EGFR, lo que lleva a un aumento de la señalización por EGFR. Sin embargo, no se han detectado esta clase de mutaciones en receptores ErbB en humanos. (Riese *et al.*, 2007).

Por otra parte, la sustitución de residuos de tirosina del dominio citoplasmático de los receptores ErbB por residuos que simulan la fosforilación en estos residuos como glutamato y aspartato, podría conducir al acoplamiento constitutivo de las proteínas de señalización citoplasmática. Hasta el momento, no se han observado mutaciones de este tipo en muestras de tumores. (Riese *et al.*, 2007).

3.3.2. Sobreexpresión de receptores ErbB

Con respecto a la presencia de estos receptores en cáncer, la expresión de EGFR en cáncer de mama se encuentra altamente asociada a un pronóstico pobre y está sobreexpresado en el 54% de los carcinomas de mama de tipo basal (Banerjee

et al., 2006; Nielsen *et al.*, 2004). Además, se expresa en el 33% de los carcinomas humanos y en el 50% de los glioblastomas (Witton *et al.*, 2003).

En lo que se refiere a ErbB2, aproximadamente entre un 13 y 23% de los tumores de mama presentan sobreexpresión de este receptor, lo que se asocia con una reducción de la supervivencia global (Witton *et al.*, 2003; Slamon *et al.*, 1987; Koninki *et al.*, 2009). También está involucrado con una malignidad superior en los tumores de mama, evidenciándose por la aparición de metástasis y de un fenotipo más agresivo (Witton *et al.*, 2003).

La sobreexpresión de ErbB3 está asociada a un pronóstico pobre en distintos tipos de cáncer como por ejemplo en mama, pulmón y ovario. Se ha reportado que 17,5% de los pacientes con cáncer de mama presentan elevada expresión de ErbB3, lo que se asocia con un mal pronóstico (Witton *et al.*, 2003).

Por último, ErbB4 se expresa en carcinomas de colon, próstata, mama, pulmón, ovario, cérvix, estómago y tiroides. En mama se expresa tanto en tejido normal como tumoral. En este último, curiosamente la expresión de ErbB4 se relaciona con una reducción de la proliferación celular, de hecho este receptor se encuentra expresado en 11,9% de los cánceres de mama y se correlaciona con un buen pronóstico. (Barros *et al.*, 2010).

3.3.3. Sobreexpresión de los ligandos de la familia ErbB

En el 85% de los carcinomas mamarios se observan altos niveles de expresión de ligandos de ErbBs, independientemente del estado de los receptores (Barros *et al.*, 2010).

La expresión de EGF está fuertemente vinculada a la promoción de la proliferación celular, y su sobreexpresión ocurre en varios tipos de cáncer como mama, hígado y páncreas (Barros *et al.*, 2010).

Algunos investigadores han reportado la expresión en cáncer de mama de distintas isoformas de neuregulinas, mediante detección con anticuerpos (Montero *et al.*, 2008). Por ejemplo, en uno de ellos se observó que la expresión de la isoforma NRG2 α se correlaciona con la presencia de nódulos (Dunn *et al.*, 2004). Además, estudios citogenéticos evidenciaron la presencia de alteraciones en los genes de neuregulinas en tumores de pacientes con cáncer de mama (Huang *et al.*,

2004). En estos pacientes, se pudo distinguir un subgrupo que tiene una interrupción en el gen NRG1 que se correlaciona con un bajo grado histopatológico. Además, se ha visto que los niveles de NRG se encuentran incrementados en cáncer de mama invasivo (Barros *et al.*, 2010).

3.3.4. Mutaciones en los componentes de la red de señalización por debajo de los receptores ErbB

Además de las alteraciones presentes en cáncer en los receptores ErbBs y en sus ligandos, también se han observado alteraciones en las moléculas que participan en la cascada de señalización activadas por estos receptores, por ejemplo se ha visto activación de PI3K y de Akt. También puede darse la disminución de proteínas que regulan negativamente la vía de PI3K/Akt como ocurre con la fosfatasa PTEN. De hecho, se ha descrito la sobreexpresión de PI3K por amplificación génica y la presencia de mutaciones activantes de esta quinasa en diversos tumores. Este tipo de mutaciones suelen estar relacionadas con la aparición de resistencias a terapias anti-ErbBs (Brunner-Kubath *et al.*, 2010).

3.4. Terapias anti-ErbBs

Actualmente el paradigma terapéutico en cáncer está siendo redireccionado hacia la utilización de lo que se denominan “terapias personalizadas”. En esto tienen mucho que ver los nuevos fármacos dirigidos contra los receptores ErbB y los componentes de vías de señalización. Estas aproximaciones han permitido desarrollar tratamientos más eficaces, que otorgan mejores perspectivas para el paciente tanto en la progresión de la enfermedad como en la calidad de vida. Es por esto que resulta fundamental una completa caracterización de los mecanismos biológicos que se encuentran alterados en estas patologías, con perspectivas al desarrollo de nuevos fármacos y/o la determinación de marcadores pronóstico o predictivos de la enfermedad.

Diversas estrategias dirigidas contra los receptores ErbB han sido diseñadas con el fin de ser utilizadas en el tratamiento del cáncer. (Cai *et al.*, 2010).

Anticuerpos monoclonales

Son anticuerpos dirigidos contra epítopos pertenecientes al ectodominio de los receptores ErbB. El trastuzumab (Herceptina®) se une al subdominio IV de la

región extracelular del receptor ErbB2 (Park *et al.*, 2008). El pertuzumab se une al subdominio II de la región extracelular de ErbB2, específicamente al brazo de dimerización (Franklin *et al.*, 2004). El cetuximab (Erbitux®) es un anticuerpo monoclonal quimérico de humano y ratón, que se une al subdominio III de la región extracelular del receptor EGFR, impidiendo la unión de cualquiera de sus ligandos (Li *et al.*, 2005). El panitumumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que al igual que cetuximab se une al subdominio III del receptor (Yang *et al.*, 2001). Todos estos anticuerpos están siendo utilizados en clínica (Roskoski, 2014).

Todavía no se conocen con exactitud todos los mecanismos que median el efecto del anticuerpo, pero se sabe que influyen en la regulación negativa del receptor, arresto del ciclo celular, inhibición de la angiogénesis y promoción de la citotoxicidad mediada por anticuerpo (ADCC, *antibody-dependent cell mediated cytotoxicity*), (Cai *et al.*, 2010).

Inhibidores de la actividad tirosina quinasa

Estos inhibidores son moléculas sintéticas capaces de competir con el ATP por el sitio de unión en el dominio intracelular de dichos receptores (Levitzki *et al.*, 1995). Existen inhibidores de quinasa con alta o baja especificidad de diana, como aquellos capaces de inhibir simultáneamente a receptores ErbB y quinasas de otras familias. Los que se mencionan a continuación, que son los más desarrollados, son derivados de quinazolina y se unen al bolsillo de unión a ATP en el dominio quinasa del receptor, y actúan específicamente sobre los receptores ErbB (Denny, 2001; Fry, 2003). Estos fármacos se subdividen en dos clases: reversibles, como son el erlotinib, gefitinib, lapatinib y CP 724.714; e irreversibles, entre los que se encuentran el afatinib, pelitinib, neratinib y canertinib. De los inhibidores mencionados, los que han sido aprobados para su uso en clínica son el erlotinib, gefitinib, lapatinib y afatinib (información obtenida del Instituto Nacional del Cáncer de EEUU).

3.5. Inhibidores de intermediarios de la señalización por receptores ErbB

La sobreactivación de la vía de señalización por receptores ErbB, como se mencionó anteriormente, puede deberse a alteraciones en las moléculas que

participan en dicha señalización. En clínica se han aprobado diferentes fármacos dirigidos contra estos intermediarios: el everolimus (inhibidor de mTOR) está siendo utilizado en cáncer de páncreas, riñón y cerebral; el dasatinib (inhibidor de Src, Abl y c-Kit) en leucemia, el vemurafenib y dabrafenib (inhibidores de B-Raf) y el trametinib (inhibidor de Mek1/2) están siendo utilizados en melanoma (información obtenida del Instituto Nacional del Cáncer de EEUU).

4. Un nuevo intermediario en la señalización por NRG

Como hace referencia el título del presente trabajo de tesis, un nuevo intermediario de la vía de señalización por receptores ErbB-NRG se ha identificado: VANGL Planar Cell Polarity Protein 1, con otras denominaciones como Vangl1, Vang-Like1 (Van Gogh, *Drosophila*), Strabismus 2 (STB2/STBM2), Loop-Tail Protein 2 Homolog (LPP2) y KITENIN (KAI1 COOH-Terminal Intercating Tetraspanin). (Jessen *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004).

El gen *Vangl* fue inicialmente identificado en estudios genéticos realizados en la mosca *Drosophila melanogaster*, en mutantes que presentaban aberraciones en la estructura de determinados apéndices en el ala y las piernas (pelos-cerdas) y en la orientación del omatidio, la unidad estructural del ojo (Taylor *et al.*, 1998; Wolff *et al.*, 1998). Los fenotipos observados (Figura 7) demuestran que Vangl tiene un papel importante en la orientación de las células en el plano de las estructuras epiteliales, proceso que se conoce como polaridad planar de la célula o PCP (*planar cell polarity*). En mamíferos, Vangl también regula el proceso de extensión convergente o gastrulación que es crítico en la formación de varias estructuras embrionarias, incluyendo el tubo neural y el corazón (Iliescu *et al.*, 2011).

4.1. Vangl1 y su papel en el desarrollo

El establecimiento de la polaridad es necesario en el desarrollo de organismos tanto unicelulares como multicelulares, procariotas y eucariotas, y es fundamental para la generación de la diversidad celular y la especialización tisular. En una célula la distribución asimétrica de moléculas reguladoras es requerida para establecer los diferentes destinos de las células hijas, y permite el establecimiento especializado de estructuras anteriores y posteriores, como las

dendritas y los axones en una neurona, y la especialización de los dominios apical y basal en muchos tipos celulares. En tejidos animales, la polaridad de grupos de células está coordinadamente regulada y esta polaridad tisular o polaridad en el plano de un epitelio, organiza el epitelio en unidades funcionales. (Wolff *et al.*, 1998; Bellaïche *et al.*, 2004).

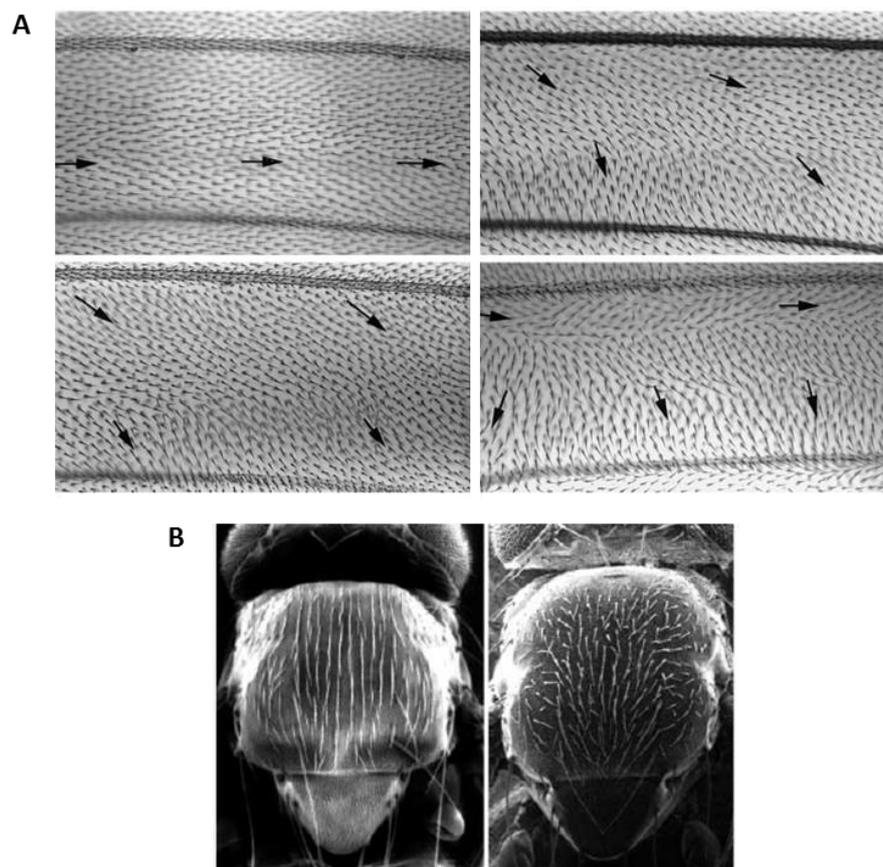


Figura 7. Defectos en la polaridad planar celular en mutantes en *Vangl* de *Drosophila*. **A.** Defectos en la orientación de los pelos de la superficie dorsal del ala. La micrografía superior izquierda pertenece a *Vangl* normal y las 3 restantes corresponden a distintas formas mutadas del gen. Las flechas indican la dirección de la polaridad. (Taylor *et al.*, 1998). **B.** Micrografías del tórax de *Drosophila* con *Vangl* normal (izquierda) y mutado (derecha). (Wolff *et al.*, 1998).

La superficie cuticular de *Drosophila* posee un elevado número de estructuras polarizadas como pelos, cerdas y omatidios. En cualquier región del cuerpo estas estructuras están alineadas en paralelo, dando a la región “polaridad de tejido”. Por este motivo durante años se han estudiado las bases genéticas que permiten el desarrollo de la polaridad tisular en el ala, el ojo y el abdomen de *Drosophila*, para comprender mejor cómo se regula este proceso. (Taylor *et al.*, 1998).

El mecanismo por el que se produce la PCP ha sido bien caracterizado en el desarrollo del epitelio del ala de las moscas, donde la localización apical asimétrica de complejos celulares dirige el posicionamiento de los pelos del ala (Taylor *et al.*, 1998). Las proteínas Prickle, Vang y Flamingo (*Drosophila* Fmi/mamíferos CELSR) forman un complejo en el lado proximal de cada célula, mientras que Frizzled (*Drosophila* Fz/mamíferos Fzd), Dishevelled (Dsh/Dvl), Diego y Fmi forman un complejo en el lado distal (Figura 8). Esta segregación se mantiene por dos mecanismos generales de retroalimentación positiva. Primero, cada complejo restringe la localización subcelular de su complejo opositor, por ejemplo Vang y Prickle previenen la ubicación proximal de Dsh. Segundo, complejos opositores en células vecinas interactúan, por ejemplo Vang proximal interactúa con Fz distal en células adyacentes para reforzar y propagar la señal de polaridad a través del tejido. Si estas funciones se eliminan se interrumpe la PCP, conduciendo a fenotipos aberrantes que se propagan más allá de las células manipuladas, lo que demuestra que la comunicación intercelular es necesaria para dirigir la PCP (Bellaïche *et al.*, 2004; Hatakeyama *et al.*, 2014). Como se hizo referencia anteriormente la localización asimétrica de determinados componentes también se observó en el desarrollo del ojo y del tórax de *Drosophila*. (Wolff *et al.*, 1998).

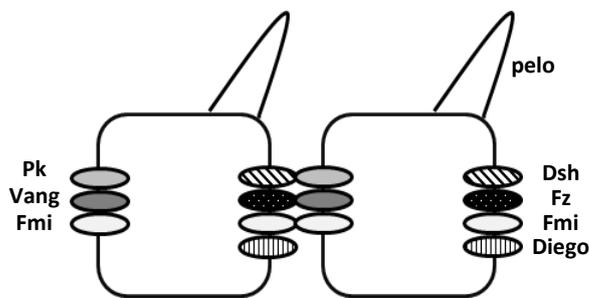


Figura 8. Esquema de PCP en el ala de *Drosophila*. En el extremo distal de las células epidérmicas del ala, Frizzled (Fz) promueve la formación de estructuras de actina que constituyen los pelos. Pk (Prickle), Fmi (Flamingo), Dsh (Dishevelled).

La ruta de PCP se ha mantenido conservada en mamíferos y un ejemplo claro es la orientación de los estereocilios en el epitelio neurosensor del oído interno. Los ortólogos de Vang en mamíferos son dos parálogos Vangl1 y Vangl2, cuya secuencia aminoacídica presenta 64,3% de identidad y 78,6% de similitud (Belotti *et al.*, 2012).

En el ratón, mutaciones en los genes PCP *Vangl1* o *Vangl2*, *Dsh* (*Dvl*) y *Fmi* (*CELSR1*) provocan disrupciones en estas estructuras del oído interno. Además, en vertebrados los genes relacionados con los genes PCP de la mosca regulan los

movimientos de extensión convergente durante la embriogénesis, incluidos el angostamiento y alargamiento de la placa neural, necesarios para el cierre del tubo neural. Mutaciones en *Vangl1/Vangl2*, *Dvl1/2*, *Dvl2/3*, *CELSR1* y *Fz3/6* causan craneorraquisquisis, la forma más grave de las anomalías del tubo neural, en la que tanto el cerebro como la médula espinal permanecen abiertos en grado variable y el embrión muere en el útero. (Belotti *et al.*, 2012; Jessen *et al.*, 2004).

En mamíferos los genes *Vangl1* y *Vangl2*, codifican proteínas que se expresan durante la embriogénesis y presentan patrones de expresión complementarios durante el desarrollo del tubo neural. *Vangl2* se expresa en niveles elevados y ampliamente en las porciones dorsales y ventrales del tubo neural, antes, durante y luego del cierre (E7,5-E11,5); mientras que la expresión de *Vangl1* se encuentra restringida principalmente a la porción ventral del tubo neural y a la notocorda. (Belotti *et al.*, 2012).

Estudios realizados en pez cebra también muestran que *Vangl1* y *Vangl2* se expresan ampliamente y de manera no solapante durante la embriogénesis. *Vangl2* se expresa de forma predominante en esta etapa y funciona en diversos procesos como la gastrulación y la migración neuronal, mientras que la expresión de *Vangl1* comienza más tarde y pareciera estar restringida al sistema nervioso. Sin embargo, la inyección de RNA *Vangl1* logró suprimir parcialmente los defectos en gastrulación en embriones mutantes en *Vangl2*, lo que sugiere que *Vangl1* y *Vangl2* tienen funciones bioquímicas similares (Jessen *et al.*, 2004).

En humanos se han identificado mutaciones de pérdida de función en los genes *Vangl1* y *Vangl2* en casos familiares y esporádicos con defectos en el tubo neural (Iliescu *et al.*, 2011).

Además de la importancia evidente que tienen *Vangl1* y *Vangl2* en el desarrollo del embrión, la expresión de ambos persiste en ciertos tejidos luego del nacimiento (Iliescu *et al.*, 2011).

4.2. Vangl1, una tetraspanina de membrana

Por estudios de inmunofluorescencia y fraccionamiento celular tanto *in vivo* en tejidos primarios, como *in vitro* en células en cultivo transfectadas, se comprobó que *Vangl1* es una proteína integral de membrana cuya ubicación es esencial para

Introducción

su función (Iliescu *et al.*, 2011). Su secuencia que consta de 524 aminoácidos permite predecir 4 dominios transmembrana que están altamente conservados en ratón, humano, pez cebra, gusano y mosca, y que han sido experimentalmente corroborados. En los estudios topológicos, también se ha demostrado que posee dos bucles extracelulares entre los dominios transmembrana 1-2 y 3-4, uno intracelular entre los dominios transmembrana 2-3 y que los extremos N- y C-terminal (amino y carboxilo terminal, respectivamente) se encuentran orientados hacia el interior de la célula (Figura 9). Esta distribución permite la presencia de una larga cola citoplasmática en el extremo C-terminal con dominios de interacción proteína-proteína “coiled-coil” y el motivo de unión a PDZ, que interacciona con los subdominios DIX de las proteínas PCP citoplasmáticas Dvl1, Dvl2 y Dvl3. Además, ubica los motivos de direccionamiento a membrana y/o internalización por endocitosis mediada por clatrina que se encuentran en los extremos N-terminal (YSFG₇₋₁₀, YSYY₁₀₋₁₃, y LL₅₆₋₅₇) y C-terminal (YKDF₂₈₄₋₂₈₇ y NPNL₂₉₁₋₂₉₄) de la proteína, donde se espera que puedan ser funcionales. Sin embargo, este modelo sugiere que los sitios predictivos para N-glicosilación en residuos de asparagina NDS₅₉₋₆₁ (N-terminal), NST₃₁₄₋₃₁₆, y NNS₃₁₇₋₃₁₉ (C-terminal), no estarían sujetos a esta modificación ya que mapean en las porciones de la proteína orientadas hacia la cara intracelular. (Iliescu *et al.*, 2011; Hatakeyama *et al.*, 2014).

Cabe destacar que a pesar de los patrones de expresión no solapantes observados para Vangl1 y Vangl2 durante el desarrollo, también ha sido descrito que Vangl2 es capaz de formar homodímeros y heterodímeros con Vangl1 (Belotti *et al.*, 2012). Aunque aún no se conoce bien dónde, cómo y la función de dicha interacción, se ha observado, por ejemplo, la colocalización de ambas proteínas por inmunofluorescencia en la cóclea del ratón. Aparentemente esta dimerización podría ocurrir en *cis* (en la misma membrana) y/o en *trans* (entre proteínas presentes en membranas de células adyacentes), para lo cual se ha visto que serían suficientes los dominios transmembrana y los bucles extracelulares, y no dependería de las porciones N- y C-terminal de Vangl2. (Belotti *et al.*, 2012).

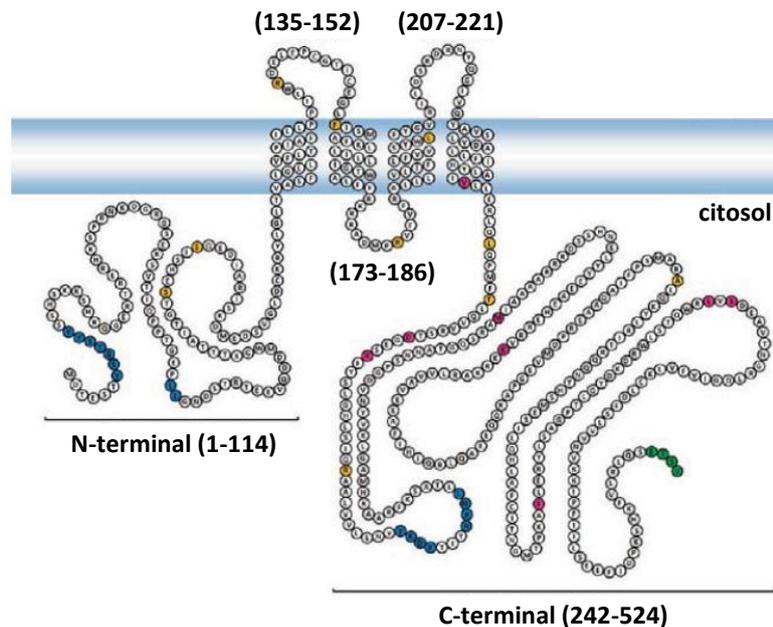


Figura 9. Topología de Vangl1. Los números entre paréntesis corresponden a la posición de los residuos aminoacídicos en la secuencia primaria de Vangl1. Además, se indica el motivo de unión a dominios PDZ (verde), los motivos asociados al direccionamiento hacia la membrana (azul) y residuos que se han encontrado mutados en ratones y humanos con defectos en el tubo neural (naranja y rosa), (Ilescu *et al.*, 2011).

4.3. Vangl1 en cáncer

Numerosos estudios han demostrado que la ruta de señalización que regula la PCP es esencial para el desarrollo embrionario, sin embargo su participación en el mantenimiento del tejido adulto es poco comprendida. Dado que esta vía regula procesos de diferenciación, movilidad celular y organización del tejido durante el desarrollo, se ha propuesto que componentes claves como Vangl1 y Vangl2, pueden encontrarse desregulados en cáncer.

En concordancia con esta hipótesis, se demostró que la sobreexpresión de Vangl1 en la línea celular de cáncer de colon de ratón CT-26, aumenta la invasión y la adhesión a fibronectina *in vitro* y favorece la tumorigénesis y metástasis *in vivo*. Además, se ha visto en pacientes con cáncer de colon (Lee *et al.*, 2004) y gástrico (Ryu *et al.*, 2010) una expresión superior de Vangl1 en la mucosa del tumor y en los tejidos metastáticos, respecto de la mucosa normal. Por otra parte, la supresión de Vangl1 mediante pequeños ARNs de interferencia (siRNA) ha demostrado

Introducción

disminuir la metástasis del cáncer de colon en ratón, lo que apoya un papel promotor de la metástasis por parte de Vangl1 (Lee *et al.*, 2005); probablemente a través de la señalización por PCP y aumento de motilidad y/o invasividad mediados en ciertos casos por un complejo funcional formado por Vangl1, Dvl y PKC δ (Kho *et al.*, 2009).

En líneas celulares de hepatocarcinoma la disminución de los niveles de Vangl1 inhibe la progresión, lo cual está asociado con una disminución en la expresión de los genes diana de AP-1, como COX-2 y MMP3 (Cho *et al.*, 2011).

Además, ha sido reportada la interacción del supresor de metástasis KAI1/CD82 con Vangl1 en líneas celulares de cáncer de colon y de vejiga. En éstas últimas la pérdida de dicha interacción previene la actividad supresora de metástasis de KAI1/CD82, lo que sugiere que Vangl1 podría funcionar como un promotor de metástasis y que el papel de KAI1/CD82 sería modular esta actividad a través de su unión. (Lee *et al.*, 2004; Rowe *et al.*, 2006).

La sobreexpresión de Vangl1 también aumenta la invasión y migración de células de carcinoma escamoso *in vitro* y promueve la metástasis *in vivo* en un modelo de carcinoma escamoso en ratón. Además, en pacientes con cáncer de laringe la expresión elevada de Vangl1 se correlaciona significativamente con un estadio avanzado, tamaño del tumor y metástasis en ganglios linfáticos (Lee *et al.*, 2011).

En glioma, pacientes con niveles bajos de expresión de Vangl1 mostraron una supervivencia libre de progresión significativamente mayor que los pacientes con niveles de expresión elevados. Por otra parte, en líneas celulares se observó que la capacidad de Vangl1 de promover la invasión y progresión se asocia a la inducción de transición epitelio-mesénquima y marcadores de células madre (Lee *et al.*, 2015).

Con respecto a la polaridad, se ha descrito que Vangl1 forma un complejo con Scrib y NOS1AP que regula la polaridad celular y la migración, y que este complejo está asociado con la progresión del cáncer de mama. En células de cáncer de mama invasivo, estas proteínas colocalizaban en los extremos de las protrusiones celulares. Por el contrario, en las células mamarias normales Scrib y Vangl1 se localizaban en los sitios de unión célula-célula, mientras que NOS1AP

permanecía en el citosol. En la línea celular MDA-MB-231 el silenciamiento de cualquiera de estas proteínas impidió la migración en un ensayo de transwell. Además, en pacientes, la expresión elevada de Vangl1 y Scrib se correlaciona con un aumento en el riesgo de recurrencia tumoral. (Anastas *et al.*, 2012).

A pesar de la clara evidencia de la participación de Vangl1 en algunos cánceres, aún no se conoce bien la función que ejerce. En el epitelio intestinal se ha visto que Vangl1 actúa como efector en la vía de señalización activada por el Factor Intestinal Trefoil (ITF)/TFF3 que regula la reparación de heridas en este tejido (Kalabis *et al.*, 2006).

Recientemente en cáncer colorectal se ha descrito la existencia de una vía de señalización involucrada en la invasividad, activada por EGF pero independiente de EGFR en la que participarían Vangl1 y ErbB4 (Bae *et al.*, 2014).

Si bien la expresión de Vangl1 está asociada en algunos pacientes con un peor pronóstico, ni *Vangl1* ni *Vangl2* han sido identificados como oncogenes, lo que sugiere que podrían funcionar más tarde en el desarrollo del tumor tomando parte en la enfermedad metastática, en vez de tener un papel directo en la tumorigénesis (Hatakeyama *et al.*, 2014).

Aunque previamente se hizo referencia a una correlación entre niveles elevados de Vangl1 y progresión tumoral aún no es claro que siempre sea así. Diferentes componentes de la vía PCP han mostrado estar involucrados en modular la progresión del cáncer debido a su papel en movilidad celular. Sin embargo, la señalización por PCP en algunas instancias y/o contextos celulares también podría inhibir la progresión del cáncer, como ocurre por antagonismo entre rutas de Wnt o por sobreexpresión de β -catenina durante el desarrollo del tumor. Lo mismo sucede con algunas moléculas accesorias involucradas en la vía de PCP, como Vangl1, cuyo papel en los distintos estadios de progresión del cáncer de mama aún no es claro. Podría ser que esta vía de señalización tenga un papel dual en la progresión del cáncer de mama, actuando como inhibidor en estadios tempranos y como promotor en estadios tardíos de la enfermedad. (Lee *et al.*, 2004; MacMillan *et al.*, 2014).

Objetivos

Objetivos

La búsqueda de nuevas terapias no sólo involucra el desarrollo de mejores fármacos para dianas existentes sino que es imprescindible la identificación de otras alteraciones que puedan contribuir a la carcinogénesis y/o la resistencia. En ello tiene relevancia el estudio de las vías de señalización, como es el caso de la vía de señalización de los receptores ErbBs y sus ligandos, que como se mencionó anteriormente tiene una vinculación directa con cáncer y su completa caracterización está aún lejos de ser alcanzada.

Considerando lo anterior, nos planteamos el siguiente objetivo general:

Identificar y caracterizar nuevos intermediarios en la ruta de señalización NRG-ErbB, mediante aproximaciones proteómicas, genómicas y de genómica funcional.

Materiales y Métodos

Materiales y Métodos

1. Reactivos, equipos y animales de experimentación

Los reactivos generales fueron encargados a Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania), Roche Applied Science (Manheim, Alemania) o Merck (Darmstadt, Alemania).

Los medios de cultivo procedían de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). El SBF, la tripsina-EDTA y los antibióticos penicilina/estreptomicina se obtuvieron de Invitrogen (Gaithersburg, MD, USA). El material de plástico estéril para cultivos celulares fue comprado a Becton & Dickinson (San Diego, CA) y Corning Incorporated (NY, EEUU). Los ligandos utilizados para estimular los cultivos en los experimentos indicados, SDF1 α , NRG β 1 e IGF-1 provenían de Prospec (Israel) y EGF de Strathmann (Hamburgo, Alemania). Los inhibidores Selumetinib, TGX221, BKM120, Gö6976 y BEZ235 fueron obtenidos de LC laboratories (Woburn, MA, EEUU); BIM I de Calbiochem (La Jolla, CA, USA), PIK75 de Selleckchem, PX866 de Cayman chemical, CC214 de Celgene, NSC23766 de Tocris y Dasatinib de Bristol-Myer Squibb (Barcelona, Spain).

Los anticuerpos provenían de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), Cell Signaling Technologies (Beverly, MA, USA), Stressgen Biotechnologies Corporation (British Columbia, Canada), BD Biosciences y Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA).

Las enzimas de restricción y los tampones empleados en las digestiones de ADN, los dNTPs y la ligasa T4 de ADN junto con su tampón fueron distribuidos por Fermentas Life Sciences (Burlington, Canadá). La fosfatasa alcalina y su tampón fueron de Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania). La fosfatasa lambda y su tampón de New England BioLabs (Ipswich, MA, USA). La enzima DNA polimerasa y su tampón de reacción fueron obtenidos de Biotools (B&M Labs; Madrid). La enzima MMLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) y los oligonucleótidos utilizados en las diferentes PCR fueron de Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA). El *RNasin RNase Inhibitor* fue suministrado por Promega (Madison, Wisconsin). Para la extracción de ARN se utilizó el reactivo

Trizol® (Invitrogen). El kit *QuikChange II Site Directed Mutagénesis* fue de Stratagene (Las Rozas, Madrid).

Los vectores lentivirales fueron obtenidos de Thermo Scientific (Waltham, MA, USA).

La proteína A-Sefarosa™ y la GammaBind™ G Sefarosa™ fueron distribuidos por GE Healthcare (Uppsala, Suecia). Las membranas de PVDF Immobilon fueron compradas a Millipore Corporation (Billerica, MA) y las películas de autorradiografía a Fujifilm Corporation (Tokio, Japón).

Los péptidos utilizados para la generación de anticuerpos fueron encargados a Eurogentec (Seraing, Bélgica). La hemocianina de lapa (KLH) fue distribuida por Calbiochem (Darmstadt, Alemania), y el éster de N-hidroxisuccinimida del ácido m-maleibenzoico (MBS) se obtuvo de Sigma (Steinheim, Alemania). El adyuvante completo de Freund utilizado fue de Pierce (Rockford, IL) y el incompleto de Sigma (Steinheim, Alemania). La Sefarosa CL-4B se obtuvo de GE Healthcare (Uppsala, Suecia). La emulsión se realizó usando un sonicador modelo Sonios vibracell de Sonics&Materials Inc. (Newtown, CT) con una potencia máxima de 500 vatios.

Los conejos inmunizados para obtener los anticuerpos eran de la raza *New Zealand* y distribuidos por la Granja San Bernardo (Tulebras, Navarra). Todos los procedimientos con animales de experimentación se realizaron de acuerdo con la normativa internacional y nacional que regula el cuidado de los animales de laboratorio en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio establecidos en la Directiva 86/609/CEE que se desarrollan en la Ley 3/2007.

Las medidas de absorbancia y la cuantificación de proteínas se realizaron en un espectrofotómetro modelo SmartSpec™Plus (BioRad). En el caso de las placas multipocillo la densidad óptica se determinó utilizando un lector automático ULTRA Evolution de Tecan (Männedorf, Suiza).

2. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en este trabajo y su procedencia se especifican en las tablas: Tabla II (anticuerpos primarios comerciales), Tabla III (anticuerpos primarios generados en el laboratorio) y Tabla IV (anticuerpos secundarios).

Todos los anticuerpos generados en el laboratorio, en este trabajo o previamente, son anticuerpos policlonales de conejo y se obtuvieron siguiendo el procedimiento que se indica en la sección 2.1.

Tabla II. Anticuerpos primarios comerciales

Anticuerpo	Antígeno	Especie	Casa comercial
Anti-pSer	Serina fosforilada	Conejo (policlonal)	Invitrogen
Anti-Vangl1 (E19)	Vangl1	Cabra (policlonal)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Vangl1 (E3)	Vangl1	Ratón (monoclonal)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-HA	Hemaglutinina	Ratón (monoclonal)	Roche
Anti-DNA-PK	DNA-PK	Conejo (policlonal)	Cell Signaling Technologies
Anti-PKC δ	PKC δ	Ratón (monoclonal)	BD Biosciences
Anti-SSH1	SSH1	Conejo (monoclonal)	Cell Signaling Technologies
Anti-pErk1/2	pT ²⁰² pY ²⁰⁴ -Erk1/2	Conejo (policlonal)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-pSrc	pY ⁴¹⁶ -Src	Conejo (policlonal)	Cell Signaling Technologies
Anti-JIP4	JIP4	Cabra (policlonal)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-GAPDH	GAPDH	Ratón (monoclonal)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Calnexina	Calnexina	Conejo (policlonal)	Stressgen

Tabla III. Anticuerpos primarios generados en el laboratorio

Anticuerpo	Antígeno	Epítipo
Anti-pM1 (peptídico)	pS ³¹³ -P-Rex1	H2N- VTGSKKpSTKRTK -COOH (Montero <i>et al.</i> ,2011)
Anti-pM2 (peptídico)	pS ³¹⁹ -P-Rex1	H2N- TKRTKpSINGSL -COOH (Montero <i>et al.</i> ,2011)
Anti-pM3 (peptídico)	pS ⁶⁰⁵ -P-Rex1	H2N- EMEGTpSSKNKQ -COOH (Montero <i>et al.</i> ,2011)
Anti-pM4 (peptídico)	pS ¹¹⁶⁹ -P-Rex1	H2N- TMSYRDpSYSECN -COOH (Montero <i>et al.</i> ,2011)
Anti-Pan-P-Rex	P-Rex1	aminoácidos 1032-1142

(proteína fusión)		(Montero <i>et al.</i> ,2011)
Anti-pAkt (peptídico)	pS ⁴⁷³ -Akt	H2N- CETPDSYRDSpSER -COOH (Montero <i>et al.</i> ,2011)
Anti-NRG α 2c (peptídico)	Neuregulina α 2c C-terminal	H2N- CETPDSYRSDPHSER -COOH (Montero <i>et al.</i> , 2000)
Anti-pS20 (peptídico)	pS ²⁰ -Vangl1	H2N- SSHSKKpSHRQGE -COOH
Anti-pS17 (peptídico)	pS ¹⁷ -Vangl1	H2N- SSHpSKKSHRQGE -COOH

Tabla IV. Anticuerpos secundarios

Especie reconocida	Molécula conjugada	Antígeno	Casa comercial
Conejo	HRP	IgG (H+L)	Bio-Rad
Conejo	HRP	IgG (L)	Jackson Immunoresearch
Ratón	HRP	IgG (H+L)	Bio-Rad
Ratón	HRP	IgG (L)	Jackson Immunoresearch
Cabra	Cy3	IgG (H+L)	Jackson Immunoresearch
Ratón	Cy3	IgG (H+L)	Jackson Immunoresearch

H: cadena pesada de la inmunoglobulina; L: cadena ligera de la inmunoglobulina

2.1. Generación de anticuerpos

2.1.1. Acoplamiento de los péptidos

Para producir sueros anti-peptídicos es necesario acoplar la secuencia de aminoácidos de interés a KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*, Hemocianina de Lapa) antes de inmunizar los conejos, evitando así su eliminación. El procedimiento seguido fue el descrito por Sambrook (Sambrook 1989) que se resume a continuación. A 1 ml de KLH diluida en PBS a una concentración final de 10 mg/ml se le añadieron 50 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO) que contenían 1,5 mg de MBS (3-*Maleimidobenzoic Acid N-Hydroxysuccinimide Ester*, éster de N-Hidroxisuccinamida del Ácido m-Maleimidobenzoico). Se agitó esta mezcla durante 30 minutos y se pasó por una columna de Sephadex G-25 para obtener el complejo diluido en PBS pH 7,4. Se identificaron las fracciones que contenían KLH, midiendo la absorbancia

a una $\lambda=280$ nm, y se juntaron todas las que presentaban un valor mayor de 0,5. Paralelamente se disolvieron 5 mg de péptido sintético en el mínimo volumen posible de PBS pH 7,4, hasta un volumen máximo de 500 μ l. El péptido disuelto se mezcló con la solución de KLH-MBS y se mantuvo en agitación moderada durante 1 hora a temperatura ambiente para promover su acoplamiento.

