

# Análisis de la secreción de endoglina en exosomas y su relación con el proceso metastásico

Sergio Haro Girón<sup>1,2\*</sup>, Héctor Peinado<sup>2</sup>

**1**Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. **2**Unidad de Microambiente y Metástasis, Departamento de Oncología Molecular, Centro Nacional de Investigaciones Biológicas (CNIO).

## Resumen

El melanoma cutáneo es una neoplasia que se debe al crecimiento y invasión anormal de los melanocitos de la piel, siendo una de las causas de muerte más relevantes entre los cánceres de piel. Datos previos del laboratorio del Dr. Peinado apoyan que los exosomas tumorales (pequeñas vesículas secretadas por el tumor), juegan un papel crucial en la progresión tumoral y metástasis. Datos preliminares obtenidos mediante espectrometría de masas de exosomas tumorales de melanoma demuestran que Endoglina podría ser un nuevo candidato secretado en exosomas e implicado en la colaboración tumor-microambiente. Endoglina tiene un papel muy importante en la angiogénesis y postulamos que su secreción podría contribuir a la comunicación tumor-endotelio. Datos preliminares sugieren que la expresión de endoglina en otros tipos tumorales está relacionada con la expresión de PDGFR- $\beta$  (PlateletDerivedGrowth Factor Receptor Beta). En este trabajo hemos caracterizado varias líneas celulares de melanoma humano y neurofibromatosis de tipo 1 en la expresión de endoglina y PDGFR- $\beta$  mediante PCR cuantitativa (qPCR) y Western Blot. Asimismo, hemos silenciado endoglina en la línea celular de melanoma SKMEL28 y se ha analizado la presencia de endoglina en los exosomas aislados de células. Nuestros datos indican que endoglina es un potencial candidato secretado en exosomas de melanoma que podría estar implicado en el proceso metastásico

**Palabras clave:** Melanoma, endoglina, PDGFR- $\beta$ , shRNA, exosomas

**Cita:** Sergio Haro Girón, Héctor Peinado (2015) Papel de los exosomas y endoglina en la neurofibromatosis tipo 1. *Dianas* 4(1): e20150907. ISSN 1886-8746 journal.dianas.e20150907. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

**Editores:** María José Carmena y Alberto Domingo, Departamento de Biología de Sistemas, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

**Recibido:** 20 de abril de 2015

**Copyright:** ©2015 Sergio HaroGirón et al. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de CreativeCommons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

\*E-mail: [hpeinado@cnio.es](mailto:hpeinado@cnio.es)



## Introducción

El melanoma cutáneo es un desorden neoplásico que se originan en los melanocitos cutáneos. Es uno de los tumores sólidos más prevalentes en la actualidad provocando el 80% de las muertes de los cánceres relacionados con la piel [1]

Existen cuatro tipos de clasificaciones clínicas para los melanomas cutáneos que se diferencian en forma y zona de aparición. Además para clasificar el estadio existe otro diagnóstico clínico basado en la zona donde ha invadido en el momento del estudio. La mayoría de los melanoma cutáneos aparecen debido a las mutaciones en BRAF que se producen, y que sobreactivan esta vía de señalización [1]

Este tipo de neoplasia metastásica es capaz de secretar distintos factores que favorecen por un lado la metástasis de las células tumorales mediante cambios en el microambiente, y por otro lado la formación de nichos metastásicos donde las células en circulación se pueden integrar y formar otros tumores secundarios [2] En este proceso de metástasis, uno de los factores que tienen mucha importancia son los exosomas [2].

Los exosomas son nanovesículas de entre 40 y 100 nm de diámetro y que provienen de los cuerpos multivesiculares (MVB). Estas vesículas transportan moléculas de distinta naturaleza desde proteínas, como es Alix, hasta ácidos nucleicos como miRNA, RNA y DNA de doble cadena [3]. Los exosomas derivados de tumores o TD-exosomas tienen una naturaleza molecular distinta [4].

Estos exosomas juegan un papel muy importante en la comunicación paracrina y endocrina, siendo muy importantes en la metástasis del tumor primario ya que son capaces de transportar moléculas que pueden estar fosforiladas y reprimir genes [4]. En melanoma se ha observado que los exosomas son capaces de

preparar el nicho metastásico con más eficiencia que las partículas solubles [5]. Según las moléculas que transportan pueden favorecer la quimiotaxis de las células neoplásicas modificando la matriz extracelular del ganglio centinela, además de inmunosuprimir la zona para favorecer que las células lo metastaticen y favorecer la angiogénesis en el nódulo. [5]

Dada la relevancia de los exosomas en la progresión tumoral, el laboratorio del Dr. Peinado analizó el contenido proteico por espectrometría de masas de los exosomas de melanoma. Este análisis reveló que los exosomas de melanoma transportan una forma molecular asociada de 12 proteínas entre las cuales se encuentra endogлина (datos no mostrados).

En el cáncer, uno de los procesos que se dan es la formación de nuevos vasos sanguíneos. Una de las proteínas que son importantes en el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos es la endogлина [6]. La endogлина es un co-receptor de los receptores de TGF-β, uniéndose a receptores con actividad serin/treonin quinasa [6]. Es un homodímero, donde los enlaces disulfuro unen las dos subunidades. El dominio extracelular consiste en 565 aminoácidos, tiene un dominio transmembrana de unos 25, además de una cola citoplasmática de 47 aminoácidos y de un peso molecular de 180KDa[7].

