

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



## TESIS DOCTORAL

**Caracterización de las proteínas MDGA1 y MDGA2 implicadas en migración y adhesión celular: análisis de su expresión en patologías tumorales humanas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Jacqueline Head Abad**

Directores

Carmen de Juan Chocano  
Manuel Benito de las Heras

**Madrid, 2015**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II

**Caracterización de las proteínas MDGA1 y  
MDGA2 implicadas en migración y adhesión  
celular. Análisis de su expresión en patologías  
tumORAles humanas.**

TESIS DOCTORAL

JACQUELINE HEAD ABAD

Madrid, 2015





**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II**

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de la Dra. Carmen de Juan Chocano y el Dr. Manuel Benito de las Heras.

**Opta al grado de Doctor:**  
**Jacqueline Head Abad**



Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación de la Universidad Complutense de Madrid mediante la concesión de una beca de Personal Investigador en Formación; y al proyecto Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña (2010).



## *A mi familia*

*Empieza por hacer lo necesario,  
luego lo que es posible,  
y de pronto te encontrarás haciendo lo imposible.*

San Francisco de Asís



# AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera dar las gracias a mis Directores de Tesis, la Dra. Carmen de Juan Chocano y el Dr. Manuel Benito de las Heras, por brindarme la oportunidad de realizar mi tesis doctoral y permitirme formar parte de su grupo de investigación. Gracias Carmen por la confianza depositada en mí y por haberme enseñado a descubrir los entresijos de lo que realmente es investigar. Gracias Manuel, por tu entusiasmo por la ciencia y por esas charlas inesperadas que sin querer nos llevaban a arreglar el mundo.

Gracias a los Servicios de Cirugía General y Aparato Digestivo, Servicio de Cirugía Torácica y Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, por su colaboración. A los miembros del Servicio de Microscopía Confocal del CNIO, en especial a Diego y Manuel, por sus consejos e ideas. Gracias a los miembros del Servicio de Genómica UCM del Parque Científico de Madrid, especialmente a Rosa y Jesús por estar siempre dispuestos a echar una mano, cambiar a última hora las reservas para hacer la PCR cuantitativa y recibirte siempre con una sonrisa en la boca; y a Maribel y Rosana por sus consejos con la secuenciación de los promotores metilados de mis queridos *MDGAs*. Gracias a los miembros del Instituto de Investigaciones Biomédicas, en especial a Jesús Espada y Jesús Cruces por su ayuda en el diseño de los experimentos de epigenética y a Antonio Díaz por estar siempre dispuesto a echar una mano y aconsejar con los experimentos de cultivos celulares.

Gracias a todos los profesores y miembros del Departamento, por esos pequeños instantes en los que te cruzas por los pasillos y una palabra de ánimo, una sonrisa, una felicitación o un simple “hola” han sido capaces de cambiar el rumbo del día. Gracias Pilar por estar siempre pendiente de que todo salga perfecto, por facilitar la organización y ofrecerte a solucionar cualquier problema que surgiera tanto a nivel de laboratorio como de papeleo. Gracias Manoli por regalar cada mañana una sonrisa y un “hola guapa” que levantaba el ánimo a cualquiera.

Gracias a todos mis compañeros del Departamento: doctorandos, becarios de colaboración, estudiantes de máster, estudiantes de fin de grado... por compartir risas, conversaciones, largos días en el laboratorio, prestar material cuando la angustia se apoderaba de mi... Gracias por vuestra compañía y apoyo. Gracias a Juan y Emma, nuestros estudiantes de máster que renovaron el ambiente del laboratorio de Cáncer y nos trajeron unos años plenos de anécdotas de todo tipo. Mil gracias a mi familia en el departamento: Irene, Tamara, Esther, Elisa, Sabela, Vanesa y Juan; estos años no habrían sido lo mismo sin vosotros. Gracias por compartir conmigo mis angustias y alegrías tanto a nivel laboral como personal, por ser un apoyo incondicional, fuente de ánimo e inestimable ayuda. Gracias Irene por enseñarme que las cosas son más sencillas de lo que parecen, que las soluciones muchas veces las tenemos al alcance de la mano pero da miedo cogerlas y gracias por tu completa sinceridad que me ha zarandeado más de una vez y me ha colocado de nuevo en mi sitio de vuelta a la realidad. Gracias Tamara por mostrarme que las cosas o se hacen bien o no se hacen, por ser tan perfeccionista y por esas ansias de conocimiento que transmites. Gracias Esther por tu sencillez y entrega completa. Elisa, gracias por tu visión avanzada, por ofrecer siempre un punto de vista distinto, por tu comprensión. Gracias Sabela por tu manera de enfocar las cosas, tan jovial y desenfadada, por ofrecer ese toque de frescura y dinamismo, por ser una luchadora nata. Gracias Vane por tu sinceridad, por ser una persona llana y accesible, por esas risas y anécdotas compartidas tanto en el laboratorio como fuera de él. No quiero olvidarme tampoco de Juan de Toro, un auténtico ejemplo de trabajo y siempre con un humor implacable y una broma o un chiste por contar que amenizaban los largos días en el laboratorio.

Gracias al  *$\beta$ -cell team*, Carlos y Alberto, por enseñarme su pasión por la ciencia, por escuchar pacientemente mis problemas con los experimentos y estar siempre dispuestos a echar una mano y ofrecer una solución. A Ana, Miriam y Víctor, por las risas compartidas y esos cafés de desconexión que daban la energía suficiente para continuar el día, gracias.

No me puedo olvidar de mi estancia en Londres. Gracias Maddy por acogerme en tu laboratorio durante mis tres meses de estancia allí, por transmitirme tu ilusión por la investigación y enseñarme que aún siendo jefe de grupo no es necesario abandonar la poyata. Poder trabajar codo a codo contigo ha sido un placer, siempre pendiente de los

experimentos y fuente incansable de ideas. Gracias a mis compañeros del King's College: Giulia, Mali, Karl, Penny y Asier por facilitarme tanto mi estancia allí, ofrecerme su amistad y ayudarme en todo lo que estuviera en su mano. Gracias Judit y Asier, tener un apoyo español en tierras extranjeras es un privilegio. Gracias por vuestra amistad.

Un millón de gracias a mis amigos, que de una manera u otra han intentado comprender lo que hacía cacharreando en el laboratorio y me han ofrecido su apoyo, comprensión y ánimos. Gracias Nuria por tu templanza y paciencia, nadie mejor que tú comprende el sacrificio que supone la ciencia. Gracias por escucharme, animarme y estar SIEMPRE ahí a pie de cañón, tanto en los buenos pero sobre todo en los malos momentos. Gracias por todas las vivencias compartidas, los viajes, las risas... eres una persona increíble y me siento muy afortunada de poder decir a voz en grito que eres una gran amiga. Gracias por tu amistad. Gracias Raúl, Sonia, Irene y Kike por las vivencias, risas y aventuras compartidas. Nunca olvidaré aquel maravilloso viaje a Senterada, vuestra visita a Londres o ese viaje hippy furgonetero que nos marcamos por Europa. Gracias Raúl y Sonia porque en vosotros he encontrado una amistad incondicional, amigos de verdad con quien puedes contar para lo que sea; nos quedan mil aventuras por vivir. Gracias Enrique, Sara y Jaime, AMIGOS con mayúsculas, doy gracias al cielo por haberme permitido conocer a gente tan maravillosa como vosotros. Muchas gracias por entenderme, escucharme, hacerme entrar en razón cuando la desesperación se apoderaba de mi, por los bailes, las risas, las aventuras, las propuestas más locas, las salidas en bici y muchos más momentos compartidos que me quedan por nombrar. Nos esperan mil aventuras más juntos, gracias. Gracias Laura, Elena y Carla por esas noches locas bailando sin parar, disfrutando de la buena música, por escucharme y aconsejarme, por estar siempre a mi lado, por reñirme cuando ha hecho falta. Aunque ya no nos veamos tanto, seguís siendo una parte importante de mi. A mis amigos TAFAD, aunque os veo poco cuando nos vemos la liamos parda... Gracias por esos días de locura, de portarnos y disfrutar como niños sin importar lo que piensen los demás, por vivir la vida plena. Esos viajes de esquí me renuevan energía para el resto del año, gracias por vuestra amistad.

Y por último, no tengo palabras ni papel suficiente para agradecer a mi FAMILIA su apoyo incondicional. Esta tesis es por y para vosotros. No me cabe ninguna duda que esta tesis no hubiera sido posible si no fuera por el espíritu de lucha y superación personal que siempre me habéis alentado a desarrollar. Han sido muchos años de decepciones, alegrías, infortunios... pero siempre juntos hemos podido superar cualquier obstáculo. “Estamos juntos y con salud” éste ha sido el lema que marcaba el principio de una nueva remontada. Gracias a mis padres por transmitirme su pasión por el deporte y la naturaleza, algo que además de haberse constituido como una parte fundamental de mi vida, me ha enseñado que la disciplina, el tesón y la lucha por un objetivo son las claves para alcanzar el éxito. Gracias por inculcarme tantos valores personales que conforman la persona que actualmente soy, gracias por creer en mi, por ser el pilar fundamental en mi vida y ofrecerme consuelo, comprensión, cariño infinito y apoyo incondicional. Gracias a mi hermano, Jorge, por su paciencia y comprensión. Por esas tardes de música en las que bailábamos como locos en el cuarto o esas largas charlas en las noches de verano en las que recordábamos todas esas grandes anécdotas que hemos compartido. No desesperes, el tiempo te colocará allá donde tengas que estar... Ánimo!

Gracias a mis tíos Ignacio e Isabel por creer en mi y apostar por mi carrera investigadora. Tío, el destino no te permitió vencer esta enfermedad maldita, el Cáncer, esta tesis también es para vosotros.





*Los fracasos, para las mentes heroicas,  
son peldaños hacia el éxito.*

Thomas Chandler Haliburton



# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>21</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>23</b>
<b>1.1 Caracterización de los genes MDGA1 y MDGA2</b> .....	<b>25</b>
1.1.1 Organización genómica de MDGA1 .....	25
1.1.2 Expresión del gen MDGA1.....	26
1.1.3 Organización genómica de MDGA2 .....	27
1.1.4 Expresión del gen MDGA2.....	27
<b>1.2 Caracterización de las proteínas MDGA1 y MDGA2</b> .....	<b>28</b>
1.2.1 Estructura de las proteínas MDGA1 y MDGA2 humanas.....	28
1.2.2 Localización celular de MDGA1 y MDGA2.....	30
1.2.3 Anclaje de MDGA1 y MDGA2 a la membrana celular mediante un grupo Glicosil Fosfatidil Inositol (GPI) .....	31
1.2.4 Glicosilación de MDGA1 y MDGA2.....	32
1.2.5 Función de las proteínas MDGA1 y MDGA2 .....	33
<b>1.3 MDGAs y enfermedad</b> .....	<b>34</b>
1.3.1 Implicación de MDGA1 en esquizofrenia.....	35
1.3.2 Implicación de MDGA1 y MDGA2 en autismo.....	35
1.3.3 MDGA2 y disfunción sexual.....	37
1.3.4 MDGA2 y Lupus eritematoso sistémico .....	37
<b>1.4 Adhesión celular</b> .....	<b>38</b>
1.4.1 Uniones célula-célula .....	39
1.4.1.1 <i>Desmosomas</i> .....	41
1.4.1.2 <i>Uniones adherentes</i> .....	44
1.4.1.3 <i>Uniones estrechas</i> .....	48
1.4.1.4 <i>Uniones comunicantes</i> .....	52
1.4.2 Uniones célula-matriz extracelular .....	54
1.4.2.1 <i>Hemidesmosomas</i> .....	55
1.4.2.2 <i>Uniones focales o placas de adhesión</i> .....	58
<b>1.5 Migración celular</b> .....	<b>61</b>
1.5.1 Proceso migratorio.....	61
1.5.1.1 <i>Polarización de la célula</i> .....	62
1.5.1.2 <i>Formación de protrusiones</i> .....	63
1.5.1.3 <i>Estabilización de las protrusiones</i> .....	64
1.5.1.4 <i>Fuerzas de tracción</i> .....	65
1.5.1.5 <i>Retracción</i> .....	66
1.5.2 Migración colectiva .....	67
<b>1.6 Epigenética. Regulación de la expresión génica</b> .....	<b>71</b>
1.6.1 Metilación del ADN.....	71
1.6.2 Modificación covalente de histonas .....	73
1.6.3 Remodelación del nucleosoma.....	74
1.6.4 Micro ARNs .....	75
1.6.5 Epigenética y cáncer .....	76
1.6.5.1 <i>Cronología de la epigenética y el cáncer</i> .....	77
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>81</b>

<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>85</b>
<b>3.1 Construcciones de MDGA1 y MDGA2 .....</b>	<b>87</b>
3.1.1 Construcciones de MDGA1 y MDGA2 utilizadas.....	87
3.1.2 Producción y purificación de los plásmidos mediante Maxi-Prep .....	87
3.1.3 Valoración del ADN plasmídico por espectrofotometría.....	88
3.1.4 Digestión y secuenciación del ADN plasmídico .....	89
<b>3.2 Cultivos celulares .....</b>	<b>89</b>
3.2.1 Líneas celulares utilizadas .....	89
3.2.2 Almacenamiento.....	90
3.2.3 Congelación/descongelación .....	90
3.2.4 Transfección de células MDCK.....	90
3.2.5 Generación de líneas celulares estables.....	91
3.2.6 Purificación de las líneas celulares mediante FACS.....	91
3.2.7 Ensayos de migración .....	93
3.2.7.1 Estudio de la capacidad migratoria mediante el ensayo de la herida .....	93
3.2.7.2 Estudio de la capacidad migratoria mediante cámaras Transwell.....	94
3.2.8 Ensayo de invasión celular .....	95
3.2.9 Ensayo de proliferación celular .....	96
3.2.10 Ensayos de adhesión celular .....	97
3.2.10.1 Ensayo de adhesión célula-matriz extracelular .....	97
3.2.10.2 Ensayo de adhesión célula-célula.....	97
<b>3.3 Tinciones para inmunofluorescencia .....</b>	<b>99</b>
3.3.1 Fijación, permeabilización y bloqueo de las células .....	99
3.3.2 Anticuerpos primario y secundario .....	99
3.3.3 Tinción de núcleos con DAPI.....	100
3.3.4 Microscopio confocal.....	100
<b>3.4 Inmunodetección de proteínas.....</b>	<b>101</b>
3.4.1 Obtención de los extractos proteicos .....	101
3.4.2 Valoración de proteínas del extracto proteico .....	101
3.4.3 Western Blot .....	101
3.4.3.1 Preparación de las muestras .....	101
3.4.3.2 Electroforesis en geles de SDS-PAGE.....	102
3.4.3.3 Transferencia en semi-dry a membranas de nitrocelulosa .....	102
3.4.3.4 Bloqueo e incubación con anticuerpos.....	102
3.4.3.5 Detección de anticuerpos por quimioluminiscencia.....	103
3.4.3.6 Borrado de las membranas de nitrocelulosa.....	104
<b>3.5 Estudio de la expresión de MDGA1 y MDGA2 en patologías tumorales humanas .....</b>	<b>104</b>
3.5.1 Pacientes.....	104
3.5.2 Clasificación de los pacientes en estadios.....	105
3.5.3 Estudio de la expresión génica de MDGA1 y MDGA2 en tumores humanos mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) .....	108
3.5.3.1 Obtención de ARN de las muestras tumorales .....	108
3.5.3.2 Valoración de ARN mediante espectrofotometría.....	108
3.5.3.3 Ensayo de PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).....	109
3.5.3.4 Síntesis de ADNc por retrotranscripción .....	111
3.5.3.5 PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).....	112
<b>3.6 Inmunohistoquímica .....</b>	<b>115</b>

<b>3.7 Estudio de hipermetilación del promotor de MDGA1 y MDGA2 .....</b>	<b>116</b>
3.7.1 Ensayo de desmetilación con la 5-Aza-2' Deoxicitidina.....	116
3.7.2 Estudio de hipermetilación del promotor de MDGA1 y MDGA2 en muestras tumorales humanas.....	116
3.7.2.1 Obtención de ADN genómico de tumores.....	116
3.7.2.2 Transformación del ADN por bisulfito.....	118
3.7.2.3 MSP (Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction).....	119
3.7.2.4 Purificación del producto de PCR.....	121
3.7.2.5 Clonaje en pGEM-T.....	121
3.7.2.6 Purificación y digestión del ADN plasmídico.....	122
3.7.2.7 Secuenciación.....	122
<b>3.8. Análisis estadístico de los resultados.....</b>	<b>123</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>125</b>
<b>4.1 Generación de líneas celulares estables de MDGA1 y MDGA2 .....</b>	<b>127</b>
<b>4.2 Estudio de la capacidad de migración, invasión y adhesión celular mediadas por MDGA1 y MDGA2 .....</b>	<b>130</b>
4.2.1 Ensayos de migración.....	130
4.2.1.1 Estudio de la capacidad migratoria mediante el ensayo de la herida.....	130
4.2.1.2 Estudio de la capacidad migratoria mediante cámaras transwell.....	134
4.2.2 Ensayos de invasión.....	136
4.2.3 Ensayo de proliferación celular.....	138
4.2.4 Ensayos de adhesión.....	139
4.2.4.1 Ensayos de adhesión célula-matriz extracelular.....	139
4.2.4.2 Ensayos de adhesión célula-célula.....	142
<b>4.3 Análisis de la expresión de otras proteínas implicadas en adhesión celular. ....</b>	<b>145</b>
<b>4.4 Estudio de la expresión de MDGA1 y MDGA2 en patologías tumorales humanas .....</b>	<b>148</b>
4.4.1 Estudio de la expresión génica de MDGA1 y MDGA2 mediante qRT-PCR.....	148
4.4.1.1 Análisis de los niveles de expresión de MDGA1 y su relación con las variables clínico-patológicas de los tumores.....	158
4.4.1.2 Análisis de los niveles de expresión de MDGA2 y su relación con las variables clínico-patológicas de los tumores.....	163
4.4.1.3 Análisis de los niveles de expresión de MDGA1 y MDGA2 y su relación con las variables clínico-patológicas de los tumores.....	168
4.4.1.4. Estudios de pronóstico basados en la expresión de los genes MDGA1 y MDGA2 en las diferentes patologías tumorales estudiadas.....	173
4.4.2 Estudio de la expresión de MDGA1 y MDGA2 mediante inmunohistoquímica.....	182
<b>4.5 Estudio de hipermetilación del promotor de MDGA1 y MDGA2 .....</b>	<b>186</b>
4.5.1 Ensayo de desmetilación con 5-aza-2' Deoxicitidina.....	188
4.5.2 Análisis del estado de metilación de los promotores de MDGA1 y MDGA2.....	189
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>193</b>
<b>5.1 Papel de MDGA1 y MDGA2 en migración celular.....</b>	<b>198</b>
<b>5.2 Papel de MDGA1 y MDGA2 en invasión celular .....</b>	<b>200</b>
<b>5.3 Papel de MDGA1, MDGA2 en adhesión celular.....</b>	<b>201</b>

<b>5.4 Estudio de la expresión génica de <i>MDGA1</i> y <i>MDGA2</i> en patologías tumorales humanas.....</b>	<b>204</b>
5.4.1 Análisis de los niveles de expresión de los genes <i>MDGA1</i> y <i>MDGA2</i> y su relación con las variables clínico-patológicas de las muestras tumorales .....	207
5.4.2 Estudios de pronóstico basados en la expresión de los genes <i>MDGA1</i> y <i>MDGA2</i> en las diferentes patologías tumorales analizadas.....	208
<b>5.5 Estudio de la expresión de las proteínas <i>MDGA1</i> y <i>MDGA2</i> en tejidos tumorales humanos .....</b>	<b>210</b>
<b>5.6 Estado de metilación del promotor de <i>MDGA1</i> y <i>MDGA2</i>.....</b>	<b>211</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>195</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>217</b>
<b>8. RECURSOS ELECTRÓNICOS .....</b>	<b>251</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>255</b>

## ABREVIATURAS

**CCR:** Cáncer colorrectal

**CE:** Cáncer de esófago

**CG:** Cáncer gástrico

**CNMP:** Cáncer no microcítico de pulmón

**ADN:** Ácido desoxiribonucleico

**KDa:** Kilodalton

**PCR:** *Polymerase Chain Reaction*

**qRT-PCR:** *Quantitative Real-Time PCR*

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero

**μm:** micras



# 1. INTRODUCCIÓN

---



## 1.1 Caracterización de los genes MDGA1 y MDGA2

### 1.1.1 Organización genómica de MDGA1

El gen *MDGA1* fue aislado por primera vez en nuestro laboratorio a partir de ADN genómico extraído de una muestra tumoral de un paciente con cáncer no microcítico de pulmón (CNMP), que fue amplificado mediante la técnica de AP-PCR (*Arbitrarily Primed PCR*) (De Juan et al., 1999). Esta técnica derivada de la PCR, que consiste en la amplificación de secuencias de ADN genómico utilizando cebadores arbitrarios, permitía obtener huellas de ADN (*DNA fingerprinting*) para los diferentes pacientes sometidos a este estudio. El análisis de estas huellas hizo posible la detección de alteraciones genómicas, tales como amplificaciones y pérdidas de expresión, en las secuencias de ADN de las muestras tumorales (Kohno et al., 1994; Okazaki et al., 1996; Peinado et al., 1992; Saitoh et al., 1998). De esta manera, fue posible detectar una secuencia de ADN que se encontraba amplificada de manera significativa en la muestra tumoral de un paciente con CNMP (De Juan et al., 1999).

Esta secuencia de ADN genómico, que en un principio se denominó F18, consistía en un fragmento de 600 pares de bases (pb) localizado en el brazo corto del cromosoma 6 en el locus 6p21.2. El análisis de esta región cromosómica reveló la proximidad del oncogen *pim-1*, que codifica para una serina/treonina quinasa que regula la supervivencia celular, diferenciación, proliferación, apoptosis y tumorigénesis (Bachmann and Möröy, 2005), y *p21WAF-1/CIP-1*, un gen regulado por p53 que inhibe las ciclinas dependientes de quinasas (Denicourt and Dowdy, 2004; el-Deiry et al., 1993).

Un análisis más detenido de la región de ADN donde se localizaba el fragmento F18, reveló que dicha secuencia se encontraba incluida en la región intrónica de un gen novel que hasta el momento no había sido caracterizado. La organización genómica de este gen, al que se denominó *MDGA1* (*MAM domain containing a glycosyl phosphatidylinoditol anchor 1*; Gene ID: 266727), se muestra en la figura 1.1 (De Juan et al., 2002).

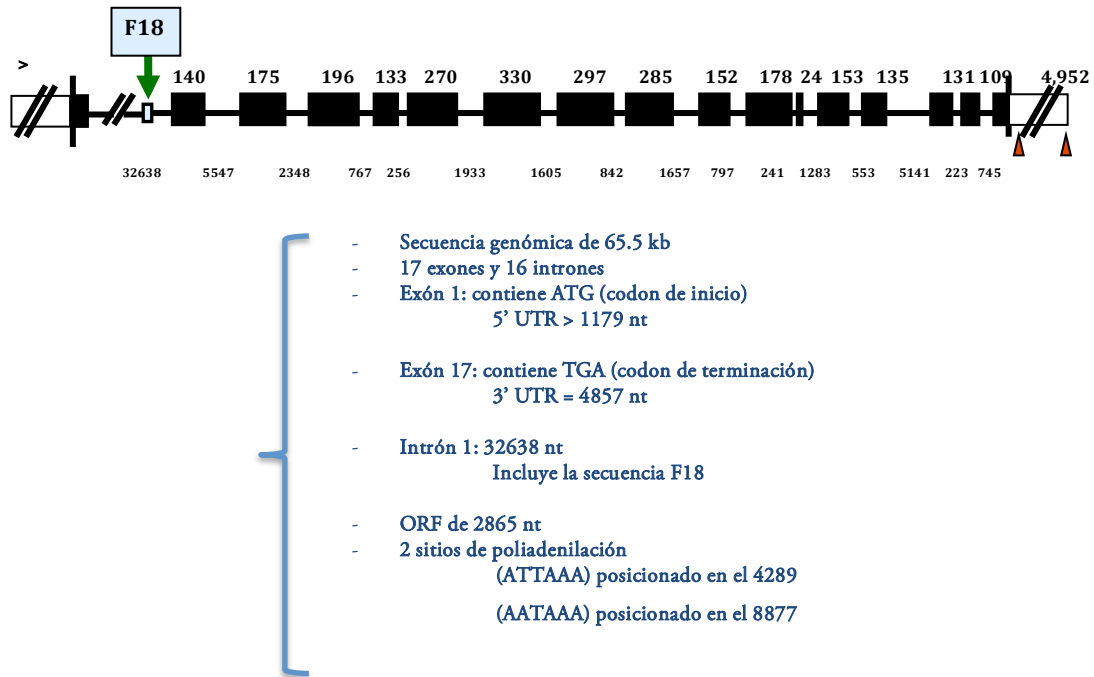


Figura 1.1. Organización genómica del gen *MDGA1*. Las cajas negras representan los exones con su tamaño (nt) indicado en la parte superior. Las cajas en blanco corresponden a las secuencias no traducidas (UTR). Las líneas horizontales corresponden a los intrones con su tamaño (nt) indicado en la parte inferior. Los codones ATG (exón 1) y TGA (Exón 17) se muestran como barras verticales y los triángulos indican las dos señales de poliadenilación.

### 1.1.2 Expresión del gen *MDGA1*

El patrón de expresión de *MDGA1* en tejidos no tumorales humanos y en líneas celulares tumorales humanas fue investigado en nuestro laboratorio mediante ensayos de *Northern blot*. Estos ensayos revelaron que en tejidos no tumorales humanos el gen se expresaba como un ARNm de 5 Kb en corazón, músculo esquelético y riñón, mientras que en cerebro se expresaba como un transcrito de 9.5 kb. Además, *MDGA1* se expresaba en diferentes líneas celulares tumorales humanas (leucemia linfoblástica, leucemia mieloide crónica, leucemia promielocítica, linfoma de Burkitt, adenocarcinoma colorrectal, carcinoma de pulmón y melanoma) como un ARNm de 5 kb (De Juan et al., 2002).

### 1.1.3 Organización genómica de MDGA2

El gen *MDGA1* presenta un gen homólogo localizado en el brazo largo del cromosoma 14 (14q21.3) denominado *MDGA2* (*MAM domain containing a glycosyl phosphatidylinoditol anchor 2*; Gene ID: 161357).

La organización genómica de *MDGA2* se muestra en la figura 1.2 (Díaz-López, 2007).

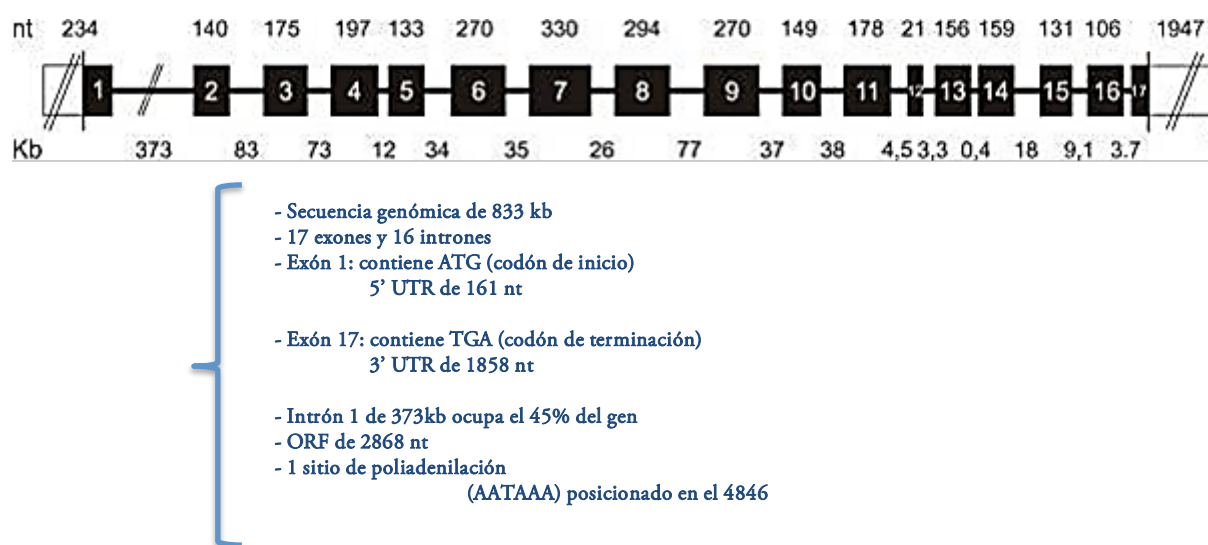


Figura 1.2. Organización genómica del gen *MDGA2*. Las cajas negras representan los exones con su tamaño (nt) indicado en la parte superior. Las cajas en blanco corresponden a las secuencias no traducidas (UTR). Las líneas horizontales corresponden a los intrones con su tamaño (nt) indicado en la parte inferior. Los codones ATG (Exón 1) y TGA (Exón 17) se muestran como barras verticales y el triángulo indica la única señal de poliadenilación.

### 1.1.4 Expresión del gen MDGA2

Al igual que con *MDGA1*, el análisis de expresión de *MDGA2* fue llevado a cabo en nuestro laboratorio mediante experimentos de *Northern blot*. En este caso, el estudio se realizó en tejidos humanos: fetales, tejidos no tumorales y en tumores primarios.

En los tejidos fetales analizados (cerebro, pulmón, hígado y riñón) el gen se expresaba como un ARNm de 5Kb. Además, en cerebro fetal se detectaron también dos ARNm de 7 y 9 kb. Así mismo, el gen *MDGA2* se expresó en todos los tejidos no

tumorales analizados (corazón, cerebro placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón y páncreas) y en todos los tumores primarios analizados (mama, ovario, útero, riñón, pulmón, estómago, colon y recto), en todos los casos como un transcrito de 5 kb (Díaz-López, 2007).

## 1.2 Caracterización de las proteínas MDGA1 y MDGA2

### 1.2.1 Estructura de las proteínas MDGA1 y MDGA2 humanas

El gen *MDGA1* codifica una proteína de 955 aminoácidos con un peso molecular de 140 KDa y un punto isoeléctrico de 8.65. Esta proteína presenta en el extremo N-terminal un péptido señal de 16 aminoácidos (PS) que conduce a la proteína por la vía de secreción hacia la membrana. A continuación la proteína presenta seis dominios inmunoglobulina (Ig), un dominio fibronectina tipo III (FNIII), un dominio MAM (meprina, antígeno A5, proteína tirosin fosfatasa  $\mu$ ,  $\kappa$ ), y un dominio C-terminal que contiene un sitio de anclaje a la membrana celular mediante un grupo glicosil fosfatidil inositol (GPI) (Figura 1.3) (De Juan et al., 2002).

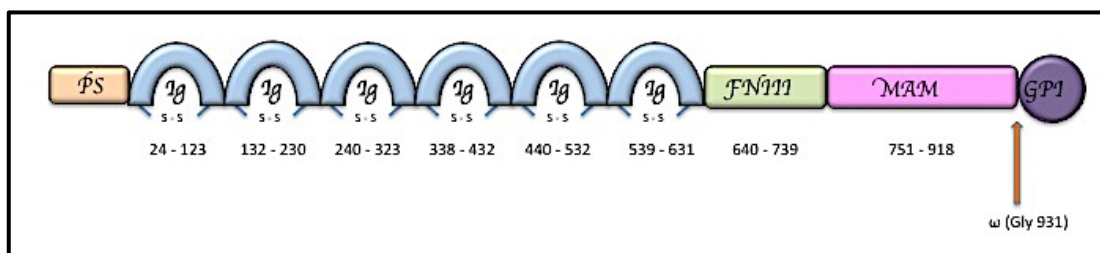


Figura 1.3. Representación esquemática de los dominios estructurales de MDGA1. Los números representan el rango de aminoácidos incluidos en cada uno de los dominios proteicos.

El gen *MDGA2* humano codifica una proteína de 956 aminoácidos, con un peso molecular de 135 KDa y un punto isoeléctrico de 6.88. Esta proteína presenta una organización estructural similar a la de MDGA1. MDGA2 posee en el extremo N-terminal un péptido señal de 20 aminoácidos (PS) seguido de seis dominios Ig, un dominio FNIII, un dominio MAM y un dominio C-terminal que contiene un sitio de anclaje a la membrana celular mediante un grupo GPI (Figura 1.4). El péptido

señal de MDGA1 y MDGA2, es necesario para la translocación de la proteína a través de las membranas del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, y la presencia de un grupo GPI permite el anclaje de las proteínas a la membrana celular.

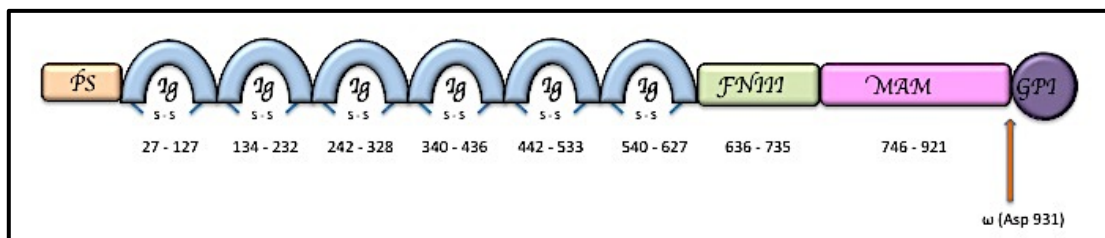


Figura 1.4. Representación esquemática de los dominios estructurales de MDGA2. Los números representan el rango de aminoácidos incluidos en cada uno de los dominios proteicos.

Además, se ha descrito que existen dos primeros exones alternativos para MDGA2, lo que resulta en dos isoformas diferentes de la proteína (956 o 727 aminoácidos). La primera isoforma está muy conservada ya que presenta una homología superior al 97% con sus genes ortólogos en otras especies de mamíferos como chimpancé, ratón, rata, caballo y perro (Hellquist et al., 2009).

Cabe destacar que aunque el alineamiento de los ARNm de ambos genes mostraba una ausencia de homología entre sus secuencias génicas, el alineamiento de sus secuencias proteicas mostraba un porcentaje de homología del 47% (Figura 1.5) (Díaz-López, 2007).

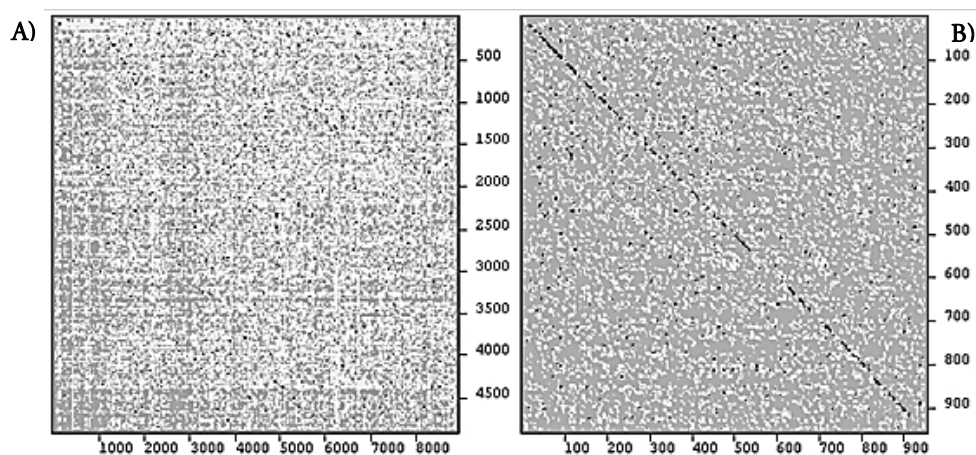


Figura 1.5. Representación gráfica del alineamiento de las secuencias de los ARNm (A) y de las secuencias proteicas (B) de MDGA1 y MDGA2. MDGA1 se representa en el eje de las X y MDGA2 en el eje de las Y en ambas gráficas.

Además, la información obtenida en la base de datos del Ensembl reveló se que ambas proteínas, MDGA1 y MDGA2, se encuentran altamente conservadas durante el transcurso de la evolución (Díaz-López, 2007) (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Relación de algunas de las especies en las que actualmente se conoce la secuencia completa de la proteína MDGA1 ó MDGA2 (Flicek et al., 2014).

ESPECIES ANIMALES	
MDGA1	MDGA2
<i>Homo sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
<i>Canis famimiliaris</i>	<i>Danio rerio</i>
<i>Bos taururs</i>	<i>Bos taurus</i>
<i>Pan troglodytes</i>	<i>Pan troglodytes</i>
<i>Macaca mulatta</i>	<i>Macaca mulatta</i>
<i>Mus musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>Gallus gallus</i>	<i>Gallus gallus</i>
<i>Monodelphis domestica</i>	<i>Monodelphis domestica</i>
<i>Fugu rubripes</i>	<i>Fugu rubripes</i>
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	<i>Tetraodon nigroviridis</i>
<i>Sus scrofa</i>	<i>Loxodonta africana</i>
	<i>Oryctogalus cuniculus</i>
	<i>Xenopus tropicalis</i>
	<i>Dasyopus novemcinctus</i>
	<i>Echinops telfairi</i>
	<i>Gasterosteus aculeatus</i>

### 1.2.2 Localización celular de MDGA1 y MDGA2

Los estudios de localización celular de las proteínas MDGA1 y MDGA2 fueron llevados a cabo mediante ensayos de transfección en células HeLa y Cos-7 con las construcciones pFLAG-MDGA1 y pFLAG-MDGA2, generadas en nuestro laboratorio (Díaz-López et al., 2005; Díaz-López, 2007). Una vez transfectadas, las células fueron marcadas mediante inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-FLAG. Estos ensayos permitieron detectar, mediante microscopía confocal, ambas proteínas en la membrana de las células en cultivo (Díaz-López et al., 2005; Díaz-López, 2007).

Además, se comprobó que la localización de ambas proteínas estaba restringida principalmente a unos microdominios de membrana conocidos como balsas lipídicas (*lipid rafts*) (Díaz-López et al., 2005; Díaz-López, 2007).

Posteriormente, la expresión de ambas proteínas en las células transfectadas fue confirmada mediante ensayos de *western-blot* utilizando los anticuerpos anti-FLAG y GP854. Estos ensayos revelaron la presencia de tres bandas proteicas de tamaño aproximado de 140 KDa, 115 KDa y 106 KDa para MDGA1, y de una única banda proteica de 135 KDa en el caso de MDGA2 (Díaz-López et al., 2005; Díaz-López, 2007).

### **1.2.3 Anclaje de MDGA1 y MDGA2 a la membrana celular mediante un grupo Glicosil Fosfatidil Inositol (GPI)**

El anclaje de las proteínas MDGA1 y MDGA2 a la membrana celular mediante un grupo GPI se confirmó mediante dos tipos de ensayos. Por un lado, las células HeLa fueron transfectadas con las construcciones pFLAG-MDGA1 o pFLAG-MDGA2, y con las construcciones pFLAG-(MDGA1  $\Delta$ GPI) o pFLAG-(MDGA2  $\Delta$ GPI). Estas últimas construcciones ( $\Delta$ GPI) carecían de la secuencia de reconocimiento de anclaje GPI.

Por otro lado, se realizaron ensayos en los que las células transfectadas con pFLAG-MDGA1 o pFLAG-MDGA2 eran tratadas con la enzima fosfolipasa C (PI-PLC) de *Bacillus cereus*. Esta enzima hidroliza las proteínas GPI liberando al medio una forma soluble que carece de anclaje a la membrana. Posteriormente, las células transfectadas fueron marcadas mediante inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-FLAG.

Ambos ensayos revelaron la presencia de MDGA1 y MDGA2 en la membrana de las células transfectadas con pFLAG-MDGA1 o pFLAG-MDGA2 que no habían sido tratadas con PI-PLC. Por el contrario, ninguna de estas proteínas fue detectada en la membrana de las células transfectadas con pFLAG-(MDGA1  $\Delta$ GPI) o

pFLAG-(MDGA2  $\Delta$ GPI). Así mismo, ninguna de estas proteínas fue detectada en la membrana de las células transfectadas con pFLAG-MDGA1 o pFLAG-MDGA2 que fueron tratadas posteriormente con PI-PLC. Sin embargo, en este último caso, las proteínas MDGA1 y MDGA2 fueron detectadas como formas solubles en el sobrenadante del medio de cultivo de estas células mediante ensayos de inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-FLAG.

### ***1.2.4 Glicosilación de MDGA1 y MDGA2***

La glicosilación es una modificación postraduccional muy común en las proteínas de la vía de secreción. Esta modificación se produce principalmente durante el transporte de la proteína a través del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (Lowe and Marth, 2003) hacia la membrana de la célula. Existen dos tipos de glicosilación: la N-glicosilación, en la que los residuos de azúcar se unen covalentemente a asparagina (Lam et al., 2013), y la O-glicosilación, en la que los residuos de azúcar se unen covalentemente a los aminoácidos serina/treonina (Julenius, 2004).

El estudio de glicosilación de MDGA1 reveló que esta proteína contenía nueve posibles puntos de N-glicosilación y un punto de O-glicosilación. El tratamiento con tunicamicina (un antibiótico que inhibe la N-glicosilación de las proteínas) mostró que las células transfectadas con pFLAG-MDGA1 experimentaban un descenso en el tamaño de la proteína de 140 KDa a 125 KDa, indicando que la proteína estaba N-glicosilada (Díaz-López, 2007).

Por otra parte, en el caso de MDGA2 el análisis de glicosilación reveló la existencia de ocho posibles puntos de N-glicosilación y un punto de O-glicosilación. Un estudio similar al realizado con MDGA1 mostró que el tratamiento con tunicamicina también producía un descenso en el tamaño de MDGA2 de 135 KDa a 115 KDa, lo que indicaba que también se trataba de una glicoproteína (Díaz-López, 2007).

### **1.2.5 Función de las proteínas MDGA1 y MDGA2**

La presencia en la secuencia proteica de MDGA1 y MDGA2 de dominios estructurales (Ig, FNIII, MAM y GPI) que se encuentran presentes en diversos tipos de moléculas de adhesión, llevó a postular un posible papel de ambas proteínas relacionado con la adhesión celular.

Se ha postulado que MDGA1 podría formar parte de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig). Sus características estructurales la convierten en una proteína única pues se trata de la primera molécula de la superfamilia de las Ig conteniendo un anclaje GPI a la membrana y un dominio de adhesión MAM. Se han caracterizado diversas proteínas de la superfamilia de las Ig con anclaje a membrana mediante un grupo GPI implicadas en una gran variedad de interacciones específicas célula-célula y/o migración (Haenisch et al., 2005; Ilantzis et al., 1997; Kim et al., 1992; Peck and Walsh, 1993; Pimenta et al., 1996; Wilson et al., 1996; Yoshihara et al., 1994). Además la presencia del dominio MAM y/o los dominios Ig le confieren a MDGA1 la capacidad de poder interactuar con otras proteínas a través de interacciones homofílicas o heterofílicas (Cismasiu, 2004; Fujimura et al., 2006; Litwack et al., 2004).

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado una posible implicación de la proteína MDGA1 en migración y adhesión celular, produciendo un incremento tanto en la capacidad migratoria como en la capacidad de adhesión célula-célula de células MDCK en cultivo que expresan esta proteína (Díaz-López et al., 2010).

### 1.3 MDGAs y enfermedad

Recientemente se ha observado que las anomalías en la citoarquitectura y funcionalidad cerebral presentes en pacientes con desórdenes mentales podría deberse a una migración neuronal aberrante influenciada por diversas moléculas de adhesión celular (CAMs) (Li et al., 2010). Estas moléculas se encuentran implicadas en multitud de procesos de transducción de señales que son importantes para la migración y adhesión celular y el crecimiento axonal, que son necesarios para una correcta conectividad y plasticidad sináptica asociada al aprendizaje y la memoria (Panicker et al., 2003). Además, las CAMs juegan un papel significativo en la interacción entre las neuronas que están migrando y los procesos gliales (Takeuchi, 2006). En este sentido, se ha comprobado que en el desarrollo del sistema nervioso la migración neuronal y el crecimiento axonal son esenciales (Litwack et al., 2004).

Se han identificado más de 100 miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, muchos de ellos implicados en la migración celular, diferenciación y crecimiento axonal (Brümmendorf and Lemmon, 2001; Crossin and Krushel, 2000; Kamiguchi and Lemmon, 2000; Peck and Walsh, 1993; Walsh and Doherty, 1997). Litwack et al. demostraron por primera vez que las proteínas MDGA1 y MDGA2 tienen un importante papel en el desarrollo del sistema nervioso de ratón, participando en el control de la adhesión neuronal, migración y crecimiento axonal (Litwack et al., 2004). Además estas funciones son reforzadas por el hecho de que las proteínas MDGAs presentan una similitud estructural importante con otras proteínas localizadas en los axones y que regulan el crecimiento axonal en el sistema nervioso como LAMP, L1/NgCAM/NrCAM, TAG1/Axonina 1 y Contactina/F3/F11 (Berglund et al., 1999; Cohen et al., 1998; Dahme et al., 1997; Kamiguchi and Lemmon, 2000; Walsh and Doherty, 1997).

En los últimos años se han realizado estudios que demuestran la expresión de las proteínas MDGAs principalmente en sistema nervioso. Además, en estos estudios se ha postulado que alteraciones en la expresión de estas proteínas podrían estar relacionadas con diferentes enfermedades del sistema nervioso como Alzheimer,

desórdenes bipolares, autismo y esquizofrenia (Kurose et al., 2012; Lee et al., 2013; Li et al., 2010; Pettem et al., 2013).

### **1.3.1 Implicación de MDGA1 en esquizofrenia**

Diversos estudios indican que MDGA1 se expresa predominantemente durante el desarrollo del sistema nervioso central y periférico de rata y ratón (Litwack et al., 2004; Takeuchi, 2006; Takeuchi et al., 2007), interaccionando con las regiones ricas en axones principalmente a través de su dominio MAM (Fujimura et al., 2006). Takeuchi *et al.* demuestran que MDGA1 afecta a la migración radial de las células neuronales de la placa cortical de ratón (Takeuchi, 2006; Takeuchi et al., 2007). Por otro lado, se ha descrito que el gen *MDGA1* está localizado en el cromosoma 6p21, dentro de la región asociada a la esquizofrenia 6p22.3-p21.1. Esto llevó a Li *et al.* a sugerir una posible asociación entre el gen *MDGA1* y la esquizofrenia y desorden bipolar en población china. En este trabajo se demuestra que polimorfismos de un único nucleótido intrónico en *MDGA1* está ligado a esquizofrenia (Li et al., 2010).

### **1.3.2 Implicación de MDGA1 y MDGA2 en autismo**

Estudios genéticos recientes implican a una gran cantidad de moléculas de adhesión sinápticas y a las proteínas a las que se unen, en autismo y esquizofrenia (Betancur et al., 2009; Bourgeron, 2009). Entre estas proteínas se encuentran las neurexinas y neuroliginas, que son las moléculas de adhesión sinápticas más extensamente estudiadas (Südhof, 2008). Estas moléculas no son imprescindibles para el establecimiento inicial de la sinapsis, pero actúan de manera isoforma-dependiente para especificar la maduración de la sinapsis a inhibitoria o excitatoria. En roedores existen 4 tipos de neuroliginas que presentan diferente función y localización sináptica (Südhof, 2008). De todas ellas, la neuroligina 2 (NL2) ha cobrado una especial importancia por su localización en sinapsis inhibitoria (Varoqueaux et al., 2004). Todas las neuroliginas probablemente median actividades promotoras de sinapsis a través de interacciones directas con neurexinas presinápticas, pero también

pueden desarrollar funciones de validación de sinapsis de forma independiente a la unión a neurexinas (Ko et al., 2009).

Las moléculas MDGAs se encuentran altamente expresadas en los *basilar pons*, aunque MDGA1 además está altamente expresada en las capas de la superficie cortical, el hipocampo, amígdala, tálamo, bulbo olfatorio y cerebelo (Litwack et al., 2004). Al igual que otros miembros de la familia de las Ig como CADM-1 y LRFN5, las proteínas MDGAs podrían tener una función en la regulación del desarrollo de la sinapsis (Figura 1.11). Pettem *et al.* demostraron que las moléculas MDGAs se unen a NL2 a través de los tres primeros dominios Ig, impidiendo así la unión de NL2 a neurexina1 (NX1). De este modo, se podría considerar que MDGA1 es un regulador negativo de la función sinaptogénica de NL2. Estos resultados revelan que MDGA1 es un supresor del desarrollo de la sinapsis inhibitoria y postula la unión de las MDGAs a las vías sinápticas implicadas en autismo y esquizofrenia (Pettem et al., 2013).

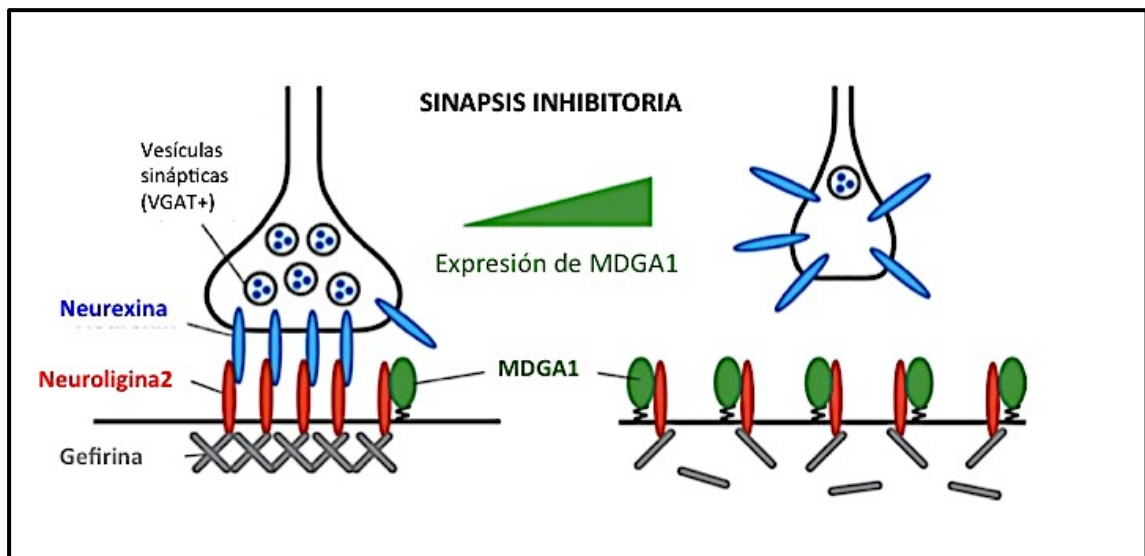


Figura 1.11. Modelo de cómo MDGA1 podría suprimir el desarrollo de la sinapsis inhibitoria. MDGA1 se une a NL2 inhibiendo su interacción con NX. Altos niveles de MDGA1 en neuronas podría inhibir la formación de la sinapsis inhibitoria o desestabilizar la misma, produciendo finalmente una reducción de la densidad de la sinapsis inhibitoria (Pettem et al., 2013).

Además, se han descrito algunas variantes truncadas de MDGA2 asociadas a casos de autismo (Bucan et al., 2009).

### 1.3..3 MDGA2 y disfunción sexual

Recientemente se ha encontrado una asociación entre determinados polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) de *MDGA2* y la disfunción sexual inducida por inhibidores selectivos de la reabsorción de serotonina (SSRIs) ó inhibidores de la reabsorción de serotonina-noradrenalina (SNRIs).

Kurose *et al.* demostraron una asociación significativa entre variaciones genéticas y disfunción sexual inducida por SSRI/SNRI. Genotiparon 200 pacientes japoneses que sufrían depresión, y encontraron 16 polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) que estaban significativamente asociados a disfunción sexual inducida por SSRI/SNRI. De estos 16 SNPs, 11 (69%) se localizaban en el primer intrón de *MDGA2*. Además se observó que esta asociación con los SNPs de *MDGA2* era independiente del sexo y la edad. Así mismo, estos autores postulan la posibilidad de que estos SNPs afecten a la expresión génica o función de la proteína, que resulte en una disfunción sexual por SSRI/SNRI (Kurose et al., 2012).

### 1.3.4 MDGA2 y Lupus eritematoso sistémico

El lupus eritematoso sistémico es una enfermedad autoinmune multisistémica caracterizada por la producción de anticuerpos, la formación de complejos inmunes y la consiguiente inflamación en múltiples órganos como piel, articulaciones, riñón y corazón. Aunque los mecanismos patogénicos de esta enfermedad no se conocen completamente, se ha comprobado que tanto factores ambientales como genéticos juegan un importante papel en el inicio y progresión de la enfermedad (Deapen et al., 1992; Hochberg, 1987; Molina and Shoenfeld, 2005). En los últimos años se ha encontrado una asociación entre varios loci y esta enfermedad (Criswell, 2008; Harley et al., 2009; 2006; Rhodes and Vyse, 2008; Rullo and Tsao, 2013; Tsao, 2004). En particular, Hellquist *et al.*, demostraron que el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) rs961616 localizado en la región intrónica de *MDGA2* se encontraba significativamente asociado con el riesgo de padecer lupus eritematoso sistémico en la población europea (Hellquist et al., 2009).

## 1.4 Adhesión celular

La adhesión celular desempeña un papel esencial en la organización tisular y en la correcta funcionalidad fisiológica de los tejidos y órganos, estableciendo uniones estables de tipo célula-célula y célula-matriz extracelular. Las unidades funcionales implicadas en la adhesión celular suelen ser complejos multiproteicos compuestos por tres clases de proteínas: las moléculas de adhesión celular (CAMs), las proteínas de la matriz extracelular (ECM), y las proteínas de la placa citoplásmica y proteínas de la membrana.

Las moléculas de adhesión celular generalmente son glicoproteínas transmembrana que median uniones con otras moléculas de adhesión de células adyacentes o con proteínas de la matriz extracelular, y determinan la especificidad del reconocimiento célula-célula y célula-ECM. En este grupo estarían incluidos miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, integrinas, cadherinas y selectinas.