2.1.2. Obtención de antisueros

Para inducir la producción de antisueros policlonales se siguió un protocolo de inmunización en conejos de raza *New Zealand* a los que se les inyectaron dos dosis (1 mg y 500 μ g) del péptido de interés. Para la primera inoculación se mezclaron 1 mg de péptido acoplado a KLH con un volumen equivalente de adyuvante de Freund completo añadido en fracciones de 100 μ l, mientras se agitaba vigorosamente. La suspensión fue sonicada hasta conseguir una emulsión que se inyectó subcutáneamente en varios puntos del dorso de los conejos (aproximadamente 0,2 ml por punto). A los 21 días de la primera inoculación, se administró una dosis de recuerdo consistente en la inyección de una emulsión de 500 μ g de péptido con adyuvante incompleto de Freund, en un único punto de la región glútea de los animales. Diez días más tarde se les extrajo sangre por canulación de la arteria central de la oreja. La sangre se dejó coagular, se centrifugó a baja velocidad y el suero se conservó a -20 °C hasta su purificación por cromatografía de afinidad. A partir de la primera extracción se realizaron sangrados periódicamente (cada 10 días) hasta que disminuyó el título del anticuerpo.

2.1.3. Purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad

Los anticuerpos se purificaron por cromatografía de afinidad utilizando columnas con el péptido que reconocen acoplado. Para prepararlas se utilizó una matriz de Sefarosa CL-4B activada con bromuro de cianógeno (CNBr) que se incubó con HCl 1 mM durante 15 minutos siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Transcurrido este tiempo se equilibraron con tampón de acoplamiento (NaCl 0,5 M; NaOH 0,1 M pH 8,2), se añadió el péptido previamente acoplado a BSA y se incubaron a 4 °C durante toda la noche en agitación.

Transcurrido ese tiempo se lavaron nuevamente con tampón de acoplamiento y se bloquearon los sitios de unión a la resina que aún no estaban

ocupados con Tris 0,1 M pH 8 durante 2 horas. A continuación se lavaron las columnas con tres ciclos de cambio de pH haciendo pasar alternativamente tampón acetato 0,1 M pH 4 con NaCl 0,5 M y tampón Tris 0,1 M pH 8 con NaCl 0,5 M. Finalmente las columnas se lavaron con PBS y se mantuvieron en el mismo tampón hasta el momento de la purificación de los anticuerpos.

Para evitar la reactividad cruzada de los anticuerpos anti-pS17 y anti-pS20 se incubó cada antisuero con la columna que contiene acoplado el péptido contrario; es decir, el suero anti-pS17 se incubó en la columna con el péptido pS20 y al revés para el suero anti-pS20, durante 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C en agitación. Tras la incubación se recogió el suero no acoplado, que ya no contiene los anticuerpos capaces de reconocer al péptido contrario. Para asegurar la eliminación completa de los anticuerpos capaces de reconocer al péptido contrario, se repitió la purificación cruzada incubando el suero no acoplado en la misma columna. Finalmente se recogió el suero no acoplado y se incubó en la columna con el antígeno correspondiente acoplado. En este caso se desechó el suero no acoplado y se lavó la columna con Tris 10 mM pH 8 NaCl 0,5 M hasta que la absorbancia a $\lambda=280$ nm del lavado era inferior a 0,01. En ese momento se comenzó la elución del anticuerpo unido a la columna añadiendo glicina 0,1 M a pH 2,6. Las fracciones recogidas, de un 1 ml cada una, se neutralizaron con 100 μ l de Tris-HCl pH 8 por fracción. Para comprobar la presencia de anticuerpo en las fracciones, se midió la absorbancia de cada una de ellas a $\lambda=280$ nm y se juntaron las fracciones con mayor absorbancia.

Una vez purificados los anticuerpos, se comprobó su funcionamiento y especificidad en experimentos de inmunoprecipitación (IP), Western blot (WB) e inmunofluorescencia (IF).

3. Cultivo Celular

3.1. Condiciones de cultivo y líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas para el desarrollo de este trabajo son de origen humano y sus características se detallan en la Tabla V.

Tabla V. Líneas celulares

Línea Celular	Tejido	Medio de Cultivo
MCF7	Adenocarcinoma de mama (ER+/HER2 bajo)	DMEM 10% SBF
T47D	Carcinoma ductal de mama (ER+/HER2 bajo)	DMEM 10% SBF
BT474	Carcinoma ductal de mama (HER2+)	DMEM 10% SBF
HCC1954	Carcinoma ductal de mama (HER2+)	RPMI 10% SBF
HCC1569	Carcinoma de mama (HER2+)	RPMI 10% SBF
HCC2218	Carcinoma ductal de mama (HER2+)	RPMI 10% SBF
HCC1419	Carcinoma ductal de mama (HER2+)	RPMI 10% SBF
SKBR3	Adenocarcinoma de mama (HER2+)	DMEM 10% SBF
MDA MB-231	Adenocarcinoma de mama (TNBC)	DMEM 10% SBF
HBL100	Carcinoma de mama (TNBC)	DMEM 10% SBF
HCC1187	Carcinoma ductal de mama (TNBC)	RPMI 10% SBF
HCC70	Carcinoma ductal de mama (TNBC)	RPMI 10% SBF
HCC3153	Carcinoma ductal de mama (TNBC)	RPMI 10% SBF
HCC1937	Carcinoma ductal de mama (TNBC)	RPMI 10% SBF
HS578T	Carcinoma ductal de mama (TNBC)	RPMI 10% SBF
BT549	Carcinoma ductal de mama (TNBC)	RPMI 10% SBF
A2780	Adenocarcinoma de ovario	RPMI 10% SBF
OVCAR-8	Adenocarcinoma de ovario	DMEM 10% SBF
OVCAR-3	Adenocarcinoma de ovario	DMEM 10% SBF
IGROV-1	Adenocarcinoma de ovario	RPMI 10% SBF
SKOV-3	Adenocarcinoma de ovario	DMEM 10% SBF
HepG2	Hepatocarcinoma	DMEM 10% SBF
Huh7	Hepatocarcinoma	DMEM 10% SBF
KB	HNSCC	DMEM 10% SBF
SCC2	HNSCC	DMEM 10% SBF
SCC8	HNSCC	DMEM 10% SBF
SCC9	HNSCC	DMEM 10% SBF
SCC24B	HNSCC	DMEM 10% SBF
SCC29	HNSCC	DMEM 10% SBF
SCC34	HNSCC	DMEM 10% SBF

Materiales y Métodos

SCC38	HNSCC	DMEM 10% SBF
SCC40	HNSCC	DMEM 10% SBF
SCC42B	HNSCC	DMEM 10% SBF
A549	NSCLC	DMEM 10% SBF
H1299	NSCLC	DMEM 10% SBF
H460	NSCLC	DMEM 10% SBF
H727	NSCLC	DMEM 10% SBF
H23	NSCLC	RPMI 10% SBF
H1975	NSCLC	RPMI 10% SBF
GLC8	SCLC	RPMI 10% SBF
DMS92	SCLC	RPMI 10% SBF
U266	Mieloma múltiple	RPMI 10% SBF
U266-DOX4	Mieloma múltiple	RPMI 10% SBF
U266-LR7	Mieloma múltiple	RPMI 10% SBF
MM1R	Mieloma múltiple	RPMI 10% SBF
RPMI	Mieloma múltiple	RPMI 10% SBF
OPM2	Mieloma múltiple	RPMI 10% SBF
NCI-H929	Mieloma múltiple	RPMI 10% SBF
MM1S	Mieloma múltiple	RPMI 10% SBF
HELA	Carcinoma de cérvix	DMEM 5% SBF
HEK-293	Fibroblasto embrionario de riñón	DMEM 5% SBF

HER2+ (amplificación/sobreexpresión de ErbB2), TNBC (cáncer de mama triple negativo), NSCLC (cáncer de pulmón no microcítico), SCLC (cáncer de pulmón microcítico), HNSCC (carcinoma escamoso de cabeza y cuello). La línea celular HBL100 ha sido descatalogada de la ATCC por problemas de autenticidad.

Las células se cultivaron en placas estériles de 100 mm en un incubador a 37 °C y 5% de CO₂. El medio de cultivo utilizado fue DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*), que contiene 4,5 g/l de glucosa, 4 mM de L-Glutamina y 5 mM de piruvato, y se suplementó con 5 o 10 % de suero bovino fetal (SBF, ver Tabla V), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Con la excepción de las líneas mencionadas en la Tabla V que se cultivaron en medio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*), suplementado con 10 % de SBF, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Cuando las líneas adquirieron un 80-90% de confluencia, se lavaron con PBS estéril (KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 8

mM) para eliminar los restos de medio de cultivo, y se tripsinizaron (0,25% tripsina, EDTA 0,38 g/l) todas salvo las HCC1187, HCC2218, GLC8 y las de mieloma, que se desprendieron de la placa utilizando un rascador (*scraper*). El tratamiento con tripsina de las demás líneas hizo que se despegasen de la placa de cultivo; posteriormente se diluyeron en el medio adecuado a la concentración deseada y se sembraron en placas nuevas. El efecto de la tripsina se neutralizó al añadir medio fresco con suero.

3.2. Preservación de líneas celulares

Para conservar las líneas celulares, éstas se tripsinizaron en la fase de crecimiento exponencial y se centrifugaron a 1200 rpm 5 minutos, tras los cuales, se resuspendieron en 1 ml de medio con 10% de DMSO, como agente crioprotector. Los crioviales se mantuvieron 24 horas a -80 °C y, posteriormente se transfirieron a tanques de nitrógeno líquido dónde se almacenaron. El proceso para la conservación de las líneas HCC1187, HCC2218, GLC8 y de mieloma se realizó de forma similar salvo por la adición de tripsina, que no fue necesaria.

4. Transfección y transducción de líneas celulares

4.1. Transfección con jetPEI™ (PolyPlus Transfection)

Los plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la Tabla VI.

Los experimentos de transfección se realizaron por la técnica que utiliza el reactivo jetPEI™ (PolyPlus Transfection, Sélestat, Francia). Se mezclaron 10 µg de plásmido con 250 µl de NaCl 150 mM, posteriormente se le adicionó 20 µl de jetPEI™ que había sido resuspendido en 250 µl de NaCl. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos y a continuación se adicionó gota a gota sobre una placa de 100 mm que contenía las células que se querían transfectar, que se encontraban a una densidad del 50-60%. A las 24 horas se les cambió el medio de cultivo por medio fresco, y fueron lisadas en las 24-48 horas siguientes para los correspondientes experimentos.

4.2. Transducción con lentivirus y retrovirus

La transducción es la transferencia de ADN de una célula huésped a otra por medio de un virus. En este trabajo se utilizaron lentivirus para los experimentos de

silenciamiento con las secuencias de shRNA clonadas en el vector pLKO, y retrovirus para los experimentos de expresión de HA-Vangl1 clonado en el vector pBabe. Para producir los virus se emplearon las células HEK293T, que derivan de la línea HEK293 y que han sido transformadas con los genes adenovirales E1a y E1b, además de contener inserto el antígeno T del virus SV40 (Graham *et al*, 1977). La transfección de las células HEK293T se realizó con el reactivo Jet PEI como se describe en la sección 4.1.

La producción de lentivirus se realizó con los siguientes plásmidos:

- Vector lentiviral (8 µg): pLKO.1-sh no codificante (control negativo), pLKO.1-GFP (control positivo), pLKO.1-shRNA
- pMDG-VSV-G (4 µg).
- pRSV-Rev (4 µg).
- pMDL-gag/pol (4 µg).

La producción de retrovirus se realizó con los siguientes plásmidos:

- Vector retroviral (3 µg): pBabe (control negativo), pBabe-HAVangl1, pBabe-HAVangl1_S17-20A, pBabe-HAVangl1_S17A y pBabe-HAVangl1_S20A.
- pMDG-VSV-G (2,5 µg).
- pNGVL-MLV-gag-pol (5 µg).

A las 24 horas de la transfección se reemplazó el medio de las células por medio fresco y a las 48 horas se recogió el medio con los virus, se filtró con filtros de PVDF de 0,45 µm, y se le añadió polibreno (Sigma-Aldrich) a una concentración final 6 µg/ml. Este medio se utilizó para transducir las células MCF7 y pasadas 8 horas se les cambió el medio con virus por medio DMEM con SBF 10%. 48 horas después de la infección con los virus, se seleccionaron las células MCF7 con puromicina (3 µg/ml), y se mantuvo entre 1 y 2 semanas.

5. Construcción de mutantes y vectores de expresión

Los estudios con las formas mutantes de Vangl1, se hicieron amplificando el gen Vangl1 de la línea celular MCF7. Para esto se extrajo el ARN de la célula con el reactivo de Trizol®, siguiendo las instrucciones de la casa comercial, y se sintetizó

a partir del mismo el ADNc mediante amplificación con la enzima transcriptasa reversa, utilizando un cebador de oligo dT.

5.1. Extracción de ARN total

El ARN se extrajo de las células mediante el método de extracción fenólica de Chomzinsky y Sacchi (1987) modificado en el protocolo del TRIZOL® Reagent (Invitrogen). Este método se basa en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que tras añadir cloroformo separa la muestra en dos fases, una fase acuosa y otra orgánica. EL ARN permanece en la fase acuosa y es precipitado con isopropanol. Tras precipitar, el ARN se lava con etanol al 75%, se centrifuga y se retira el alcohol y se deja secar el precipitado que se resuspende finalmente en agua tratada libre de ARNasas y se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

Para conocer la concentración y la calidad del ARN obtenido, se preparó una dilución 1:250 de cada muestra en agua DEPC (Dietilpirocarbonato), por duplicado y se midió la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro.

Para comprobar la integridad del ARN extraído cada muestra se mezcló con tampón de carga 10X (azul de bromofenol 0,41%, xylene cyanol 0,41%, glicerol 50%) y se sometieron a electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (2 µg/ml), en tampón TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Las bandas fueron visualizadas en un transiluminador con luz ultravioleta modelo Gel Doc 2000 (Bio-Rad).

5.2. Síntesis de ADNc a partir de ARN: RT-PCR

Se procedió a la síntesis de los ADNs complementarios a partir de las muestras de ARN siguiendo el protocolo de Invitrogen. Se partió de 2 µg de ARN a los que se anilló un oligonucleótido poli-T (0,5 µg) en un volumen final de 15 µl. Se calentaron las muestras durante 5 minutos a 70 °C y tras ese tiempo se añadieron los componentes en el siguiente orden:

- Tampón de reacción 5X (comercial) que contiene MgCl₂ 15 mM, Tris-HCl 250 mM (pH 8), KCl 375 mM y DTT 50 mM.
- Mezcla de nucleótidos (dNTPs) 0,25 mM.
- Inhibidor de ARNasas 25U.

- Transcriptasa reversa M-MLV 200U.
- H₂O.

La reacción de RT-PCR se realizó durante una hora a 37 °C.

5.3. Amplificación de ADNc mediante PCR

La amplificación de las distintas construcciones descritas en la sección 5.4 se realizó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos se describen en la Tabla VII y los componentes de la reacción se detallan a continuación:

- Tampón comercial que contiene MgCl₂ 20 mM, Tris-HCl 750 mM (pH 9), KCl 500 mM y (NH₄)₂SO₄ 200 mM.
- Mezcla de nucleótidos (dNTPs) 0,2 mM.
- Oligonucleótido sentido 0,2 μM.
- Oligonucleótido antisentido 0,2 μM.
- Molde de ADNc 0,5 μg.
- Taq ADN polimerasa 1 U.
- H₂O.

La mezcla se introdujo en un termociclador Mastercycler personal (Eppendorf; Hamburg, Alemania) y las condiciones para la PCR fueron:

- 5 minutos a 96 °C (desnaturalización inicial).
- 30-35 ciclos de :
30 segundos a 95 °C (desnaturalización).
30 segundos a 58-60 °C (anillamiento).
1 minuto/kb a 72 °C (extensión).
- Extensión final: 10 minutos a 72 °C.

El análisis de los productos de PCR, se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% con 2 μg/ml de bromuro de etidio en tampón TAE 1X. Las bandas correspondientes a los fragmentos amplificados fueron visualizadas en un transiluminador de luz ultravioleta. Los tamaños de los diferentes fragmentos, fueron determinados con el marcador de peso molecular 100 bp DNA ladder de Invitrogen.

5.4. Construcción de mutantes

Para diseñar los oligonucleótidos se utilizó como secuencia de referencia la secuencia del ARNm de Vangl1 sin intrones, disponible en la base de datos pública *Ensembl* (www.ensembl.org), y el programa de bioinformática *primer3* (MIT, Cambridge, MT, EEUU).

La secuencia entera de Vangl1 se amplificó en dos partes con los oligonucleótidos descritos en la Tabla VII, utilizando el sitio de restricción interno para la enzima SacI. Se amplificaron ambas secuencias y se digirió la porción N-terminal con las enzimas EcoRI y SacI, y la porción C-terminal con SacI y XhoI. El vector pcDNA3 (Invitrogen) fue digerido con las enzimas EcoRI y XhoI. Las digestiones se purificaron por electroforesis en gel de agarosa con el kit *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) y luego se ligaron con la ligasa DNA T4 (1 unidad) durante 4 horas a temperatura ambiente. La ligación se transformó en la bacteria *E. coli* DH5 α por transformación lenta como se describe en la sección 5.5.2. El vector pcDNA3 utilizado tenía clonada la secuencia que codifica para el epítipo HA en los sitios BamHI y EcoRI. De esta forma Vangl1 se clonó en el extremo 3' del epítipo y en el mismo marco de lectura para poder obtener de la construcción una proteína fusión de Vangl1 y el epítipo HA en su extremo N-terminal (pcDNA3-HA-Vangl1). Las construcciones se esquematizan en la Figura 10.

Las mutantes de Vangl1 con los extremos N- y C-terminal deletados se construyeron usando como molde el vector pcDNA3-HA-Vangl1 y los oligonucleótidos descritos en la Tabla VII, digiriendo con las enzimas correspondientes y clonadas de la misma forma que pcDNA3-HA-Vangl1.

Las mutantes de Vangl1 que tenían sustituida/s la/las serinas 17 y 20 por alanina, se realizaron por mutagénesis dirigida con el kit *QuikChange II Site Directed Mutagenesis* (Stratagene), siguiendo las instrucciones de la casa comercial y con los oligonucleótidos detallados en la Tabla VII. La incorporación de las mutaciones se verificó mediante secuenciación a través del Servicio de Genómica del CIC.

Materiales y Métodos

Para clonar el epítipo HA en el extremo C-terminal de Vangl1, se amplificaron Vangl1 y el epítipo HA por separado, y se clonaron en el vector como se esquematiza en la Figura 10.

Para expresar las mutantes de Vangl1 en la línea celular MCF7, dado que el rendimiento de la transfección era muy bajo y el reactivo JetPEI™ les resultaba tóxico, se decidió clonar la forma silvestre y las mutantes S17-20A, S17A y S20A en el vector de expresión pBabe (Addgene). El mismo es un vector retroviral por lo que puede ser introducido en las células mediante infección, como se indica en la sección 4.2, y además confiere resistencia a puromicina facilitando la selección de las células que contienen al vector.

Las distintas formas de Vangl1 fusionadas al epítipo HA se obtuvieron a partir de las construcciones clonadas previamente en pcDNA3. Dado que no se contaba con 2 sitios de restricción para direccionar el fragmento, se clonó por un extremo utilizando el sitio BamHI y por el otro mediante la generación de extremos romos, como se esquematiza en la Figura 10. Para esto primero se digirieron los plásmidos pcDNA3 con las distintas construcciones con la enzima XhoI y el plásmido pBabe con la enzima EcoRI. Los extremos romos fueron generados con el Fragmento de Klenow (Fermentas) que es un fragmento proveniente de la ADN polimerasa de *E. coli* con actividad exonucleasa 3'-5' y polimerasa 5'-3', siguiendo el protocolo descrito por Sambrook (1989). Las digestiones se purificaron a partir de un gel de agarosa, como se describió anteriormente, y se cortaron con la enzima BamHI. A continuación se purificaron los fragmentos y el vector pBabe, y se ligaron y transfectaron en *E.coli* DH5 α como anteriormente. Para cada construcción se purificaron los plásmidos de varias colonias con el kit GenElute™ Plasmid Miniprep (Sigma-Aldrich), y se verificaron mediante digestión con enzimas de restricción y visualización en gel de agarosa.

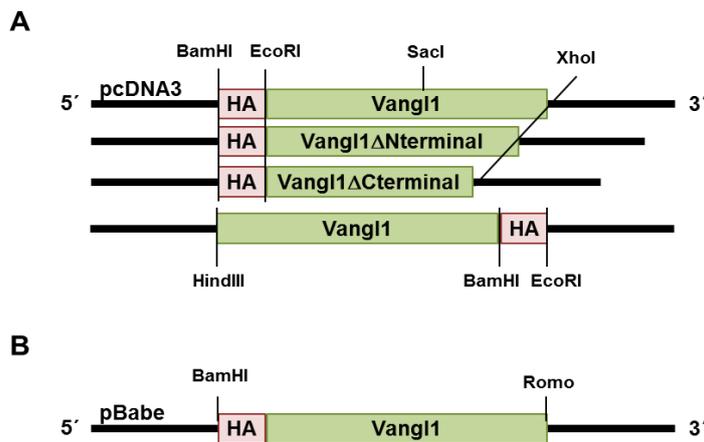


Figura 10. Esquema de construcción de mutantes. A. Mutantes de Vangl1 clonadas en pcDNA3 fusionadas al epítipo HA, expresadas en Hela. **B.** Mutantes de Vangl1 clonadas en pBabe fusionadas al epítipo HA expresadas en MCF7.

Tabla VI. Plásmidos

Plásmidos	Inserto	Características
pcDNA3		Vector de expresión en mamíferos
pCMV3	P-Rex1-myc	pcDNA3 que expresa P-Rex1 fusionado a myc
pBabe		Vector de expresión en mamíferos (retroviral)
pLKO		Vector de expresión en mamíferos (lentiviral)

Tabla VII. Oligonucleótidos

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
Vangl1-parte 1 (nt 16-812)	Sentido (EcoRI) CC <u>GAATTC</u> GATACCGAATCCACTTATTCTGG
	Antisentido AGGCTGTAGAAGCGGGACTC
Vangl1-parte 2 (nt 691-1593)	Sentido GTGGATGCCCTCCTCTTCAT
	Antisentido (XhoI) CCC <u>CTCGAG</u> GAACTTTTAAACGGATGTCTCAGAC
ΔN-terminal	Sentido (EcoRI) CC <u>GAATTC</u> GTGGGGCTGGATTGCAAACGCTA
	Antisentido (XhoI) CCC <u>CTCGAG</u> GAACTTTTAAACGGATGTCTCAGAC
ΔC-terminal	Sentido (EcoRI) CC <u>GAATTC</u> GATACCGAATCCACTTATTCTGG
	Antisentido (XhoI) CCC <u>CTCGAG</u> TTAGAACATGGGCTGCAGCTG

Materiales y Métodos

S17-20A	Sentido	CTATTCAAGTCAT <u>G</u> CGAAAAA <u>G</u> CTCACAGACAAGGGG
	Antisentido	CCCCTTGTCTGTGAG <u>C</u> TTTTTTTCG <u>C</u> ATGACTTGAATAG
S17A	Sentido	CTATTCAAGTCAT <u>G</u> CGAAAAAATCTCACAGACAAGGGG
	Antisentido	CCCCTTGTCTGTGAG <u>C</u> TTTTTTTCGAATGACTTGAATAG
S20A	Sentido	CTATTCAAGTCATTCGAAAAA <u>G</u> CTCACAGACAAGGGG
	Antisentido	CCCCTTGTCTGTGAGATTTTTTTCG <u>C</u> ATGACTTGAATAG
Vangl1 (HA en C-terminal)	Sentido (HindIII)	CCG <u>AAGCTT</u> ATGGATACCGAATCCACTTA
	Antisentido	AGGCTGTAGAAGCGGGACTC
Vangl1 (HA en C-terminal)	Sentido	GTGGATGCCCTCCTCTTCAT
	Antisentido (BamHI)	G <u>CGATCC</u> AACGGATGTCTCAGACTGTAAGC
HA (en C-terminal de Vangl1)	Sentido (BamHI)	CG <u>GGATCC</u> ATGTACGACGTTCTG
	Antisentido (EcoRI)	CG <u>GAATTC</u> TTAGGTGTCCCCGGATCTCGGGAGGCT

Los sitios de restricción y los nucleótidos sustituidos se indican en negrita y subrayado. El codón stop se indica subrayado doble.

5.5. Transformación y purificación de vectores de expresión

5.5.1. Transformación rápida

Para amplificar los plásmidos utilizados en este trabajo, se transformaron bacterias competentes DH5 α de *E. coli* con el correspondiente plásmido, mediante un protocolo de transformación rápida, ya que estos plásmidos tienen buena eficiencia de transformación. Se mezclaron 10 μ g de plásmido con 10 μ l de bacterias competentes (por el método de CaCl₂, Sambrook 1989) y se incubó 5 minutos en hielo. Luego se realizó un choque térmico a 37 °C durante un minuto y se dejó recuperar 2 minutos en hielo. A continuación, se adicionó 200 μ l de medio LB (triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 1%, pH 7) y se incubó 5 minutos a 37 °C. Finalmente se sembraron en placas de 100 mm con LB-agar y ampicilina 100 nM.

5.5.2. Transformación lenta

La transformación lenta se utilizó para las mezclas de ligación. Se mezcló la mitad o toda la ligación (5-10 μ l) con 100 μ l de bacterias competentes (por el

método de CaCl_2 , Sambrook 1989) y se incubó 30 minutos en hielo. Luego se realizó un choque térmico a 37 °C durante un minuto y se dejó recuperar 2 minutos en hielo. A continuación, se adicionó 400 μl de medio LB y se incubó 1 hora a 37 °C en agitación. Finalmente se sembró en placas de 100 mm con LB-agar y ampicilina 100 nM.

Al día siguiente de la transformación se picaron algunas de las colonias crecidas y se cultivaron en 100 ml de LB con ampicilina para posterior purificación del plásmido con el kit comercial GenElute™ Plasmid Midiprep de Sigma, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para visualizar los plásmidos purificados y analizar su calidad, se corrieron alícuotas con distinta cantidad de plásmido a las que se añadió con tampón de carga 10X, en un gel de agarosa al 0,8% diluida en tampón TAE 1X con 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de bromuro de etidio. La obtención de la fotografía del gel de agarosa se hizo en un transiluminador GELDoc 2000 (Biorad).

6. Preparación de extractos celulares e inmunoprecipitación

Para la obtención de los extractos proteicos de las líneas celulares, primero se depositaron las placas de cultivo en hielo. Las células fueron lavadas dos veces con PBS y posteriormente incubadas durante 10 minutos con tampón de lisis con inhibidores de proteasas y fosfatasas (NaCl 140 mM, EDTA 10 mM, 10% glicerina, 1% Nonidet P-40, Tris-HCl 20 mM, pH 8, PMSF 1 mM, Pepstatina 1 μM , Aprotinina 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Leupeptina 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Ortovanadato Sódico 1 mM, β -glicerolfosfato 25 mM, NaF 50 mM y Pirofosfato de Sodio 10 mM (Cabrera *et al.*, 1996)). Tras recoger los extractos celulares en tubos de 1,5 ml, se centrifugaron durante 10 minutos a 4 °C y 12000 rpm. Posteriormente, los sobrenadantes se transfirieron a nuevos tubos. Tanto el PBS como el tampón de lisis se mantuvieron en frío y todo el proceso se llevó a cabo en hielo. Los extractos proteicos celulares se cuantificaron por el método de Bradford (Bradford, 1976) o con el kit Pierce™ BCA™ Protein Assay (Thermo Scientific™). En todos los ensayos se inmunoprecipitó 1 mg de extracto, salvo en los que se indica otra cantidad; y en los geles de acrilamida a partir de extracto se cargó 50 μg por carril, salvo en los que se indica otra cantidad.

Para el experimento de lisis con el tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 1%, SDS 0,1%, desoxicolato de sodio 1%) las muestras se procesaron como se describe en el párrafo anterior, cambiando sólo la composición del tampón de lisis.

La detección de las proteínas se llevó a cabo utilizando el método de Western blot, bien directamente en extracto, mezclando la cantidad necesaria con tampón de carga 2X (SDS 4%, azul de bromofenol 0,05%, glicerina 20% y β -mercaptoetanol 2% en Tris-HCl 100 mM, pH 6,8) o en caso de que fuese necesario enriquecer la muestra en dicha proteína, mediante inmunoprecipitación empleando el anticuerpo correspondiente y 60 μ l de proteína A-Sefarosa o γ -bind-Sefarosa. Esta mezcla se mantuvo en agitación a 4 °C durante al menos 2 horas. Luego se lavaron los inmunocomplejos tres veces con 1 ml de tampón de lisis frío y cada muestra se resuspendió en 35 μ l de tampón de carga (SB 2X). Seguidamente se calentaron durante 7 minutos a 100 °C y finalmente, fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).

7. Electroforesis y Western blot

Para llevar a cabo la separación de las proteínas se empleó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Una vez hervidas las muestras, éstas fueron cargadas en el gel y la electroforesis se realizó en cubetas Mini-PROTEAN®3 (BioRad) o en cubetas grandes de tipo *Sturdi* a un determinado voltaje. El porcentaje de poliacrilamida en los geles variaba en función del tamaño de la proteína de interés. Las proteínas se separaron sometiendo los geles a un voltaje constante de 120 V, en el caso de geles pequeños, o 200 V para geles grandes, en tampón de electroforesis (Tris-HCl 20 mM, Glicina 192 mM, y 1% de SDS).

Una vez finalizada la separación de las proteínas por electroforesis, éstas se transfirieron a una membrana de PVDF. Para ello se utilizó el sistema Trans-Blot de BioRad (transferencia húmeda) en tampón de transferencia (Tris-HCl 20 mM, Glicina 192 mM) a 500 mA constantes durante un intervalo de tiempo fijado en función del porcentaje de acrilamida del gel utilizado y sus dimensiones (entre 70 minutos y 3 horas), o 14 horas a 20 V de voltaje constante.

A continuación las membranas se bloquearon durante al menos una hora con 1% de BSA en TBS-T (NaCl 140 mM, 0,05% Tween, Tris 10 mM pH 7,5) y se incubaron con el anticuerpo correspondiente disuelto en tampón TBS-T. El tiempo de incubación del anticuerpo primario fue de al menos 2 horas. Transcurrido este tiempo, las membranas se lavaron tres veces con TBS-T durante 7 minutos cada vez y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado a Peroxidasa de Rábano (HRP) durante media hora. Tras realizar nuevamente tres lavados con TBS-T, las bandas se visualizaron por radiografía con un sistema de detección basado en la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno y potenciado con p-iodofenol (Ausubel *et al.*, 1987; Cabrera *et al.*, 1996). Para ello se incubaron durante 1 minuto en tampón de revelado (luminol 0,08%, p-iodofenol 0,02%, Tris-HCl 0,1 M pH 9,3) al que previamente se le añadió H₂O₂ 0,44 mM.

8. Tinción con plata

Para la tinción con plata de los geles de poliacrilamida se utilizó el kit *Silver Stain Plus* de Bio-Rad, siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

9. Protocolos de elución de proteínas a partir de inmunoprecipitados

Como se menciona en la sección de Resultados y Discusión, para poder realizar los geles bidimensionales de las proteínas purificadas por inmunoprecipitación, las mismas deben ser eluidas de las esferas de proteína A-sefarosa para posteriormente ser separadas mediante isoelectroenfoque. Para esto se probaron distintos protocolos de elución, con el fin de elegir el que permitiera preservar en mejores condiciones la muestra, diera mayor rendimiento y pureza, para evitar la interferencia de sales y otros componentes en el isoelectroenfoque. Los protocolos ensayados se describen a continuación.

9.1. Elución con pH ácido

Tras el último lavado de la inmunoprecipitación, se resuspendió el pellet de proteína A-sefarosa con el inmunocomplejo en 60 µl de glicina 0,1 M a pH 2,6 y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente, agitando con vórtex cada 15 minutos. Luego se centrifugó 20 segundos a 12000 rpm y se separó el sobrenadante del pellet con las esferas. El sobrenadante se neutralizó con 20 µl de Tris 1M pH 9,35.

En ambas partes se adicionó SB 2X para ser posteriormente visualizadas por SDS-PAGE y WB.

9.2. Elución con péptido competidor

El pellet de la inmunoprecipitación después de ser lavado se resuspendió en 60 μ l de PBS con 5 μ g del péptido frente al cual fue generado el anticuerpo. La mezcla se incubó 30 minutos a temperatura ambiente y se agitó en vórtex cada 15 minutos. Luego se centrifugó 20 segundos a 12000 rpm y se separó el sobrenadante del pellet con las esferas, a ambas partes se adicionó SB 2X para ser posteriormente visualizadas por SDS-PAGE y WB.

9.3. Elución por desnaturalización con urea

Los inmunoprecipitados luego de ser lavados se resuspendieron en 100 μ l de tampón de rehidratación (urea 8 M y 4% CHAPS), se agitaron 10 segundos en vórtex y se incubaron 30 minutos a 36 °C, nuevamente se agitaron 10 segundos en vórtex y se centrifugaron a 13000 rpm durante 2 minutos. Se separó el sobrenadante y se volvió a resuspender el pellet en 100 μ l del tampón y se repitieron los pasos anteriores. Finalmente se juntaron los dos sobrenadantes y se precipitaron con metanol-cloroformo o con ácido tricloroacético (TCA)-acetona, para comprobar cuál era la forma más eficiente. Las esferas de proteína A-sefarosa se conservaron con SB 2X para ser visualizadas por SDS-PAGE y WB.

Para la precipitación con metanol-cloroformo se añadieron a los 200 μ l de sobrenadante de la elución, 4 volúmenes de metanol, 1 volumen de cloroformo y 3 volúmenes de agua milliQ, agitando vigorosamente tras cada agregado. Luego se centrifugó 5 minutos a 12000 rpm y se removió la fase superior, quedando las proteínas en la interfase. Se añadieron 3 volúmenes de metanol y tras agitación fuerte se centrifugaron 5 minutos a 12000 rpm. Se eliminó el sobrenadante, y se resuspendió en tampón de lisis con SB 2X, para posterior visualización por SDS-PAGE y WB.

En la precipitación con TCA-acetona, se añadió al sobrenadante de la elución un volumen de 20% TCA/acetona, se dejó agitando 10 minutos a 4 °C y se centrifugó 15 minutos a 13000 rpm en frío. Se descartó el sobrenadante, se lavó con el mismo volumen de agua milliQ durante 5 minutos a temperatura ambiente,

se centrifugó nuevamente y se eliminó el agua. Se repitieron 3 lavados con agua de la misma manera. A continuación, se resuspendió el pellet en tampón de lisis con SB 2X, para posterior visualización por SDS-PAGE y WB.

9.4. Elución por disociación en condiciones desnaturalizantes fuertes

Luego del lavado del inmunoprecipitado con tampón de lisis, el mismo se lavó con 1 ml de la solución A (Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 137 mM), se resuspendió en 60 μ l de la solución B (solución A con 0,75% SDS, 2% β -mercaptoetanol, 100 mM DTT, 10 μ g/ μ l aprotinina, 10 μ g/ μ l leupeptina) y se hirvió durante 5 minutos. Posteriormente, se adicionó Tritón X-100 a una concentración final de 0,1%, se centrifugó 30 segundos a 13000 rpm y se recuperó el sobrenadante que se mezcló con SB 2X, al igual que el pellet, para poder luego visualizar ambas fracciones por SDS-PAGE y WB.

10. Electroforesis en geles de dos dimensiones

Los geles bidimensionales y los análisis de espectrometría de masas fueron realizados por el personal de la Unidad de Proteómica del CIC.

Las muestras fueron precipitadas con metanol-cloroformo, como se menciona en la sección 9.3, y el pellet fue resuspendido en tampón de rehidratación (urea 8 M, tiourea 2 M, CHAPS 4%, DTT 50 mM, DeStreak 15 mg, tampón IPG 0,5%). Las muestras se adicionaron a tiras de IPG de 13 cm con un gradiente lineal de pH 3-10 (GE Healthcare). El programa de isoelectrenfoque fue de 12 horas a 50 V, 1 hora a 500 V, 1 hora a 1000 V, 30 minutos con un gradiente de voltaje de 1000 a 8000 V, y una acumulación de 35000 V a 8000 V/hora. Las tiras se trataron con tampón equilibrante (Tris-HCl 375 mM pH 8,8, urea 6 M, glicerol 20%, SDS 2%) con TCEP (Tris carboxietil fosfina hidroclicada) 15 mM durante 15 minutos, para la desnaturalización y reducción de las proteínas, y luego de esto, con tampón equilibrado con 2,5% de iodoacetamida para la alquilación proteica. La segunda dimensión de la electroforesis se efectuó en geles de poliacrilamida al 8%. Los puntos de proteína fueron visualizados por tinción con plata siguiendo el protocolo descrito por Yan *et al.*, 2000.

La transferencia de los geles y el revelado de los Western blot, se realizó como se describe en la sección 7.

11. Identificación de proteínas por Espectrometría de masas

11.1. Escisión del punto proteico del gel y digestión trípica de las proteínas

Los puntos proteicos de interés se recortaron manualmente del gel. La digestión se realizó como se describió previamente (Shevchenko *et al.*, 1996), con las siguientes variaciones: los fragmentos recortados fueron desteñidos con una solución 1:1 de ferricianuro de potasio 15 mM y tiosulfato de sodio 50 mM para eliminar la plata. Luego fueron lavados con agua y deshidratados con acetonitrilo 100%.