La endogлина es una proteína que regula la actividad de proteínas como ALK 1 y ALK 5 al igual que sus proteínas dianas SMAD. Pero también se ha visto que la actividad de la endogлина está presente en situaciones de hipoxia y una sobreexpresión de este receptor provoca un aumento del óxido nítrico sintasa [7].

El papel de endogлина en la metástasis tumor no está del todo aclarado. En el carcinoma hepatocelular, endogлина favorecía el direccionamiento celular y la invasibilidad y metástasis de las células hepáticas [8]. En melanoma el silenciamiento de endogлина mediante shRNA provoca una disminución de la proliferación *in vitro* [9]. Pero además, *in vivo*, el silenciamiento de endogлина en ratones disminuye la formación de vasos sanguíneos, provoca necrosis en muchos vasos sanguíneos reduciendo las metástasis pulmonares y hepáticas de las células de melanoma y la reducción del tumor primario [9]

El análisis de genes relacionados con la expresión de endogлина en diversos tipos tumorales realizados por el Dr. Peinado demostró que un candidato correlacionado con su expresión es PDGFR-β (Platelet Derived Growth Factor Receptor Beta). Es un receptor con un dominio extracelular formado por cinco dominios parecidos a inmunoglobulina y un dominio intracelular con regiones con actividad quinasa. Para poder activarse, necesitan autofosforilarse el residuo de tirosina conservado y liberarse del bucle que bloquea el centro activo, y si es doblemente fosforilado se favorece aún más su actividad [10]. Este receptor tiene un papel clave en la angiogénesis mediante su unión a PDGF y favoreciendo el reclutamiento de pericitos a los vasos [9]

En varios tipos de enfermedades se ha observado que PDGFR-β es una proteína clave en el desarrollo de la enfermedad. En cáncer de próstata se ha observado que existe una mayor expresión de este receptor en líneas de cáncer de próstata. Además se observa un aumento de expresión de uno de sus ligandos, PDGF-D, que está muy relacionado con una mayor invasibilidad celular. En cáncer de colon, la transición a EMT activa la expresión de PDGFR-β, y la activación de este receptor promueve la metástasis [11]. La activación de PDGFR-β es suficiente como para activar a la proteína P-Rex1, promoviendo la metástasis en varios tipos de tumores, entre los cuales pudiera estar el melanoma [12]

En este trabajo nos centraremos en el análisis de la secreción de endogлина en exosomas y en la caracterización y aislamiento de varios plásmidos que contienen secuencias de interferencia (shRNA) contra endogлина, para bloquear su expresión. Para ello procederemos a la caracterización de expresión de endogлина y PDGFR-β en varias líneas celulares tumorales y estudio de la interferencia por transfección transitoria.

## Materiales y Métodos

### Plásmidos

Se trabajaron con 3 plásmidos distintos del tipo pSuper Retro. Cada plásmido contiene una secuencia de shRNA para reducir la expresión de endogлина de 19 nucleótidos: 5'-TGTCCTTGATCCAGACAAA-3'(pRSE2) y 5'-TGGTACATCTACTCGCACA-3' (pRSE3). El pRS es el plásmido control, el cual contiene una secuencia que no afecta la expresión de ningún gen. La secuencia es 5'-GGTACGAATGTTAGCGAAC-3'. Los plásmidos fueron donados por el Dr. ten Dijke [12]. También se trabaja con dos plásmidos pSuper donados por el Dr. Carmelo Bernabéu del Centro de Investigaciones Biológicas [13]

### Purificación de DNA

Se clonaron los plásmidos por transformación a la cepa de E.Coli 5DHα mediante choque térmico a 42°C durante 30 segundos. Se cultivaron en placas de LB con ampicilina a 50µg/ml y se dejaron toda una noche a 37°C y se seleccionó una colonia. Se hace un preinóculo que crece en agitación en 10ml de medio LB con ampicilina a 1 µg/µl durante 8 horas. Se cambia a un matraz que tenga 400 ml de LB con ampicilina

a 1 µg/µl y se deja en agitación a 37°C durante toda la noche. El DNA plasmídico se purificó usando el QIAGEN Maxi Plasmid Kit y el protocolo adjunto al producto.

### Caracterización de los plásmidos

Se digieren los DNA plasmídicos con las enzimas de restricción HindIII y EcoRI (New England Laboratories). Se hacen tres experimentos distintos: Una doble digestión con 3 µg de DNA plasmídico usando 10 unidades EcoRI y otras 10 unidades HindIII. Una digestión simple con 10 unidades HindIII y una digestión simple con 10 unidades EcoRI. La digestión se realiza en un volumen final de 20 microlitros. Se dejan durante 3 horas a 37°C en el baño. El gel de agarosa se realiza al 1,8% de agarosa para la doble digestión, y al 1% para las digestiones simples. La electroforesis se hace con la instrumentación de Bio Rad, y se realiza a 70 V durante unas dos horas. Se revela en una cámara ultravioleta (Bio Rad). Tras esto se usaron 0.6 µg del DNA plasmídico de pRSE2 y pRSE3 digerido por EcoRI para secuenciar. Para ello se precipitó añadiéndole 1/10 volúmenes de acetato de sodio pH 5.2. Tras esto se le añadieron entre 2.5 volúmenes de etanol 100% (Panreac) frío y se dejó a -20 °C durante 20 minutos. Se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos y se quitó el sobrenadante. Se le añadió 1 ml de etanol al 70%, se le da un spin rápido. Se quita el sobrenadante, se deja secar y se resuspende en agua libre de nucleasas (Ambion). Tras esto se lleva al servicio de Genómicas del CNIO para secuenciar usando el primer 20A1 (5'-AAGCCCTTTGTACACCCTA-3').