Las proteínas de la matriz extracelular son generalmente glicoproteínas de gran tamaño como colágeno, fibronectina, laminina y proteoglicanos que se asocian formando fibras u otros complejos macromoleculares.

En la cara intracelular de la membrana plasmática, las moléculas de adhesión se encuentran asociadas a proteínas de la placa citoplásmica o a proteínas de la membrana. Las proteínas de la placa citoplásmica establecen un puente de unión entre el complejo de adhesión y el citoesqueleto y están implicadas en la regulación de las funciones de las moléculas de adhesión y en la transducción de señales iniciadas en la superficie celular por las moléculas de adhesión (Gumbiner, 1996).

### 1.4.1 Uniones célula-célula

Existen 4 tipos de estructuras de adhesión célula-célula: desmosomas, uniones adherentes, uniones estrechas u oclusivas y uniones comunicantes o *gap junctions* (Figura 1.12).

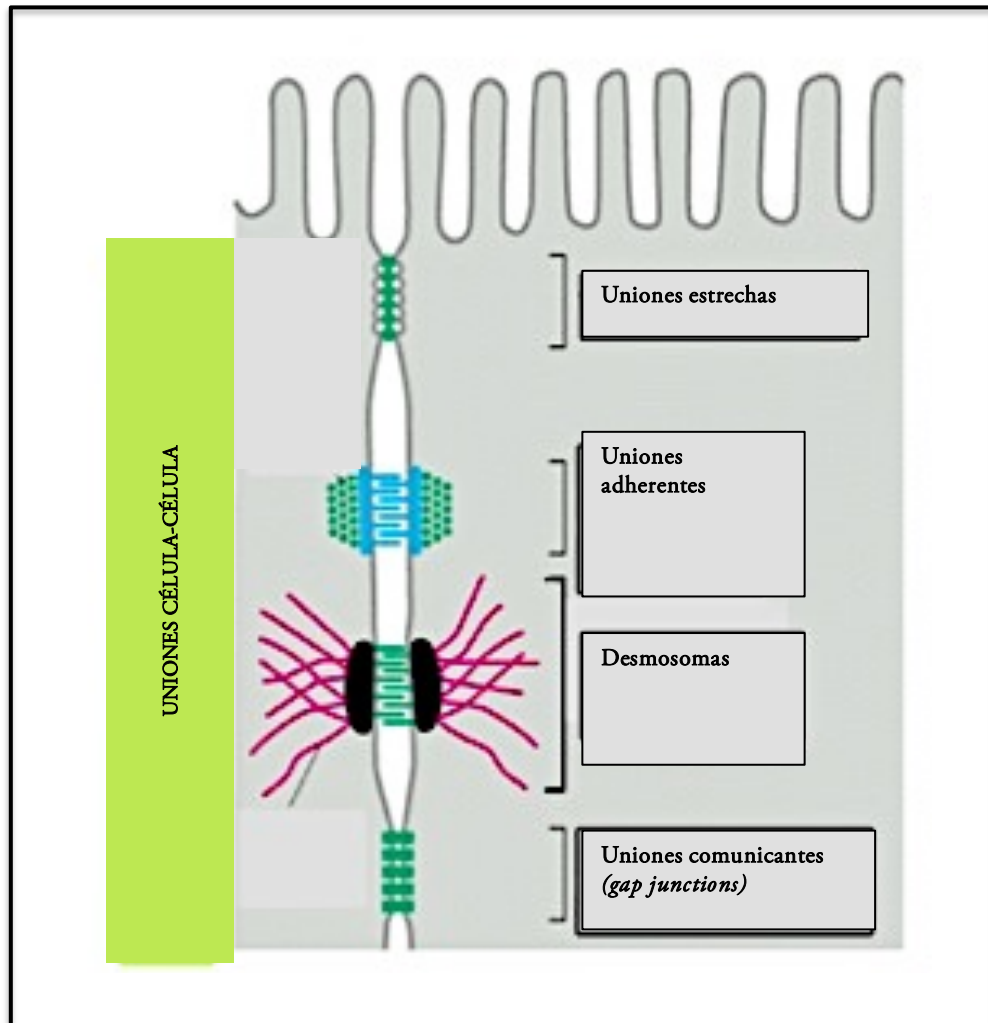


Figura 1.12. Representación esquemática de los diferentes tipos de estructuras de adhesión célula-célula.

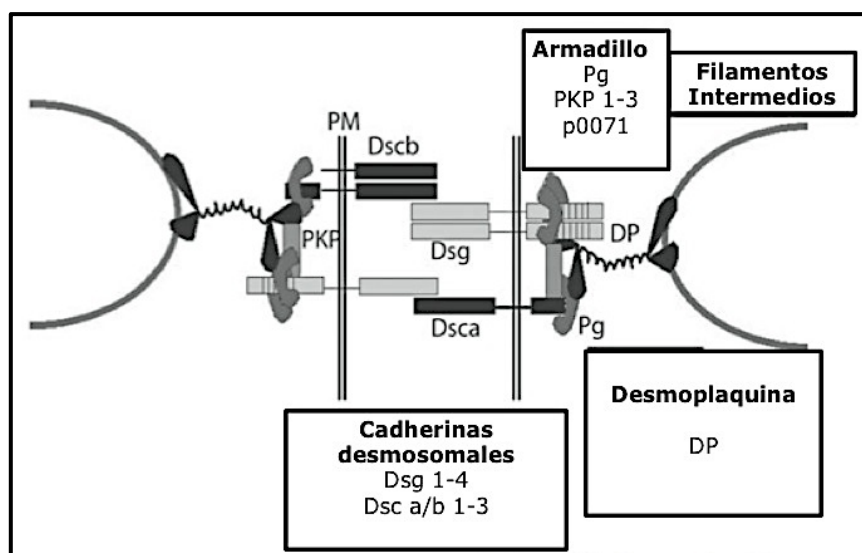
La tabla 1.2 resume los diferentes tipos de uniones célula-célula, los tejidos en los que aparecen y las proteínas implicadas.

**Tabla 1.2.** Componentes moleculares constitutivos de los principales tipos de uniones homotípicas. Adaptado de (Franke, 2009).

	Localización	Filamentos asociados	Proteínas transmembrana y glicoproteínas	Proteínas específicas de la placa
<b>Desmosomas</b>	Células epiteliales, Varios tipos de cardiomiocitos, Células meningoteliales, Células dendríticas del timo, Folicúlos linfoides	Filamentos intermedios (queratina, vimentina, desmina)	Cadherinas desmosomales (Desmogleinas 1-4 (Dsg 1-4) Desmocolina 1-3 (Dsc 1-3)	Placoglobina (Pg) Desmoplaquina I/II (DP I/II) Placofilinas 1-3 (PKP 1-3)
<b>Uniones adherentes</b>	Células epiteliales, Células endoteliales, Varios tipos de cardiomiocitos, Células mesenquimales, Células neurales.	Microfilamentos (actina)	Cadherinas clásicas (E-cadherina, N-cadherina, P-cadherina, VE-cadherina, Cadherina 11) Nectinas 1-4	$\alpha$ - y $\beta$ -catenina, Placoglobina ó $\gamma$ -catenina, p120 ( $\delta$ -catenina), Proteína ARVCF, Proteína p0071, Placofilina-2, ZO-1, ZO-2 y ZO-3 Afadina
<b>Uniones estrechas</b>	Células epiteliales, Células endoteliales	-	Ocludina, Claudina 1-24, Tricelulina, Proteínas del grupo JAM, CAR, ESAM	ZO-1, ZO-2 y ZO-3, Cingulina
<b>Uniones comunicantes</b>	Todo tipo de células capaces de formar tejidos	-	Conexinas 1-21	ZO-1, ZO-2 Y ZO-3

### 1.4.1.1 Desmosomas

De entre todas las estructuras de adhesión célula-célula, los desmosomas son probablemente las que establecen un acoplamiento mecánico más fuerte. Su elevada fuerza de adhesión se basa en las múltiples interacciones no covalentes entre sus componentes moleculares (Holthöfer et al., 2007). La estructura básica de los desmosomas está constituida por proteínas pertenecientes a 3 tipos de familias. El componente transmembrana de los desmosomas incluye miembros de la superfamilia de las moléculas de adhesión celular dependientes de calcio (CAMs), conocidas como cadherinas desmosomales: desmogleinas (Dsg) y desmocolininas (Dsc). Otro tipo de proteínas de los desmosomas son aquellas relacionadas estructuralmente con la superfamilia de las proteínas armadillo, que incluyen la placoglobina (Pg) y las placofilinas (PKP) (tabla 1.2). Estas proteínas interaccionan directamente con los dominios citoplásmicos de las cadherinas desmosomales. Y por último las proteínas de la familia de las plaquinas, y en particular la desmoplaquina (DP), que proporcionan el vínculo de unión estructural de los desmosomas con los filamentos intermedios (queratina, vismentina y desmina) (Getsios et al., 2005; Harmon and Green, 2013; Holthöfer et al., 2007) (Figuras 1.13 y 1.14).



**Figura 1.13.** Modelo molecular de un desmosoma. Las cadherinas desmosomales interactúan unas con otras, y mediante sus dominios citoplásmicos interactúan con otros miembros de la familia de las proteínas armadillo. Las desmoplaquinas son capaces de unir estos complejos de membrana a los filamentos intermedios. Adaptado de Getsios *et al.* (2005). PM= membrana plasmática

- Cadherinas desmosomales

Las cadherinas desmosomales se pueden subdividir en desmogleinas (Dsg) y desmocolininas (Dsc). Se han identificado 4 isoformas humanas de Dsg y 3 isoformas humanas de Dsc. Por *splicing* alternativo resultan además dos

isoformas distintas de Dsc: isoforma a y b, que contienen un dominio citoplasmático más corto.

Su estructura es muy similar a la de las cadherinas clásicas. Poseen cinco ectodominios: 4 dominios cadherina (EC1-EC4) y un dominio más próximo a la membrana (EA). El dominio EC1 presenta secuencias peptídicas cortas de reconocimiento de adhesión celular (CAR) específicos para las diferentes isoformas de las Dsg y Dsc. Además presentan un dominio citoplásmico que interacciona con placoglobina (Pg) y placofilinas (PKP) (Getsios et al., 2005; Harmon and Green, 2013).

- Proteínas armadillo

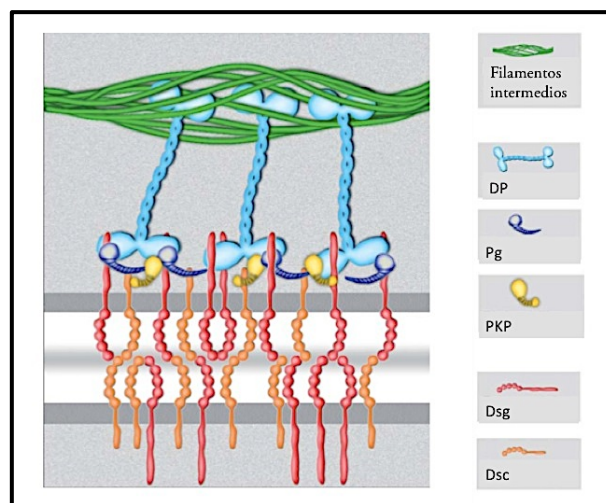
Las proteínas armadillo sirven como nexo de unión entre las cadherinas desmosomales y los filamentos intermedios, a los que se unen por medio de la desmoplaquina. Se cree que estas proteínas desempeñan doble papel. Por un lado favorecen el agrupamiento de los complejos de adhesión en la membrana plasmática proporcionando una unión indirecta al citoesqueleto a través de los filamentos intermedios. Por otro lado también podrían estar implicadas en las vías de señalización intracelular. La **placoglobina** (Pg) presenta 12 dominios repetitivos que están organizados formando una superhélice con carga positiva. Es capaz de unirse a las cadherinas desmosomales o a las cadherinas clásicas y por ello puede localizarse en los desmosomas o en las uniones adherentes. Además sirve de nexo de unión entre las cadherinas desmosomales y los filamentos intermedios mediante la interacción con desmoplaquina y otras proteínas armadillo como las **placofilinas** 2 y 3 (PKP). Las tres PKPs (PKP1-3) y p0071 (también conocida como PKP4), son miembros de la subfamilia de la p120-catenina. Se trata de proteínas caracterizadas por tener 10 dominios repetitivos y un extremo N-terminal fundamental para la unión con las proteínas desmosomales. PKP1 se une a Dsg1, desmoplaquina (DP) y filamentos intermedios, pero no con Pg. El papel de las PKPs consiste en reclutar DP en los desmosomas incrementando la expresión de las proteínas desmosomales mediante la estabilización de los complejos desmosomales. Por otra parte, p0071 está más íntimamente relacionado con p120-catenina. p0071 es capaz de interactuar con Dsc3a,

Pg y DP. Parece ser que esta proteína sirve también como plataforma de reclutamiento de moléculas de señalización a los complejos de adhesión (Getsios et al., 2005; Harmon and Green, 2013).

- Plaquinias

Las plaquinias son los mediadores moleculares que unen los desmosomas con los filamentos intermedios. La **desmoplaquina** (DP) es el componente más abundante de los desmosomas y existe en dos isoformas derivadas de un *splicing* alternativo del gen (DP I/II). Estudios bioquímicos sugieren que la DP forma homodímeros originando una  $\alpha$ -hélice central con dos terminaciones globulares en los extremos N-terminal y C-terminal. El dominio N-terminal de la DP interacciona con las proteínas armadillo y con las cadherinas desmosomales, mientras que el dominio C-terminal permite la unión directa a los filamentos intermedios (Figura 1.13 y Figura 1.14).

La DP es fundamental en el mantenimiento de la integridad mecánica de los tejidos *in vivo*. De hecho, se ha comprobado que la delección del gen de la DP en ratones produce una letalidad embrionaria temprana. Además, la ausencia de DP origina anomalías en las uniones adherentes, sugiriendo que los procesos regulados por DP en los desmosomas tiene una influencia directa en la maduración de las uniones adherentes (Getsios et al., 2005; Holthöfer et al., 2007).



**Figura 1.14.** Detalle de la organización de los diferentes componentes moleculares que conforman los desmosomas. Adaptado de Holthöfer *et al.* (2007).

### 1.4.1.2 Uniones adherentes

Las uniones adherentes son las estructuras de adhesión más conservadas a lo largo de la evolución. Además, constituyen el tipo de unión más abundante en los tejidos de mamíferos, donde adoptan diferentes formas como *zonulae adherens* en epitelios polarizados, *fasciae adherens* en músculo cardíaco o *puncta adherens* en células mesenquimales y neuronales (Franke, 2009; Ivanov and Naydenov, 2013).

Las uniones adherentes cumplen múltiples funciones entre las que se encuentran la iniciación y estabilización de las adhesiones célula-célula, el control de proliferación y motilidad celular, la regulación de la polaridad y diferenciación celular, la regulación del citoesqueleto de actina, la señalización intracelular y la regulación transcripcional. Este tipo de uniones implican interacciones entre glicoproteínas transmembrana de la superfamilia de las cadherinas clásicas, y miembros de la familia de las cateninas como  $\beta$ -catenina, placoglobina,  $\alpha$ -catenina y p120-catenina (Figura 1.15). Todas estas proteínas controlan la formación, mantenimiento y función de las uniones adherentes (Hartsock and Nelson, 2008; Ivanov and Naydenov, 2013).

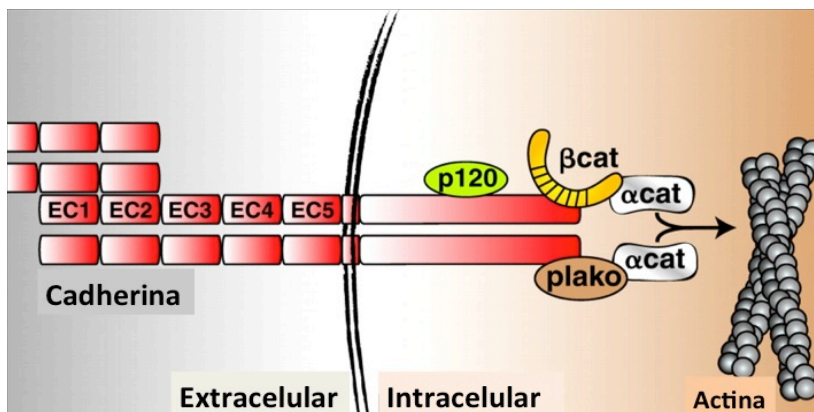


Figura 1.15. Detalle de la organización de los diferentes componentes moleculares implicados en las uniones adherentes. Plako = placoglobina (Pg) Adaptado de Dejana E. *et al.*, (2008).

- Cadherinas clásicas

Las cadherinas clásicas son las principales proteínas transmembrana que participan en las uniones adherentes y son las responsables de las uniones célula-célula a través del emparejamiento con cadherinas de células adyacentes. Las cadherinas clásicas se unen directa o indirectamente a proteínas citoplásmicas de la familia de las cateninas, entre las que se

encuentran la  $\alpha$  y  $\beta$  catenina, placoglobina o  $\gamma$ -catenina y p120 catenina o  $\delta$ -catenina. Estas proteínas regulan localmente la organización del citoesqueleto de actina, la estabilidad de las cadherinas y están implicadas en las vías de señalización intracelular que controlan la migración y diferenciación celular y la vía Wnt no canónica (Hartsock and Nelson, 2008; Perez-Moreno and Fuchs, 2006). Existen diferentes tipos de cadherinas clásicas que reciben su nombre en función del tejido en el que se expresan predominantemente: E-cadherina (epitelial), VE-cadherina (endotelio vascular), N-cadherina (neural), P-cadherina (placenta) (Ivanov and Naydenov, 2013).

Las uniones mediadas por las cadherinas clásicas son calcio-dependientes. En su estructura presentan un dominio extracelular que consta de 5 subunidades denominadas repeticiones de cadherinas EC (EC1-EC5) cada una de las cuales presenta secuencias de unión a calcio. La unión de este catión es fundamental para que el dominio extracelular de la cadherina adopte la conformación correcta que haga posible la unión y agregación de las cadherinas (Hartsock and Nelson, 2008; Ivanov and Naydenov, 2013). El dominio citoplásmico se puede dividir en dos partes: el dominio juxtamembrana (JMD) que interacciona con p120-catenina y está próximo al dominio transmembrana, y el dominio C-terminal (CBD) de unión a  $\beta$ -catenina o a placoglobina de manera excluyente (Ivanov and Naydenov, 2013).

- $\beta$ -catenina

Es una proteína de la familia de las proteínas armadillo que interacciona con el dominio C-terminal de las cadherinas y con  $\alpha$ -catenina. La  $\beta$ -catenina es regulada por fosforilación y juega un papel importante como co-activador transcripcional de la vía Wnt. Cuando la  $\beta$ -catenina es fosforilada por las quinasas CKII o GSK3 $\beta$  en los residuos serina S684, S686, S692, incrementa su afinidad por la cadherina. Sin embargo, cuando es fosforilada por las tirosina-quininas Src, Fer o Abl EGFR en un residuo tirosina (Y489 o Y654), se promueve su disociación con cadherina y la fosforilación de la tirosina Y142 favorece la unión de BCL9-2 que promueve la translocación de  $\beta$ -

catenina al núcleo y la inducción de la transcripción de determinados genes como Ciclina D1 y c-Myc (Brembeck et al., 2004; Kikuchi et al., 2007; Logan and Nusse, 2004; Nelson, 2008).

La  $\beta$ -catenina es capaz de incrementar las adhesiones mediadas por cadherina principalmente mediante dos mecanismos: la regulación del tránsito de cadherina desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi para finalizar en la membrana plasmática, ó mediante la estabilización de la cadherina en la membrana plasmática a través del reclutamiento de  $\alpha$ -catenina a las uniones adherentes (Hartsock and Nelson, 2008; Ivanov and Naydenov, 2013).

- p120-catenina

p120-catenina es una proteína de la familia de las proteínas armadillo que juega un importante papel en la estabilidad y dinámica de las cadherinas clásicas. Existen 4 isoformas de p120-catenina que son el resultado de diferentes transformaciones postraduccionales o diferentes puntos internos de traducción. p120-catenina se une a las cadherinas clásicas en el dominio juxtamembrana y se cree que estabiliza a las cadherinas en la membrana plasmática durante la formación de las uniones célula-célula, mediante la inhibición de la endocitosis de las cadherinas y la promoción de la exocitosis de las cadherinas unidas a p120-catenina. En estudios anteriores se ha establecido que p120-catenina puede estar regulado por fosforilación, ya que disminuye su afinidad por cadherina cuando se encuentra fosforilada en residuos de tirosina (Mariner et al., 2001; McLachlan and Yap, 2007).

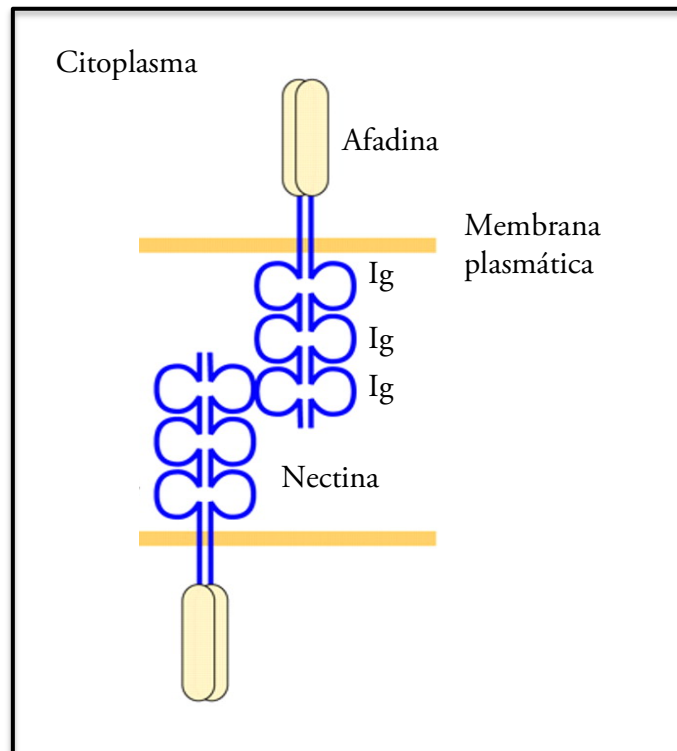
Además, p120-catenina también funciona como un regulador de la motilidad e invasividad celular. Se ha comprobado que la sobre-expresión de p120-catenina en fibroblastos y células MDCK incrementa las extensiones de membrana y la migración celular. Estos efectos se correlacionan con un incremento en la actividad de las proteínas Rho GTPasas Rac y Cdc42. Por otro lado, p120-catenina podría regular también la motilidad celular y la invasividad mediante la inhibición de RhoA (Hartsock and Nelson, 2008; Ivanov and Naydenov, 2013).

- $\alpha$ -catenina

La  $\alpha$ -catenina es el vínculo de unión del complejo cadherina- $\beta$ -catenina con el citoesqueleto de actina. La  $\alpha$ -catenina puede encontrarse en un estado monomérico u homodimérico. La  $\alpha$ -catenina en estado monomérico se encuentra libre en el citoplasma o unida al complejo cadherina- $\beta$ -catenina, mientras que en estado homodimérico se encuentra unida a los filamentos de actina. Se cree que la interacción entre  $\alpha$ - y  $\beta$ -catenina puede estar regulada por fosforilación ya que la fosforilación de la tirosina 148 de la  $\alpha$ -catenina incrementa la unión a  $\beta$ -catenina (Hartsock and Nelson, 2008).

- Nectinas

Además de las cadherinas, las nectinas constituyen uno de los componentes clave de las uniones adherentes. En mamíferos, la familia de las nectinas está formada por cuatro miembros diferentes: nectinas 1-4. Su estructura consiste en tres dominios inmunoglobulina extracelulares, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático (Figura 1.16). A pesar de que las cadherinas y las nectinas están implicadas en el ensamblaje y mantenimiento de las uniones adherentes, existen varias diferencias fundamentales entre estas proteínas. Las nectinas no unen calcio, por lo que generan uniones adherentes célula-célula independientes de calcio; pueden formar uniones homofílicas o heterofílicas pero presentan una mayor afinidad por las uniones heterofílicas; y las adhesiones mediadas por las nectinas presentan una mayor afinidad que las uniones mediadas por cadherinas. Las nectinas suelen encontrarse unidas a afadina, una proteína que presenta un dominio de unión a actina y que sirve como nexo de unión de las nectinas con una gran cantidad de proteínas citosólicas como  $\alpha$ -catenina, vinculina y ZO1 (Indra et al., 2014; Ivanov and Naydenov, 2013).



**Figura 1.16.** Modelo esquemático de la estructura de las nectinas y la formación del complejo nectina-afadina. Inmunoglobulina = Ig. Modificado de(Kanzaki et al., 2008).

### 1.4.1.3 Uniones estrechas

Las uniones estrechas se localizan principalmente en células epiteliales y endoteliales. Este tipo de uniones presentan fundamentalmente dos funciones: impedir que se produzca la mezcla de las proteínas de membrana entre la membrana apical y basolateral, y permitir que tenga lugar el paso de iones y solutos entre las dos células implicadas en la unión intercelular a través del espacio paracelular. Las uniones estrechas contienen dos tipos de proteínas transmembrana, las ocludinas y las claudinas, que son las que confieren estas funciones, además de otras proteínas (trielulina y proteínas del grupo JAM, CAR, ESAM) (Tabla 1.2). Además, en las uniones estrechas están presentes proteínas de la placa citoplasmática que conectan estas estructuras con los filamentos de actina (ZO 1-3, cingulina) y con las uniones adherentes (ZO 1-3) (Ding et al., 2013; Hartsock and Nelson, 2008) (Figura 1.17).

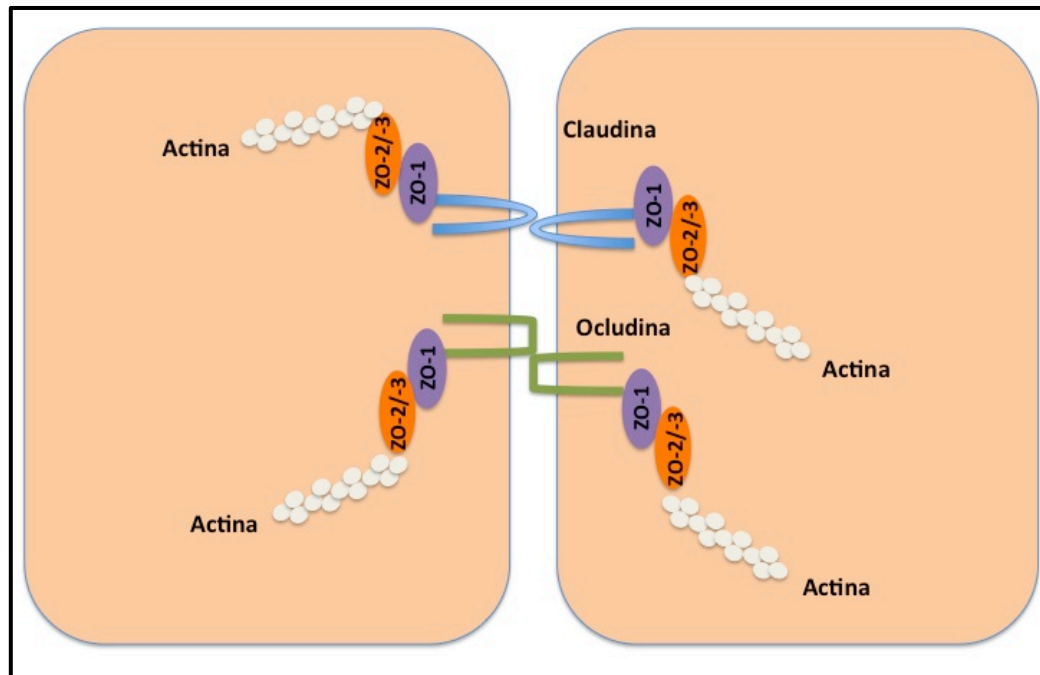
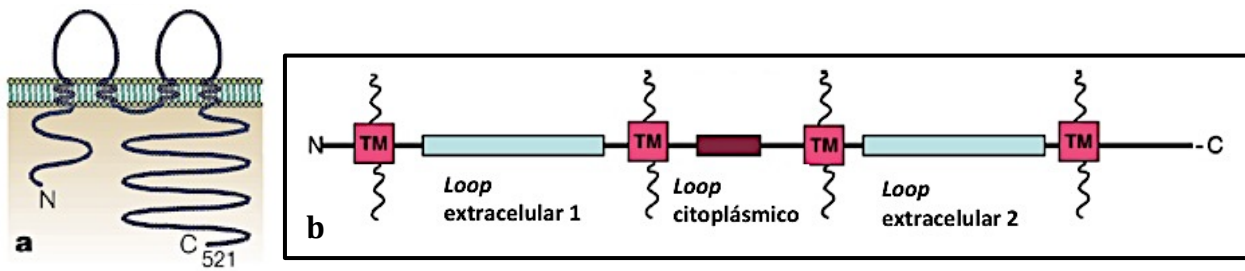


Figura 1.17. Esquema representativo de los diferentes componentes moleculares implicados en las uniones estrechas.

- Ocludinas

Las ocludinas presentan cuatro dominios transmembrana con dos *loops* extracelulares. Se ha comprobado que el dominio C-terminal es necesario para la asociación de las ocludinas con ZO-1 (Furuse et al., 1994) y que los dominios extracelulares intervienen en la localización de las ocludinas en las uniones estrechas y regulan la permeabilidad de la barrera entre las células. Además, el segundo *loop* extracelular puede interactuar con claudina y con moléculas de adhesión JAM (Figura 1.17 y Figura 1.18).

Existen dos isoformas de ocludinas, que son el resultado de un *splicing* alternativo del ARNm. Ambas isoformas se encuentran localizadas en las uniones estrechas y son reguladas por fosforilación. Las ocludinas no fosforiladas se encuentran en la membrana basolateral y en vesículas citoplásmicas, mientras que las ocludinas fosforiladas se localizan en las uniones estrechas. Un amplio número de quinasas y fosfatasas se han postulado como reguladores de los estados de fosforilación de las ocludinas y su localización y función en las uniones estrechas (Hartsock and Nelson, 2008).



**Figura 1.18.** Componentes estructurales de las ocludinas. Representación esquemática de la localización de las ocludinas en la membrana celular (a). Representación esquemática de los dominios estructurales de las ocludinas (b). Presenta cuatro dominios transmembrana (TM) y dos *loops* extracelulares. El N- y C-terminal se encuentran localizados en el citoplasma. Adaptado de Hartsock *et al.* (2008).

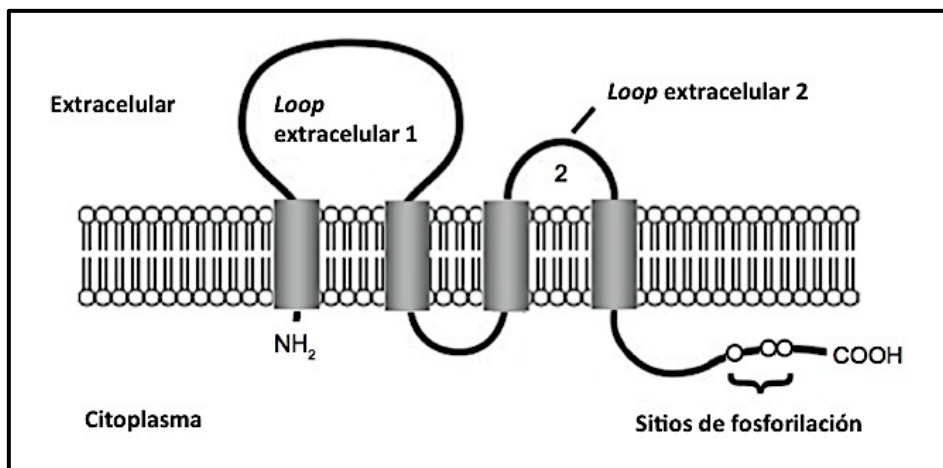
- Claudinas

Las claudinas son componentes cruciales en la estructura y funcionalidad de las uniones estrechas. Desempeñan un importante papel en la regulación de la permeabilidad paracelular y el mantenimiento de la polaridad celular en las células epiteliales y endoteliales. Presentan una estructura muy similar a la de las ocludinas. Poseen cuatro dominios transmembrana y dos *loops* extracelulares. Además, sus extremos N- y C-terminal están localizados en el citoplasma (Figura 1.19). Actualmente se conocen 24 miembros de la familia de las claudinas en mamíferos que se pueden dividir en claudinas clásicas o no clásicas, en función de la similitud de secuencia. Todas las claudinas, a excepción de la Claudina-12, presentan en su dominio C-terminal una secuencia de unión a las proteínas ZO-1, ZO-2 y ZO-3.

Las claudinas controlan directamente el flujo de iones y pequeñas moléculas a través de los canales paracelulares de las uniones estrechas, los cuales presentan características similares al resto de los canales iónicos, como selección de la carga iónica o permeabilidad dependiente de la concentración del ión. Hay que destacar que la selección iónica depende del tipo de claudina que se expresa, de manera que cambios en el tipo de claudina expresada o sustituciones en un único aminoácido de una claudina, son capaces de afectar a la selección iónica.

Los patrones de expresión de las claudinas son altamente específicas de tejido y dentro de un tejido se expresan diferentes tipos de claudinas. Además, las claudinas pueden interactuar entre sí de manera homo- o heterotípica. Numerosos estudios sugieren que la combinación de claudinas que se

expresan en un tejido determinan la selectividad y permeabilidad de las uniones estrechas de ese tejido (Ding et al., 2013; Hartsock and Nelson, 2008).



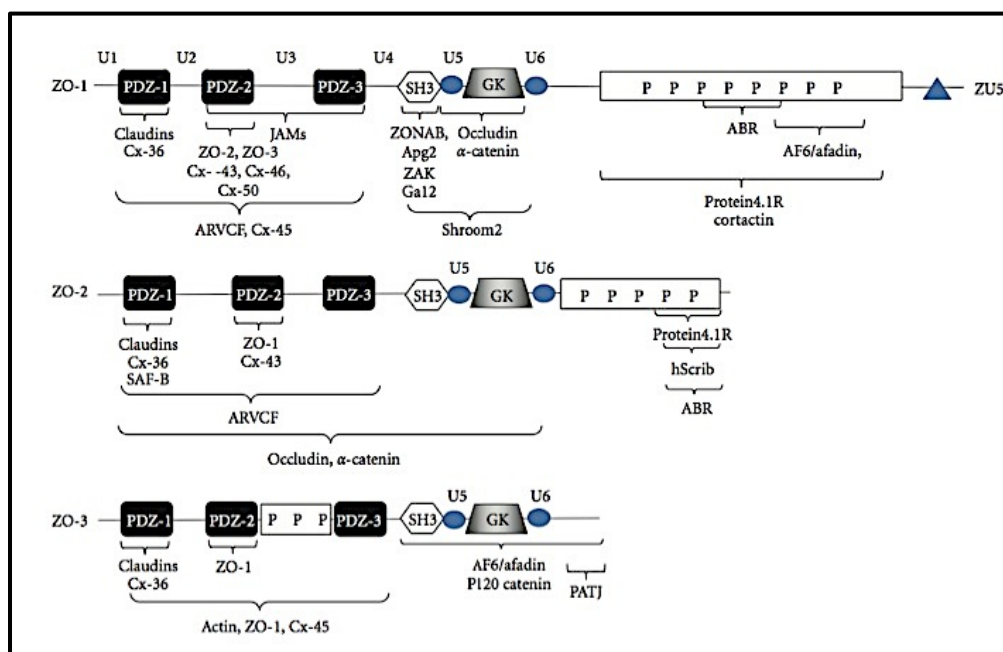
**Figura 1.19.** Estructura proteica de las claudinas. Presenta cuatro dominios transmembrana y dos *loop* extracelulares. El N- y C-terminal se encuentran localizados en el citoplasma. La región C-terminal contiene sitios de fosforilación que podrían estar implicados en las interacciones con otras proteínas y la transducción de señales. Adaptado de Ding *et al.* (2013).

- Proteínas ZO

Las proteínas *zonula ocludens* (ZO): ZO-1, ZO-2 y ZO-3, son proteínas citoplásmicas que sirven de nexo de unión entre las claudinas y ocludinas y los filamentos de actina del citoesqueleto (Figura 1.17). Su estructura se basa en la presencia de 3 dominios PDZ (*Psd95/large disc/zonula ocludens-1*), un dominio SH3 (dominio homólogo 3 de Src), un dominio GK (dominio guanilato quinasa), y una zona rica en residuos de prolina que se encuentra próxima al C-terminal en ZO-1 y ZO-2, y entre los dominios PDZ 2 y 3 en ZO-3 (Figura 1.20). Las proteínas ZO se pueden asociar entre sí, de manera que ZO-1 se puede asociar con ZO-2 o con ZO-3 a través de su dominio PDZ. Además, las proteínas ZO son capaces de reclutar diversos tipos de proteínas de la superficie celular. Inicialmente estas proteínas fueron descritas como proteínas específicas de las uniones estrechas, donde interactúan con proteínas transmembrana localizadas en dichas estructuras (occludinas, claudinas, moléculas de adhesión JAM, tricelulina). Posteriormente se ha comprobado que también se pueden unir a los complejos cadherina-catenina de las uniones adherentes y a conexinas de las uniones comunicantes. En las uniones adherentes se asocian con  $\alpha$ -catenina, miembros de la familia de las

p120-cateninas y afadina. Además son capaces de interactuar con proteínas citoplásmicas como adaptadores, moléculas de señalización y reguladores transcripcionales.

La función de las proteínas ZO es la de servir como vínculo de unión entre los componentes transmembrana y el citoesqueleto (Bauer et al., 2010; Hartsock and Nelson, 2008).



**Figura 1.20.** Detalle de los dominios estructurales de las proteínas ZO. Así mismo, se describe bajo los dominios, algunas proteínas con las que interactúan las proteínas ZO. Claudina, ocludina, α-catenina, afadina, región de unión de actina (ABR), conexina (Cx), proteína G subunidad α 12 (Ga12), moléculas de adhesión JAM, proteínas asociadas con las uniones estrechas (PATJ), región rica en prolina (P P P), dominio Psd95/large disc/zonula ocludens-1 (PDZ), dominio homólogo 3 de Src (SH3), dominios variables únicos (U1-U6), quinasa asociada a ZO-1 (ZAK), ZO-1 asociadas a proteínas de unión a ácidos nucleicos (ZONAB). Adaptado de Bauer *et al.* (2010).

#### 1.4.1.4 Uniones comunicantes

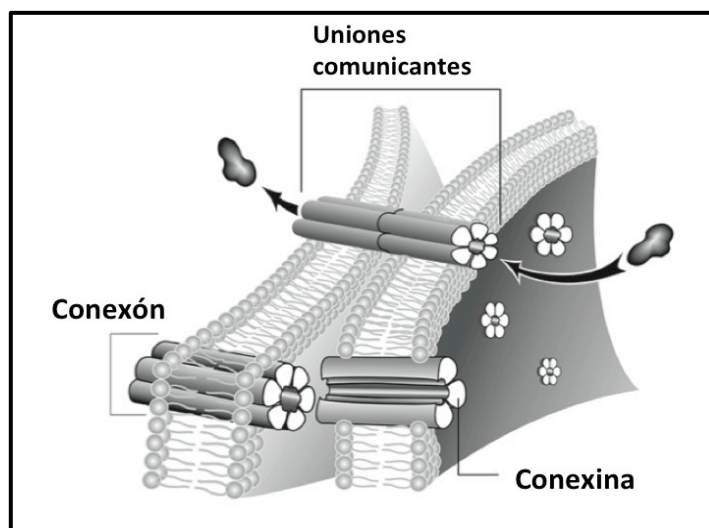
- Conexinas

Las uniones comunicantes se pueden establecer entre dos células que se encuentren separadas a una distancia de aproximadamente 2 nm. Estas uniones están constituidas por dos conexones, localizados en la membrana plasmática de dos células adyacentes, que se alinean para generar poros o canales. Cada conexón es el resultado de la oligomerización en hexámeros de las conexinas, que son proteínas integrales de membrana (Figura 1.21). Existen 21 conexinas humanas diferentes que se expresan en distintas combinaciones en todos los tipos celulares del organismo. Los conexones pueden ser homoméricos (constituídos por 6 conexinas iguales) o heteroméricos

(formados por diferentes conexinas). A su vez, estos conexones homoméricos o heteroméricos pueden constituir uniones comunicantes homotípicas (formadas por dos conexones idénticos) o heterotípicas (formadas por dos conexones homoméricos o heteroméricos diferentes). Las propiedades eléctricas así como la permeabilidad de los canales de las uniones comunicantes depende de las subunidades que las componen.

Estas estructuras similares a canales, son capaces de generar una conexión citoplásmica directa entre las células, y por tanto, una vía de comunicación intercelular directa. La comunicación a través de estos canales está limitado a moléculas pequeñas (de tamaño menor a 1 kDa) como iones y segundos mensajeros, y este proceso es crítico para el mantenimiento de la homeostasis celular y la regulación de los eventos de control celular como la proliferación, diferenciación y apoptosis.

Aunque está extensamente aceptado que la función principal de las conexinas es su ensamblaje en las uniones comunicantes para permitir la comunicación intercelular, los conexones también poseen la capacidad de actuar como canales de conexión con el medio extracelular, permitiendo el intercambio de moléculas de señalización (Ableser et al., 2013; Echevarria and Nathanson, 2004; Sutor and Hagerty, 2005).



**Figura 1.21.** Estructura básica de las uniones comunicantes. Cada canal de la unión comunicante está formado por un par de conexones localizados en la membrana plasmática de dos células adyacentes. Cada conexón, a su vez, está constituido por seis conexinas. Adaptado de Echevarria et al. (2004).

### *1.4.2 Uniones célula-matriz extracelular*

La adhesión celular a la matriz extracelular (ECM) es esencial para el desarrollo de múltiples procesos biológicos como la homeostasis tisular, la diferenciación de las células madre, el desarrollo embrionario y el cierre de heridas (Dao et al., 2013; de Pereda et al., 2009; Seltsmann et al., 2013). Las interacciones con la matriz extracelular se inician generalmente por la unión de receptores de adhesión a moléculas de la ECM y la agregación de estos receptores en los puntos de unión. El reclutamiento posterior de moléculas adaptadoras adicionales permite la unión de estos receptores a los filamentos de actina, permitiendo la maduración de la adhesión a ECM (Dao et al., 2013).

Aunque la suma de todas estas interacciones determina sobre todo la fuerza de la adhesión a la ECM, diferentes componentes de la ECM se unen a diferentes receptores de adhesión, lo que puede influir en el comportamiento celular en procesos como proliferación, diferenciación y migración (Dao et al., 2013).

Para responder a esta complejidad macromolecular, las células embebidas en los tejidos normalmente expresan un conjunto de receptores de adhesión adecuados para la matriz extracelular específica del tejido. Muchas de las interacciones célula a matriz extracelular están mediadas por las integrinas (receptores de adhesión heterodiméricos). Mediante la combinación de diferentes subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de las integrinas, las células pueden ajustar su repertorio de receptores de adhesión a las moléculas de adhesión presentes en un determinado tejido. Dependiendo del patrón de expresión de las integrinas, las células pueden ser dirigidas a compartimentos tisulares específicos, lo que ayuda a la organización tisular en diferentes zonas estructurales y funcionales (Dao et al., 2013).

Existen dos tipos de estructuras responsables de las uniones entre la célula y la ECM: los hemidesmosomas y las uniones focales o placas de adhesión (Figura 1.22).

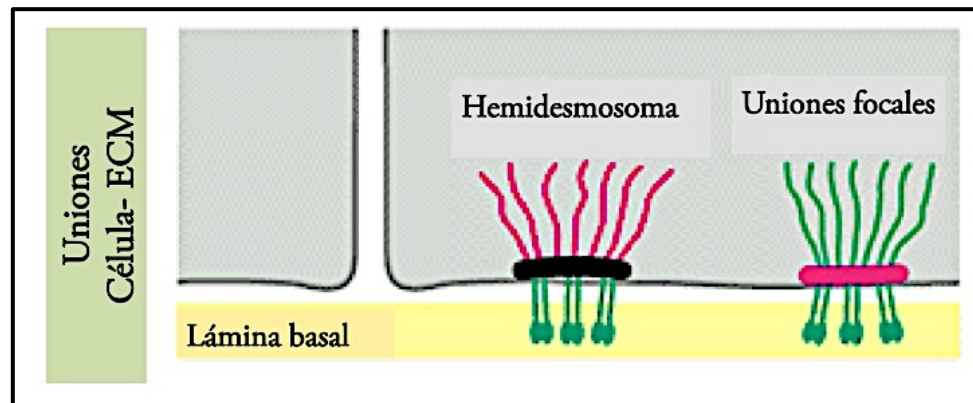
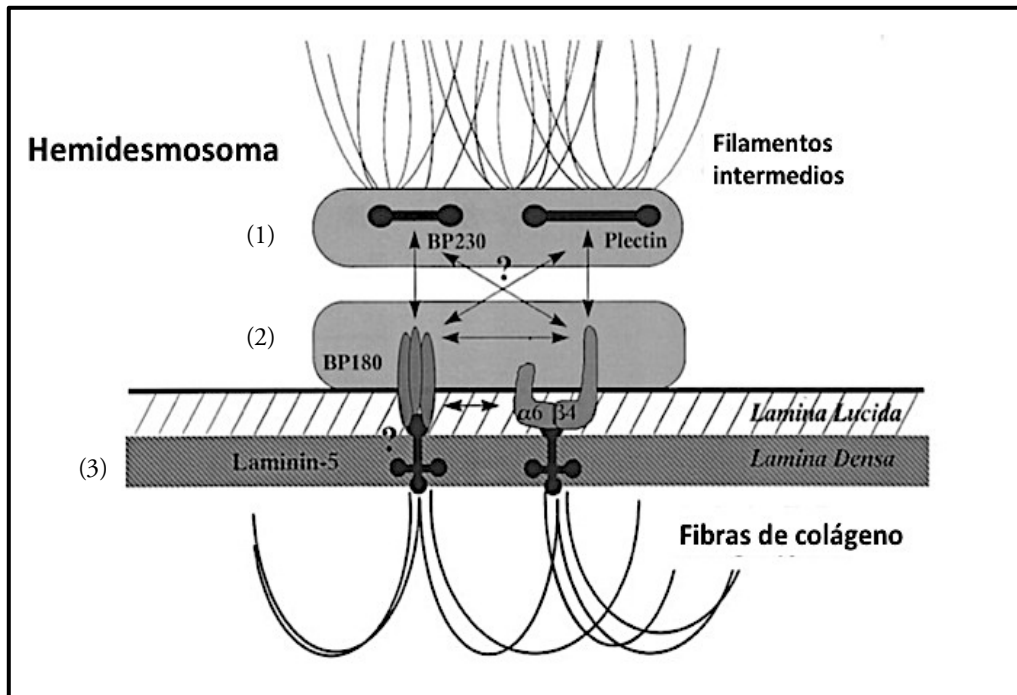


Figura 1.22. Representación esquemática de los diferentes tipos de estructuras de adhesión célula-matriz extracelular.

#### 1.4.2.1 Hemidesmosomas

Los hemidesmosomas son complejos multiproteicos de adhesión que contribuyen al anclaje de las células epiteliales a la membrana basal permitiendo la polarización celular, su organización espacial y la arquitectura tisular (Borradori and Sonnenberg, 1999). Median adhesiones estables que proporcionan resistencia al estrés mecánico mediante la unión del citoesqueleto de actina y la matriz extracelular (de Pereda et al., 2009).

La organización molecular de los hemidesmosomas se basa en tres clases de proteínas: las proteínas de la placa citoplásmica que actúan como moléculas de unión entre el citoesqueleto y la cara citoplásmica de la membrana plasmática, las proteínas transmembrana que sirven como receptores celulares que conectan el interior celular con la matriz extracelular, y las proteínas asociadas de la membrana basal de la matriz extracelular (Borradori and Sonnenberg, 1999) (Figura 1.23).



**Figura 1.23.** Modelo esquemático de un hemidesmosoma ilustrando las interacciones moleculares potencialmente implicadas en su ensamblaje. 1.) Proteínas de la placa citoplásmica. 2.) Proteínas transmembrana. 3.) Proteínas de la matriz extracelular. Adaptado de Borradori and Sonnenberg (1999).

- Proteínas de la placa citoplásmica

La placa citoplásmica está constituida fundamentalmente por dos proteínas: BP230 (*Bullous Pemphigoid antigen 230*) y plectina. Ambas están implicadas en la organización del citoesqueleto. El dominio C-terminal de **BP230** se asocia a los filamentos intermedios, mientras que su dominio N-terminal interacciona con el dominio citoplasmático de BP180 y la subunidad β4 de la integrina α6β4. Por otro lado, la **plectina** actúa como una molécula de unión multifuncional del citoesqueleto. Su dominio C-terminal puede unir filamentos intermedios, queratinas, neurofilamentos y vimentina *in vitro*. Su dominio N-terminal contiene un dominio de unión a actina y secuencias que interaccionan con la cola citoplasmática de la subunidad β4 de la integrina α6β4 (Borradori and Sonnenberg, 1999; de Pereda et al., 2009; Seltsmann et al., 2013).

- Proteínas transmembrana

Los hemidesmosomas presentan tres proteínas transmembrana: la integrina  $\alpha 6\beta 4$ , BP180 y CD151. La **integrina  $\alpha 6\beta 4$**  se encuentra localizada particularmente en los hemidesmosomas en los sitios de unión a filamentos intermedios de queratina. La cola citoplasmática de  $\beta 4$  es crucial para la interacción de la integrina  $\alpha 6\beta 4$  con los diferentes componentes de los hemidesmosomas. Contiene 2 pares de dominios fibronectina III (FNIII) separados entre sí por un segmento conector (CS). Su región próxima a la membrana se une a plectina, mientras que el dominio C-terminal contiene un sitio de unión para BP180. También es posible que interaccione con BP230. La interacción de la integrina  $\alpha 6\beta 4$  con plectina es clave para la estabilidad del hemidesmosoma y se ha propuesto que actúa como primer paso en el ensamblaje de los hemidesmosomas, facilitando el reclutamiento de BP180 y BP230. Por otra parte, el dominio extracelular de la integrina  $\alpha 6\beta 4$  es crucial para la adhesión celular.  $\alpha 6\beta 4$  es el receptor de diferentes subtipos de laminina, pero une con una elevada afinidad laminina-5 y laminina-332.

**BP180** (*Bullous pemphigoid* 180), también conocido como colágeno tipo XVII, presenta en su dominio N-terminal numerosos sitios susceptibles de fosforilación y su cola citoplásmica es fundamental para su localización en los hemidesmosomas, probablemente estabilizada por su unión a BP230 y plectina.

Además, BP180 puede asociarse con  $\alpha 6\beta 4$  mediante su dominio N-terminal (interaccionando con la subunidad  $\beta 4$ ), mientras que es capaz de unirse a la subunidad  $\alpha 6$  mediante su dominio extracelular. Su estructura, con un dominio extracelular de colágeno tan largo implica un papel de esta proteína en la adhesión epitelio-estromal.

**CD151** es una tetraspanina asociada a integrinas (Borradori and Sonnenberg, 1999; de Pereda et al., 2009; Green and Jones, 1996; Seltsmann et al., 2013). Las tetraspaninas se caracterizan por contener cuatro dominios transmembrana, dos colas citosólicas y dos *loop* extracelulares: uno largo y uno corto (Yáñez-Mó et al., 2009). CD151 fue identificado por primera vez como promotor de la metástasis en cáncer hepático (Testa et al., 1999) y está

implicado en migración celular, invasión y angiogénesis mediante la formación de complejos proteicos con las integrinas (Kang et al., 2014; Salavaldés et al., 2012; Takeda et al., 2007; Yang et al., 2010).

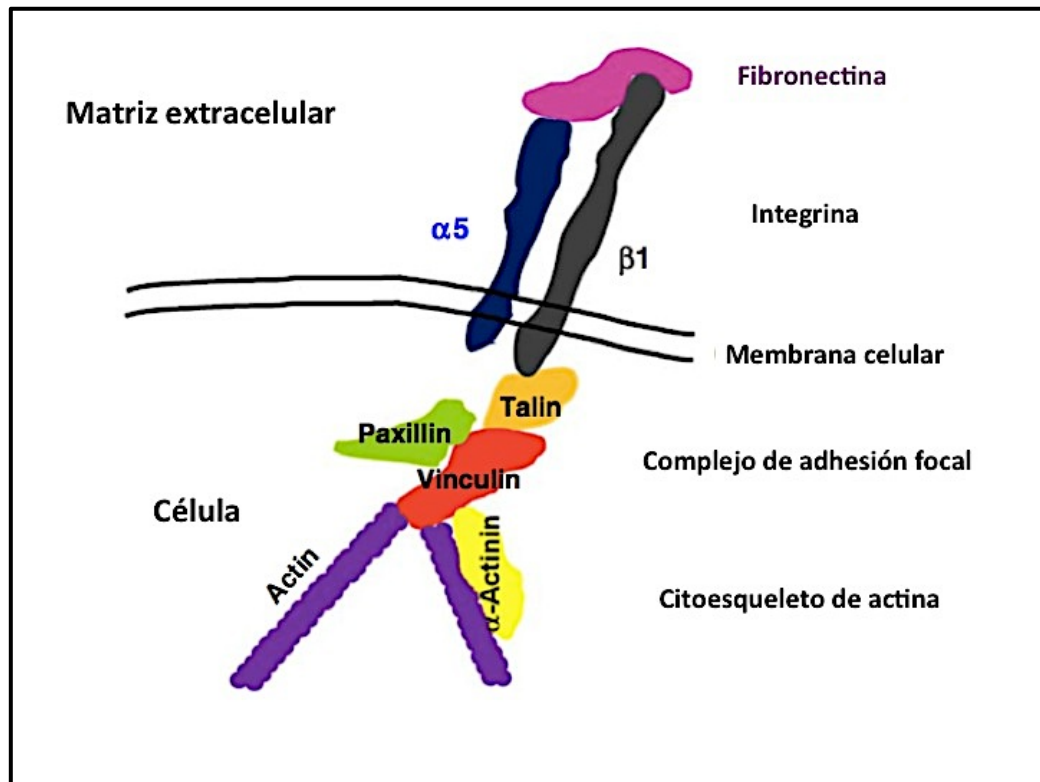
- Proteínas de la matriz extracelular

Uno de los principales componentes de la matriz extracelular es la laminina. En concreto la laminina-5, localizada fundamentalmente en la membrana basal de la epidermis, es el ligando principal de la integrina  $\alpha6\beta4$ . Su interacción parece ser crucial para la formación de los hemidesmosomas y el mantenimiento de una adhesión estable. La laminina-5 sirve como puente de unión entre la integrina  $\alpha6\beta4$  y componentes de la matriz de la dermis (Borradori and Sonnenberg, 1999).