A continuación, los fragmentos de gel fueron tratados con DTT 10 mM en bicarbonato de amonio 25 mM a 56 °C, seguido de iodoacetamida 55 mM en bicarbonato de amonio 50 mM a temperatura ambiente. Luego se lavaron con acetonitrilo 100% y bicarbonato de amonio 20 mM. A los fragmentos de gel deshidratados se adicionó tripsina porcina modificada a una concentración final de 3 ng/μl en bicarbonato de amonio 20 mM (Promega, Madison, Wis.), y se incubó a 37 °C durante 16 horas. El sobrenadante de la digestión trípica se acidificó con ácido fórmico 5%, y se desaló y purificó usando columnas C18-Stage-Tips. El eluido se secó en centrífuga de vacío (Speed-Vac, Eppendorf).

11.2. Escisión de la banda de la membrana de PVDF y digestión trípica de las proteínas

Tras la inmunodetección, las bandas de las proteínas electrotransferidas a la membrana de PVDF se recortaron, redujeron, alquilaron y digirieron con tripsina siguiendo el protocolo descrito por Methogo *et al.*, 2005. Los péptidos trípticos fueron acidificados con ácido fórmico, desalados en columnas C18-Stage-Tips y secados en un sistema de vacío.

11.3. Espectrometría de masas por NanoUPLC-LTQ Orbitrap Velos

Los péptidos se disolvieron en ácido fórmico 0,5%, acetonitrilo 3% en agua, y se analizaron por cromatografía líquida en fase reversa MS/MS, utilizando un sistema nanoUPLC (NanoAcquity, Waters) conectado al espectrómetro de masas LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) a través de una fuente de ionización por nanoelectrospray (Nanospray Flex Ion Source, Thermo

Fisher Scientific, Bremen, Germany), operando en modo positivo. La elución peptídica se realizó con un gradiente 10-45% de acetonitrilo con 0,1% ácido fórmico durante 30 minutos a una velocidad de flujo de 250 nl/min, utilizando una columna nanoACQUITY UPLC BEH 1.7 μm , 130 Å, 75 μm \times 250 mm C18 (Waters Corp., Milford/MA, USA). La adquisición de datos espectrales, se realizó en modo dependiente de datos, que cambia automáticamente entre escaneado completo MS y adquisición de espectros de fragmentación MS/MS.

11.4. Análisis de datos

El análisis de datos se realizó con el programa Proteome Discoverer (versión 1.4.1.14) de Thermo Scientific, usando los algoritmos SEQUEST® y Mascot™ (Matrix Sciences Ltd., London, UK). Las bases de datos utilizadas fueron IPI human v3.87 para SEQUEST y las secuencias humanas de la base de datos de SwissProt para Mascot. Los parámetros de búsqueda fueron los siguientes: digestión trípica con hasta 2 posibles sitios de corte perdidos, tolerancia de masas de 10 ppm para los iones precursores y 0,8 Da para los iones producto, carbamidometilación de proteínas como modificación fija y oxidación de metioninas como modificación variable.

Los resultados de la búsqueda se filtraron para considerar sólo las proteínas y péptidos que presentaban valores elevados de confianza, con un mínimo de dos péptidos por proteína y un FDR (*false discovery rate*) <1%.

12. Identificación de péptidos monofosforilados por Espectrometría de masas

Las bandas de interés se recortaron y tripsinizaron siguiendo el protocolo anteriormente indicado. El enriquecimiento de fosfopéptidos se llevó a cabo por cromatografía de afinidad con TiO_2 siguiendo el procedimiento SIMAC descrito por Thingholm *et al*, 2008.

Los fosfopéptidos se eluyeron en la placa de muestras de MALDI con 0,5 μl de una solución de matriz DHB (ácido 2,5-dihydroxibenzoico) a una concentración de 20 g/l en 50% acetonitrilo, 1% ácido fosfórico. La adquisición de espectros de masas se llevó a cabo tanto en modo positivo como negativo, y en modo lineal y reflector utilizando un espectrómetro de masas MALDI-ToF, modelo Ultraflex de

Bruker (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Los espectros fueron analizados con el programa FlexAnalysis (Bruker Daltonics).

Además, se compararon los espectros adquiridos en los distintos modos de trabajo del equipo antes y después del tratamiento en placa con fosfatasa alcalina (Roche Diagnostics), comprobando así la pérdida característica del grupo fosfato de 80 Da.

13. Ensayo fosfatasa *in vitro*

Para el ensayo fosfatasa *in vitro* se inmunoprecipitó la proteína Vangl1 de extractos celulares siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Posteriormente, los precipitados se lavaron dos veces con el tampón de fosfatasa alcalina (Tris-HCl 0,05 M; EDTA 0,1 mM, pH 8,5) y la reacción se llevó a cabo a 37 °C en 30 µl del mismo tampón con 4 unidades de fosfatasa alcalina (Roche Biochemicals), o con 400 unidades de fosfatasa lambda en 30 µl de su tampón (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), a los tiempos indicados en la Figura 26 de Resultados y discusión. Luego se les adicionó tampón de carga para SDS-PAGE y se las congeló a -20 °C hasta ser analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y WB.

14. Inmunofluorescencia (IF)

Las células se cultivaron sobre cubreobjetos en placas de 35 mm. Tras lavarlas dos veces con PBS que contenía CaCl₂ 1 mM y MgCl₂ 0,5 mM (PBS/CM) se fijaron con paraformaldehído al 2% en PBS/CM durante 30 minutos. A continuación se lavaron dos veces con PBS/CM y se quelaron los restos de paraformaldehído con NH₄Cl en PBS/CM durante 10 minutos. Las células se permeabilizaron con 0,1% de Tritón-X100 en PBS/CM realizando tres incubaciones de diez minutos cada una y se bloquearon los sitios de unión inespecíficos realizando tres lavados con 0,2% de BSA en PBS/CM. Posteriormente se incubaron los cubreobjetos con el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente, o a 4 °C durante toda la noche. Tras la incubación con el anticuerpo primario se realizaron tres lavados con tampón de bloqueo y se incubaron las células con el anticuerpo secundario, diluido en este mismo tampón, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron de nuevo tres lavados de diez minutos y se tiñeron los núcleos con DAPI (1 µg/ml)

diluido en agua. Los cubreobjetos se fijaron utilizando Gelvatol (12% Mowiol, 30% glicerol, Tris 0,12 M pH 8,5).

Las fotografías de las inmunofluorescencias se tomaron en un microscopio de epifluorescencia de Zeiss, modelo Axioplan 2 (Jena, Alemania) equipado con una cámara Hamamatsu Orca con el software OpenLab 4.0.3, utilizando un objetivo 60X.

15. Ensayos de actividad biológica

15.1. Proliferación celular por metabolización de MTT

Para el análisis del crecimiento celular se utilizó el método de metabolización o reducción de MTT (Mosmann, 1983). El ensayo se basa en la capacidad de las mitocondrias en las células vivas, para reducir el compuesto MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) que es amarillo y soluble en agua, dando lugar a un compuesto morado que precipita en forma de cristales insolubles en agua (formazán). Para ello se sembraron 13000 células/pocillo en placas de 24 pocillos. A las 24 horas, cuando las células estaban adheridas a la placa, se realizó la primera medida que se consideró el punto 0 de proliferación. En ese momento se añadieron los tratamientos adecuados a las células y su efecto se midió a los tiempos indicados para cada experimento en los pies de figura. Para la medición se adicionó MTT al medio con las células a una concentración final de 500 µg/ml, y se incubó durante una hora a 37 °C. A continuación se retiró el medio y se añadió 500 µl/pocillo de DMSO para lisar las células y disolver los cristales de formazán (MTT reducido). Se incubó 10 minutos en oscuridad, a temperatura ambiente y en agitación, y se midió la absorbancia a $\lambda=570$ nm en el lector automático Evolution de Tecan (Suiza). Los resultados mostrados para cada condición consisten en la media \pm la desviación estándar de cuatro réplicas por condición.

15.2. Ensayo de migración por herida en placa

Las células MCF7 fueron plaqueadas en placas de 60 mm o multipocillo de 6. Al llegar a un 95% de confluencia se realizaron las heridas, 3 (placa 60 mm) o 2 (multipocillo) por placa, con una punta de micropipeta de 10 µl. Luego se lavaron con PBS y se les adicionó medio de cultivo DMEM suplementado con Mitomicina C

(2,5 mg/ml) y las condiciones que se detallan en los pies de figura. En los ensayos en placas de 60 mm, se eligieron 3 sitios por condición y se tomaron fotos en esos mismos sitios a las 0, 24 y 48 horas con un microscopio Carl Zeiss Axiovert 135 (Jena, Alemania) equipado con una cámara Hamamatsu Orca con el software OpenLab 4.0.3, utilizando un objetivo 10X. Para el ensayo en placas multipocillo de 6, se eligieron 2 puntos por condición (pocillo) y se tomaron fotos por contraste de fases en esos mismos sitios cada 10 minutos durante 48 horas, con un microscopio invertido Nikon Eclipse TE 2000 E, equipado con una cámara Hamamatsu Orca con el software MetaMorph Molecular Devices (Izasa, Barcelona, Spain) y utilizando un objetivo 20X (experimento de *timelapse*).

15.3. Ensayo de invasión

Se utilizaron *transwells* (Falcon®) con una membrana de 8 µm de tamaño de poro, aptos para placas de 24 pocillos. Los mismos fueron recubiertos con 60 µl de matrigel al 10% en DMEM, e incubados 2 horas a 37 °C para su gelificación. El matrigel (BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix) fue previamente descongelado en hielo y manipulado en frío. A continuación se resuspendieron las células en DMEM SBF 1%, se plaquearon sobre el matrigel (100000 cel/*transwell*), y se incubaron a 37 °C en placas de 24 pocillos con 600 µl/pocillo de medio DMEM SBF 10%, o DMEM SBF 1% suplementado o no con NRG 10 nM. A las 48 horas se determinó la invasión. Para esto se retiró de los *transwells* el matrigel con las células que no invadieron, con la ayuda de un palillo de algodón, y se los incubó durante 15 minutos en paraformaldehído al 4% (diluido en PBS), para fijar las células que invadieron. Se lavaron 3 veces en PBS y se tiñeron durante 30 minutos con una solución de cristal violeta al 0,5% en agua. Luego se lavaron 3 veces con agua, se dejaron secar y se tomaron fotos por microscopía de campo claro con un microscopio Olympus modelo BX51, equipado con una cámara Olympus DP70 y el programa DP Controller 2.1.1.183 de Olympus, utilizando un objetivo 4X. Se contó el número de células teñidas por *transwell*. Cada condición fue plaqueada por duplicado. Como control del número de células plaqueadas, células del mismo *pool* se plaquearon simultáneamente en una placa de 24 pocillos por triplicado, y se midió por MTT una vez adheridas las células.

15.4. Ensayo de adhesión a fibronectina

El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos a las que se adicionó 25 µg/pocillo de fibronectina (Sigma-Aldrich), se incubó 30 minutos a temperatura ambiente y se recuperó para reutilizar en ensayos posteriores. La placa luego se mantuvo durante la noche a 4 °C. Al día siguiente se adicionó BSA 1,5% en PBS y se incubó 1 hora a 37 °C, para bloquear los espacios no cubiertos con fibronectina. Se lavaron los pocillos 2 veces con PBS y se plaquearon 25000 células/pocillo (100 µl) resuspendidas en medio DMEM suplementado con SBF 10%, o SBF 1% suplementado o no con NRG 10 nM. Luego de incubar 30 minutos a 37 °C, se eliminaron las células no adheridas invirtiendo la placa con un golpe seco, y lavando 3 veces con PBS. Luego se tiñeron las células adheridas con cristal violeta 0,04% en agua (100 µl/pocillo) durante 10 minutos en agitación, a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente se lavó 3 veces con PBS y 2 con agua, se dejó secar y se tomaron fotos por microscopía de campo claro con un microscopio Olympus modelo BX51, equipado con una cámara Olympus DP70 y el programa DP Controller 2.1.1.183 de Olympus, utilizando un objetivo 4X.

Para la cuantificación, en paralelo y de igual manera, se plaqueó en una placa de 96 pocillos recubierta con fibronectina, el doble de células provenientes del mismo *pool* (200 µl/pocillo) y luego de incubar 30 minutos a 37 °C, se lavó y adicionó DMEM con SBF 10% para medir proliferación por metabolización de MTT a las 4 horas (se plaqueó el doble de células para que las medidas de absorbancia no fueran demasiado bajas). Se realizó a la par un control del número de células plaqueadas, donde se plaquearon las células del mismo *pool* (100 µl/pocillo) en placa de 96 pocillos sin tratar con fibronectina y se midió por MTT cuando estaban todas adheridas. Cada condición fue plaqueada por triplicado.

15.5. Ensayo de crecimiento 3D en matrigel

Para el ensayo se adicionó matrigel a una placa de 48 pocillos (100 µl/pocillo), descongelado previamente en hielo y manipulado en frío, y se gelificó incubando 30 minutos a 37 °C. A continuación, se adicionó 200 µl/pocillo de medio DMEM suplementado con matrigel 4% y SBF 20%, o SBF 1% con o sin NRG 20 nM. Luego se añadieron las células resuspendidas en DMEM SBF 1% (1000 células en 200 µl/pocillo) y se mantuvieron durante 4 semanas a 37 °C. Cada 4 días

se renovó el medio DMEM con matrigel al 2% suplementado con SBF 10%, o SBF 1% con o sin NRG 10 nM (aspirando cuidadosamente para no dañar el matrigel). Se tomaron fotos en las semanas 1, 2, 3 y 4 para seguir el crecimiento, realizando un barrido con un objetivo 10X en la porción central del pocillo con un microscopio invertido Nikon Eclipse TE 2000 E, equipado con una cámara Hamamatsu Orca con el software MetaMorph Molecular Devices (Izasa, Barcelona, Spain). Como control del número de células, se plaquearon células del mismo *pool* en placas de 96 pocillos, para medir por MTT una vez adheridas. Cada condición fue plaqueada por duplicado.

16. Fraccionamiento celular

Las células se cultivaron en placas de 100 mm hasta que alcanzaron una confluencia del 80% aproximadamente. En ese momento se lavaron 2 veces con PBS frío y se incubaron en hielo durante 10 minutos con tampón de homogeneización frío (Sacarosa 250 mM, EDTA 1 mM, Tris 10 mM pH 7.0) al que se le habían añadido los inhibidores de proteasas y fosfatasas (Pepstatina 1 μ M, Aprotinina 1 μ g/ml, Leupeptina 1 μ g/ml, PMSF 1 mM, Ortovanadato Sódico 1 mM, β -glicerolfosfato 25 mM, NaF 50 mM). Una vez despegadas de la placa con un rascador (*scraper*), las células se lisaron manualmente usando un homogeneizador *Dounce*, manteniéndolas en todo momento en hielo. Tras confirmar mediante tinción con 0,2% de solución de Trypan Blue, la permeabilización de la membrana celular en el 95% de las células, se centrifugaron a 4.000 xg durante 10 minutos a 4 °C para sedimentar los restos celulares y núcleos. El sobrenadante resultante fue transferido a un nuevo tubo y centrifugado a 30.000 xg durante 40 minutos separando así la fracción citosólica (sobrenadante) de la microsomal (pellet). El sedimento resultante de esta centrifugación fue resuspendido en tampón de lisis con inhibidores de proteasas y fosfatasas (descrito en el apartado 6 de Materiales y métodos), y posteriormente centrifugado durante 10 minutos a 4 °C y 12000 rpm para extraer las proteínas de las membranas. Para la inmunoprecipitación de Vangl1 y los WB a partir de extracto se utilizaron cantidades equivalentes de la fracción citosólica y microsomal.

17. Bioinformática

La búsqueda de sitios consenso de quinasas en la secuencia de Vangl1, se realizó con la herramienta NetPhosK 1.0 Server de la Universidad de Dinamarca (Center for biological sequence analysis, Technical University of Denmark – DTU; Blom *et al.*, 2004).

El alineamiento de la secuencia de Vangl1 con la secuencia del péptido pM1 se realizó utilizando el programa Needleman-Wunsch Global Align Nucleotide Sequences, disponible en la página web del NCBI (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, EEUU).

18. Cuantificación y estadística

La cuantificación de los experimentos WB se llevó a cabo utilizando el programa Image-J (*National Health Institute, NIH, Maryland, USA*). Los resultados obtenidos en los experimentos de proliferación celular (metabolización de MTT), adhesión a fibronectina e invasión se representan como la media \pm desviación estándar de cuatro, tres y dos réplicas por condición, respectivamente; de al menos dos experimentos independientes.

Resultados y Discusión

Resultados y Discusión

1. Identificación de nuevas moléculas que responden a estímulo con NRG

Estudios previos en el laboratorio han permitido identificar a la proteína P-Rex1 (intercambiador 1 de RAC dependiente de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato) como intermediario en la vía de señalización NRG-ErbB. Este intermediario fue descubierto por la aparición de una banda inespecífica de 180 kDa en Western blots de extractos de la línea celular MCF7 estimulados con NRG, revelados con el anticuerpo dirigido contra el residuo de serina 473 fosforilado de la quinasa Akt (α -pS⁴⁷³-Akt), generado en el laboratorio. En células de cáncer de mama, la estimulación de los receptores ErbB con NRG modifica los niveles de fosforilación de P-Rex1 y por tanto su activación, llevando a cambios que favorecen la proliferación celular, la migración y la invasividad. Además, se ha encontrado que el comportamiento agresivo del cáncer de mama en humanos tiene correlación con los niveles de expresión de P-Rex1. (Montero *et al.*, 2011).

Con el fin de identificar nuevos componentes de la vía de señalización por receptores ErbB, se decidió estudiar la respuesta de la línea celular de cáncer de mama MCF7 tras su estimulación con NRG. Para ello se serodeprivaron las células durante 24 horas y a continuación se trataron durante 15 minutos con NRG 10 nM. A continuación los extractos celulares se analizaron mediante Western blot (WB) con anticuerpos específicos para antígenos fosforilados, sobre extracto proteico y en inmunoprecipitados.

En primer lugar, dado que las redes de señalización intracelular están gobernadas por cascadas de fosforilación sobre residuos de serina (Olsen *et al.*, 2006; Hunter, 2000), se trató de evidenciar fosforilación diferencial con un anticuerpo específico para residuos de serina fosforilados (Invitrogen). Contrariamente a lo esperado, no se pudo apreciar variación de la fosforilación en las células estimuladas con NRG respecto de las control no estimuladas (Figura 11.A). Sin embargo, esto puede deberse a falta de especificidad del anticuerpo ya que previamente se ha visto que los anticuerpos específicos para fosfoserinas no siempre dan buenos resultados.

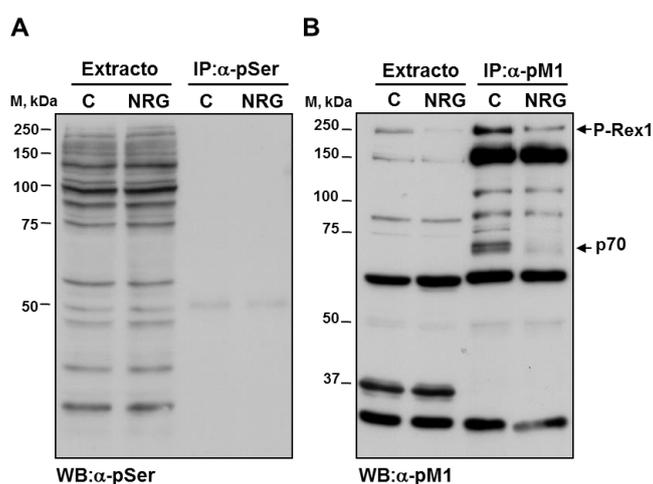


Figura 11. Estudios de fosforilación diferencial tras estimulación de la línea celular MCF7 con NRG. Las células fueron serodeprivadas durante 24 horas y una parte se estimuló durante 15 minutos con NRG 10 nM. Posteriormente, fueron lisadas y 5 mg de extracto proteico se inmunoprecipitó con los anticuerpos α-pSer (A) o α-pM1 (B) y se visualizó por WB con el mismo anticuerpo que se usó para la inmunoprecipitación. C (control), corresponde a las células serodeprivadas sin estimular con NRG. NRG, células estimuladas con NRG.

Siguiendo con el esquema que condujo a la identificación de P-Rex1 con el anticuerpo específico α-pS⁴⁷³-Akt (Montero *et al.*, 2011), se utilizaron anticuerpos generados también en el laboratorio dirigidos contra determinados residuos fosforilados de P-Rex1 (Montero *et al.*, 2011), para ver si los mismos reconocían alguna proteína además de P-Rex1 que sufriera variación de la fosforilación ante estimulación con NRG. De los cuatro anticuerpos probados (pM1, pM2, pM3 y pM4) descritos en la Tabla III de la sección de Materiales y métodos, sólo α-pM1 permitió ver bandas que cambiaban su grado de fosforilación ante la estimulación con NRG (Figura 11.B). Particularmente, nos llamó la atención una banda por debajo de la banda de 75 kDa del marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ Dual Color Standard, Bio-Rad), que disminuía su fosforilación al ser estimulada con NRG. El aspecto de la banda ancha y difusa, podría deberse a diferentes grados de fosforilación del mismo producto proteico, que causa diferencias en la movilidad electroforética. Dada la significativa variación de la fosforilación ante el estímulo y su reproducibilidad, se decidió ir tras la identificación de este producto proteico. Para facilitar el seguimiento de los resultados y la discusión, en adelante llamaremos p70 al producto proteico identificado y pM1 al residuo de serina fosforilado reconocido por el anticuerpo α-pM1.

Para verificar la especificidad del anticuerpo α -pM1 por p70 y para descartar que la prevalencia se debiera a su afinidad por la proteína A o por las esferas de sefarosa utilizadas en la inmunoprecipitación (IP), o simplemente por ser una proteína demasiado abundante, se llevó a cabo un ensayo de competición con el péptido frente al cual se generó el anticuerpo α -pM1. Como se puede apreciar en el WB de la Figura 12, la banda de p70 sólo se inmunoprecipitó en el carril correspondiente a la IP del extracto proteico de MCF7 con el anticuerpo α -pM1. Por el contrario, en el carril correspondiente a la IP que se llevó a cabo también en presencia del péptido, no se observó dicha banda. Esto demuestra la especificidad de α -pM1 para reconocer a p70, ya que la unión fue desplazada en la competición con el péptido que posee el epítipo específico reconocido por el anticuerpo.

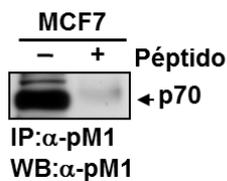


Figura 12. Ensayo de competición. Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente 10 μ l del anticuerpo α -pM1 en ausencia (-) o presencia (+) de 5 μ g de péptido contra el cual se generó dicho anticuerpo. A continuación, se adicionó a cada tubo la Proteína A-sefarosa y 2 mg de extracto de la línea celular MCF7 que había sido serodeprivada durante 24 horas. Se incubaron 2 horas en agitación a 4 $^{\circ}$ C, se lavaron los extractos inmunoprecipitados y se visualizaron por WB con el anticuerpo α -pM1.

1.1. p70 en otras líneas celulares de cáncer

Para continuar con el estudio de p70, decidimos hacer un análisis más amplio sobre un panel de líneas celulares de cáncer con la intención de determinar si en ellas también se hallaba presente esta proteína. Como podemos observar en la Figura 13 sólo la línea celular Hela de cáncer de cérvix, además de la línea MCF7, presentaba una banda que se asemeja a la de p70.

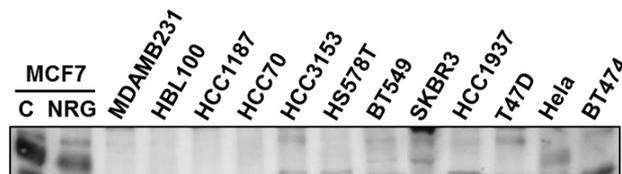


Figura 13. Extractos celulares (2 mg) de distintas líneas celulares se inmunoprecipitaron con α -pM1 y se visualizaron posteriormente por WB con el mismo anticuerpo. Como control para localizar la banda de p70 se utilizó la línea MCF7 tratada como se describe en los experimentos anteriores.

1.2. ¿Es p70 un fragmento de proteólisis parcial de P-Rex1?

El hecho de que p70, al igual que P-Rex1, disminuya su fosforilación tras el estímulo con NRG, el grado de intensidad de la banda y su tamaño menor que P-Rex1, permite pensar que p70 podría corresponder a un producto generado por proteólisis parcial de P-Rex1. Esto podría darse como parte de un mecanismo de regulación o simplemente como suele suceder cuando una proteína es muy abundante que sufre procesamiento parcial.

Dado que esta banda no pudo ser identificada, ni inmunoprecipitada por los otros anticuerpos de P-Rex1, ni por los específicos de residuos fosforilados pM2, pM3 y pM4, ni por el anticuerpo pan-P-Rex1 que reconoce los niveles de P-Rex1 total (resultados no mostrados), podemos descartar que sea un fragmento correspondiente al extremo C-terminal de P-Rex1, ya que todos los anticuerpos generados en el laboratorio contra P-Rex1, a excepción de pM1 y pM2, reconocen epítomos presentes en la región C-terminal de la proteína (esquema Figura 14). Al no disponer de otro anticuerpo que reconozca la región N-terminal de P-Rex1 y dado que los anticuerpos comerciales sólo reconocen el extremo C-terminal o la región central (que por el tamaño de p70 no se unirían a este fragmento, ya que los aminoácidos que reconocen quedarían en el otro fragmento generado), se plantearon distintas aproximaciones experimentales para intentar determinar si la banda de p70 corresponde a un fragmento de P-Rex1.

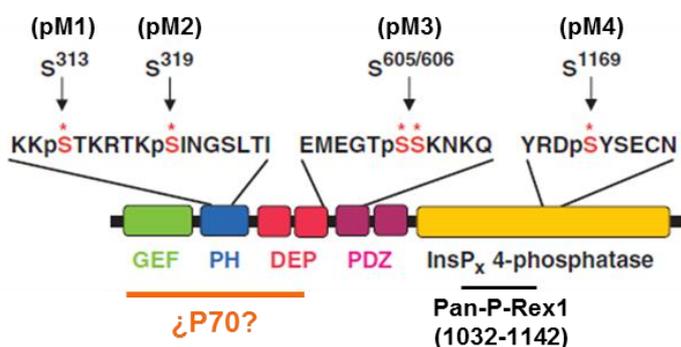


Figura 14. Esquema de P-Rex1 y los anticuerpos que lo reconocen. Se indican los residuos aminoacídicos que reconocen los 4 anticuerpos fosfoespecíficos (pM1, pM2, pM3 y pM4) y el anticuerpo pan-P-Rex1. En naranja, la ubicación del posible producto de proteólisis parcial de P-Rex1 en el extremo N-terminal de la proteína (¿p70?). Adaptada de Montero *et al*, 2011.

En primer lugar se sobreexpresó la proteína P-Rex1 fusionada al epítipo myc en la línea celular 293 para determinar si bajo esta condición se observaba aparición de la banda p70. Como se muestra en el WB de la Figura 15, es evidente la sobreexpresión de P-Rex1 por la aparición de una banda de 180 kDa que no se

observa en la línea celular 293 transfectada con el vector vacío. Sin embargo, no se observa aparición de ninguna banda a la altura de p70 tras la sobreexpresión de P-Rex1, por lo que en principio esta banda no tendría relación con P-Rex1. Aunque podría ser proveniente de P-Rex1 pero generarse a partir de un mecanismo ausente en la línea 293.

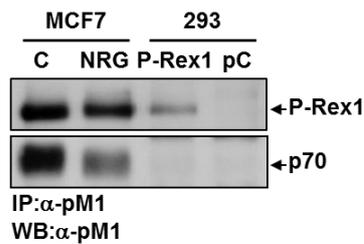


Figura 15. Sobreexpresión de P-Rex1 en la línea celular 293. Se sobreexpresó P-Rex1 en la línea celular 293 a partir del plásmido pCMV3, que posee el gen de P-Rex1 fusionado al epítipo myc en el vector de expresión pcDNA3 (P-Rex1). Como control se utilizó la línea 293 transfectada con el vector pcDNA3 vacío (pC). Las células de MCF7 y 293 fueron serodeprivadas ON, y los lisados se inmunoprecipitaron con α -pM1 y visualizaron por WB con el mismo anticuerpo. C, control sin estimular. NRG, estimulada con NRG como en experimentos previos.

A continuación se probó silenciar P-Rex1 en MCF7 para establecer si su ausencia causaba algún efecto en la banda de p70. Como se puede ver en el WB de la Figura 16 a pesar de la disminución en los niveles de P-Rex1, no se observa modificación en la intensidad de la banda correspondiente a p70. Esto indicaría que p70 no es un fragmento de P-Rex1 y que la defosforilación inducida por NRG, reconocida con el anticuerpo α -pM1, sería independiente de P-Rex1.

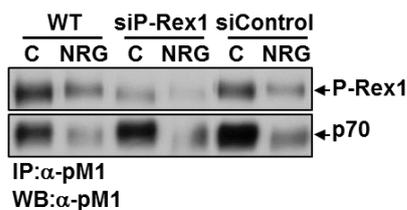


Figura 16. Silenciamiento de P-Rex1 en la línea celular MCF7. Se utilizaron clones de la línea MCF7 silenciados en P-Rex1 mediante un RNA de interferencia específico para P-Rex1 (siP-Rex1), construidos previamente en el laboratorio. Las células fueron serodeprivadas 24 horas y estimuladas 15 minutos con NRG 10 nM (NRG) o sin estimular (C). Se utilizó también como control un clon de MCF7 transfectado con un shRNA control que no reconoce la secuencia del gen de P-Rex1 (siControl). WT (*wildtype*) se refiere a la línea MCF7 sin transfectar.

Por otra parte, dado que del panel de líneas analizadas sólo se identificó una banda semejante a la de p70 en las células Hela, se estimuló esta línea con EGF (ya que esta línea no responde a NRG pero expresa el receptor EGFR) para establecer si la banda que se encontraba a la altura de p70 resultaba modificada en su grado de fosforilación (Figura 17). La intensidad de la banda en las células tratadas con EGF no mostró variación con respecto al control sin estimular, por lo que esta fosforilación sería independiente de la señalización mediada por EGF.

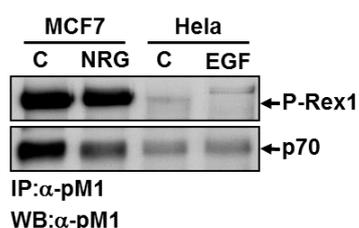


Figura 17. p70 en HeLa. Las líneas celulares MCF7 y HeLa fueron serodeprivadas durante 24 horas, seguido de 15 minutos de estimulación con NRG (MCF7) o EGF (HeLa) 10 nM. Posteriormente se lisaron y 2 mg de extracto se inmunoprecipitaron con α -pM1 y se analizaron por WB con el mismo anticuerpo.

En base a lo observado, la banda p70 no parece ser producto de un procesamiento parcial de P-Rex1 y su fosforilación tampoco parece depender de la presencia de P-Rex1, o al menos no de forma exclusiva. Además, la disminución en la fosforilación de el/los residuos reconocidos por el anticuerpo α -pM1 depende de la estimulación con NRG en MCF7, pero es independiente de la estimulación con EGF en la línea celular HeLa.

1.3. Identificación de p70 por técnicas de proteómica

1.3.1. Geles de poliacrilamida en una dimensión

En un paso más hacia la identificación de p70, se realizó un gel de poliacrilamida en gradiente (Figura 18) en el cual, en una mitad destinada a ser revelada por WB con el anticuerpo α -pM1, se cargaron muestras provenientes de extractos de la línea MCF7 control, estimulada con NRG o en competición con el péptido epítipo de α -pM1, que fueron inmunoprecipitadas con el mismo anticuerpo. En paralelo, en el mismo gel se cargaron 2 carriles para ser teñidos posteriormente con plata, en los cuales extractos de MCF7 control fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo α -pM1 en presencia o ausencia del péptido, utilizando para cada condición 20 placas, dada la menor sensibilidad de la tinción con plata respecto del WB.

De esta manera fue posible identificar una banda en el carril control del gel teñido con plata, que desaparecía en el carril de la competición con el péptido y que tenía el tamaño de p70. Esta banda fue recortada y enviada al Servicio de Proteómica del CIC para su identificación mediante espectrometría de masas con el equipo LTQ Orbitrap Velos. De este estudio se obtuvo el listado de proteínas que se muestra en la Tabla VIII. Paralelamente se envió para su identificación la banda del carril control que se correspondía con P-Rex1, y se corroboró que esa banda era P-Rex1. Sin embargo, si bien en el análisis de proteómica de la banda de p70 se

identificaron varias proteínas, ninguna parecía corresponder a P-Rex1, lo que permitió verificar que esta banda no es un producto de proteólisis parcial de P-Rex1.

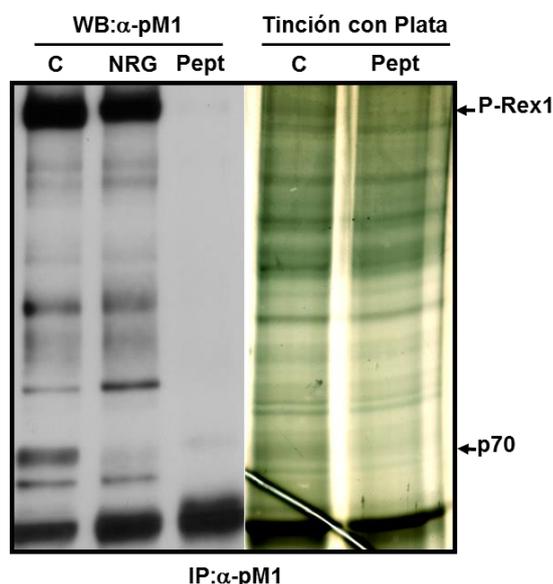


Figura 18. Identificación de p70 por espectrometría de masas a partir de gel teñido con plata. La línea celular MCF7 fue serodeprivada durante 24 horas y estimulada con NRG 10 nM durante 15 minutos, posteriormente se lisó y los extractos se inmunoprecipitaron con el anticuerpo α -pM1. En la porción izquierda de la figura se muestra el WB revelado con el mismo anticuerpo, en el cual se inmunoprecipitaron 2 mg de extracto por carril. El primer carril corresponde a las células control (C), el segundo a las estimuladas con NRG (NRG) y el tercero a las células control inmunoprecipitado en presencia del péptido (Pept). En la parte derecha de la figura se muestra la tinción del gel con plata. Cada carril corresponde a extracto proveniente de 20 placas de 100 mm (56 mg) de MCF7 control, inmunoprecipitadas con el anticuerpo α -pM1 en ausencia (C) o presencia (Pept) del péptido. Del carril C del gel de plata, se recortaron las bandas a la altura de p70 y P-Rex1, y se identificaron por espectrometría de masas en la Unidad de Proteómica del CIC (Tabla VIII).

Tabla VIII. Proteínas identificadas en la banda de p70 recortada del gel de plata

Identificación	Descripción	MW [kDa]	Σ Coverage	Σ # Unique Peptides	Score A2 ^a	Score A3 ^a
P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	61,0	23,56	11	328,16	24,33
P14618	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	57,9	15,44	8	234,34	16,94
Q9NY93	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX56	61,6	6,40	3	181,23	11,03
P50990	T-complex protein 1 subunit theta	59,6	11,86	6	130,46	10,37
P68104	Elongation factor 1-alpha 1	50,1	9,52	2	94,48	7,54
P48643	T-complex protein 1 subunit epsilon	59,6	10,17	6	93,27	9,57
P48444	Coatomer subunit delta	57,2	3,91	2	80,15	5,22
Q9Y262	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	66,7	3,37	2	79,81	5,37

Resultados y Discusión

P40227	T-complex protein 1 subunit zeta	58,0	6,97	4	69,32	6,33
P30153	Ser/Thr-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	65,3	4,75	3	68,01	4,99
P07237	Protein disulfide-isomerase	57,1	4,13	2	67,05	2,68
Q9UI10	Translation initiation factor eIF-2B subunit delta	57,5	4,40	2	66,33	4,14
Q53EL6	Programmed cell death protein 4	51,7	6,82	3	64,00	6,58
Q6P1J9	Parafibromin	60,5	4,90	3	61,19	6,36
Q9Y2X3	Nucleolar protein 58	59,5	3,21	2	46,81	1,63
P14866	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	64,1	4,41	3	42,67	
Q13177	Serine/threonine-protein kinase PAK 2	58,0	4,96	3	39,07	2,28
P50991	T-complex protein 1 subunit delta	57,9	2,97	2	37,38	4,19
P08621	U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa	51,5	3,89	2	35,74	
P54578	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14	56,0	3,44	2	33,86	
P08107	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	70,0	3,43	2	33,74	
Q9NUL7	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX28	59,5	3,15	2	33,73	
P54577	Tyrosyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	59,1	3,22	2	27,81	
O75131	Copine-3	60,1	2,79	2	24,58	2,06
Q9NQ55	Suppressor of SWI4 1 homolog	53,2	3,38	2	24,07	
O43242	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	60,9	3,37	2	0,00	

^a Los valores de Score A2 y A3 fueron obtenidos con los algoritmos Mascot™ y SEQUEST®, respectivamente.

1.3.2. Geles bidimensionales

A pesar de que la proteína p70 reconocida por α -pM1 es inmunoprecipitada por este anticuerpo, esto no fue suficiente para poder aislarla en un gel de una dimensión. El listado de proteínas obtenido por proteómica a partir de la banda de p70 del gel de plata era amplio, por lo que se decidió intentar mejorar la resolución de esta proteína mediante geles bidimensionales.

Los geles en dos dimensiones aumentan la capacidad resolutive ya que separan en función de dos características de la proteína. La primera separación se lleva a cabo en función del punto isoelectrico de la proteína (PI), mediante la técnica de isoelectroenfoque. El PI es una característica inherente de cada proteína ya que viene dada por la composición aminoacídica de la misma. En el isoelectroenfoque, al ejercer una corriente, la muestra con las proteínas se hace migrar a través de un gradiente de pH, esto hace que cada proteína se desplace hasta alcanzar el sitio donde el pH es igual a su PI y donde, por lo tanto, su carga neta es nula y no se ve forzada a seguir migrando (Bonifacino *et al.*, 2004). El paso

siguiente es la separación de estas proteínas en un gel de poliacrilamida con SDS, lo que permite resolver dichas proteínas en función de su peso molecular.