### Cultivos celulares

Las líneas celulares usadas son las SKMEL 28 y SKMEL103 (Melanoma), ST88, S462 y FHM-B1 (Neurofibroma) y HUVEC (Endoteliales). Las células se incuban a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y en condiciones húmedas. Además el medio es DMEM (Lonza) que contiene gentamicina 4 mg/ml (Lonza) y suero FETAL BOBINO (10%, Lonza). La línea celular HUVEC, debido a su origen, deben ser cultivadas en un medio especial EGM-V2(Lonza), enriquecido con human Epidermal Growth Factor(Hegf), Vascular Endothelial Growth Factor(VEGF), R3-Insulin-like Growth Factor-1 (R3-IGF-1), ácido ascórbico, hidrocortisona, human Fibroblast Growth Factor Beta (hFGF-β), Suero Fetal Bovino y Gentamicina/Amfotericina-B en los volúmenes indicados por el protocolo de Lonza. Las células endoteliales necesitan crecer en una placa en la que pongan 4 ml de gelatina porcina al 0.1%, cubriendo toda la superficie de la placa, durante unos 15 minutos. Cuando se van a sembrar las células, se recoge la gelatina sobrante y se añade 10 ml de medio EGM-V2.

### Aislamiento de RNA

Cada una de las líneas celulares se crecen en placas p100 hasta que tengan sobre un 80% de confluencia. Tras esto se lisan usando un mililitro de Qiazol (Qiagen). Se añaden 0.2 ml de cloroformo por ml de Qiazol y se centrifuga a 12000 rcf durante 15 minutos a 4°C. Se recoge la fase acuosa y se añaden 0,5 ml de isopropanol (Panreac) a temperatura ambiente y se vuelve a centrifugar a 10000 rcf a 4°C durante 10 minutos. Se elimina el isopropanol y se limpia con un mililitro de etanol (Panreac) al 75%. Se centrifuga a 7500 rcf durante 5min a 4 °C, se elimina el etanol y se deja secar al aire libre. Se resuspende el pellet en 100 microlitros de agua libre de nucleasas (Ambion). La concentración se mide mediante el NanoDrop.

### Retrotranscripción

Se usa un microgramo de RNA. Se usa el protocolo del producto Quantitect Reverse Transcription (Qiagen) para ajustar los volúmenes para esa cantidad de RNA. Se incuba el RNA de la muestra con la master mix de eliminación de DNA durante 5 minutos a 42°C. Tras esto se prepara la master mix de la retrotranscripción en el hielo. Se añade a cada uno de los tubos de RNA 6 microlitros de master mix de retrotranscripción. Se deja 30 minutos a 42°C. Para inactivar la reacción, se incuban las muestras a 95°C durante 3 minutos, se diluyen en 200 µl de agua libre de nucleasas (Ambion) y se congelan a -20° C hasta su posterior uso.

### qPCR

Para la qPCR se usan sondas Taqman (Life Technologies) que alineen con el gen de endoglina humana y contra PDGFR-β. En una placa de 96 pocillos a cada pocillo se añade un volumen de 3.5 µl procedentes de un microgramo de cDNA. A cada pocillo se le añade 11.25 µl de la Master mix, que contienen el Taqman Assay. Se lee en el aparato 7500 fast (Applied Biosystems) y se analiza con el software Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System Software.

### Western Blot

Las células se lavan con PBS 1x y se aspira. Tras esto se añade 500 µl de RIPA en cada pocillo con inhibidores de proteasas y fosfatasa (NaF al 1mM y ortovanadato de sodio al 0.1 mM). Se raspa la superficie y se recoge en un eppendorf. Se deja 10 minutos en hielo y se centrifuga a 10000 rpm durante 10 min a 4°C. Se recogió el sobrenadante en un nuevo eppendorf y se congeló a -20°C. Se prepara un BCA para medir la concentración de proteína siguiendo el protocolo del producto BCA protein Assay Kit (ThermoScientific) El reactivo para la realización de la electroforesis se usaron unos 15 µg de

proteínas por carril en un gel de poliacrilamida al 7.5%. La electroforesis se realiza a 120V durante una hora y media a temperatura ambiente. Tras esto, se hace una transferencia a una membrana de PVDF a 100V durante una hora y media a 4°C. Se recoge la membrana y se incuba toda la noche con el anticuerpo primario anti-endogлина (Abcam, EPR10145) en una dilución 1:1000 a 4°C. Tras esto se lava y se incuba con el anti-rabbit (GE Healthcare, NA934V) durante una hora en una dilución 1:4000 y se revela usando el kit de GE Healthcare. Como control de carga se incuba β-actina (Sigma-Aldrich, A5441) en una dilución 1:5000 durante toda la noche y se usa como anticuerpo secundario el anti-mouse (GE Healthcare, EPR10145) en una dilución 1:1000, que se incuba durante una hora.