### 1.4.2.2 Uniones focales o placas de adhesión

Las uniones focales son agrupaciones de receptores transmembrana de la familia de las integrinas que unen mecánicamente el citoesqueleto de actina con la matriz extracelular a través de una gran variedad de proteínas de unión de actina. La capacidad de generar y transmitir fuerza depende de la potencia de la conexión entre las integrinas y el citoesqueleto de actomiosina mediada por las proteínas de adhesión focal (Figura 1.24). La composición de las adhesiones focales no es única y depende del tipo de integrinas y su estado de activación.

Entre la gran cantidad de proteínas que se encuentran implicadas en las uniones focales, las integrinas, la vinculina y talina son las más importantes (Ciobanasu et al., 2014; Mierke, 2009).



**Figura 1.24.** Dibujo esquemático del complejo de adhesión focal asociado a las integrinas tras la unión del ligando. Adaptado de Mierke et al (2009).

- Vinculina

La vinculina es incapaz de unirse directamente a las integrinas, pero lo hace a través de proteínas de unión como talina y paxilina. En concreto, se une a la subunidad  $\beta$  de las integrinas a través de talina y a la subunidad  $\alpha 4$  o  $\alpha 9$  a través de paxilina. Además, la unión de vinculina con paxilina modula la interacción de esta última con la quinasa de adhesión focal (FAK).

En cuanto a su estructura proteica la vinculina presenta dos dominios: la cabeza y la cola, que están separados entre sí por una región bisagra flexible. La cabeza es globular y está subdividida en 4 dominios (D1-D4), mientras que la cola constituye un solo dominio (D5). La cabeza de la vinculina presenta sitios de unión para talina,  $\alpha$ -actinina y  $\alpha$ - y  $\beta$ -catenina, mientras que la cola de la vinculina presenta sitios de unión para actina, paxilina y fosfatidil-inositol-4,5bifosfato (PIP<sub>2</sub>). La cabeza de la vinculina interacciona con la cola generando una conformación cerrada que constituye un estado inactivo de la proteína. Así, la vinculina se puede encontrar en dos conformaciones: cerrada (inactiva) o abierta (activa). El paso de la forma inactiva a activa se puede producir por la unión de talina al dominio globular

y  $\beta$ -actina al dominio de la cola, por la unión de fosfolípidos como  $\text{PIP}_2$  a la cola de la vinculina, o por fuerzas mecánicas debidas a la adhesión mediada por las integrinas que generan el cambio conformacional de la vinculina. Además, la vinculina interacciona directa o indirectamente con muchas otras proteínas de adhesión focal como tensina, VASP, zyxina, vinexina, ezrina, filamina,  $\alpha$ -actinina, actina y FAK (Ciobanasu et al., 2014; Dumbauld et al., 2013; Mierke, 2009).

- Talina

La talina es una de las primeras proteínas de unión a actina que se encuentran acoplando el citoesqueleto de actina a la matriz extracelular. Contiene tres dominios de unión a actina localizados en el extremo N-terminal del dominio FERM (*four-point-one*, *ezrin*, *radixin*, *moesin*), en la parte central y en el extremo C-terminal. Además, el dominio FERM también se une a las integrinas y participa en su activación, mientras que el dominio central contiene 11 sitios de unión a vinculina. Por otra parte, el extremo N-terminal de la talina interacciona con la superficie celular, mientras que su parte central y el extremo C-terminal interaccionan con los filamentos de actina (Ciobanasu et al., 2014; Kalli et al., 2013).

- Integrinas

Las integrinas son una familia de receptores de adhesión que están compuestas por dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ) unidas entre sí de forma covalente. En humanos existen 18 subunidades  $\alpha$  y 8 subunidades  $\beta$  que se combinan entre sí dando lugar a 24 integrinas diferentes.

Las integrinas conectan el citoesqueleto de actomiosina con el tejido conectivo a través de las proteínas de adhesión focal, de manera que la formación del complejo entre talina y la cola citoplasmática de la subunidad  $\beta$  de la integrina son capaces de cambiar su conformación a un estado activo. Así mismo, juegan un papel clave en la regulación de las adhesiones focales ya que controlan la adhesión celular y, a través de las cascadas de señalización mediadas por integrinas, también controlan la generación de las fuerzas

celulares y la dinámica de remodelación del citoesqueleto (Deb et al., 2011; Kalli et al., 2013; Mierke, 2009).

## 1.5 Migración celular

La migración celular juega un importante papel en una gran variedad de fenómenos biológicos como el desarrollo embrionario, el cierre de heridas y la respuesta inmune, que requieren un movimiento en una dirección determinada y a una localización específica (Allena, 2013; Horwitz, 1997).

Para alcanzar su lugar de acción, las células no sólo se mueven a través de la matriz extracelular sino que también se mueven unas sobre otras, entre otras e incluso a través de otras. Por ejemplo, los leucocitos se adhieren y migran sobre las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos antes de atravesar el endotelio entre dos células endoteliales o mediante la inducción de la formación de un canal de la membrana de una única célula endotelial (Carman, 2009).

### 1.5.1 Proceso migratorio

En general, la migración celular puede entenderse como un proceso cíclico (Horwitz, 1997). La respuesta inicial de una célula a un agente promotor de la migración es polarizar y extender protrusiones de membrana hacia la dirección de migración. Estas protrusiones generalmente conducen a una polimerización de actina y son estabilizados por adhesiones a la matriz extracelular o células adyacentes mediante receptores de membrana que se encuentran asociados al citoesqueleto de actina. Estas adhesiones sirven como sitios de tracción para la migración sobre los que se mueven las células, y son eliminados en la parte posterior de la célula facilitando su desensamblaje (Ridley et al., 2003) (Figura 1.25).

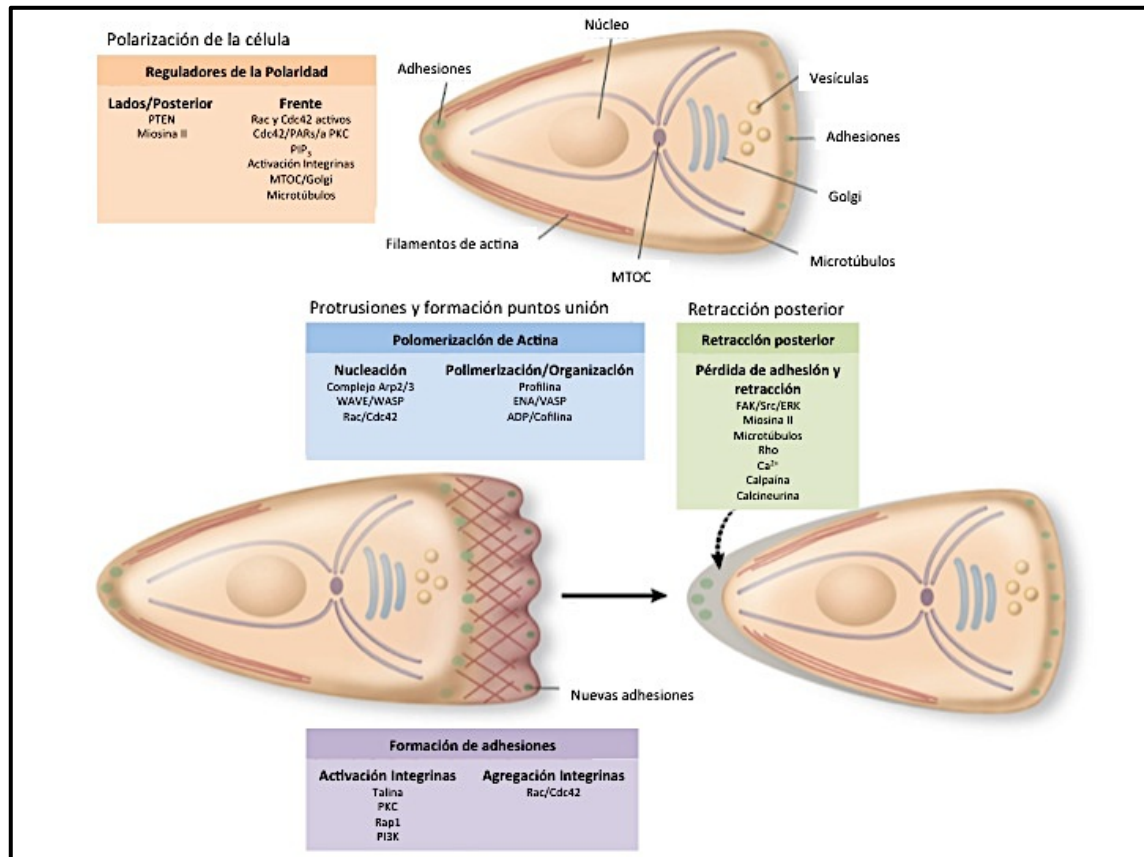


Figura 1.25. Procesos celulares desencadenados durante la migración celular. Adaptado de Ridley et al. (2003).

### 1.5.1.1 Polarización de la célula

Para que la célula migre debe estar polarizada, lo que significa que los procesos moleculares que suceden en el frente y en la parte posterior de la célula son diferentes. El establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular en respuesta a un estímulo extracelular está mediada por un conjunto de moléculas que incluye las GTPasas de la familia Rho (Cdc42), PI3Ks (*Phosphoinositide 3-kinases*) y PTEN (*Phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate 3-phosphatase*), integrinas, microtúbulos y transporte de vesículas.

- Cdc42  
Cdc42 influye en la polaridad celular ya que restringe la dirección de formación de las protrusiones en el frente celular (Srinivasan et al., 2003) y modifica la localización del centro organizador de microtúbulos (MTOC) y el aparato de Golgi, que se localizan delante del núcleo en dirección al sentido

de la migración. Esto favorece el crecimiento de los microtúbulos hacia las nuevas protrusiones de membrana y facilita el aporte de las proteínas asociadas a membrana necesarias para la formación de las nuevas protrusiones mediante la liberación de vesículas por parte del aparato de Golgi (Etienne-Manneville and Hall, 2002; Rodriguez et al., 2003).

- PI3K y PTEN

Para generar una respuesta celular, los pequeños gradientes producidos por moléculas pequeñas entre el frente celular y la parte posterior de la célula deben ser amplificados. Los fosfoinosítoles PIP<sub>3</sub> (fosfoinositol trifosfato) y PIP<sub>2</sub> (fosfoinositol bifosfato) son moléculas de señalización que generan rápidamente una polarización de la célula en respuesta a gradientes quimiotácticos. Estos procesos de amplificación implican la acumulación localizada y la activación de PI3Ks que generan PIP<sub>3</sub>/PIP<sub>2</sub> mediante fosforilación, y la fosfatasa PTEN que revierte esta fosforilación (Ridley et al., 2003).

Existen unos ciclos de retroalimentación positiva que implican a Cdc42, los productos de PI3K y PTEN, que trabajan juntos en la iniciación y mantenimiento de la polaridad en las células migratorias.

### 1.5.1.2 Formación de protrusiones

Las células migran direccionalmente en respuesta a diferentes estímulos como gradientes de quimioquinas, factores de crecimiento o moléculas de la matriz extracelular. Estos factores se unen a unos receptores de membrana e inician una cascada de señalización que incluye la activación de proteínas G o tirosina quinasas, la estimulación de GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) por Cdc42, y la activación de quinasas lipídicas con el subsiguiente reclutamiento de Rac activado. La activación local de Rac y Cdc42 disminuye la actividad de Rho e incrementa la actividad de PI3K y la producción de PIP<sub>2</sub>/PIP<sub>3</sub> en el frente celular. Además, la activación localizada de Rac y/o Cdc42 junto con otros activadores como proteínas de la familia WASP/WAVE y el complejo Arp2/3 estimula la formación y ramificación de la red

de filamentos de actina en el frente celular, que finalmente induce la formación de una protrusión en la dirección de la migración (Ridley et al., 2003).

Las células pueden generar cuatro tipos diferentes de protrusiones en el frente celular: lamelipodios, filopodios, protuberancias irregulares (*blebs*) e invadopodios. Cada una de estas estructuras únicamente contribuye a la migración en circunstancias específicas. De esta manera, los **lamelipodios** pueden extenderse largas distancias sobre la matriz extracelular *in vivo*, empujando a las células a través de los tejidos (Friedl and Gilmour, 2009a). Los **filopodios** exploran el ambiente celular y son particularmente importantes en la guía del crecimiento neuronal y la angiogénesis de los vasos sanguíneos (Eilken and Adams, 2010; Gupton and Gertler, 2007). Las **protuberancias irregulares o blebs** han sido descritas como conductores direccionales de la migración celular durante el desarrollo (Charras and Paluch, 2008) y los **invadopodios** son protrusiones que permiten la degradación puntual de la matriz extracelular, probablemente para facilitar la invasión a través de los tejidos (Buccione et al., 2009). Los diferentes tipos de protrusiones pueden coexistir en el frente celular. Por ejemplo los filopodios, lamelipodios y protuberancias irregulares han sido observadas en el frente celular de las células migratorias de *zebrafish* durante la gastrulación (Diz-Muñoz et al., 2010).

### 1.5.1.3 Estabilización de las protrusiones

Para que se produzca la migración es necesario que las protrusiones sean estabilizadas. Aunque existe una gran variedad de receptores implicados en la migración de diferentes tipos celulares, las integrinas son la principal familia de receptores promotores de la migración. Estos receptores tienen un papel dual sirviendo como vínculo de unión entre las proteínas de la matriz extracelular y el citoesqueleto de actina por medio de proteínas adaptadoras (Ridley et al., 2003).

La unión del ligando a la porción extracelular de las integrinas produce un cambio conformacional que modifica las interacciones entre los dominios citoplasmáticos de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (Emsley et al., 2000), y promueve el

agrupamiento de las integrinas. Esto inicia señales intracelulares como la fosforilación de proteínas con residuos tirosina, la activación de pequeñas GTPasas y cambios en la biosíntesis de fosfolípidos que regulan la formación y la fuerza de los sitios de unión, la organización y dinámica del citoesqueleto y la polaridad celular durante la migración (Geiger et al., 2001). Las integrinas activadas se localizan preferentemente en el frente celular, donde se están formando continuamente nuevas adhesiones (Kiosses et al., 2001).

Las integrinas y otras moléculas de adhesión son activadas por PI3Ks, PKCs y/o Rap via talina, y estabilizan la protrusión mediante conexiones estructurales con los filamentos de actina. Las nuevas adhesiones en el frente celular refuerzan una elevada actividad de Rac, Cdc42 y PI3K, mientras que la formación de un gradiente de actividad de Rho, que es menor en el frente celular, contiene la actividad de Rac en la parte posterior de la célula (Ridley et al., 2003).

Durante la formación de las adhesiones, algunos componentes proteicos presentan cinéticas similares, lo que indica que ya existían complejos preformados en el citoplasma. Sin embargo, otros componentes presentan cinéticas diferentes, lo que concuerda con el modelo en el que los eventos reguladores inician la adhesión en serie de diferentes proteínas. La paxilina por ejemplo está presente en las adhesiones nacientes, mientras que la  $\alpha$ -actinina aparece en las adhesiones más antiguas (Webb et al., 2002).

#### 1.5.1.4 Fuerzas de tracción

La polarización generalmente va acompañada de una sensibilización de los receptores en el frente celular que favorece el movimiento continuado en la misma dirección (Ridley et al., 2003). La conexión de la matriz extracelular con el citoesqueleto se produce a través de las integrinas, que sirven como sitios de tracción sobre los que la célula se mueve y como mecanosensores, transmitiendo información sobre el estado físico de la matriz extracelular al interior de la célula y alterando las dinámicas del citoesqueleto (Beningo et al., 2001; Galbraith et al., 2002; Horwitz,

1997). Debido a que las células migratorias deben separarse tras ejercer una tracción sobre el sustrato, la velocidad de migración depende de la fuerza de la adhesión de la célula, que viene determinada por la densidad de ligandos de adhesión en el sustrato, la densidad de receptores de adhesión en la célula y la afinidad de los receptores por los ligandos (Horwitz, 1997). La fuerza transmitida por los sitios de adhesión proviene de la interacción de la miosina II con los filamentos de actina en dichos sitios de adhesión (Ridley et al., 2003). En las células migratorias las fuerzas de tracción más intensas se localizan en los complejos focales del frente celular y de la parte posterior de la célula (Beningo et al., 2001).

El desensamblaje de las adhesiones se produce tanto en el frente celular, donde está acompañado de la formación de nuevas protrusiones, como en la parte posterior de la célula, donde promueve la retracción de la célula. En la parte anterior de las células migratorias las adhesiones de la base de la protrusión se separan a la vez que se forman nuevas adhesiones en el frente celular (Webb et al., 2002). Sin embargo, algunas adhesiones persisten y maduran a adhesiones más estables.

Tanto las proteína quinasas como las fosfatasas aparecen como principales reguladores del recambio de las moléculas de adhesión y la estabilidad de las mismas (Larsen et al., 2003). Por ejemplo, las células que carecen de FAK (*Focal adhesion kinase*) o Src tienen más adhesiones y más duraderas así como una baja capacidad migratoria (Alahari et al., 2002; Webb et al., 2002).

### 1.5.1.5 Retracción

El ciclo de la migración es completado con el desensamblaje de las adhesiones y la retracción de la parte posterior de la célula. El desensamblaje es controlado por la dinámica de los microtúbulos así como por vías de señalización que incluyen FAK, ERK, Src y proteasa calpaína. La retracción en la parte posterior de la célula requiere de la actividad de Rho quinasa y es un proceso dependiente de miosina (Ridley et al., 2003).

La tensión puede ser suficiente para romper físicamente la unión entre la integrina y el citoesqueleto de actina con el resultado de que la integrina es dejada atrás mientras que el resto de la célula se mueve. Una elevada tensión ejercida en la parte posterior de la célula contribuye a la separación (Horwitz, 1997). Aunque esta retracción contribuye a la red de movimientos de las células migratorias, también podría contribuir a la polaridad ya que la liberación de las adhesiones en la parte posterior de la célula está acoplado de alguna manera al incremento de la formación de protrusiones en el frente celular (Ridley et al., 2003).

### **1.5.2 Migración colectiva**

La migración de células individuales es el mecanismo de movimiento celular mejor estudiado *in vitro* y se sabe que contribuye a muchos procesos fisiológicos de motilidad *in vivo* como el desarrollo, la vigilancia inmunitaria y la metástasis en cáncer (Ridley et al., 2003). La migración de células individuales permite a las células localizarse en los tejidos o tumores secundarios como en el caso de la morfogénesis y el cáncer respectivamente, o pasar de forma transitoria a través de los tejidos, como ocurre con las células inmunes (Friedl and Gilmour, 2009b).

La migración colectiva es el segundo mecanismo principal de movimiento celular (Friedl et al., 2004). La migración colectiva se refiere a células que migran juntas en capas, grupos, líneas, brotes o cualquier otra organización multicelular (Rørth, 2012). Este tipo de migración es observada frecuentemente en animales *in vivo* como parte de los programas morfogénéticos normales durante el desarrollo embrionario (Rørth, 2009; Weijer, 2009) conduciendo a la formación de órganos y tejidos complejos, y en situaciones patológicas como la diseminación de células cancerígenas o la neovascularización de tumores (Friedl and Gilmour, 2009b; Friedl et al., 2012).

La migración colectiva tiene muchas características en común con la migración individual, pero también tiene características particulares, en algunos casos únicas para un tipo específico de migración colectiva (Rørth, 2012). La migración

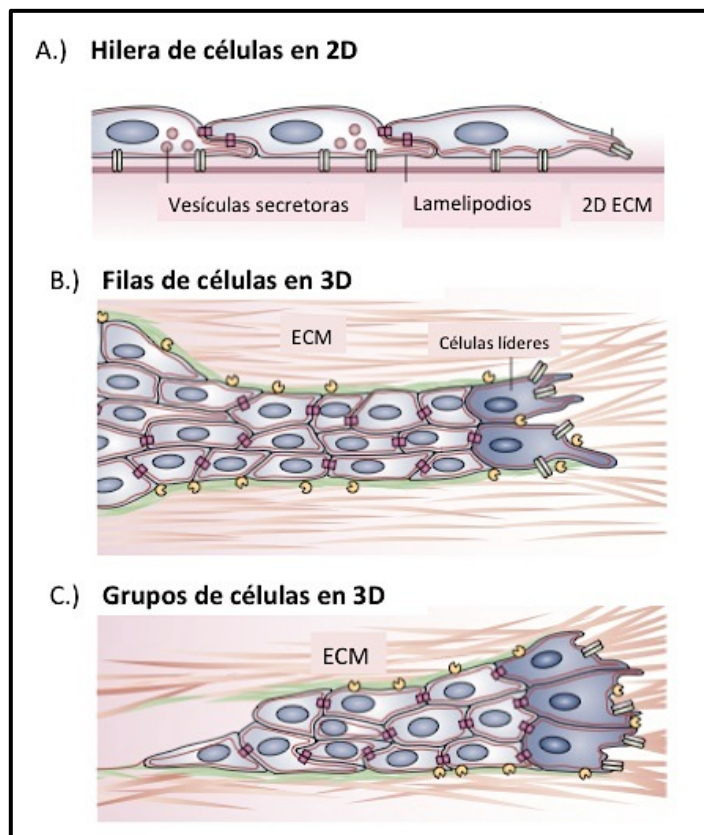
colectiva difiere de la migración individual en que las células permanecen conectadas mientras se mueven. Existen tres aspectos que caracterizan la migración colectiva:

- Las células permanecen física y funcionalmente conectadas, por lo que la integridad de las uniones célula-célula es preservada durante el movimiento (Carmona-Fontaine et al., 2008; Friedl et al., 2004; Montell, 2008).
- La polaridad multicelular y la organización supracelular del citoesqueleto de actina genera fuerzas de tracción y protrusión para la migración y mantiene las uniones célula-célula (Friedl and Gilmour, 2009a).
- En la mayoría de los tipos de migración colectiva el movimiento de las células en grupos modifica estructuralmente el tejido durante la migración causando modificaciones secundarias de la matriz extracelular, incluyendo la destitución de la membrana basal (Friedl and Gilmour, 2009b).

Dependiendo del contexto el movimiento colectivo se puede producir en dos dimensiones, en capas que migran sobre la superficie de un tejido, o en tres dimensiones formando grupos o líneas de células (Friedl and Gilmour, 2009a) (Figura 1.26).

Independientemente de los diferentes modos de migración colectiva, el principio molecular y celular de todos ellos requiere cohesión celular, polarización colectiva, coordinación de la actividad del citoesqueleto, orientación por señales químicas y físicas y cambio en la posición colectiva con respecto al sustrato. Este comportamiento de grupo requiere una organización especial del citoesqueleto supracelular, es decir, la dinámica del citoesqueleto se comparte entre múltiples células para funcionar como una sola unidad generando de forma conjunta la fuerza, migración y remodelación de la matriz extracelular. Además, el movimiento colectivo supone una interacción íntima con el estroma celular que a su vez está directamente

implicado en la inducción de la polaridad y en la liberación de factores promigratorios (Friedl and Gilmour, 2009a).



**Figura 1.26.** Tipos de migración colectiva. Movimiento de una monocapa a través de la matriz extracelular en 2D (A). Invasión multicelular en 3D (B). Invasión colectiva a través de la matriz extracelular (C). Adaptado de Friedl et al, (2009a).

Existen varios mecanismos por los cuales unas células se convierten en células líderes que guían la migración y otras en células posteriores. Esta asimetría del grupo celular es una característica de migración colectiva, donde las células líderes presentan diferentes características morfológicas y son capaces de detectar señales extracelulares y generar una mayor dinámica del citoesqueleto que el resto de las células del grupo (Vitorino and Meyer, 2008).

En la migración colectiva la adhesión célula-célula es mediada por proteínas de uniones adherentes como las cadherinas, miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas e integrinas, que conectan directa o indirectamente con la actina y/o con los filamentos intermedios del citoesqueleto proporcionando un acoplamiento mecánico robusto y dinámico (Friedl and Gilmour, 2009a). Las uniones cadherina-cadherina entre las células pueden ser rápidamente remodeladas

permitiendo a las células cambiar su posición dentro del grupo (Kametani and Takeichi, 2007; Yamada and Nelson, 2007) .

Imágenes reales de las células durante el desarrollo muestran que las células del frente en la migración colectiva extienden lamelipodios, filopodios y/o *blebs*, mientras que las células que se encuentran tras el frente raramente extienden protrusiones (Diz-Muñoz et al., 2010; Friedl and Gilmour, 2009a). Se ha comprobado que la activación de Rac induce en las células del frente la extensión de lamelipodios, y es suficiente para conducir la polarización del grupo de células en la migración colectiva (Wang et al., 2010). Así mismo, el balance de cofilina fosforilada regulada por Rac es también crítica para la migración colectiva en las células del frente. Es posible que unos elevados niveles de cofilina fosforilada puedan suprimir la extensión de protrusiones en todas las células del grupo excepto en las del frente (Zhang et al., 2011). Por otro lado, cofilina y su regulador LIMK podrían ser esenciales en la degradación de la matriz extracelular, que es particularmente importante en las células del frente de la migración colectiva en las células cancerosas (Scott et al., 2010).

## 1.6 Epigenética. Regulación de la expresión génica

La epigenética es el estudio de los cambios hereditarios en la expresión de genes que ocurre de manera independiente a los cambios en la secuencia primaria del ADN (Sharma et al., 2010b). Estos cambios hereditarios son muy importantes durante el desarrollo, donde una única célula progenitora prolifera y se diferencia en distintos tipos de células somáticas (Sharma et al., 2010a). Además, estos cambios se mantienen de manera estable a lo largo de múltiples ciclos de división celular, permitiendo a las células poseer diferentes identidades aunque todas contienen la misma información genética (Sharma et al., 2010b).

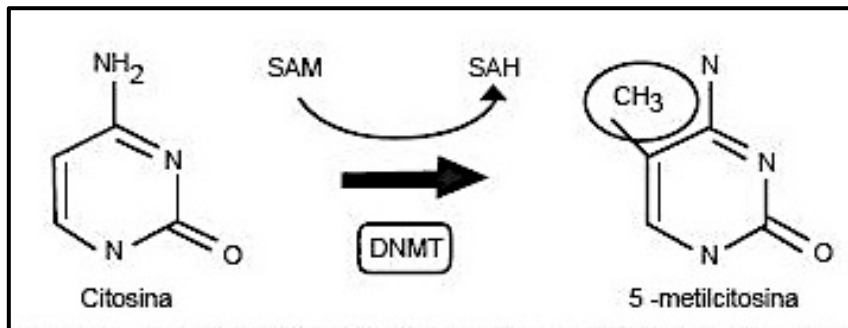
Los mecanismos epigenéticos que controlan la expresión de genes son: la metilación del ADN, la modificación covalente de las histonas, la remodelación del nucleosoma y la expresión de ARNs no codificantes (miARNs) (Sharma et al., 2010a; 2010b).

### **1.6.1 Metilación del ADN**

La metilación del ADN es la principal modificación epigenética que controla la expresión de los genes y la estructura de la cromatina (Yan et al., 2011). Los cambios en los perfiles de metilación del ADN se producen en situaciones fisiológicas y patológicas, como la edad (Bjornsson et al., 2008), tumorigénesis y enfermedades metabólicas (Barrès et al., 2009; Ling et al., 2007).

La metilación del ADN es la modificación epigenética más extensamente estudiada en mamíferos. Proporciona un mecanismo estable de silenciamiento de genes que juega un importante papel en la regulación de la expresión de genes y la arquitectura de la cromatina, junto con la modificación de histonas y otras proteínas asociadas a la cromatina (Sharma et al., 2010b). La metilación del ADN implica la adición de un grupo metilo al carbono 5 de la citosina y esta reacción es catalizada por una ADN-metil-transferasa (DNMT) (Figura 1.27). Esta modificación covalente ocurre cuando la citosina forma parte de un dinucleótido CG o también conocido como CpG (Sharma et al., 2010a). Estos dinucleótidos CpG se encuentran

localizados en regiones del ADN que contienen secuencias altamente repetitivas (como repeticiones centroméricas, retrotransposones, ADN ribosómico etc...) y en pequeñas regiones del ADN ricas en CGs como son las llamadas islas CpG (Bird, 2002; Takai and Jones, 2002). Las islas CpG se encuentran localizadas preferentemente en el extremo 5' de los genes y ocupan aproximadamente el 60% de los promotores de genes en humanos (Wang and Leung, 2004). Generalmente contienen una región libre de nucleosoma flanqueada por cromatina que normalmente se encuentra acetilada y carece de histona H1. Esto permite que los factores de transcripción puedan interaccionar con los promotores (Sharma et al., 2010a).



**Figura 1.27.** Esquema del proceso de metilación del ADN. SAM= S-adenosil-metionina, donador del grupo metilo. SAH= S-adenosil-homocisteína. DNMT= ADN-metil-transferasa (González Ramírez et al., 2008).

Durante el desarrollo y la diferenciación de tejidos, los sitios CpG del genoma se encuentran normalmente metilados, mientras que las islas CpG suelen encontrarse no metiladas (Suzuki and Bird, 2008). Sin embargo, las islas CpG de algunos promotores comienzan a metilarse durante el desarrollo, lo que conduce a un silenciamiento transcripcional a largo plazo (Sharma et al., 2010b).

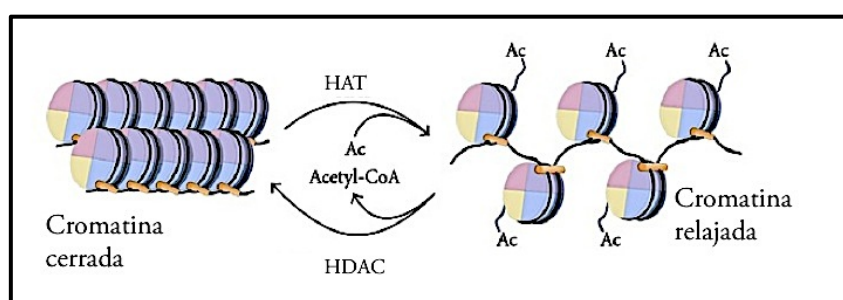
Los patrones de metilación del ADN son generados y hereditariamente mantenidos por la actividad cooperativa de las ADN-metil-transferasas DNMT3a y DNMT3b que se encargan de la metilación *de novo* y actúan de manera independiente a la replicación mostrando la misma preferencia por el ADN no metilado que por el hemimetilado, y la ADN-metil-transferasa DNMT1 que se encarga del mantenimiento de la metilación y actúa durante la replicación presentando preferencia por el ADN hemimetilado (Kim et al., 2002; Okano et al., 1999).

### 1.6.2 Modificación covalente de histonas

Las histonas, que componen el núcleo de los nucleosomas, contienen un dominio C-terminal globular y un dominio N-terminal sin estructura definida (Luger et al., 1997). Tanto los dominios N- como C-terminal están expuestos a sufrir modificaciones postraduccionales de tipo acetilación, fosforilación, metilación, ubiquitinación o sumoilación en diferentes residuos, generalmente en aminoácidos lisina, arginina y serina. Estas modificaciones regulan procesos celulares clave como la transcripción, replicación y reparación del ADN (Kouzarides, 2007).

Las modificaciones de las histonas provocan cambios en la accesibilidad a la cromatina, o el reclutamiento u oclusión de proteínas efectoras no histonas que decodifican el mensaje codificado por los patrones de modificación (Sharma et al., 2010b). Estos patrones de modificación están dinámicamente regulados por enzimas que adicionan o eliminan modificaciones covalentes de las histonas, permitiendo la activación o silenciamiento de genes.

Las enzimas que median las modificaciones de las histonas son las histonas acetil-transferasas (HATs), histonas deacetilasas (HDACs) (Figura 1.28), e histonas metil-transferasas (HMTs) (Jenuwein and Allis, 2001; Strahl and Allis, 2000).



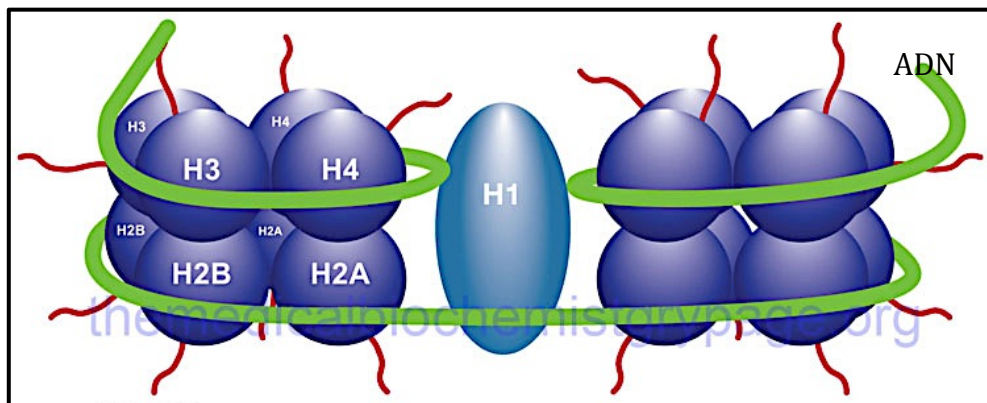
**Figura 1.28.** Esquema del proceso de acetilación de las histonas. HAT= Histona acetil-transferasa; HDAC= Histona deacetilasa.

A diferencia de la metilación del ADN, la modificación de histonas puede producir la activación o represión de genes dependiendo del residuo que es modificado y el tipo de modificación que se produce. Por ejemplo, la acetilación de

lisina se corresponde con una activación transcripcional (Hebbes et al., 1988; Kouzarides, 2007), mientras que la metilación de lisina conduce a la activación o represión transcripcional dependiendo de qué residuo es modificado y el grado de metilación (Sharma et al., 2010b).

### 1.6.3 Remodelación del nucleosoma

Los mecanismos no covalentes como la remodelación del nucleosoma y la sustitución de las histonas canónicas por variantes especializadas de histonas, también juegan un importante papel en la regulación de la estructura de la cromatina y la actividad génica. Además de servir como módulos básicos de empaquetamiento del ADN en la célula, los nucleosomas regulan la expresión génica mediante la regulación de la accesibilidad a las secuencias de ADN reguladoras para los factores de transcripción (Jiang and Pugh, 2009) (Figura 1.29).



**Figura 1.29.** Esquema de un nucleosoma. Los nucleosomas se encuentran constituidos por octámeros de histonas de tipo H2A, H2B, H3 y H4. La histona H1 se localiza entre un nucleosoma y el siguiente y es denominada la histona de unión. Además, cada nucleosoma se encuentra rodeado por aproximadamente 150 pares de bases de ADN. Adaptado de <http://themedicalbiochemistrypage.org/dna.php>

Las regiones libres de nucleosoma (*Nucleosome-Free Regions*, NFRs) se localizan en los extremos 5' y 3' de los genes y se cree que proporcionan los sitios para el acoplamiento y desacoplamiento de la maquinaria de transcripción (Yuan et al., 2005). La pérdida del nucleosoma justo antes del comienzo del sitio de transcripción está estrechamente relacionado con la activación génica (Lin et al., 2007; Shivaswamy et al., 2008).

La modulación de las NFRs está regulada por los complejos de remodelación de la cromatina dependientes de ATP, que modifican la accesibilidad de los sitios reguladores del ADN a través del deslizamiento y expulsión de los nucleosomas (Smith and Peterson, 2004). La interacción de la maquinaria de remodelación del nucleosoma con la metilación del ADN y la modificación de las histonas, juega un papel fundamental en el establecimiento de los patrones de expresión génica global y la arquitectura de la cromatina (K N et al., 2005; Wysocka et al., 2006).

Además de las alteraciones físicas en el posicionamiento del nucleosoma a través de los remodeladores del nucleosoma, la incorporación de variantes de histonas en los nucleosomas también influye en la localización del nucleosoma y por tanto en la actividad génica (Santenard and Torres-Padilla, 2009; Sarma and Reinberg, 2005). A diferencia de la mayoría de los subtipos de histonas cuya síntesis e incorporación está acoplada a la replicación del ADN en fase S, estas variantes son sintetizadas e incorporadas a la cromatina a lo largo del ciclo celular (Santenard and Torres-Padilla, 2009). Como las histonas canónicas, las variantes de histonas son susceptibles de diversas modificaciones postraduccionales que determinan su localización nuclear y su función (Sharma et al., 2010b).

La inclusión de las variantes de histonas en el nucleosoma proporciona, por tanto, un mecanismo epigenético adicional utilizado por las células para modificar la estructura de la cromatina de acuerdo con las necesidades de los diversos procesos celulares (Sharma et al., 2010b).

#### **1.6.4 Micro ARNs**

Los micro ARNs (miARNs) son ARNs no codificantes de pequeño tamaño (alrededor de 22 nucleótidos) que regulan la expresión de genes a través del silenciamiento post-traduccionales de genes diana. Su efectividad reside en su capacidad para actuar a través de mecanismos muy simples y a la vez altamente específicos. La hibridación de la secuencia de bases específica de los miARNs con las regiones 3' no traducibles de los ARN mensajeros diana dentro de los complejos de inducción de

silenciamiento, resulta en la degradación (cuando hay una complementariedad de bases perfecta) o inhibición de la traducción del ARN mensajero diana (cuando el emparejamiento de bases no es completo) (Caffarelli and Filetici, 2011; He and Hannon, 2004).

Los miARNs son específicos de tejido y controlan una amplia variedad de procesos biológicos como la proliferación, apoptosis y diferenciación (Sharma et al., 2010b). Como los genes normales, la expresión de los miARNs puede estar regulada por mecanismos epigenéticos (Saito and Jones, 2006). Además, los miARNs pueden a su vez modular mecanismos epigenéticos de regulación dentro de la célula mediante la interacción con las enzimas responsables de la metilación del ADN (DNMT3a y DNMT3b) y la modificación de histonas (Fabbri et al., 2007; Friedman et al., 2009).

La interacción entre los diferentes componentes de la maquinaria epigenética enfatiza la naturaleza integrada de los mecanismos epigenéticos implicados en el mantenimiento de los patrones de expresión génica global (Sharma et al., 2010b).

### ***1.6.5 Epigenética y cáncer***

La epigenética del cáncer está caracterizada por cambios globales en la metilación del ADN y en los patrones de modificación de histonas así como en la expresión de perfiles alterados de las enzimas de modificación de la cromatina. Estos cambios epigenéticos producen una desregulación global de los perfiles de expresión génica que conducen a la progresión y desarrollo del cáncer (Egger et al., 2004). Además se producen epimutaciones que provocan el silenciamiento de genes supresores de tumores, que inhiben el crecimiento celular y la supervivencia, y la promoción de la tumorigénesis por activación de oncogenes, que promueven la proliferación celular y la mitosis (Caffarelli and Filetici, 2011; Sharma et al., 2010b).

Los mecanismos que conducen a estos cambios epigenéticos no se conocen totalmente todavía. Sin embargo, estas alteraciones epigenéticas, al igual que las mutaciones genéticas, son mitóticamente hereditarias y pueden ser seleccionadas

rápidamente por una población celular del cáncer confiriéndoles una ventaja adaptativa que resulte en un crecimiento descontrolado de las células tumorales (Sharma et al., 2010b).

Actualmente se sabe que la activación y represión de genes relacionados con el cáncer puede ser debida tanto a alteraciones genéticas como a alteraciones epigenéticas. Los cambios genéticos consisten en una pérdida o amplificación de genes relacionados con el cáncer, mientras que las modificaciones epigenéticas pueden consistir en la activación de oncogenes o el silenciamiento de genes supresores de tumores que finalmente provocan una transformación celular y una proliferación celular descontrolada (Caffarelli and Filetici, 2011).

#### **1.6.5.1 Cronología de la epigenética y el cáncer**

En los últimos años se ha considerado que las alteraciones epigenéticas están implicadas en la patogénesis de diversas enfermedades. Especialmente la metilación aberrante del ADN está profundamente implicada en el desarrollo y progresión del cáncer, ya que los patrones de metilación del ADN son heredados con una alta fidelidad en las células somáticas (Ushijima et al., 2003). Además, la metilación aberrante del ADN es uno de los principales mecanismos de inactivación de los genes supresores de tumores junto con las mutaciones y las alteraciones cromosómicas (Ushijima, 2005).

La primera vez que se detectaron alteraciones epigenéticas en cáncer fue en 1983, cuando se descubrió una hipometilación global del ADN que se reflejaba en un descenso del contenido en 5-metilcitosina. Feinberg y Vogelstein analizaron la metilación del ADN en tejidos cancerosos y no cancerosos mediante *Southern blot*, utilizando ADN digerido con enzimas de restricción sensibles a metilación. En este estudio demostraron una reducción sustancial de la metilación del ADN en tejidos cancerosos (Feinberg and Vogelstein, 1983). Por otro lado, Gama-Sosa y colaboradores también investigaron las diferencias en los niveles de metilación del ADN entre tejidos cancerosos y no cancerosos mediante cromatografía líquida de alta resolución, observando una reducción del contenido de 5-metilcitosinas en tejidos

cancerosos (Gama-Sosa et al., 1983). Actualmente, aunque se han realizado diversos estudios sobre la hipometilación de oncogenes (Akiyama et al., 2003; Cho et al., 2001; Nishigaki et al., 2005; Sato et al., 2003), la activación de oncogenes por hipometilación es todavía controvertida ya que por un lado las regiones analizadas en la mayoría de los estudios se encuentran fuera de la región promotora que controla la expresión del gen, y por otro lado algunos oncogenes carecen de islas CpG en sus regiones promotoras (Hattori and Ushijima, 2014).

Una década después del descubrimiento de la primera evidencia de la presencia de modificaciones epigenéticas en cáncer por hipometilación, se demostró que la hipermetilación regional del ADN era la causa del silenciamiento del gen supresor de retinoblastoma humano (Ohtani-Fujita et al., 1993). Esta hipermetilación regional del ADN en cáncer supone un incremento de la metilación en islas CpG normalmente desmetiladas. La hipermetilación regional en islas CpG en el promotor de genes supresores de tumores puede inactivar dichos genes favoreciendo el desarrollo y progresión tumoral (Ushijima, 2005).

Por otro lado, el fenotipo metilador de islas CpG fue detectado por primera vez en tumores colorrectales en 1999 (Toyota et al., 1999a) y posteriormente este fenotipo comenzó a aparecer en otros tipos de cáncer como cáncer gástrico (An et al., 2005; Toyota et al., 1999b), neuroblastoma (Abe et al., 2005; Hill et al., 2014) y gliomas (Mack et al., 2014; Noushmehr et al., 2010). El fenotipo metilador de islas CpG se define como una metilación frecuente de múltiples islas CpG. Este fenotipo está asociado con características clínico-patológicas específicas de los diferentes tipos de cáncer, de manera que este fenotipo proporciona una valiosa información para el diagnóstico del cáncer y podría ser utilizada para estratificar a los pacientes y aplicar una terapia dirigida a cada uno de los grupos establecidos (Hattori and Ushijima, 2014). Por ejemplo, el fenotipo metilador de islas CpG en cáncer colorrectal está asociado a tumores en mujeres de edad avanzada localizados en el colon derecho. En la actualidad, el análisis del fenotipo metilador de islas CpG en neuroblastoma ha comenzado a estar comercialmente disponible en Japón (Hattori and Ushijima, 2014).

En cuanto a la modificación de histonas, el impacto de los inhibidores de la histona deacetilasas en la proliferación celular del cáncer fue descubierto en los años 90 (Hoshikawa et al., 1994). La hipótesis del código de histonas fue propuesto por Jenuwein y Allis en 2001, para explicar cómo las combinaciones de las modificaciones de histonas contribuye a alteraciones en la estructura de la cromatina y cambios en la expresión de los genes (Jenuwein and Allis, 2001). Actualmente, en diversos tipos de cáncer, se han descrito alteraciones de las modificaciones de histonas tanto a nivel global como específico de genes (Hattori and Ushijima, 2014). En 2005 por primera vez, Fraga y colaboradores demostraron que en cáncer colorrectal y leucemia se producía una disminución de la expresión de la histona H4K16ac y la histona H4K20me3 (Fraga et al., 2005).

La primera correlación entre la expresión aberrante de miARNs y cáncer derivó de la observación de que la expresión de los miARNs, miR15a y miR16-1, se encontraba disminuida en las muestras de tejidos cancerosos con respecto a las muestras de tejido sano. Además se observó que los genes que codifican para estos miARNs se localizan en el cromosoma 13q14 en una región que normalmente se encuentra delecionada en leucemia linfocítica crónica de células B y otros tipos de cáncer (Calin et al., 2002). Unos años más tarde se descubrió que se producían cambios significativos en los niveles de expresión de los miARNs en diversos tumores, que no estaban correlacionados con anormalidades citogenéticas evidentes. Esto sugería que los niveles de expresión alterados de los miARNs podrían deberse a una disfunción en su biosíntesis o procesamiento. Estas disfunciones podrían resultar en la pérdida o ganancia de funcionalidad de los miARNs, contribuyendo a la iniciación, progresión y metástasis tumoral (He et al., 2005). En los últimos años se ha establecido que un miARN puede funcionar como oncogen o como gen supresor de tumores en la carcinogénesis dependiendo de su nivel de expresión. En concreto, si un miARN es sobre-expresado en tumores primarios con respecto a tejido sano podría considerarse como un potencial oncogen. Por el contrario, si un miARN presenta una disminución de su expresión en tejido tumoral respecto a tejido sano, podría considerarse como un potencial gen supresor de tumores (Caffarelli and Filetici, 2011; Iorio and Croce, 2012).



## 2. OBJETIVOS

---



En base a los resultados previos del grupo y con objeto de ampliar el conocimiento en relación al papel que desempeñan MDGA1 y MDGA2 en líneas celulares en cultivo y en muestras procedentes de distintas patologías tumorales humanas, se proponen los siguientes objetivos:

1. Generar líneas celulares de MDCK que expresen de manera estable las proteínas MDGA1, MDGA2 o las dos proteínas truncadas de MDGA2: MAMGPI o IgGPI.

Las líneas celulares estables de MDCK generadas se utilizarán para realizar el estudio de las propiedades de migración, invasión y adhesión de las proteínas MDGA1 y MDGA2.

2. Investigar la implicación de MDGA2 en migración y adhesión celular.

Teniendo en cuenta los estudios previos del grupo que demuestran la implicación de MDGA1 en migración y adhesión celular, se pretende realizar estudios similares para investigar la implicación de MDGA2 en migración, adhesión célula a célula y adhesión célula a proteínas de la matriz extracelular.

3. Estudiar la implicación de MDGA1 y MDGA2 en invasión celular.

Así mismo, se propone investigar el comportamiento de MDGA1 y MDGA2 en relación a la invasión celular.

4. Analizar la expresión de *MDGA1* y *MDGA2* mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) en diferentes patologías tumorales humanas.

Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que la expresión de *MDGA1* y *MDGA2* se encuentra disminuida en muestras tumorales de distintas patologías humanas. Dado que este estudio se realizó en un número reducido de tumores, se propone ampliar este estudio a un número mayor de muestras tumorales procedentes de pacientes con cáncer no microcítico de pulmón, cáncer colorectal, cáncer gástrico y cáncer de esófago. Para ello se llevará a cabo mediante qRT-PCR un estudio comparativo de expresión de

ambos genes en tumores y muestras no tumorales. Además se explorará la posible asociación entre los niveles de expresión de *MDGA1* y *MDGA2* y las variables clínico-patológicas de los tumores. Se realizarán estudios de pronóstico basados en la expresión de ambos genes en las patologías tumorales analizadas.

5. Analizar la expresión de *MDGA1* y *MDGA2* mediante inmunohistoquímica en diferentes patologías tumorales humanas.

Con objeto de comprobar si la disminución de la expresión de los genes se corresponde con una disminución de la expresión de la proteína, se realizará un estudio comparativo de la expresión de las proteínas *MDGA1* y *MDGA2* en tejidos tumorales y no tumorales procedentes de pacientes con cáncer no microcítico de pulmón, cáncer colorectal, cáncer gástrico y cáncer de esófago. Para ello se utilizarán anticuerpos específicos frente a cada una de las proteínas MDGAs.

6. Investigar el estado de metilación de las regiones promotoras de los genes *MDGA1* y *MDGA2*.

Durante la progresión del cáncer se producen alteraciones en la metilación del DNA que conducen al silenciamiento de genes, generalmente debido a una hipermetilación de las islas CpG de los promotores. Con objeto de explicar la disminución de expresión de los genes *MDGA1* y *MDGA2* observada en tumores, se estudiará el estado de metilación de la secuencia promotora de *MDGA1* y *MDGA2* en muestras tumorales y no tumorales de pacientes con cáncer colorectal.

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**



### 3.1 Construcciones de MDGA1 y MDGA2

#### 3.1.1 Construcciones de MDGA1 y MDGA2 utilizadas

Las construcciones de MDGA1 y MDGA2 utilizadas en este trabajo fueron generadas previamente en nuestro laboratorio (Díaz-López, 2007). La construcción pFLAG-MDGA1 fue generada mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando como molde el clon de ADNc 2782838 de IMAGE, que contiene la secuencia traducible completa de la proteína humana MDGA1, y los primers directo (D) 5'-GGGAATTTCGATGGAGGTGACCTGCCTTCT-3' y reverso (R) 5'-GGTCTAGATCATCTCTGCAACGCCAAGAGG- 3'. Las construcciones pFLAG-MDGA2 y pFLAG-MAMGPI (MDGA2) se generaron a partir de ARN de cerebro humano mediante retrotranscripción-PCR (RT-PCR) utilizando los primers 5' TGAAACAAAACCAGCCATGAC 3' (para la RT) y (D) 5' CCCGCGGCCGCGCAAGGAGTGTACGCTCCTCCC 3' y (R) 5' CCGGATCCTCACCTTCGAGGACTTAAGATAGAGATGAGGA 3' (para la PCR). Posteriormente, los productos de PCR fueron clonados en el vector pSTBLUE-1 (Novagen) y subclonado en el vector pFLAG-CMV-3 (Sigma). La construcción pFLAG-IgGPI fue generada por la casa comercial Tebu-Bio. Estas construcciones fueron utilizadas para transformar bacterias competentes *E. Coli* DH5 $\alpha$ .

#### 3.1.2 Producción y purificación de los plásmidos mediante

##### *Maxi-Prep*

Los plásmidos fueron purificados y concentrados utilizando el kit Plasmid Maxi-Kit (Qiagen). Para ello, las bacterias *E. Coli* DH5 $\alpha$  previamente transformadas, se sembraron en placas Petri de LB (Luria Bertani) agar en presencia de ampicilina 100  $\mu$ g/ml, el antibiótico de resistencia presente en el vector pFLAG-CMV-3 (Figura 3.1). Las colonias aisladas se picaron y se crecieron en 3 ml de LB suplementado con el antibiótico de selección, durante 8 horas a 37°C en agitación orbital. Posteriormente, estos 3 ml fueron adicionados a 100 ml de medio LB suplementado con el antibiótico de selección y se crecieron a 37°C en agitación orbital durante 16 horas.

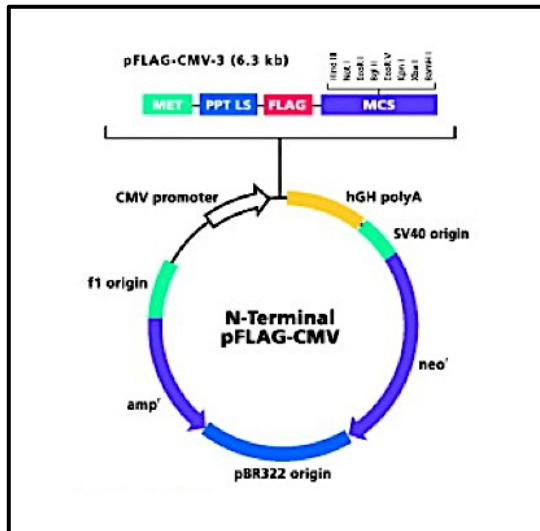


Figura 3.1. Mapa de restricción del plásmido pFLAG-CMV3 utilizado para clonar las construcciones de MDGA1 y MDGA2.

Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a la purificación del ADN plasmídico siguiendo el protocolo del kit de Qiagen. La resuspensión del ADN plasmídico se realizó en 100 µl de agua ultrapura estéril (AUE).

La preparación de los “glicerol stock” se realizó mediante la adición de 200 µl de glicerol 87% estéril a 800 µl del cultivo bacteriano, conservándose posteriormente a -80°C.

### 3.1.3 Valoración del ADN plasmídico por espectrofotometría

La cuantificación de ADN se realizó mediante la medida de las absorbancias a 260 y 280 nm utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-Visible. La lectura a 260 nm permite calcular la concentración de ácidos nucleicos de la muestra teniendo en cuenta que una unidad de densidad óptica (D.O.) a 260 nm se corresponde con 50 µg/ml de ADN de doble cadena (Sambrook et al, 1989).

La lectura a 280 nm se corresponde con la absorbancia de proteínas y algunos disolventes orgánicos como el fenol. Una relación de absorbancias A260/A280 comprendida entre 1.8 y 2 indicaba un grado de pureza adecuado de los ácidos nucleicos.

### 3.1.4 Digestión y secuenciación del ADN plasmídico

Una vez valorado el ADN plasmídico, se llevó a cabo una digestión del mismo con las enzimas de restricción adecuadas durante 3 horas a 37°C con el fin de comprobar la incorporación de las construcciones en el vector.