En un principio, los geles bidimensionales se realizaron directamente a partir de extracto proteico (200 μ g) proveniente de lisado celular de la línea MCF7 tratada en las mismas condiciones que los experimentos anteriores, y seguido de posterior precipitación con metanol-cloroformo para eliminar las sales, ya que la presencia de sales en la muestra interfiere con la separación por isoelectroenfoque (Bonifacino *et al.*, 2004).

En los WB de los geles bidimensionales revelados con α -pM1 (Figura 19) se observaron puntos interesantes cuya intensidad (fosforilación) variaba tras la estimulación con NRG. Sin embargo, a pesar de esto, es muy difícil identificar en la tinción con plata los puntos que se visualizan claramente en el WB, ya que los geles no son totalmente superponibles. Además, como se mencionó previamente la sensibilidad de la tinción con plata es bastante menor que en la detección por WB, y con plata se tiñen todas las proteínas del extracto. Por lo tanto, el hecho de que se puedan identificar puntos que parecen coincidir en ambos ensayos, no necesariamente implica que sean la misma proteína. Es decir, las proteínas identificadas por WB con un anticuerpo específico pueden no alcanzarse a visualizarse en la tinción con plata, por encontrarse en baja cantidad, y por otra parte proteínas que parecen encontrarse en el mismo sitio del gel de plata y del WB, en el primero puede que ese punto corresponda a otra proteína que posee el mismo PI y peso molecular que la proteína identificada por WB (o muy similar), pero que sea más abundante en el extracto proteico que la proteína de interés.

Teniendo en cuenta lo puntualizado anteriormente, en los geles bidimensionales se observaron un conjunto de puntos desplazados horizontalmente con el tamaño de p70 (señalados con un óvalo negro), que también disminuían su intensidad tras el estímulo de la célula con NRG. Esto permitió pensar que podrían corresponder a la banda de p70 visualizada en los geles de una dimensión. Como se mencionó anteriormente en estos geles se veía una banda gruesa, que podría ser en realidad un conjunto de bandas provenientes de distintos niveles de fosforilación de la proteína p70. Si esto fuera así, en un gel bidimensional es de esperar que estas bandas no se localicen en el mismo sitio ya

que el estado de fosforilación del producto proteico también va a influir, aunque levemente, sobre el punto isoeléctrico. Concretamente si la proteína está más fosforilada, en el gel unidimensional esto se visualizará por un leve retardo de la banda, en cambio en un gel bidimensional no sólo se puede llegar a ver ese retardo sino también un desplazamiento hacia el sitio del gradiente donde el pH es más ácido, ya que al estar más fosforilada las cargas negativas de este grupo vuelven la proteína levemente más ácida, alterando su PI. A pesar de esta congruencia en los datos, era difícil ubicar este conjunto de puntos en el gel de plata.

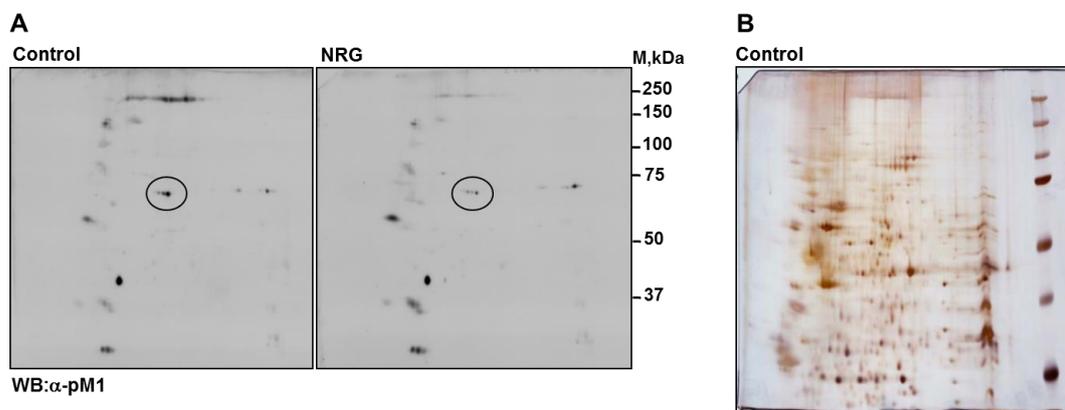


Figura 19. Geles bidimensionales a partir de extracto. La línea celular MCF7 fue serodeprivada por 24 horas y parte se estimuló con NRG 10 nM durante 15 minutos. Posteriormente se lisó y 200 μ g de extracto estimulado y control se precipitó con metanol-cloroformo, como se describe en la sección de Materiales y métodos, y se analizaron por electroforesis en gel bidimensional (realizado por el Servicio de Proteómica del CIC) y posterior WB con el anticuerpo α -pM1 (A) o tinción con plata (B).

Con la intención de lograr una mayor precisión en la identificación de p70, se decidió continuar con los geles bidimensionales pero a partir de extractos proteicos inmunoprecipitados con el anticuerpo α -pM1, tratados de la misma forma que en los experimentos anteriores. La dificultad que surgió fue que las muestras para los geles bidimensionales requieren un procesamiento distinto que en los geles de una dimensión. Al ser necesaria la eliminación de las sales y como el tampón que se utiliza para cargar la muestra en el isoelectroenfoque tiene composición distinta, se probaron diferentes protocolos para liberar la proteína de interés de las bolitas de proteína A-sefarosa, intentando siempre minimizar el contenido de sales y detergente de la muestra.

Como se muestra en la Figura 20 y se describe en la sección de Materiales y métodos, se ensayaron distintas condiciones para eluir las proteínas unidas al

anticuerpo o en su defecto el complejo antígeno-anticuerpo, de las bolitas de proteína A-sefarosa. Las condiciones probadas fueron: a) elución por pH ácido, b) por competición con el péptido frente al cual se obtuvo el anticuerpo α -pM1, c) por elución con tampón de urea 8M y CHAPS 4% seguido de precipitación con metanol-cloroformo o ácido tricloroacético-acetona, y por último d) un protocolo de disociación que utiliza SDS, agentes reductores (β -mercaptoetanol y DTT) y calor.

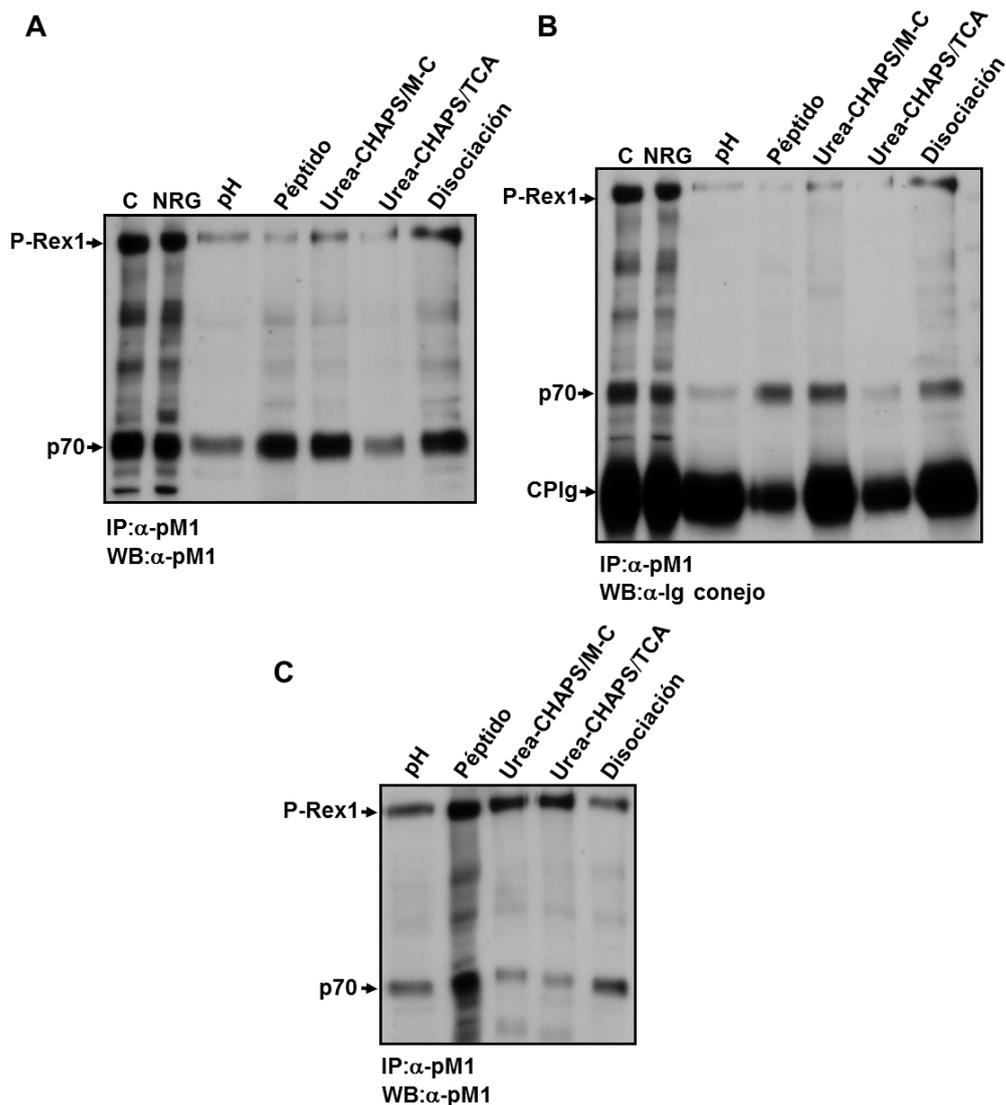


Figura 20. Protocolos para eluir a p70 de los inmunoprecipitados. La línea celular MCF7 fue serodeprivada 24 horas, se lisó y el extracto se inmunoprecipitó con el anticuerpo α -pM1. A continuación se siguieron los distintos protocolos de elución descritos en la sección de Materiales y métodos. Cada carril corresponde a 2 mg de extracto inmunoprecipitado. Los carriles C (control) y NRG (estimulado con NRG) se pusieron como control y fueron tratados como en los experimentos anteriores. Las distintas fracciones fueron analizadas por WB. **A.** WB de las fracciones eluidas. **C.** WB de las esferas de proteína A-sefarosa. Los WB en **A** y **C** fueron revelados con el anticuerpo α -pM1. **B.** Membrana del WB **A** reutilizada para revelar con anticuerpo α -Ig cadena pesada de conejo (CPIg).

En todas las condiciones probadas se logró eluir el producto de la banda de p70 junto con P-Rex1, aunque favorablemente la elución funcionó mejor para p70, probablemente porque su unión al anticuerpo es menos específica y por tanto menos fuerte que la de P-Rex1. Sobre la misma membrana se observó el contenido de Ig en las distintas eluciones (Figura 20.B), para establecer si los distintos protocolos desprendían el complejo antígeno-anticuerpo o sólo los antígenos, siendo preferible lo último por evitar que la abundancia de inmunoglobulina pudiera interferir en la identificación de p70. Al mismo tiempo se analizaron por WB las bolitas de la IP (Figura 20.C), para comprobar cuánto había quedado de p70 y P-Rex1 adherido a la proteína A tras la elución, verificándose que la mayor parte de p70 se había conseguido eluir, mientras que seguía quedando gran parte de P-Rex1 adherido.

Adicionalmente se ensayaron distintas condiciones para lisar las células. Como alternativa al tampón utilizado normalmente en el laboratorio para lisar las células que contiene el detergente no iónico NP-40, se probó el tampón de lisis RIPA que es más agresivo porque contiene SDS y Tritón X-100 (Figura 21). También se aumentó a 10 veces el número de lavados de las bolitas al finalizar la IP. Todo esto con el fin de eliminar las proteínas que se adhieren de forma inespecífica a las esferas de proteína A-sefarosa o al anticuerpo, y que pueden interferir con la identificación de p70. Además, estas condiciones permitían verificar que tras un tratamiento más agresivo p70 permanece unida al anticuerpo, dejando en evidencia la afinidad y especificidad de la interacción.

Si bien en el WB parece que el tampón RIPA es más eficiente para lisar, en verdad se utilizó una cantidad mayor de extracto para la IP ya que el lisado era de consistencia mucosa (con este tampón se lisan también los núcleos liberando el ADN) lo que dificultó la cuantificación. De acuerdo a las cantidades de extracto utilizadas para ambos tampones el rendimiento sería similar, y dado que el tampón RIPA presenta más inconvenientes al procesar la muestra, se decidió seguir con el tampón de lisis utilizado normalmente y aumentar el número de lavados.

En base a las condiciones probadas, se resolvió realizar el gel bidimensional a partir de extractos inmunoprecipitados, eluyendo la proteína con el tampón de elución con urea, ya que además de haber dado buenos resultados, es el que se usa

normalmente en el Servicio de Proteómica del CIC. Sin embargo, se ensayaron diferentes condiciones respecto a la elución y a las cantidades de extracto, anticuerpo, proteína A-sefarosa para lograr eluir la proteína en un volumen que permitiera cargar la muestra directamente sobre el isoelectroenfoque, sin tener que realizar el paso de precipitación con metanol-cloroformo, para minimizar la pérdida de muestra (resultados no mostrados).

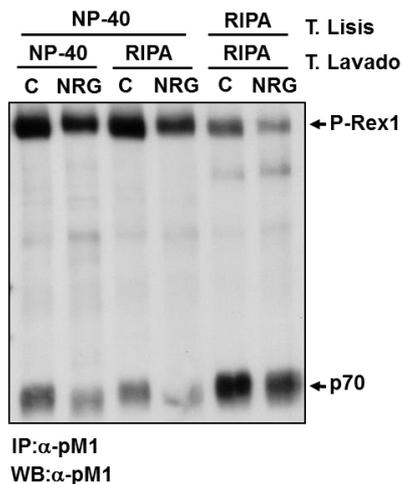


Figura 21. Condiciones de lisis. La línea MCF7 serodeprivada 24 horas y parte estimulada durante 15 minutos con NRG 10 nM (NRG), se lisó con tampón de lisis (T. lisis) que contiene el detergente NP-40 o con el tampón de lisis RIPA. La composición de ambos se describe en Materiales y métodos. Luego se inmunoprecipitó con el anticuerpo α -pM1 utilizando por carril 2 mg de extracto del lisado con NP-40 o el extracto proveniente de una placa de 100 mm (un poco más de 2 mg) lisada con RIPA. Luego de las 2 horas de inmunoprecipitación, se realizaron 10 lavados (T. lavado) con tampón NP-40 o con RIPA. Finalmente se analizaron las muestras por WB con el anticuerpo α -pM1.

En este punto, la identificación de proteínas en los geles bidimensionales se iba a realizar directamente recortando de la membrana del WB la región correspondiente a la proteína, para evitar los inconvenientes de la superposición con el gel de plata que se da principalmente en los geles de dos dimensiones, y la menor sensibilidad de la tinción con plata respecto al WB. La muestra recortada sería analizada por espectrometría de masas por el Servicio de Proteómica del CIC.

Como se puede ver en los WB de la Figura 22, en el control se observaron unos puntos a la altura de p70 (marcados con un óvalo) que no se ven en la membrana de la muestra estimulada con NRG, que podrían corresponder a los distintos niveles de fosforilación de p70 que se observan en los geles de una dimensión. Sin embargo, al igual que en los geles bidimensionales a partir de extracto (Figura 19), el resultado no es muy claro y la intensidad de los puntos es muy débil, lo que indica que probablemente la cantidad de proteína presente en la membrana no sea suficiente para su identificación por espectrometría de masas, por lo que se decidió mejorar las condiciones para obtener un resultado más claro.

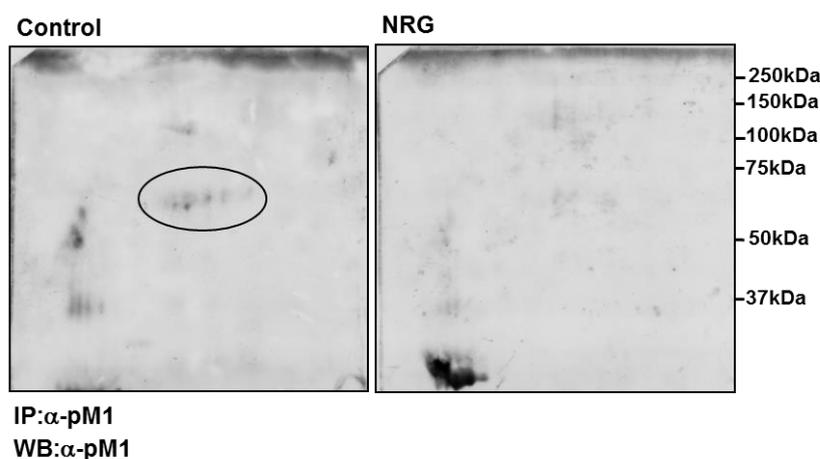


Figura 22. Geles bidimensionales a partir de extractos inmunoprecipitados de MCF7. La línea MCF7 fue serodeprivada 24 horas y se estimuló con NRG 10 nM (NRG) por 15 minutos. Como control (Control) se separó una fracción sin estimular. Se lisaron las células y 6 mg de extracto se inmunoprecipitaron con el anticuerpo α -pM1. Luego de 2 horas de incubación a 4 °C en agitación, los inmunocomplejos se lavaron 5 veces con tampón de lisis y 2 con agua, para eliminar las sales. A continuación se llevó a cabo el protocolo de elución con el tampón de urea 8M-CHAPS 4%, como se describe en Materiales y métodos. En los 200 μ l finales de la elución se añadieron los anfólitos y el DTT, y se cargó en el isoelectroenfoque. Por último, los geles bidimensionales se visualizaron por WB con el anticuerpo α -pM1.

Dado que en el WB de la Figura 21, en el carril correspondiente al lisado y lavado con RIPA de las células MCF7 control, la banda de p70 era muy definida e intensa, se recortó para su identificación por espectrometría de masas con el equipo LTQ Orbitrap Velos del Servicio de Proteómica. En la Tabla IX se muestra el listado de posibles proteínas proveniente del análisis de los péptidos identificados en la banda recortada de la membrana.

Teniendo en cuenta el peso molecular de p70 y según los criterios de mayor cobertura de secuencia (coverage), mayor número de péptidos únicos identificados y valores de Score más altos, cinco proteínas de la Tabla IX eran las que podían corresponder a p70. En este punto, se decidió averiguar la identidad de p70 por WB con anticuerpos específicos para estas proteínas empezando con Vangl1, que era la primera candidata, de acuerdo a los criterios mencionados.

Tabla IX. Proteínas identificadas en la banda recortada del WB de la Figura 21

Accession	Description	MW [kDa]	Σ Coverage	Σ # Unique Peptides	Score A2 ^a	Coverage A2	# PSM A2	Score A3 ^a	Coverage A3	# PSM A3
Q8TAA9	Vang-like protein 1	59,9	28,4	14	641,2	28,4	22	70,4	28,4	21
P02787	Serotransferrin	77,0	24,8	13	612,8	24,8	18	53,8	22,1	16
P60709	Actin, cytoplasmic 1	41,7	29,6	8	264,3	26,7	8	30,2	25,9	9
P05413	Fatty acid-binding protein, heart	14,8	29,3	3	253,8	29,3	5	17,0	29,3	5
P47989	Xanthine dehydrogenase/oxidase	146,3	3,5	4	218,4	3,5	5	13,7	3,0	4
P06858	Lipoprotein lipase	53,1	10,5	3	166,1	10,5	3	11,8	10,5	3
Q96RR1	Twinkle protein, mitochondrial	77,1	9,9	5	153,6	9,9	6	15,5	9,9	5
P02768	Serum albumin	69,3	5,1	4	153,0	5,1	5	13,0	3,9	4
P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	70,9	15,5	8	129,3	15,5	8	13,1	10,1	5
Q99541	Perilipin-2	48,0	11,2	4	129,2	11,2	8	18,8	11,2	8
P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	18,0	19,4	2	128,8	19,4	3		0,0	
Q9NZH0	G-protein coupled receptor family C group 5 member B	44,8	3,5	2	97,6	3,5	2	5,9	3,5	2
Q9UNQ0	ATP-binding cassette sub-family G member 2	72,3	4,7	3	86,9	4,7	3	6,4	3,4	2
P62805	Histone H4	11,4	31,1	3	86,6	31,1	3	7,9	31,1	3
P62820	Ras-related protein Rab-1A	22,7	21,5	3	86,3	21,5	3	9,4	21,5	3
Q96KK5	Histone H2A type 1-H	13,9	21,9	2	66,7	21,9	3	10,0	21,9	3
P49327	Fatty acid synthase	273,3	1,8	3	66,3	1,8	3		0,0	
P06727	Apolipoprotein A-IV	45,4	5,6	2	64,5	5,6	2	5,4	5,6	2
P62491	Ras-related protein Rab-11A	24,4	9,7	2	58,2	9,7	2			
A6NMY6	Putative annexin A2-like protein	38,6	5,6	2	55,5	5,6	2		0,0	
O75874	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	46,6	5,8	2	54,1	5,8	2	4,9	5,8	2
P02649	Apolipoprotein E	36,1	6,6	2	45,4	6,6	2	5,4	6,6	2
P07437	Tubulin beta chain	49,6	7,9	3	44,4	7,9	3	5,3	5,6	2
Q9BQE3	Tubulin alpha-1C chain	49,9	5,4	2	41,7	5,4	2	5,7	5,4	2
P68104	Elongation factor 1-alpha 1	50,1	7,1	3	40,8	7,1	3		0,0	
P60953	Cell division control protein 42 homolog	21,2	14,1	2	31,4	14,1	3	7,7	14,1	3
IPI00879639.1	HP47 protein (Fragment)	8,7	51,3	3				18,7	51,3	5

^a Los valores de Score A2 y A3 fueron obtenidos con los algoritmos MascotTM y SEQUEST®, respectivamente.

Como se puede ver en la Figura 23, p70 fue identificada por WB como Vangl1. Se inmunoprecipitaron con los anticuerpos α -pM1 y α -Vangl1 (comercial) extractos de la línea MCF7 control y estimulada con NRG y la línea Hela, en la que también se observó la banda de p70 (Figura 13). Las membranas se revelaron con los mismos anticuerpos de forma cruzada, y en ambos casos se pudo ver la banda correspondiente a p70 (Figura 23.A). Además en un mismo WB se cargaron extractos inmunoprecipitados con los 2 anticuerpos y se reveló con el anticuerpo de Vangl1 verificándose la presencia de la misma banda (Figura 23.B).

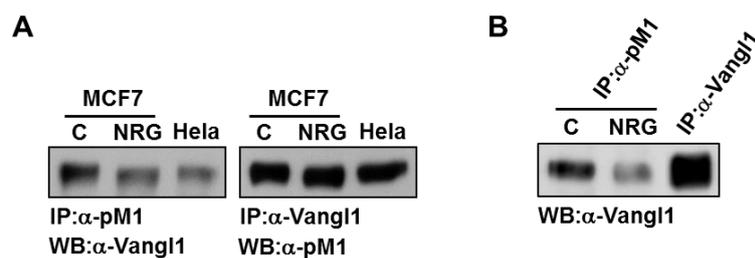


Figura 23. P70 es Vangl1. **A.** La línea MCF7 fue serodeprivada ON y se estimuló con NRG 10 nM (NRG) por 15 minutos. Como control (C) se separó una fracción sin estimular. Se lisaron junto con la línea celular Hela y 2 mg de cada extracto se inmunoprecipitó con el anticuerpo α -pM1 o α -Vangl1. Los inmunocomplejos se cargaron en un mismo gel de acrilamida y se transfirieron a una misma membrana que fue luego cortada para incubar con los anticuerpos α -pM1 o α -Vangl1. **B.** Extractos proteicos obtenidos igual que en A se inmunoprecipitaron con el anticuerpo α -pM1 (control y tratado con NRG) o α -Vangl1 (control) y se visualizaron por WB revelado con α -Vangl1.

Si bien se pudo detectar claramente Vangl1 en WB de muestras inmunoprecipitadas con α -Vangl1, no fue posible visualizarla por WB a partir de extractos. Por lo que en adelante todos los WB de Vangl1 fueron realizados a partir de extractos inmunoprecipitados.

Dado que el anticuerpo α -Vangl1 funcionaba en IP, se validó la capacidad para reconocer la localización subcelular de Vangl1 en la línea MCF7 mediante inmunofluorescencia (IF). En concordancia con lo descrito en la literatura (Iliescu *et al*, 2011), en la inmunofluorescencia de la Figura 24.A se observa la ubicación de Vangl1 en la membrana celular, lo que también fue verificado mediante fraccionamiento celular (Figura 24.B).

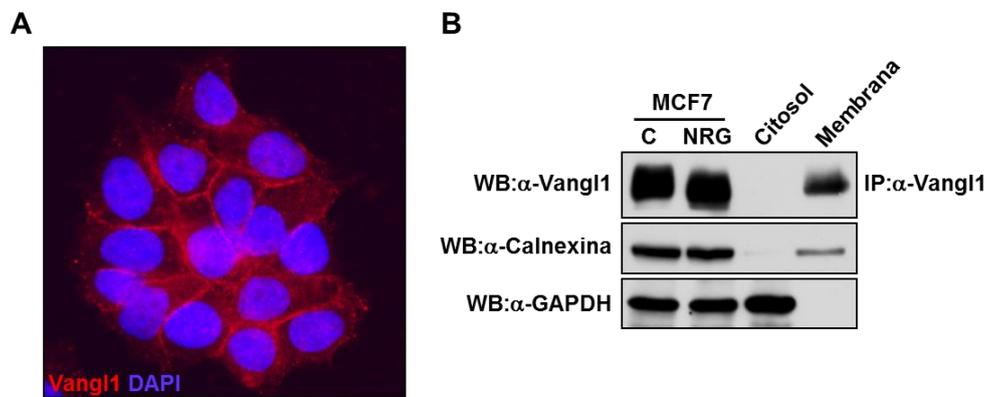


Figura 24. Localización de Vangl1 en la línea celular MCF7. **A.** Localización subcelular de Vangl1 por IF con el anticuerpo α -Vangl1. La tinción en rojo corresponde a Vangl1, que se localiza principalmente en la membrana celular. En azul se muestran los núcleos celulares teñidos con DAPI. **B.** WB del fraccionamiento de la línea MCF7 previa serodeprivación ON. Como control se cargaron en el mismo gel extractos inmunoprecipitados, obtenidos como se describe en experimentos previos (C, NRG). Controles del fraccionamiento: WB α -Calnexina (membrana) y α -GAPDH (citosol), realizados a partir de los extractos celulares.

2. Vangl1 en líneas celulares

Una vez identificada p70 como Vangl1, al disponer de un anticuerpo específico se decidió analizar en diversas líneas celulares la presencia de la misma (Figura 25), y el grado de fosforilación en el residuo identificado por el anticuerpo α -pM1. El estudio se realizó sobre paneles de líneas celulares de cáncer de mama (incluyendo los subtipos luminal, triple negativo y Her2 positivo), de ovario, de pulmón (incluyendo líneas de cáncer de pulmón microcítico-SCLC y no microcítico-NSCLC), de hepatocarcinoma, de cabeza y cuello (de carcinoma escamoso-HNSCC) y mieloma (descritas en la Tabla V de Materiales y métodos).

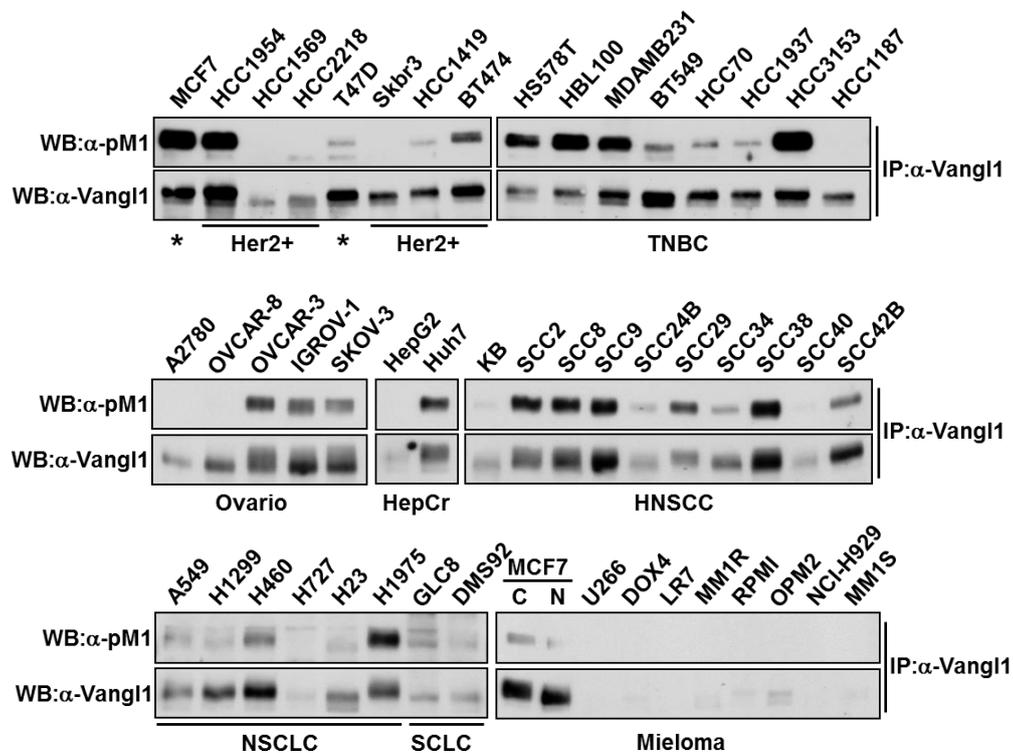


Figura 25. Vangl1 en líneas celulares. Extractos frescos (1 mg) de las líneas celulares fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo α -Vangl1 y visualizados por WB con α -pM1. Las mismas membranas, luego de matar la actividad peroxidasa del anticuerpo secundario, se reincubaron con α -Vangl1. * (cáncer de mama Luminal), Her2+ (cáncer de mama sobreexpresoras de Her2), TNBC (cáncer de mama triple negativo), HepCr (hepatocarcinoma), HNSCC (carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello), NSCLC (cáncer de pulmón de células no pequeñas), SCLC (cáncer de pulmón de células pequeñas). En el panel de líneas de mieloma se cargaron también inmunoprecipitados de MCF7 control (C) y estimulada con NRG (N).

Como se puede ver en los WB de la Figura 25, Vangl1 se encuentra presente en la mayoría de las líneas celulares analizadas, y la fosforilación del residuo reconocido por α -pM1 es variable. Sin embargo, a excepción de la línea celular

Resultados y Discusión

OPM2 donde se observaron niveles mínimos, en el resto de las líneas de mieloma no se detectó la proteína. Esto es congruente con la posible implicación que se le adjudica a esta proteína en la adhesión célula-célula o célula-MEC, ya que las líneas de mieloma crecen en suspensión y aisladas. (Anastas *et al.*, 2012, Lee *et al.*, 2004, MacMillan *et al.*, 2014).

3. Identificación del residuo de serina de Vangl1 reconocido por el anticuerpo α -pM1

Se llevaron a cabo ensayos de defosforilación *in vitro* (Figura 26) en la línea MCF7 y en distintas líneas de cáncer, para ver en qué medida este tratamiento afectaba a la banda visualizada por WB. Las células fueron serodeprivadas previo al experimento porque en WB anteriores se observaba que esta condición aumentaba el ancho de la banda de Vangl1, lo cual podría deberse al aumento de la fosforilación en el sitio pM1 y/u otros sitios.

En el WB de la Figura 26.A, que corresponde a los extractos inmunoprecipitados de la línea MCF7, se puede ver que tras el tratamiento con las fosfatasas, alcalina y lambda, el ancho de la banda de Vangl1 disminuye notablemente. También se modifica su migración quedando más abajo como si fuese una proteína de menor peso molecular. Esto último es de esperar ya que la fosforilación suele provocar un retardo en la migración en SDS-PAGE al presentar más cargas negativas por los grupos fosfatos añadidos. Éste es el caso de Vangl1 cuyo peso molecular es de 60 kDa, pero migra como una proteína de 70 kDa aproximadamente.

Para realizar el experimento que se muestra en la Figura 26.B se eligieron líneas celulares en las que previamente se había comprobado, mediante WB, que tenían Vangl1 y que presentaban también esa banda ancha y difusa, independientemente de encontrarse fosforilado el residuo pM1 (Figura 25). En el WB de Vangl1 se puede ver que en todas las líneas celulares, la banda migra más abajo luego del tratamiento con fosfatasa alcalina, aunque el ancho de la misma no se vea modificado en todas las líneas. Este efecto se observa independientemente del grado de fosforilación en el sitio pM1, lo cual es de esperar, ya que Vangl1 debe estar fosforilado en otros residuos además del reconocido por el anticuerpo α -pM1. Si bien el tratamiento con fosfatasa modificó el desplazamiento de Vangl1 en todas las líneas, la banda seguía siendo difusa, lo que podría deberse a otras modificaciones postraduccionales y/o a fosforilación residual.

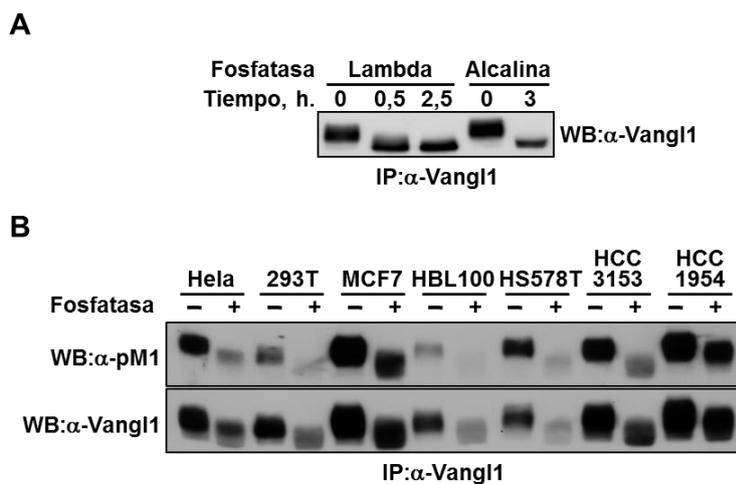


Figura 26. Ensayo de defosforilación in vitro. **A.** Extracto fresco de la línea MCF7 serodeprivada ON se inmunoprecipitó con el anticuerpo α -Vangl1 durante 2 horas, luego se lavó 3 veces con el tampón de lisis y 2 veces con el tampón de la fosfatasa alcalina. En el último lavado se separó en tubos eppendorf 2 mg de extracto inmunoprecipitado por cada condición (carril del WB). El ensayo se realizó como se describe en Materiales y métodos y se visualizó por WB revelado con α -Vangl1. **B.** Ensayo de defosforilación en distintas líneas de cáncer. Se realizó como en el punto A pero sólo con la fosfatasa alcalina durante 3 h. El WB se reveló primero con el anticuerpo α -pM1 y tras eliminar la señal del anticuerpo secundario, se reutilizó la membrana para revelar con α -Vangl1.

Para determinar el residuo fosforilado de Vangl1 reconocido por el anticuerpo α -pM1, se siguieron dos estrategias: a) identificación de péptidos fosforilados por espectrometría de masas y b) expresión de formas mutantes de Vangl1 fusionadas al epítipo de hemaglutinina (HA).

3.1. Identificación de péptidos fosforilados por espectrometría de masas

Como previamente se demostró en los ensayos de defosforilación *in vitro*, Vangl1 se encuentra fosforilada probablemente en más de un residuo. Tras la experiencia de la identificación de p70 por técnicas de proteómica, se decidió identificar por espectrometría de masas los péptidos de Vangl1 que estaban fosforilados y si la fosforilación era dependiente de la estimulación con NRG, como en la serina reconocida por α -pM1.

Para el ensayo, la línea celular MCF7 fue serodeprivada y una parte se estimuló con NRG 10 nM durante 15 minutos, como se realizó en los experimentos anteriores. Luego de lizarlas, se inmunoprecipitaron los extractos celulares con el anticuerpo α -Vangl1 según las distintas condiciones tal como se indica en la Figura

27.A. En el mismo gel de acrilamida (SDS-PAGE) se cargaron todas las muestras, posteriormente se utilizó una parte para WB con α -Vangl1 y la otra para teñir con plata. El WB de Vangl1 se hizo a partir del mismo gel que el de plata, para poder alinear los dos y recortar con mayor precisión la banda de Vangl1 del gel de plata, tomando como referencia la banda de Vangl1 del WB (dado que en el gel de plata se tiñen todas las proteínas de la IP). Las bandas recortadas del gel de plata, correspondientes a células serodeprivadas (control) y estimuladas con NRG (NRG) fueron enviadas para su identificación al Servicio de Proteómica del CIC.

Del mismo gel que se tiñó con plata, a la altura de Vangl1, también se recortaron para su identificación los carriles provenientes de extractos de las mismas células inmunoprecipitados con un anticuerpo específico para otra proteína (α -JIP4) pero de la misma especie que α -Vangl1 (Ig de cabra). De esta manera se esperaba poder discriminar los péptidos fosforilados que correspondían a Vangl1, de los que podían estar presentes en la muestra por interactuar con la Ig de cabra o con las bolitas de γ -bind-sefarosa utilizadas en la IP.

En el análisis proteómico esquematizado en la Figura 27.B se identificaron una serie de péptidos monofosforilados en Vangl1 que se encontraban presentes en ambas condiciones (control y NRG, péptido enmarcado en verde) o sólo en la tratada con NRG (péptidos enmarcados en rosa). No se observó ninguno que se correspondiera con el reconocido por el anticuerpo α -pM1, ya que éste debería estar en mayor medida en las células control y disminuir o desaparecer en las estimuladas con NRG. Sin embargo, una de las cuestiones a tener en cuenta con respecto a la espectrometría de masas es que para poder identificar un residuo, éste debe estar en un péptido que haya conseguido ser volatilizado, y esto no sucede en todos los casos. Con lo cual puede ser que el residuo pM1 no haya sido identificado por estar en un péptido no volatilizado. Esto podría intentar corregirse haciendo digestiones parciales con tripsina para obtener péptidos de tamaños diferentes, y de esta manera lograr volatilizar e identificar a la porción que contiene el residuo pM1. En las muestras de los carriles provenientes de las IP con α -JIP4 no se detectaron péptidos fosforilados.