### Fotografías

Las fotografías se realizan en un microscopio invertido con una lente con aumento 20x. De cada pocillo de una placa p6 con muestra se realiza un triplicado y se cuenta el nº de células levantadas contra el control. Para las fotografías se usó el programa AxioVision 4.6. La cámara usada para las fotografías es la Axio ICc1 (Zeiss).

### Transfección de líneas celulares

En placas de 6 pocillos se siembran 500000 células por pocillo. Se dejan crecer hasta que tengan una confluencia de entre el 70-90%. Se aspira el medio con suero de la placa antes de transfectar. Se transfecta un total de 2,5 µg de cada plásmido de la familia pRetroSuper y se deja un control donde no lleva nada de DNA. De cada muestra se utilizan 2.5 µg de DNA plasmídico que se incuba en 250 µl de medio DMEM sin suero. Se añaden 10 µl de lipofectamina 2000 (Invitrogen) por cada 250 µl de medio DMEM sin suero por muestra. Se mezclan cada uno y se hace una espera de 20 minutos hasta que se añaden a 1.5 ml de medio DMEM sin suero. Tras 24 horas desde la transfección, se cambia el medio de las células por DMEM con 10% FBS. Tras 48 horas se realiza un triplicado de fotografías a cada una de las muestras.

## Resultados

### Caracterización de los plásmidos con el siRNA contra endogлина.

Tras obtener los plásmidos de la transformación y su posterior crecimiento, se calcula la concentración de DNA de cada uno de los plásmidos que tenemos (Tabla 1).

Muestra	Concentración (µg/µl)	Ratio 280/260
pSuper	0.507	1.89
pSuper ENG	1.955	1.91
pRS	0.6222	1.9
pRS ENG 2	3.3378	1.9
pRS ENG 3	1.9969	1.92

Tabla 1. Concentraciones de DNA plasmídico obtenidos tras la transformación de E.Coli 5DHα y posterior crecimiento.

Con los plásmidos purificados se hicieron dos digestiones simples con EcoRI y HindIII y una digestión doble con estas dos enzimas de restricción (Figura 1).

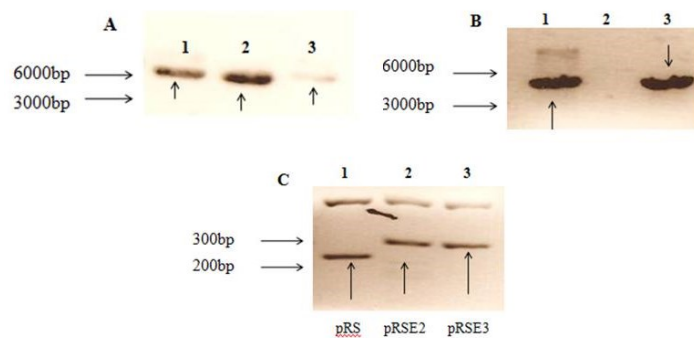


Figura 1. Digestiones con enzimas de restricción de los distintos plásmidos. A) Digestión con EcoRI de los plásmidos pRS, pRSE2 y pRSE3. B) Digestión con HindIII de los plásmidos pRS, pRSE2 y pRSE3. C) Doble digestión con HindIII y EcoRI de 3µg de DNA plasmídico. El carril 1 se representa el plásmido pRS. En el carril 2 se muestra el plásmido pRSE2. El carril 3 muestra el plásmido pRSE3

Las imágenes A y B de la figura representan el tamaño de los plásmidos tras la digestión simple con cada una de las enzimas de restricción. Mientras que un plásmido pSuper tiene un tamaño de 3Kb, Los plásmidos pSuper Retro lo tienen de unas 6kb de tamaño.

En la digestión doble del plásmido pRetroSuper se observan dos tipos de tamaño. El inserto pRScontrol (sin shRNA) debería tener un tamaño de 227 bp, mientras que los plásmidos PRSE2 Y PRSE3 (que portan las secuencias de shRNA interferentes) deberían tener un tamaño de unas 280 bp. En la figura 1C se observa que el inserto del vector vacío es de menor tamaño que los plásmidos pRSE2 y PRSE3. Esta diferencia de tamaño se debe a que el plásmido pRS no tiene un inserto, mientras que los otros plásmidos si que lo tienen.

Tras esto, se secuenciaron aquellos plásmidos digeridos con EcoRI del tipo pRetroSuper (Figura 2). En la secuenciación se confirmó la presencia del inserto contra endoglina mediante las secuencias que aparecen en el trabajo de Pardali et al [12], y mediante el alineamiento de las secuenciaciones, se confirmó que la posición del inserto se encuentra al final del promotor H1 (Figura 2).