A continuación se procedió a la secuenciación de cada construcción para verificarlas. La secuenciación se llevó a cabo en la Unidad de Genómica del Campus de Moncloa del Parque Científico de Madrid (PCM-UCM).

## 3.2 Cultivos celulares

### 3.2.1 Líneas celulares utilizadas

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo fueron las siguientes:

**Tabla 3.1.** Líneas celulares utilizadas. La línea MDCK (*Madin-Darby canine kidney epithelial cells*) fue suministrada por ATCC. La línea HeLa fue cedida por la Dra. Narcisa Martínez Quiles (Facultad de Farmacia UCM).

Línea celular	Especie	Descripción	Morfología
MDCK	<i>Canis familiaris</i>	Células renales	Epitelial
HeLa	<i>Homo sapiens</i>	Adenocarcinoma de cérvix	Epitelial

Todas las líneas celulares utilizadas eran cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium) glucosa 4.5g/l, al que se le adicionaba 10% de suero bovino fetal (FBS), Hepes 20 mM y L-glutamina 2mM. Además se adicionaba el antimicótico anfotericina B (Gibco® Life Technologies), una mezcla de antibióticos comercial que contenía penicilina y estreptomina (Gibco® Life Technologies), y un antibiótico frente a micoplasma (MycoZap™ Antibiotic Plus-CL, Lonza). El cultivo se realizaba en un incubador (Thermo forma) a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

Todas las soluciones y los tampones empleados para el cultivo se preparaban en cabina de flujo laminar y se esterilizaban mediante filtros Millipore de 0,22 µm de tamaño de poro.

### 3.2.2 Almacenamiento

Las células se almacenaban congeladas en nitrógeno líquido a  $-170^{\circ}\text{C}$ , suspendidas en suero bovino fetal (FBS) suplementado con un 10% de dimetil-sulfóxido (DMSO).

### 3.2.3 Congelación/descongelación

Para la congelación de células se partía de una placa de cultivo confluyente, se lavaba un par de veces con solución salina tampón fosfato (PBS Dulbeccos's, Life Technologies) estéril al que se le adicionaba un volumen del antimicótico anfotericina B (Gibco® Life Technologies) y una mezcla de antibióticos que contenía penicilina y estreptomycin (Gibco® Life Technologies), y se ajustaba el pH a 7.4 con NaOH. A continuación se procedía a la tripsinización de las células con 0,25% tripsina-0,02% EDTA. La tripsinización se paraba con suero bovino fetal con 10% DMSO, y las células se guardaban en un vial de criopreservación. A continuación, se llevaba a cabo una congelación progresiva de las mismas, comenzando por una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas. Una vez completado ese tiempo se mantenían a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 15-24 horas. Por último se introducían en el criopreservador de nitrógeno líquido a  $-170^{\circ}\text{C}$ .

Por el contrario, la descongelación que debía ser rápida, se realizaba pasando los viales directamente del nitrógeno líquido a un baño a  $37^{\circ}\text{C}$  para ser inmediatamente sembradas.

### 3.2.4 Transfección de células MDCK

La transfección de las diferentes construcciones en las células MDCK se llevó a cabo utilizando el kit de transfección *Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent* (Invitrogen™ Life Technologies). Para ello, se sembraron las células MDCK en medio DMEM suplementado con 10% de FBS de manera que tras 12 horas de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  en una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%, se alcanzaba una confluencia de

alrededor del 40-50% en el momento de la transfección. Para una placa de 6 pocillos, se utilizaron 4 µg del ADN plasmídico y 10 µl del reactivo Lipofectamina 2000 diluidos en Opti-MEM (Life Technologies) según las indicaciones del fabricante. En primer lugar se diluían 4 µg del ADN plasmídico en 250 µL de medio Opti-MEM. Por otro lado, 10 µl del reactivo Lipofectamina 2000 fueron diluidos en 250 µl de Opti-MEM y se incubó la mezcla durante 5 minutos. A continuación, 250 µl de la Lipofectamina 2000 diluidos en medio Opti-MEM, se adicionaron a la mezcla que contenía los 4 µg del ADN plasmídico diluidos en 250 µl de medio Opti-MEM. Esta mezcla se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Por último, 100 µl de esta solución fue aplicada gota a gota sobre las células (en medio Opti-MEM). A las 6 horas, el medio era remplazado por medio DMEM completo y suplementado con antibióticos.

### **3.2.5 Generación de líneas celulares estables**

Se generaron cinco líneas celulares MDCK que incorporaron de manera estable las siguientes construcciones: pFLAG, pFLAG-MDGA1, pFLAG-MDGA2, pFLAG-MAMGPI (MDGA2) o pFLAG-IgGPI (MDGA2). Para ello, 48 horas después de la transfección con las correspondientes construcciones, las células se tripsinizaron y se sembraron en medio DMEM 10% FBS al que se le adicionó el antibiótico de selección Geneticina (G418 Invitrogen) a una concentración de 750 µg/ml. La selección se llevó a cabo durante 15 días, tras los cuales se procedió a analizar la expresión de las distintas proteínas en las líneas celulares generadas.

### **3.2.6 Purificación de las líneas celulares mediante FACS**

En el caso de las líneas celulares policlonales estables pFLAG-MDGA2 y pFLAG-IgGPI (MDGA2), fue necesario realizar una purificación mediante FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*). El objetivo era incrementar el número de células que expresaban las proteínas objeto de estudio, ya que las líneas celulares policlonales obtenidas directamente por transfección y seleccionadas con geneticina presentaron un porcentaje de células positivas inferior al 20%. Esta técnica consiste en la

separación de subpoblaciones celulares en suspensión a medida que atraviesan una boquilla, la cual produce una vibración a una frecuencia óptima para la generación de gotas a una distancia fija desde la boquilla, de manera que cada gota contiene una sola célula. A continuación, estas células son iluminadas por un rayo láser, de manera que parte de la luz emitida por el láser es dispersada por la célula y esto permite cuantificar el número de células que hay en la muestra y medir el tamaño de cada una de ellas. Además, debido a que las células que expresan la proteína objeto de estudio son marcadas previamente con un anticuerpo específico conjugado con una molécula fluorescente, al ser iluminadas por el láser, el fluoróforo es excitado emitiendo luz visible que es detectada por el tubo fotomultiplicador o detector de luz. En el último paso, las gotas adquieren una carga eléctrica determinada por el ordenador, de manera que al pasar por unos electrodos las células son separadas en tres tubos: uno que contiene las células que expresan la proteína de interés (carga positiva), otro con las gotas vacías (sin carga eléctrica), y un tercer tubo con el resto de las células que no expresan la proteína objeto de estudio (carga negativa) (Figura 3.2).

Para llevar a cabo la purificación de las líneas celulares (pFLAG-MDGA2 y pFLAG-IgGPI) mediante FACS, las células se lavaron 2 veces con PBS (sin calcio ni magnesio) y se tripsinizaron. A continuación se centrifugaron 5 minutos a 3000xg, se decantaba el sobrenadante y se lavaban con una solución FACS de PBS con 0,5%BSA y EDTA 5 mM. Tras centrifugar de nuevo 5 minutos a 3000xg, se llevaba a cabo un bloqueo para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos, durante 30 minutos a temperatura ambiente con una solución de PBS con 10% de suero de cabra. Tras un lavado con PBS, se procedía a la incubación con el anticuerpo anti-FLAG-FITC (Sigma) a una dilución 1:100 en solución FACS, durante una hora a temperatura ambiente. Tras dos lavados, las células se resuspendían en medio FACS y se pasaban por el citómetro de flujo.

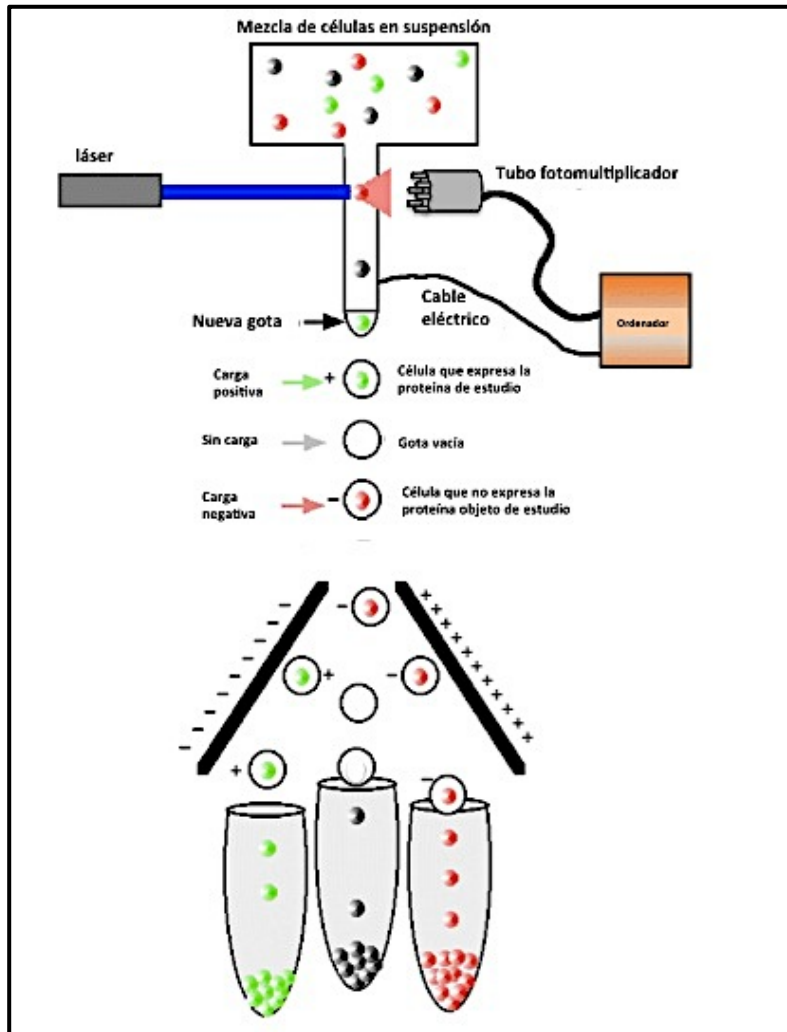


Figura 3.2. Esquema de funcionamiento de FACS. Imagen modificada de <http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/facs.html>

### 3.2.7 Ensayos de migración

#### 3.2.7.1 Estudio de la capacidad migratoria mediante el ensayo de la herida

La capacidad migratoria de las líneas celulares estables MDCK (pFLAG, pFLAG-MDGA1 y pFLAG-MDGA2) se investigó mediante el ensayo de la herida. Las células se sembraron a una densidad adecuada para obtener una monocapa de células confluyente a las 12 horas. A continuación se realizaba una brecha o herida en la monocapa de células utilizando una punta de pipeta estéril de 200 µl, tras lo cual se lavaba dos veces con PBS para eliminar las células que pudieran haberse despegado, y se reemplazaba el medio de cultivo por medio DMEM sin suero. Mediante

microscopía confocal en células vivas (*time-lapse microscopy*), se tomaron fotografías del mismo campo microscópico cada 10 minutos durante 15 horas. Para ello se utilizó un microscopio de contraste de fase (*Multifield Time-Lapse Widefield Fluorescence Olympus IX71*) acoplado a una cámara *Andor Camera Olympus*. El software utilizado para la captura de imágenes fue Andor iQ1.9.1. Para el análisis y procesamiento de las imágenes se utilizó el programa ImageJ 1.46. El análisis de la migración se realizó cada 3 horas (3, 6, 9, 12 y 15 horas) tras la realización de la herida, midiendo el avance de las células hacia el centro de la herida. En cada herida se analizaron al menos dos campos microscópicos diferentes y se realizó la media del avance de las células en todos los campos microscópicos de una misma herida. Además este experimento se realizaba por duplicado, llevándose a cabo al menos 6 experimentos independientes.

### 3.2.7.2 Estudio de la capacidad migratoria mediante cámaras Transwell

La capacidad migratoria de las líneas celulares estables MDCK (pFLAG, pFLAG-MDGA1 y pFLAG-MDGA2) se investigó también mediante el uso de



**Figura 3.3.** Ejemplo de las cámaras transwell. utilizadas.

cámaras transwell (Becton Dickinson).

Se utilizaron placas de 24 pocillos, cada uno de los cuales contenía una cámara transwell compuesta por dos compartimentos, superior e inferior, separados entre sí por un filtro de tereftalato de polietileno (PET), con un tamaño de poro de 8 micras (Figura

3.3). Las cámaras se hidrataron con medio DMEM sin suero durante 2 horas a 37°C, tras lo cual, este medio era eliminado y las cámaras se sembraban con  $3 \times 10^4$  células resuspendidas en 500  $\mu\text{l}$  de medio sin suero. A continuación se adicionaban a los pocillos 750  $\mu\text{l}$  de medio suplementado con un 10% de FBS. Las células se incubaron durante 24 horas a 37°C en una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%. Durante este tiempo, las células con capacidad migratoria atravesaron el filtro pasando del compartimento superior al inferior. A continuación, se eliminaron con un bastoncillo las células que

no habían migrado al compartimento inferior. Posteriormente las células que sí habían migrado, y que por tanto se encontraban en el compartimento inferior, fueron fijadas con metanol durante 10 minutos y posteriormente teñidas con cristal violeta 0.2% en etanol 2% durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación se eliminó el exceso de colorante con agua destilada y se dejaron secar los filtros.

Para cuantificar la capacidad migratoria de las líneas celulares estables se realizó un conteo celular correspondiente a 10 campos microscópicos elegidos al azar utilizando un microscopio invertido.

### 3.2.8 Ensayo de invasión celular

Para valorar la capacidad invasiva de las líneas celulares estables (pFLAG, pFLAG-MDGA1 y pFLAG-MDGA2), se utilizaron cámaras transwell (placas de 24 pocillos) provistas de filtros de tereftalato de polietileno (PET) de 8  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro, tapizados con una mezcla de proteínas de matriz extracelular; *BioCoat*<sup>TM</sup> *Matrigel*<sup>TM</sup> *Invasion Chambers* (Becton Dickinson) (Figura 3.4).

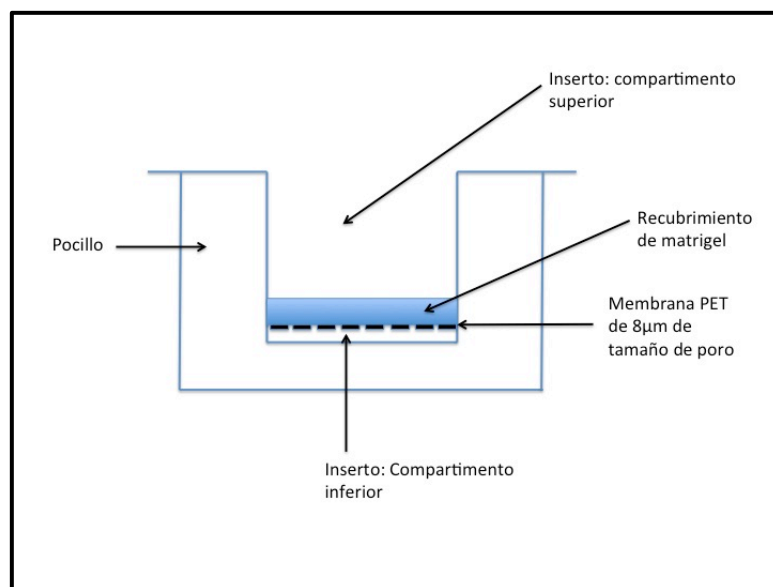


Figura 3.4. Esquema de una cámara transwell para ensayos de invasión.

Las cámaras se hidrataron con medio sin suero durante 2 horas a 37°C, tras lo cual, este medio era eliminado y las cámaras se sembraron con  $3 \times 10^4$  células resuspendidas en 500  $\mu\text{l}$  de medio sin suero. A continuación se adicionaron en los pocillos 750  $\mu\text{l}$  de medio suplementado con un 10% de FBS y las células se

incubaron durante 24 horas a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se eliminaron con un bastoncillo las células no invasivas, así como el matrigel. Las células que habían sido capaces de atravesar el matrigel, y que por tanto se encontraban en el compartimento inferior, fueron fijadas con metanol durante 10 minutos y posteriormente teñidas con cristal violeta 0.2% en etanol 2% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Una vez eliminado el exceso de colorante con agua destilada, se dejaron secar los filtros y se cuantificó la capacidad invasiva de las células como se ha descrito en el punto anterior (2.7.2).

### **3.2.9 Ensayo de proliferación celular**

Se realizó un ensayo de proliferación celular con objeto de descartar que las diferencias observadas en la capacidad migratoria e invasiva de las líneas celulares estables utilizadas (pFLAG, pFLAG-MDGA1 y pFLAG-MDGA2) era debida a diferencias en la capacidad proliferativa de las mismas. Se sembraron  $2 \times 10^3$  células/pocillo en placas de 96 pocillos y se incubaron a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub> en medio DMEM en ausencia de suero. A intervalos de 24 horas (24, 48, 72 y 96 horas) las células se fijaron con cristal violeta 0.2% en etanol 2% durante media hora. Posteriormente se lavaron con agua destilada hasta eliminar totalmente el exceso de cristal violeta y se dejaron secar bien. Para cuantificar el colorante fijado a las células, se añadió 100 µl de SDS 1% (Sodio Dodecil Sulfato) y se midió la absorbancia a 560 nm en un lector de placas *PowerWave XS microplate reader* (BioTek). En cada intervalo de tiempo indicado se midió la absorbancia en un total de 6 pocillos.

### 3.2.10 Ensayos de adhesión celular

#### 3.2.10.1 Ensayo de adhesión célula-matriz extracelular

La capacidad de adhesión de las líneas celulares estables (pFLAG, pFLAG-MDGA2, pFLAG-IgGPI y pFLAG-MAMGPI) a proteínas de matriz extracelular fue analizada mediante el kit de *cytoselect* de adhesión celular (CytoSelect™, Cell Biolabs). Este kit contenía placas de 48 pocillos que habían sido tapizadas con diferentes proteínas de matriz extracelular: fibronectina, colágeno IV y fibrinógeno de procedencia humana, laminina I de procedencia murina y colágeno I de procedencia bovina.

Para el ensayo se sembraron  $2,5 \times 10^5$  células/pocillo de cada una de las líneas celulares por duplicado y fueron incubadas 1 hora a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en medio DMEM en ausencia de suero. Finalizada la incubación, las células fueron lavadas 5 veces con PBS y se fijaron y tiñeron siguiendo las indicaciones del fabricante. Para cuantificar la adhesión relativa de las células, se realizó una lectura espectrofotométrica del colorante fijado a una longitud de onda de 560nm en un lector de placas *PowerWave XS microplate reader* (BioTek).

#### 3.2.10.2 Ensayo de adhesión célula-célula

Para valorar la capacidad de adhesión célula a célula, se utilizó el kit *Vibrant® Cell Adhesion Assay* (Molecular Probes). Este kit está basado en la utilización del éster acetoximetil calceína (Calceína AM), una molécula no fluorescente que una vez incorporada por las células, es hidrolizada por esterasas endógenas produciendo una molécula de calceína fluorescente. La calceína proporciona un marcador de citoplasma celular altamente fluorescente que interfiere mínimamente en el proceso de adhesión, siendo un método muy sensible capaz de medir la adhesión celular en las distintas líneas celulares estables (Figura 3.5).

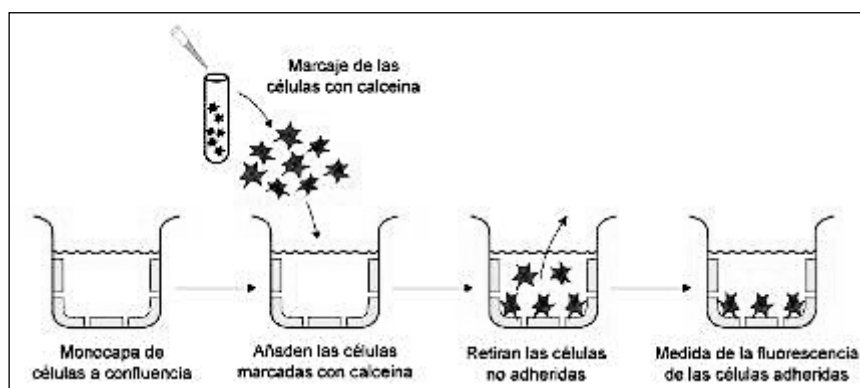


Figura 3.5. Esquema del protocolo del ensayo de adhesión célula-célula.

Se sembraron placas de 96 pocillos con  $5 \times 10^4$  células por pocillo y se incubaron 24 horas antes de realizar del ensayo, con medio DMEM completo suplementado con 10% de FBS, con objeto de obtener una monocapa de células a confluencia. Al día siguiente, las distintas líneas celulares se lavaron 2 veces con PBS y se resuspendieron en medio DMEM sin suero a una concentración de  $5 \times 10^6$  células/ml. A continuación las células se incubaron con calceína  $5 \mu\text{M}$  durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera con 5% de  $\text{CO}_2$ . Transcurrido este tiempo, las células se lavaron dos veces con medio DMEM sin suero atemperado, para eliminar el exceso de calceína. A continuación, las placas de 96 pocillos tapizadas con una monocapa de células confluyente se lavaron dos veces con PBS para eliminar el medio con suero en el que se habían sembrado el día anterior y  $100 \mu\text{l}$  de la suspensión de células incubadas en presencia de calceína fueron sembradas por pocillo ( $5 \times 10^5$  células/pocillo). Las placas se incubaron durante 2 horas a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera de  $\text{CO}_2$  del 5%. Posteriormente se eliminaron las células no adheridas por decantación y se realizaron 4 lavados con DMEM sin suero atemperado, con el fin de eliminar cualquier exceso de calceína. Finalmente se adicionaron  $200 \mu\text{l}$  de PBS/pocillo y se procedió a la lectura por fluorimetría de las células marcadas con calceína. Para ello se utilizó un filtro de fluorescencia con un máximo de absorbancia de  $480/20 \text{ nm}$  y un máximo de emisión de  $530/25 \text{ nm}$ , en un lector de fluorescencia en placa FL600 (Bio-Tek) usando el software KC4.

Con objeto de realizar un control de autofluorescencia, se realizó la medición de fluorescencia de las células no marcadas con calceína sobre una monocapa confluyente de células, omitiendo los lavados y adicionando  $100 \mu\text{l}$  de PBS/pocillo. Así

mismo, se realizó un control de fluorescencia total, sembrando células marcadas con calceína pero omitiendo los lavados y adicionando 100 µl de PBS/pocillo antes de realizar la medición fluorimétrica.

### 3.3 Tinciones para inmunofluorescencia

#### 3.3.1 Fijación, permeabilización y bloqueo de las células

La fijación de las células se realizó utilizando paraformaldehído 4% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, tras dos lavados con PBS, se realizaba una permeabilización celular con Triton X-100 0.2% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Esto permite disminuir el fondo que pueda generar el anticuerpo. Tras dos lavados con PBS, se realizaba un bloqueo con 3% BSA en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. El bloqueo se realizaba para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo.

#### 3.3.2 Anticuerpos primario y secundario

Las células se lavaban 3 veces con PBS y se incubaban con el anticuerpo primario a la dilución correspondiente en 3% BSA/PBS, durante 2 horas a temperatura ambiente (Tabla 3.2).

**Tabla 3.2.** Anticuerpos primarios utilizados en inmunocitoquímica.

Anticuerpo primario	Casa comercial (Ref.)	Origen	Dilución
Anti-FLAG	Sigma (F7425)	IgG Rabbit	1:500
GP854	Eurogentec	IgG Rabbit	1:200
Anti-Vinculina	Sigma (SAB4200080)	mAb IgG <sub>1</sub> Mouse	1:400
Anti-βcatenina	BD Biosciences (610154)	mAb IgG <sub>1</sub> Mouse	1:200
Anti-p120 catenina	BD Biosciences (612537)	mAb IgG <sub>1</sub> Mouse	1:400
Anti-Fosfotirosinas	Sigma (P5872)	mAb IgG <sub>1</sub> Mouse	1:1000

A continuación se realizaban 3 lavados con PBS y se procedía a la incubación con el anticuerpo secundario conjugado con diferentes fluoróforos a la dilución correspondiente en 3% BSA/PBS. La incubación se realizaba durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad (Tabla 3.3).

**Tabla 3.3.** Anticuerpos secundarios utilizados para inmunocitoquímica.

Anticuerpo secundario	Casa Comercial (Ref.)	Conjugado	Dilución
Goat anti-Rabbit	Invitrogen (A-11008)	Alexa Fluor 488	1:400
Goat anti-mouse	Invitrogen (A-11031)	Alexa Fluor 568	1:400
Anti-faloidina	Invitrogen (A12380)	Alexa Fluor 568	1:200

Tras la incubación con el anticuerpo secundario las células se lavaron 3 veces con PBS y se montaron sobre un portaobjetos con el líquido de montaje *Fluor-Save Reagent* (Calbiochem).

### 3.3.3 Tinción de núcleos con DAPI

DAPI es un compuesto fluorescente azul que se une preferentemente a DNA de doble cadena en las secuencias ricas en AT. La tinción de los núcleos se realizaba incubando las células con DAPI ( 4'6' Diamidin-2' fenil indol) 1 $\mu$ M durante 10 minutos en oscuridad.

### 3.3.4 Microscopio confocal

La visualización de las células mediante microscopía confocal fue realizada en la Unidad de Microscopía Confocal del CNIO (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas) de Madrid y en la Unidad de Microscopía Confocal del King's College London. El microscopio confocal utilizado fue un Axioplan 2 Imaging (Zeiss, Oberkochen, Alemania). El software utilizado para la captura de imágenes fue LSM510 Meta. Las imágenes fueron tomadas con un objetivo de 63X y 40X y siempre con aceite de inmersión.

## 3.4 Inmunodetección de proteínas

### 3.4.1 Obtención de los extractos proteicos

Las células fueron lavadas 2 veces con PBS a 4°C y se les adicionó 500 µl de un tampón de lisis comercial (Roche). Tras recoger el lisado, se pasó a tubos eppendorf que se mantuvieron en hielo durante 30 minutos. A continuación fueron centrifugados 20 minutos a 13000xg a 4°C y se recogió el sobrenadante correspondiente al extracto proteico.

### 3.4.2 Valoración de proteínas del extracto proteico

La concentración de proteínas del extracto proteico fue cuantificada mediante el método de Bradford (Bradford, M.M., 1976). El método se basa en el cambio de la absorción en el espectro del azul de Coomassie cuando interacciona con las proteínas. Los incrementos en la absorción del colorante medidos a 595 nm pueden ser relacionados con la concentración de proteínas. Como solución patrón para elaborar la curva de calibrado se empleó una solución de seroalbúmina bovina (BSA) a una concentración de 0.5 µg/µl. Para el ensayo, se cuantificó la absorbancia a 595 nm de una mezcla de 4 µl del extracto proteico en 1 ml del reactivo de Bradford (Bio-Rad) diluído 1:5 en agua destilada.

### 3.4.3 Western Blot

#### 3.4.3.1 Preparación de las muestras

Una vez valorados los extractos proteicos se recogió un volumen de extracto proteico correspondiente a 20 µg y se adicionó laemmlí buffer compuesto por Tris-Hcl 100 mM pH 6.8, glicerol 5% (v/v), SDS 2% (p/v), 2-mercaptoetanol 1% (v/v), azul de bromofenol 0,004% (p/v) (Laemmlí, U.K., 1970); completando la mezcla con tampón de electroforesis hasta un volumen final de 50 µl. Las muestras eran desnaturalizadas durante 5 minutos a 95°C y cargadas en geles SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*).

### 3.4.3.2 Electroforesis en geles de SDS-PAGE

La electroforesis en geles de poliacrilamida se realizó utilizando un equipo de electroforesis Mini-Protean 3 (Bio-Rad). Los geles de poliacrilamida constaban de un gel concentrador compuesto por acrilamida 5% y un gel separador compuesto por acrilamida 8% a partir de una solución al 30% de acrilamida/bisacrilamida 29:1 (Bio-Rad). Además, los geles contenían SDS 0.1% (p/v), persulfato amónico 0.1% (p/v), TEMED 0.243% y Tris 125 mM pH 6.8 (para el gel concentrador) ó 375 mM pH 8.8 (para el gel separador).

Las muestras preparadas y desnaturalizadas según el apartado anterior, se cargaron en el gel. Además se cargaba un marcador de peso molecular Precision Plus™ Dual Color (Bio-Rad).

Para el desarrollo de la electroforesis se utilizó un tampón compuesto por Tris-base 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM y SDS 0.1% (p/v) y el gel se corrió a un voltaje constante de 120V durante 2 horas.

### 3.4.3.3 Transferencia en semi-dry a membranas de nitrocelulosa

Una vez finalizada la electroforesis en geles SDS-PAGE, se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa Protran (Biotech), mediante paso de corriente eléctrica utilizando un equipo de transferencia *Trans-Blot SD Semi-dry Transfer Cell* (Bio-Rad) acoplado a una fuente de electroforesis. La transferencia se realizó a un voltaje constante de 15V durante 45 minutos. El tampón de transferencia utilizado estaba compuesto por Tris 48 mM pH 8.9, glicina 39 mM, 0.19% SDS (p/v) y 20% metanol (v/v).

### 3.4.3.4 Bloqueo e incubación con anticuerpos

Finalizada la transferencia, se realizó un bloqueo de los sitios de unión inespecíficos a proteínas incubando las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación suave, en una solución de bloqueo que contenía TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5) suplementado con un 5% de leche en polvo desnatada.

Posteriormente, se eliminó la solución de bloqueo y las membranas se incubaron durante 16 horas a 4°C en agitación suave con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo (Tabla 3.4).

**Tabla 3.4.** Anticuerpos primarios utilizados en los ensayos de Western blot.

Anticuerpo primario	Casa Comercial (Ref.)	Origen	Dilución
Anti-FLAG	Sigma (F7425)	IgG Rabbit	1:1000
GP854	Eurogentec	IgG Rabbit	1:500
Anti MDGA2	R&D (AF5184)	IgG Sheep	1:1000
Anti- $\beta$ -actina	Sigma (A5441)	IgG <sub>1</sub> Mouse	1:4000
Anti-GAPDH	Sigma (G8795)	IgM Mouse	1:10000

**Tabla 3.5.** Anticuerpos secundarios utilizados en los ensayos de Western blot.

Anticuerpo secundario	Casa Comercial (Ref.)	CONjugado	Dilución
Goat Anti-Mouse	Sigma (A4416)	HRP	1:3000
Goat Anti-Rabbit	Sigma (A6154)	HRP	1:1000
Donkey Anti-Sheep	Sigma (A3415)	HRP	1:5000

Al día siguiente, las membranas se lavaron 3 veces con TTBS (TBS con 0.05% de Tween-20) durante 30 minutos en agitación fuerte, tras lo cual se realizó la incubación con el anticuerpo secundario, frente a la fracción constante de las inmunoglobulinas de la especie en la que fue generado el anticuerpo primario, diluido en la solución de bloqueo (Tabla 3.5). Esta incubación se realizó durante una hora a temperatura ambiente en agitación suave. Finalmente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno en TTBS en agitación fuerte.

#### 3.4.3.5 Detección de anticuerpos por quimioluminiscencia

Para la detección de los anticuerpos secundarios, conjugados con una peroxidasa de rábano (HPR), se incubaron las membranas durante 1 minuto en los reactivos de quimioluminiscencia ECL *Western Blotting detection reagents* (Amersham, GE Healthcare). El sistema se basa en la emisión de luz del luminol al decaer a su estado basal, tras ser excitado como consecuencia de su oxidación en presencia de peróxido de hidrógeno en condiciones alcalinas. Para fijar la señal de luz se utilizaron placas de autorradiografía Hyperfilm™ MP (Amersham, GE Healthcare) y un aparato revelador CURIX 60 (Agfa).

#### 3.4.3.6 Borrado de las membranas de nitrocelulosa

En algunas ocasiones se recurrió al borrado de las membranas para hacer una nueva hibridación con un anticuerpo primario diferente. Para ello las membranas eran incubadas durante 30 minutos en una solución de borrado (Tris 50 mM pH 6.8, 2% SDS,  $\beta$ -mercaptoetanol 100 mM) a 60°C en agitación fuerte. Posteriormente se lavaban las membranas durante 1 hora aproximadamente en TTBS a temperatura ambiente en agitación fuerte para después realizar un bloqueo de la membrana y la incubación con el nuevo anticuerpo.

### 3.5 Estudio de la expresión de MDGA1 y MDGA2 en patologías tumorales humanas

#### 3.5.1 Pacientes

Las muestras tumorales fueron obtenidas, previo consentimiento informado, de pacientes intervenidos quirúrgicamente en los Servicios de Cirugía General y del Aparato Digestivo II y III y en el Servicio de Cirugía Torácica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. El periodo de seguimiento de estos pacientes fue de cinco años. En todos los casos se dispuso de muestras tumorales y no tumorales del mismo paciente. Ésta últimas fueron tomadas a una distancia de al menos 10 cm del margen del tumor. Las muestras proporcionadas se presentaban incluidas en bloques de medio de congelación tisular (*Jung Tissue Freezing Medium™*, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y eran almacenadas a -80°C hasta su uso.

Todas las muestras tumorales fueron analizadas en el Servicio de Anatomía Patológica de dicho hospital, de manera que solamente se incluyeron en el estudio aquellas muestras tumorales que presentaban al menos un 80% de tejido tumoral y menos de un 10% de tejido necrosado. Para dicho estudio, se emplearon cortes de 5  $\mu$ m de grosor realizados en un criostato (Leica CM 1510 S), que fueron fijados y posteriormente teñidos con hematoxilina-eosina.

Se dispuso en total de 88 muestras de cáncer no microcítico de pulmón (CNMP), 49 muestras de cáncer colorrectal (CCR), 56 muestras de cáncer de estómago (CG) y 25 muestras de cáncer de esófago (CE).

### **3.5.2 Clasificación de los pacientes en estadios**

La clasificación de los pacientes en función del estadio tumoral se realizó siguiendo diferentes clasificaciones dependiendo de la patología.

Así, para establecer la estadificación tumoral en el caso de los tumores no microcíticos de pulmón, tumores gástricos y tumores de esófago se empleó la clasificación TNM (*Tumour - Node - Metastasis*) descrita inicialmente por Mountain en 1986 (Mountain C.F., 1986, Mountain C.F., 1997, Mountain C.F., 2009). Esta clasificación refleja el grado de extensión de la enfermedad al considerar el tamaño del tumor primario (T), el grado de diseminación a los ganglios linfáticos cercanos (N) y la presencia de metástasis a larga distancia (M). En la siguiente tabla (Tabla 3.6) se muestran las características de los descriptores T, N y M ([www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)).

**Tabla 3.6.** Características de los descriptores T, N y M.

DESCRIPTOR	CARACTERÍSTICAS
<b>Tumor primario (T)</b>	
TX	No es posible evaluar un tumor primario
T0	No hay evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> (CIS; células anormales están presentes pero no se han diseminado a los tejidos cercanos. Aunque no es cáncer, el CIS puede convertirse en cáncer y algunas veces se llama cáncer preinvasor).
T1, T2, T3, T4	Tamaño o extensión del tumor primario
<b>Ganglios linfáticos regionales (N)</b>	
NX	No es posible evaluar los ganglios linfáticos regionales
N0	No existe complicación de ganglios linfáticos
N1, N2, N3	Grado de complicación de los ganglios linfáticos regionales (número y localización de los ganglios linfáticos).
<b>Metástasis distante (M)</b>	
MX	No es posible evaluar una metástasis distante
M0	No hay metástasis distante
M1	Presencia de metástasis distante

Las combinaciones TNM definen los distintos estadios tumorales (Tabla 3.7) ([www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)).

**Tabla 3.7.** Estadios tumorales en función de los descriptores TNM.

ESTADIO	DEFINICIÓN
<b>Estadio 0</b>	Carcinoma <i>in situ</i>
<b>Estadio I, II y III</b>	Los números más altos indican enfermedad más extensa: Un tamaño mayor del tumor o diseminación del cáncer afuera del órgano en donde se formó originalmente hacia los ganglios linfáticos vecinos o a órganos o tejidos cercanos al sitio del tumor primario.
<b>Estadio IV</b>	El cáncer se ha diseminado a órganos o tejidos distantes.

La clasificación de pacientes con cáncer colorrectal en función del estadio tumoral se realizó siguiendo la clasificación de Dukes modificada por Turnbull y colaboradores (Turnbull, Jr et al, 1967). Las características de los estadios se muestran en la tabla 3.8.

**Tabla 3.8.** Clasificación de Turnbull para los tumores colorrectales.

ESTADIO	CARACTERÍSTICAS
<b>Estadio A</b>	Tumor restringido al colon y sus paredes.
<b>Estadio B</b>	Extensión del tumor a la grasa pericólica.
<b>Estadio C</b>	Metástasis tumoral a los ganglios linfáticos mesentéricos, pero sin evidencias de diseminación a distancia.
<b>Estadio D</b>	Metástasis tumoral a pulmón, hígado, hueso, diseminación del tumor. No operable debido a invasión parietal; invasión a los órganos adyacentes.

### **3.5.3 Estudio de la expresión génica de MDGA1 y MDGA2 en tumores humanos mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)**

EL análisis de la expresión génica mediante qRT-PCR requiere previamente realizar la extracción de ARN de las muestras tumorales y no tumorales, así como su valoración y comprobación de su integridad.

#### **3.5.3.1 Obtención de ARN de las muestras tumorales**

A partir de tejido tumoral embebido en *tissue-teck* (Leica), se procedió a realizar unos cortes de 20  $\mu\text{m}$  de grosor en un criostato. Alrededor de 15 cortes de cada muestra tumoral fueron utilizados para la obtención de ARN, que se llevó a cabo siguiendo el método de Chomczynski & Sacchi (Chomczynski, P. and Sacchi, N, 1987), ligeramente modificado utilizando Trizol (*Invitrogen, Life Technologies*). Este reactivo contiene fenol y otros componentes que preservan la estabilidad del ARN mientras se disgregan los cortes de tejido. Se añadió 1 ml de trizol al tubo que contenía los cortes de tejido y se homogeneizó con la ayuda de una jeringuilla. Tras 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se añadió 0.2ml de cloroformo. Se agitaron las muestras con ayuda con un agitador mecánico y se dejaron reposar 3 minutos a temperatura ambiente para seguidamente centrifugar 15 minutos a 16000 x g a 4°C. Se obtenían dos fases: una fase orgánica que contiene el ADN, proteínas y restos celulares, y una fase acuosa donde se encuentra el ARN, que se recoge en otro eppendorf. A continuación se añaden 500  $\mu\text{l}$  de isopropanol, se mezcla por inversión y se incuba toda la noche a -20°C para precipitar los ácidos nucleicos. Tras centrifugar 15 minutos a 16000 x g a 4°C se obtiene un precipitado blanco que se lava con etanol 75% frío y se vuelve a centrifugar 5 minutos a 16000 x g a 4°C. El sobrenadante se elimina completamente y se seca el precipitado. Por último el ARN es resuspendido en 25  $\mu\text{l}$  de agua ultrapura estéril (AUE).

#### **3.5.3.2 Valoración de ARN mediante espectrofotometría**

La cuantificación de ARN se realizó mediante lectura espectrofotométrica de las absorbancias medidas a 260 y 280 nm utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-Visible. La lectura a 260nm permite calcular la concentración de ácidos nucleicos de la muestra teniendo en cuenta que una unidad de densidad óptica (D.O.) a 260

nm se corresponde con 40µg/ml de ARN de cadena sencilla (Sambrook et al, 1989).

La lectura a 280nm se corresponde con la absorbancia de proteínas y algunos disolventes orgánicos como el fenol. La relación de absorbancias A260/A280 nos da una idea del grado de contaminación de la muestra con proteínas. Se considera un buen grado de pureza de los ácidos nucleicos cuando esta relación de absorbancias se encuentra comprendida entre 1.8 y 2.

Tras su valoración se procedió a comprobar la integridad del ARN aislado, mediante electroforesis. Para ello, 1µg de ARN de cada una de las muestras era cargado en un gel de agarosa 1% en tampón TBE 1X ( Tris 89mM, Ácido Bórico 88mM y EDTA 1mM) al que se le añadió bromuro de etidio. La electroforesis se desarrolló a 100V durante 40 minutos. Las muestras de ARN se conservaron a -80°C hasta su utilización.

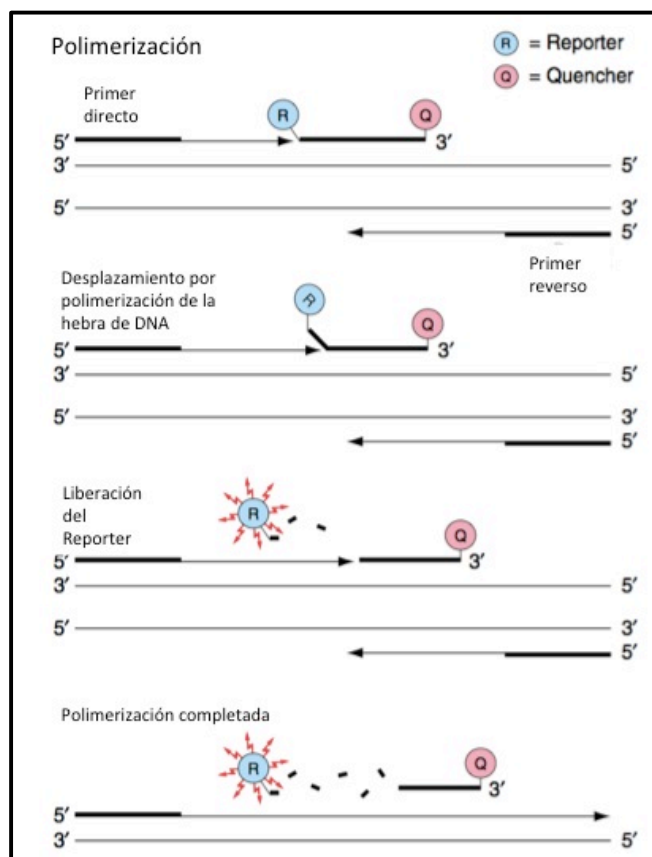
### 3.5.3.3 Ensayo de PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

El propósito de la PCR cuantitativa es poder detectar y cuantificar la acumulación de productos de PCR resultantes de la amplificación de secuencias conocidas de ADN genómico, plasmídico o ADN complementario (ADNc). Para ello, además de los oligonucleótidos específicos para la secuencia de ADN objeto de estudio, se utilizaron sondas TaqMan® (Applied Biosystem) que contienen un agente emisor de fluorescencia o *reporter* fluorescente (FAM™, 6-carboxi-fluoresceína), que se encuentra unido covalentemente al extremo 5', y un amortiguador de fluorescencia o *quencher* (TAMRA™), en el extremo 3'.

En una etapa inicial se produce la transcripción reversa. En esta etapa se produce la síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir del ARN total. Posteriormente en una segunda etapa, se produce la PCR cuantitativa a tiempo real, en la que los productos de PCR son sintetizados a partir de ADNc empleando una mezcla de reacción que contiene la sonda TaqMan y los oligonucleótidos específicos para detectar la secuencia de interés.

Cuando la sonda está intacta, la proximidad entre el *reporter* y el *quencher* resulta en una supresión de la emisión de fluorescencia. Durante la PCR, si el gen de interés está presente, la sonda se une específicamente al ADN entre los sitios de unión de los oligonucleótidos directo e indirecto. A continuación, la actividad 5' nucleasa de la enzima polimerasa, degrada la sonda entre el *reporter* y el *quencher* sólo si la sonda hibrida con el ADN objeto de estudio, permitiendo la emisión de fluorescencia del *reporter*. La sonda es degradada por la enzima y desplazada por la síntesis de la hebra complementaria. El extremo 3' es bloqueado para prevenir la extensión de la sonda durante la PCR (Figura 3.6).

Este proceso se repite en cada ciclo de la PCR y no interfiere en la acumulación exponencial del producto de PCR. El incremento en la señal de fluorescencia sólo se produce si la sonda es complementaria a la secuencia objeto de estudio y ésta es amplificada durante la PCR, con lo que se evita la detección de secuencias inespecíficas.



**Figura 3.6.** Esquema que representa el fundamento de la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real mediante el uso de primers y sondas específicas para el gen objeto de estudio.

Los sistemas de PCR a tiempo real detectan la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de PCR y los programas de análisis representan dicha fluorescencia gráficamente respecto al número de ciclos. La cantidad de amplicón producido es proporcional al número de moléculas de ARNm iniciales, de manera que en aquellas muestras con mayor expresión del gen, el amplicón fluorescente aparecerá en ciclos anteriores.

#### 3.5.3.4 Síntesis de ADNc por retrotranscripción

Para la síntesis del ADNc se utilizaron 5µg de ARN, completando hasta un volumen de 50 µl con agua libre de nucleasas. A continuación se preparó la mezcla de reacción para la transcripción reversa utilizando *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystem, Life Technologies) que presenta oligonucleótidos aleatorios y una retrotranscriptasa (Tabla 3.9), incorporando 50 µl al volumen anterior. Además, en la reacción se incluyó un inhibidor de ARNasas (Applied Biosystem, Life Technologies). Las condiciones para la transcripción reversa fueron 10 minutos a 25°C seguidos de 120 minutos a 37°C, siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración final de ADNc fue de 50 ng/µl en un volumen final de 100 µl.

**Tabla 3.9.** Mezcla de reacción para la transcriptasa reversa.

COMPONENTE	VOLUMEN (µl) POR REACCIÓN
Tampón 10X de transcripción reversa	10
Mezcla 25X dNTPs	4
Mezcla 10X de cebadores aleatorios	10
Enzima transcriptasa reversa ( <i>MultiScribe Reverse Transcriptase</i> , 50U/µl)	5
Inhibidor de ARNasas	2.5
Agua libre de nucleasas	18.5
Volumen final	50

### 3.5.3.5 PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

Los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real se llevaron a cabo siguiendo el sistema TaqMan® Gene Expression de Applied Biosystem. Para el desarrollo de la PCR cuantitativa a tiempo real se preparó la siguiente mezcla de reacción (Tabla 3.10).

**Tabla 3.10.** Mezcla de reacción para la PCR cuantitativa a tiempo real.

COMPONENTE	VOLUMEN (μl) POR REACCIÓN
<i>Taqman® Gene Expression Assay 20X</i>	1
<i>TaqMan® Universal PCR Master Mix 2X, no AmpErase UNG<sup>‡</sup> //</i>	10
<i>FastStart Universal Probe Master (Rox)</i>	
Agua libre de nucleasas	7
ADNc (50 ng/μl)	2
Volumen final	20

El componente *Taqman® Gene Expression Assay 20X* incluye dos cebadores no marcados específicos y la sonda TaqMan para amplificar y detectar la secuencia de interés (Tabla 3.11). Estas sondas hibridan exón-exón, con lo que evitan las posibles contaminaciones con ADN genómico. La mezcla de reacción *TaqMan® Universal PCR Master Mix 2X, no AmpErase UNG<sup>‡</sup>* (Applied Biosystem) o *FastStart Universal Probe Master (Rox)* (Roche), incluyen la ADN polimerasa *AmpliTaq Gold® DNA polymerase* y el resto de componentes que aseguran la amplificación de la secuencia objeto de estudio.

**Tabla 3.11.** Sondas TaqMan® utilizadas en los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real.

GEN	EXONES CON LOS QUE HIBRIDA	REFERENCIA
MDGA1	3-4	Hs01029770_m1
MDGA2	7-8	Hs00766205_m1
GAPDH	3-3	Hs99999905_m1

Las amplificaciones de cada muestra para las secuencias objeto de estudio, se realizaron por duplicado y en al menos dos experimentos independientes, en placas de 96 pocillos (*MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode*, Applied Biosystem). Se empleó como control negativo la mezcla de reacción previamente descrita, sin ADNc. Como gen normalizador se utilizó *GAPDH* y como muestra normalizadora se usó un *pool* de tejidos no tumorales de 10 pacientes para cada una de las patologías estudiadas (cáncer no microcítico de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de esófago y cáncer de estómago).

La cuantificación del gen objeto de estudio fue evaluado en un ABI Prism 7900 (Life Technologies) en la Unidad de Genómica del Campus de Moncloa del Parque Científico de Madrid (PCM-UCM). Las condiciones para la amplificación mediante PCR cuantitativa a tiempo real fueron las siguientes (Tabla 3.12).

**Tabla 3.12.** Condiciones para la amplificación por PCR cuantitativa a tiempo real.

FASE	TIEMPO	TEMPERATURA (°C)	NÚMERO DE CICLOS
Desnaturalización	20 segundos	95	1
<b>Amplificación</b>			
Desnaturalización	1 segundo	95	40
Hibridación/Elongación	20 segundos	60	

Como resultado de la PCR cuantitativa a tiempo real, obtenemos para cada muestra un dato numérico para cada gen que se denomina Ct. El Ct o *threshold cycle* se relaciona con el número de ciclos a partir de los cuales el Sistema de Detección de Secuencia comienza a detectar un incremento de la señal asociado a un aumento exponencial del producto de PCR. De este modo, obtendremos Cts de cada muestra para nuestros genes objeto de estudio (*MDGA1* y *MDGA2*) y de nuestro gen endógeno calibrador *GAPDH*. De este modo, la diferencia de Cts entre el gen objeto de estudio y el gen calibrador, nos dará una idea de la expresión del gen problema respecto a la expresión de nuestro gen endógeno en cada uno de los pacientes. Este dato lo denominamos  $\Delta Ct$ .

$$\Delta Ct = Ct_{\text{muestra}} - Ct_{\text{endógeno}} = Ct_{\text{calibrador}} - Ct_{\text{endógeno}}$$

A su vez, normalizamos respecto a la muestra que tomaremos como referencia de expresión normal (en nuestro caso un *pool* de tejido no tumoral de 10 pacientes). Esto vendría expresado como la diferencia entre el  $\Delta\text{Ct}$  de nuestro gen problema en cada uno de los pacientes respecto a la muestra no tumoral. Este dato es el  $\Delta\Delta\text{Ct}$  y nos daría una idea de la diferencia de expresión del gen objeto de estudio en muestras tumorales respecto a su expresión en tejido no tumoral.

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{muestra}} - \Delta\text{Ct}_{\text{calibrador}} ; \text{RQ} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Por último, para facilitar la interpretación de los datos se utiliza el valor de RQ que es el valor negativo del  $\Delta\Delta\text{Ct}$  en potencia de base 2. La interpretación del RQ sería la siguiente:

- $\text{RQ} < 0.5$  Se considera que existen menos de 50% del número de copias que presenta la muestra no tumoral.
- $\text{RQ} = [0.5 - 2]$  Ya que si no hay diferencia de expresión de un gen en tumores y tejido no tumoral su  $\Delta\Delta\text{Ct}$  sería 0 y su potencia en base 2 sería 1, se considera que valores de RQ comprendidos entre 0.5 y 2 se corresponden con una expresión normal del gen al estar comprendido entre  $\pm$  el 50% de la unidad.
- $\text{RQ} > 2$  Indica niveles superiores al 50% del número de copias presentes en la muestra no tumoral.

### 3.6 Inmunohistoquímica

A partir de tejido tumoral y no tumoral embebido en *tissue-tek* (Lieca) se realizaron cortes de 5 micras mediante el uso de un criostato. Los cortes fueron colocados sobre portaobjetos y fueron fijados con acetona 10 minutos, después se lavaron con tampón de lavado (Dako) y se realizó un bloqueo de las peroxidases endógenas. Posteriormente se realizaron una serie de lavados y se realizó una incubación con el anticuerpo primario correspondiente (GP854 para MDGA1 y anti-MDGA2 (R&D) para MDGA2) a una dilución 1:500 durante 50 minutos a temperatura ambiente. A continuación se realizaron una serie de lavados y se procedió al revelado con el polímero *envision flex HRP* (Dako ready to use) durante 20 minutos. Posteriormente se realizaron una serie de lavados y se procedió al uso del cromógeno diaminobencidina (Dako) a una dilución 1:100 durante 10 minutos seguido de una serie de lavados. También se realizó una contratinción con hematoxilina (Dako ready to use). Por último la muestra se lavó en agua destilada 5 minutos y se deshidrató con alcohol 96° 5 minutos, alcohol 99° 5 minutos y xilol 5 minutos. Finalmente se procedió al montaje de la muestra con un cubreobjetos y un medio de montaje *Dako mounting*.

Las inmunohistoquímicas fueron realizadas en el Servicio de Anatomía Patológica de la clínica Citopath utilizando el aparato Autostainerlink 48 (Dako).

## 3.7 Estudio de hipermetilación del promotor de MDGA1 y MDGA2

### 3.7.1 Ensayo de desmetilación con la 5-Aza-2' Deoxicitidina

La 5-Aza-2' Deoxicitidina (5-Aza) es un compuesto capaz de producir la desmetilación del ADN genómico, ya que produce una relajación de la estructura de la cromatina que permite que los factores de transcripción tengan acceso a las regiones promotoras, facilitando la expresión del gen. Para este ensayo, se utilizó la línea celular HeLa. Se sembraron  $4 \times 10^5$  células en placas de 100 mm de diámetro y se crecieron durante 6 horas en medio DMEM completo suplementado con 10% de FBS a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente las células fueron tratadas con 5-Aza-2' Deoxicitidina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 10 µM en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de FBS. Las células se cultivaron en estas condiciones durante 5 días, renovando cada 24 horas el medio de cultivo y la 5-Aza.

Las células se recogieron a las 24, 48, 72 y 96 horas tras el tratamiento con la 5-Aza y se procedió a la extracción del ARN de las células tratadas, la síntesis del ADNc mediante retrotranscripción y el análisis de la expresión de los genes *MDGA1* y *MDGA2* mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).