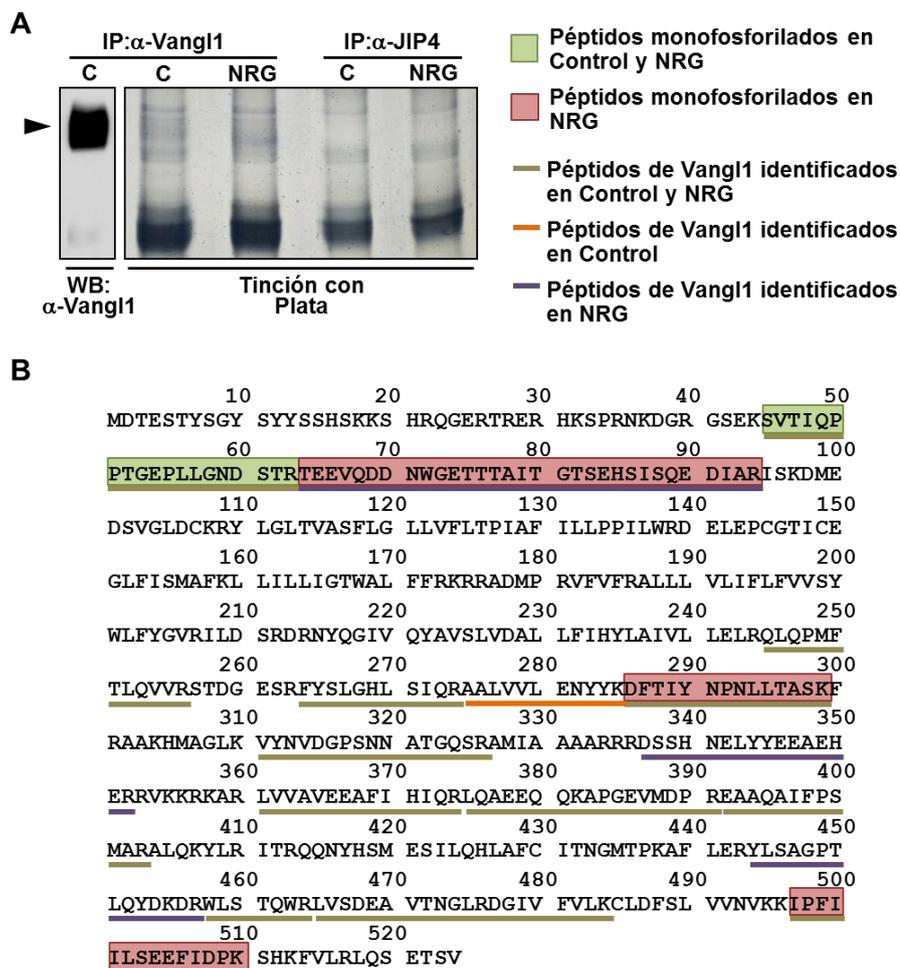


Figura 27. Identificación de residuos fosforilados en Vangl1 por espectrometría de masas. **A.** Extractos de la línea celular MCF7 serodeprivada ON y estimulada durante 15 minutos con NRG 10 nM (NRG) o sin estimular (C), fueron inmunoprecipitados con los anticuerpos α -Vangl1 o α -JIP4 (ambos de cabra) con γ -bind sefarosa durante 2 horas. Posteriormente se cargaron en un gel de acrilamida y una parte se destinó a WB con α -Vangl1 (carril izquierdo) y la otra fue teñida con plata. Del gel de plata se recortaron las bandas que se encontraban a la misma altura que la banda de Vangl1 en el WB, y se enviaron a la Unidad de Proteómica del CIC para identificar los péptidos fosforilados por espectrometría de masas. Para el WB se inmunoprecipitó 2 mg de extracto control y para el gel de plata se inmunoprecipitó 6 mg por condición (carril). **B.** Esquema de la secuencia peptídica de Vangl1 con el resultado del análisis proteómico.

Por otra parte, el análisis por proteómica se realizó primero haciendo digestión de las proteínas presentes en la muestra e identificando los péptidos por espectrometría de masas (péptidos subrayados en la Figura 27.B). En la muestra control, Vangl1 fue identificada con una cobertura de secuencia de 32,1% y una intensidad de 40,9%; en la muestra estimulada con NRG Vangl1 fue identificada con una cobertura de secuencia de 41,4% y una intensidad de 57,2%. A continuación, se purificaron por columna de afinidad los péptidos que estaban

fosforilados y se identificaron por espectrometría de masas. En el esquema de la Figura 27.B se observa que sólo uno de los péptidos fosforilados (aa 45-63) se identificó en ambas muestras, mientras que los 3 restantes fueron identificados en la muestra estimulada con NRG. A priori esto pareciera indicar que son fosforilaciones estimuladas por NRG, sin embargo, cabe mencionar que en el análisis previo de identificación de péptidos de Vangl1, uno de estos péptidos (aa 64-94) sólo había sido identificado en la muestra estimulada con NRG. Esto sugiere que dicho péptido podría estar también fosforilado en la muestra control, y que no haya podido ser identificado.

Los resultados del estudio proteómico ponen en evidencia, como era de esperar, que Vangl1 se encuentra fosforilada en más de un sitio, y que en algunos residuos la fosforilación ocurre tras la estimulación con NRG.

3.2. Identificación del sitio pM1 por mutagénesis de Vangl1

Para identificar el residuo fosforilado de serina que reconoce el anticuerpo α -pM1, se construyeron formas mutantes de la proteína y se estudió la fosforilación con dicho anticuerpo. En primer lugar se clonó en el vector de expresión pcDNA3 la forma silvestre de Vangl1 fusionada por el extremo N-terminal al epítipo HA, y se verificó que ésta pudiera ser fosforilada en el residuo pM1 al ser reconocida en WB por el anticuerpo α -pM1. Se transfectó la línea celular Hela con la construcción y con el vector vacío como control, mediante la técnica que utiliza el reactivo jetPEI®. Se utilizó esta línea celular ya que tiene buena eficiencia de transfección y al igual que la línea MCF7, posee el residuo pM1 de Vangl1 fosforilado. Pasados tres días de la transfección las células se lisaron y los extractos se inmunoprecipitaron con el anticuerpo α -HA, para ser analizados posteriormente por WB. En el WB revelado con α -HA de la Figura 28.A se visualiza una banda a la altura de Vangl1 en el carril del WB correspondiente a la IP del extracto de Hela transfectada con pcDNA3-HA-Vangl1, que no se observa en el carril correspondiente a la IP del extracto de las células transfectadas con pcDNA3 vacío. Además, esta banda también se visualiza en el WB revelado con α -pM1.

A pesar de que en las células Hela se podía observar la expresión de HA-Vangl1 por WB, fue dificultoso visualizar la fosforilación en el residuo pM1. En este punto, se decidió clonar el epítipo de HA en el extremo C-terminal de Vangl1, para

verificar que la ubicación del mismo no estuviese interfiriendo con la fosforilación en ese residuo. Como se puede ver en el WB de la Figura 28.B ambas construcciones de la proteína eran reconocidas por el anticuerpo α -pM1, independientemente del extremo al que se fusionara el epítipo HA. Frente a esta evidencia se intentó optimizar las condiciones de transfección y se serodeprivó las células antes de lisarlas, para favorecer la fosforilación en pM1.

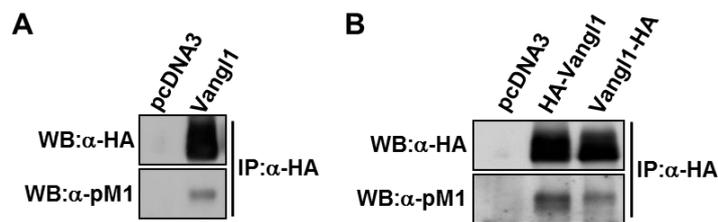


Figura 28. Expresión de HA-Vangl1 en Hela. **A.** Vangl1 fue clonado en el vector de expresión pcDNA3 fusionado en su extremo N-terminal al epítipo HA. Esta construcción y el vector vacío fueron transfectados en la línea celular Hela. Pasados 3 días las células se lisaron y los extractos (3 mg) fueron inmunoprecipitados con α -HA y visualizados mediante WB primero revelado con α -pM1 y tras eliminar actividad peroxidasa del anticuerpo secundario, se reutilizó la membrana para revelar con α -HA. **B.** De la misma manera que en **A**, en el WB se muestran las fusiones de HA al extremo N-terminal de Vangl1 (HA-Vangl1, segundo carril) y C-terminal (Vangl1-HA, tercer carril).

A continuación se construyeron dos formas mutantes de Vangl1, una que presentaba deletado el extremo N-terminal (aa 1-102) y la otra con delección del extremo C-terminal (aa 250-524), ambas fusionadas por el extremo N-terminal al epítipo HA y clonadas en el vector pcDNA3. Como anteriormente, se transfectaron en células Hela y se analizó a los 3 días por WB la expresión de la proteína y la fosforilación en el sitio pM1 (Figura 29). En el WB revelado con α -HA se observa la expresión de las distintas construcciones a las alturas esperadas de acuerdo a los PM (HA-Vangl1 64 kDa, HA-Vangl1 Δ C-terminal 34k Da y HA-Vangl1 Δ N-terminal 55 kDa). Es curioso el patrón de bandas que se observa en el carril correspondiente a la delección del extremo C-terminal (observada en distintas repeticiones del experimento).

Con respecto a la fosforilación de las distintas formas expresadas, en el WB α -pM1 sólo se reconoce la forma silvestre de Vangl1 y la que posee delección del extremo C-terminal. En esta última, α -pM1 reconoce una banda ubicada a una altura mayor de la que le corresponde por el PM de la forma truncada (banda

inferior del carril del WB revelado con α -HA). Dado que el anticuerpo α -pM1 reconoce a HA-Vangl1 Δ C-terminal, podemos afirmar que el residuo reconocido por el anticuerpo no se encuentra en la porción delecionada del extremo C-terminal de Vangl1.

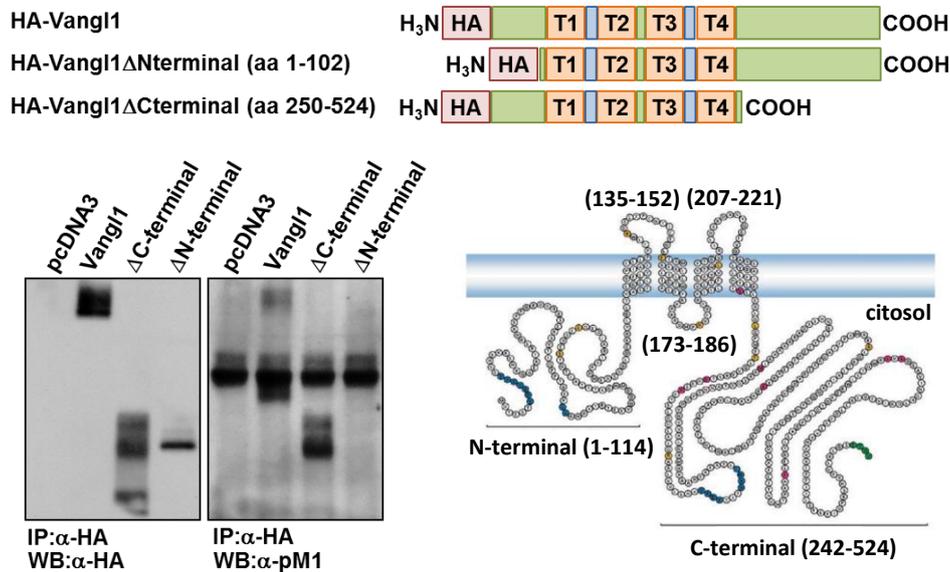


Figura 29. Expresión de HA-Vangl1 y sus formas mutantes en HeLa. En la parte superior se muestra el esquema de Vangl1 y las deleciones de los extremos N y C terminal (en verde, naranja y celeste, porciones citoplasmáticas, transmembrana y extracelular, respectivamente). Los extractos de las células transfectadas fueron analizados mediante IP y WB como se indica en la figura anterior.

Con respecto a la forma de Vangl1 con el extremo N-terminal delecionado, el que no se manifieste la fosforilación a pesar de expresarse la proteína puede ser por varios motivos. En primer lugar podría deberse a que la serina reconocida por α -pM1 se encuentra en la porción delecionada. Segundo, que esta deleción impide un correcto plegamiento por lo que la quinasa no es capaz de reconocerlo. Tercero, que la porción delecionada sea necesaria para la fosforilación aunque no contenga a la serina. Cuarto, dado que Vangl1 es una proteína de membrana y que el péptido-sígnal para su ubicación se encuentra en la porción N-terminal, la deleción podría provocar que la proteína no consiga ser direccionada a la membrana impidiendo que sea reconocida por su quinasa.

Para complementar el análisis por WB, se intentó visualizar la ubicación de las mutantes mediante inmunofluorescencia (IF) con el anticuerpo α -HA, en las células HeLa transfectadas con las distintas construcciones de Vangl1. Como se

Resultados y Discusión

observa en la Figura 30 y como es de esperar, la forma silvestre de Vangl1 se localiza en la membrana. La forma Vangl1 Δ C-terminal también se ubica en la membrana, aunque se observan algunos agregados en el citoplasma que podrían ser debido a la sobreexpresión. Sin embargo, la forma Vangl1 Δ N-terminal no consigue ir a la membrana y se ven agregados dentro de la célula. Como se mencionó anteriormente, esto podría deberse a la pérdida del péptido señal que permite el direccionamiento de la proteína a la membrana. Por lo tanto, aunque no se observe fosforilación en el carril de Vangl1 Δ N-terminal en el WB α -pM1, esto no necesariamente implica que el residuo pM1 está en la porción delecionada.

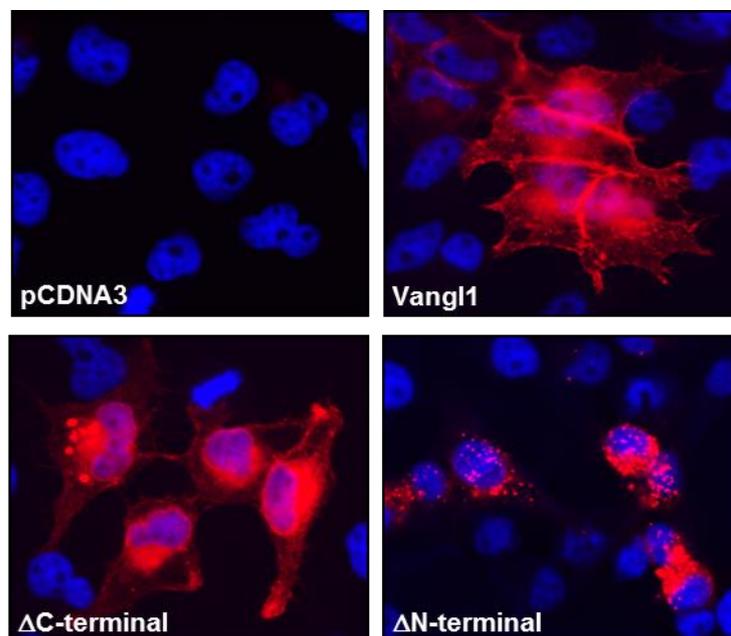


Figura 30. Localización de Vangl1 y sus formas mutantes en HeLa. IF de células HeLa transfectadas con las distintas construcciones y el vector vacío (pcDNA3). En rojo/HA (Vangl1 y las mutantes) y azul/DAPI (núcleos).

El paso siguiente para la identificación era hacer deleciones más acotadas y/o mutagénesis dirigida de las distintas serinas. En este punto se realizó un alineamiento de la secuencia de Vangl1 con la secuencia del péptido de P-Rex1 al que va dirigido el anticuerpo α -pM1, por ver si existía alguna región de homología. Para el alineamiento se utilizó la herramienta *Needleman-Wunsch Global Align Nucleotide Sequences*, disponible en la página web del NCBI. Como se muestra en la Figura 31.A, se identificó una región en el extremo N-terminal de Vangl1 que podría ser la reconocida por el anticuerpo α -pM1. En la secuencia hay dos serinas candidatas (17 y 20), por lo que se decidió hacer mutagénesis dirigida de ambas,

juntas y por separado, reemplazándolas por alanina (incapaz de ser fosforilada). Las construcciones se clonaron igual que en los casos anteriores en el vector pcDNA3 con el extremo N-terminal fusionado a HA. Luego de verificar las mutaciones por secuenciación, de la misma manera que anteriormente se analizaron por WB e IF. En el WB α -HA (Figura 31.B) se visualiza la expresión de las distintas formas de Vangl1, sin embargo sólo se observa fosforilación (WB α -pM1) en el carril correspondiente a la IP de Vangl1 normal. Por lo tanto, estas serían las serinas reconocidas por el anticuerpo α -pM1. Alternativamente, podría ser que solamente una de las serinas sea la reconocida por el anticuerpo, pero que la fosforilación entre ambas sea cooperativa y por tanto al no fosforilarse una tampoco se fosforila la otra.



Figura 31. Expresión de HA-Vangl1 y sus mutantes en serina en HeLa. **A.** Alineamiento de la secuencia de Vangl1 (aminoácidos 1 a 40) y la secuencia del péptido pM1. **B.** Por mutagénesis dirigida se reemplazaron las serinas 17 y/o 20 de la secuencia de Vangl1 clonada en pcDNA3 fusionada a HA, por residuos de alanina. A continuación, se transfectaron en la línea celular HeLa y se analizaron por WB como anteriormente. S17-20A, Vangl1 con ambas serinas mutadas a alanina; S17A y S20A, reemplazo de la serina 17 o 20, respectivamente por alanina.

Las IF de la Figura 32 demuestran que las distintas mutantes de Vangl1 se ubican sin problema en la membrana plasmática, indicando que la fosforilación en las serinas 17 y 20 no es esencial para la localización.

A continuación, las mutantes en serina fueron estudiadas en la línea MCF7. Dado que la transfección con jetPEI® en esta línea celular daba bajo rendimiento y les resultaba tóxico, se clonaron las construcciones en el vector pBabe que permite la incorporación del vector mediante infección retroviral y selección con puromicina. Al igual que en HeLa, sólo se observó fosforilación de pM1 en la forma

normal de Vangl1 (Figura 33.A), y todas se ubicaban en la membrana celular (Figura 33.B).

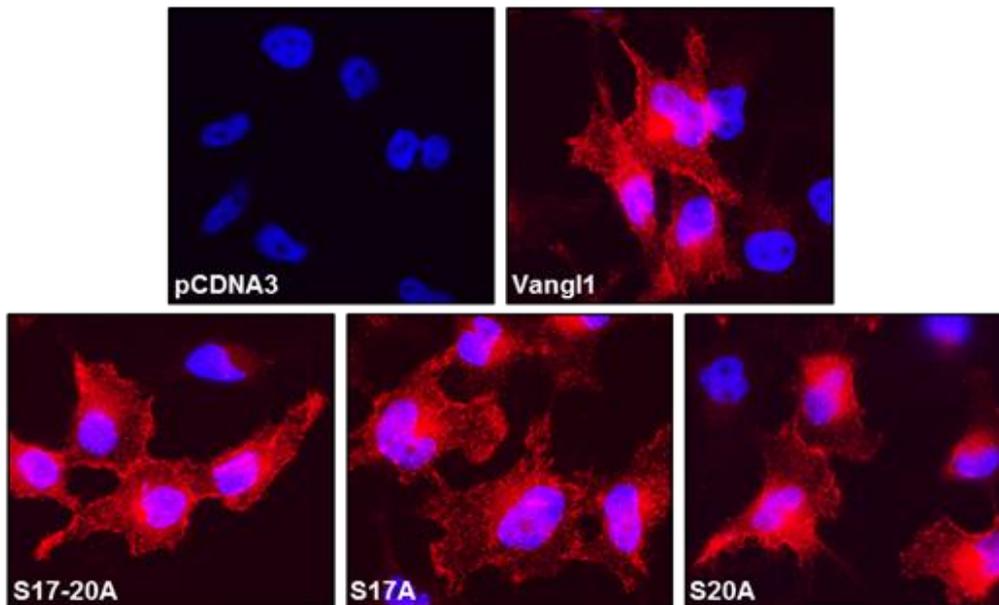


Figura 32. Localización de Vangl1 y sus formas mutantes en HeLa. IF de células HeLa transfectadas con las distintas construcciones y el vector vacío (pCDNA3). En rojo/HA (Vangl1) y azul/DAPI (núcleos).

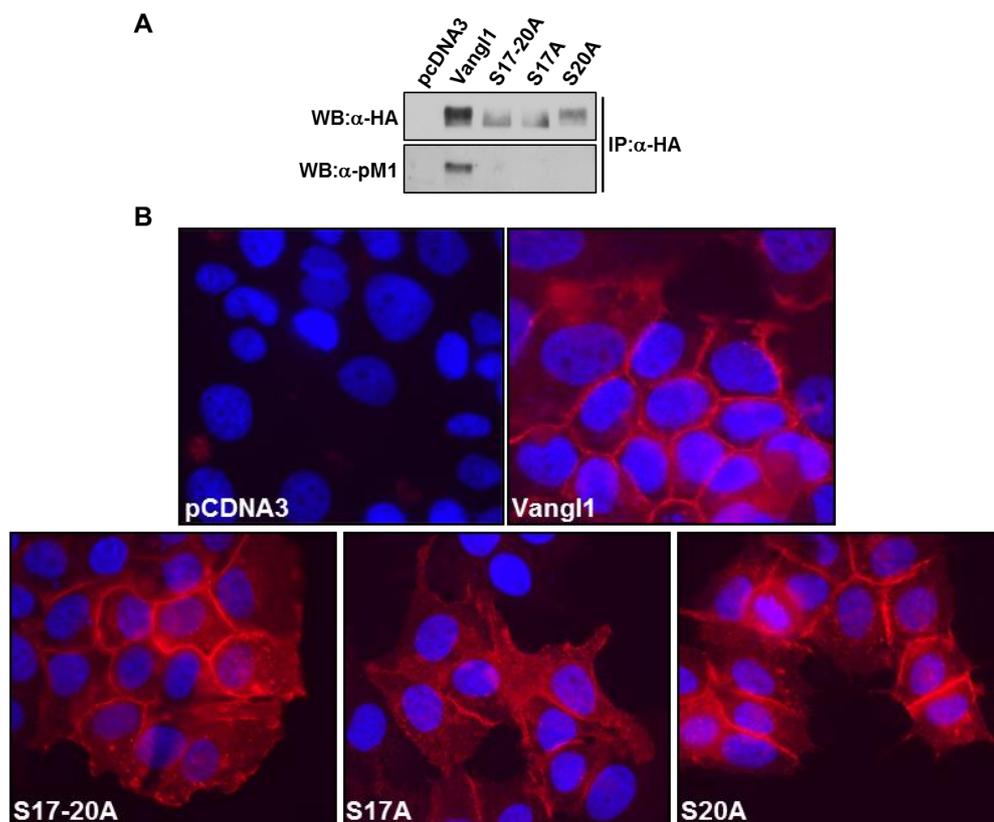


Figura 33. Expresión de HA-Vangl1 y sus mutantes en serina en MCF7. A. Las mutantes en serinas 17 y/o 20 de Vangl1 se clonaron en el vector retroviral pBabe. Luego de la infección y selección con puromicina, los extractos de las células MCF7 se analizaron por WB (A) e IF (B) como se indicó en los experimentos previos en HeLa.

4. Generación de un anticuerpo específico para la serina de Vangl1 reconocida por el anticuerpo α -pM1

Una vez identificadas las posibles serinas reconocidas por el anticuerpo α -pM1, se decidió hacer anticuerpos específicos dirigidos a cada serina en su estado fosforilado. Para esto se diseñaron 2 péptidos con la secuencia de Vangl1 que mostró homología con el péptido pM1. Uno de los péptidos con la serina 17 fosforilada y el otro con la serina 20 fosforilada (Figura 34.A). Dichos péptidos se inyectaron en conejos para generar los anticuerpos fosfoespecíficos, como se describe en la sección de Materiales y métodos. Luego de un mes, se obtuvo el primer sangrado y a los 10 días el segundo, que se purificaron para su utilización como se describe a continuación.

4.1. Especificidad de los anticuerpos obtenidos

Para purificar los anticuerpos a partir de los sueros provenientes de los sangrados, se incubó cada suero en una columna que poseía acoplado el péptido con el que había sido diseñado, tras sucesivos lavados, se eluyó el anticuerpo por pH ácido.

Dado que ambos anticuerpos, el que reconoce la serina 17 fosforilada y el que reconoce la serina 20 fosforilada (en adelante α -pS17 y α -pS20, respectivamente), partían de péptidos iguales a excepción de las serinas fosforiladas, se realizaron dos pasos previos de purificación cruzada. Para esto los sueros fueron incubados primero en la columna que poseía unido a la resina el péptido contrario (suero α -pS17 con resina pS20 y viceversa). La fracción que pasó por la columna sin ser retenida se volvió a pasar por la misma columna, para repetir la purificación cruzada. Finalmente, lo que eluyó sin ser retenido (*flowthrough*) se reincubó con la resina que tenía acoplado el péptido específico, y se recogieron las fracciones con el anticuerpo tras elución por pH ácido.

A continuación, se probaron los anticuerpos para ver su reactividad y especificidad. Primero se evaluó la especificidad mediante dotblots en membranas de nitrocelulosa con distintas cantidades de los péptidos pS17 y pS20, incubadas con las fracciones obtenidas en las distintas etapas de purificación: los sueros (sin purificar), Purif α -pS17 por columna pS20 y Purif α -pS20 por columna pS17 (los

Resultados y Discusión

anticuerpos eluidos por pH ácido en el paso de purificación cruzada, que eran los que reconocían a ambos péptidos); y las fracciones puras (etapa final de la purificación). Como se observa en la Figura 34.B, todas las fracciones purificadas son capaces de reconocer a ambos péptidos, incluso la final (fracción pura) en la que los anticuerpos que interaccionaban de forma cruzada habían sido eliminados. En paralelo una membrana se incubó con el anticuerpo α -pM1 y curiosamente éste sólo reconoció al péptido pS20, indicando que la serina 20 fosforilada era la reconocida por dicho anticuerpo.

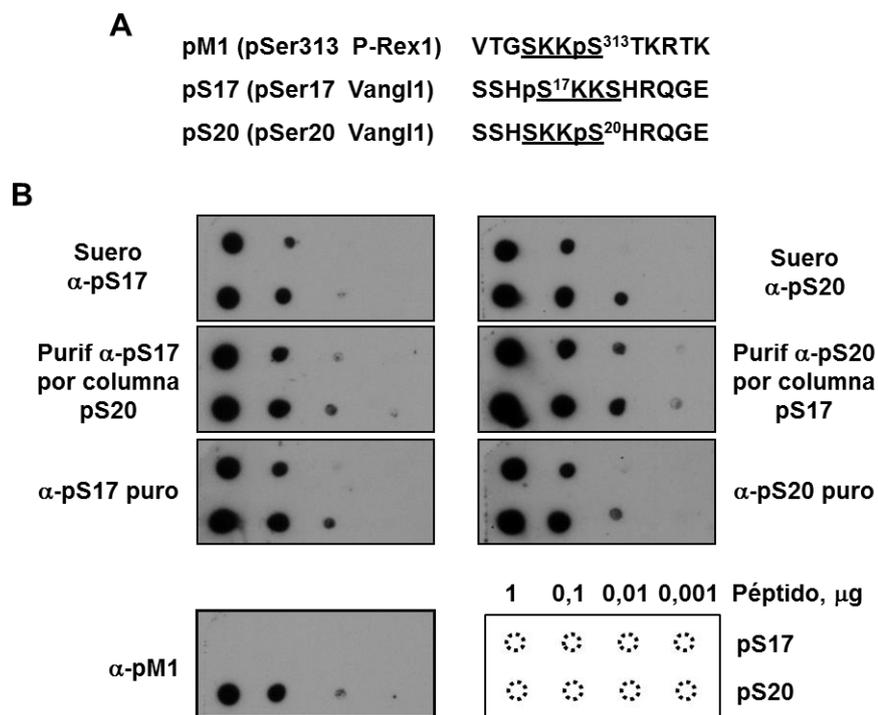


Figura 34. Generación de anticuerpos fosfoespecíficos. **A.** Secuencias de los péptidos utilizados para generar los anticuerpos α -pM1, α -pS17 y α -pS20. **B.** Dotblots de las distintas purificaciones del primer sangrado. En membranas de nitrocelulosa se colocaron distintas cantidades de los péptidos pS17 y pS20 (esquema inferior) y luego de ser bloqueadas con BSA se incubaron con las distintas fracciones: suero, eluato de la etapa de purificación cruzada (purif α -pS17 por columna pS20 y purif α -pS20 por columna pS17) y la fracción pura, que es lo que eluyó de la purificación final donde el *flowthrough* (FT) de las etapas de purificación cruzada se incubó en la columna con el péptido específico (el FT del suero pS20 pasado por la columna pS17, se pasó por la columna con el péptido pS20 y la fracción pura se recogió tras elución a pH ácido), y con α -pM1. Las membranas fueron luego incubadas con anticuerpo secundario α -Ig de conejo conjugado a HRP y reveladas como en los WB.

En esta instancia se decidió analizar también mediante dotblots la capacidad de las distintas fracciones purificadas, para reconocer otros péptidos que se utilizaron en el laboratorio para hacer anticuerpos que reconocen distintas serinas fosforiladas de P-Rex1, y que previamente habían sido utilizados para

determinar si reconocían a p70 (pM1, pM2, pM3 y pM4). Las fracciones también se probaron frente al péptido pAkt, con el que se diseñó el anticuerpo que además de reconocer a Akt fosforilado en las serina 473 reconocía a P-Rex1, motivo por el cual se identificó en el laboratorio (Montero *et al.*, 2011). Ninguna de las fracciones fue capaz de reconocer a los péptidos, ni siquiera α -pS20 logró reconocer al péptido pM1 (resultados no mostrados).

Para la purificación de los anticuerpos a partir del segundo sangrado, cada suero se hizo pasar directamente por la columna que tenía acoplado el péptido que le correspondía. Es decir, el suero de α -pS17 se pasó sólo por la columna que tenía acoplado el péptido pS17, y el suero α -pS20 por la columna que tenía acoplado el péptido α -pS20. Las fracciones resultantes de la elución por pH ácido se recolectaron y se utilizaron en dotblots para verificar su especificidad y comparar con la purificación del primer sangrado. Como se puede ver en la Figura 35 las purificaciones de los dos sangrados reconocían ambos péptidos.

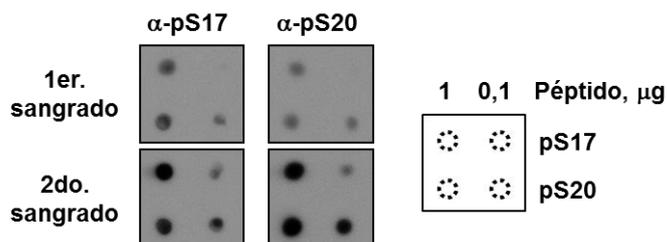


Figura 35. Dotblots para comparar la fracción de purificación final del primer sangrado (fracción pura) y la purificación del segundo sangrado. Los mismos fueron realizados igual que en la Figura 34.

4.2. Aplicación en WB e IP

A continuación, los anticuerpos purificados fueron validados para su utilización en WB e IP. Para probarlos en WB se inmunoprecipitaron con el anticuerpo α -Vangl1 extractos de células MCF7 control y estimuladas con NRG, y extractos de la línea 293 que posee Vangl1 pero su fosforilación en el sitio reconocido por pM1 es más leve (Figura 26). Los distintos extractos se inmunoprecipitaron por triplicado y se visualizaron por WB con los anticuerpos α -pM1, α -pS17 o α -pS20. Como se puede ver en los WB de la Figura 36.A el anticuerpo α -pS20 presenta el mismo patrón de bandas que α -pM1, por el contrario α -pS17 no fue capaz de reconocer ninguna banda. Las tres membranas fueron reincubadas con el anticuerpo α -Vangl1 para verificar que en todas las condiciones la IP había funcionado y que tenían igual cantidad de proteína. Por lo

Resultados y Discusión

tanto, fue posible verificar que el anticuerpo específico contra la serina 20 fosforilada es el que reconoce el sitio pM1, y aunque en los dotblots α -pS17 fue capaz de reconocer al péptido pS20, no sucedió lo mismo en los WB con la proteína entera.

Luego, para comprobar si α -pS17 y α -pS20 eran capaces de inmunoprecipitar a Vangl1, se inmunoprecipitaron con α -Vangl1, α -pS17 o α -pS20 extractos celulares en las mismas condiciones que las descritas anteriormente, y se visualizaron por WB con α -Vangl1. Como se puede observar en el WB de la Figura 36.B, sólo α -pS20 fue capaz de inmunoprecipitar a Vangl1, en mayor medida en la línea MCF7 que es la que tiene más fosforilada la serina 20. En el carril de la línea 293 se observa una banda más tenue, lo cual es de esperar ya que la fosforilación de pM1 en esa línea celular es menor.

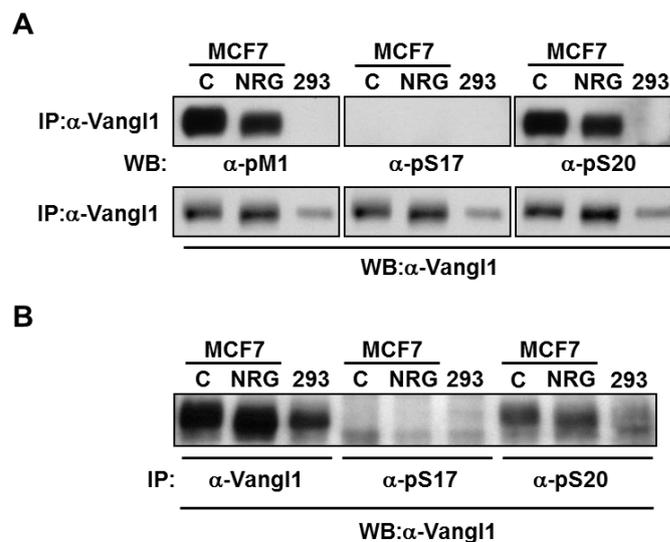


Figura 36. Validación de los anticuerpos. A. Validación en WB. Extractos de las líneas MCF7 control (C) y estimulada con NRG (NRG) y 293 fueron inmunoprecipitados con α -Vangl1, y visualizados por WB con los anticuerpos α -pM1, α -pS17 y α -pS20. Las mismas membranas, tras eliminar actividad del anticuerpo secundario, se reincubaron con α -Vangl1. B. Validación en IP. Extractos de las líneas MCF7 control (C) y estimulada con NRG (NRG) y 293 fueron inmunoprecipitados con los anticuerpos α -pM1, α -pS17 y α -pS20, y visualizados por WB revelado con el anticuerpo α -Vangl1.

Una vez verificada la capacidad de α -pS20 para reconocer a Vangl1, se propuso evaluar la especificidad del reconocimiento de la serina 20 fosforilada por este anticuerpo. Para esto se hizo un ensayo de competición (Figura 37) en el que de la misma manera que precedentemente, extractos de MCF7 control y estimulada con NRG y de 293 fueron inmunoprecipitados con α -Vangl1 y visualizados por WB,

con las siguientes condiciones de incubación del anticuerpo α -pS20: a) solo, b) en presencia del péptido que se utilizó para sintetizar dicho anticuerpo, que contiene la serina 20 fosforilada (pS20, WB de la derecha) y c) en presencia de un péptido con la misma secuencia pero cuya serina no estaba fosforilada (p20, WB ubicado en el medio). Cada membrana fue reincubada con α -Vangl1, tras matar la señal del anticuerpo secundario. Los WB permiten establecer que α -pS20 reconoce específicamente la serina 20 fosforilada, ya que sólo la presencia del péptido con la serina fosforilada fue capaz de evitar la unión del anticuerpo a la membrana. Por el contrario, el péptido con secuencia idéntica pero no fosforilado no fue capaz de competir, lo que se evidencia claramente en el WB que es igual al que sólo fue incubado con α -pS20.

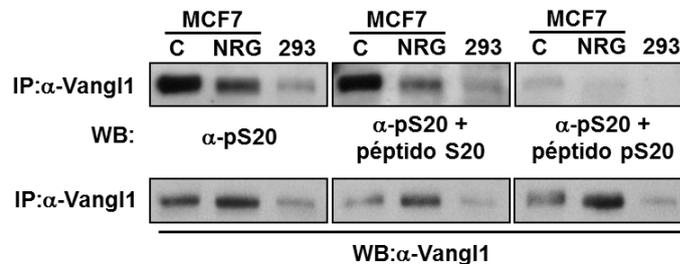


Figura 37. Ensayo de WB competitivo. Extractos de las líneas MCF7 control (C) y estimulada con NRG (NRG) y 293 fueron inmunoprecipitados con α -Vangl1, y visualizados por WB utilizando las siguientes condiciones de incubación del anticuerpo primario α -pS20: solo, en presencia del péptido utilizado para generar el anticuerpo (péptido pS20) o en presencia de un péptido con idéntica secuencia pero sin fosforilación en la serina 20 (péptido S20). Las mismas membranas, tras matar la actividad peroxidasa del anticuerpo secundario, se reincubaron con α -Vangl1.

Dado que el anticuerpo α -pS20 es capaz de inmunoprecipitar a Vangl1, se estudió su capacidad para reconocerlo en inmunofluorescencia. Si bien se ensayaron diferentes condiciones, no se observó un resultado claro (resultados no mostrados).

5. Regulación de la fosforilación del sitio pM1 de Vangl1

Con el fin de determinar la relación entre las distintas vías de señalización y la fosforilación de Vangl1 en la serina 20, se realizaron estudios de estimulación e inhibición de diferentes quinasas y fosfatasas involucradas en las vías.

5.1. Factores que estimulan la fosforilación en pM1

Primero se estudió si la fosforilación de Vangl1 en la serina 20 respondía a otros estímulos además de NRG. Para ello, la línea celular MCF7 fue serodeprivada ON y a continuación se estimuló durante 15 minutos con NRG (10 nM), IGF-1 (10 nM) o SDF1 α (5 nM). También se mantuvo una parte sin estimular como control. Los lisados se inmunoprecipitaron con α -Vangl1 y se visualizaron por WB, primero revelado con α -pS20 y luego con α -Vangl1 (Figura 38).