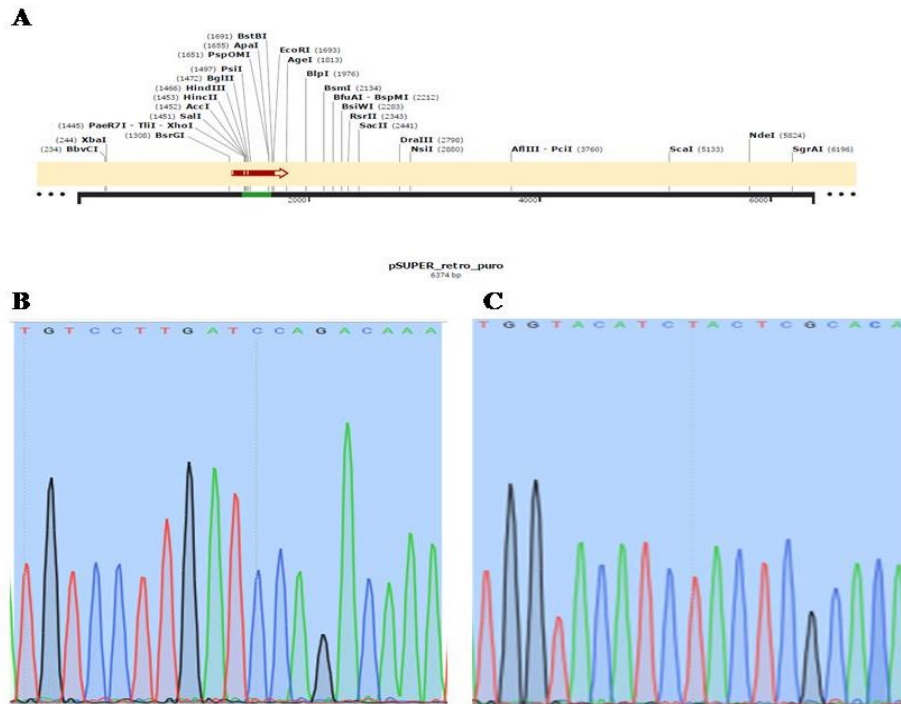


Figura 2. A) Alineamiento de la secuenciación del plásmido con el mapa del plásmido. La zona marcada de verde corresponde con el promotor H1. B) Secuencia del inserto del plásmido pRSE2. C) Secuencia del inserto del plásmido pRSE3

### Caracterización de líneas celulares para endoglina y PDGFR-β

Tras obtener los plásmidos, el siguiente paso que se realizó es caracterizar las línea celular SKMEL 28 que tiene mutada la proteína B-RAF y la línea celular SKMEL 103 que tiene mutada la proteína N-RAS[14]. También se caracterizaron las líneas ST88 y S462 derivadas de tumores de neurofibromatosis tipo 1 que poseen una 0 copias funcionales del gen NF1 y por tanto no expresan neurofibromina, y la línea célula JHM-B1, que procede de una neurofibromatosis tipo 1 debido a mutación espontánea del cromosoma 17, provocando que no exista una copia funcional del gen NF1 que codifique para neurofibromina. Como control se usa la línea celular HUVEC, que es una línea celular endotelial procedente de las venas del cordón umbilical

Se aisló el RNA de las líneas celulares HUVEC, SKMEL 28, SKMEL 103, ST88, S462 y JHM-B1. Tras esto se realizó una RT-PCR y se obtuvo el cDNA para realizar las qPCR de endoglina y PDGFR-β. Como control del experimento se usa el gen HPRT para estudiar la expresión de endoglina y GAPDH para el estudio de PDGFR-β (Figura 3).

En la figura 3A se puede observar que todas las líneas celulares tumorales expresan más endoglina que las propias células endoteliales umbilicales, siendo distinto en el caso de las S462, que su expresión es muy baja. Las células ST88 expresan gran cantidad de endoglina, y tiene una alta importancia el hecho que las células de melanoma también tenga una expresión alta de esta proteína, dado que pueden ser también susceptibles de silenciamiento de esta proteína.

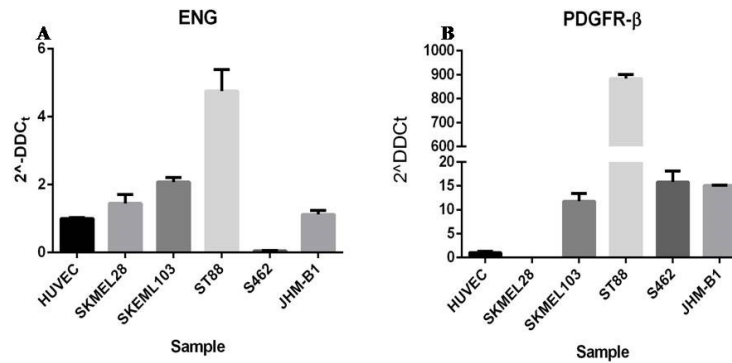


Figura 3. A) Resultados de la qPCR de endoglina. Como referencia se uso las células HUVEC. Las células con mayor expresión de endoglina son las ST88, mientras que las S462 no expresan mucha endoglina, comparadas con las HUVEC. B) Resultados de la qPCR de PDGFR-β. Como referencia se usaron las células HUVEC. Las células con mayor expresión son las ST88, pero las que menos expresan PDGFR-β son las ST88, mientras que S462 si que expresan.