### 3.7.2 Estudio de hipermetilación del promotor de MDGA1 y MDGA2 en muestras tumorales humanas.

#### 3.7.2.1 Obtención de ADN genómico de tumores

A partir de muestras de tejido tumoral y no tumoral embebido en *tissue-teck* (Leica), se procedió a realizar cortes de 20 µm de grosor en un criostato. Alrededor de 25 cortes de cada muestra tumoral fueron utilizados para la obtención de ADN, que se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Blin & Stafford de 1976 (Blin, N. and Stafford, D.W., 1976), ligeramente modificado. Los cortes se homogeneizaron con una espátula mantenida en frío en 1.25 ml de una solución tampón compuesta por Tris HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 10 mM y NaCl 0.15 M. A continuación se

añadió 50  $\mu$ l de proteinasa K 20 mg/ml (Sigma Aldrich) para degradar las proteínas y se homogeneizó de nuevo. Posteriormente, se añadieron 62.5  $\mu$ l de SDS al 20%, se mezcló por inversión y se incubó 3 horas a 65°C. Posteriormente se adicionó 1.25 ml de una solución tampón compuesta por Tris HCl 10mM pH 7.5, EDTA 10 mM y NaCl 0.65 M y seguidamente un volumen de una solución comercial de fenol ADN, pH 8. La mezcla se agitó mediante un agitador mecánico y se centrifugó 15 minutos a 4000 rpm a temperatura ambiente. Tras la centrifugación se recogió la fase acuosa, que contiene el ADN y se añadió un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1, se agitó en vórtex y se centrifugó 5 minutos a 4000 rpm a temperatura ambiente. Se recogió de nuevo la fase acuosa y se añadieron dos volúmenes de etanol absoluto frío y se dejó precipitar toda la noche a -20°C. Al día siguiente, se centrifugó 15 minutos a 4000 rpm a 4°C y se decantó el sobrenadante, lavándose el precipitado con 1 ml de etanol 70% frío. Se centrifugó de nuevo 15 minutos a 4000 rpm a 4°C y posteriormente se decantó el sobrenadante y se dejó secar completamente el precipitado de ADN para finalmente resuspenderlo en 100  $\mu$ l de agua ultrapura estéril.

La cuantificación de ADN se realizó mediante valoración de las absorbancias medidas a 260 y 280 nm utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-Visible. Para los cálculos se tuvo en cuenta que una unidad de densidad óptica (D.O.) a 260 nm se corresponde con 50  $\mu$ g/ml de ADN de cadena doble (Sambrook et al, 1989). Así mismo, la pureza del ADN se estimó considerando que una pureza óptima se correspondía con un valor del cociente  $A_{260}/A_{280}$  entre 1.8 y 2. La integridad del ADN aislado se determinó mediante electroforesis en geles de agarosa. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su uso.

### 3.7.2.2 Transformación del ADN por bisulfito

La metilación del ADN se produce por la adición covalente de un grupo metilo al carbono 5 del anillo de la citosina, generándose 5-metilcitosina. Tras el tratamiento del ADN genómico con bisulfito, las citosinas no metiladas sufren un proceso de desaminación transformándose en uracilo, mientras que las citosinas metiladas permanecen intactas.

La transformación por bisulfito se realizó utilizando *Bisulflash™ DNA Modification Kit* (Epigentek, BioNova) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los ensayos se realizaban a partir de 1µg de ADN genómico al que se le adicionaba 110 µl de una mezcla de soluciones tampón y se incubaba en un termociclador a 95°C durante 20 minutos en los que se llevaba a cabo la transformación con bisulfito. A continuación se preparaban unas columnas de elución y se hacía pasar la mezcla con el ADN genómico transformado a través de la columna. Posteriormente se realizaban varios lavados de las columnas y finalmente se eluía el ADN transformado en 20 µl de un tampón de elución. Este ADN modificado se conservaba a -20°C hasta su uso.

### 3.7.2.3 MSP (Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction)

Una vez transformado el ADN por bisulfito, la detección de metilación en el ADN se llevó a cabo mediante PCR específica de metilación (MSP). Este método de PCR se basa en el uso de oligonucleótidos diseñados específicamente para detectar secuencias ADN metilado localizadas en las regiones ricas en CGs de los promotores. Además, se utilizaban oligonucleótidos diseñados específicamente para detectar secuencias de ADN no metilado. De esta manera, tras la transformación con el bisulfito, era posible amplificar por PCR secuencias de ADN metilado (M) y no metilado (U).

El análisis de las regiones promotoras de los genes *MDGA1* y *MDGA2* se realizó utilizando el programa informático <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/index.html> con ayuda del Dr. Jesús Cruces (Facultad de Medicina UAM). El programa permitió detectar 2 islas CpG en la región promotora de *MDGA1*, y 4 islas CpG en el promotor de *MDGA2*. En ambos casos el porcentaje de CGs en las islas era superior al 50%. A continuación, en colaboración con el Dr. Jesús Espada (Instituto de Investigaciones Biomédicas CSIC), se llevó a cabo el diseño de distintas parejas de oligonucleótidos utilizando el programa informático *Methyl Primer Express* (Applied Biosystems). Estos oligonucleótidos reconocían de manera específica las secuencias metiladas (M) o no metiladas (U) de los promotores de *MDGA1* y *MDGA2*. Las tablas 3.13 y 3.14 muestran todas las parejas de oligonucleótidos que se utilizaron en este estudio.

**Tabla 3.13.** Parejas de cebadores utilizados para los ensayos de MSP. En blanco están los cebadores directos y en azul los reversos.

MDGA1-MSP1		MDGA1 MSP2	
Pareja de cebadores (tamaño de ADN amplificado)	Cebadores (M)	Cebadores (U)	Cebadores (M)
<b>Pareja 1 (144 pb)</b>	5' GTTTTTTGGTTTCGTCGTC 3'	5' TTAGTTTTTGGTTTTGGTTGTT 3'	5' GTCGTTGAGTTTACGGTAGC 3'
	5' TCTTCACGACGATACCTCA 3'	5' TCTTCACACCACTACTTCATCC 3'	5' CCACAAACGACTAACAAACT 3'
<b>Pareja 1.1 (142 pb)</b>	5' GTTTTTTGGTTTCGTCGTC 3'	5' TTAGTTTTTGGTTTTGGTTGTT 3'	5' AGTCGGGTCGTTGAGTTTAC 3'
	5' TTACGACGCGATACCTCA 3'	5' TTACACCACTACTTCATCC 3'	5' CCACAAACGACTAACAAACT 3'
<b>Pareja 2 (146 pb)</b>			5' GTTCGGAGTGTTTTAGTTC 3'
			5' AACTCCGCTCGAATTAATC 3'

**Tabla 3.14.** Parejas de cebadores utilizados para los ensayos de MSP. En blanco están los cebadores directos y en azul los reversos.

MDGA2-MSP1		MDGA2-MSP2	
Pareja de cebadores (tamaño de ADN amplificado)	Cebadores (M)	Cebadores (U)	Cebadores (M)
<b>Pareja 1 (115 pb)</b>	5' GTCGTAGTTGGGAGATTC 3'	5' GTTGTAGTTGTGAGATT 3'	5' GCGTAGTTCGGTGGGTAC 3'
	5' CGAATACCTAAAAAATCGCA 3'	5' CAATACCTAAAAAATCACA 3'	5' CGAAACCGAAAACAAAATCC 3'
<b>Pareja 1.1 (103 pb)</b>			5' GTAGTTCGGTGGGTAGC 3'
			5' CGAAACCGAAAACAAAATCC 3'
<b>Pareja 2 (111 pb)</b>			5' TTTTGTGTTAGTAGCGGTTTC 3'
			5' TCCCGCGTTAAACTAACGTA 3'

### 3.7.2.4 Purificación del producto de PCR

Los productos amplificados por PCR fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa 2% en TBE, que se desarrolló a 90V durante 1 hora. Las bandas detectadas, que se correspondían con el tamaño de ADN amplificado, se extraían del gel con ayuda de un bisturí y el fragmento de ADN era purificado mediante el uso de *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) y resuspendido en 10  $\mu$ l de agua ultrapura estéril.

### 3.7.2.5 Clonaje en pGEM-T

A continuación, los fragmentos de ADN purificados fueron clonados en el vector pGEM-T utilizando *pGEM-T Easy Vector System I* (Promega) provisto de la T4 ADN ligasa. Para ello 3  $\mu$ l de producto de PCR se utilizaron en la reacción de ligación con el vector pGEM-T (Figura 3.7). La reacción se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y se procedió a la transformación de bacterias competentes *E. coli* DH5 $\alpha$  por choque térmico a 42°C. Las bacterias transformadas se sembraron en placas Petri en medio LB suplementado con ampicilina 100  $\mu$ g/ml, IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) 40  $\mu$ g/ml y X-Gal 23  $\mu$ g/ml y se incubaron toda la noche a 37°C.

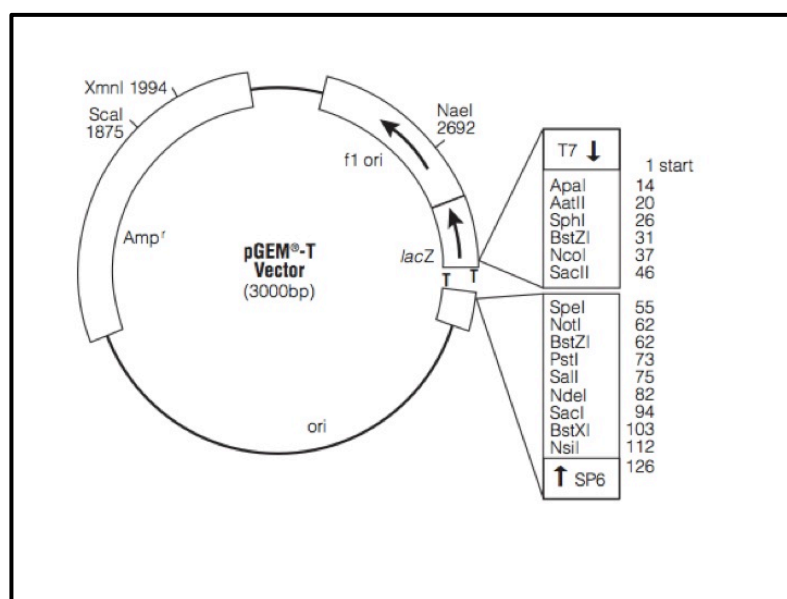
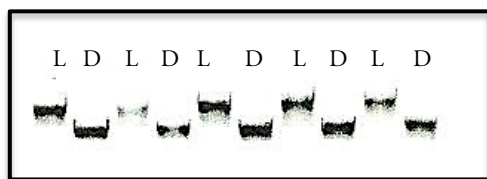


Figura 3.7. Mapa del vector pGEM-T.

Las colonias blancas aisladas, se picaron y se crecieron en 3 ml de LB suplementado con ampicilina 100  $\mu\text{g/ml}$  en agitación orbital a 37°C durante toda la noche.

### 3.7.2.6 Purificación y digestión del ADN plasmídico

La purificación del ADN plasmídico se llevó a cabo utilizando el kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega). Una vez purificado, el ADN plasmídico fue resuspendido en 50  $\mu\text{l}$  de agua ultrapura estéril. A continuación, se comprobó la incorporación del inserto (producto de MSP) en el plásmido pGEM-T mediante la digestión del ADN plasmídico con las enzimas de restricción *Nco I* y *Not I* (Figura 3.8). La reacción de digestión se realizó durante 3 horas a 37°C y, a continuación, los productos de la digestión se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa 1% a 90V durante 45 minutos.



**Figura 3.8.** Fragmentos de ADN obtenidos tras la digestión enzimática del ADN. L= plásmido linealizado con *Not I*; D=doble digestión con *Nco I* y *Not I*.

### 3.7.2.7 Secuenciación

La secuenciación del ADN correspondiente al producto amplificado por PCR-MSP se llevó a cabo en la Unidad de Genómica del Campus de Moncloa del Parque Científico de Madrid (PCM-UCM).

### 3.8. Análisis estadístico de los resultados

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en el presente trabajo fue realizado mediante el uso del software IBM *SPSS Statistics* 19 para el sistema operativo *Microsoft® Windows*. El procesamiento y tratamiento de datos previos al análisis estadístico fue realizado mediante la aplicación informática *Microsoft® Office 2011*.

En primer lugar se realizaron las pruebas de normalidad mediante el test de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov. En caso de cumplir el supuesto de normalidad ( $p > 0,05$ ) se realizaron las pruebas paramétricas para comparación de medias entre dos poblaciones mediante la prueba estadística *t* de *student*, tomándose los valores, según procediese, indicados por la prueba de Levene para la igualdad de varianzas. En el caso de que las poblaciones muestrales no cumplieren el principio de normalidad, las pruebas estadísticas utilizadas fueron las pruebas no paramétricas *U* de *Mann-Whitney* para comparación de medias entre dos poblaciones, o la prueba de rangos de *Wilcoxon* para comparación simultánea de medias entre varias poblaciones.

Para identificar las relaciones de dependencia entre variables cualitativas se utilizó el test de la Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ), asumiendo la dependencia entre variables si  $P < 0,05$ .

El método de Kaplan-Meier fue el elegido para establecer las curvas de supervivencia, medida como el intervalo libre de enfermedad (ILE), definido como el tiempo transcurrido entre la resección quirúrgica del tumor y la recidiva tumoral. La comparación entre estas curvas de supervivencia se realizó mediante el test Log-Rank. Así mismo, la aplicación electrónica *Cutoff Finder* (Budczies et al., 2012), permitió distinguir entre dos subpoblaciones con distinto pronóstico clínico en función de la expresión de los genes *MDGA1* o *MDGA2*. Los estudios de supervivencia sólo incluyeron los pacientes sometidos a cirugía potencialmente curativa, por lo que se consideró únicamente a los pacientes de CNMP con tumores en los estadios I, II o IIIA, los pacientes de CCR con tumores en los estadios A, B o C; los pacientes de CG

con tumores en los estadios I, II o III; y los pacientes de CE con tumores en los estadios I, II o III. Se excluyeron del análisis los pacientes que fallecieron en el periodo post-operatorio. Se consideró un tiempo de seguimiento clínico de 60 meses para las curvas de supervivencia y se establecieron como datos censurados los pacientes que finalizaron el estudio sin recurrir en la enfermedad o los pacientes de los que no se disponía del seguimiento completo.

Para evaluar el grado de asociación o independencia de una variable cuantitativa con la supervivencia de un grupo de pacientes se utilizó el método de regresión multivariante de Cox, que permite valorar simultáneamente el efecto independiente de una serie de variables o factores pronósticos sobre la supervivencia.

En todos los casos, se consideraron resultados significativos aquellos cuyos valores de  $p$  eran menores de 0.05 ( $p < 0,05$ ).

## 4. RESULTADOS

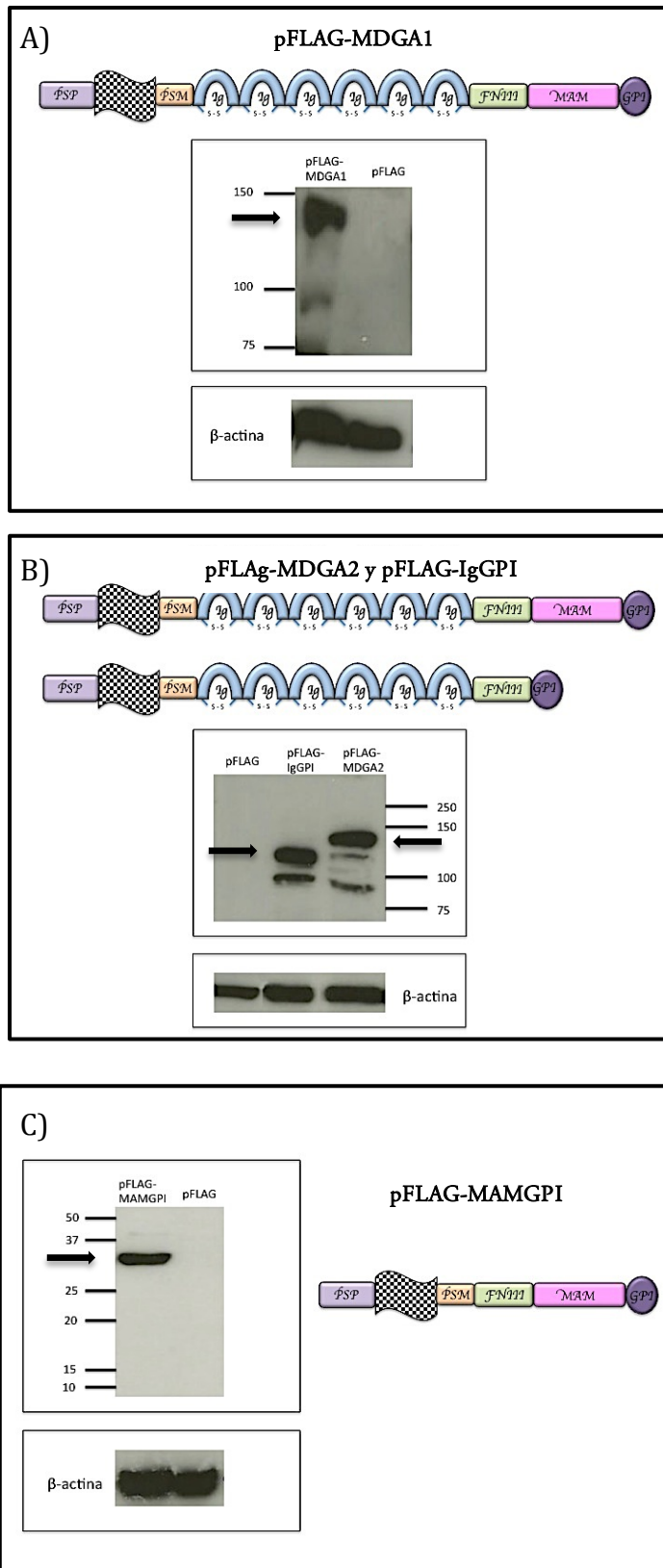
---



## 4.1 Generación de líneas celulares estables de MDGA1 y MDGA2

El estudio de la capacidad de migración, invasión y adhesión celular mediada por las proteínas MDGA1 y MDGA2, requería la generación de líneas celulares que expresaran de manera estable las proteínas MDGA1, MDGA2 o las proteínas truncadas de MDGA2: MAMGPI, IgGPI. Para ello, se utilizó la línea celular MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells*), que fue transfectada con las construcciones pFLAG-MDGA1, pFLAG-MDGA2, pFLAG-MAMGPI (MDGA2) o pFLAG-IgGPI (MDGA2). Así mismo, se generó una línea celular estable para el vector vacío pFLAG, que fue utilizada como control en todos los ensayos realizados. Posteriormente se procedió a la selección con geneticina tal y como se describe en el apartado 2.5 de Material y Métodos. Una vez realizada la selección, se comprobó la expresión de las correspondientes proteínas mediante ensayos de *Western blot* e inmunofluorescencia mediante microscopía confocal.

El análisis de la expresión de las proteínas mediante *Western blot*, se realizó utilizando 20 µg del extracto proteico total de cada una de las líneas celulares (Figura 4.1). La línea celular pFLAG-MDGA1 mostró una forma mayoritaria de unos 140 kDa correspondiente a la proteína MDGA1 (Figura 4.1.A). Esta proteína fue detectada con el anticuerpo GP854, un anticuerpo policlonal generado frente al dominio MAM de MDGA1 (aminoácidos 753-918) por inmunización de dos conejos (*Eurogentec*) (Díaz-López et al., 2010). Así mismo, la línea celular pFLAG-MDGA2 mostró una forma mayoritaria de unos 140 kDa correspondiente a la proteína MDGA2, que fue detectada con el anticuerpo anti-FLAG (Figura 4.1.B). Las líneas celulares de las dos formas truncadas de MDGA2: IgGPI y MAMGPI, expresaban dos proteínas recombinantes de unos 120 kDa (Figura 4.1.B) y unos 30 kDa (Figura 4.1.C) respectivamente, que fueron detectadas con el anticuerpo anti-FLAG.

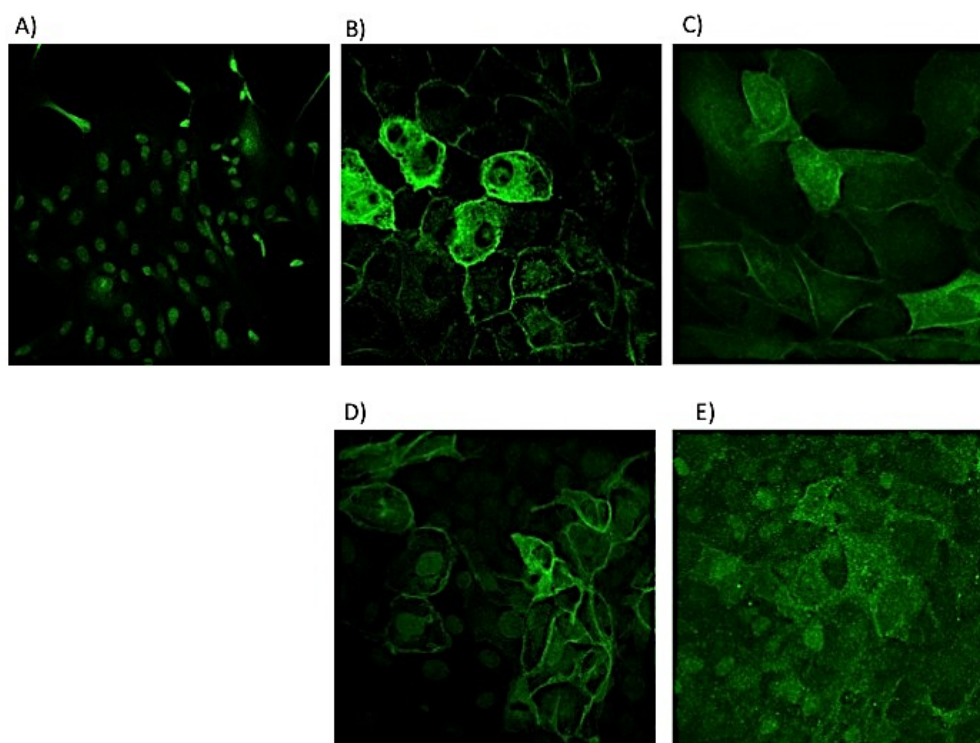


**Figura 4.1.** Análisis de la expresión de MDGA1 y de MDGA2 y sus proteínas truncadas mediante *Western blot* en las cuatro líneas celulares estables generadas pFLAG-MDGA1 (A), pFLAG-MDGA2, pFLAG-IgGPI (B) y pFLAG-MAMGPI (C). La proteína recombinante para pFLAG-MDGA1 fue detectada con el anticuerpo GP854 y el resto de las proteínas recombinantes fueron detectadas con el anticuerpo anti-FLAG. En todos los casos la  $\beta$ -actina se utilizó como control de carga. El tamaño de las proteínas se expresa en kDa.

Los tamaños de todas las proteínas MDGAs coincidían con los pesos moleculares descritos en (Díaz-López et al., 2010) para MDGA1 y sus formas truncadas IgGPI y MAMGPI. Estos resultados indicaban que existe una homología en relación al tamaño entre MDGA1 y MDGA2 y sus correspondientes proteínas truncadas.

El análisis de la expresión de las proteínas mediante inmunofluorescencia por microscopía confocal reveló niveles de expresión proteica del 60-80% en las líneas celulares pFLAG-MDGA1 y pFLAG-MAMGPI. Sin embargo, en el caso de las líneas celulares pFLAG-MDGA2 y pFLAG-IgGPI se obtuvieron niveles de expresión de estas proteínas inferiores al 20%. Por ello, en ambos casos fue necesario realizar un enriquecimiento en células positivas mediante análisis por citometría de flujo (FACS), según se describe en el apartado 2.6 de Materiales y Métodos.

La figura 4.2 muestra las proteínas MDGA1, MDGA2, IgGPI y MAMGPI localizadas preferentemente en la membrana citoplasmática de las células MDCK.



**Figura 4.2.** Localización celular de las proteínas MDGA1, MDGA2, IgGPI (MDGA2) y MAMGPI (MDGA2) mediante microscopía confocal. Tinción por inmunofluorescencia de las cinco líneas celulares pFLAG (A), pFLAG-MDGA1 (B), pFLAG-MDGA2 (C), pFLAG-IgGPI (D) y pFLAG-MAMGPI (E), utilizando un anticuerpo primario GP854 (para MDGA1) o anti-FLAG (para el resto de las líneas celulares). El anticuerpo secundario utilizado fue anti-rabbit Alexa Fluor 488.

## 4.2 Estudio de la capacidad de migración, invasión y adhesión celular mediadas por MDGA1 y MDGA2

La presencia de dominios estructurales característicos de moléculas de adhesión, como los seis dominios inmunoglobulina y el dominio MAM, parecían indicar una posible implicación de estas proteínas en adhesión y migración celular. Estudios previos del laboratorio realizados en células MDCK transfectadas de manera estable con la construcción pFLAG-MDGA1, demostraron una clara implicación de MDGA1 tanto en migración como en adhesión celular (Díaz-López et al., 2010). Dada la similitud estructural existente entre las proteínas MDGA1 y MDGA2, cabía la posibilidad de que MDGA2 también estuviera implicada en migración y adhesión celular. Además, se investigó un posible papel de MDGA1 y MDGA2 en el proceso de invasión celular. Por todo ello, se realizaron ensayos de migración, invasión y adhesión celular utilizando las líneas celulares estables de MDCK previamente generadas: pFLAG, pFLAG-MDGA1, pFLAG-MDGA2, y las construcciones parciales de MDGA2 (pFLAG-IgGPI y pFLAG-MAMGPI).

### 4.2.1 Ensayos de migración

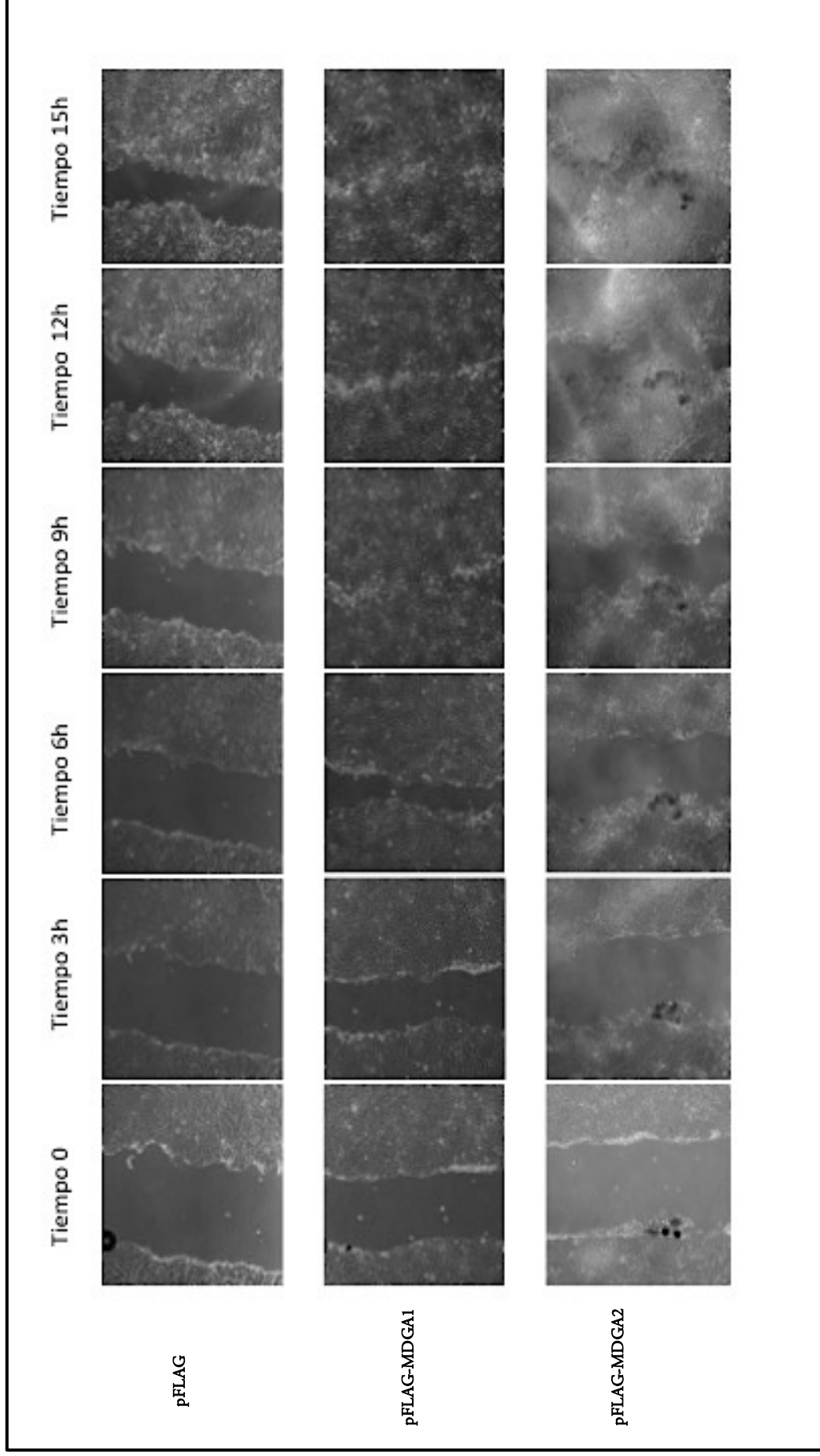
#### 4.2.1.1 Estudio de la capacidad migratoria mediante el ensayo de la herida

Este ensayo se basa en la capacidad de las células para migrar y cerrar una herida. Para realizar este ensayo las células se cultivaron durante 12 horas hasta alcanzar una monocapa de células confluyente. A continuación se practicaba una herida en el centro del pocillo y se realizaba un seguimiento de la migración de las células para cerrar dicha herida, tomando imágenes del mismo campo microscópico cada 10 minutos durante 15 horas, mediante microscopía confocal en células vivas (*time-lapse microscopy*).

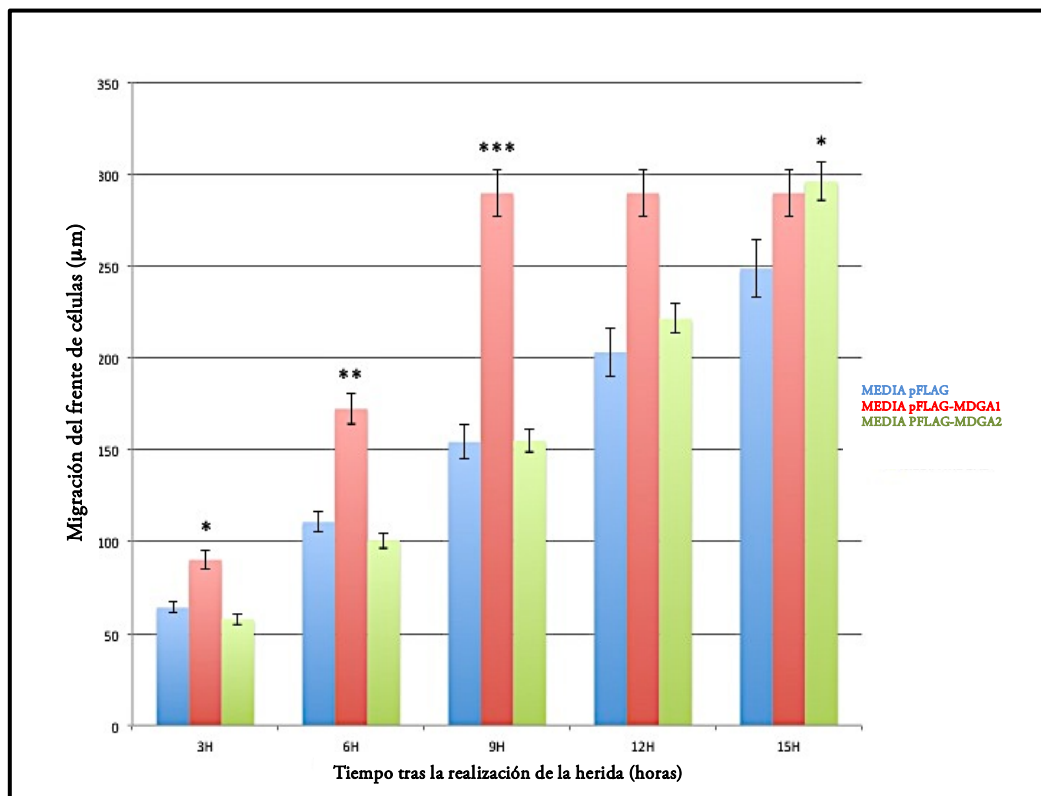
El ensayo se realizó en las líneas celulares estables pFLAG, pFLAG-MDGA1 y pFLAG-MDGA2. En la figura 4.3 se muestra el avance del frente de células obtenido a las 3, 6, 9, 12 y 15 horas tras la realización de la herida. En todos los casos se analizaban dos campos microscópicos diferentes. De este modo, se minimizaban los errores debidos a irregularidades en la anchura de la herida generada.

Los resultados revelaron que las células que expresan de manera estable la proteína MDGA1 presentaban una mayor capacidad migratoria que las células control, mostrando a las 3 horas un incremento en el avance sobre la herida que fue un 40% ( $p=0.020$ ) superior al obtenido en las células pFLAG en el mismo tiempo (Figura 4.4 y tabla 4.1). Este incremento en la capacidad migratoria era mucho más visible a las 6 y 9 horas, tiempos en los que las células que expresaban MDGA1 presentaban incrementos de migración respecto a las células control (pFLAG) del 56% ( $p=0.004$ ) y 88% ( $p<0.001$ ) respectivamente. Además, estas células eran capaces de cerrar por completo la herida en 9 horas (Figura 4.4 y tabla 4.1).

Por otro lado, las células que expresaban de manera estable la proteína MDGA2, mostraron igualmente un incremento de la capacidad migratoria respecto a las células control, aunque en este caso la migración fue más lenta que la observada en las células que expresaban MDGA1. Este incremento empezó a observarse a las 12 horas tras la realización de la herida, alcanzando el cierre total de la misma a las 15 horas (Figura 4.3), tiempo en el que las células mostraron un incremento en el avance sobre la herida del 19% ( $p=0.03$ ) con respecto a las células control (Figura 4.4 y tabla 4.1).



**Figura 4.3.** Ensayo de la herida en las líneas celulares pFLAG, pFLAG-MDGA1 y pFLAG-MDGA2. Instantáneas tomadas a tiempo cero y a las 3, 6, 9, 12 y 15 horas tras realizar la herida.



**Figura 4.4.** Análisis de la capacidad migratoria de las células MDCK que expresan de manera estable las proteínas MDGA1 y MDGA2 mediante el ensayo de la herida. Las células pFLAG se utilizaron como control. Se representa la migración del frente de células expresado en micras ( $\mu\text{m}$ ) en los tiempos indicados tras la realización de la herida.

**Tabla 4.1.** Resultados obtenidos en el estudio de la capacidad migratoria de las células MDCK que expresan de manera estable las proteínas MDGA1 y MDGA2 mediante el ensayo de la herida. Las células pFLAG se utilizaron como control. Se muestra el valor medio de la migración del frente de células expresado en micras ( $\mu\text{m}$ ) y el error típico a las 3, 6, 9, 12 y 15 horas tras la realización de la herida.

Tiempo tras realización de la herida	PFLAG		pFLAG-MDGA1		pFLAG-MDGA2	
	Media ( $\mu\text{m}$ )	Error típico	Media ( $\mu\text{m}$ )	Error típico	Media ( $\mu\text{m}$ )	Error típico
3 horas	64.19	2.96	90.13	5.38	57.81	2.93
6 horas	110.72	5.49	172.44	8.24	100.77	4.23
9 horas	154.36	9.31	289.86	12.76	154.94	6.002
12 horas	203.26	13.15	289.86	12.76	221.41	8.023
15 horas	248.77	15.61	289.86	12.76	296.28	10.29

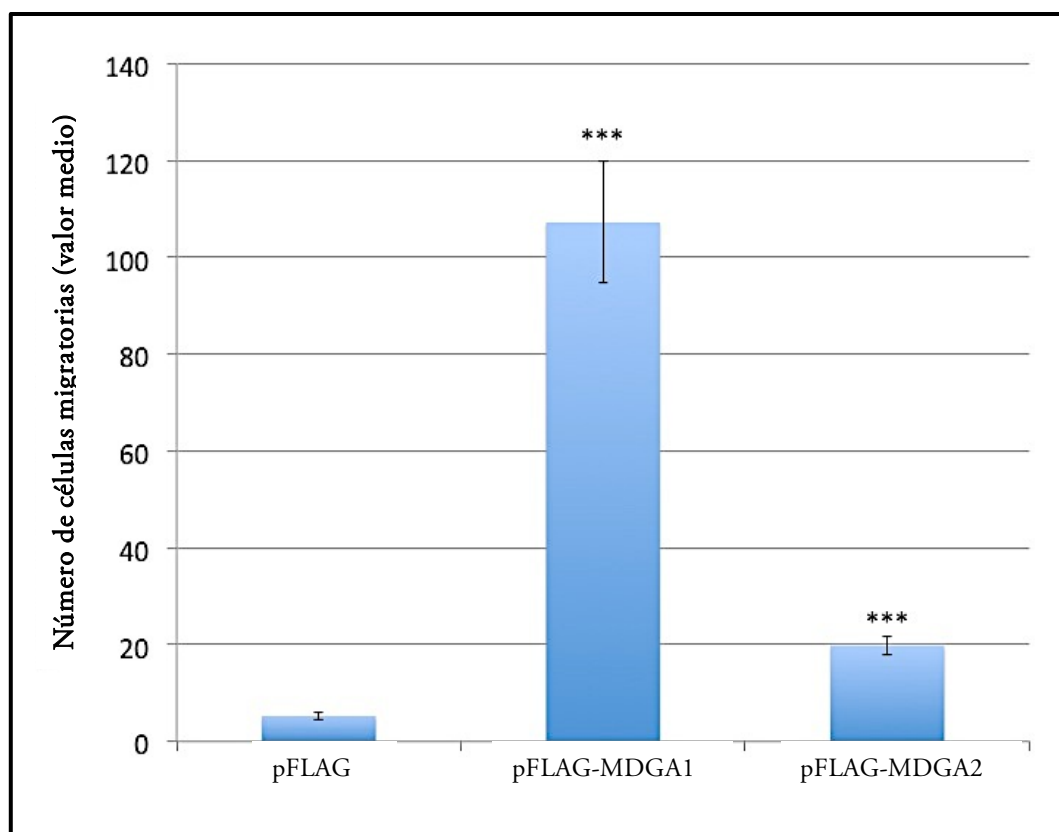
### 4.2.1.2 Estudio de la capacidad migratoria mediante cámaras transwell

Con objeto de confirmar los resultados obtenidos mediante el ensayo de la herida, se llevaron a cabo ensayos de migración en cámaras transwell®. Estos ensayos implican el uso de unas cámaras compuestas por dos compartimentos, superior e inferior, separados entre sí por una membrana con un tamaño de poro de 8 micras de diámetro. El ensayo se basa en la capacidad de las células para pasar de un compartimento a otro a través de la membrana. Las células eran sembradas en el compartimento superior, y tras 24 horas de incubación en las condiciones adecuadas se cuantificaba, en el compartimento inferior, el número de células que habían sido capaces de atravesar la membrana (apartado 2.7.2 de Materiales y Métodos). Este ensayo se llevó a cabo con las líneas celulares estables pFLAG, pFLAG-MDGA1 y pFLAG-MDGA2.

La figura 4.5 muestra el valor medio del número de células que fueron capaces de migrar desde el compartimento superior al inferior, y que fueron cuantificadas tras 24 horas de incubación. En la tabla 4.2 se muestran los valores de la media, error típico e incremento de la migración obtenidos en el ensayo.

El análisis estadístico de los resultados mostró que las células MDCK que expresaban de manera estable MDGA1, presentaban un aumento significativo de la migración que era unas 20.24 veces superior al valor obtenido en las células control ( $p < 0.001$ ) (Tabla 4.2). Así mismo, las células que expresaban MDGA2 mostraron un aumento significativo de la migración que fue unas 3.7 veces superior al mostrado por las células pFLAG ( $p < 0.001$ ).

Estos resultados confirmaban los resultados previos obtenidos en el ensayo de la herida. Los dos tipos de ensayos de migración realizados revelaron que tanto MDGA1 como MDGA2 promovían un aumento de la capacidad migratoria de las células MDCK, siendo este incremento significativamente superior en el caso de MDGA1 ( $p < 0.001$ ).



**Figura 4.5.** Análisis de la capacidad migratoria de las células MDCK que expresan de manera estable las proteínas MDGA1 y MDGA2 mediante cámaras transwell. Las células pFLAG se utilizaron como control.

**Tabla 4.2.** Resultados estadísticos obtenidos en los ensayos de migración en cámaras transwell de las líneas celulares pFLAG, pFLAG-MDGA1 y pFLAG-MDGA2.

Línea celular	Media	Error típico	Incremento (nº de veces)	P-valor
pFLAG	5,3	0,8		
pFLAG-MDGA1	107,3	12,6	20.24	<0.001
pFLAG-MDGA2	19,8	2	3.73	<0.001

#### 4.2.2 Ensayos de invasión

La capacidad invasiva de las células MDCK que expresan de manera estable las proteínas MDGA1 y MDGA2, se investigó realizando ensayos de invasión en los que se utilizaron unas cámaras transwell con dos compartimentos (superior e inferior) separados entre sí por una membrana de 8 micras de tamaño de poro y tapizada con una mezcla de proteínas de matriz extracelular (matrigel). Estos ensayos se basan en la capacidad de las células invasivas de atravesar la capa de proteínas de matriz extracelular y pasar al compartimento inferior, mientras que las células no invasivas no son capaces de atravesar la capa de matrigel. El ensayo se llevó a cabo con las líneas celulares estables pFLAG, pFLAG-MDGA1 y pFLAG-MDGA2.

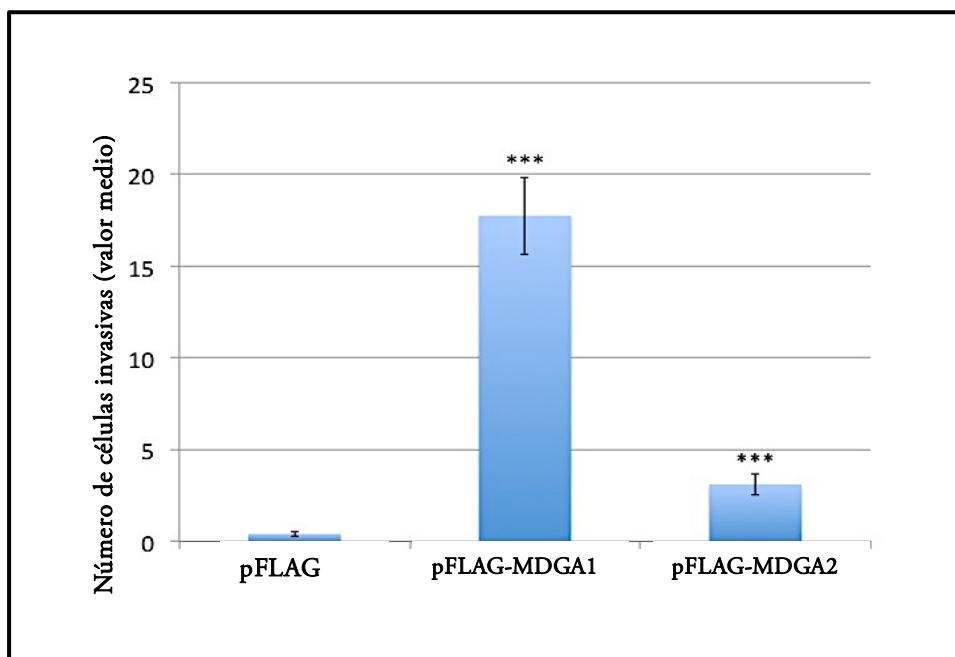
En la figura 4.6.A se muestra la capacidad invasiva de las líneas celulares MDCK que fue cuantificada calculando el valor medio del número de células invasivas obtenido en diez campos microscópicos seleccionados al azar en cada una de las cámaras transwell. La tabla 4.3 muestra los resultados estadísticos de la media del número de células invasivas, el error típico, el incremento de la capacidad invasiva y los valores de P obtenidos para cada una de las líneas celulares utilizadas en este ensayo.

Los resultados mostraron un incremento significativo de la capacidad invasiva de las células MDCK que expresaban de manera estable las proteínas MDGA1 o MDGA2 con respecto a las células control.

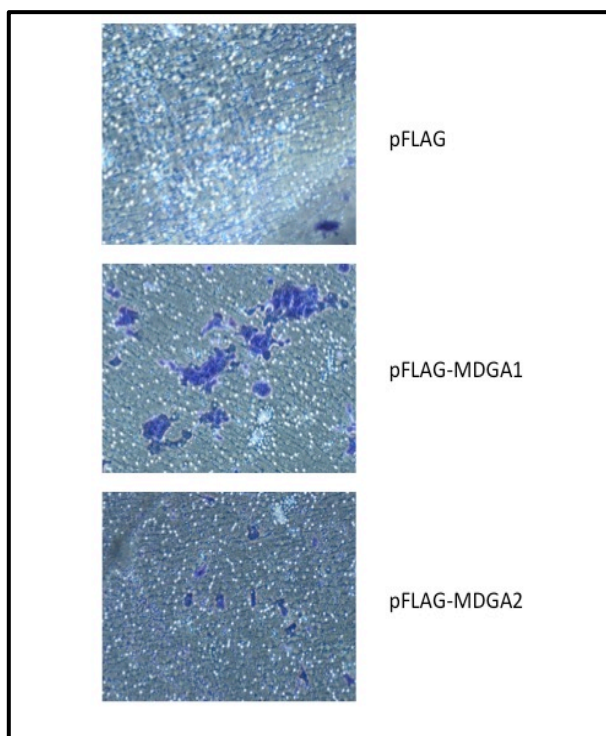
**Tabla 4.3.** Resultados estadísticos obtenidos en los ensayos de invasión de las líneas celulares pFLAG, pFLAG-MDGA1 y pFLAG-MDGA2.

Línea celular	Media	Error típico	Incremento de capacidad invasiva (nº de veces)	P-valor
pFLAG	0,4	0,1		
pFLAG-MDGA1	17,74	2,1	44,35	<0,001
pFLAG-MDGA2	3,1	0,6	7,75	<0,001

A)



B)



**Figura 4.6.** Análisis de la capacidad invasiva de las células MDCK que expresan de manera estable MDGA1 o MDGA2. Las células pFLAG se utilizaron como control. (A) Número de células invasivas de cada una de las líneas celulares (valor medio). (B) Imágenes de las células invasivas que han atravesado la capa de matrigel, teñidas con cristal violeta.

El análisis estadístico de los resultados reveló un valor medio del número de células invasivas de 17.74 ( $p < 0.001$ ) y de 3.1 ( $p < 0.001$ ) para las células que expresaban MDGA1 o MDGA2 respectivamente, frente a un valor de 0.4 obtenido para las células control (Figura 4.6.A y Tabla 4.3). Estos resultados representaban un incremento de la capacidad invasiva que fue 44.35 veces superior en las células MDGA1, y 7.75 veces mayor en las células MDGA2, en relación a la capacidad invasiva de las células control (Tabla 4.3).

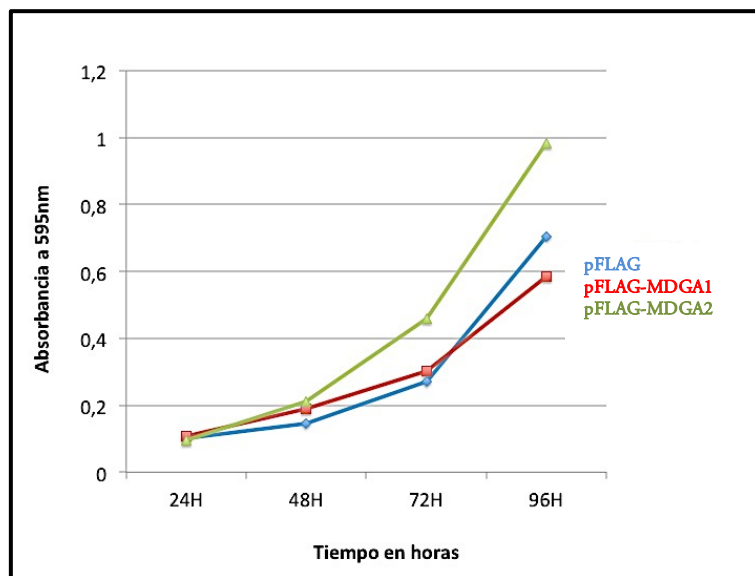
La figura 4.6.B muestra las imágenes de las células que fueron capaces de atravesar la capa de matrigel de las cámaras transwell y pasaron al compartimento inferior donde fueron teñidas con cristal violeta.

#### 4.2.3 Ensayo de proliferación celular

Con el fin de validar los resultados obtenidos en los ensayos de migración e invasión, fue necesario realizar un control de proliferación celular. De este modo, se descartaba que los efectos observados en los ensayos de migración e invasión fueran debidos a un incremento en la capacidad proliferativa de las células pFLAG, pFLAG-MDGA1 y pFLAG-MDGA2. Para ello, las tres líneas celulares se sembraron e incubaron en medio DMEM en ausencia de suero y se midió la proliferación cada 24 horas durante 4 días (Figura 4.7). La curva de proliferación obtenida indicaba que no existían diferencias significativas entre la capacidad proliferativa de las líneas celulares utilizadas en el ensayo en los distintos tiempos analizados (Figura 4.7 y Tabla 4.4).

**Tabla 4.4** Resultados obtenidos en las curvas de proliferación de las tres líneas celulares analizadas.

Línea celular	Absorbancia 595nm				P-valor a las 96 horas
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	
pFLAG	0,1005	0,146	0,2713	0,7032	
pFLAG-MDGA1	0,1071	0,18822	0,3032	0,5857	0,180
pFLAG-MDGA2	0,0953	0,2121	0,4586	0,9837	0,655



**Figura 4.7.** Curvas de proliferación de las líneas celulares pFLAG, pFLAG-MDGA1 y pFLAG-MDGA2.

#### 4.2.4 Ensayos de adhesión

##### 4.2.4.1 Ensayos de adhesión célula-matriz extracelular

La adhesión celular es un evento complejo implicado en diferentes procesos como la embriogénesis, migración, invasión, remodelación de tejidos y cierre de herida. Para llevar a cabo estos procesos las células se adhieren unas a otras mediante adhesiones de tipo célula-célula, o a componentes de la matriz extracelular como glucoproteínas, proteoglicanos y ácido hialurónico, formando complejos con componentes del citoesqueleto que finalmente afectan a la motilidad, diferenciación, proliferación y supervivencia celular.

Estudios previos realizados en el laboratorio habían demostrado que las células que expresaban MDGA1 presentaban una menor adhesión a las proteínas de la matriz extracelular que las células que no expresaban la proteína (Díaz-López et al., 2010).

Con objeto de investigar la capacidad de adhesión célula-matriz extracelular de las células que expresaban MDGA2 o sus proteínas truncadas (IgGPI, MAMGPI), se realizaron ensayos similares a los llevados a cabo con MDGA1. Para ello se utilizaron placas que contenían pocillos tapizados con diferentes proteínas de matriz extracelular: colágeno I, colágeno IV, laminina, fibronectina y fibrinógeno. Las células fueron sembradas e incubadas en medio DMEM en ausencia de suero durante una hora a 37°C. A continuación las células no adheridas a la matriz extracelular fueron eliminadas mediante lavados con PBS y se realizó la tinción de las células adheridas. La adhesión relativa de las células se midió mediante lectura espectrofotométrica de la absorbancia medida a 560nm (Figura 4.8).

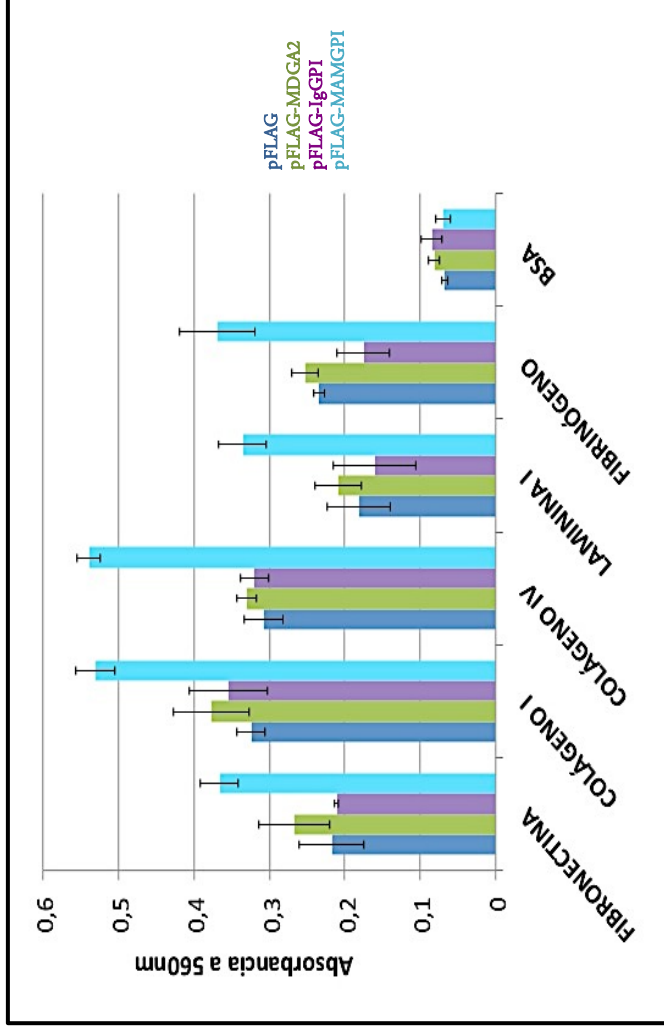
La figura 4.8 muestra los resultados obtenidos en los ensayos de adhesión de cada una de las líneas celulares a las cinco proteínas de matriz extracelular. Los correspondientes valores de absorbancia medidos a 560nm, el error típico obtenido en cada caso y los valores de significatividad estadística (p), se muestran en la tabla 4.5.