IGF-1 (*insulin growth factor 1*, factor de crecimiento insulínico tipo 1) es el ligando de IGF-1R, receptor para el factor de crecimiento insulínico tipo 1, presente en muchos tejidos. Al unirse el ligando, la tirosina quinasa del dominio citoplasmático de IGF-1R activa cascadas de señalización que estimulan el crecimiento y la proliferación celular e inhiben la muerte celular programada. SDF1 α , también llamado CXCL12, es una quimioquina que interacciona con el receptor CXCR4 participando en diferentes funciones celulares incluyendo embriogénesis, respuesta inflamatoria y homeostasis tisular. Ambos receptores han sido asociados a crecimiento tumoral y metástasis. (Chitnis *et al.*, 2008; Murphy *et al.*, 2010; Teicher *et al.*, 2010)

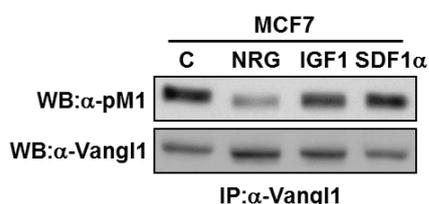


Figura 38. Células MCF7 serodeprivadas ON, se estimularon durante 15 minutos con NRG 10 nM, IGF-1 10 nM y SDF1- α 5 nM. Como control (C) se mantuvieron células sin estimular. Se lisaron y los extractos se inmunoprecipitaron con α -Vangl1 y se visualizaron por WB revelado primero con α -pS20 y luego de eliminar actividad del anticuerpo secundario, se reveló con α -Vangl1.

Como se puede ver en el WB α -pS20 de la Figura 38 sólo la estimulación con NRG disminuye la fosforilación en la serina 20 de Vangl1, y levemente IGF-1. Sin embargo, en todas las muestras estimuladas se visualiza Vangl1 como una banda más intensa y desplazada hacia un tamaño menor respecto al control (WB revelado

con α -Vangl1), lo cual podría deberse a la defosforilación de la proteína en otros residuos. Esto indicaría que la fosforilación en los distintos residuos de Vangl1 podría estar regulada por diferentes estímulos.

Dado que en todos los experimentos de estimulación, para evidenciar fosforilación en el sitio pM1 de Vangl1 las células eran previamente serodeprivadas, se decidió determinar de qué manera esta condición afectaba la fosforilación en función del tiempo. Células MCF7 fueron serodeprivadas durante distintos tiempos y después de lisadas, los extractos se visualizaron de la misma manera que en los experimentos anteriores mediante IP con α -Vangl1 y WB primero con α -pM1 y luego con α -Vangl1. Como se observa en la Figura 39, la fosforilación en la serina 20, comienza a aumentar a la media hora de eliminar el suero del medio, alcanzando un máximo entre las 9 y 12 horas, tras lo cual comienza nuevamente a disminuir.

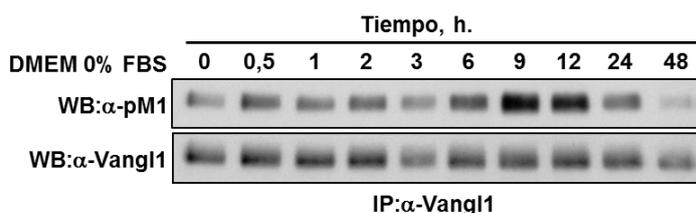


Figura 39. La línea celular MCF7 fue serodeprivada distintos tiempos, y los extractos de los lisados se analizaron por IP con α -Vangl1 y WB primero revelado con α -pS20 y luego con α -Vangl1, tras eliminar actividad del anticuerpo secundario. SBF, suero bovino fetal; h, hora.

Para estudiar el efecto que tenía la NRG sobre la fosforilación de Vangl1 en función del tiempo de estimulación, se realizó un experimento tratando células MCF7 con NRG durante distintos tiempos, previa serodeprivación. Como se había observado que la fosforilación variaba también en función del tiempo de serodeprivación, se hizo primero un experimento de estimulación con NRG a tiempos cortos, donde se mantuvo un solo control serodeprivado sin estimular (Figura 40.A), ya que en esos tiempos de estimulación con NRG no variaba la fosforilación basal del control. Sin embargo, para ver la fosforilación a tiempos mayores de estimulación con NRG, se mantuvo un control sin suero para cada tiempo de estimulación (Figura 40.B). En los WB se puede ver que la fosforilación en la serina 20 de Vangl1, alcanza un mínimo entre los 30 minutos y la hora de

estimulación con NRG, tras lo cual comienza a aumentar alcanzando un máximo a las 3 horas, manteniéndose estable a tiempos mayores de estimulación.

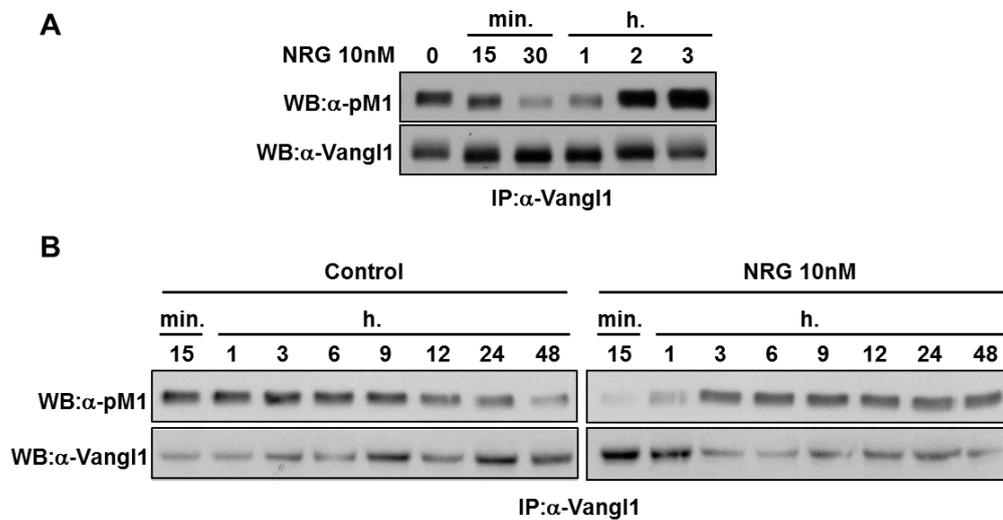


Figura 40. A. Extractos celulares de MCF7 fueron serodeprivados ON, luego estimulados con NRG 10 nM distintos tiempos, y manipulados como en experimentos anteriores. **B.** Igual que en A, pero se mantuvo un control serodeprivado (WB izquierda) para cada tiempo de estimulación con NRG (WB derecha). Los tiempos indicados en ambos WB son los de estimulación con NRG. min, minutos. h, hora/s.

5.2. Quinasas y fosfatasas implicadas en la fosforilación

Para establecer cómo se regula la fosforilación en la serina 20, se utilizaron distintos inhibidores dirigidos a quinasas pertenecientes a las diferentes rutas de señalización activadas tras la estimulación con NRG (Tabla XI, al final de esta sección).

En primer lugar se estudió el efecto de la inhibición de las principales vías activadas por NRG, MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) y PI3K-Akt (*Phosphatidylinositol 3 Kinase*), sobre la fosforilación de la serina 20 (Figura 41.A). Como en los experimentos anteriores, la línea MCF7 fue serodeprivada ON y a continuación tratada durante dos horas con los distintos inhibidores a las dosis indicadas en la Figura 41.B, y luego estimulada o no con NRG. En el mismo experimento, para poder visualizar y comparar los efectos de los distintos tratamientos sobre Vangl1 también se mantuvieron células MCF7 serodeprivadas con y sin estímulo, sin tratar con inhibidor (carriles 1 y 2 de los WB de la Figura 41.B).

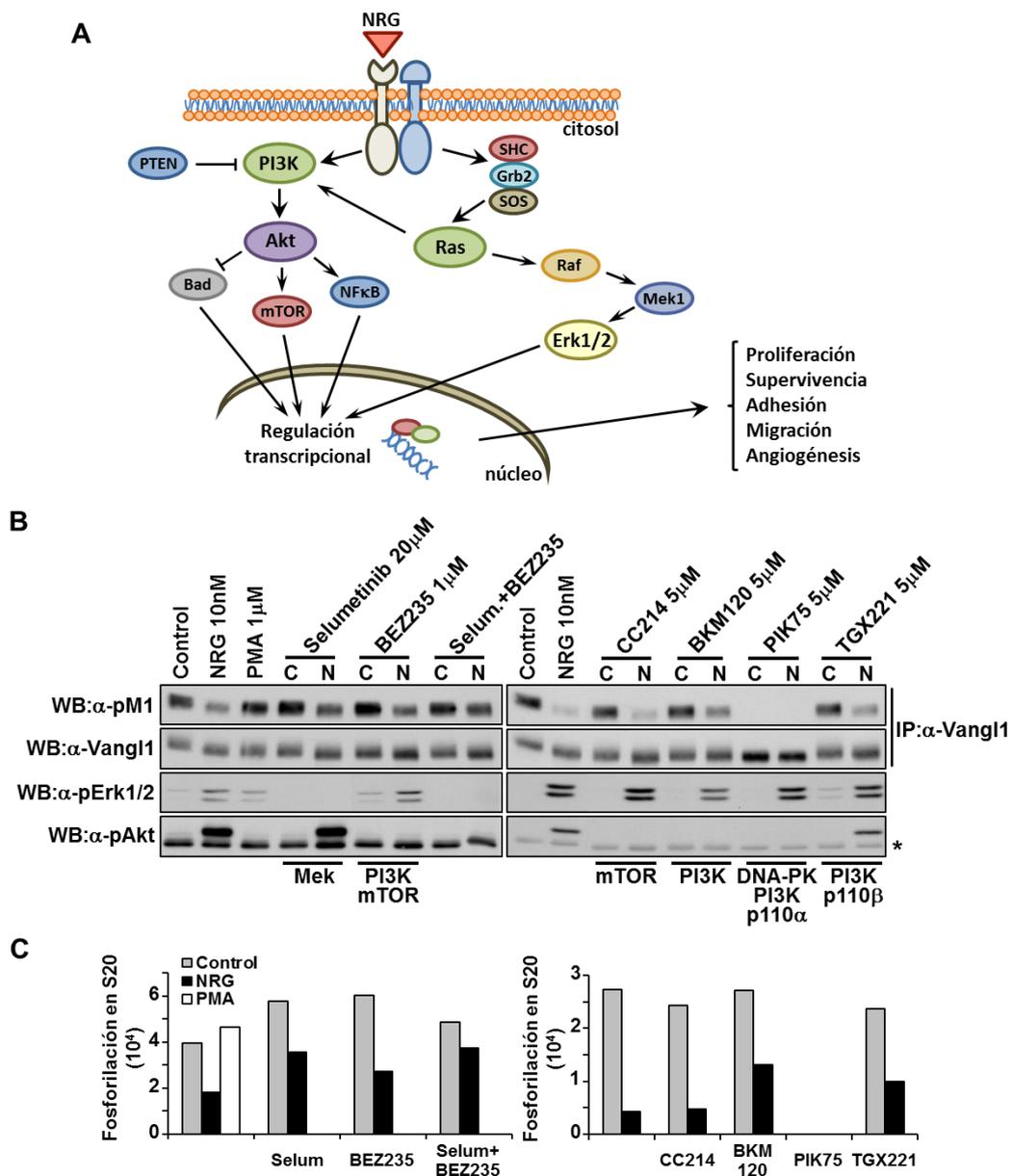


Figura 41. A. Principales vías de señalización activadas por NRG: MAPK y PI3K-Akt. **B.** Las células MCF7 fueron serodeprivadas ON, tratadas durante 2 horas con los distintos inhibidores a las dosis indicadas y luego estimuladas durante 15 minutos con NRG 10 nM (N). Para cada inhibidor se mantuvo un control sin estimular (C). También se hizo una estimulación con PMA 1 μ M durante 15 minutos, luego de haber serodeprivado ON. Se inmunoprecipitaron los extractos con α -Vangl1 y se visualizó por WB primero revelado con α -pM1 y luego con α -Vangl1, tras matar actividad del anticuerpo secundario. *banda inespecífica. El efecto de cada inhibidor fue verificado en 3 repeticiones independientes del experimento. **C.** Las bandas del WB α -pM1 (fosforilación de Vangl1 en la serina 20) se cuantificaron con el programa Image J.

Con respecto a la vía de MAPK, para comprobar si esta ruta tenía conexión directa con la fosforilación se trató a las células MCF7 previamente serodeprivadas, con PMA (*phorbol myristate acetate*) que es un estimulador directo de la vía. La activación de esta ruta, que se puede ver por la fosforilación de

Erk1/2 (WB α -pErk1/2, Figura 41.B) no modificó la fosforilación en el residuo S20. El tratamiento con Selumetinib que es un inhibidor de la MAPKK Mek1 (CI_{50} 14 nM) y de la fosforilación de la MAPK Erk1/2 (CI_{50} 10 nM), aunque no mostró un efecto marcado, pareciera haber aumentado la fosforilación basal y afectado parcialmente la defosforilación en S20 inducida por NRG.

Para estudiar la implicación de la vía de PI3K-Akt en la fosforilación en S20, se utilizaron varios inhibidores: BEZ235 (inhibidor dual de PI3K y mTOR, intermediario en la misma vía), CC214 (inhibidor específico de mTOR), BKM120 (inhibidor de PI3K), PIK75 (inhibidor de la subunidad p110 α de PI3K y a mayores dosis de DNA-PK, *DNA-dependent protein kinase*), y TGX221 (inhibidor de la subunidad p110 β de PI3K). La acción de los mismos se verificó por la inhibición de la fosforilación de Akt tras la estimulación con NRG (WB α -pAkt, Figura 41.B). Como se observa en los WB de la Figura 41.B ninguno de los inhibidores a excepción de PIK75, fue capaz de alterar significativamente la fosforilación de Vangl1 en S20. La inhibición de PI3K, de forma similar a Selumetinib, pareciera bloquear levemente la defosforilación inducida por NRG.

La inhibición de ambas vías al combinar Selumetinib (MAPK) con Bez235 (PI3K-Akt) sí causó un bloqueo en la defosforilación en S20 que se produce al estimular con NRG. Dado que ninguno de estos compuestos por separado tuvo un efecto marcado sobre Vangl1 y su fosforilación, ambas rutas deben estar participando en la regulación de la fosforilación en S20. Esto podría suceder, de forma independiente o a través de un intermediario común, por ejemplo si la activación de una fosfatasa o la inhibición de una quinasa está regulada por ambas vías, la inhibición de una vía no impide que la otra mantenga la regulación.

Por otra parte, llama la atención el efecto de PIK75 sobre la fosforilación en S20 (Figura 41.B). Las características de la banda del WB α -Vangl1, más baja, compacta e intensa, evidencian la acción del inhibidor sobre la fosforilación y no sobre los niveles de proteína. Dado que de los inhibidores de PI3K sólo PIK75 bloqueó la fosforilación, y como este inhibidor también actúa sobre DNA-PK (p110 α de PI3K CI_{50} 5,8 nM y DNA-PK CI_{50} 2 nM), probablemente sea esta quinasa la responsable de la fosforilación en S20. Si bien la actividad de esta serina/treonina quinasa en un principio fue asignada al núcleo, actuando como

sensor del daño al DNA e implicada en la reparación del mismo y en la transcripción de genes involucrados en la respuesta, también se ha evidenciado su acción en el citosol. Un ejemplo es la activación de Akt por fosforilación en la serina 473. Esto permite pensar que la fosforilación de Vangl1 también puede estar regulada, directa o indirectamente, por DNA-PK. (Lu *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2004; Friedmann *et al.*, 2006)

Para corroborar que la acción de PIK75 sobre la fosforilación de la serina 20 de Vangl1 se debía a la inhibición de DNA-PK, se optó por una estrategia más específica, como es el silenciamiento mediante shRNAs dirigidos contra el ARN mensajero de esta quinasa. Como se observa en los WB de la Figura 42.A, si bien no se logró bloquear por completo la expresión de DNA-PK, la disminución de sus niveles claramente provocó una disminución de la fosforilación en S20. Dado que previamente se había observado que la fosforilación en S20 aumentaba tras la serodeprivación, se estudió si DNA-PK era la quinasa responsable de este aumento. Como se muestra en la Figura 42.B, en las células MCF7 con niveles reducidos de DNA-PK, además de que la fosforilación basal de Vangl1 fue menor, tampoco se observó el aumento de fosforilación que ocurre en las células control tras la serodeprivación.

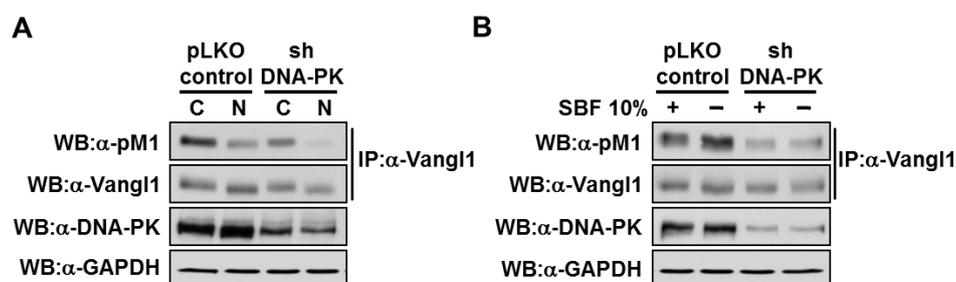


Figura 42. A. La línea MCF7 fue infectada con lentivirus portadores del vector pLKO control (expresa una secuencia no codificante) o pLKO shDNA-PK (expresa un shRNA específico para DNA-PK), a las 48 horas de la infección se adicionó puromicina al medio (3 µg/ml) para seleccionar las células infectadas. Como en experimentos anteriores una vez seleccionadas, se serodeprivaron ON y estimularon con NRG (N) o no (C) y se visualizaron los extractos por IP y WB. WB α-DNA-PK, control silenciamiento y WB α-GAPDH, control de carga. **B.** Las mismas células que en el punto A, fueron cultivadas ON en medio DMEM suplementado con SBF 10% (+) o sin SBF (-), a continuación lisadas y visualizadas como en A.

Por tanto, si bien DNA-PK claramente está implicada en la fosforilación de S20, dado que no fue posible bloquear la fosforilación, pero tampoco anular la expresión de DNA-PK, no se puede descartar que sea la única quinasa responsable

de fosforilar a Vangl1 en la serina 20, o que haya otras quinasas involucradas. En los WB de la Figura 42 se muestra la única secuencia de shRNA, de las 5 ensayadas, que consiguió disminuir los niveles de expresión de DNA-PK.

Las serina/treonina quinasas de la familia PKC (Proteína Kinasa C) son un conjunto de quinasas activadas por diacilglicerol (DAG) y fosfatidilserina. Esta familia está compuesta por 3 subfamilias: cPKC (PKCs clásicas o convencionales), nPKC (PKCs nuevas) y aPKC (PKCs atípicas). La subfamilia cPKC está compuesta por las isoformas alfa, beta I, beta II y gamma, y su activación es dependiente de calcio. La subfamilia nPKC está compuesta por las isoformas épsilon, theta, delta y eta, y es independiente de calcio. La tercera subfamilia, aPKC compuesta por iota y zeta, es insensible a calcio, DAG o ésteres de forbol. Esta familia de quinasas participa en múltiples vías de señalización que responden a distintos estímulos externos, entre los que se encuentran las hormonas, los factores de crecimiento, y otros receptores de membrana. Esto se evidencia por su efecto en diversas funciones celulares: proliferación, supervivencia, migración, invasión, apoptosis, angiogénesis y resistencia a drogas (Figura 43.A). El papel que desempeñan estas quinasas depende del tipo celular, lo que también se observa en su participación en cáncer. Por ejemplo, la activación de PKC δ en líneas celulares derivadas de tumores de colon y próstata promueve la apoptosis, mientras que en células de cáncer de mama promueve el crecimiento celular y la supervivencia. (Urtreger *et al.*, 2012; Kang 2014)

Debido a la implicación de estas quinasas en múltiples vías de señalización, que responden a la estimulación con NRG (Roskoski 2014) y que ha sido reportada la interacción entre Vangl1 y PKC δ (Kho *et al.*, 2009), se decidió estudiar si esta quinasa podía estar involucrada en la fosforilación de la serina 20 de Vangl1. Además, la secuencia aminoacídica que contiene a la serina 20 presenta homología con los sitios consenso de fosforilación reconocidos por las familia PKC (Kang 2014). Con tal fin se trató a la línea MCF7 con BIM I (Bisindolylmaleimide I), inhibidor de las isoformas PKC α -, β 1-, β 2-, γ -, δ - y ϵ -. Como se observa en la Figura 43.B, el tratamiento de las células durante una hora con el inhibidor causó una disminución en la fosforilación de S20 en las células control, serodeprivadas no estimuladas (C). Si bien en las células tratadas con BIM I y estimuladas con NRG no

se visualiza banda, esto puede ser porque al haber menos fosforilación basal (C), la defosforilación que ocurre tras la estimulación con NRG es más eficiente. Por lo tanto, el tratamiento con BIM I pareciera estar inhibiendo la fosforilación basal de la serina 20. Dado que este inhibidor actúa sobre varias quinasas de la familia, algunas presentes en MCF7 [α -, β 1-, β 2-, δ - y ϵ - (Urtreger *et al.*, 2012 y estudios previos en el laboratorio)], también se trató a las células con el inhibidor Gö6976 dirigido contra PKC α - y β 1-, pero no se observó efecto en la fosforilación (Figura 43.C).

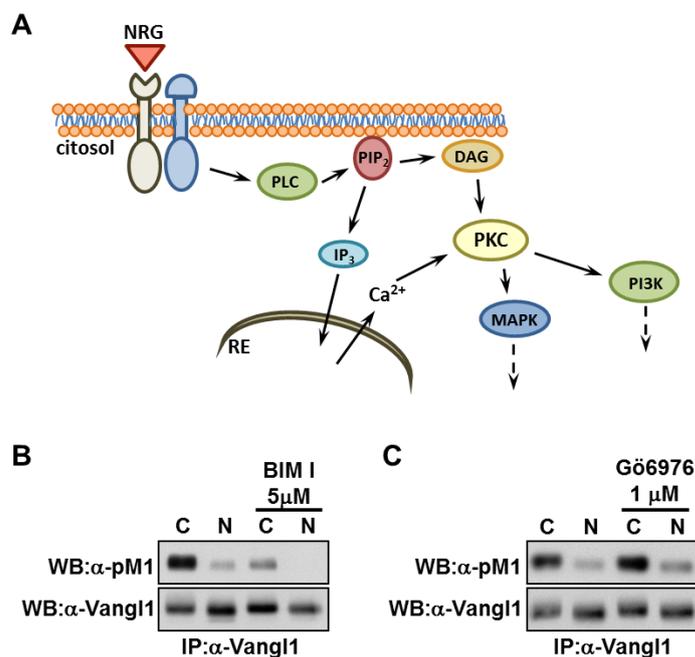


Figura 43. A. Esquema simplificado de señalización de la familia PKC. **B.** Células MCF7 fueron serodeprivadas ON, a continuación una parte se trató con BIM I 5 μ M durante 1 hora, seguido de estimulación con NRG 10 nM durante 15 minutos (N) o no (C). Las células se lisaron y analizaron por IP y WB como en los experimentos anteriores. **C.** Igual que en B, pero en vez de BIM I, se utilizó Gö6976 1 μ M para tratar las células.

Para caracterizar mejor el efecto de BIM I, se trató a las células MCF7 con el inhibidor durante distintos intervalos de tiempo. Como se puede ver en el WB de la Figura 44.A el efecto es temprano, ya que a los 5 minutos de la adición de BIM I se observa disminución de la fosforilación, que continúa hasta las 2 horas de tratamiento. La misma línea celular fue estimulada durante distintos tiempos con NRG en ausencia o presencia del inhibidor (Figura 44.B). En este experimento además de verse disminuida la fosforilación de las células control (serodeprivadas pero sin estimular con NRG), también se observa un bloqueo en la disminución de

la fosforilación que ocurría tras la estimulación con NRG, más evidente a los 30 y 60 minutos de estimulación. Es decir, la fosforilación en S20 es menor en las células tratadas con BIM I que en las sin tratar, y se mantiene independientemente de la estimulación con NRG. Esto permite pensar que alguna PKC, en respuesta a NRG, podría estar también activando alguna fosfatasa o inhibiendo alguna quinasa que actúa sobre la serina 20.

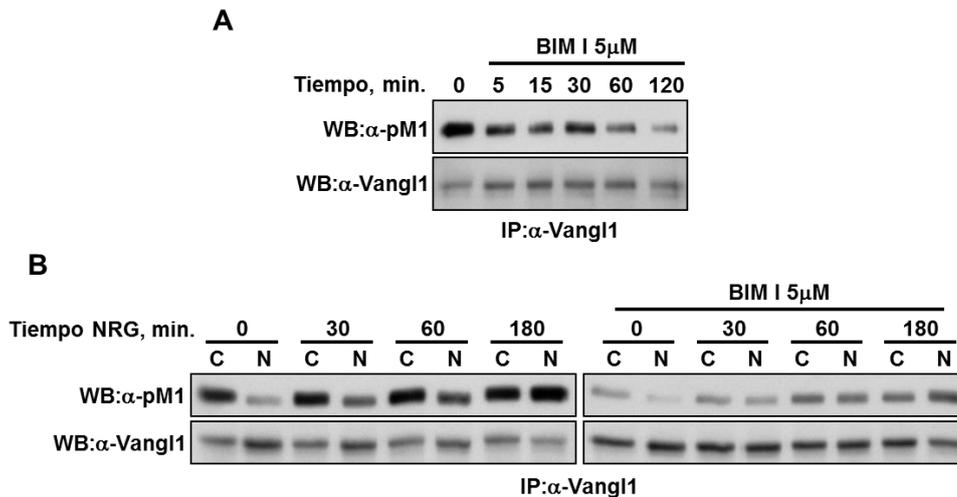


Figura 44. **A.** Células MCF7 serodeprivadas ON se trataron con BIM I 5 μ M a los tiempos indicados en la figura, a continuación se lisaron y analizaron por IP y WB. **B.** Células MCF7 serodeprivadas ON, fueron tratadas o no con BIM I 5 μ M durante una hora y a continuación se les adicionó NRG 10 nM (N) e incubó los tiempos indicados en la figura. Para cada tiempo se mantuvo un control sin estimular (C). Luego se lisaron y analizaron por IP y WB.

En estudios previos del laboratorio se observó que PKC δ es la isoforma más abundante en la línea MCF7 (datos no publicados). Para verificar si PKC δ era la responsable del efecto observado al tratar con BIM I, se decidió recurrir a una estrategia más específica silenciando su expresión por shRNA. En los WB de la Figura 45.A claramente se observa una disminución en la fosforilación de la serina 20 al silenciar la expresión de PKC δ . Además, el efecto es más pronunciado con el shPKC δ 92, que es la secuencia que mejor interfiere la expresión de la quinasa. Por lo tanto, estos resultados evidencian la participación de PKC δ en la fosforilación de Vangl1, independientemente de la activación con NRG.

Por otra parte, al igual que en los experimentos de shDNA-PK comentados previamente, se analizó si PKC δ también era responsable del aumento de fosforilación que ocurre en la serina 20 de Vangl1 al serodeprivar las células. Como queda demostrado en los WB de la Figura 45.A, al silenciar la expresión de PKC δ a

pesar de ser menor la fosforilación basal (carril S), la misma es capaz de aumentar al serodeprivar (carril C).

La evidente participación de PKC δ en la fosforilación de Vangl1, y dado que ha sido propuesta la interacción entre ambas proteínas (Kho *et al.*, 2009), se realizó un ensayo de co-inmunoprecipitación. Como se observa en la Figura 45.B, la IP con α -PKC δ co-inmunoprecipitó a Vangl1, y la IP con α -Vangl1 también parece haber co-inmunoprecipitado a PKC δ en la muestra control. Por lo tanto, este ensayo estaría evidenciando la interacción entre ambas proteínas.

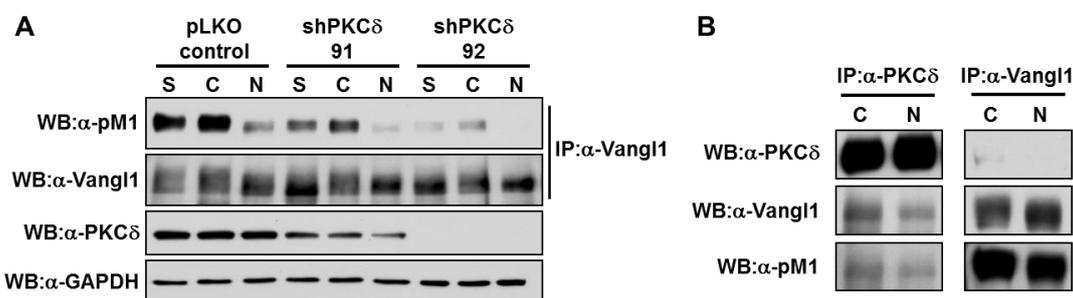


Figura 45. A. Células MCF7 que contienen un plásmido pLKO control (que expresa una secuencia no codificante) o pLKO shPKC δ 91/92 (que expresan shRNAs dirigidos contra dos regiones distintas de PKC δ), fueron crecidas en medio DMEM SBF 10% (S) o serodeprivadas ON (C), seguido de estimulación con NRG 10 nM durante 15 minutos (N). Luego se lisaron y los extractos proteicos se analizaron por IP y WB como en experimentos anteriores. WB α -PKC δ , control silenciamiento y WB α -GAPDH, control de carga. **B.** 2 mg de extracto de células MCF7 serodeprivadas ON y estimuladas durante 15 minutos con NRG 10 nM (N) o no (C), fueron inmunoprecipitados con los anticuerpos α -PKC δ o α -Vangl1 y visualizados por WB revelado con los anticuerpos α -PKC δ y α -Vangl1. La membrana revelada con α -Vangl1, se reincubó con α -pM1, previa eliminación de la actividad del anticuerpo secundario.

Previamente, en el experimento de estimulación a distintos tiempos con NRG en células tratadas con BIM I (Figura 44.A), se mencionó el bloqueo de la defosforilación inducida por NRG. Sin embargo, en el experimento de shPKC δ no se observa tal efecto. Por lo tanto, puede que PKC δ participe en la fosforilación basal de la serina 20, pero que otra/s de las quinasas de la familia PKC inhibidas por BIM I, sea/n la/s implicada/s en la defosforilación dependiente de NRG.

Dado que la estimulación con NRG provoca una disminución en la fosforilación de Vangl1 en MCF7, se indagó en la literatura la existencia de fosfatasas que se activen mediante este estímulo. Llamó la atención la serina/treonina fosfatasa Slingshot-1 (SSH1) que en MCF7 se activa en respuesta a NRG, y que posee una cinética de defosforilación sobre sus sustratos muy

semejante a la observada en la serina 20 de Vangl1 (Nagata-Ohashi *et al.*, 2004). Además, existe evidencia clara de la participación de esta fosfatasa en la regulación de los eventos que conducen a favorecer la migración celular, tras la estimulación con NRG (Nagata-Ohashi *et al.*, 2004). Al existir una relación entre la expresión de Vangl1 y los mismos eventos, se decidió estudiar si había una conexión entre estos intermediarios.

Como primera aproximación, se evaluó si la inhibición de Rac1 tenía algún efecto sobre la fosforilación de S20, ya que la activación de SSH1 depende de esta GTPasa (Nagata-Ohashi *et al.*, 2004). El inhibidor de PI3K, PX866 inhibe también la fosforilación de P-Rex1 en la serina 1169 (estudios previos del laboratorio), que ocurre tras la estimulación con NRG, impidiendo la activación de Rac1 (Montero *et al.*, 2011). Por esto, se utilizó este inhibidor como estrategia para inhibir SSH1 indirectamente y comprobar si se afectaba la fosforilación de Vangl1. Como se observa en la Figura 46.A el inhibidor bloqueó la defosforilación en S20 inducida por NRG.

A continuación, se decidió utilizar un inhibidor específico de Rac1 para corroborar que el efecto observado al tratar con PX866 se debía a la inhibición indirecta de Rac1. Si bien el inhibidor NSC23766 pareciera disminuir la fosforilación en la muestra control (Figura 46.B), efecto opuesto al observado con PX866, el resultado no fue claro en las repeticiones del experimento. Además, la dosis utilizada es muy alta (aunque es la utilizada en la bibliografía, Kim *et al.*, 2011), y podría estar actuando sobre otras dianas.

Para determinar si SSH1 realmente estaba involucrada en la regulación de la fosforilación de Vangl1, se utilizó la estrategia de silenciamiento mediante shRNAs específicos para la fosfatasa. Curiosamente, la disminución de la expresión de SSH1 (Figura 46.C), causó un efecto distinto al observado con el inhibidor PX866. Contrariamente a lo observado con el inhibidor, la disminución de los niveles de SSH1 no bloqueó la defosforilación que ocurre al tratar con NRG, sino que se observó un aumento en la fosforilación de Vangl1 en las células control. Esto indicaría que SSH1 estaría de alguna manera frenando la fosforilación que se visualiza en la serina 20 de Vangl1 cuando no es estimulada por NRG.

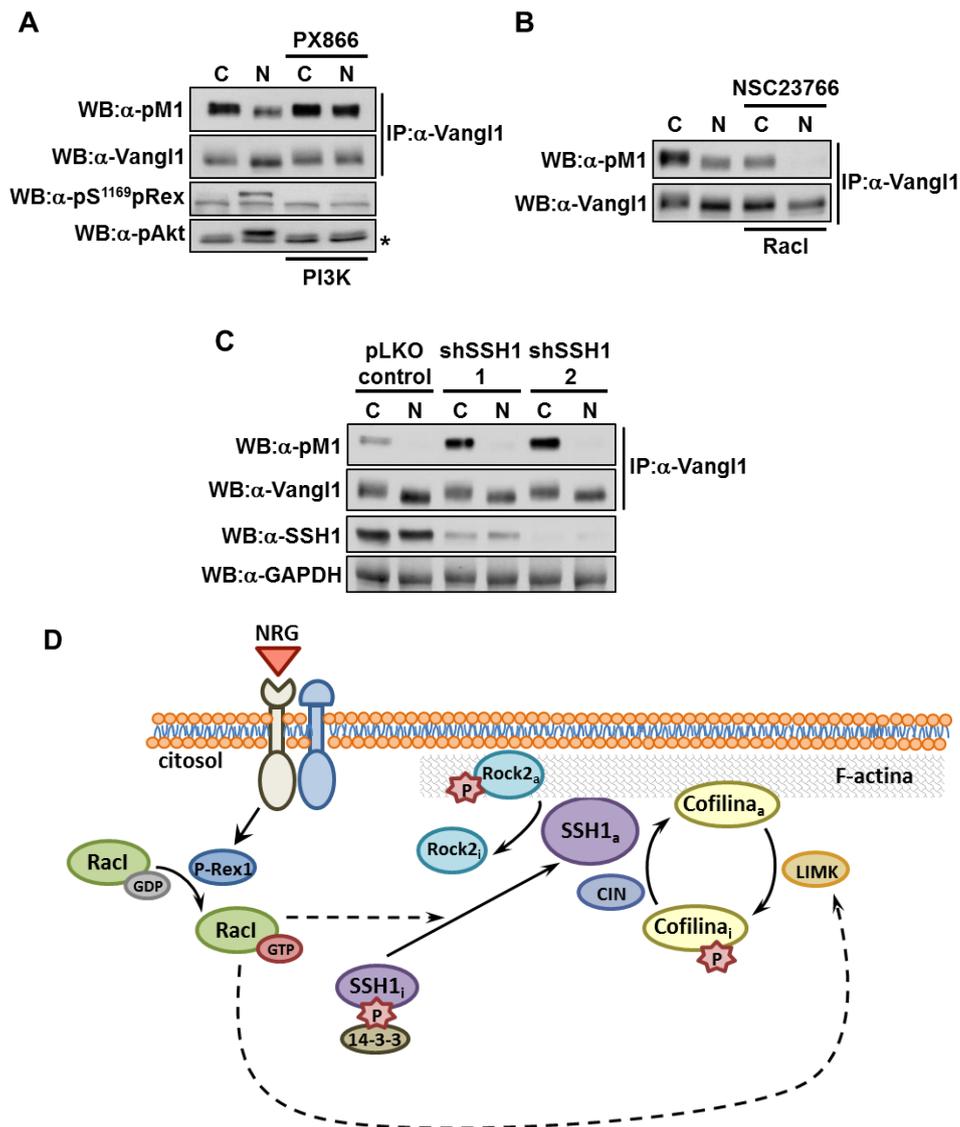


Figura 46. A. Células MCF7 serodeprivadas ON, tratadas o no con PX866 1 μ M durante una hora, seguido de estimulación con NRG 10 nM durante 15 minutos (N). C, control sin estimular. Se lisaron y analizaron por IP y WB. WB α -pS(1169)P-Rex1 y α -pAkt, para verificar la inhibición. **B.** Células MCF7 serodeprivadas ON, tratadas o no con NSC23766 200 μ M durante 2 horas, seguido de estimulación con NRG como en A. **C.** La línea MCF7 fue infectada con lentivirus portadores del vector pLKO control (expresa una secuencia no codificante) o pLKO shSSH1 1/2 (expresan shRNAs distintos dirigidos a SSH1). Luego de seleccionar con puromicina (3 μ g/ml) se serodeprivaron ON y estimularon con NRG (N) o no (C), y se visualizaron los extractos por IP y WB. WB α -SSH1, control silenciamiento y WB α -GAPDH, control de carga. **D.** Esquema de la señalización mediada por SSH1.

A pesar de que los resultados obtenidos indican una relación entre la fosfatasa SSH1 y Vangl1, la información obtenida no es clara. Sin embargo, esto no es llamativo, considerando que la vía de señalización en la que participa SSH1 tras la activación con NRG y que conduce a la reorganización de los filamentos de actina, formación de lamelipodios y migración celular, presenta una intrincada

regulación. Si bien en la Figura 46.D, se muestra un esquema simplificado, la regulación es compleja y aún no se conoce muy bien cómo ocurre y sus intermediarios. La disminución de la fosforilación en la serina 20 de Vangl1 tras la estimulación por NRG, a priori, hace pensar en la acción de una fosfatasa activada por este estímulo. Pero la regulación de la fosforilación no necesariamente es producto de un único intermediario, y esto es lo que sustentan los experimentos realizados para estudiar la fosforilación de Vangl1, inhibiendo diferentes dianas y rutas de señalización.