La expresión de PDGFR-β en los cultivos celulares parece ser que están relacionados con la expresión de endoglina, siendo en muchos casos una relación 1:1, tal y como sucede con la línea celular ST88 o SKMEL 103.

Mientras la línea celular de melanoma SKMEL28 tiene expresión de endoglina y no de PDGFR-β, a diferencia de la línea celular de neurofibromatosis S462, la cual expresa PDGFR-β y no endoglina.

Tras esto los resultados de las qPCR, se realizó Western Blot para observar la presencia de esta proteína en las células mediante inmunodetección, tras un lisado celular (Figura 4)

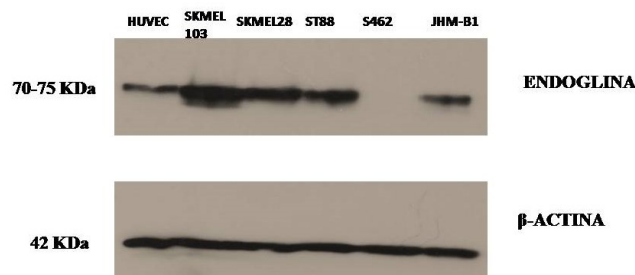


Figura 4. Inmunodetección de endoglina en los distintos cultivos celulares. Como control de carga se utilizo β-actina.

Con la inmunodetección podemos confirmar los datos de la qPCR, observando que todas las líneas celulares expresan endoglina, salvo la línea celular S462. Además se observa que la cantidad de endoglina se corresponde con la expresión de cada línea celular. En algunas líneas como la SKMEL 103 y la JHM-B1 aparece una doble banda. Esta doble banda aparece debido a que existe un cambio en la movilidad de electroforesis. Este cambio podría deberse a una modificación post-traducciona en la proteína como es la fosforilación de la proteína debido a Alk5 y TGF-βRII en residuos de Ser y Thr que modifican en crecimiento celular y adhesión, y que su desregulación puede ser una de las causas de una señalización por TGF-β descontrolada[14].

### Silenciamiento de endoglina en la línea celular SKMEL 103

Para validar el uso de interferentes de endoglina seleccionamos el modelo SKMEL 103 debido a la alta expresión de mRNA y proteína .A las 48 horas, en el punto con mayor rendimiento de la transfección, se realizan fotografías de cada muestra por triplicado (Figura 5).

En las imágenes se puede observar que las células que fueron transfectadas con el plásmido que contenía el shRNA contra endoglina empiezan a perder contacto a partir de las 24 horas, pero a las 48 horas de ser transfectadas ya aparecen células en suspensión probablemente debido a la falta de adherencia con la superficie de la placa.

La qPCR para las muestras de SKMEL 103 reflejan que el aquellas células transfectadas con el plásmido pRSE2 aumentan la expresión de endoglina comparadas con el control. Incluso la transfección de las células con un plásmido vacío como es el pRS provoca un aumento de la expresión de endoglina. En el caso de pRSE3 no se ve expresión debido a que no hubo expresión ni del gen diana ni del gen control (En este caso HPRT1) (Figura 6).



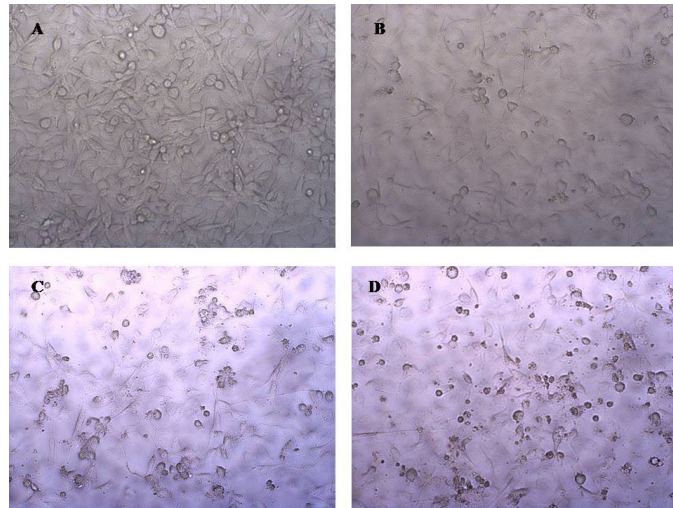


Figura 5. Fotografías realizadas tras 48 horas de la transfección de las células SKMEL 103. Las imágenes están ordenadas según el tratamiento. A) Control, B) pRS, C) pRSE2 y D) pRSE3. Las células transfectadas con el inserto tienen más prolongaciones que los controles, además de más células muertas flotando en el medio.

Con la expresión de PDGFR- $\beta$  se observa que esta proteína se expresa de forma igualitaria en el control y pRS, comparado con los resultados de la expresión de endoglina. Mientras pRSE2 sufre un descenso en la expresión de PDGFR- $\beta$  cuando endoglina está sobreexpresado. En pRSE3 no tiene expresión tampoco del gen diana ni del gen control.