Las diferencias observadas en la capacidad de adhesión célula-matriz extracelular se representa como el porcentaje de adhesión de cada una de las líneas celulares respecto a la adhesión de las células control (Tabla 4.6).

El análisis de los resultados revelaba que las células que expresaban MDGA2 presentaban mayores incrementos de adhesión a fibronectina (22.7%), colágeno I (18.75%) y laminina I (16.66%). En relación a las proteínas truncadas de MDGA2, se observó que IgGPI mostraba valores de adhesión a las proteínas de matriz extracelular similares o ligeramente inferiores a los obtenidos en las células control. Sin embargo, los mayores incrementos de adhesión célula-matriz extracelular se detectaron con la proteína truncada MAMGPI. Las células que expresaban esta proteína mostraban un incremento en la adhesión a todas las proteínas de matriz extracelular comprendidos entre un 60,87% para fibrinógeno y un 88,88% para laminina I. Sin embargo, el análisis estadístico de los resultados en ningún caso mostró que las diferencias observadas fueran significativas.

**Tabla 4.5.** Valor medio de absorbancia medida a 560nm , error típico y valor de P. obtenidos en los ensayos de adhesión a proteínas de matriz extracelular de las líneas celulares pFLAG, pFLAG-MDGA2, pFLAG-IgGPI y pFLAG-MAMGPI. BSA utilizado como control interno del ensayo.

Línea celular	Fibronectina			Colágeno I			Colágeno IV			Laminina I			Fibrinógeno			BSA		
	Media	Error Típico	P-valor	Media	Error Típico	P-valor	Media	Error Típico	P-valor	Media	Error Típico	P-valor	Media	Error Típico	P-valor	Media	Error Típico	P-valor
pFLAG	0,22	0,043		0,32	0,019		0,31	0,026		0,18	0,042		0,23	0,007		0,07	0,004	
pFLAG-MDGA2	0,27	0,047	0,109	0,38	0,051	0,285	0,33	0,013	1	0,21	0,031	0,285	0,25	0,018	0,285	0,08	0,007	
pFLAG-IgGPI	0,21	0,002	0,593	0,35	0,052	0,593	0,32	0,019	1	0,16	0,055	0,109	0,18	0,035	0,109	0,08	0,014	
pFLAG-MAMGPI	0,37	0,03	0,109	0,54	0,026	0,102	0,54	0,016	0,109	0,34	0,032	0,109	0,37	0,050	0,109	0,07	0,009	



**Figura 4.8.** Análisis de la capacidad de adhesión de las líneas celulares pFLAG, pFLAG-MDGA2, pFLAG-IgGPI y pFLAG-MAMGPI a las proteínas de matriz extracelular: fibronectina, colágeno I, colágeno IV, laminina I y fibrinógeno. El BSA se utilizó como control interno del ensayo. Se muestran los valores de absorbancia medida a 560nm.

Tabla 4.6. Resultados obtenidos en los ensayos de adhesión a proteínas de la matriz extracelular de las líneas celulares pFLAG, pFLAG-MDGA2, pFLAG-IgGPI y pFLAG-MAMGPI expresados en porcentajes de adhesión.

PORCENTAJE DE ADHESIÓN

Línea celular	Fibronectina	Colágeno I	Colágeno IV	Laminina I	Fibrinógeno
pFLAG	100	100	100	100	100
pFLAG-MDGA2	122,7	118,75	106,45	116,66	108,6
pFLAG-IgGPI	95,45	109,37	103,22	88,88	78,26
pFLAG-MAMGPI	168,18	168,75	174,19	188,88	160,87

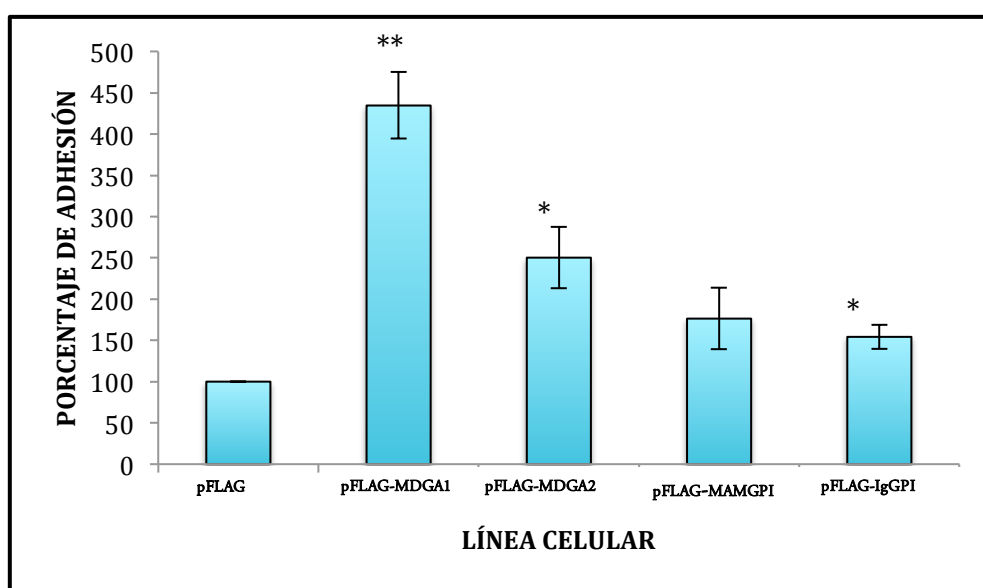
4.2.4.2 Ensayos de adhesión célula-célula

La capacidad de adhesión célula-célula se analizó mediante un ensayo cuantitativo de fluorescencia en el que las células eran marcadas con calceína, un marcador fluorescente que no interfiere en el proceso de adhesión celular. Para el ensayo, las células MDCK que expresaban de manera estable las proteínas MDGA1, MDGA2, o sus proteínas truncadas (MAMGPI o IgGPI), así como las células control, una vez marcadas con calceína, fueron sembradas sobre una monocapa de células que en cada caso coincidía con el mismo tipo de células sembradas, es decir, las células pFLAG se sembraron sobre una monocapa de células pFLAG y las células pFLAG-MDGA1 se sembraron sobre una monocapa de células pFLAG-MDGA1. Así mismo, las células pFLAG-MDGA2, pFLAG-MAMGPI y pFLAG-IgGPI se sembraron sobre una monocapa de células pFLAG-MDGA2. A continuación, se realizó una co-incubación de dos horas, transcurridas las cuales se eliminaron las células no adheridas a la monocapa de células mediante lavados con PBS. Posteriormente se determinó la intensidad de fluorescencia relativa de las células adheridas.

Los resultados obtenidos en los ensayos de adhesión célula-célula para cada una de las líneas celulares utilizadas en el ensayo se muestran en la tabla 4.7 y figura 4.9. Los resultados se expresan en porcentajes de adhesión de las células que expresan de manera estable las proteínas MDGA1, MDGA2, MAMGPI o IgGPI, con respecto a la adhesión de las células control pFLAG.

**Tabla 4.7.** Resultados obtenidos en los ensayos de adhesión célula-célula de las líneas celulares pFLAG-MDGA1, pFLAG-MDGA2, pFLAG-MAMGPI y pFLAG-IgGPI, sembradas sobre la correspondiente monocapa de células, expresados en porcentajes de adhesión en relación a las células control pFLAG.

PORCENTAJE DE ADHESIÓN					
LÍNEA CELULAR	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	INCREMENTO DE ADHESIÓN (n° de veces)	P-valor
pFLAG	100	0	0	0	
pFLAG-MDGA1	435	80.7	40.3	4,35	0,004
pFLAG-MDGA2	250	82.8	37	2,5	0,015
pFLAG-MAMGPI	176	74.6	37.3	1,76	0,133
pFLAG-IgGPI	154	29	14.5	1,54	0,033



**Figura 4.9.** Porcentaje de adhesión de las líneas celulares pFLAG-MDGA1, pFLAG-MDGA2, pFLAG-MAMGPI y pFLAG-IgGPI sembradas sobre la correspondiente monocapa de células (pFLAG, pFLAG-MDGA1 o pFLAG-MDGA2) en relación a las células control pFLAG.

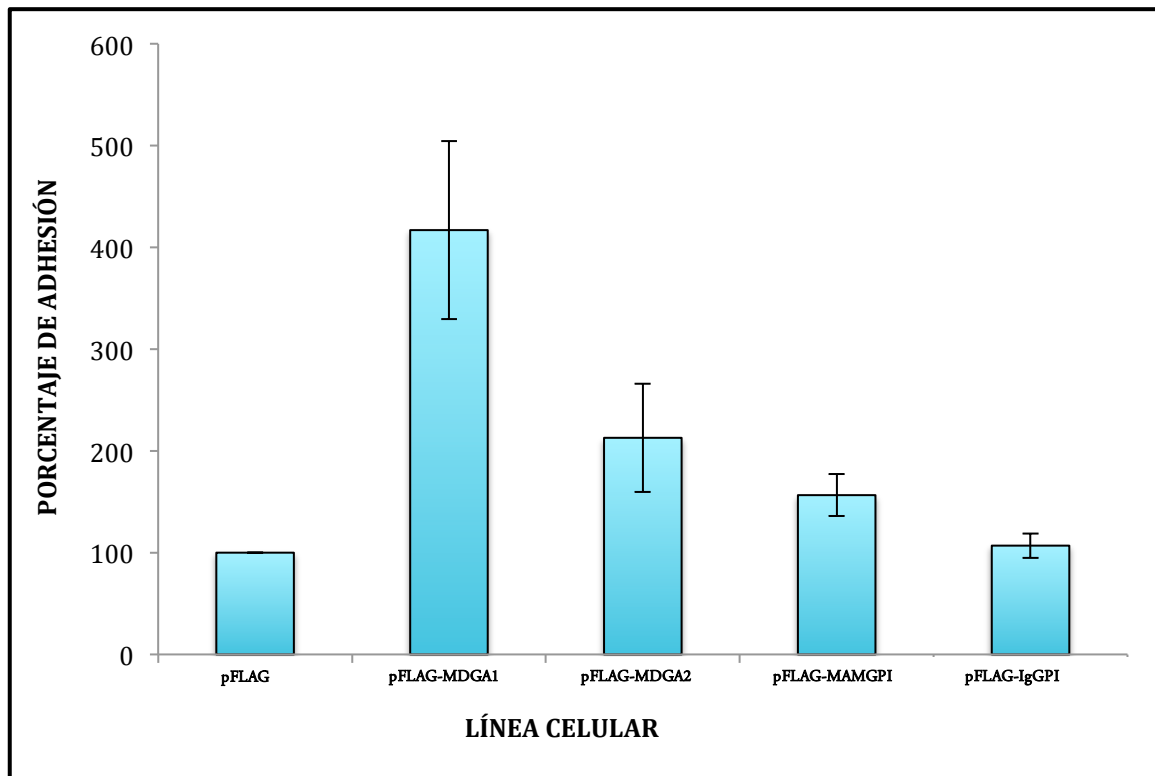
El análisis estadístico de los resultados mostró que tanto las células que expresaban MDGA1 como las que expresaban MDGA2 presentaban un incremento de la capacidad de adhesión célula-célula respecto a la capacidad de adhesión de las células control pFLAG, que en el caso de MDGA1 presentaba una mayor significatividad estadística. MDGA1 producía un aumento de la capacidad de adhesión de las células MDCK de 4,35 veces ( $p=0,004$ ) mientras que MDGA2 incrementaba 2,5 veces la capacidad de adhesión célula-célula ( $p=0,015$ ). Así mismo, las proteínas truncadas de MDGA2, MAMGPI e IgGPI, producían respectivamente

un incremento en la capacidad de adhesión célula-célula de 1,76 ( $p=0,133$ ) y 1,54 ( $p=0,033$ ) veces respecto a las células control pFLAG.

El ensayo de adhesión célula-célula se repitió en las mismas condiciones que las descritas con anterioridad, pero esta vez utilizando en todos los casos como sustrato para sembrar las líneas celulares estables una monocapa de células pFLAG, que no expresaban ninguna de las proteínas objeto de estudio.

**Tabla 4.8.** Resultados obtenidos en los ensayos de adhesión célula-célula de las líneas celulares pFLAG-MDGA1, pFLAG-MDGA2, pFLAG-MAMGPI y pFLAG-IgGPI sembradas sobre una monocapa de células pFLAG, expresados en porcentajes de adhesión en relación a las células control pFLAG.

PORCENTAJE DE ADHESIÓN A MONOCAPA RESPECTO A pFLAG					
LÍNEA CELULAR	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	INCREMENTO DE ADHESIÓN (nº de veces)	P-valor
pFLAG	100	0	0	0	
pFLAG-MDGA1	417	151.5	87.5	4,17	0,068
pFLAG-MDGA2	212.86	92.58	53.45	2,13	0,169
pFLAG-MAMGPI	166	44.5	25.67	1,66	0,088
pFLAG-IgGPI	106.91	21.07	12.17	1,069	0,627



**Figura 4.10.** Porcentaje de adhesión de las líneas celulares pFLAG-MDGA1, pFLAG-MDGA2, pFLAG-MAMGPI y pFLAG-IgGPI sembradas sobre una monocapa de células pFLAG, referido a la capacidad de adhesión de la línea pFLAG (control).

Los resultados, que se muestran en la tabla 4.8 y figura 4.10, fueron similares a los obtenidos anteriormente. MDGA1 producía un incremento en la capacidad de adhesión célula-célula de 4,17 veces ( $p=0,068$ ); MDGA2 confería un aumento de la capacidad de adhesión de 2,13 veces ( $p=0,169$ ) y MAMGPI producía un incremento de la capacidad de adhesión célula-célula de 1,66 ( $p=0,088$ ) veces respecto a las células control pFLAG. En el caso de IgGPI los resultados fueron similares a los obtenidos para las células control.

El análisis conjunto de los resultados indica que la expresión de las proteínas MDGA1 o MDGA2 producen un incremento similar en la capacidad de adhesión célula-célula, independientemente de la monocapa de células que se utilice en el ensayo. Estos resultados revelan que la unión célula-célula mediada por las proteínas MDGA1 o MDGA2 parece presentar carácter heterofílico.

### 4.3 Análisis de la expresión de otras proteínas implicadas en adhesión celular.

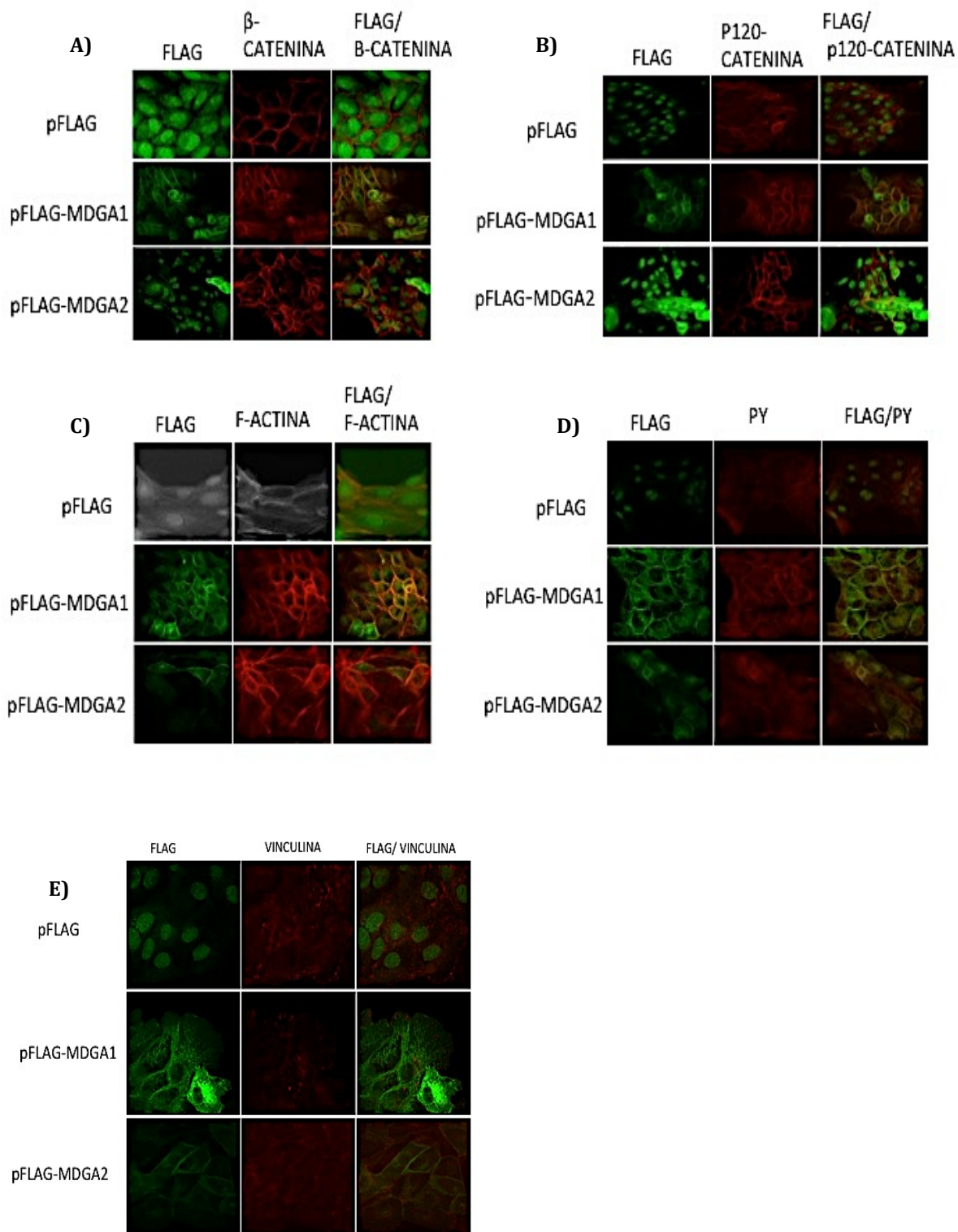
Una vez analizada la capacidad de adhesión célula-célula de las líneas celulares que expresaban MDGA1 o MDGA2, nuestro siguiente objetivo fue analizar en estas células la expresión de otras proteínas implicadas en adhesión celular como  $\beta$ -catenina, p120-catenina, F-actina, vinculina y proteínas fosfotirosina. Todas estas proteínas se localizan en estructuras celulares implicadas en uniones célula-célula o en uniones célula-matriz extracelular.

$\beta$ -catenina y p120-catenina se localizan en las uniones adherentes. p120-catenina se une a las cadherinas clásicas en el dominio yuxtamembrana, y  $\beta$ -catenina interacciona con el dominio C-terminal de las cadherinas y con la  $\alpha$ -catenina, que a su vez interacciona con los filamentos de actina del citoesqueleto. Tanto  $\beta$ -catenina como p120-catenina se encuentran reguladas por fosforilación, la cual es llevada a cabo por proteínas fosfotirosinas (un grupo de proteínas citosólicas que catalizan la fosforilación en residuos tirosina de ambas cateninas).

Por otro lado, la vinculina se localiza en las uniones focales, donde forma parte del complejo de adhesión focal. Se une a las integrinas a través de las proteínas de unión talina y paxilina. Además, interacciona con los filamentos de actina del citoesqueleto.

La expresión de todas estas proteínas fue analizada en las células MDCK que expresaban las proteínas MDGA1 o MDGA2. Para ello se realizaron tinciones de inmunofluorescencia con los correspondientes anticuerpos. Los resultados revelaron que tanto MDGA1 como MDGA2 colocalizan con  $\beta$ -catenina, p120-catenina, F-actina, fosfotirosinas y vinculina (Figura 4.11). Esta colocalización refuerza la idea de que las proteínas MDGA1 y MDGA2 desempeñan un papel en los procesos de adhesión celular. Sin embargo, no se han observado diferencias entre la expresión de estas proteínas en las células que expresan MDGA1 o MDGA2 que pudieran explicar las diferencias observadas en relación a la capacidad de adhesión célula-célula mediada por MDGA1 o MDGA2.

Estos resultados podrían indicar una posible interacción entre las proteínas MDGA1 y MDGA2 y otras proteínas implicadas en adhesión celular.



**Figura 4.11.** Microscopía confocal de tinciones por inmunofluorescencia de las líneas celulares pFLAG, pFLAG-MDGA1 y pFLAG-MDGA2. Los anticuerpos primarios utilizados fueron GP854 para MDGA1 y anti-FLAG (Sigma) para MDGA2 y las células control. En todos los casos se utilizó un anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 (Invitrogen) (A,B,C,D,E). En estas líneas celulares se analizó la expresión de  $\beta$ -catenina (A) con un anticuerpo anti- $\beta$ -catenina (BD biosciences), p120-catenina (B) con un anticuerpo anti-p120-catenina (BD Biosciences), F-actina (C) con un anticuerpo anti-faloidina (Invitrogen), proteínas fosfotirosinas (D) con un anticuerpo anti-fosfotirosinas (Sigma) y vinculina (E) con un anticuerpo anti-vinculina (Sigma). Para todas estas proteínas, se utilizó el anticuerpo secundario Alexa Fluor 568 (Invitrogen).

## 4.4 Estudio de la expresión de MDGA1 y MDGA2 en patologías tumorales humanas

### 4.4.1 Estudio de la expresión génica de MDGA1 y MDGA2 mediante qRT-PCR

Estudios previos realizados en el laboratorio revelaron una disminución de la expresión de los genes *MDGA1* y *MDGA2* en tumores humanos (Tabla 4.9).

**Tabla 4.9** Análisis de la expresión de *MDGA1* y *MDGA2* mediante qRT-PCR en cáncer colorrectal, cáncer de endometrio y cáncer de pulmón.

Patología tumoral	<i>MDGA1</i>		<i>MDGA2</i>	
	Nº tumores analizados	Disminución de la expresión <i>MDGA1</i>	Nº tumores analizados	Disminución de la expresión <i>MDGA2</i>
Cáncer Colorrectal	20	14 (70%)	16	8 (50%)
Cáncer de Endometrio	24	19 (79%)	23	14 (61%)
Cáncer de Pulmón	5	3 (60%)	5	5 (100%)

A la vista de estos resultados nos propusimos continuar el estudio de la expresión génica de *MDGA1* y *MDGA2* mediante qRT-PCR, ampliando el número de pacientes. Las patologías tumorales humanas seleccionadas para nuestro estudio fueron: cáncer no microcítico de pulmón (CNMP), cáncer colorrectal (CCR), cáncer gástrico (CG) y cáncer de esófago (CE). En total se analizaron 88 pacientes con CNMP, 49 pacientes con CCR, 56 pacientes con CG y 25 pacientes con CE. La técnica de qRT-PCR permite cuantificar la expresión de un determinado gen con una alta especificidad y sensibilidad mediante el uso de unas sondas marcadas con un fluoróforo y un reductor de emisión o *quencher*, y unos *primers* específicos para los genes *MDGA1* o *MDGA2*.

La expresión de estos genes en las muestras tumorales fue referida a la expresión de los mismos en una mezcla de 10 muestras de tejidos no tumorales, que se utilizó como muestra calibradora. De este modo se obtuvo el valor de  $\Delta\Delta C_t$ , que puede ser expresado mediante el RQ (*relative quantification*) como  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Para llevar a cabo el análisis de los resultados, se consideró un valor de RQ igual a 1 para la

muestra calibradora (tejidos no tumorales). Los valores de RQ comprendidos entre 0.5 y 2 indicaban niveles de expresión de los genes *MDGA1* y *MDGA2* en las muestras tumorales similares a los niveles de expresión de dichos genes en la muestra calibradora. Así mismo, se consideró que valores de RQ superiores a 2 indicaban niveles de expresión incrementados de *MDGA1* y *MDGA2*. Por el contrario, valores de RQ inferiores a 0.5 indicaban una disminución de los niveles de expresión de los genes analizados (apartado 5.3.4 de Materiales y Métodos).

Las figuras 4.12 y 4.13 y su correspondientes tablas 4.10 y 4.11 representan los resultados de expresión de los genes *MDGA1* y *MDGA2* en las diferentes patologías tumorales estudiadas, mostrando la media del valor de RQ obtenido en el grupo de pacientes que presentaron una disminución de la expresión ( $RQ < 0.5$ ), una expresión normal ( $0.5 \leq RQ < 2$ ) o una expresión incrementada ( $RQ \geq 2$ ) de estos genes. Así mismo se indica el número de pacientes incluido en cada uno de estos grupos (N).

En relación a *MDGA1* (Figura 4.12 y Tabla 4.10), el análisis de los resultados reveló que en la patología de CNMP un grupo de 62 pacientes presentaron niveles de expresión de *MDGA1* disminuidos, con un valor medio de RQ de 0.167. Sin embargo, únicamente 3 pacientes mostraron una expresión incrementada de este gen, con un valor medio de RQ de 2.680. El resto de los pacientes analizados (23), presentaron valores normales de expresión de *MDGA1* ( $RQ = 0.992$ ). El análisis estadístico de los resultados mostró diferencias significativas entre los niveles de expresión de *MDGA1* del grupo de pacientes con una expresión disminuida de dicho gen y los pacientes con una expresión del gen similar a la de las muestras no tumorales ( $P < 0.001$ ).

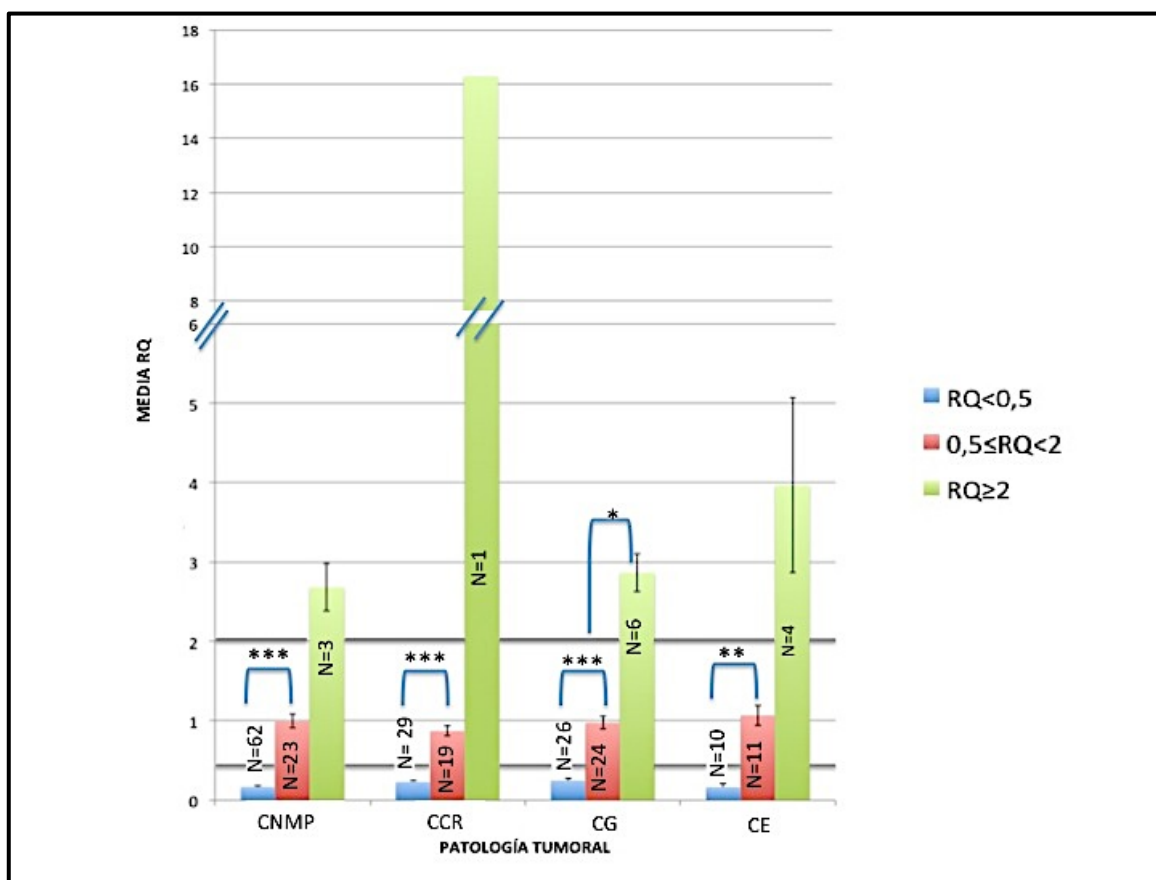
En la patología de CCR, 29 pacientes presentaron una disminución de la expresión de *MDGAI* (RQ=0.230), y tan sólo 1 paciente mostró un nivel de expresión que resultó ser muy elevado (RQ=16.285). El análisis estadístico de los resultados mostró diferencias significativas entre los niveles de expresión de *MDGAI* en el grupo de pacientes con una expresión de *MDGAI* similar a la de las muestras no tumorales y el grupo de pacientes con una disminución en la expresión de dicho gen (P<0.001).

En el grupo de pacientes de CG, 26 presentaron niveles de expresión de *MDGAI* disminuidos (RQ=0.247) y únicamente 6 pacientes presentaron niveles incrementados de expresión de este gen (RQ=2.863). El análisis estadístico de los resultados indicó diferencias significativas entre los niveles de expresión de este gen entre el grupo de pacientes con una expresión disminuida de *MDGAI* y el grupo de pacientes con niveles de expresión normales (P<0.001). Así mismo, se encontraron diferencias significativas entre el grupo de pacientes que presentaron un incremento de la expresión del gen y los que mantuvieron niveles de expresión normales (P=0.028).

Por último, 10 pacientes de CE mostraron niveles de expresión de *MDGAI* disminuidos (RQ=0.165) y 4 pacientes presentaron un nivel de expresión aumentado (RQ=3.967). El análisis estadístico de los resultados reveló diferencias significativas entre los niveles de expresión del gen en el grupo de pacientes que mostraba una disminución de la expresión de *MDGAI* y el grupo de pacientes que mantuvo unos niveles de expresión normales (P=0.005).

**Tabla 4.10.** Valores relativos de expresión de *MDGA1* (media de RQ), error típico y valor de P en las patologías tumorales analizadas. N representa el número de pacientes.

EXPRESIÓN DE <i>MDGA1</i>																
	CNMP				CCR				CG				CE			
	MEDIA	ERROR TÍPICO	N	P-valor	MEDIA	ERROR TÍPICO	N	P-valor	MEDIA	ERROR TÍPICO	N	P-valor	MEDIA	ERROR TÍPICO	N	P-valor
RQ<0.5	0,167	0,016	62	<0.001	0,230	0,022	29	<0.001	0,247	0,026	26	<0.001	0,165	0,041	10	0.005
0.5≤RQ<2	0,992	0,086	23		0,871	0,060	19		0,976	0,084	24		1,068	0,124	11	
RQ≥2	2,680	0,297	3	0.109	16,285		1	-	2,863	0,235	6	0.028	3,967	1,000	4	0.068



**Figura 4.12.** Representación gráfica de los valores relativos de expresión de *MDGA1* (media de RQ) en las patologías tumorales analizadas. N representa el número de pacientes.

Por otro lado, en relación a *MDGA2* (Figura 4.13 y Tabla 4.11), el análisis de los resultados reveló que en la patología de CNMP un grupo de 64 pacientes presentaron niveles de expresión de *MDGA2* disminuidos, con un valor medio de RQ de 0.152. Sin embargo, 17 pacientes mostraron una expresión incrementada de este gen, con un valor medio de RQ muy elevado (RQ=30.866). El resto de los pacientes analizados (7), presentaron valores normales de expresión de *MDGA2* (RQ=0.790). El análisis estadístico de los resultados mostró diferencias significativas entre los niveles de expresión de *MDGA2* del grupo de pacientes con una expresión disminuida de dicho gen con respecto a los pacientes que mantienen una expresión del gen similar a las muestras no tumorales (P=0.018). Así mismo, se encontraron diferencias significativas entre los niveles de expresión de *MDGA2* entre el grupo de pacientes que presentaban un incremento en la expresión del gen y los que mantuvieron valores normales de expresión (RQ=0.018).

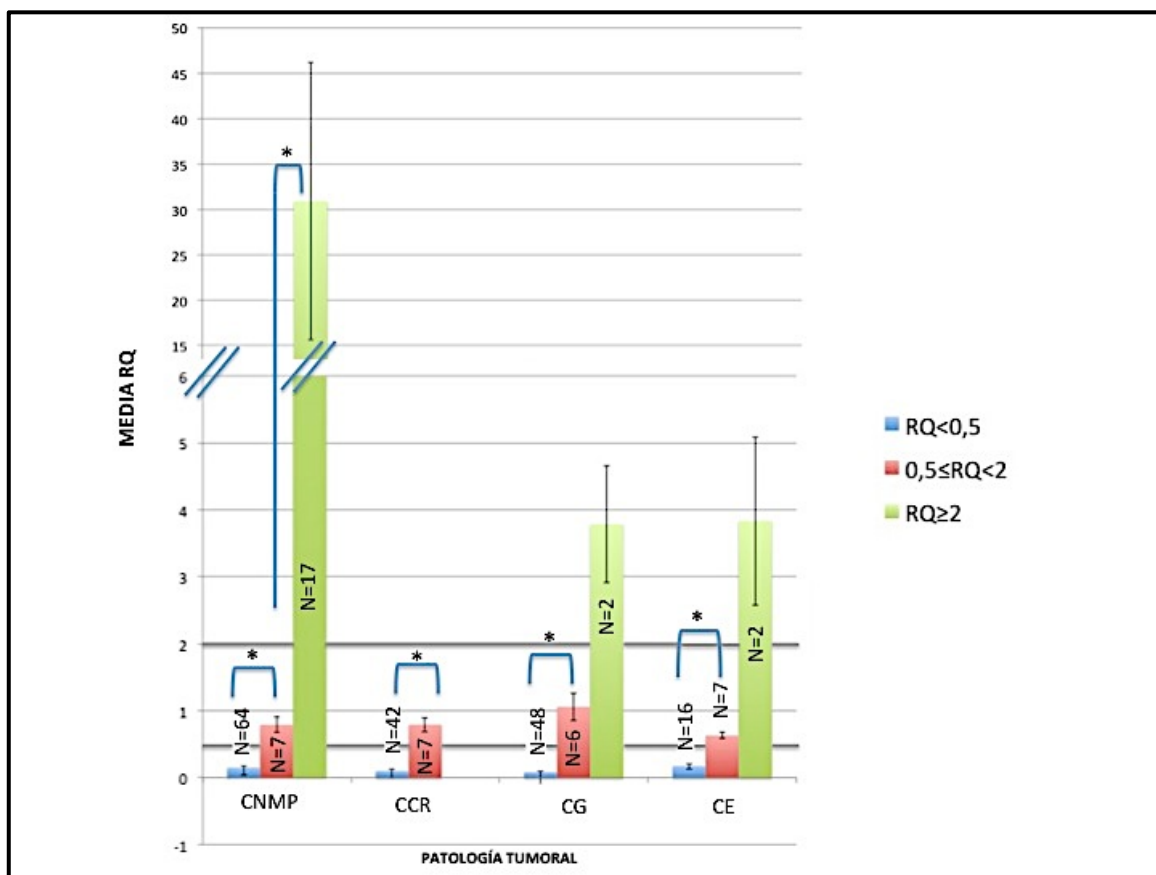
En la patología de CCR, 42 pacientes presentaron una disminución de la expresión de *MDGA2* (RQ=0.104), mientras que el resto de los pacientes (7) presentaron niveles de expresión del gen similares a los de las muestras no tumorales (RQ=0.792). Ningún paciente de esta patología presentó sobreexpresión de *MDGA2*. El análisis estadístico de los resultados mostró diferencias significativas entre los niveles de expresión de *MDGA2* en el grupo de pacientes con una expresión disminuida de *MDGA2* y el grupo de pacientes que presentaba valores normales de expresión de dicho gen (P=0.018).

En el grupo de pacientes de CG, 48 presentaron niveles de expresión de *MDGA2* disminuidos (RQ=0.082) y únicamente 2 pacientes presentaron niveles incrementados de expresión de este gen (RQ=3.784). El análisis estadístico de los resultados reveló diferencias significativas entre los niveles de expresión de este gen entre el grupo de pacientes que presentaba disminuida la expresión de *MDGA2* y el grupo de pacientes que presentaron niveles de expresión normales (P=0.028).

Por último, 16 pacientes de CE mostraron niveles de expresión de *MDGA2* disminuidos ( $RQ=0.175$ ) y 2 pacientes presentaron un nivel de expresión aumentado ( $RQ=3.834$ ). El análisis estadístico de los resultados reveló diferencias significativas entre los niveles de expresión del gen en el grupo de pacientes que mostraba una disminución de la expresión de *MDGA2* y el grupo de pacientes que mantuvo unos niveles de expresión normales ( $P=0.018$ ).

**Tabla 4.11.** Valores relativos de expresión de *MDGA2* (media de RQ), error típico y valor de P en las patologías tumorales analizadas. N representa el número de pacientes.

EXPRESIÓN DE <i>MDGA2</i>																
	CNMP				CCR				CG				CE			
	MEDIA	ERROR TÍPICO	N	P-valor	MEDIA	ERROR TÍPICO	N	P-valor	MEDIA	ERROR TÍPICO	N	P-valor	MEDIA	ERROR TÍPICO	N	P-valor
$RQ < 0.5$	0,152	0,016	64	<b>0.018</b>	0,104	0,018	42	<b>0.018</b>	0,082	0,017	48	<b>0.028</b>	0,175	0,032	16	<b>0.018</b>
$0.5 \leq RQ < 2$	0,790	0,111	7		0,792	0,106	7		1,058	0,204	6		0,630	0,044	7	
$RQ \geq 2$	30,866	15,341	17	<b>0.018</b>	-	-	0	-	3,784	0,870	2	0.180	3,834	1,258	2	0.180



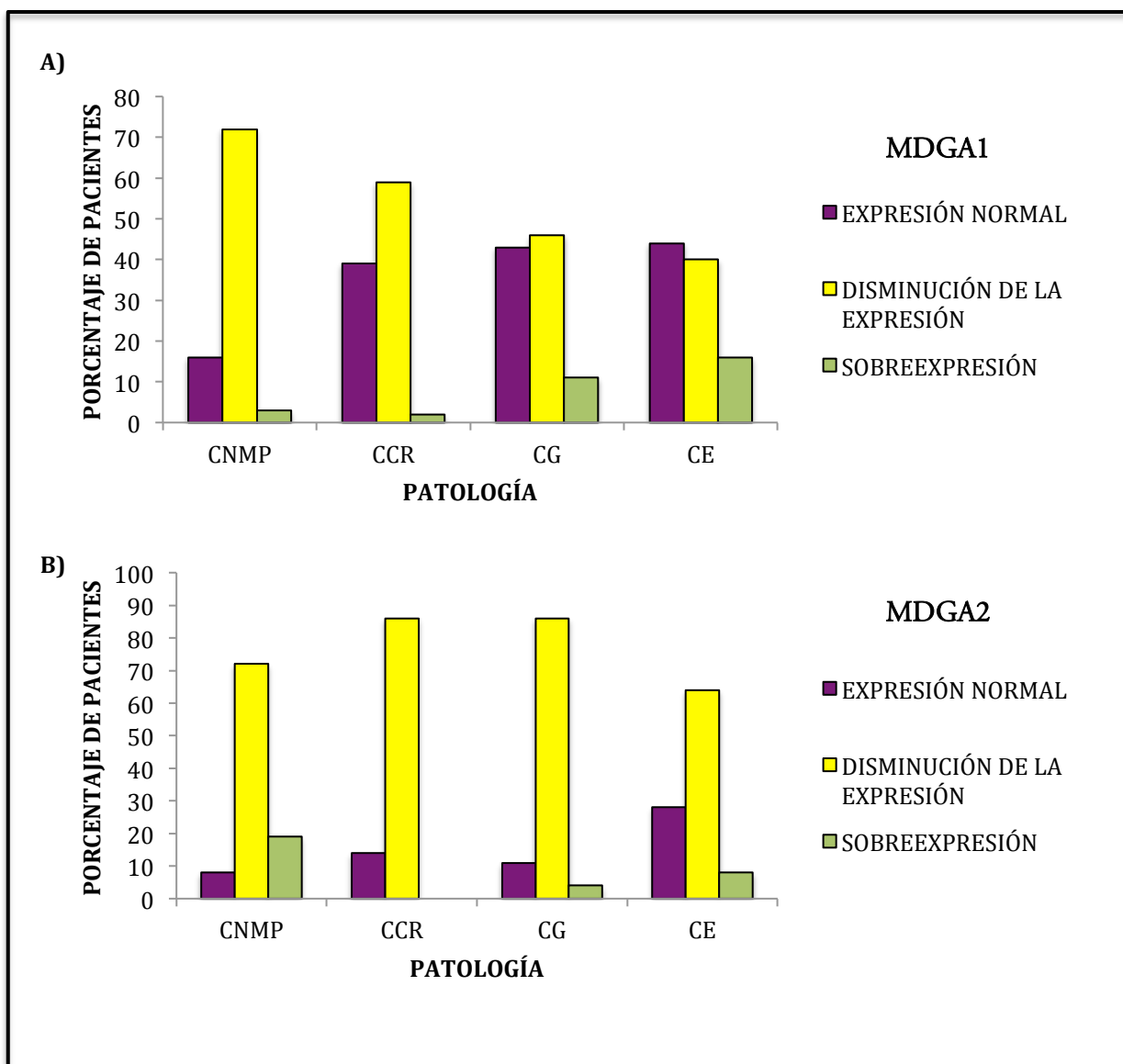
**Figura 4.13.** Representación gráfica de los valores relativos de expresión de *MDGA2* (media de RQ) en las patologías tumorales analizadas. N representa el número de pacientes.

Los resultados obtenidos expresados en porcentajes se muestran en la tabla 4.12 y en la figura 4.14. El gen *MDGAI* presentó una disminución de expresión en el 70.5% de los pacientes con CNMP, en el 59.2% de los pacientes con CCR, en el 46.4% de los pacientes con CG y en el 40% de los pacientes con CE. Sin embargo, un número reducido de pacientes mostraron niveles incrementados de expresión en las cuatro patologías analizadas: 3.4% de los pacientes con CNMP, 2% de los pacientes con CCR, 10.7% de los pacientes con CG y 16% de los pacientes con CE. El resto de los pacientes mostraron niveles de expresión de *MDGAI* similares a los obtenidos en las muestras no tumorales.

En relación al gen *MDGA2* los resultados obtenidos revelaron una disminución de los niveles de expresión de este gen en más del 60% de los pacientes en todas las patologías tumorales analizadas: 72.7% de los pacientes con CNMP, 85.7% de los pacientes con CCR, 85.7% de los pacientes con CG y 64% de los pacientes con CE. Por otro lado, se encontraron niveles de expresión aumentados en el 19.3% de los pacientes con CNMP, en el 3.6% de los pacientes con CG y en 8% de los pacientes con CE. Ningún paciente con CCR presentó niveles de expresión de *MDGA2* incrementados. El resto de los pacientes presentaron niveles de expresión de *MDGA2* similares a los obtenidos en las muestras no tumorales.

**Tabla 4.12.** Porcentaje de pacientes que presentan una expresión disminuida, incrementada o normal de *MDGA1* o *MDGA2*.

PATOLOGÍA TUMORAL (N° de muestras)	Disminución de la expresión		Sobre-expresión		Expresión normal	
	MDGA1	MDGA2	MDGA1	MDGA2	MDGA1	MDGA2
CNMP (88)	62 (70.5%)	64 (72.7%)	3 (3.4%)	17 (19.3%)	23 (26.1%)	7 (7.9%)
CCR (49)	29 (59.2%)	42 (85.7%)	1 (2%)	0	19 (38.8%)	7 (14.3%)
CG (56)	26 (46.4%)	48 (85.7%)	6 (10.7%)	2 (3.6%)	24 (42.8%)	6 (10.7%)
CE (25)	10 (40%)	16 (64%)	4 (16%)	2 (8%)	11 (44%)	7 (28%)

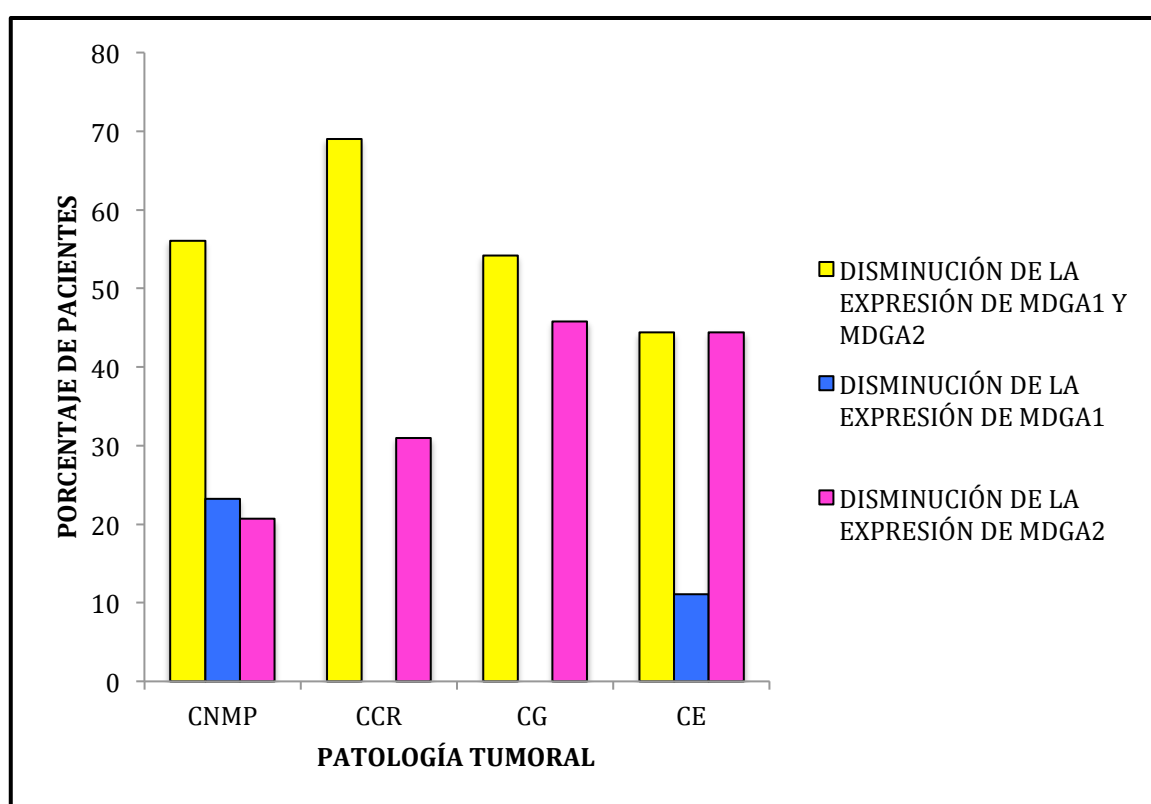


**Figura 4.14.** Representación gráfica del porcentaje de pacientes que presentan una expresión normal, disminuida o incrementada de *MDGA1* (A) o *MDGA2* (B).

En todas las patologías tumorales analizadas, el grupo mayoritario de pacientes correspondía a aquellos que mostraban una disminución en la expresión de los genes *MDGA1* o *MDGA2* (Tabla 4.12 y Figura 4.14). Si se analiza únicamente este grupo de pacientes, se pueden establecer tres subgrupos en cada patología: un subgrupo constituido por aquellos pacientes en los que sólo disminuye la expresión de *MDGA1*, otro subgrupo integrado por los pacientes en los que sólo disminuye la expresión de *MDGA2*, y por último, un subgrupo formado por los pacientes que muestran una disminución simultánea en la expresión de *MDGA1* y *MDGA2*. La figura 4.15 y su correspondiente tabla 4.13 muestran que en CNMP el 57.5% de los pacientes presentaron una expresión disminuida de ambos genes simultáneamente, un 20% de los pacientes presentaron disminuida únicamente la expresión de *MDGA1* y un 22.5% presentaron únicamente disminuida la expresión de *MDGA2*. En CCR, el 69% de los pacientes presentaron una disminución simultánea de la expresión de ambos genes y un 31% de los pacientes presentaron únicamente disminuida la expresión de *MDGA2*. En CG un 54.2% de los pacientes presentaron disminuida simultáneamente la expresión de ambos genes y el 45.8% de los pacientes presentaron únicamente disminuida la expresión de *MDGA2*. Por último, el 44.4% de los pacientes de CE presentaron disminuida la expresión de ambos genes de manera simultánea, el 11.1% de los pacientes presentaron únicamente disminuida la expresión de *MDGA1* y el 44.4% presentaron disminuida únicamente la expresión de *MDGA2*. En todas las patologías estudiadas, el subgrupo de pacientes más representado correspondía aquellos que mostraban una disminución simultánea de *MDGA1* y *MDGA2*.

**Tabla 4.13.** Porcentaje de pacientes que presentan una disminución simultánea de la expresión de *MDGA1* y *MDGA2*, únicamente de *MDGA1* o únicamente de *MDGA2*. Entre paréntesis se indica el número de pacientes.

	CNMP (80)	CCR (42)	CG (48)	CE (18)
Disminución de la expresión de <i>MDGA1</i> y <i>MDGA2</i>	57.5% (46)	69% (29)	54.2% (26)	44.4% (8)
Disminución de la expresión de <i>MDGA1</i>	20% (16)	-	-	11.1% (2)
Disminución de la expresión de <i>MDGA2</i>	22.5% (18)	31% (13)	45.8% (22)	44.4% (8)



**Figura 4.15.** Representación gráfica del porcentaje de pacientes que presentan una disminución simultánea de la expresión de ambos genes, únicamente de *MDGA1* o únicamente de *MDGA2*.

### 4.4.1.1 Análisis de los niveles de expresión de MDGA1 y su relación con las variables clínico-patológicas de los tumores

Con los datos obtenidos, se realizó un exhaustivo análisis estadístico para investigar si existía alguna relación entre los niveles de expresión de *MDGA1* y las características clínico-patológicas de los tumores. En estos análisis se incluyeron únicamente aquellos pacientes de los que se disponía de las variables clínico-patológicas. En las tablas 4.14, 4.15, 4.16 y 4.17 se pueden observar los resultados de las pruebas estadísticas realizadas en las diferentes patologías tumorales estudiadas. En general, no se observa ningún tipo de asociación entre la disminución de la expresión de *MDGA1* y las diferentes variables clínico-patológicas analizadas. Únicamente cabe destacar que parece existir una relación estadísticamente significativa entre la disminución de la expresión de *MDGA1* y el grado de diferenciación del tumor en cáncer no microcítico de pulmón ( $p=0.023$ ).

**Tabla 4.14.** Asociación entre la disminución de los niveles de expresión de *MDGAI* y las diferentes variables clínico-patológicas en los pacientes con CNMP.

Variable	Casos (n)	Disminución de la expresión de <i>MDGAI</i>		P valor
		Si (%)	No (%)	
<b>Género de los pacientes</b>	<b>87</b>			0.625
Mujer	13	10 (76.9%)	3 (23.1%)	
Hombre	74	52 (70.3%)	22 (29.7%)	
<b>Edad de los pacientes</b>	<b>76</b>			0.803
> 66	38	26 (68.4%)	12 (31.6%)	
≤ 66	38	27 (71%)	11 (29%)	
<b>Estadio TNM</b>	<b>83</b>			0.441
I	58	40 (69%)	18 (31%)	
II	15	11 (73.3%)	4 (26.7%)	
IIIA	9	7 (77.8%)	2 (22.2%)	
IIIB	1	0	1 (100%)	
<b>Tamaño del tumor</b>	<b>84</b>			0.489
T1	23	16 (69.6%)	7 (30.4%)	
T2	53	38 (71.7%)	15 (28.3%)	
T3	7	5 (71.4%)	2 (28.6%)	
T4	1	0	1 (100%)	
<b>Infiltración ganglionar</b>	<b>84</b>			0.209
N0	73	50 (68.5%)	23 (31.5%)	
N1	3	3 (100%)	0	
N2	7	6 (85.7%)	1 (14.3%)	
N3	1	0	1 (100%)	
<b>Tipo Histológico</b>	<b>82</b>			0.769
Epidermoide	41	27 (65.8%)	14 (34.2%)	
Adenocarcinoma	37	27 (73%)	10 (37%)	
Carcinoma Indiferenciado de células grandes	4	3 (75%)	1 (25%)	
<b>Grado de diferenciación</b>	<b>75</b>			<b>0.023</b>
Bien	27	16 (59.3%)	11 (40.7%)	
Moderado	25	15 (60%)	10 (40%)	
Pobre	23	21 (91.3%)	2 (8.7%)	
<b>Recurrencia tumoral</b>	<b>68</b>			0.245
Negativa	42	30 (71.4%)	12 (28.6%)	
Positiva	26	15 (57.7%)	11 (42.3%)	

## Resultados

**Tabla 4.15.** Asociación entre la disminución de los niveles de expresión de *MDGAI* y las diferentes variables clínico-patológicas en los pacientes con CCR.