En lo que respecta a SSH1 (Figura 46.D), podría estar ejerciendo su acción directamente sobre Vangl1 y/o a través de alguno de sus sustratos, como la serina/treonina quinasa Rock2 que se inhibe al ser defosforilada por SSH1 en respuesta a NRG. Si esto fuera así, explicaría en parte el efecto observado en la fosforilación de Vangl1, al silenciar la expresión de SSH1. Además, S20 podría estar regulada por más de una quinasa y fosfatasa que responden al mismo estímulo o no, tal como ocurre en el caso de la cofilina, sustrato de SSH1 que se activa tras ser defosforilada para favorecer el ensamblaje de los filamentos de actina. La activación de la cofilina ocurre por defosforilación, y esta acción no sólo es llevada a cabo por SSH1 al tratar con NRG, sino también por la fosfatasa CIN que también responde a estímulos celulares, y otras dos fosfatasas, PP1 y PP2A. Por otra parte, Rac1 además de conducir a la activación de SSH1, también activa a la quinasa LIMK (a través de la quinasa PAK) que fosforila a la cofilina inactivándola. Aumentando la complejidad de la regulación, también ha sido reportada la capacidad de la fosfatasa PTEN para activar a la cofilina, de forma independiente de la vía de PI3K, y ejerciendo su acción sobre SSH1 y LIMK. (Nagata-Ohashi *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2011; Rana *et al.*, 2012; Vitolo *et al.*, 2013)

Si bien se conoce poco de la función de Vangl1, cómo se regula y con quiénes interactúa, sí ha sido bien definida su interacción con el supresor de metástasis KAI1/CD82. Éste último es una tetraspanina de membrana que interacciona a través de su extremo C-terminal con Vangl1 o, como también se la suele denominar, KITENIN (KAI1 COOH-Terminal Intercating Tetraspanin). KAI1 se encuentra desregulado en varios tipos de cáncer durante la etapa de progresión, y estudios *in vitro* han demostrado que la disminución de su expresión conduce a

una menor adhesión célula-célula, y mayor adhesión a la proteína de MEC, fibronectina. El descubrimiento de la interacción entre KAI1 y Vangl1, y estudios posteriores indican que el papel supresor de metástasis que se le atribuye a KAI1 podría deberse a una regulación negativa sobre Vangl1. (Lee *et al.*, 2004)

Como se mencionó previamente, KAI1 se encuentra vinculada a un fenotipo tumoral más agresivo, donde el aumento en la migración e invasividad, y los eventos que conducen a ello son clave (Liu *et al.*, 2006). Una de las observaciones fue la capacidad de KAI1 para inhibir los movimientos de protrusión y retracción en la membrana celular, a través de la modulación de las estructuras de actina. Estos eventos celulares son resultado de la desregulación a nivel molecular, por parte de KAI1, de Rac1, RhoA, y sus efectores cofilina y la quinasa ROCK (Liu *et al.*, 2012). Lo anterior sugiere una posible conexión entre los mecanismos que regulan la cofilina y Vangl1.

Por otra parte, se ha reportado que en tumores sólidos KAI1 atenúa la señalización derivada de integrinas, EGFR y c-Met, y además afecta principalmente la vía de señalización de FAK-Src-p130^{CAS}-Crk (Liu *et al.*, 2012). Si bien KAI1 no se expresa en la línea celular MCF7 (Odintsova *et al.*, 2003), esto no excluye que Vangl1 pueda formar parte de estas vías de señalización. Dado que se ha observado que la NRG es capaz de inducir la migración de las células tumorales de mama a través de la activación de la tirosina quinasa Src (Figura 47.A), y que en algunos contextos celulares, como ocurre en miocitos cardíacos de rata, esta activación por NRG sería dependiente de HER2 e independiente de la vía de PI3K/Akt (Vadlamudi *et al.*, 2003; Kuramochi *et al.*, 2006); se decidió evaluar si la inhibición de la activación de Src tenía algún efecto sobre la fosforilación de la serina 20 de Vangl1. Para esto, se trataron células MCF7 con Dastatinib, un inhibidor de la activación de Src. En los WB de la Figura 47.B, se observa que a la dosis 1 μ M de Dasatinib, que es cuando se inhibe la activación de Src (fosforilación en tirosina 416), también se bloquea la defosforilación de Vangl1 estimulada por NRG. Con lo cual, de alguna manera la activación de Src conduce a la defosforilación de la serina 20, en respuesta a NRG. Sin embargo, a la dosis que se observa el efecto de Dasatinib, no se descarta la posibilidad de que esté actuando sobre otras dianas, y que sean las responsables del efecto en la fosforilación de Vangl1.

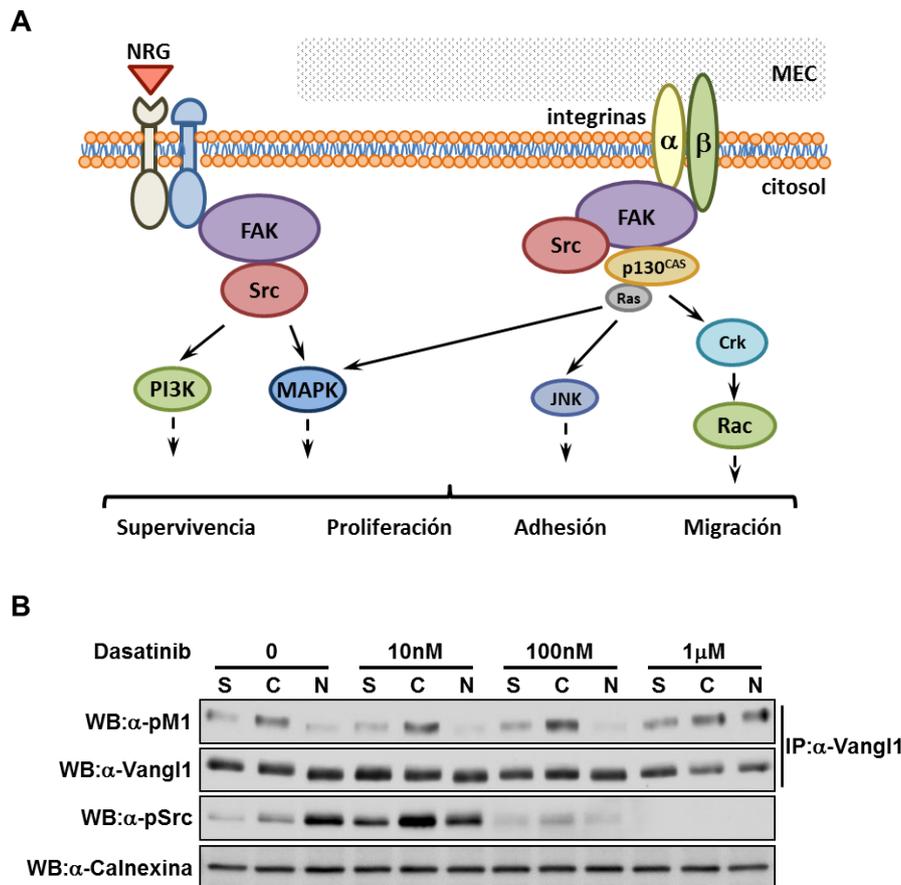


Figura 47. A. Esquema de activación de Src por NRG e integrinas. **B.** Células MCF7 cultivadas en DMEM SBF 10% (S) o serodeprivadas ON (C y N) fueron tratadas con dasatinib a las dosis indicadas durante 4 horas. Una parte de las células serodeprivadas se trató con NRG 10 nM durante 15 minutos (N). Se lisaron y los extractos se analizaron por IP y WB como anteriormente. WB α-pSrc (reconoce serina 416 fosforilada), control inhibición. WB α-Calnexina, control de carga.

Para complementar el estudio de la fosforilación en Vangl1, se utilizó la herramienta bioinformática NetPhosK de la Universidad de Dinamarca que predice los sitios posibles de ser fosforilados en la secuencia de una proteína, buscando los sitios consenso de las quinasas en dicha secuencia (Blom *et al.*, 2004). En la Tabla X se muestra el listado de quinasas obtenido, con los residuos aminoácidos candidatos a ser fosforilados. Si bien es a modo predictivo, la serina 20 es diana potencial de la familia PKC, presentando un valor de *score* de entre los más elevados, lo que sustenta los datos experimentales presentados en este apartado. Además, la secuencia de Vangl1 presenta regiones consenso para varias de las quinasas estudiadas (indicados en color en la Tabla X).

Tabla X. Predicción de quinasas de Vangl1

Site	Kinase	Score	Site	Kinase	Score
T-6	CKI	0.54	T-258	PKG	0.51
Y-7	SRC	0.56	S-266	RSK	0.50
S-11	PKC	0.64	S-266	PKA	0.83
Y-12	INSR	0.53	Y-284	SRC	0.51
S-14	PKC	0.77	T-296	PKC	0.61
S-15	PKC	0.87	S-325	PKA	0.57
S-17	PKC	0.87	S-338	RSK	0.62
S-20	PKC	0.81	S-338	PKA	0.87
S-33	RSK	0.65	S-338	PKG	0.54
S-33	p38MAPK	0.51	S-339	RSK	0.64
S-33	PKB	0.81	S-339	PKB	0.68
S-33	GSK3	0.53	S-339	PKA	0.69
S-33	cdk5	0.51	S-339	PKG	0.55
S-42	PKC	0.78	Y-345	SRC	0.61
S-42	PKA	0.74	Y-417	INSR	0.51
T-62	CKII	0.50	S-422	PKC	0.54
T-75	PKC	0.57	S-446	PKA	0.56
S-86	CKII	0.56	T-450	PKC	0.53
S-86	CKI	0.54	S-460	RSK	0.55
S-88	DNAPK	0.58	S-460	PKA	0.72
S-88	ATM	0.64	T-461	PKC	0.60
S-96	CKII	0.55	S-467	PKA	0.59
S-96	PKA	0.70	S-511	PKC	0.71
T-114	PKC	0.80	S-511	cdc2	0.51
S-117	cdc2	0.53	S-520	RSK	0.55
S-155	cdc2	0.54	S-520	PKA	0.71
S-199	PKA	0.54			
Highest Score:		0.87 PKC at position 15			

En color se indican las quinasas cuya secuencia consenso se encuentra en Vangl1 y que se han visto implicadas en la fosforilación de la serina 20, mediante los estudios de inhibición y silenciamiento de este apartado. En negrita, se indican las quinasas con los *scores* más altos. *Site*, se indican los residuos candidatos y su ubicación en la secuencia de Vangl1 (número); *Kinase*, quinasa; *Score*, valor predictivo (más alto, mayor probabilidad).

En la Figura 48 se muestra un esquema simplificado de la regulación de la fosforilación de la serina 20 de Vangl1, como resumen de los resultados obtenidos en los estudios de inhibición (inhibidores descritos en la Tabla XI) y silenciamiento por shRNAs, de quinasas y fosfatasa.

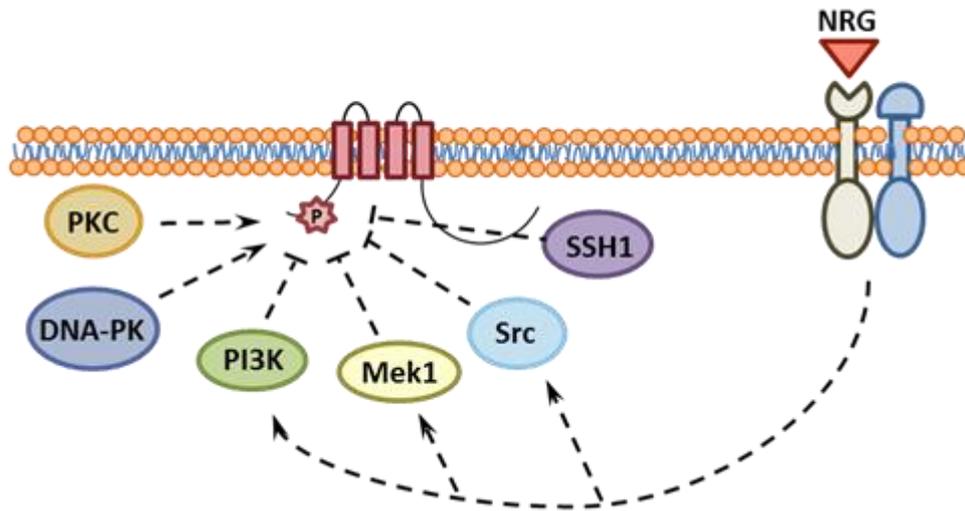


Figura 48. Esquema simplificado de la regulación de la fosforilación de la serina 20 de Vangl1 en la línea celular MCF7. Las quinasas DNA-PK y PKC δ participan en la fosforilación basal de S20, y la fosfatasa SSH1 estaría regulando negativamente esta fosforilación. La estimulación de las células con NRG induce la defosforilación de S20, mediada por las vías de PI3K-Akt, MAPK y Src.

Tabla XI. Inhibidores utilizados para estudiar la fosforilación de Vangl1

Inhibidor	Diana	CI ₅₀
Selumetinib	MAPKK Mek1	14 nM
	MAPK Erk1/2	10 nM
Bez235	PI3K (p110 α , γ , δ , β)	4 - 5 - 7 - 75 nM
	mTOR	6 nM
	ATR	21 nM
CC214	mTOR	2 nM
BKM120	PI3K	
PIK75	PI3K (p110 α)	5,8 nM
	DNA-PK	2 nM
TGX221	PI3K (p110 α , δ , β , γ)	52 - 116 - 166 - 262 nM
BIM I	PKC (p110 α , β 1, β 2, γ , ϵ)	14 nM
Gö6976	PKC (p110 α , β 1)	2,3 - 6,2 nM
PX866	PI3K	0,1 nM
	mTOR	3,1 μ M
NSC23766	Rac	50 μ M
Dasatinib	Abl	1 nM
	Src	0,8 nM
	c-Kit	79 nM

6. Papel biológico de Vangl1 en MCF7

En la Introducción se mencionó el papel de Vangl1 en el desarrollo y su vinculación a diversos tipos de cáncer, principalmente en la progresión de la enfermedad. Para continuar con la caracterización de Vangl1 en la línea celular de cáncer de mama MCF7 y su relación con la vía de señalización por NRG, se decidió evaluar el efecto biológico del silenciamiento de la expresión de Vangl1. Con la experiencia previa en otras proteínas, se recurrió a la estrategia de pequeños ARN de interferencia para bloquear la expresión de Vangl1.

Se probaron 5 secuencias dirigidas contra regiones distintas y específicas de Vangl1 (shVangl1), clonadas en el plásmido pLKO. Como control se utilizó un plásmido pLKO que expresa una secuencia de ARN no codificante. En el WB de la Figura 49, de los 5 shRNA sólo las secuencias G11 y H1 fueron capaces de disminuir los niveles de expresión de Vangl1, por lo que se decidió continuar los ensayos con ambas secuencias.

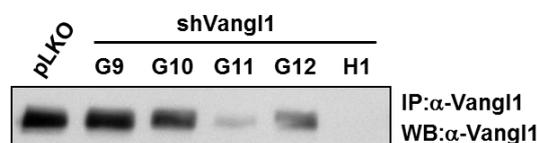


Figura 49. shVangl1 en MCF7. La línea MCF7 fue infectada con lentivirus portadores del vector pLKO control que expresa una secuencia no codificante (pLKO) o pLKO shVangl1 (shVangl1). Se probaron 5 shRNAs, G9-12/H1, cada uno dirigido a una región diferente del ARNm de Vangl1. Luego de seleccionar con puromicina (3 µg/ml), las células se lisaron y los extractos se visualizaron mediante IP y WB con α-Vangl1.

6.1. Vangl1 en proliferación celular

En primer lugar se estudió si Vangl1 tenía un papel en la proliferación celular, para esto se midió la capacidad de las células para metabolizar MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) a diferentes días, en condiciones normales de crecimiento (DMEM SBF 10%) o ante la estimulación con NRG (DMEM SBF 1% con NRG, y DMEM SBF 1% como control). En la gráfica de barras de la Figura 50 se observa que las células MCF7 con Vangl1 silenciado crecen menos que las células control (pLKO), aun así, siguen siendo capaces de aumentar la proliferación ante la estimulación con NRG. Por lo tanto, el papel de Vangl1 en la vía de señalización por NRG no estaría directamente relacionado con

la proliferación celular, aunque el hecho de no expresarse o hacerlo en niveles muy bajos retarde el crecimiento. Por otra parte, el silenciamiento de Vangl1 no causó alteraciones en la morfología de la línea MCF7.

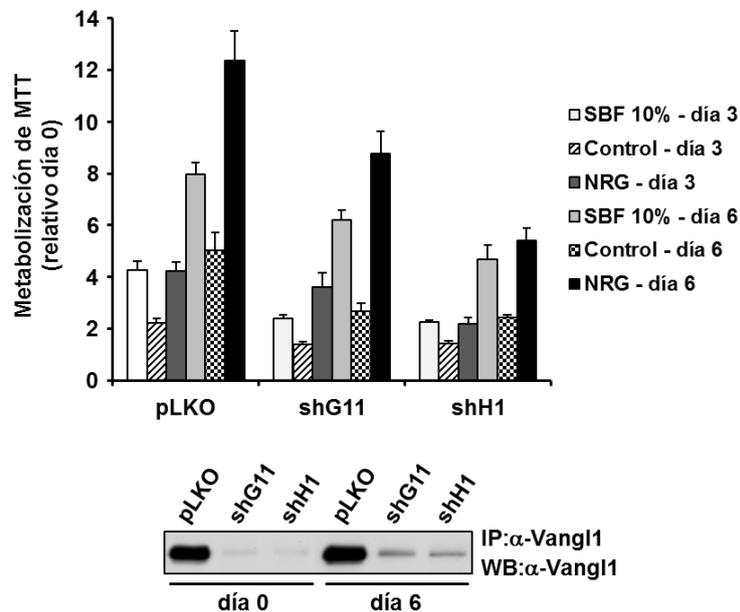


Figura 50. Vangl1 en proliferación. Las células MCF7 con pLKO control y las que expresaban los shVangl1 G11 y H1, fueron plaqueadas en placas de 24 pocillos en DMEM con SBF 10%. A las 24 horas se midió la metabolización de MTT por absorbancia a 570 nm (día 0) y se les cambió el medio de cultivo por DMEM con SBF 10% (SBF 10%) o DMEM con SBF 1% sin (Control) o con NRG 10 nM (NRG). Se midió metabolización de MTT a los días 3 y 6. A las placas del día 6, se les renovó el medio al día 3 con las mismas condiciones. La metabolización de MTT está relativizada a la medición a día 0. Las desviaciones corresponden a los cuadruplicados de cada condición, y el ensayo es representativo de 3 experimentos independientes. Se verificaron los niveles de Vangl1 por IP y WB a día 0 y 6 de las mediciones de proliferación por MTT.

6.2. Vangl1 en migración celular

A continuación se evaluó si el silenciamiento de Vangl1 tenía un efecto en la capacidad de la línea MCF7 para migrar en un ensayo de herida en placa. Para esto, una vez que las células se encontraban a un 95% de confluencia, se realizaron las heridas y se adicionó el medio de cultivo suplementado con Mitomicina C y las diferentes condiciones que se muestran en la Figura 51. La Mitomicina C es un antibiótico aislado de la bacteria *Streptomyces*, que presenta actividad antitumoral. En el ensayo de migración la utilización de este antibiótico que frena el crecimiento celular, permite que sólo cierren la herida las células capaces de migrar, independientemente de su velocidad de proliferación. A las 48 horas de realizarse la herida, no se aprecian diferencias en la capacidad de migrar de las células

silenciadas respecto de las células control, en ninguna de las condiciones de crecimiento, DMEM SBF 10% (Figura 51.A) o DMEM SBF 1% +/- NRG (Figura 51.B).

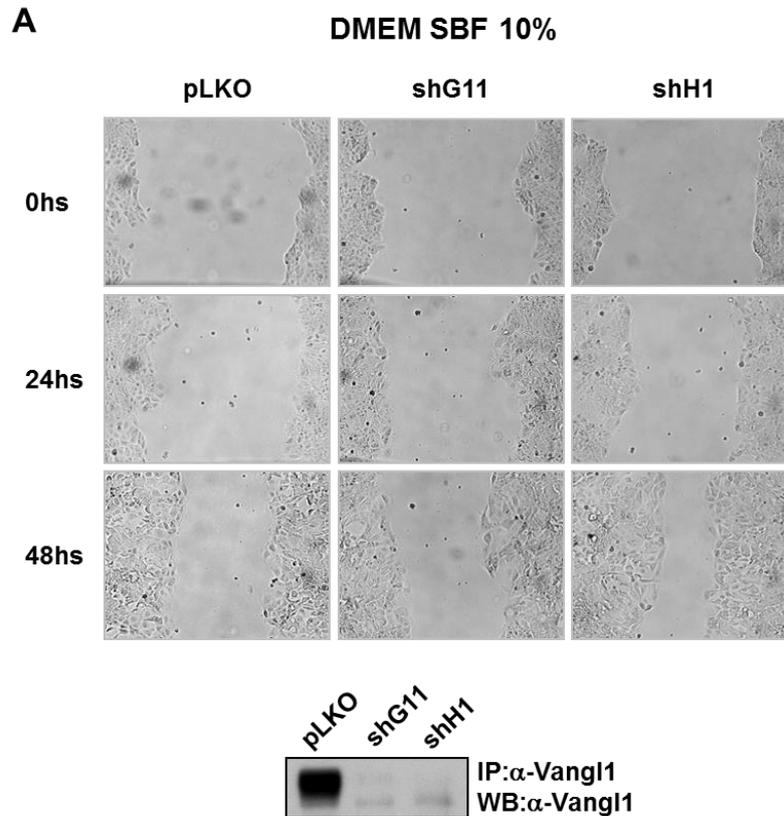


Figura 51. Migración de MCF7 shVangl1 por ensayo de herida en placa. A. Las células MCF7 del experimento de la Figura 50, u otras obtenidas de la misma forma, fueron plaqueadas en placas de 60 mm. Al llegar a un 95% de confluencia se realizaron 3 heridas por placa con una punta de micropipeta de 10 μ l. Luego se lavaron con PBS y se les adicionó medio de cultivo DMEM suplementado con SBF 10% y Mitomicina C (2,5 μ g/ml). Se eligieron 3 sitios por condición y se tomaron fotos en esos mismos sitios a las 0, 24 y 48 horas (microscopía por contraste de fases, objetivo 10X). Experimento representativo de 3 experimentos independientes.

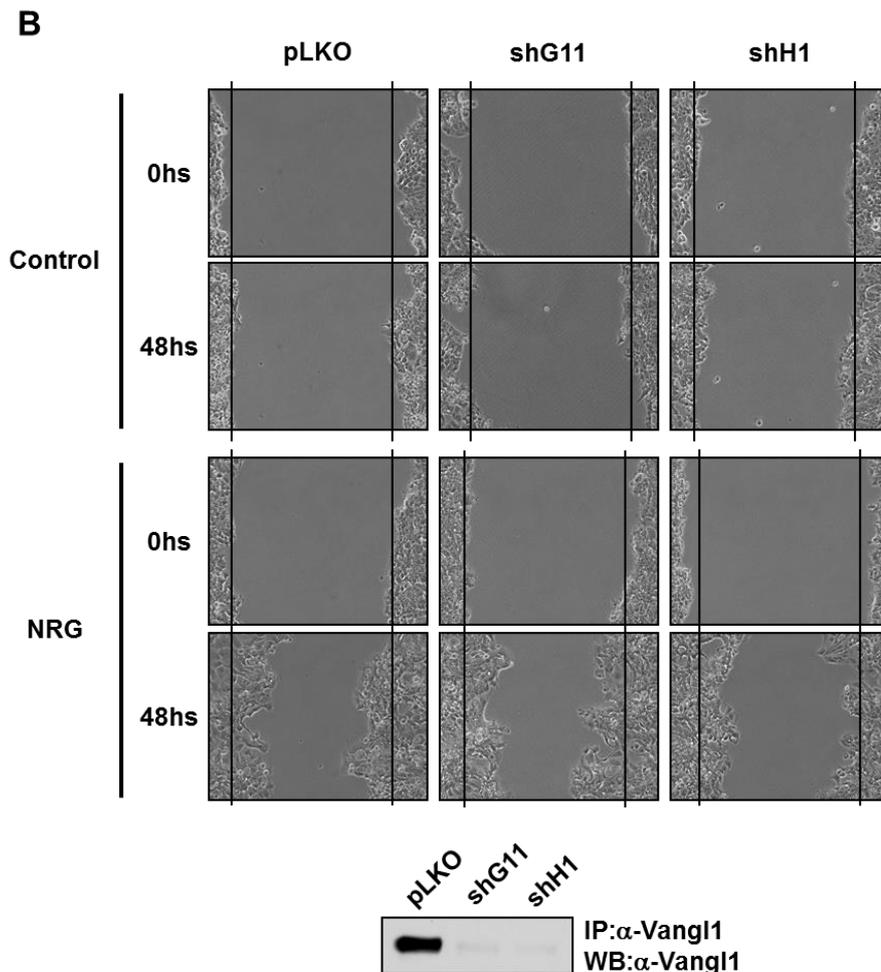


Figura 51 (continuación). Migración de MCF7 shVangl1 por ensayo de herida en placa. B. Las células MCF7 del experimento de la Figura 50, u otras obtenidas de la misma forma, fueron plaqueadas en placa de 6 pocillos. Al llegar a un 95% de confluencia se realizaron las heridas con una punta de micropipeta de 10 μ l. Se mantuvo una condición por pocillo y se realizaron 2 heridas por condición. Luego se lavaron con PBS y se les adicionó medio de cultivo DMEM suplementado con Mitomicina C (2,5 μ g/ml) y SBF 1%, sin (control) o con NRG 10 nM (NRG). Se eligieron dos puntos por condición y se tomaron fotos en esos mismos sitios cada 10 minutos durante 48 horas (experimento de *timelapse*), en la figura se muestra la imagen capturada a 0 y 48 horas (microscopía por contraste de fases, objetivo 20X). Estas mismas condiciones también fueron ensayadas en 2 experimentos independientes realizados como en la parte A de la figura, con resultados semejantes.

6.3. Vangl1 en invasión celular

Una de las características primordiales que presentan las células tumorales involucradas en la progresión del cáncer y el desarrollo de metástasis, es la capacidad para invadir otros tejidos u órganos. Dado que la sobreexpresión de Vangl1 ha sido asociada a este estadio de la enfermedad, principalmente en cáncer de colon y de cabeza y cuello (Lee *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2011), se decidió evaluar

si esta proteína estaba involucrada en el aumento de invasividad que se observa en la línea celular MCF7 al ser estimulada con NRG (Adam *et al.*, 1998).

Para estudiar invasividad se hizo un ensayo de migración a través de *transwells* recubiertos con matrigel. Los *transwells* poseen una membrana porosa por donde pasan las células que son capaces de degradar el matrigel, atraídas por un quimioattractante al otro lado de la membrana (esquema Figura 52.C). El matrigel es una sustancia gelatinosa, rica en componentes de la matriz extracelular, proveniente de la solubilización de la membrana basal de células del sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS). Este ensayo de invasión permite simular, *in vitro*, el ambiente al que se enfrenta la célula tumoral al momento de invadir otros tejidos.

En las imágenes de las células que invadieron (Figura 52.A) y en la cuantificación (Figura 52.B, gráfica izquierda), claramente se evidencia que el silenciamiento de Vangl1 afecta la capacidad invasiva que se observa en las células MCF7 control (pLKO), al usar SBF 10% o NRG como quimioattractante. En el mismo ensayo se realizó un control del número de células plaqueadas mediante MTT, porque si bien en todas las repeticiones del experimento se observaba una disminución en la capacidad invasiva de las células con Vangl1 silenciado respecto a las células control, el número de células era muy variable (Figura 52.C). Una particularidad de las células silenciadas, es que presentaban mayor dificultad al momento de disgregarlas para contarlas y plaquear el experimento, lo que conducía al plaqueo de un número superior de células silenciadas con respecto a las células control (pLKO). A pesar de lo anterior, en la mayoría de los experimentos la invasión era menor en las células silenciadas. Principalmente el efecto se visualizaba al hacer el cociente entre las células que invadían estimuladas con NRG y su correspondiente control (Figura 52.B, gráfica derecha), para de esta forma independizar del número de células plaqueadas. En la relación NRG/control, siempre se observó que la capacidad de invadir al estimular con NRG era menor en las células con menores niveles de Vangl1, sobretodo en las silenciadas con el shRNA H1, que en congruencia, en la mayor parte de las repeticiones del experimento, era el que mejor silenciaba a Vangl1.

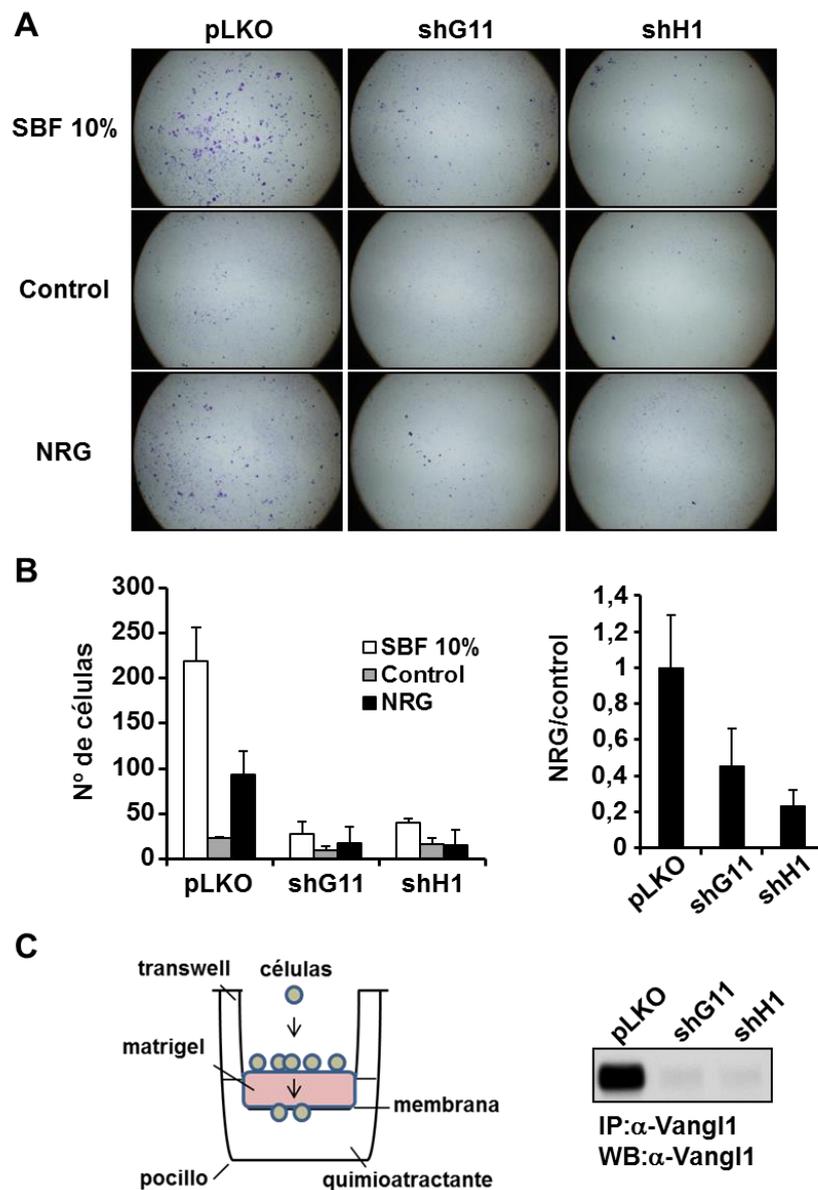


Figura 52. Invasión en MCF7 shVangl1. **A.** Las células MCF7 del experimento de la Figura 50 u otras obtenidas de la misma forma, fueron plaqueadas en DMEM SBF 1% sobre *transwells* (100000 células/transwell) previamente recubiertos con 10% de matrigel en DMEM, gelificado 2 horas a 37 °C. Los *transwells* con las células fueron incubados a 37 °C en placas de 24 pocillos con medio DMEM SBF 10%, DMEM SBF 1% (control) o DMEM SBF 1% con NRG 10 nM (NRG). A las 48 horas se determinó la invasión como se describe en Materiales y métodos. Las fotos fueron tomadas con un objetivo 4X. **B.** Gráfica izquierda: cuantificación de las células que invadieron, la desviación estándar corresponde a los duplicados de cada condición. El experimento que se muestra es representativo de 3 experimentos independientes con resultados similares. Gráfica derecha: invasión de las células estimuladas con NRG relativizada a su control. **C.** Esquema del ensayo de invasión (izquierda). Por IP y WB se verificó el silenciamiento de Vangl1. Como control del número de células plaqueadas, células del mismo *pool* se plaquearon simultáneamente en una placa de 24 pocillos por triplicado, y se midió por MTT una vez adheridas las células.

La diferencia entre lo observado en el ensayo de migración por herida en placa, donde el silenciamiento de Vangl1 no mostró efecto, y el ensayo de invasión, donde la falta de Vangl1 afectó la capacidad de migrar a través del matrigel, podría deberse a otros elementos necesarios para que una célula pueda invadir. Es decir, para que ocurra la invasión, la célula además de migrar, tiene que ser capaz de degradar la MEC, actividad que desempeñan las metaloproteasas. Vangl1 podría estar afectando la regulación de la expresión, síntesis o secreción de estas proteínas a la MEC. Con lo cual esto podría explicar la disminución de la invasividad observada al silenciar Vangl1 en MCF7. En concordancia, ha sido descrito que la reducción en los niveles de Vangl1 lleva aparejada una disminución en la expresión de ciertas metaloproteasas (Cho *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2004).

6.4. Vangl1 en adhesión a fibronectina

Una característica de las células tumorales, que se manifiesta especialmente en estadios más avanzados y agresivos de la enfermedad, es el aumento en la adhesión a proteínas de la MEC (Yarden *et al.*, 2001). Dado que la NRG estimula la interacción de las células con las proteínas de la MEC (Spencer *et al.*, 2000), y que ha sido descrita la relación entre Vangl1 y la adhesión a MEC (Lee *et al.*, 2004), se estudió si el silenciamiento de Vangl1 afectaba el aumento en adhesión a fibronectina estimulado por NRG. Como se evidencia en la Figura 53, tanto en las fotos (A) como en la cuantificación (B) se observa una menor adhesión a fibronectina en las células con Vangl1 silenciado, respecto a las pLKO. Al igual que para los ensayos de invasión se realizó un control del número de células plaqueadas, y en los experimentos donde se conseguía sembrar el mismo número de células, siempre existía menor adhesión de las células silenciadas. Este efecto era claro principalmente al hacer el cociente entre la adhesión de las células tratadas con NRG y su respectivo control sin tratar, donde claramente la respuesta de incremento en la adhesión ante este estímulo, no era igual de eficaz al disminuir los niveles de Vangl1. Este resultado demuestra que Vangl1 podría tener un papel en la vía de señalización por NRG asociado al aumento de adhesión a proteínas de la MEC, al menos a fibronectina.

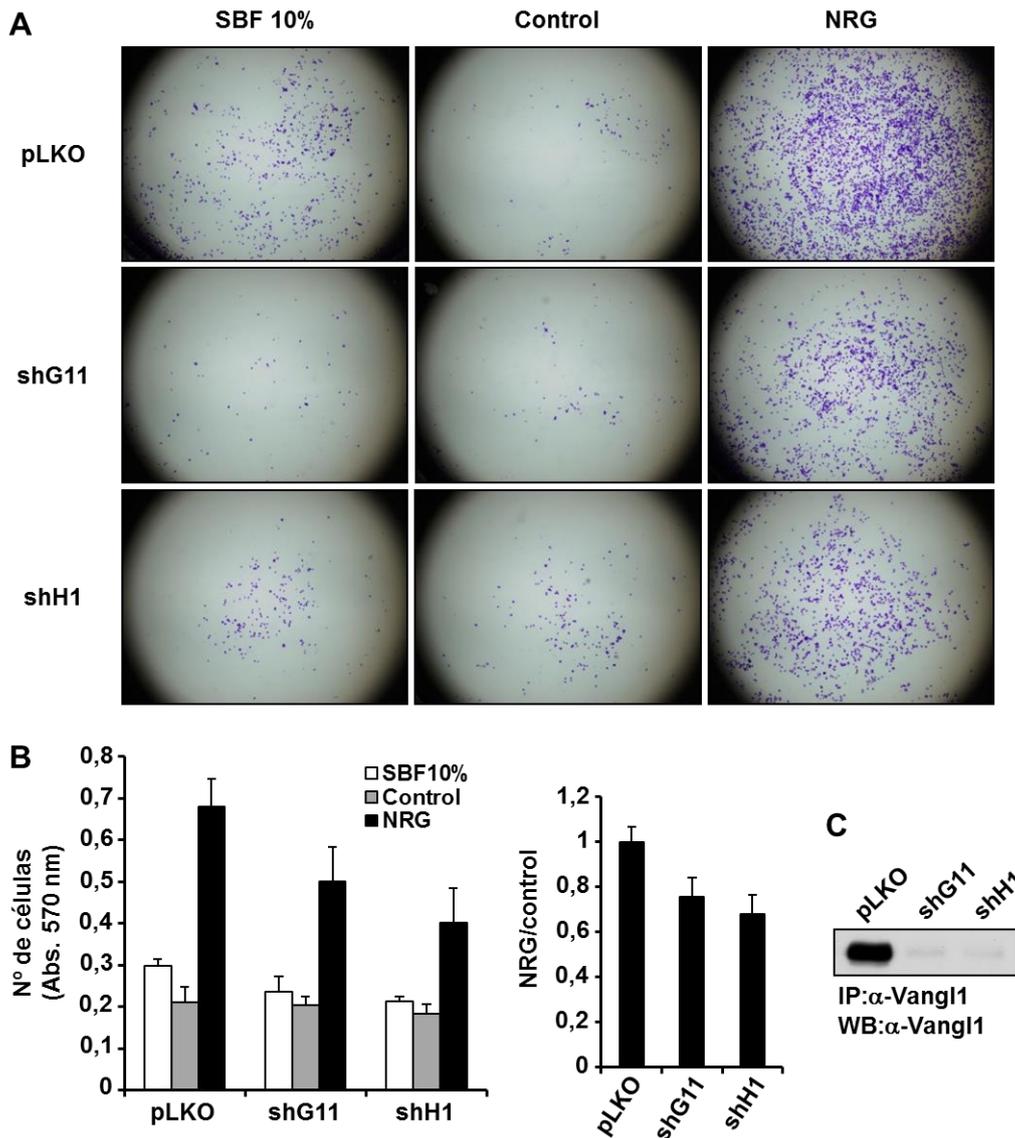


Figura 53. Adhesión a fibronectina en MCF7 shVangl1. **A.** Las células MCF7 del experimento de la Figura 50, u otras obtenidas de la misma forma, fueron plaqueadas en placas de 96 pocillos recubiertas con fibronectina. Se plaquearon 25000 células/pocillo en medio DMEM suplementado con SBF 10%, SBF 1% (control) o SBF 1% con NRG 10 nM (NRG). Luego de incubar 30 minutos a 37 °C se lavaron y se tiñeron con cristal violeta como se describe en Materiales y métodos. Las fotos fueron tomadas con objetivo 4X. **B.** Para la cuantificación, en paralelo y de igual manera, se plaqueó el doble de células provenientes del mismo *pool* y luego de incubar 30 minutos a 37 °C, se lavaron y se adicionó DMEM SBF 10% para medir proliferación por MTT a las 4 horas. Gráfica izquierda: metabolización de MTT por absorbancia a 570 nm (proporcional al n° de células adheridas). Gráfica derecha: adhesión de las células estimuladas con NRG relativizada a su control. **C.** El silenciamiento de Vangl1 fue verificado por IP y WB. Se hizo un control del número de células plaqueadas, donde se plaquearon las células del mismo *pool* en placa de 96 pocillos sin tratar con fibronectina y se midió por MTT cuando estaban todas adheridas. Cada condición fue plaqueada por triplicado y se muestra un experimento representativo de 3 experimentos realizados de forma independiente.