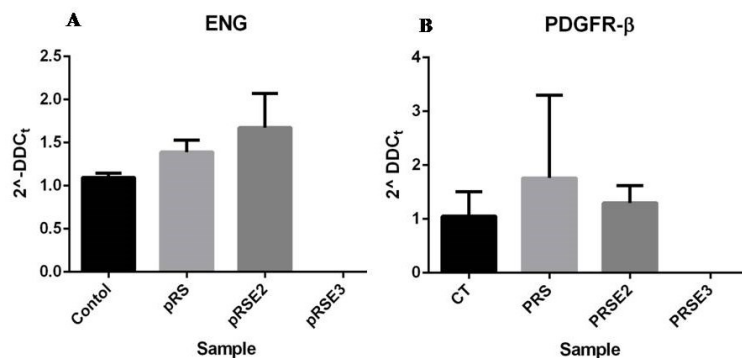


Figura 6. Resultados de la qPCR de las células SKMEL 103 tras el silenciamiento. A) Resultados de la expresión de endoglina. El control usado fue HPRT1. B) Resultados de la expresión de PDGFR- $\beta$ . Como control de expresión se uso GAPDH.

## Discusión

En este trabajo hemos sido capaces de amplificar, aislar y purificar varios plásmidos que contienen el shRNA de endoglina para silenciar este gen. Además lo hemos confirmado mediante dos digestiones simples para obtener el tamaño del plásmido, una digestión doble para confirmar la presencia o ausencia del inserto en su secuencia y por último mediante secuenciación hemos obtenido que se encuentren las secuencias de los plásmidos en la zona del promotor H1.

Tras esto hemos caracterizado varias líneas celulares en la expresión y síntesis de endoglina. Las líneas celulares de melanoma humano como son SKMEL 28 y SKMEL 103 tienen expresión de esta proteína y además la expresan en alta cantidad, como se ha demostrado. Esta proteína es muy importante en la angiogénesis, pero nunca se había documentado que en estas dos líneas celulares también pudieran expresarse. La expresión de endoglina se correlaciona con la plasticidad de las células y la capacidad de estas células de mimetizar un fenotipo endotelial y participar en la formación de estructuras vasculares en el sarcoma de Ewing y melanoma [15]. Además, su inhibición reduce considerablemente la viabilidad en experimentos *in vitro* y la metástasis en experimentos *in vivo*, siendo una alternativa al tratamiento de melanoma con inhibidores de la proteína BRAF [9].

Tras el silenciamiento de endoglina, las células supervivientes de las SKMEL 103 han respondido con una expresión mayor de endoglina, mientras que la expresión de PDGFR- $\beta$  ha disminuido. Una de las

causas de este aumento de endoglina puede deberse a que sólo se extrae el RNA de las células supervivientes. De algún modo, la célula respondería al silenciamiento del gen de endoglina activando alguna vía alternativa y resistiendo al silenciamiento del gen y provocando ese aumento de expresión porque es una proteína crucial para que la célula pueda sobrevivir y proliferar, mientras que decae la expresión de PDGFR-β porque probablemente este receptor es más importante en los procesos de metástasis e invasibilidad en melanoma

Además, en la línea celular SKMEL 103 la expresión de endoglina tiene una relación 1:1 con PDGFR-β, mientras que las SKMEL 28 no tienen expresión de este receptor. Esta relación puede ser muy importante en la capacidad metastásica del tumor, dado que las SKMEL 103 son de una naturaleza más metastásica que las SKMEL 28, ya que como anteriormente se ha comentado, la activación de PDGFR-β responde en el cáncer de colon a un fenotipo más metastásico (EMT) [6]. Uno de los problemas en el tratamiento de melanoma, es desarrollo de resistencias a los inhibidores de BRAF [15]. Esto provoca la activación de receptores con actividad tirosin quinasa como PDGFR-β, importante en la viabilidad celular [15]. El tratamiento con inhibidores para este receptor provoca una menor viabilidad celular y menor migración de las células de melanoma [16]. En melanoma PDGFR-β y endoglina de algún modo aún no conocido podrían interactuar conjuntamente en el proceso de angiogénesis activando vías de señalización que favorecieran la proliferación y mimetización de un fenotipo endotelial.

Se conoce que existe una forma soluble de endoglina que es capaz de secretarse, y que tiene importancia en varios tipos de cáncer como es el de mama [15]. Los exosomas podrían ser otro medio de secreción de endoglina al microambiente tumoral, donde probablemente jugaría un papel muy importante en el desarrollo de esta neoplasia de piel. Actualmente estamos intentando detectar si los exosomas de las células de melanoma contienen endoglina, y posteriormente se estudiaría el papel que tendría en el desarrollo de la patología.

Recientemente hemos demostrado la presencia de endoglina en los exosomas de SKMEL 103 (datos no mostrados). No existía información al respecto hasta ahora, apoyando aún más la idea de que esta proteína tendría un papel en el desarrollo de la metástasis. Este transporte de endoglina por exosomas podría estar relacionado con la expresión de PDGFR-β en melanoma, en el cual, PDGFR-β fuese una vía alternativa de supervivencia tumoral o metastásica en situaciones de resistencias a medicamentos y tratamientos.

## Agradecimientos

Muchas gracias al CNIO y en especial al área de Microambiente y Metástasis por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto. Agradecerle a Héctor el trabajar con él y agradecerle también todo lo que me ha enseñado en este tiempo que he estado. También a mis compañeros de laboratorio Susana y Ana por ayudarme cuando no sabía algo y guiarme en los experimentos realizados. Por último agradecer a los colaboradores por prestarnos el material necesario para este trabajo y a la Dra. María José Carmena por aconsejarme siempre que he tenido alguna duda.