Variable	Casos (n)	Disminución de la expresión de <i>MDGAI</i>		P valor
		Si (%)	No (%)	
<b>Género de los pacientes</b>	<b>46</b>			0.595
Mujer	24	16 (66.7%)	8 (33.3%)	
Hombre	22	13 (59%)	9 (41%)	
<b>Edad de los pacientes</b>	<b>44</b>			0.490
>73	19	11 (58%)	8 (42%)	
≤ 73	25	17 (68%)	8 (32%)	
<b>Estadio tumoral Dukes</b>	<b>43</b>			0.529
A	8	5 (62.5%)	3 (37.5%)	
B	20	12 (60%)	8 (40%)	
C	8	7 (87.5%)	1 (12.5%)	
D	7	4 (57.1%)	3 (42.9%)	
<b>Localización del tumor</b>	<b>41</b>			0.539
Colon derecho	11	6 (54.5%)	5 (45.5%)	
Colon izquierdo	14	9 (64.3%)	5 (35.7%)	
Recto	16	12 (75%)	4 (25%)	
<b>Grado de diferenciación</b>	<b>17</b>			0.435
Bien	7	5 (71.4%)	2 (28.6%)	
Moderado	9	4 (44.4%)	5 (55.6%)	
Pobre	1	0	1	
<b>Tamaño del tumor</b>	<b>31</b>			0.350
T1	1	0	1 (100%)	
T2	7	6 (85.7%)	1 (14.3%)	
T3	18	12 (66.7%)	6 (33.3%)	
T4	5	3 (60%)	2 (40%)	
<b>Infiltración ganglionar</b>	<b>31</b>			0.432
N0	20	12 (60%)	8 (40%)	
N1	7	6 (85.7%)	1 (14.3%)	
N2	4	3 (75%)	1 (25%)	
<b>Metástasis</b>	<b>32</b>			0.646
Sí	5	3 (60%)	2 (40%)	
No	27	19 (70.4%)	8 (29.6%)	
<b>Recurrencia tumoral</b>	<b>40</b>			0.500
Negativa	31	21 (67.7%)	10 (32.3%)	
Positiva	9	5 (55.5%)	4 (44.4%)	

**Tabla 4.16.** Asociación entre la disminución de los niveles de expresión de *MDGA1* y las diferentes variables clínico-patológicas en los pacientes con CG.

Variable	Casos (n)	Disminución de la expresión de <i>MDGA1</i>		P valor
		Si (%)	No (%)	
<b>Género de los pacientes</b>	<b>50</b>			0.254
Mujer	28	12 (42.9%)	16 (57.1%)	
Hombre	22	13 (59.1%)	9 (40.9%)	
<b>Edad de los pacientes</b>	<b>50</b>			0.258
> 73	24	10 (41.7%)	14 (58.3%)	
≤ 73	26	15 (57.7%)	11 (42.3%)	
<b>Estadio TNM</b>	<b>34</b>			0.938
I	11	5 (45.5%)	6 (54.5%)	
II	10	4 (40%)	6 (60%)	
III	13	5 (38.5%)	8 (61.5%)	
<b>Localización del tumor</b>	<b>48</b>			0.416
Proximal	5	1 (20%)	4 (80%)	
Media	12	6 (50%)	6 (50%)	
Distal	31	16 (51.6%)	15 (48.4%)	
<b>Tipo tumoral</b>	<b>43</b>			0.446
Intestinal	27	14 (51.8%)	13 (48.2%)	
Difuso	15	6 (40%)	9 (60%)	
Mixto	1	1 (100%)	0	
<b>Tamaño del tumor</b>	<b>35</b>			0.857
T1	4	2 (50%)	2 (50%)	
T2	9	5 (55.6%)	4 (44.4%)	
T3	11	4 (36.4%)	7 (66.6%)	
T4	11	5 (45.5%)	6 (54.5%)	
<b>Infiltración ganglionar</b>	<b>36</b>			0.453
N0	20	10 (50%)	10 (50%)	
N1	4	2 (50%)	2 (50%)	
N2	5	1 (20%)	4 (80%)	
N3	7	2 (28.6%)	5 (71.4%)	
<b>Metástasis</b>	<b>40</b>			0.109
Sí	2	2 (100%)	0	
No	38	16 (42.1%)	22 (57.9%)	
<b>Recurrencia tumoral</b>	<b>47</b>			0.358
Negativa	31	16 (51.6%)	15 (48.4%)	
Positiva	16	6 (37.5%)	10 (62.5%)	

## Resultados

**Tabla 4.17.** Asociación entre la disminución de los niveles de expresión de *MDGAI* y las diferentes variables clínico-patológicas en los pacientes con CE.

Variable	Casos (n)	Disminución de la expresión de <i>MDGAI</i>		P valor
		Si (%)	No (%)	
<b>Género de los pacientes</b>	<b>25</b>			-
Mujer	0	0	0	
Hombre	25	10 (40%)	15 (60%)	
<b>Edad de los pacientes</b>	<b>24</b>			0.072
>70	13	7 (53.8%)	6 (46.2%)	
≤ 70	11	2 (18.2%)	9 (81.8%)	
<b>Tipo histológico</b>	<b>24</b>			0.647
Adenocarcinoma	19	7 (36.8%)	12 (63.2%)	
Epidermoide	4	2 (50%)	2 (50%)	
Indiferenciado	1	0	1 (100%)	
<b>Localización del tumor</b>	<b>24</b>			0.897
Proximal	0	0	0	
Medio	5	2 (40%)	3 (60%)	
Distal	19	7 (36.8%)	12 (63.2%)	
<b>Estadio</b>	<b>21</b>			0.408
I	1	1 (100%)	0	
II	6	3 (50%)	3 (50%)	
III	13	4 (30.8%)	9 (69.2%)	
IV	1	0	1 (100%)	
<b>Tamaño del tumor</b>	<b>21</b>			0.284
T1	1	1 (100%)	0	
T2	8	3 (37.5%)	5 (62.5%)	
T3	11	3 (27.3%)	8 (72.7%)	
T4	1	1(100%)	0	
<b>Infiltración ganglionar</b>	<b>21</b>			0.933
N0	5	2 (40%)	3 (60%)	
N1	10	4 (40%)	6 (60%)	
N2	2	1 (50%)	1 (50%)	
N3	4	1 (25%)	3 (75%)	
<b>Metástasis</b>	<b>21</b>			0.421
Sí	1	0	1 (100%)	
No	20	8 (40%)	12 (60%)	
<b>Recurrencia tumoral</b>	<b>23</b>			0.907
Negativa	9	3 (33.3%)	6 (66.7%)	
Positiva	14	5 (35.7%)	9 (64.3%)	

#### 4.4.1.2 Análisis de los niveles de expresión de MDGA2 y su relación con las variables clínico-patológicas de los tumores

Así mismo, se realizó un análisis estadístico para estudiar la posible relación entre la disminución de la expresión de *MDGA2* y las diferentes variables clínico-patológicas en todas las patologías tumorales estudiadas. En este estudio se incluyeron únicamente aquellos pacientes de los que se disponía de las características clínico-patológicas. Las tablas 4.18, 4.19, 4.20 y 4.21 muestran los resultados de este análisis. Los resultados muestran que no existe ninguna relación entre la disminución de la expresión de *MDGA2* y las diferentes variables clínico-patológicas. Únicamente parece existir una asociación estadísticamente significativa entre la disminución de la expresión de este gen y el tamaño del tumor en cáncer gástrico ( $p=0.020$ ).

## Resultados

**Tabla 4.18.** Asociación entre la disminución de los niveles de expresión de *MDGA2* y las diferentes variables clínico-patológicas en los pacientes con CNMP.

Variable	Casos (n)	Disminución de la expresión de <i>MDGA2</i>		P valor
		Si (%)	No (%)	
<b>Género de los pacientes</b>	<b>87</b>			0.341
Mujer	13	8 (61.5%)	5 (38.5%)	
Hombre	74	55 (74.3%)	19 (25.7%)	
<b>Edad de los pacientes</b>	<b>76</b>			0.129
> 66	38	30 (79%)	8 (21%)	
≤ 66	38	24 (63.2%)	14 (36.8%)	
<b>Estadio TNM</b>	<b>83</b>			0.753
I	58	40 (69%)	18 (31%)	
II	15	12 (80%)	3 (20%)	
IIIA	9	6 (66.7%)	3 (33.3%)	
IIIB	1	1 (100%)	0	
<b>Tamaño del tumor</b>	<b>84</b>			0.812
T1	23	15 (65.2%)	8 (34.8%)	
T2	53	39 (73.6%)	14 (26.4%)	
T3	7	5 (71.4%)	2 (28.6%)	
T4	1	1 (100%)	0	
<b>Infiltración ganglionar</b>	<b>84</b>			0.933
N0	73	52 (71.2%)	21 (28.8%)	
N1	3	2 (66.7%)	1 (33.3%)	
N2	7	5 (71.4%)	2 (28.6%)	
N3	1	1 (100%)	0	
<b>Tipo Histológico</b>	<b>82</b>			0.605
Epidermoide	41	30 (73.2%)	11 (26.8%)	
Adenocarcinoma	37	27 (73%)	10 (27%)	
Carcinoma Indiferenciado de células grandes	4	2 (50%)	2 (50%)	
<b>Grado de diferenciación</b>	<b>75</b>			0.726
Bien	27	21 (77.8%)	6 (22.2%)	
Moderado	25	17 (68%)	8 (32%)	
Pobre	23	17 (73.9%)	6 (26.1%)	
<b>Recurrencia tumoral</b>	<b>68</b>			0.367
Negativa	42	28 (66.7%)	14 (33.3%)	
Positiva	26	20 (76.9%)	6 (23.1%)	

**Tabla 4.19.** Asociación entre la disminución de los niveles de expresión de *MDGA2* y las diferentes variables clínico-patológicas en los pacientes con CCR.

Variable	Casos (n)	Disminución de la expresión de <i>MDGA2</i>		P valor
		Sí (%)	No (%)	
<b>Género de los pacientes</b>	<b>45</b>			0.113
Mujer	24	23 (95.8%)	1 (4.2%)	
Hombre	21	17 (80.9%)	4 (19.1%)	
<b>Edad de los pacientes</b>	<b>43</b>			0.449
>73	19	16 (84.2%)	3 (15.8%)	
≤ 73	24	22 (91.7%)	2 (8.3%)	
<b>Estadio tumoral Dukes</b>	<b>43</b>			0.990
A	8	7 (87.5%)	1 (12.5%)	
B	20	18 (90%)	2 (10%)	
C	8	7 (87.5%)	1 (12.5%)	
D	7	6 (85.7%)	1 (14.3%)	
<b>Localización del tumor</b>	<b>40</b>			0.920
Colon derecho	11	10 (90.9%)	1 (9.1%)	
Colon izquierdo	14	12 (85.7%)	2 (14.3%)	
Recto	15	13 (86.7%)	2 (13.3%)	
<b>Grado de diferenciación</b>	<b>16</b>			0.412
Bien	6	6 (100%)	0	
Moderado	9	6 (66.7%)	3 (33.3%)	
Pobre	1	1 (100%)	0	
<b>Tamaño del tumor</b>	<b>31</b>			0.933
T1	1	1 (100%)	0	
T2	7	6 (85.7%)	1 (14.3%)	
T3	18	16 (88.9%)	2 (11.1%)	
T4	5	4 (80%)	1 (20%)	
<b>Infiltración ganglionar</b>	<b>31</b>			0.711
N0	20	17 (85%)	3 (15%)	
N1	7	6 (85.7%)	1 (14.3%)	
N2	4	4 (100%)	0	
<b>Metástasis</b>	<b>32</b>			0.581
Sí	5	4 (80%)	1 (20%)	
No	27	24 (88.9%)	3 (11.1%)	
<b>Recurrencia tumoral</b>	<b>40</b>			0.886
Negativa	31	27 (87.1%)	4 (12.9%)	
Positiva	9	8 (88.9%)	1 (11.1%)	

## Resultados

**Tabla 4.20.** Asociación entre la disminución de los niveles de expresión de *MDGA2* y las diferentes variables clínico-patológicas en los pacientes con CG.

Variable	Casos (n)	Disminución de la expresión de <i>MDGA2</i>		P valor
		Si (%)	No (%)	
<b>Género de los pacientes</b>	<b>50</b>			0.150
Mujer	28	23 (82.1%)	5 (17.9%)	
Hombre	22	21 (95.4%)	1 (4.5%)	
<b>Edad de los pacientes</b>	<b>50</b>			0.329
> 73	24	20 (83.3%)	4 (16.7%)	
≤ 73	26	24 (92.3%)	2 (7.7%)	
<b>Estadio TNM</b>	<b>34</b>			0.777
I	11	10 (90.9%)	1 (9.1%)	
II	10	8 (80%)	2 (20%)	
III	13	11 (84.6%)	2 (15.4%)	
<b>Localización del tumor</b>	<b>48</b>			0.096
Proximal	5	3 (60%)	2 (40%)	
Media	12	10 (83.3%)	2 (16.7%)	
Distal	31	29 (93.5%)	2 (6.5%)	
<b>Tipo tumoral</b>	<b>43</b>			0.685
Intestinal	27	23 (85.2%)	4 (14.8%)	
Difuso	15	14 (93.3%)	1 (6.7%)	
Mixto	1	1 (100%)	0	
<b>Tamaño del tumor</b>	<b>35</b>			<b>0.020</b>
T1	4	4 (100%)	0	
T2	9	9 (100%)	0	
T3	11	7 (63.6%)	4 (36.4%)	
T4	11	11 (100%)	0	
<b>Infiltración ganglionar</b>	<b>36</b>			0.120
N0	20	19 (95%)	1 (5%)	
N1	4	2 (50%)	2 (50%)	
N2	5	4 (80%)	1 (20%)	
N3	7	6 (85.7%)	1 (14.3%)	
<b>Metástasis</b>	<b>40</b>			0.583
Sí	2	2 (100%)	0	
No	38	33 (86.8%)	5 (13.2%)	
<b>Recurrencia tumoral</b>	<b>47</b>			0.969
Negativa	31	27 (87.1%)	4 (12.9%)	
Positiva	16	14 (87.5%)	2 (12.5%)	

**Tabla 4.21.** Asociación entre la disminución de los niveles de expresión de *MDGA2* y las diferentes variables clínico-patológicas en los pacientes con CE.

Variable	Casos (n)	Disminución de la expresión de <i>MDGA2</i>		P valor
		Sí (%)	No (%)	
<b>Género de los pacientes</b>	<b>25</b>			-
Mujer	0	0	0	
Hombre	25	16 (64%)	9 (36%)	
<b>Edad de los pacientes</b>	<b>24</b>			0.459
>70	13	9 (69.2%)	4 (30.8%)	
≤ 70	11	6 (54.5%)	5 (45.5%)	
<b>Tipo histológico</b>	<b>24</b>			0.150
Adenocarcinoma	19	10 (52.6%)	9 (47.4%)	
Epidermoide	4	4 (100%)	0	
Indiferenciado	1	1 (100%)	0	
<b>Localización del tumor</b>	<b>24</b>			0.052
Proximal	0	0	0	
Medio	5	5 (100%)	0	
Distal	19	10 (52.6%)	9 (47.4%)	
<b>Estadio</b>	<b>21</b>			0.641
I	1	1 (100%)	0	
II	6	3 (50%)	3 (50%)	
III	13	7 (53.8%)	6 (46.2%)	
IV	1	1 (100%)	0	
<b>Tamaño del tumor</b>	<b>21</b>			0.214
T1	1	1 (100%)	0	
T2	8	6 (75%)	2 (25%)	
T3	11	4 (36.4%)	7 (63.6%)	
T4	1	1 (100%)	0	
<b>Infiltración ganglionar</b>	<b>21</b>			0.490
N0	5	3 (60%)	2 (40%)	
N1	10	7 (70%)	3 (30%)	
N2	2	1 (50%)	1 (50%)	
N3	4	1 (25%)	3 (75%)	
<b>Metástasis</b>	<b>21</b>			0.375
Sí	1	1 (100%)	0	
No	20	11 (55%)	9 (45%)	
<b>Recurrencia tumoral</b>	<b>23</b>			0.675
Negativa	9	5 (55.6%)	4 (44.4%)	
Positiva	14	9 (64.3%)	5 (35.7%)	

### 4.4.1.3 Análisis de los niveles de expresión de MDGA1 y MDGA2 y su relación con las variables clínico-patológicas de los tumores

Por último, se realizó un exhaustivo análisis estadístico teniendo en cuenta los niveles de expresión de *MDGA1* y *MDGA2* en las diferentes patologías tumorales estudiadas. De este modo, se analizó si existía alguna asociación entre la disminución de la expresión de ambos genes y las diferentes variables clínico-patológicas. Igualmente, en este estudio únicamente se incluyeron aquellos pacientes de los que se disponía de las características clínico-patológicas. Las tablas 4.22, 4.23, 4.24 y 4.25 muestran los resultados del análisis. Los resultados muestran que no existe una relación entre la disminución simultánea de los niveles de expresión de *MDGA1* y *MDGA2* y las variables clínico-patológicas estudiadas.

**Tabla 4.22.** Asociación entre la disminución de los niveles de expresión de *MDGA1* y *MDGA2* y las diferentes variables clínico-patológicas en los pacientes con CNMP.

Variable	Casos (n)	Disminución de la expresión de <i>MDGA1</i> y <i>MDGA2</i>		P valor
		Si (%)	No (%)	
<b>Género de los pacientes</b>	<b>87</b>			0.599
Mujer	13	6 (46.2%)	7 (53.8%)	
Hombre	74	40 (54.1%)	34 (45.9%)	
<b>Edad de los pacientes</b>	<b>76</b>			0.169
> 66	38	22 (57.9%)	16 (42.1%)	
≤ 66	38	16 (42.1%)	22 (57.9%)	
<b>Estadio TNM</b>	<b>83</b>			0.622
I	58	28 (48.3%)	30 (51.7%)	
II	15	9 (60%)	6 (40%)	
IIIA	9	5 (55.6%)	4 (44.4%)	
IIIB	1	0	1 (100%)	
<b>Tamaño del tumor</b>	<b>84</b>			0.727
T1	23	11 (47.8%)	12 (52.2%)	
T2	53	28 (52.8%)	25 (47.2%)	
T3	7	4 (57.1%)	3 (42.9%)	
T4	1	0	1 (100%)	
<b>Infiltración ganglionar</b>	<b>84</b>			0.695
N0	73	37 (50.7%)	36 (49.3%)	
N1	3	2 (66.7%)	1 (33.3%)	
N2	7	4 (57.1%)	3 (42.9%)	
N3	1	0	1 (100%)	
<b>Tipo Histológico</b>	<b>82</b>			0.655
Epidermoide	41	19 (46.3%)	22 (53.7%)	
Adenocarcinoma	37	21 (56.8%)	16 (43.2%)	
Carcinoma Indiferenciado de células grandes	4	2 (50%)	2 (50%)	
<b>Grado de diferenciación</b>	<b>75</b>			0.245
Bien	27	12 (44.4%)	15 (55.6%)	
Moderado	25	11 (44%)	14 (56%)	
Pobre	23	15 (65.2%)	8 (34.8%)	
<b>Recurrencia tumoral</b>	<b>68</b>			0.758
Negativa	42	21 (50%)	21 (50%)	
Positiva	26	12 (46.2%)	14 (53.8%)	

## Resultados

**Tabla 4.23.** Asociación entre la disminución de los niveles de expresión de *MDGA1* y *MDGA2* y las diferentes variables clínico-patológicas en los pacientes con CCR.

Variable	Casos (n)	Disminución de la expresión de <i>MDGA1</i> y <i>MDGA2</i>		P valor
		Si (%)	No (%)	
<b>Género de los pacientes</b>	<b>45</b>			0.739
Mujer	24	16 (66.7%)	8 (33.3%)	
Hombre	21	13 (61.9%)	8 (38.1%)	
<b>Edad de los pacientes</b>	<b>43</b>			0.377
>73	19	11 (57.9%)	8 (42.1%)	
≤ 73	24	17 (70.8%)	7 (29.2%)	
<b>Estadio tumoral Dukes</b>	<b>43</b>			0.529
A	8	5 (62.5%)	3 (37.5%)	
B	20	12 (60%)	8 (40%)	
C	8	7 (87.5%)	1 (12.5%)	
D	7	4 (57.1%)	3 (42.9%)	
<b>Localización del tumor</b>	<b>40</b>			0.372
Colon derecho	11	6 (54.5%)	5 (45.5%)	
Colon izquierdo	14	9 (64.3%)	5 (35.7%)	
Recto	15	12 (80%)	3 (20%)	
<b>Grado de diferenciación</b>	<b>16</b>			0.293
Bien	6	5 (83.3%)	1 (16.7%)	
Moderado	9	4 (44.4%)	5 (55.6%)	
Pobre	1	0	1 (100%)	
<b>Tamaño del tumor</b>	<b>31</b>			0.350
T1	1	0	1 (100%)	
T2	7	6 (85.7%)	1 (14.3%)	
T3	18	12 (66.7%)	6 (33.3%)	
T4	5	3 (60%)	2 (40%)	
<b>Infiltración ganglionar</b>	<b>31</b>			0.432
N0	20	12 (60%)	8 (40%)	
N1	7	6 (85.7%)	1 (14.3%)	
N2	4	3 (75%)	1 (25%)	
<b>Metástasis</b>	<b>32</b>			0.646
Sí	5	3 (60%)	2 (40%)	
No	27	19 (70.4%)	8 (29.6%)	
<b>Recurrencia tumoral</b>	<b>40</b>			0.500
Negativa	31	21 (67.7%)	10 (32.3%)	
Positiva	9	5 (55.6%)	4 (44.4%)	

**Tabla 4.24.** Asociación entre la disminución de los niveles de expresión de *MDGA1* y *MDGA2* y las diferentes variables clínico-patológicas en los pacientes con CG.

Variable	Casos (n)	Disminución de la expresión de <i>MDGA1</i> y <i>MDGA2</i>		P valor
		Si (%)	No (%)	
<b>Género de los pacientes</b>	<b>50</b>			0.254
Mujer	28	12 (42.9%)	16 (57.1%)	
Hombre	22	13 (59.1%)	9 (40.9%)	
<b>Edad de los pacientes</b>	<b>50</b>			0.258
> 73	24	10 (41.7%)	14 (58.3%)	
≤ 73	26	15 (57.7%)	11 (42.3%)	
<b>Estadio TNM</b>	<b>34</b>			0.938
I	11	5 (45.5%)	6 (54.5%)	
II	10	4 (40%)	6 (60%)	
III	13	5 (38.5%)	8 (61.5%)	
<b>Localización del tumor</b>	<b>48</b>			0.416
Proximal	5	1 (20%)	4 (80%)	
Media	12	6 (50%)	6 (50%)	
Distal	31	16 (51.6%)	15 (48.4%)	
<b>Tipo tumoral</b>	<b>43</b>			0.446
Intestinal	27	14 (51.8%)	13 (48.2%)	
Difuso	15	6 (40%)	9 (60%)	
Mixto	1	1 (100%)	0	
<b>Tamaño del tumor</b>	<b>35</b>			0.857
T1	4	2 (50%)	2 (50%)	
T2	9	5 (55.6%)	4 (44.4%)	
T3	11	4 (36.4%)	7 (63.6%)	
T4	11	5 (45.5%)	6 (54.5%)	
<b>Infiltración ganglionar</b>	<b>36</b>			0.543
N0	20	10 (50%)	10 (50%)	
N1	4	2 (50%)	2 (50%)	
N2	5	1 (20%)	4 (80%)	
N3	7	2 (28.6%)	5 (71.4%)	
<b>Metástasis</b>	<b>40</b>			0.109
Sí	2	2 (100%)	0	
No	38	16 (42.1%)	22 (57.9%)	
<b>Recurrencia tumoral</b>	<b>47</b>			0.358
Negativa	31	16 (51.6%)	15 (48.4%)	
Positiva	16	6 (37.5%)	10 (62.5%)	

## Resultados

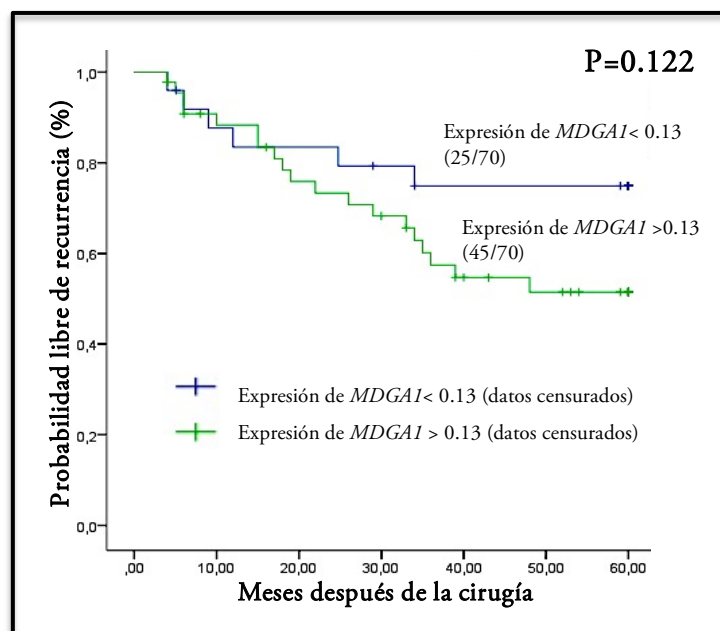
**Tabla 4.25.** Asociación entre la disminución de los niveles de expresión de *MDGA1* y *MDGA2* y las diferentes variables clínico-patológicas en los pacientes con CE.

Variable	Casos (n)	Disminución de la expresión de <i>MDGA1</i> y <i>MDGA2</i>		P valor
		Sí (%)	No (%)	
<b>Género de los pacientes</b>	<b>22</b>			-
Mujer	0	0	0	
Hombre	22	8 (36.4%)	14 (63.6%)	
<b>Edad de los pacientes</b>	<b>21</b>			0.061
>70	12	6 (50%)	6 (50%)	
≤ 70	9	1 (11.1%)	8 (88.9%)	
<b>Tipo histológico</b>	<b>21</b>			0.432
Adenocarcinoma	17	5 (29.4%)	12 (70.6%)	
Epidermoide	4	2 (50%)	2 (50%)	
Indiferenciado	0	0	0	
<b>Localización del tumor</b>	<b>21</b>			0.432
Proximal	0	0	0	
Medio	4	2 (50%)	2 (50%)	
Distal	17	5 (29.4%)	12 (70.6%)	
<b>Estadio</b>	<b>21</b>			0.368
I	1	1 (100%)	0	
II	6	2 (33.3%)	4 (66.7%)	
III	13	3 (23.1%)	10 (76.9%)	
IV	1	0	1 (100%)	
<b>Tamaño del tumor</b>	<b>19</b>			0.075
T1	1	1 (100%)	0	
T2	7	3 (42.9%)	4 (57.1%)	
T3	10	1 (10%)	9 (90%)	
T4	1	1 (100%)	0	
<b>Infiltración ganglionar</b>	<b>19</b>			0.403
N0	4	1 (25%)	3 (75%)	
N1	9	4 (44.4%)	5 (55.6%)	
N2	2	1 (50%)	1 (50%)	
N3	4	0	4 (100%)	
<b>Metástasis</b>	<b>19</b>			-
Sí	0	0	0	
No	19	6 (31.6%)	13 (68.4%)	
<b>Recurrencia tumoral</b>	<b>20</b>			0.919
Negativa	7	2 (28.6%)	5 (71.4%)	
Positiva	13	4 (30.8%)	9 (69.2%)	

#### 4.4.1.4. Estudios de pronóstico basados en la expresión de los genes *MDGA1* y *MDGA2* en las diferentes patologías tumorales estudiadas.

Con el fin de explorar si la expresión de los genes *MDGA1* o *MDGA2* podría constituir un biomarcador con valor predictivo en las diferentes patologías tumorales estudiadas, se realizaron estudios de pronóstico. Para ello se utilizó la aplicación electrónica *Cutoff Finder* (Budczies et al., 2012) que permitió identificar el punto óptimo para establecer dos subpoblaciones de pacientes con distinto pronóstico clínico. El método de Kaplan-Meier fue el elegido para la realización de las curvas de supervivencia y el test Log-Rank para compararlas entre sí.

En relación al **CNMP** el estudio de pronóstico se realizó en 70 pacientes de los que se disponía del seguimiento clínico. En cuanto a la expresión de *MDGA1*, el punto de corte óptimo que permitió establecer dos subpoblaciones con un pronóstico clínico diferente fue 0.13 ( $P=0.122$ ; Log-Rank) (Figura 4.16). Veinticinco pacientes (25/70; 35.7%) presentaron una expresión de *MDGA1* inferior a 0.13 y cuarenta y cinco pacientes (45/70; 64.3%) presentaron una expresión de *MDGA1* superior a 0.13.



**Figura 4.16.** Curvas de supervivencia obtenidas mediante el método de Kaplan-Meier en relación a la expresión de *MDGA1* en CNMP. Entre paréntesis se representan el número de pacientes pertenecientes a cada grupo respecto al número total de pacientes incluidos en el estudio.

En la tabla 4.26 se muestran los datos obtenidos de estos dos grupos de pacientes en relación al estudio pronóstico.

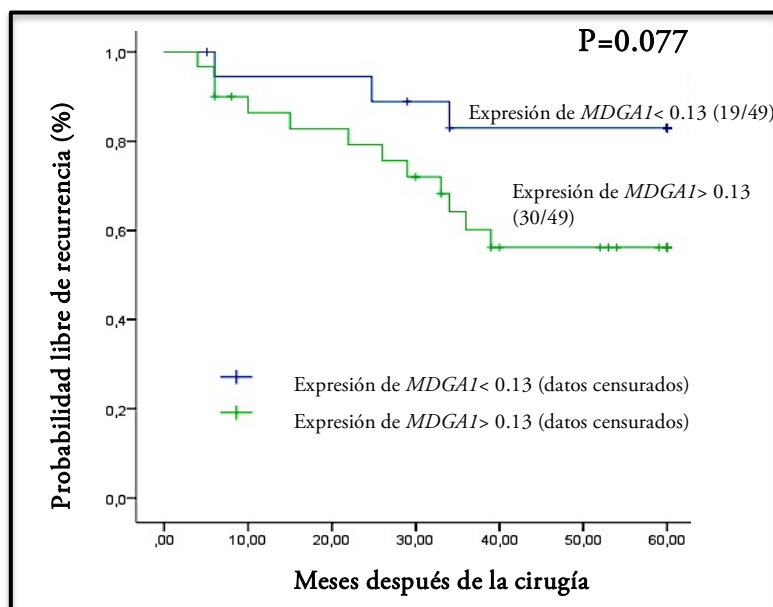
**Tabla 4.26.** Subgrupos de pacientes de CNMP establecidos en el estudio de pronóstico en base a la expresión de *MDGAI*. Se muestra el número total de pacientes de cada subgrupo, el número de pacientes que presentan recidiva, el número de datos censurados y el tiempo medio libre de enfermedad.

Valor relativo de expresión de <i>MDGAI</i>	Casos	Recidiva	Datos censurados	Estimación de meses libres de enfermedad (media $\pm$ error típico)
RQ <i>MDGAI</i> < 0.13	25	6	19	48.76 $\pm$ 4.11
RQ <i>MDGAI</i> > 0.13	45	19	26	42.01 $\pm$ 3.24

Estos resultados indicaban que la expresión de *MDGAI* en los tumores de los pacientes afectados de CNMP parecía influir en el pronóstico, de manera que los pacientes con una expresión de *MDGAI* inferior a 0.13 presentaban un tiempo medio libre de enfermedad de 6.75 meses mayor que el grupo de pacientes con expresión de *MDGAI* superior a 0.13. Además las diferencias estadísticas entre los dos grupos de pacientes se encontraban próximas a la significación estadística (P=0.122; Log-Rank).

Por otro lado, si se tiene en cuenta que en la población de pacientes de CNMP incluidos en este estudio, un elevado número de casos (49/70; 70%) pertenecían al estadio I, y el 30% restante pertenecía a los estadios tumorales II y IIIA, parecía interesante estudiar el valor pronóstico de la expresión de *MDGAI* considerando únicamente el grupo de pacientes de estadio I. El estudio de pronóstico reveló que el punto de corte óptimo que distingue entre dos subpoblaciones con un pronóstico clínico diferente en función de la expresión de *MDGAI* fue 0.13 (P=0.077; Log-Rank) (Figura 4.17). Diecinueve pacientes (19/49; 38.8%) presentaron una expresión de *MDGAI* inferior a 0.13 y treinta pacientes (30/49; 61.2%) presentaron una expresión de *MDGAI* superior a 0.13.

En la tabla 4.27 se muestran los datos obtenidos de estos dos grupos de pacientes en relación al estudio pronóstico.



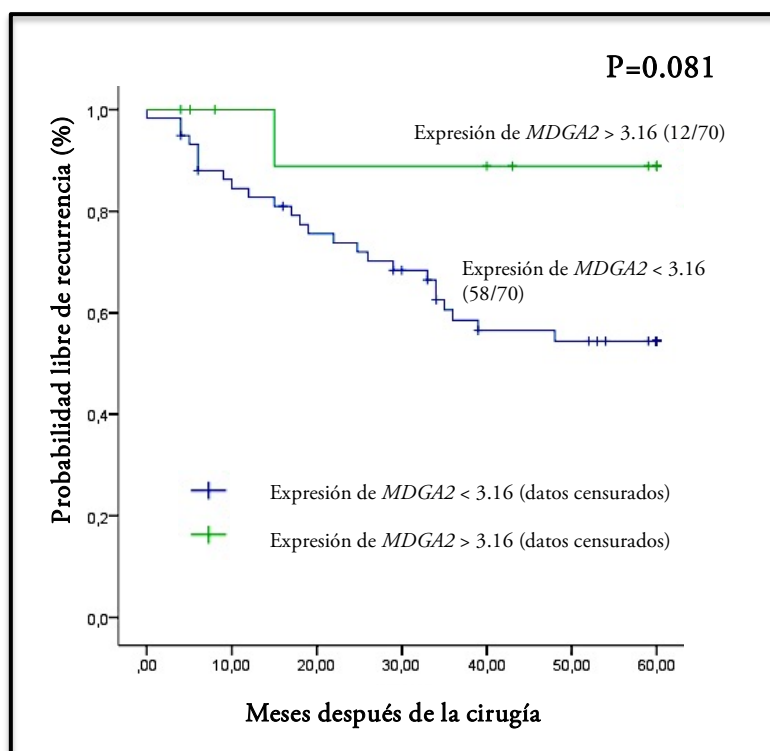
**Figura 4.17.** Curvas de supervivencia obtenida mediante el método de Kaplan-Meier en relación a la expresión de *MDGAI* en los pacientes de estadio I de CNMP.

**Tabla 4.27.** Subgrupos de pacientes de CNMP de estadio I establecidos en el estudio de pronóstico en base a la expresión de *MDGAI*.

Valor relativo de expresión de <i>MDGAI</i>	Casos	Recidiva	Datos censurados	Estimación de meses libres de enfermedad (media $\pm$ error típico)
RQ <i>MDGAI</i> < 0.13	19	3	16	53.50 $\pm$ 3.58
RQ <i>MDGAI</i> > 0.13	30	12	18	43.53 $\pm$ 3.84

Los datos mostrados indicaban que cuando se consideraba únicamente los pacientes de CNMP de estadio I era posible identificar un subgrupo con una expresión de *MDGAI* inferior a 0.13 que presentaban un mejor pronóstico clínico, con un tiempo medio libre de enfermedad que se incrementaba 9.97 meses, en relación al subgrupo de pacientes con expresión de *MDGAI* superior a 0.13. En este caso, los resultados obtenidos se encontraban más próximos a la significación estadística que cuando se consideró el conjunto global de pacientes ( $P=0.077$ ; Log Rank).

Así mismo, se realizó el estudio de pronóstico en relación a la expresión de *MDGA2* en los pacientes de CNMP. En este caso, el punto de corte óptimo que distingue entre dos subpoblaciones con un pronóstico clínico diferente fue de 3.16 ( $P=0.081$ ; Log-Rank) (Figura 4.18). Cincuenta y ocho pacientes (58/70; 82.9%) presentaron una expresión de *MDGA2* inferior a 3.16 y 12 pacientes (12/70; 17.1%) presentaron una expresión de *MDGA2* superior a 3.16.



**Figura 4.18.** Curvas de supervivencia obtenidas mediante el método de Kaplan-Meier en función de la expresión de *MDGA2* en CNMP.

En la tabla 4.28 se muestran los datos obtenidos de estos dos grupos de pacientes en relación al estudio pronóstico.

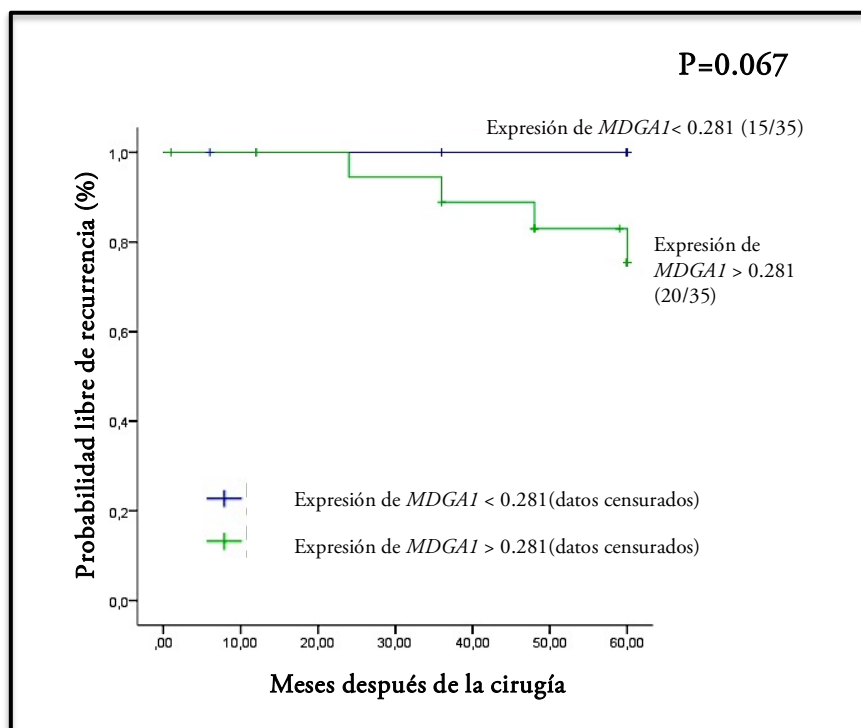
**Tabla 4.28.** Subgrupos de pacientes de CNMP establecidos en el estudio de pronóstico en base a la expresión de *MDGA2*.

Valor relativo de expresión de <i>MDGA2</i>	Casos	Recidiva	Datos censurados	Estimación de meses libres de enfermedad (media $\pm$ error típico)
RQ <i>MDGA2</i> < 3.16	58	24	34	42.70 $\pm$ 2.85
RQ <i>MDGA2</i> > 3.16	12	1	10	55.00 $\pm$ 4.71

Los resultados obtenidos indicaban que la expresión de *MDGA2* en los tumores de pacientes afectados de CNMP parecía influir en el pronóstico de los mismos, de manera que los pacientes con una expresión de *MDGA2* superior a 3.16 presentaban un tiempo medio libre de enfermedad de 12.3 meses mayor, en relación con el subgrupo de pacientes que presentaban una expresión de *MDGA2* inferior a 3.16. Además las diferencias obtenidas entre los dos grupos de pacientes se encontraban próximas a la significación estadística (P=0.081; Log-Rank).

Al igual que con *MDGAI*, se realizaron los análisis de pronóstico para *MDGA2* teniendo en cuenta únicamente el grupo de 49 pacientes pertenecientes al estadio I de CNMP. En este caso el punto óptimo que discrimina entre dos subpoblaciones fue 0.74. Sin embargo, no se encontraron diferencias de pronóstico significativas entre las dos subpoblaciones (P=0.461; Log Rank).

El estudio de pronóstico en los **tumores de CCR** se realizó en 35 pacientes de los que se disponía del seguimiento clínico. En relación a la expresión de *MDGAI*, el punto de corte óptimo que distingue entre dos subpoblaciones con un pronóstico clínico diferente en función de la expresión de este gen fue 0.281 (P=0.067; Log-Rank) (Figura 4.19). Quince pacientes (15/35; 42.9%) presentaron una expresión de *MDGAI* inferior a 0.281 y veinte pacientes (20/35; 57.1%) presentaron niveles de expresión de *MDGAI* superiores a 0.281.



**Figura 4.19.** Curvas de supervivencia obtenidas mediante el método de Kaplan-Meier en relación a la expresión de *MDGAI* en los pacientes de CCR.

En la tabla 4.29 se muestran los datos obtenidos de estos dos grupos de pacientes en relación al estudio pronóstico.

**Tabla 4.29.** Subgrupos de pacientes de CCR establecidos en el estudio de pronóstico en base a la expresión de *MDGAI*.

Valor relativo de expresión de <i>MDGAI</i>	Casos	Recidiva	Datos censurados
RQ <i>MDGAI</i> < 0.281	15	0	15
RQ <i>MDGAI</i> > 0.281	20	4	16

Los resultados obtenidos mostraban que dentro del grupo de 15 pacientes con una expresión de *MDGAI* inferior a 0.281 ninguno de ellos recurrió en el proceso tumoral, por lo tanto, este grupo de pacientes presentaba un pronóstico clínico mucho mejor que los 20 pacientes que presentaban una expresión de *MDGAI* superior a 0.281. Estos resultados se encontraban muy próximos a la significación estadística (P=0.067; Log-Rank).

Así mismo, se realizó el estudio de pronóstico en relación a la expresión de *MDGA2* en los pacientes de CCR. En este caso, el punto de corte óptimo para diferenciar dos subpoblaciones se sitúa en 0.1066. Sin embargo, el análisis estadístico Log-Rank no encontró diferencias significativas en el pronóstico clínico entre estas dos subpoblaciones ( $P=0.549$ ; Log Rank).

El estudio de pronóstico en los **tumores de CG** se realizó en 38 pacientes, de los que se disponía del seguimiento clínico. En relación a la expresión de *MDGAI*, el punto de corte óptimo que distingue entre dos subpoblaciones con un pronóstico clínico significativamente diferente fue 0.4363 ( $P=0.015$ ; Log-Rank) (Figura 4.20). Quince pacientes (15/38; 39.5%) presentaron una expresión de *MDGAI* inferior a 0.4363 y 23 pacientes (23/38; 60.5%) presentaron una expresión de *MDGAI* superior a 0.4363.

En la tabla 4.30 se muestran los datos obtenidos de estos dos grupos de pacientes en relación al estudio pronóstico.

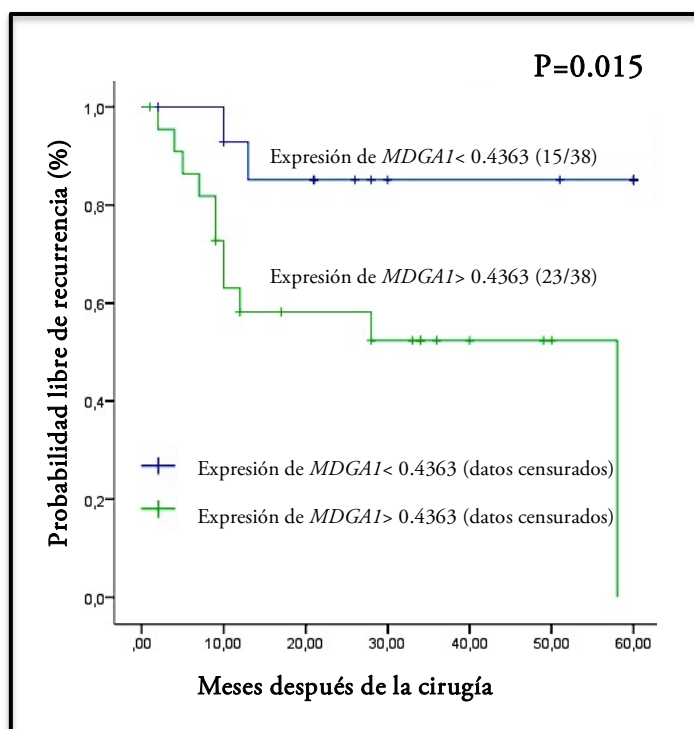


Figura 4.20. Curvas de supervivencia obtenidas mediante el método de Kaplan-Meier en relación a la expresión de *MDGAI* en los pacientes de CG.

**Tabla 4.30.** Subgrupos de pacientes de CG establecidos en el estudio de pronóstico en base a la expresión de *MDGAI*.

Valor relativo de expresión de <i>MDGAI</i>	Casos	Recidiva	Datos censurados	Estimación de meses libres de enfermedad (media ± error típico)
RQ <i>MDGAI</i> < 0.4363	15	2	13	52.79 ± 4.71
RQ <i>MDGAI</i> > 0.4363	23	11	12	35.19 ± 5.59

Los resultados obtenidos mostraban que la expresión de *MDGAI* en los tumores de los pacientes afectados de CG parecía influir de manera significativa (P= 0.015; Log-Rank) en el pronóstico de estos pacientes, de manera que los pacientes con una expresión de *MDGAI* inferior a 0.4363 presentaban un tiempo medio libre de enfermedad de 17.6 meses mayor que el subgrupo de pacientes con una expresión de *MDGAI* superior a 0.4363.

Dado que la comparación entre las curvas de supervivencia determinadas mediante el método de Kaplan-Meier mostraron diferencias significativas (P=0.015; Log-Rank), se realizó un análisis multivariante con el fin de determinar si la expresión de *MDGAI* podría ser considerada como un biomarcador de pronóstico. Para el análisis multivariante de Cox únicamente se consideró el estadio tumoral (tabla 4.31).

**Tabla 4.31.** Análisis multivariante de Cox considerando la expresión relativa de *MDGAI* y el estadio en los tumores de CG.

VARIABLE	RIESGO RELATIVO	P
Expresión de <i>MDGAI</i> < 0.4363	0.165	<b>0.021</b>
Estadio I vs II o III	0.260	<b>0.031</b>

Este análisis confirmó que una expresión de *MDGAI* inferior a 0.4363 constituye un factor pronóstico favorable, independiente del estadio tumoral.

Así mismo, se realizó el estudio de pronóstico en relación a la expresión de *MDGA2* en los pacientes de CG. En este caso, el punto de corte óptimo que define dos subpoblaciones diferentes fue 0.1848 (P=0.176; Log-Rank) (Figura 4.21). Veintiocho pacientes (28/38; 73.7%) presentaron una expresión de *MDGA2* inferior a 0.1848 y diez pacientes (10/38; 26.3%) presentaron una expresión de *MDGA2* superior a 0.1848.

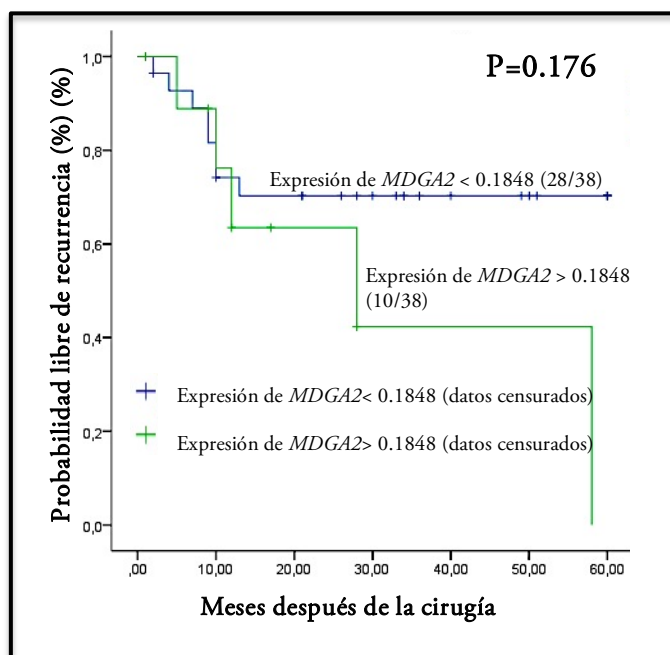


Figura 4.21. Curvas de supervivencia obtenidas mediante el método de Kaplan-Meier en relación a la expresión de *MDGA2* en CG.

En la tabla 4.32 se muestran los datos obtenidos de estos dos grupos de pacientes en relación al estudio pronóstico.

Tabla 4.32. Subgrupos de pacientes de CG establecidos en el estudio de pronóstico en base a la expresión de *MDGA2*.

Valor relativo de expresión de <i>MDGA2</i>	Casos	Recidiva	Datos censurados	Estimación de meses libres de enfermedad (media $\pm$ error típico)
RQ <i>MDGA2</i> < 0.1848	28	8	20	44.56 $\pm$ 4.59
RQ <i>MDGA2</i> > 0.1848	10	5	5	33.82 $\pm$ 9.35

Estos resultados indicaban que era posible identificar un subgrupo de pacientes con una expresión de *MDGA2* inferior a 0.1848 que presentaban un mejor pronóstico clínico, con un tiempo medio libre de enfermedad 10.74 meses mayor que el subgrupo de pacientes con una expresión de *MDGA2* superior a 0.1848. Además, estas diferencias entre los dos subgrupos de pacientes se encontraban próximas a la significación estadística (P=0.176; Log-Rank).

Por último, el estudio de pronóstico en los **tumores de CE** se realizó en veinte pacientes de los que se disponía del seguimiento clínico. En relación a la expresión de *MDGA1*, el punto de corte óptimo que distingue entre dos subpoblaciones en función de la expresión de este gen fue 0.714. Diez pacientes (10/20; 50%) presentaron una expresión de *MDGA1* inferior a 0.714 y diez pacientes (10/20; 50%) presentaron una expresión de *MDGA1* superior a 0.714. En relación a la expresión de *MDGA2*, el punto óptimo de corte que diferencia entre dos subpoblaciones fue 0.3545. Diez pacientes (10/20; 50%) presentaron una expresión de *MDGA2* inferior a 0.3545 y diez pacientes presentaron una expresión de *MDGA2* superior a 0.3545.

Sin embargo, en ambos casos, el análisis comparativo de las curvas de supervivencia determinó que no existían diferencias significativas en la supervivencia en función de la expresión de *MDGA1* (P=0.529; Log-Rank) o de la expresión de *MDGA2* (P=0.955; Log-Rank).

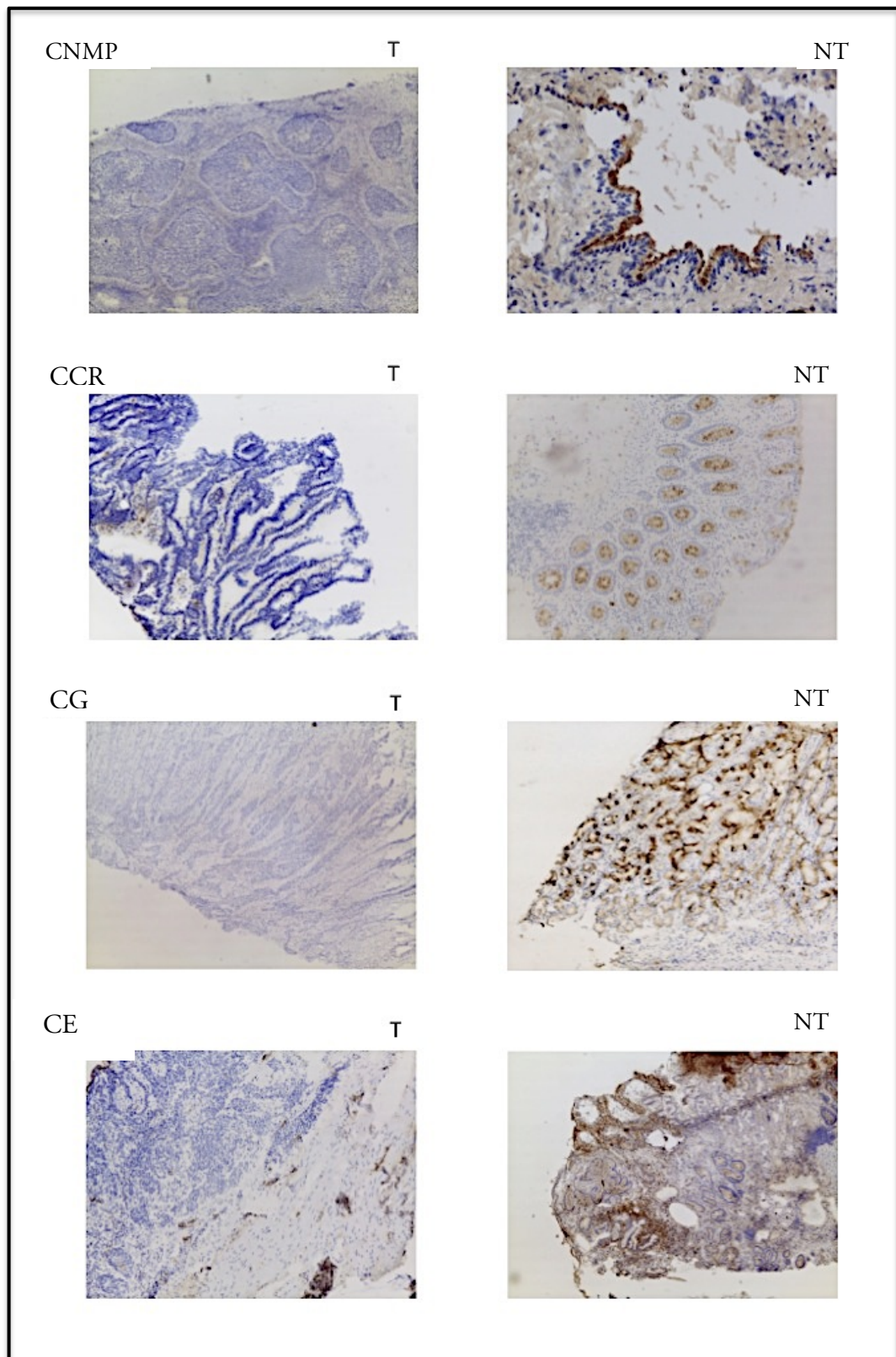
#### **4.4.2 Estudio de la expresión de MDGA1 y MDGA2 mediante inmunohistoquímica**

Con objeto de comprobar si la disminución en la expresión de los genes *MDGA1* y *MDGA2* analizada mediante qRT-PCR, se correspondía con una disminución en la expresión de las correspondientes proteínas, se llevó a cabo un análisis de la expresión de ambas proteínas mediante inmunohistoquímica. Para ello se realizaron cortes de tejido de 5 micras de grosor procedentes de muestras de tejido tumoral y no tumoral de los pacientes del estudio. La tinción de los tejidos se llevó a cabo utilizando el anticuerpo GP854 (específico para MDGA1) y un anticuerpo comercial anti-MDGA2 (R&D). En este ensayo se compararon las tinciones de cada una de las proteínas objeto de estudio en tejido tumoral con respecto al tejido no tumoral del mismo paciente.