6.5. Vangl1 en crecimiento en 3D

Una aproximación más para entender el papel biológico de Vangl1 fue estudiar el efecto que tiene su silenciamiento en la línea MCF7, en la capacidad de crecer en un cultivo tridimensional utilizando matrigel como soporte (Figura 54).

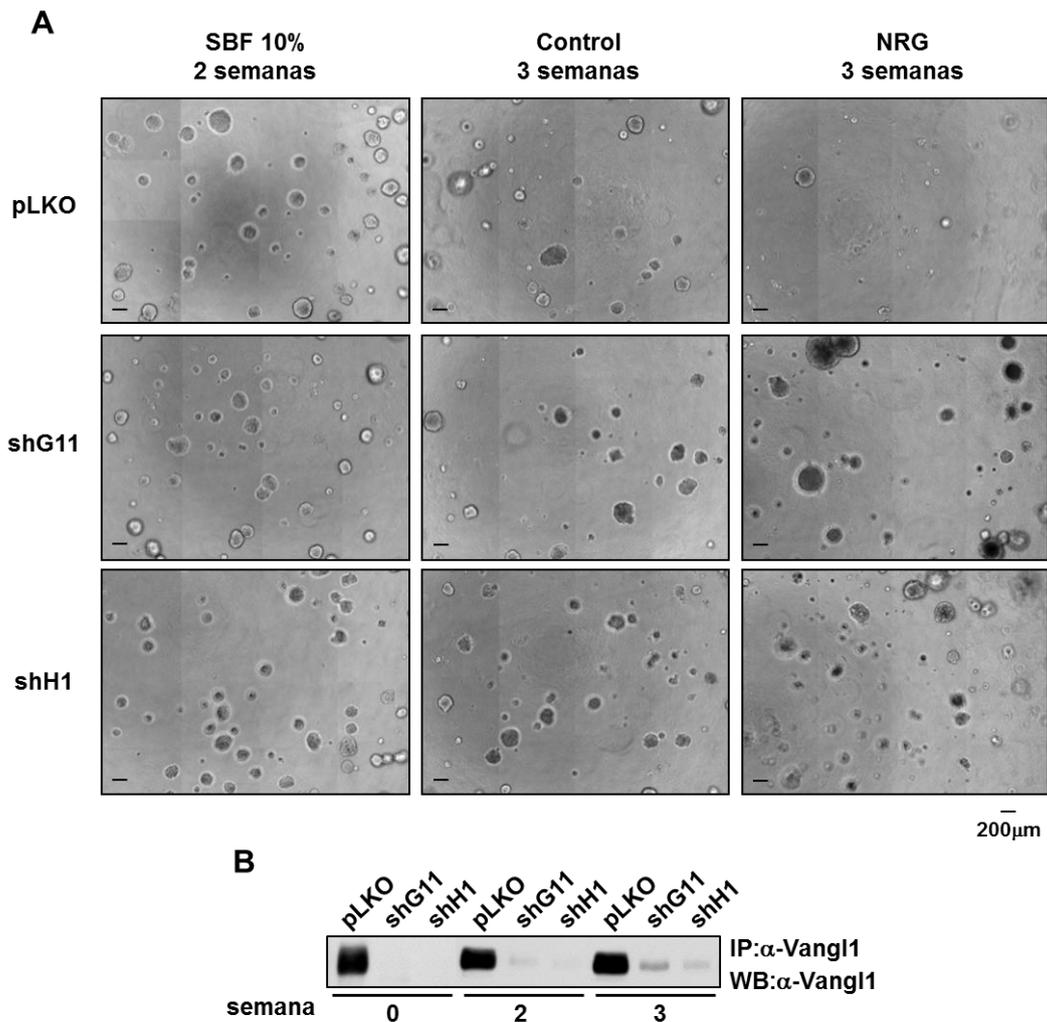


Figura 54. Crecimiento en 3D de MCF7 shVangl1. **A.** Las células MCF7 del experimento de la Figura 50 u otras obtenidas de la misma forma, fueron plaqueadas en placa de 48 pocillos recubiertas previamente con matrigel (1000 células/pocillo), como se describe en Materiales y métodos. Fueron cultivadas durante 4 semanas a 37 °C en medio DMEM suplementado con 2% matrigel y SBF 10%, SBF 1% (control) o SBF 1% con NRG 10 nM (NRG), renovado cada 4 días. Se tomaron fotos mediante barrido con un objetivo 10X en la porción central del pocillo en las semanas 1, 2, 3 y 4 para seguir el crecimiento. **B.** Se verificó por IP y WB el silenciamiento de Vangl1 en células que fueron mantenidas en paralelo. Como control del número de células, se plaquearon células del mismo *pool* en placas de 96 pocillos, para medir por MTT una vez adheridas. Cada condición fue plaqueada por duplicado y se muestra un experimento representativo de 2 experimentos independientes.

Resultados y Discusión

Como se observa en la Figura 54, las células cultivadas en DMEM suplementado con SBF 10% fueron capaces de crecer y formar esferas independientemente de los niveles de Vangl1. Lo mismo ocurrió con las células cultivadas en DMEM suplementado con SBF 1%, como era de esperar al tener menor cantidad de suero el crecimiento fue más lento, pero muy similar entre las células pLKO y las shVangl1. Sin embargo, sí se observaron diferencias en las células cultivadas en presencia de NRG. En la primera semana todas comenzaban a crecer, pero luego sólo continuaron creciendo las que tenían silenciada o muy baja expresión de Vangl1.

7. Vangl1 en pacientes con cáncer de mama

Dada la correlación encontrada en cáncer de colon (Lee *et al.*, 2004), gástrico (Ryu *et al.*, 2010), laringe (Lee *et al.*, 2011) y glioma (Lee *et al.*, 2015), entre los niveles de expresión de Vangl1 y la progresión de la enfermedad, se analizaron los niveles de esta proteína en extractos proteicos provenientes de tumores de pacientes con cáncer de mama (Figura 56).

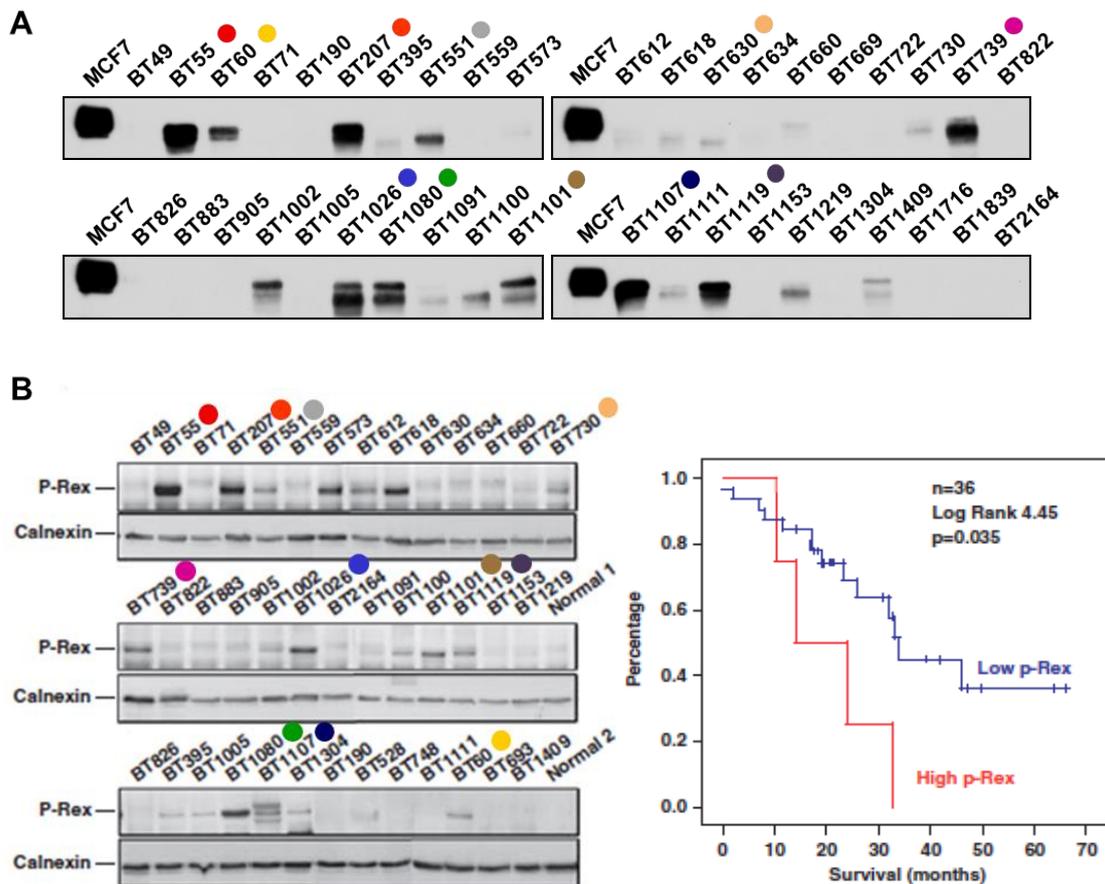


Figura 56. Expresión de Vangl1 en tumores de pacientes con cáncer de mama. A. Sobrenadantes de extractos proteicos de tumores (1 mg), que habían sido previamente utilizados para inmunoprecipitar a P-Rex1, fueron reutilizados para inmunoprecipitar a Vangl1 (IP α -Vangl1), y se visualizaron mediante WB α -Vangl1. Como control se inmunoprecipitó en paralelo Vangl1 de extractos de la línea MCF7 (1 mg). **B.** Figura de Montero *et al.*, 2011. Izquierda: WB de las IP α -P-Rex1 realizadas previamente sobre los mismo extractos. Control de carga, Calnexina (Calnexin). Derecha: gráfica de correlación de los niveles de expresión de P-Rex1 en los pacientes (*High*, elevado - *Low*, bajo) con la supervivencia en meses (*survival*, *month*). Los círculos en colores indican los pacientes con expresión de ambas proteínas.

Como se indica en la Figura 56 los mismos extractos proteicos habían sido previamente utilizados para determinar los niveles de P-Rex1 (Montero *et al.*, 2011), donde se observó una correlación entre mayor expresión de esta proteína y

Resultados y Discusión

menor supervivencia (Figura 56.B). Curiosamente, los pacientes que expresaban P-Rex1 coincidían con los que expresaban Vangl1. Esto permite inferir que, al igual que en P-Rex1, mayores niveles de expresión de Vangl1 se correlacionan con una supervivencia menor en los pacientes analizados.

Conclusiones

Conclusiones



Se identificó a la tetraspanina de membrana Vangl1 como intermediario en la vía de señalización por NRG.



Vangl1 en condiciones normales se localiza en la membrana celular, y la delección de la porción C-terminal citoplasmática y las mutaciones puntuales en serina S17-20A, S17A y S20A no afectaron esta ubicación. Por el contrario, la delección de la región N-terminal intracelular impidió la correcta localización en la membrana celular.



Vangl1 se expresa de forma ubicua en líneas celulares provenientes de tumores de distintos tejidos, encontrándose fosforilada la serina 20 en la mayoría. Sin embargo, no se expresa en líneas celulares de mieloma o lo hace a niveles mínimos, lo que soporta un papel en la adhesión célula-célula y célula-MEC.



La estimulación con NRG causa la defosforilación en la serina 20, y la fosforilación en otros residuos.



En los estudios de fosforilación de la serina 20 de Vangl1 en la línea MCF7, se demostró que:

- a) La fosforilación es inducida al serodeprivar las células, llegando a un máximo a las 12 horas. La estimulación con NRG disminuye la fosforilación, siendo mínima a la hora, y aumentando a tiempos mayores de tratamiento.
- b) La quinasa DNA-PK participa en la fosforilación y es responsable del aumento que se observa al serodeprivar la línea MCF7.
- c) La quinasa PKC δ está implicada en la fosforilación basal e interacciona con Vangl1.
- d) La fosfatasa Slingshot-1 (SSH1) regula negativamente la fosforilación basal en la serina 20.
- e) Las vías de MAPK, PI3K-Akt y Src participan en la defosforilación inducida por NRG.



La disminución de la expresión de Vangl1 afectó principalmente la adhesión a fibronectina y la invasión; y favoreció el crecimiento en 3D dependiente de NRG.



En tumores de pacientes con cáncer de mama se encontraron elevados niveles de Vangl1, observándose una correlación entre la presencia de esta proteína y una peor supervivencia.

Bibliografía

Bibliografía

Adam, L., R. Vadlamudi, S.B. Kondapaka, J. Chernoff, J. Mendelsohn, R. Kumar. (1998). Heregulin regulates cytoskeletal reorganization and cell migration through the p21-activated kinase-1 via phosphatidylinositol-3 kinase. *J Biol Chem.* 273(43):28238-46.

Anastas, J.N., T.L. Biechele, M. Robitaille, J. Muster, K.H. Allison, S. Angers y R.T. Moon. (2012). A protein complex of SCRIB, NOS1AP and VANGL1 regulates cell polarity and migration, and is associated with breast cancer progression. *Oncogene*, 31(32):3696-708.

Ausubel, K. y B. Gitler. (1987). Swallow syncope in an otherwise healthy young man. *Am Heart J*, 113(3):831-2.

Bae, J.A., S. Yoon S., S.Y. Park, J.H. Lee, J.E. Hwang, H. Kim, Y.W. Seo, Y.J. Cha, S.P. Hong, H. Kim, I.J. Chung, K.K. Kim. (2014). An unconventional KITENIN/ErbB4-mediated downstream signal of EGF upregulates c-Jun and the invasiveness of colorectal cancer cells. *Clin Cancer Res.* 20(15):4115-28.

Banerjee, S., J.S. Reis-Filho, S. Ashley, D. Steele, A. Ashworth, S.R. Lakhani, I.E. Smith. (2006). Basal-like breast carcinomas: clinical outcome and response to chemotherapy. *J Clin Pathol.* 59(7):729-35.

Barros, F.F., D.G. Powe, I.O. Ellis y A.R. Green. (2010). Understanding the HER family in breast cancer: interaction with ligands, dimerization and treatments. *Histopathology*, 56:560-72.

Bellaïche, Y., O. Beaudoin-Massiani, I. Stüttem y F. Schweisguth. (2004). The planar cell polarity protein Strabismus promotes Pins anterior localization during asymmetric division of sensory organ precursor cells in *Drosophila*. *Development*, 131:469-478.

Belotti, E., T.M. Puvirajesinghe, S. Audebert, E. Baudelet, L. Camoin, M. Pierres, L. Lasvaux, G. Ferracci, M. Montcouquiol, J.P. Borg. (2012). Molecular characterisation of endogenous Vangl2/Vangl1 heteromeric protein complexes. *PLoS One*, 7(9):e46213.

Bibliografía

Beerli, R.R. y N.E. Hynes. (1996). Epidermal growth factor-related peptides activate distinct subsets of ErbB receptors and differ in their biological activities. *J Biol Chem.* 271:6071-6.

Blom, N., T. Sicheritz-Ponten, R. Gupta, S. Gammeltoft, S. Brunak. (2004). Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomic*, 4(6):1633-49.

Bonifacino, J.S., M. Dasso, J.B. Harford, J. Lippincott-Schwartz y K.M. Yamada. (2004). Current Protocols in Cell Biology. *John Wiley & Sons ed.*

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.

Brunner-Kubath, C., W. Shabbir, V. Saferding, R. Wagner, C.F. Singer, P. Valent, W. Berger, B. Marian, C.C. Zielinski, M. Grusch y T.W. Grunt. (2010). The PI3 kinase/mTOR blocker NVP-BEZ235 overrides resistance against irreversible ErbB inhibitors in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 129(2):387-400.

Burgess, A.W., H. Cho, C. Eigenbrot, K.M. Ferguson, T.P.J. Garrett, D. J. Leahy, M.A. Lemmon, M.X. Sliwkowski, C.W. Ward y S. Yokoyama. (2003). An Open-and-Shut Case? Review Recent Insights into the Activation of EGF/ErbB Receptors. *Molecular Cell*, 12:541-552.

Burstein, H. J., Y. Sun, L.Y. Dirix, Z. Jiang, R. Paridaens, A.R. Tan, A. Awada, A. Ranade, S. Jiao, G. Schwartz, R. Abbas, C. Powell, K. Turnbull, J. Vermette, C. Zacharchuk y R. Badwe. (2010). Neratinib, an irreversible ErbB receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced ErbB2-positive breast cancer. *J Clin Oncol*, 28(8):1301-7.

Cabrera, N., E. Diaz-Rodriguez, E. Becker, D. Martin-Zanca, A. Pandiella. (1996). TrkA receptor ectodomain cleavage generates a tyrosine-phosphorylated cell-associated fragment. *J Cell Biol*, 132:427-36.

Cai, Z., H. Zhanga, J. Liu, A. Berezov, R. Murali, Q. Wang y M.I. Greene. (2010). Targeting erbB receptors. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21:961-966.

Chitnis, M.M., J.S. Yuen, A.S. Protheroe, M. Pollak, V.M. Macaulay.(2008). The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway. *Clin Cancer Res.*14(20):6364-70.

Cho, S.B., Y.L. Park, S.J. Park, S.Y. Park, W.S. Lee, C.H. Park, S.K. Choi, Y.H. Heo, Y.S. Koh, C.K. Cho, I.J. Chung, K.K. Kim, S. Kim, Y.E. Joo. (2011). KITENIN is associated with activation of AP-1 target genes via MAPK cascades signaling in human hepatocellular carcinoma progression. *Oncol Res.* 19(3-4):115-23.

Chomczynski, P. y N. Sacchi. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162(1):156-9.

Citri, A. y Y. Yarden. (2006). EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7:505-16.

De Laurentiis, M., D. Cianniello, R. Caputo, B. Stanzione, G. Arpino, S. Cinieri, V. Lorusso y S. De Placido. (2010). Treatment of triple negative breast cancer (TNBC): current options and future perspectives. *Cancer Treat Rev.* 36(3):80-6.

Denny, W.A. (2001). The 4-anilinoquinazoline class of inhibitors of the erbB family of receptor tyrosine kinases. *Farmaco*, 56:51-6.

Dunn, M., P. Sinha, R. Campbell, E. Blackburn, N. Levinson, R. Rampaul, T. Bates, S. Humphreys y W.J. Gullick. (2004). Co-expression of neuregulins 1, 2, 3 and 4 in human breast cancer. *J Pathol*, 203(2):672-80.

Eccles, S.A. (2011). The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology. *Int. J. Dev. Biol.* 55:685-96.

Feng, J. J. Park, P. Cron, D. Hess, B.A. Hemmings. (2004). Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 279(39):41189-96.

Franklin, M.C., K.D. Carey, F.F. Vajdos, D.J. Leahy, A.M. de Vos, M.X. Sliwkowski. (2004). Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer Cell*, 5:317-28.

Bibliografía

Friedmann, B.J., M. Caplin, B. Savic, T. Shah, C.J. Lord, A. Ashworth, J.A. Hartley, D. Hochhauser. (2006). Interaction of the epidermal growth factor receptor and the DNA-dependent protein kinase pathway following gefitinib treatment. *Mol Cancer Ther.* (2):209-18.

Fry, D.W. (2003). Mechanism of action of erbB tyrosine kinase inhibitors. *Exp Cell Res*, 284:131-9.

Giani, C, E. D'Amore, J.C. Delarue, H. Mouriessse , F. May-Levin, H. Sancho-Garnier, M. Breccia y G. Contesso. (1986). Estrogen and progesterone receptors in benign breast tumors and lesions: relationship with histological and cytological features. *Int J Cancer*, 37(1):7-10.

Graham, F.L., J. Smiley, W.C. Russell, R. Nairn. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 36(1):59-74.

Hatakeyama, J., J.H. Wald, I. Printsev, H.Y. Ho, K.L. Carraway.(2014) Vangl1 and Vangl2: planar cell polarity components with a developing role in cancer. *Endocr Relat Cancer*, 21(5):R345-56.

Hobbs, S.S., S.L. Coffing, A.T. Le, E.M. Cameron, E.E. Williams, M. Andrew, E.N. Blommel, R.P. Hammer, H. Chang y D.J. 2do Riese. (2002). Neuregulin isoforms exhibit distinct patterns of ErbB family receptor activation. *Oncogene*, 21 (55):8442-8452.

Huang, H.W., S.K. Mohan y C. Yu (2010). The NMR solution structure of human epidermal growth factor (hEGF) at physiological pH and its interactions with suramin. *Biochem Biophys Res Commun*, 402:705-10.

Hunter, T. (2000). Signaling-2000 and Beyond. *Cell*, 100:113-127.

Hynes, N.E. y H.A. Lane. (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*, 5:341-54.

Iliescu, A., M. Gravel, C. Horth, S. Apuzzo y P. Gros. (2011). Transmembrane Topology of Mammalian Planar Cell Polarity Protein Vangl1. *Biochemistry*, 50:2274-2282.

Jessen, J.R. y L. Solnica-Krezel. (2004). Identification and developmental expression pattern of *van gogh-like 1*, a second zebrafish *strabismus* homologue. *Gene Expression Patterns*, 4:339-344.

Kalabis, J., I. Rosenberg, D.K. Podolsky. (2006). Vangl1 protein acts as a downstream effector of intestinal trefoil factor (ITF)/TFF3 signaling and regulates wound healing of intestinal epithelium. *J Biol Chem*. 281(10):6434-41.

Kang, J.H. (2014). Protein Kinase C (PKC) Isozymes and Cancer. *New Journal of Science*, vol 2014, article ID 231418.

Kho, D.H., J.A. Bae, J.H Lee, H.J. Cho, S.H. Cho, J. H. Lee, Y.W. Seo, K.Y. Ahn, I.J. Chung, K.K. Kim. (2009). KITENIN recruits Dishevelled/PKC delta to form a functional complex and controls the migration and invasiveness of colorectal cancer cells. *Gut*. 58(4):509-19.

Kinugasa, Y., H. Ishiguro, Y. Tokita , A. Oohira , H. Ohmoto y S. Higashiyama. (2004). Neuroglycan C, a novel member of the neuregulin family. *Biochem Biophys Res Commun*, 321(4):1045-9.

Kim, J.S., E.J. Bak, B.C. Lee, Y.S. Kim, J.B. Park, I.G. Choi. (2011). Neuregulin induces HaCaT keratinocyte migration via Rac1-mediated NADPH-oxidase activation. *J Cell Physiol*. 226(11):3014-21.

Köninki, K., M. Tanner, A. Auvinen, J. Isola. (2009). HER-2 positive breast cancer: decreasing proportion but stable incidence in Finnish population from 1982 to 2005. *Breast Cancer Res*.11(3):R37.

Kuramochi, Y., X. Guo, D.B. Sawyer. (2006). Neuregulin activates erbB2-dependent src/FAK signaling and cytoskeletal remodeling in isolated adult rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 41(2):228-35.

Laakso, M., M. Tanner, J. Nilsson, T. Wiklund, B. Erikstein, P. Kellokumpu-Lehtinen, P. Malmström, N. Wilking, J. Bergh y J. Isola. (2006). Basoluminal carcinoma: a new biologically and prognostically distinct entity between basal and luminal breast cancer. *Clin Cancer Res*, 12(14 Pt 1):4185-91.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-5.

Bibliografía

Lee, J.H., S.R. Park, K. Chay, Y. Seo, H. Kook, K.Y. Ahn, Y. Jin Kim y K.K. Kim. (2004). KAI1 COOH-Terminal Interacting Tetraspanin (KITENIN), a Member of the Tetraspanin Family, Interacts with KAI1, a Tumor Metastasis Suppressor, and Enhances Metastasis of Cancer. *Cancer Research*, 64:4235-4243.

Lee, J., E. Cho, M. Kim, Y. Seo, D. Kho, I. Chung, H. Kook, N. Kim, K. Ahn y K. Kim. (2005). Suppression of Progression and Metastasis of Established Colon Tumors in Mice by Intravenous Delivery of Short Interfering RNA Targeting KITENIN, a Metastasis-Enhancing Protein. *Cancer Research*, 65:(19):8993-9003.

Lee, S., Y. Song, Y. Park, S. Cho, W. Lee, J. Lee, I. Chung, K. Kim, J. Rew y Y. Joo. (2011). Expression of KITENIN in human colorectal cancer and its relation to tumor behavior and progression. *Pathology International*, 61:210-220.

Lee, K., E. Ahn, S. Oh, O. Kim, Y. Joo, J. Bae, S. Yoon, H. Ryu, S. Jung, K. Kim, J. Lee y K. Moon. (2015). KITENIN promotes glioma invasiveness and progression, associated with the induction of EMT and stemness markers. *Oncotarget*, (5):3240-53.

Levitzi, A. y A. Gazit. (1995). Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science*, 267:1782-8

Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, Wiltzius JJ, Kussie P, Ferguson KM. (2005). Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell*, 7:301-11.

Linggi, B. y G. Carpenter. (2006). ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology. *Trends Cell Biol.* 16:649-56.

Liu, W.M., X.A. Zhang. (2006). KAI1/CD82, a tumor metastasis suppressor. *Cancer Lett.* 240(2):183-94.

Liu, W.M., F. Zhang, S. Moshiah, B. Zhou, C. Huang, K. Srinivasan, S. Khurana, Y. Zheng, J.M. Lahti, X.A. Zhang. (2012). Tetraspanin CD82 inhibits protrusion and retraction in cell movement by attenuating the plasma membrane-dependent actin organization. *PLoS One*, 7(12):e51797.

Lizard-Nacol, S., R. Lidereau, F. Collin, M. Arnal, L. Hahnel, P. Roignot, J. Cuisenier, J. Guerrin. (1995). Benign breast disease: absence of genetic alterations at several loci implicated in breast cancer malignancy. *Cancer Res.* 55(19):4416-9.

Lu, H.S., J.J. Chai, M. Li, B.R. Huang, C.H. He, R.C. Bi. (2001). Crystal structure of human epidermal growth factor and its dimerization. *J Biol Chem.* 276:34913-7.

Lu, D., J. Huang, A. Basu. (2006). Protein kinase Cepsilon activates protein kinase B/Akt via DNA-PK to protect against tumor necrosis factor-alpha-induced cell death. *J Biol Chem.* 281(32):22799-807.

MacMillan, C.D., H.S. Leong, D.W. Dales, A.E. Robertson, J.D. Lewis, A.F. Chambers, A.B. Tuck. (2014). Stage of breast cancer progression influences cellular response to activation of the WNT/planar cell polarity pathway. *Sci Rep.* 4:6315.

Massague, J. y A. Pandiella. (1993). Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem.* 62:515-41.

Methogo, R.M., G. Dufresne-Martin, P. Leclerc, R. Leduc, K. Klarskov. (2005). Mass spectrometric peptide fingerprinting of proteins after Western blotting on polyvinylidene fluoride and enhanced chemiluminescence detection. *J Proteome Res.* 4(6):2216-24.

Millikan, R. C., B. Newman, C.K. Tse, P.G. Moorman, K. Conway, L.G. Dressler, L.V. Smith, M.H. Labbok, J. Geradts, J.T. Bensen, S. Jackson, S. Nyante, C. Livasy, L. Carey, H.S. Earp, C.M. Perou. (2008). Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 109(1):123-39.

Minami C.A., D.U. Chung, H. R. Chang. (2011). Management options in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer.* 5:175-99.

Montero, J.C., L. Yuste, E. Díaz-Rodríguez, A. Esparís-Ogando, A. Pandiella. (2000). Differential shedding of transmembrane neuregulin isoforms by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. *Mol Cell Neurosci.* 16(5):631-48.

Montero, J.C., R.Rodríguez-Barrueco, A.Ocaña, E.Díaz-Rodríguez, A.Esparis-Ogando, y A.Pandiella. (2008). Neuregulins and Cancer. *Clin Cancer Res.* 14(11):3237-44.

Bibliografía

Montero, J.C., S. Seoane, A. Ocaña y A. Pandiella. (2011). P-Rex1 participates in Neuregulin-ErbB signal transduction and its expression correlates with patient outcome in breast cancer. *Oncogene*, 30:1059-1071.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65:55-63.

Murphy, J.P., D.M. Pinto.(2010). Temporal proteomic analysis of IGF-1R signalling in MCF-7 breast adenocarcinoma cells. *Proteomics*, 10(9):1847-60.

Nagata-Ohashi, K., Y. Ohta, K. Goto, S. Chiba, R. Mori, M. Nishita, K. Ohashi, K. Kousaka, A. Iwamatsu, R. Niwa, T. Uemura, K. Mizuno. (2004). A pathway of neuregulin-induced activation of cofilin-phosphatase Slingshot and cofilin in lamellipodia. *J Cell Biol.* 165(4):465-71.

Nielsen, T.O., F.D. Hsu, K. Jensen, M. Cheang, G. Karaca, Z. Hu, T. Hernandez-Boussard, C. Livasy, D. Cowan, L. Dressler, L.A. Akslen, J. Ragaz, A.M. Gown, C.B. Gilks, M. van de Rijn, C.M. Perou. (2004) Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 10(16):5367-74.

Ocaña, A. y A. Pandiella (2008). Identifying breast cancer druggable oncogenic alterations: lessons learned and future targeted options. *Clin Cancer Res.* 14(4):961-70.

Ocaña, A., y A.Pandiella. (2010). Personalized therapies in the cancer "omics" era. *Mol Cancer*, 9:202.

Odintsova, E., J. Voortman, E. Gilbert, F. Berditchevski. (2003). Tetraspanin CD82 regulates compartmentalisation and ligand-induced dimerization of EGFR. *J Cell Sci.* 116(Pt 22):4557-66.

Olayioye, M.A., R.M. Neve, H.A. Lane, N.E. Hynes. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* 19:3159-67.

Olopade, O. I., T. A. Grushko, R. Nanda, D. Huo. (2008). Advances in breast cancer: pathways to personalized medicine. *Clin Cancer Res.* 14(24):7988-99.

Olsen, J.V., B. Blagoev , F. Gnad, B. Macek , C. Kumar , P. Mortensen y M. Mann. (2006). Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell*, 127(3):635-48.

Park, J.W., R.M. Neve, J. Szollosi y C.C. Benz. (2008). Unraveling the biologic and clinical complexities of HER2. *Clin Breast Cancer*, 8:392-401

Prat, A. y C.M. Perou (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*. 5(1):5-23.

Prat, A., J.S. Parker, O. Karginova, C. Fan, C. Livasy, J.I. Herschkowitz, X. He, C.M. Perou. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 12(5):R68.

Rakha, E.A., M.E. El-Sayed, et al. (2008). Expression profiling technology: its contribution to our understanding of breast cancer. *Histopathology*, 52(1):67-81.

Reddy, K.B. (2011). Triple-negative breast cancers: an updated review on treatment options. *Curr Oncol*. 18(4):e173-9.

Rana, M.K., R.A. Worthylake. (2012). Novel mechanism for negatively regulating Rho-kinase (ROCK) signaling through Coronin1B protein in neuregulin 1 (NRG-1)-induced tumor cell motility. *J Biol Chem*. 287(26):21836-45.

Riese, D.J., 2nd, R.M. Gallo y J. Settleman. (2007). Mutational activation of ErbB family receptor tyrosine kinases: insights into mechanisms of signal transduction and tumorigenesis. *Bioessays*, 29:558-65.

Roskoski, R. (2014). The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res*. 79:34-74.

Rowe, A. y P. Jackson. (2006). Expression of KITENIN, a KAI1/CD82 binding protein and metastasis enhancer, in bladder cancer cell lines: Relationship to KAI1/CD82 levels and invasive behavior. *Oncology reports*, 16:1267-1272.

Ryu, H., Y. Park, S. Park, J. Lee, S. Cho, W. Lee, I. Chung, K. Kim, K. Lee, S. Kweon y Y. Joo. (2010). KITENIN Is Associated with Tumor Progression in Human Gastric Cancer. *Anticancer Research*, 30:3479-3486.

Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis. (1989). Molecular cloning, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Bibliografía

SEER Training Modules, Breast Cancer, Anatomy. U. S. National Institutes of Health, National Cancer Institute. 05, abril, 2015.

< <http://training.seer.cancer.gov/breast/anatomy//>>.

Schuchard, M., J.P. Landers, N.P. Sandhu, T.C. Spelsberg. (1993). Steroid hormone regulation of nuclear proto-oncogenes. *Endocr Rev.* 14(6):659-69.

Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm, M. Mann. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* 68(5):850-8.

Slamon; D.J., G.M. Clark , S.G. Wong , W.J. Levin, A. Ullrich, W.L. McGuire. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235(4785):177-82.

Sorlie, T., C. M. Perou, R. Tibshirani, T. Aas, S. Geisler, H. Johnsen, T. Hastie, M.B. Eisen, M. van de Rijn, S.S. Jeffrey, T. Thorsen, H. Quist, J.C. Matese, P.O. Brown, D. Botstein, P.E. Lønning, A.L. Børresen-Dale. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(19):10869-74.

Sorlie, T., Y. Wang, C. Xiao, H. Johnsen, B. Naume, R.R. Samaha, A.L. Børresen-Dale. (2006). Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. *BMC Genomics*, 7:127.

Spencer, K.S., D. Graus-Porta, J. Leng, N.E. Hynes, R.L. Klemke. (2000). ErbB2 is necessary for induction of carcinoma cell invasion by ErbB family receptor tyrosine kinases. *J Cell Biol.* 148(2):385-97.

Taylor, J., N. Abramova, J. Charlton y P.N. Adler. (1998). *Van Gogh*: A New Drosophila Tissue Polarity Gene. *Genetics*, 150:199-210.

Teicher, B.A., S.P. Fricker. (2010). CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* 16(11):2927-31.

Thingholm, T.E., O.N. Jensen, P.J. Robinson, M.R. Larsen. (2008). SIMAC (sequential elution from IMAC), a phosphoproteomics strategy for the rapid separation of monophosphorylated from multiply phosphorylated peptides. *Mol Cell Proteomics*, 7(4):661-71.

Urtreger, A.J., M.G. Kazanietz, E.D. Bal de Kier Joffé. (2012). Contribution of individual PKC isoforms to breast cancer progression. *IUBMB Life*, 64(1):18-26.

Vadlamudi, R.K., A.A. Sahin, L. Adam, R.A. Wang, R. Kumar. (2003). Heregulin and HER2 signaling selectively activates c-Src phosphorylation at tyrosine 215. *FEBS Lett.* 543(1-3):76-80.

Vitolo, M.I., A.E. Boggs, R.A. Whipple, J.R. Yoon, K. Thompson, M.A. Matrone, E.H. Cho, E.M. Balzer, S.S. Martin. (2013). Loss of PTEN induces microtentacles through PI3K-independent activation of cofilin. *Oncogene*, 32(17):2200-10.

Warren, C.M. y R. Landgraf. (2006). Signaling through ERBB receptors: multiple layers of diversity and control. *Cell Signal.* 18:923-33.

Watanabe, K., C. Bianco, L. Strizzi, S. Hamada, M. Mancino, V. Bailly, W. Mo, D. Wen, K. Miatkowski, M. Gonzales, M. Sanicola, M. Seno y D.S. Salomon. (2007). Growth factor induction of Cripto-1 shedding by glycosylphosphatidylinositol-phospholipase D and enhancement of endothelial cell migration. *J Biol Chem.* 282(43):31643-55.

Wilson, K.J., J.L. Gilmore, J. Foley, M.A. Lemmon, D.J. Riese, 2nd (2009). Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: implications for cancer. *Pharmacol Ther*, 122:1-8.

Witton, C.J., J.R. Reeves, J.J. Going, T.G. Cooke, J.M. Bartlett. (2003). Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. *J Pathol*, 200(3):290-7.

Wolff T. y G.M. Rubin. (1998). *strabismus*, a novel gene that regulates tissue polarity and cell fate decisions in *Drosophila*. *Development*, 125:1149-1159.

Yan J.X., R. Wait, T. Berkelman, R.A. Harry, J.A. Westbrook, C.H. Wheeler, M.J. Dunn. (2000). A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis*, 21(17):3666-72.

Yang XD, Jia XC, Corvalan JR, Wang P, Davis CG. (2001). Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer therapy. *CritRev Oncol Hematol.* 38:17-23.

Bibliografía

Yarden, Y. y M.X.Sliwkowski. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:127-37.