## Bibliografía

1. Curbelo-Alonso, D. and Soengas, M. 2015. Hyperactivated endolysosomes trafficking in melanoma. *Oncotarget*. 6(5): 2583-2584
2. Peinado, H., Aleckovic, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., García-Santos, G., Nitadori-Hoshino, A., Hoffman, C., Badal, K., García, B., Callahan, M., Yuan, J., Martins, V., Skog, J., Kaplan, R., Brady, M., Wolchok, J., Chapman, P., Kang, Y., Bromberg, J. and Lyden, D. 2012. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature Medicine*. 18(6):883-891
3. Thakur, B., Zhang, Z., Becker, A., Matei, I., Huang, Y., Costa-Silva, B., Zheng, Y., Hoshino, A., Brazier, H., Xiang, J., Williams, C., Rodriguez-Barrueco, R., Silva, J. Zhang, W., Hearn, S., Elemento, O., Paknejad, N., Manova-Todorova, K., Welte, K., Bromberg, J., Peinado, H. and Lyden, D. 2014. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Research*. 24:766-769.
4. Vella, J. 2014. The emerging role of exosomes in epithelial-mesenchymal transition in cancer. *Frontiers in Oncology*. 4(361)
5. Zhang, H. and Grizzle, W. 2014. A novel Pathway of Local and Distant Intercellular Communication that Facilitates the Growth and Metastasis of Neoplastic Lesions. *The American Journal of Pathology*. 184(1): 28-41.
6. Liu, Z., Lebrin, F., Maring J., van den Driesche, S., van der Brink, S., van Dinther, M., Thorikay, M., Martin, S., Kobayashi K., Hawinkels, L., van Meeteren, L., Pardali, E., Korving, J., Letarte, M.,



- Arthur, H., Theuer, C., Goumans, M., Mummery, C. and ten Dijke, P. 2014. Endoglin is Dispensable for Vasculogenesis, but Required for Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Angiogenesis. *PLoS ONE*. 9(1): e86273.
7. Kopczyńska, E. and Makarewicz, R. 2012. Endoglin- a marker of vascular endothelial cell proliferation in cancer. *Współczesna Onkol.* 16(1): 68-71.
  8. Li, Y., Zhai, Z., Liu, D., Zhong, X., Meng, X., Yang, Q., Liu, J. and Li, H. 2015. CD105 promotes hepatocarcinoma cell invasion and metastasis through VEGF. *Tumor Biology*. 36:737-745-
  9. Tesic, N., Kamensek, U., Sersa, G., Kranjc, S., Stimac, M., Lamprecht, U., Preat, V., Vandermeulen, G., Butinar, M., Turk, B. and Cemazar, M. 2015. Endoglin (CD105) Silencing Mediated by shRNA Under the Control of Endothelin-1 Promoter for Targeted Gene Therapy of Melanoma. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*. 4(239).
  10. Campbell, A., Lawn, S., McGarry, L., Welch, H., Ozanne, B. and Norman, J. 2013. P-Rex1 Cooperates with PDGFR $\beta$  to Drive Cellular Migration in 3D Microenvironments. *PLoS ONE* 8(1): e53982.
  11. Heldin, C. 2013. Targeting the PDGF signalling pathway in tumor treatment. *Cell Communication and Signaling*. 11:97
  12. Pardali, E., van der Schaft, DWJ., Wiercinska, E., Hogendoorn, PCW., Griffioen, AW. and ten Dijke, P. 2011. Critical role of endoglin in tumor cell plasticity of Ewing sarcoma and melanoma. *Oncogene*. 30: 334-345.
  13. Sanz-Rodríguez, F., Guerrero-Esteo, M., Botella, LM., Banville, D., Vary, C. and Bernabéu, C. 2004. Endoglin Regulates Cytoskeletal Organization through Binding to ZRP-1, a Member of the Lim Family of Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 279(31): 32858-32868.
  14. Kaufmann, W., Nevis, K., Qu, P., Ibrahim, J., Zhou, T., Zhou, Y., Simpson, D., Helms-Deaton, J., Cordeiro-Stone, M., Moore, D., Thomas, N., Hao, H., Liu, Z., Shields, J., Scott, G. and Sharpless, N. 2008. Defective Cell Cycle Checkpoint Functions in Melanoma are Associated with Altered Patterns of Gene Expression. *Journal of Investigative Dermatology*. 128: 175-187
  15. Pérez-Gómez, E., del Castillo, G., Santibáñez, JF., López-Novoa, JM., Bernabéu, C. and Quintanilla, M. 2010. The Role of the TGF- $\beta$  Coreceptor Endoglin in Cancer. *The Scientific World Journal*. 10:2367-2384.
  16. Li, Y., Li, Y., Liu, Q. and Wang, A. 2015. Tyrphostin AG1296, a platelet-derived growth factor receptor inhibitor, induces apoptosis, and reduces viability and migration of PLX4032-resistant melanoma cells. *OncoTargets and Therapy*. 8:1043-1051