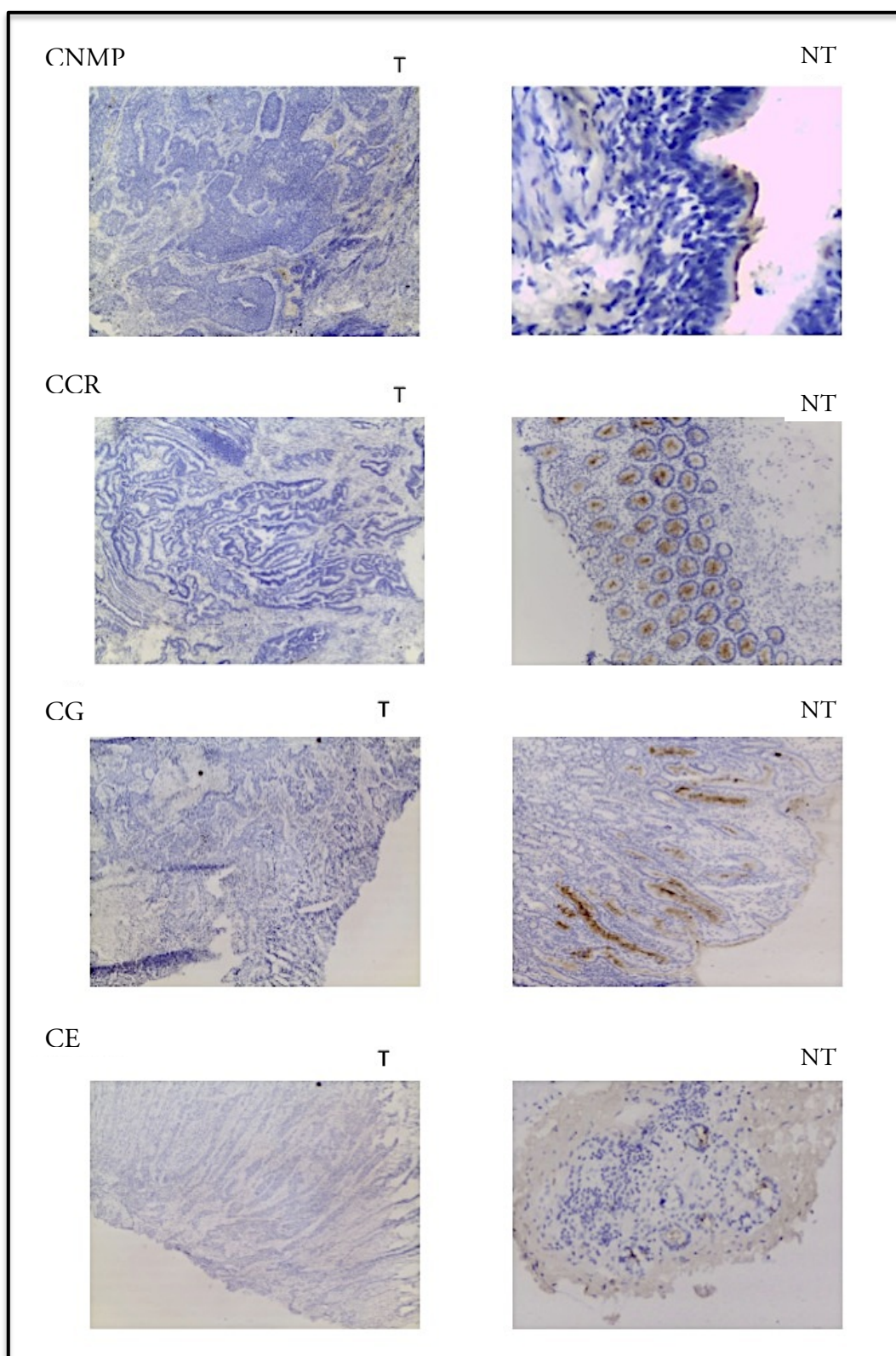
Este análisis se llevó a cabo en colaboración con el Dr. José Antonio López-Asenjo (Servicio de Anatomía Patológica de la clínica Citopath). Únicamente se incluyeron en este estudio aquellos pacientes de los que se disponía de muestra de tejido tumoral y no tumoral. El número total de pacientes analizados fue: 10 con CNMP, 10 con CCR, 10 con CG y 5 con CE. Para cada paciente se realizó una tinción de cada una de las proteínas MDGA1 o MDGA2 tanto en tejido tumoral como no tumoral. Del total de las tinciones realizadas (40 inmunohistoquímicas de pacientes con CNMP, 40 de pacientes con CCR, 40 de pacientes con CG y 20 inmunohistoquímicas de pacientes con CE) se muestra la tinción de un paciente seleccionado de cada patología (Figuras 4.22 y 4.23).

Los resultados obtenidos mostraron una intensa tinción de MDGA1 y MDGA2 en el polo luminal de las células. La expresión de estas proteínas en tejido no tumoral se localizaba en el epitelio respiratorio (CNMP), en glándulas y criptas del colon (CCR), en faveolas y criptas de estómago (CG) y en las glándulas en esófago (CE). Por otra parte, se apreciaba una ausencia de tinción o unos niveles de tinción muy bajos en los tejidos tumorales de CNMP, CCR, CG y CE (Figuras 4.22 y 4.23).

Estos resultados demuestran que se producía una clara disminución de la expresión de ambas proteínas en tejido tumoral respecto a tejido no tumoral, confirmando que existe una correspondencia entre la disminución de la expresión de los genes *MDGA1* y *MDGA2*, obtenida mediante qRT-PCR (apartado 4.1 de Resultados), y la disminución de la expresión de las correspondientes proteínas en tejido tumoral.



**Figura 4.22.** Inmunohistoquímicas de MDGA1 en tejido tumoral (T) y no tumoral (NT) de CNMP, CCR, CG y CE. La tinción de MDGA1 realizada con el anticuerpo GP854 producía una coloración parda que fue más intensa en las muestras no tumorales de cada una de las patologías analizadas.



**Figura 4.23.** Inmunohistoquímica de MDGA2 en tejidos tumorales (T) y no tumorales (NT) de CNMP, CCR, CG y CE. La tinción de MDGA2 realizada con el anticuerpo anti-MDGA2 (R&D), producía una coloración parda que fue más intensa en las muestras no tumorales de cada una de las patologías analizadas.

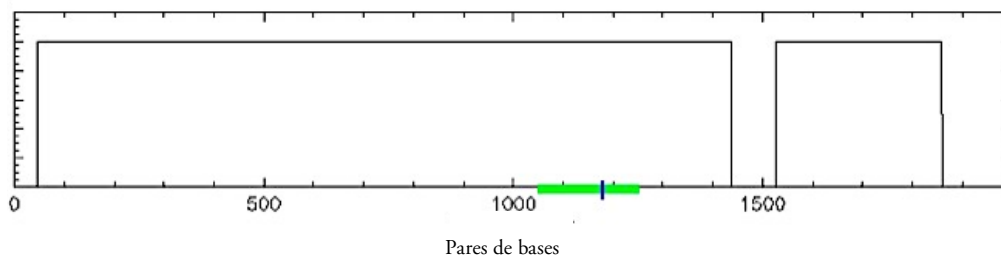
## 4.5 Estudio de hipermetilación del promotor de MDGA1 y MDGA2

A la vista de los resultados obtenidos en los que se muestra una importante disminución de la expresión de los genes *MDGA1* y *MDGA2* en todas las patologías analizadas, que además se correlaciona con una disminución de la expresión de las proteínas correspondientes, nuestro siguiente objetivo fue investigar si existía una correlación entre la expresión génica disminuida de *MDGA1* y *MDGA2* y una posible hipermetilación de las secuencias promotoras de ambos genes. Por este motivo, en primer lugar se realizó un análisis de los promotores de los genes con objeto de investigar la presencia de islas CpG.

La región promotora del gen *MDGA1* humano comprende 2000 pares de bases (pb) y posee dos regiones ricas en CGs de 1390 pb (nucleótidos 48 a 1437), que contiene el primer exón de *MDGA1*, y de 333 pb (nucleótidos 1527 a 1859). Ambas islas CpG contienen un porcentaje de CGs superior al 50% (Figura 4.24 A).

La región promotora del gen *MDGA2* humano comprende 2650 pb y contiene cuatro regiones ricas en CGs de 866 pb (nucleótidos 48 a 913), 266 pb (nucleótidos 984 a 1249), 498 pb (nucleótidos 1282 a 1779) y 379 pb (nucleótidos 1794 a 2172). La tercera y cuarta isla CpG incluyen el primer exón de *MDGA2*. La proporción de CGs de estas regiones en todos los casos supera el 50% (Figura 4.24 B).

A)



Longitud de la región del promotor: 2000pb

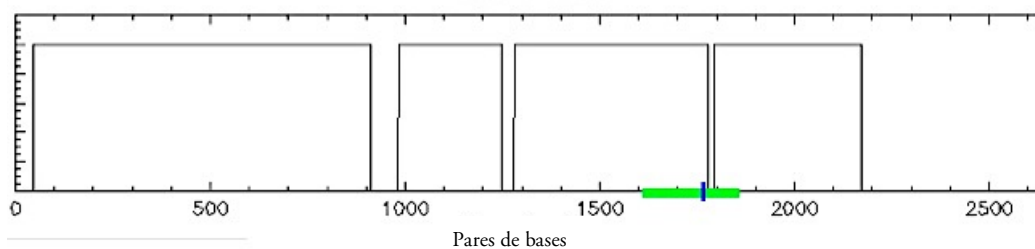
Porcentaje C + Porcentaje G > 50.00

2 regiones ricas en CGs:

Longitud 1390 pb (nt 48..1437)

Longitud 333 pb (nt 1527..1859)

B)



Longitud de la región del promotor: 2650 pb

Porcentaje C + Percentage G > 50.00

4 regiones ricas en CGs:

Longitud 866 pb (nt 48..913)

Longitud 266 pb (nt 984..1249)

Longitud 498 pb (nt 1282..1779)

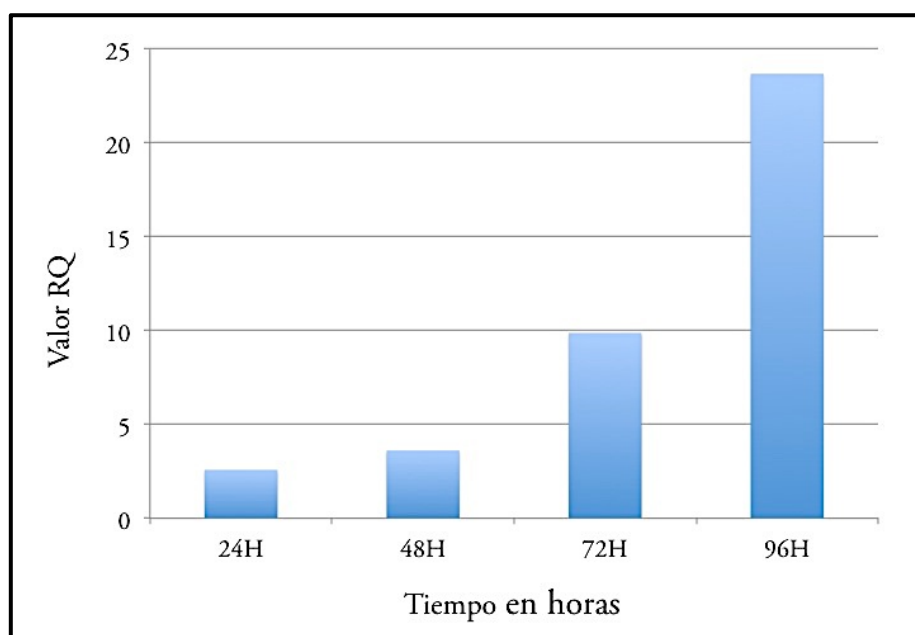
Longitud 379 pb (nt 1794..2172)

**Figura 4.24.** Esquema del promotor de *MDGA1* (A) y de *MDGA2* (B). Los números indican los pares de bases del promotor. Las cajas en blanco representan las islas CpG susceptibles de metilación. La línea verde representa el primer exón y la línea azul la posición del codón de iniciación ATG. Análisis de resultados realizado con el programa <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/index.html>

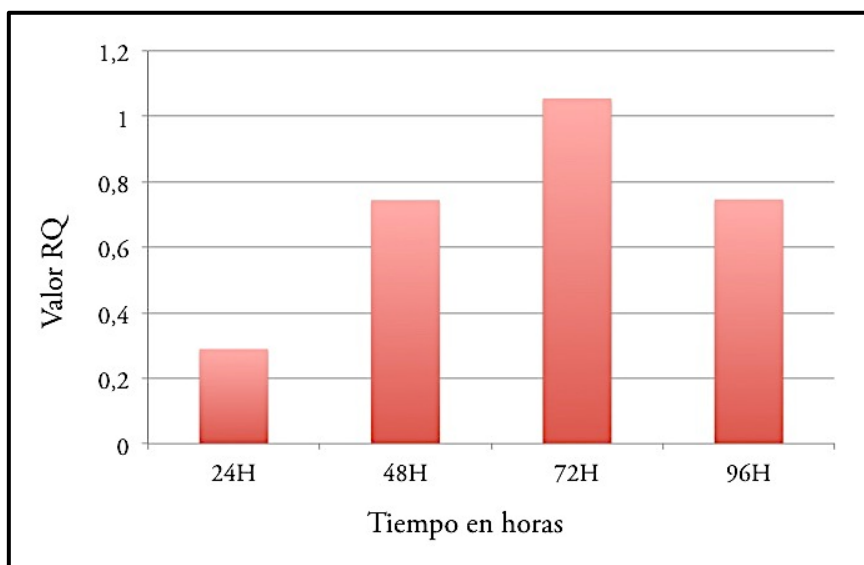
#### 4.5.1 Ensayo de desmetilación con 5-aza-2' Deoxicitidina

En un primer abordaje para el estudio de hipermetilación de los promotores, se investigó si la desmetilación del ADN se correlacionaba con un aumento en la expresión de los genes *MDGA1* y *MDGA2*. Para ello se utilizó el agente desmetilante 5-aza-2' deoxicitidina (5-aza). Las células HeLa, que presentaban un nivel de expresión muy bajo de *MDGA1* y *MDGA2*, fueron tratadas con 5-aza durante cinco días consecutivos, renovando cada 24 horas el medio de cultivo, al que se le adicionaba 5-aza 10  $\mu$ M. Las células se recogían a las 24, 48, 72 y 96 horas tras el tratamiento con 5-aza y se analizaba la expresión de los genes *MDGA1* y *MDGA2* mediante qRT-PCR.

Los resultados mostraron que a medida que se prolongaba el tiempo de tratamiento con el agente desmetilante, se producía un incremento en la expresión del gen. Esto ocurría tanto para *MDGA1* como para *MDGA2* (Figuras 4.25 y 4.26). Sin embargo, en el caso de *MDGA2* se observaba una disminución de su expresión a las 96 horas respecto a la obtenida a las 72 horas. Esto podría ser debido al efecto tóxico producido por la 5-aza en las células, de modo que una exposición prolongada a este agente desmetilante parecía afectar a la viabilidad celular.



**Figura 4.25.** Análisis de la expresión de *MDGA1* mediante qRT-PCR en las células HeLa a las 24, 48, 72 y 96 horas tras el tratamiento con 5-aza.



**Figura 4.26.** Análisis de la expresión de *MDGA2* mediante qRT-PCR en las células HeLa a las 24, 48, 72 y 96 horas tras el tratamiento con 5-aza.

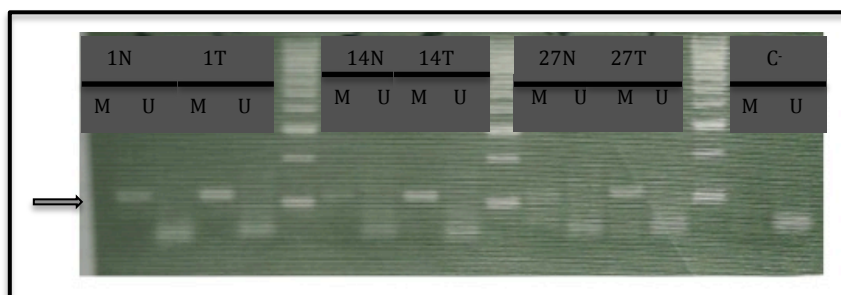
#### 4.5.2 Análisis del estado de metilación de los promotores de *MDGA1* y *MDGA2*

El estado de metilación de las regiones promotoras de *MDGA1* y *MDGA2* fue analizado mediante PCR específica de metilación (MSP). Este estudio se realizó en ADN genómico extraído de muestras tumorales y no tumorales de pacientes con CCR. Se seleccionaron aquellos pacientes que presentaban una expresión disminuida de los genes *MDGA1* y/o *MDGA2* en tejido tumoral, previamente analizada mediante qRT-PCR.

El ADN genómico fue tratado con bisulfito sódico. Este tratamiento convierte las citosinas no metiladas en uracilos, que serán convertidos en timinas durante la reacción de PCR posterior, mientras que las citosinas metiladas permanecen intactas. De esta manera, se establecen diferencias entre las secuencias de ADN metilado (M) y no metilado (U).

A continuación, el ADN modificado por bisulfito fue amplificado mediante PCR específica de metilación (MSP). Para ello se diseñaron parejas de cebadores que reconocían las secuencias metiladas (cebadores M) y no metiladas (cebadores U) de los promotores de *MDGA1* y *MDGA2*. El diseño de los cebadores se realizó utilizando el programa informático *Methyl Primer Express Software* (Applied biosystems)(ver tablas 4.10 y 4.11 del apartado 7.2.3 de Materiales y Métodos).

Los productos de PCR amplificados por MSP fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa para visualizar las secuencias de ADN metiladas (M) y no metiladas (U). La figura 4.27 muestra los resultados obtenidos en tres pacientes analizados (1, 14 y 27) en los que se detectó un incremento del estado de metilación de *MDGA2* en las muestras tumorales respecto a las correspondientes muestras no tumorales.



**Figura 4.27.** Análisis del estado de metilación mediante MSP para *MDGA2* con los cebadores MDGA2-MSP2 pareja 2 en tejido tumoral (T) y no tumoral (N) de tres pacientes (1,14 y 27) con CCR. Las secuencias de ADN específicas para *MDGA2* (111 pb) se encuentran indicadas con una flecha. M=metilado; U= no metilado; C= control negativo.

Para confirmar que las secuencias de ADN metiladas y no metiladas detectadas mediante electroforesis en geles de agarosa eran específicas para *MDGA1* y *MDGA2*, los productos amplificados fueron clonados en el vector pGEM-T y posteriormente secuenciados.

De todas las parejas de cebadores utilizados (tablas 4.10 y 4.11, apartado 7.2.3 de Materiales y Métodos), en el caso de *MDGA1* únicamente los cebadores (U) MDGA1-MSP2 pareja 1.2 amplificaron una secuencia de ADN específica para *MDGA1* de 102 pb que se correspondía con la secuencia no metilada del gen. Sin

embargo, los cebadores (M) MDGA1-MSP2 pareja 1.2 amplificaron una secuencia de ADN metilado del mismo tamaño (102 pb) que resultó ser inespecífica para *MDGA1*. Del mismo modo, para *MDGA2* únicamente los cebadores (M) MDGA2-MSP2 pareja 2 amplificaron una secuencia de ADN específica para *MDGA2* de 111 pb que se correspondía con la secuencia metilada de dicho gen. Sin embargo, los cebadores (U) MDGA2-MSP2 pareja 2 amplificaron una secuencia de ADN no metilado del mismo tamaño (111 pb) que resultó ser inespecífica para *MDGA2*.

Dado que el diseño de cebadores para el análisis del estado de metilación de los promotores constituye un punto crítico en estos estudios, y a la vista de los resultados obtenidos, en el momento actual se está llevando a cabo un análisis exhaustivo de las regiones promotoras de estos genes con el objetivo de diseñar nuevos cebadores que hagan posible este análisis de metilación.



## 5. DISCUSIÓN

---



Las proteínas MDGAs han sido propuestas como un subgrupo de moléculas de adhesión celular incluido en la superfamilia de las inmunoglobulinas. Se trata de un grupo importante de proteínas de membrana implicadas en procesos de adhesión celular, migración y desarrollo de conexiones neuronales (Walsh and Doherty, 1997).

Entre las proteínas de la superfamilia de las inmunoglobulinas que muestran una mayor homología estructural con MDGA1 y MDGA2 se distinguen tres grupos (Hellquist et al., 2009):

- Proteínas que presentan en su estructura únicamente dominios Ig: como las proteínas de la familia ICAM (*Intracellular adhesion molecule*) y VCAM (*Vascular cell adhesion molecule*).
- Proteínas que presentan en su estructura dominios Ig y dominios FNIII: como las proteínas de la familia CNTN (*Contactin cell adhesion molecule*) y NCAM (*Neural cell adhesion molecule*).
- Proteínas que contienen en su estructura un dominio MAM: como las proteínas de la familia de las MEP (Meprinas) y NRP (Neuropilinas). En este grupo se incluyen las proteínas MDGA1 y MDGA2.

Las proteínas de la familia NCAM presentan una elevada homología estructural con las proteínas MDGAs ya que, al igual que estas últimas, presentan en su estructura proteica dominios Ig y FNIII, aunque carecen de dominio MAM. Además, al igual que las MDGAs, NCAM se encuentra ampliamente expresado en el sistema nervioso. Existen distintas isoformas de NCAM que se generan por *splicing* alternativo, entre las que se encuentran NCAM-180, NCAM-140 y NCAM-120 (Shin et al., 2002). NCAM-140 y NCAM-180 son proteínas transmembrana que difieren entre sí en la longitud del dominio citosólico, mientras que, NCAM-120 se encuentra unida a la membrana plasmática mediante un grupo GPI (Thompson et al., 2013), al igual que ocurre con MDGA1 y MDGA2. Las moléculas NCAM median adhesión celular mediante interacciones homo y heterofílicas y participan en

los procesos de migración neuronal (Shin et al., 2002). Durante el desarrollo embrionario NCAM sufre un proceso de modificación post-traducciona que consiste en la adición de ácido polisialílico (Finne, 1982). En tejidos adultos esta modificación desaparece, aunque NCAM se encuentra polisialilada en determinadas regiones cerebrales como el bulbo olfatorio y el hipocampo, donde participa en la plasticidad sináptica y la migración celular general (Rutishauser, 2008). La expresión de NCAM polisialilada se encuentra asociada con el crecimiento e invasividad de determinados tipos de cánceres como neuroblastoma y cáncer no microcítico de pulmón (Hildebrandt et al., 1998; Komminoth et al., 1991; Scheidegger et al., 1994; Thompson et al., 2013).

Otras moléculas relacionadas con las proteínas MDGAs son las neuropilinas (NRP1, NRP2). Estas proteínas, al igual que las MDGAs, presentan en su estructura proteica un dominio MAM. Este dominio está implicado en adhesión y se encuentra formando parte de la estructura de una gran variedad de proteínas implicadas en la adhesión célula a célula. El dominio MAM fue identificado por primera vez como una secuencia común en la región extracelular de la meprina, antígeno A5 y la proteína tirosin-fosfatasa  $\mu$ ,  $\kappa$  (Beckmann and Bork, 1993; Jiang et al., 1992; Takagi et al., 1991). Las neuropilinas son glicoproteínas transmembrana que median adhesión celular en el sistema nervioso (Takagi et al., 1995) y promueven el anclaje de las células endoteliales a la matriz extracelular (Mukoyama et al., 2005). Durante el desarrollo embrionario, las neuropilinas se encuentran altamente expresadas en las células endoteliales de los vasos sanguíneos (Fantin et al., 2011; Koch, 2012). Además, se ha comprobado que la neuropilina 1 se encuentra expresada en las células tumorales y vasculatura tumoral (Plein et al., 2014; Soker et al., 2002).

La presencia en su estructura proteica de dominios inmunoglobulina, un dominio fibronectina, un dominio MAM y un anclaje a la membrana mediante un grupo GPI, hace que las proteínas MDGAs sean las primeras proteínas humanas caracterizadas hasta el momento que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas e incluyen en su estructura todos estos dominios proteicos (De Juan et al., 2002). Dado que los dominios Ig y MAM están implicados en procesos de

adhesión y migración celular, el primer objetivo propuesto en este trabajo ha sido investigar el papel de MDGA1 y MDGA2 en migración, invasión y adhesión celular.

Para abordar dicho objetivo se utilizó la línea celular MDCK. Las células MDCK han sido ampliamente utilizadas en ensayos de adhesión y migración por diversos grupos de investigación (Beatriz Fernandez-Munoz et al., 2011; Moreno-Bueno et al., 2009; Peinado et al., 2003). Además, nuestro grupo comprobó mediante ensayos de Northern blot que estas células no expresaban de manera endógena MDGA1 ni MDGA2, por lo tanto, esta línea celular resultaba adecuada para realizar este estudio.

Las líneas celulares estables de MDCK que fueron generadas (pFLAG, pFLAG-MDGA1, pFLAG-MDGA2, pFLAG-MAMGPI y pFLAG-IgGPI), se analizaron mediante ensayos de Western blot, utilizando los anticuerpos GP854 y anti-FLAG, y mediante inmunofluorescencia por microscopía confocal, con objeto de comprobar la expresión de las proteínas MDGA1, MDGA2 y las proteínas truncadas de MDGA2: MAMGPI e IgGPI en dichas líneas celulares. En el caso de pFLAG-MDGA2 y pFLAG-IgGPI fue necesario realizar un enriquecimiento en células positivas para las proteínas MDGA2 e IgGPI (MDGA2) mediante FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*), ya que la baja expresión proteica detectada no hacía posible la realización de este estudio.

Además, comprobamos mediante microscopía confocal que la localización de las proteínas MDGA1, MDGA2 y las proteínas truncadas de MDGA2 (MAMGPI e IgGPI), tenía lugar en la membrana plasmática, como había sido descrito previamente en nuestro laboratorio (Díaz-López et al., 2005).

## 5.1 Papel de MDGA1 y MDGA2 en migración celular

La migración celular es un proceso fisiológico implicado en muchos fenómenos biológicos como el desarrollo embrionario, el cierre de heridas y la respuesta inmune (Allena, 2013). Este proceso está sujeto a una regulación llevada a cabo por diversas proteínas entre las que se encuentran las moléculas de adhesión (Ridley, 2011; Ridley et al., 2003).

La implicación de MDGA1 y MDGA2 en migración neuronal fue descrita por primera vez por Litwack (Litwack et al., 2004). En este trabajo se describen los perfiles de expresión de MDGA1 y MDGA2 en cerebro de rata, sugiriendo un papel de estas proteínas en el control de la adhesión neuronal, migración y crecimiento axonal en el desarrollo del cerebro murino (Litwack et al., 2004). MDGA1 se encuentra altamente expresado en distintas poblaciones neuronales migratorias, cada una de las cuales lleva a cabo una migración circunferencial no radial desde su zona germinal, lo que sugiere que MDGA1 controla aspectos de su migración (Litwack et al., 2004). Además, MDGA1 se expresa en las neuronas corticales que migran a la capa superficial en los embriones tardíos y en neonatos de ratón (Takeuchi, 2006; Takeuchi et al., 2007), por lo que se encuentra implicado en la corticogénesis de cerebro de ratón.

En un trabajo posterior se ha demostrado que durante la formación del córtex cerebral de ratón las neuronas con MDGA1 mutado presentan un retraso en su migración, y su posición en la capa superior del córtex se encuentra alterada. Esto sugiere que MDGA1 estaría implicada en la correcta migración y posicionamiento de un grupo de neuronas de proyección de la capa superior del córtex cerebral, lo que a su vez indica que la migración radial de las neuronas de la capa superficial podría estar regulada diferencialmente (Ishikawa et al., 2010). En este mismo trabajo se sugiere que debido a que MDGA1 parece estar expresado únicamente en un subtipo de neuronas de proyección del córtex de ratón, MDGA2 podría desempeñar un papel similar al de MDGA1 en otros subtipos de neuronas de proyección, ya que MDGA2 se encuentra ubicuamente expresado en el cerebro postnatal de rata (Litwack et al.,

2004), y en las neuronas de la placa cortical de ratón (Ishikawa et al., 2010). Estos hechos estarían en concordancia con estudios recientes que indican que las neuronas de proyección cortical son generadas por dos progenitores diferentes y los comportamientos migratorios de las neuronas provenientes de cada uno de estos progenitores son distintos (Ishikawa et al., 2010).

Por otro lado, se ha comprobado que la disminución de la expresión de MDGA1 mediante ARN de interferencia *in vivo* en neuronas corticales de ratón, produce una alteración en la migración radial de estas neuronas, lo que sugiere que MDGA1 desempeña un papel esencial para la migración neuronal (Takeuchi, 2006).

Así mismo, se ha propuesto un papel de MDGA1 y MDGA2 en la migración y diferenciación de neuronas de la periferia del cerebro y el tubo neural en embriones de *teleost fish*, lo que sugiere que las proteínas MDGAs también se encuentran implicadas en la migración neuronal de este organismo (Sano et al., 2009).

Además, resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que la expresión de MDGA1 incrementaba la migración de las células MDCK (Díaz-López et al., 2010). Este estudio se realizó mediante dos tipos de ensayos: ensayo de cierre de la herida y ensayo de cámaras *transwell*.

En el presente trabajo se han llevado a cabo estos mismos ensayos para analizar en paralelo el comportamiento migratorio de las células MDCK que expresan de manera estable MDGA1 o MDGA2. El ensayo de la herida ha revelado que la expresión de MDGA1 produce un incremento significativo en la capacidad migratoria de las células, que ya es visible a las 3 horas tras la realización de la herida. Además, estas células son capaces de cerrar por completo la herida tras 9 horas de ensayo. En el caso de MDGA2, la expresión de esta proteína también produce un incremento en la migración de las células MDCK, aunque éste es más tardío. El incremento en la capacidad migratoria de las células MDCK que expresan de manera estable la proteína MDGA2 comienza a ser visible a las 12 horas, aunque no llega a

ser significativo hasta las 15 horas tras la realización de la herida, momento en el que se produce el cierre de la misma.

El ensayo de las cámaras *transwell* confirmó los resultados anteriores y puso de manifiesto que, si bien las dos proteínas MDGAs conferían propiedades migratorias a las células MDCK, también en este caso la capacidad migratoria de MDGA1 superaba a la de MDGA2. En este ensayo el número de células que migraba desde el compartimento superior al inferior en las cámaras *transwell*, tras 24 horas de ensayo, era unas cinco veces superior en el caso de las células MDCK que expresaban MDGA1 que en las células que expresaban MDGA2. En ambos casos los resultados obtenidos fueron estadísticamente significativos.

### 5.2 Papel de MDGA1 y MDGA2 en invasión celular

El papel que desempeñan las proteínas MDGAs en invasión celular no ha sido descrito hasta el momento. Por este motivo el siguiente objetivo de nuestro estudio fue analizar la capacidad invasiva de ambas proteínas. Para ello se realizó un ensayo en el que se cuantificó el número de células capaces de atravesar una mezcla de proteínas de matriz extracelular (matrigel) en su tránsito desde el compartimento superior al inferior en las cámaras *transwell*.

Los resultados revelaron que tanto MDGA1 como MDGA2 conferían propiedades invasivas a las células MDCK. En este caso, también MDGA1 mostró un incremento mayor en la capacidad invasiva, de manera que las células MDCK que expresaban de manera estable esta proteína incrementaban su capacidad invasiva entre cinco y seis veces en relación a las células que expresaban MDGA2. En ambos casos los resultados obtenidos fueron estadísticamente significativos.

En cáncer la transición epitelio-mesénquima (EMT) ha sido ampliamente descrita como la responsable de la adquisición de capacidades migratorias e invasivas de las células tumorales (De Craene and Berx, 2013; Petersen et al., 2003; Thiery, 2002). Durante esta transición se produce una pérdida de las uniones intercelulares,

se pierde la polarización apical-basolateral, se induce la expresión de proteasas que destruyen la membrana basal y las células tumorales invaden el estroma (Defamie et al., 2014; Thompson, 2005).

Así mismo, se ha descrito que durante esta transición se producen cambios en la expresión de moléculas de adhesión. La E-cadherina (marcador epitelial) disminuye su expresión, mientras que la N-cadherina (marcador mesenquimal) aumenta su expresión a medida que progresa la EMT (“*cadherin switch*”) (Peinado et al., 2004). Estudios previos han demostrado que determinados factores de transcripción como Snail, Slug y E47 son represores de la expresión de E-cadherina y son inductores de la transición epitelio-mesenquima cuando se encuentran sobre-expresados en células MDCK (Bolós et al., 2003; Peinado et al., 2003; Pérez-Moreno et al., 2001). Además, la expresión de estos factores de transcripción incrementa la capacidad invasiva y metastásica de las células cancerígenas (Bolós et al., 2003; Peinado et al., 2003; Pérez-Moreno et al., 2001).

Dado que la expresión de las proteínas MDGA aumenta las capacidades migratorias e invasivas de las células MDCK, sería interesante analizar la expresión de ambas proteínas durante la EMT con objeto de comprobar si se produce un incremento de su expresión en las células con fenotipo mesenquimal, de manera que pudieran ser consideradas como marcadores mesenquimales. Además, sería interesante analizar factores de transcripción implicados en la EMT que podrían regular la expresión de MDGA1 y MDGA2.

### 5.3 Papel de MDGA1, MDGA2 en adhesión celular

Algunas proteínas de la superfamilia de las inmunoglobulinas están implicadas en la adhesión célula-célula y la adhesión célula-matriz extracelular. Un ejemplo es la proteína NCAM, una proteína de adhesión que se encuentra expresada en la superficie de casi todas las células neuronales del sistema nervioso central y periférico (Niethammer, 2002). Se ha descrito que NCAM juega un importante papel en el desarrollo temprano del cerebro, la plasticidad sináptica y la consolidación de la

memoria (Rønn et al., 1998; Schachner, 1997) y además promueve el crecimiento neuronal mediante interacciones homofílicas o heterofílicas con otras moléculas de la superficie de células adyacentes o con proteínas de la matriz extracelular (Crossin and Krushel, 2000; Niethammer, 2002; Wędzony et al., 2013). Además, NCAM interviene en la regulación de la adhesión célula-matriz extracelular, aunque lo hace de un modo indirecto a través de la subunidad  $\beta 1$  de algunas integrinas. Se ha comprobado que ratones deficientes en NCAM mantienen la adhesión célula-célula pero disminuyen la adhesión célula-matriz extracelular mediada por su interacción con esta integrina (Cavallaro et al., 2001; Perl et al., 1999).

En relación a la adhesión célula-matriz extracelular, estudios previos de nuestro laboratorio revelaron que las células MDCK que expresaban la proteína MDGA1 o sus proteínas truncadas (IgGPI, MAMGPI), disminuían su adhesión a las cinco proteínas de matriz extracelular analizadas (colágeno I, colágeno IV, fibronectina, vitronectina y laminina) (Díaz-López et al., 2010). Sin embargo, la implicación de MDGA2 en adhesión célula-matriz extracelular, no había sido estudiada hasta el momento. Por ello, se investigó la capacidad de adhesión de las células que expresaban MDGA2 o sus proteínas truncadas (MAMGPI e IgGPI) a diferentes proteínas de matriz extracelular (colágeno I, colágeno IV, laminina I, fibronectina y fibrinógeno). Nuestros resultados mostraron que la expresión de MDGA2 aumentaba la adhesión de las células MDCK a colágeno I, laminina I y fibronectina. Sin embargo, los mayores incrementos de adhesión a todas las proteínas de matriz extracelular analizadas se obtuvieron en el caso de las células que expresaban la proteína truncada MAMGPI, lo que parecía indicar que la presencia del dominio MAM, además de estar implicado en la adhesión célula-célula como se ha descrito en la literatura, parecía estar también implicado en adhesión célula-matriz extracelular. Estos resultados indicaban que existen diferencias en relación a la adhesión célula-matriz extracelular según esté mediada por MDGA1 o por MDGA2.

Estudios previos han demostrado que la delección de cuatro de los seis dominios inmunoglobulina de la proteína MDGA1, incrementa la capacidad de unión mediada por el dominio MAM hasta 30 veces, sugiriendo que la interacción

con otras proteínas a través del dominio MAM podría estar obstaculizada por los dominios inmunoglobulina (Ishikawa et al., 2010).

En relación a la adhesión célula-célula, los ensayos de adhesión realizados con las líneas celulares estables mostraron que tanto MDGA1 como MDGA2 producían un incremento en la capacidad de adhesión intercelular de las células MDCK, aunque también en este caso el efecto observado fue mayor en las células que expresaban MDGA1, llegando a incrementar casi dos veces la capacidad de adhesión célula-célula con respecto a las células que expresaban MDGA2. Así mismo, se observó que las dos proteínas truncadas de MDGA2 (MAMGPI, IgGPI) incrementaban la adhesión célula-célula, pero en ambos casos este incremento fue algo inferior al obtenido con la proteína MDGA2. Esto parecía indicar que la presencia simultánea de los dominios Ig y MAM podría favorecer la adhesión célula-célula mediada por MDGA2.

Por otro lado, con objeto de determinar si la adhesión mediada por las proteínas MDGA1, MDGA2 o las proteínas truncadas de MDGA2 (MAMGPI e IgGPI) era de tipo homofílico o heterofílico, realizamos dos tipos de experimentos variando la monocapa de células sobre la que sembrábamos las células marcadas con calceína. El análisis conjunto de los resultados indicaba que la expresión de las proteínas MDGA1 o MDGA2 producía un incremento similar en la capacidad de adhesión célula-célula independientemente de la monocapa de células que se utilizaba en el ensayo. Estos resultados revelaban que la unión célula-célula mediada por las proteínas MDGA1 o MDGA2 parecía presentar carácter heterofílico.

Estudios previos confirman el carácter heterofílico de las adhesiones mediadas por las proteínas MDGA. Fujimura *et al* indican que en el desarrollo del sistema nervioso de pollo, MDGA1 interacciona heterofílicamente con las regiones ricas en axones a través de su dominio MAM y con el músculo diferenciado a través de las regiones inmunoglobulina del extremo N-terminal (Fujimura et al., 2006). Estas observaciones sugieren que MDGA1 podría jugar un importante papel en la orientación de los nervios periféricos hacia los músculos (Fujimura et al., 2006).

## 5.4 Estudio de la expresión génica de *MDGA1* y *MDGA2* en patologías tumorales humanas

Una vez analizadas las capacidades de migración, invasión y adhesión que adquieren las células MDCK cuando expresan las proteínas MDGA1 o MDGA2, nuestro siguiente objetivo fue analizar la expresión de estas proteínas en patologías tumorales humanas. Con este propósito, en primer lugar se analizó la expresión de los genes *MDGA1* y *MDGA2* en tejidos no tumorales y tumorales humanos, y en segundo lugar se investigó la expresión de las correspondientes proteínas en los mismos tejidos.

En los últimos años en nuestro laboratorio se había llevado a cabo un análisis de la expresión de *MDGA1* y *MDGA2* mediante PCR cuantitativa a tiempo real, una técnica que permite analizar con una alta sensibilidad y especificidad la expresión génica mediante la detección de ARN mensajero maduro. Los resultados obtenidos mostraron que en un elevado porcentaje de las muestras analizadas se producía una disminución de la expresión de ambos genes (Díaz-López, 2007). Sin embargo, el número total de muestras disponibles para realizar este estudio no llegó a ser suficientemente amplio en ninguna de las patologías analizadas. Por este motivo, se decidió ampliar el estudio a un mayor número de muestras tumorales. En el presente trabajo se ha analizado la expresión de *MDGA1* y *MDGA2* mediante qRT-PCR en un total de 88 pacientes con cáncer no microcítico de pulmón (CNMP), 49 pacientes con cáncer colorectal (CCR), 56 pacientes con cáncer gástrico (CG) y 25 pacientes con cáncer de esófago (CE).

Los resultados obtenidos han confirmado los resultados previos de nuestro laboratorio, ya que han revelado que tanto *MDGA1* como *MDGA2* presentan disminuida su expresión en un alto porcentaje de las muestras analizadas en todas las patologías tumorales estudiadas.

En relación a *MDGAI*, su expresión disminuye de manera significativa en 62 de 88 (70.5%) muestras tumorales de los pacientes con CNMP; en 29 de 49 (59.2%) muestras tumorales de los pacientes con CCR; en 26 de 56 (46.4%) muestras tumorales de los pacientes con CG y en 10 de 25 (40%) muestras tumorales de los pacientes con CE. Sin embargo, el número de muestras tumorales que mostraron un incremento en la expresión de *MDGAI* fue mucho menor en todas las patologías analizadas (3.4% en CNMP, 2% en CCR, 10.7% en CG y 16% en CE).

En cuanto a *MDGA2*, su expresión disminuye de manera significativa en 64 de 88 (72.7%) muestras de CNMP; en 42 de 49 (85.7%) muestras de CCR; en 48 de 56 (85.7%) muestras de CG y en 16 de 25 (64%) muestras de CE. En este caso, los incrementos en la expresión del gen fueron detectados en un número muy inferior de muestras tumorales en todas las patologías analizadas.

Así mismo, se cuantificó el número de muestras tumorales que presentaba una disminución simultánea de los dos genes. Los resultados revelaron que este hecho ocurría en el 57.5% de las muestras de CNMP, en el 69% de las muestras de CCR, en el 54.2% de las muestras de CG y el 44.4% de las muestras de CE. Estos datos mostraban que en todas las patologías analizadas un grupo de pacientes bastante representativo presentaba una disminución en la expresión de los dos genes objeto de estudio.

Se ha descrito que muchas moléculas de adhesión experimentan una disminución de su expresión durante la iniciación y la progresión tumoral (Cavallaro and Christofori, 2004; Defamie et al., 2014; Panicker et al., 2003). Por lo tanto, la pérdida de expresión de *MDGAI* y *MDGA2*, obtenida en los ensayos de qRT-PCR, estaría en consonancia con la reducción en los niveles de expresión de otras moléculas de adhesión. La pérdida de determinadas moléculas de adhesión de la familia de las cadherinas y la superfamilia de las inmunoglobulinas se ha relacionado directamente con la progresión tumoral.

Entre las proteínas de adhesión, la E-cadherina es el miembro mejor estudiado de la familia de las cadherinas. Durante muchos años se ha considerado a la E-cadherina como un inhibidor de la invasión y metástasis del cáncer. De hecho, su expresión está inversamente relacionada con la capacidad invasiva en cáncer de colon y de mama (Frixen et al., 1991; Mbalaviele et al., 1996; Vleminckx et al., 1991). Generalmente los cánceres bien diferenciados muestran una elevada expresión de E-cadherina, predominantemente en las uniones intercelulares, mientras que, a medida que avanza la enfermedad, los carcinomas pobremente diferenciados e invasivos se caracterizan por presentar una baja expresión de E-cadherina (Cavallaro and Christofori, 2004; Wijnhoven et al., 2000). Así mismo, la expresión anormal de las cateninas se ha correlacionado con la progresión tumoral y un peor pronóstico (AJ et al., 2001; Nakopoulou et al., 2002).

Por otro lado CADM1 (también conocido como *TSLC1*, *IGSF4*, *Necl-2*, *RA175*, *SgIGSF*, *SymCAM1*), un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, presenta una pérdida de expresión en una amplia variedad de tumores (como cáncer colorectal, cáncer de esófago, cáncer de pulmón y cáncer de páncreas), y frecuentemente se correlaciona con un estado avanzado del tumor, mal pronóstico y metástasis (Liang et al., 2011; van der Weyden et al., 2012). Diversos estudios en ratones han demostrado que la re-expresión de CADM1 suprime *in vivo* la tumorigenicidad del cáncer no microcítico de pulmón y de algunas líneas celulares de carcinoma nasofaríngeo (Kuramochi et al., 2001; Lung et al., 2006; Mao et al., 2004).

Así mismo, la expresión de NCAM, otro miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, se encuentra marcadamente disminuida en adenocarcinoma colorrectar, cáncer pancreático y astrocitoma, confiriendo un mal pronóstico en los pacientes afectados de estas patologías (Cavallaro et al., 2001). Parece ser que esta disminución de la expresión se encuentra asociada con un cambio de la isoforma adulta de 120 KDa a las isoformas embrionarias de 140 y 180 KDa (Panicker et al., 2003).

#### **5.4.1 Análisis de los niveles de expresión de los genes MDGA1 y MDGA2 y su relación con las variables clínico-patológicas de las muestras tumorales**

El análisis estadístico de los resultados no ha mostrado una asociación significativa entre: la disminución de la expresión del gen *MDGA1*; la disminución de la expresión de *MDGA2*; la disminución conjunta de la expresión de ambos genes, y las variables clínico-patológicas analizadas en ninguna de las patologías tumorales estudiadas. Los datos obtenidos indican que únicamente en la patología de CNMP existe una asociación estadísticamente significativa ( $P=0.023$ ) entre la disminución de la expresión de *MDGA1* y el grado de diferenciación del tumor, de manera que más del 90% de las muestras tumorales de CNMP pobremente diferenciadas muestran una disminución en la expresión de *MDGA1*.

Por otro lado, tan sólo en la patología de CG existía una asociación estadísticamente significativa ( $P=0.020$ ) entre la disminución de la expresión de *MDGA2* y el tamaño del tumor. En este caso todos los tumores analizados pertenecientes a las categorías T1, T2 y T4 mostraron una expresión disminuida de *MDGA2*.

Es posible que la falta de asociación entre la expresión de los genes MDGA y las variables clínico-patológicas se deba a que la población muestral utilizada para realizar este estudio no ha sido muy heterogénea. Prácticamente la totalidad de los tumores estudiados pertenecían a estadios tempranos de la enfermedad (sin metástasis ni infiltración ganglionar), es decir, en todos los casos las biopsias tumorales de las que disponíamos correspondían a pacientes que habían sido sometidos a resección quirúrgica potencialmente curativa. Sería interesante en un futuro, ampliar el estudio a un número mayor de muestras que incluyera un mayor número de pacientes en los diferentes estadios de la enfermedad, de manera que pudiéramos analizar la expresión de los genes MDGA no sólo en los estadios tempranos de la enfermedad sino también en estadios más avanzados de la enfermedad. No obstante, dado que esto último no es factible puesto que los pacientes en estadios más avanzados de la enfermedad no se someten a resección quirúrgica, sería interesante disponer de muestras de metástasis

secundarias de los tumores primarios con objeto de analizar en estas muestras la expresión de *MDGA1* y *MDGA2*.

### **5.4.2 Estudios de pronóstico basados en la expresión de los genes *MDGA1* y *MDGA2* en las diferentes patologías tumorales analizadas**

Los biomarcadores son herramientas muy valiosas para la detección temprana, diagnóstico, pronóstico y selección del tratamiento (Ludwig and Weinstein, 2005). Éstos también pueden ser utilizados para determinar la localización del tumor y su estadio, subtipo y respuesta a la terapia (Bhatt et al., 2010).

Cuando muchos cambios se manifiestan en la mayoría de los pacientes con un tipo específico de tumor, esto puede ser utilizado como un biomarcador para la detección y desarrollo de dianas terapéuticas, además de la predicción de la respuesta a determinados tratamientos (Sidransky, 2002; Vogelstein and Kinzler, 2004; Weissleder and Ntziachristos, 2003).

En el presente trabajo se ha investigado por primera vez el valor pronóstico de la expresión de los genes *MDGA1* y *MDGA2* en patologías tumorales humanas. Estos estudios han permitido establecer, en todos los tipos de cáncer analizados, dos subpoblaciones de pacientes con distinto pronóstico clínico. En las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier el parámetro que se ha medido ha sido el tiempo medio libre de enfermedad (probabilidad libre de recurrencia) transcurrido después de la cirugía.

En relación a la expresión de *MDGA1*, en todas las patologías analizadas ha sido posible distinguir dos grupos de pacientes con diferente pronóstico clínico, de manera que el subgrupo de pacientes con menor expresión de *MDGA1* presentaba un tiempo medio libre de enfermedad (meses) que siempre era más prolongado que el obtenido en el subgrupo de pacientes con una mayor expresión del gen. En CNMP los pacientes con una menor expresión de *MDGA1* (RQ<0.13) presentaban mejor pronóstico clínico, con un incremento en el tiempo medio libre de enfermedad de

6.75 meses. Estos resultados se encontraban próximos a la significación estadística ( $P=0.122$ ). Cuando se realizó el mismo estudio considerando únicamente los pacientes de estadio I de la enfermedad, que representan el 70% de los pacientes con CNMP, el tiempo medio libre de enfermedad en los pacientes con menor expresión de *MDGA1* se incrementó hasta 9.97 meses en relación a los pacientes con una mayor expresión de este gen ( $P=0.077$ ). Es interesante destacar que ninguno de los 15 pacientes con CCR que presentaba una menor expresión de *MDGA1* ( $RQ<0.281$ ) cursó recidiva. También en este caso los resultados obtenidos se encontraban próximos a la significación estadística ( $P=0.067$ ). En el caso de los tumores de CG, las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier sí mostraron diferencias significativas entre los dos subgrupos de pacientes con menor y mayor expresión de *MDGA1*. Los pacientes con menor expresión de este gen ( $RQ<0.463$ ) incrementaban el tiempo medio libre de enfermedad hasta 17.6 meses en relación a los pacientes con mayor expresión de *MDGA1*. El análisis multivariante de Cox realizado para establecer si la expresión de *MDGA1* podía ser considerada como biomarcador de pronóstico, confirmó que la expresión disminuida de *MDGA1* constituye un factor pronóstico favorable, independiente del estadio tumoral.

En cuanto a *MDGA2*, también en este caso fue posible establecer dos subpoblaciones de pacientes con diferente pronóstico clínico en relación a la expresión de este gen. En CG el subgrupo de pacientes con menor expresión de *MDGA2* ( $RQ<0.1848$ ) presentaba mejor pronóstico, con un incremento del tiempo medio libre de enfermedad de 10.7 meses en relación a los pacientes con una mayor expresión de este gen. Los resultados obtenidos se encontraban próximos a la significación estadística ( $P=0.176$ ). Sin embargo, en el caso de CNMP el subgrupo de pacientes con menor expresión de *MDGA2* ( $RQ<3.16$ ) presentaba un peor pronóstico clínico. Estos resultados, contrarios a los obtenidos en el resto de las patologías tumorales analizadas, podría explicarse si se tiene en cuenta que en CNMP hay un subgrupo de 17 pacientes que presentan valores de expresión de *MDGA2* muy elevados (Tabla 4.11 y Figura 4.13), lo que podría explicar las diferencias encontradas en relación al pronóstico de los pacientes con CNMP con expresión disminuida de *MDGA2*.

La asociación observada entre la disminución de la expresión de *MDGA1* (en CNMP, CCR y CG) o de *MDGA2* (en CG) y un mejor pronóstico clínico de los pacientes, explicaría los resultados obtenidos en las líneas celulares MDCK que expresan de manera estable las proteínas MDGA1 o MDGA2. Los experimentos *in vitro* muestran que la expresión de *MDGA1* o de *MDGA2* confiere a las células una mayor capacidad migratoria e invasiva (lo que podría asociarse con una mayor malignidad del cáncer y por lo tanto a un peor pronóstico clínico). La disminución de la expresión de *MDGA1* o de *MDGA2* que presentan los subgrupos de pacientes en los estudios de pronóstico, podrían indicar una menor capacidad migratoria e invasiva de las células tumorales de estos pacientes, y por lo tanto esto explicaría el mejor pronóstico clínico obtenido reflejado en un incremento en el tiempo medio libre de enfermedad que presentan estos pacientes con una expresión disminuida de *MDGA1* o *MDGA2*.

### **5.5 Estudio de la expresión de las proteínas MDGA1 y MDGA2 en tejidos tumorales humanos**

Una vez analizada la expresión de los genes *MDGA1* y *MDGA2* mediante qRT-PCR, nuestro siguiente objetivo fue investigar la expresión de las correspondientes proteínas en las muestras de tejido tumoral y no tumoral de los pacientes de nuestro estudio.

Los resultados revelaron que en todas las muestras analizadas de CNMP, CCR, CG y CE, existía una correspondencia entre la disminución de la expresión de los genes *MDGA1* y *MDGA2* y la disminución de la expresión de las correspondientes proteínas, detectada mediante inmunohistoquímica utilizando anticuerpos específicos para las proteínas MDGA.

## 5.6 Estado de metilación del promotor de *MDGA1* y *MDGA2*

En las células cancerígenas la expresión génica es comúnmente alterada debido a la combinación de lesiones genéticas y epigenéticas. Los cambios epigenéticos incluyen la alteración de los perfiles de metilación del ADN genómico y la modificación de histonas (Clark, 2007). La iniciación y progresión del cáncer va acompañada de profundos cambios en la metilación del ADN, que fueron las primeras alteraciones epigenéticas identificadas en cáncer (Feinberg and Vogelstein, 1983; Riggs and Jones, 1983).

Los dos principales cambios que se producen en la metilación del ADN son una amplia hipometilación del ADN genómico y la hipermetilación de las islas CpG de los promotores (Gopalakrishnan et al., 2008; Jones and Baylin, 2002; Robertson, 2005; Sharma et al., 2010a; 2010b; TEODORIDIS et al., 2004). La hipometilación global del ADN juega un importante papel en la tumorigénesis y se produce en diversas secuencias genómicas como elementos repetitivos, retrotransposones, promotores pobres en islas CpG e intrones (Rodríguez et al., 2006). Esta hipometilación global produce un incremento de la inestabilidad genómica promoviendo la reorganización genómica (Eden et al., 2003; Jones and Baylin, 2002) y la traslocación y activación de otras regiones genómicas (Howard et al., 2008). Además, la hipometilación produce la activación aberrante de genes y de regiones no codificantes a través de diversos mecanismos que contribuyen al desarrollo y progresión del cáncer (Sharma et al., 2010b).

Por otro lado, la hipermetilación de las islas CpG de los promotores es muy frecuente en tumores y contribuye a la tumorigénesis mediante el silenciamiento de genes supresores de tumores (Gopalakrishnan et al., 2008; Sharma et al., 2010b). Desde el descubrimiento inicial de la hipermetilación de islas CpG del promotor de retinoblastoma (Greger et al., 1989), muchos otros genes supresores de tumores como *p16*, *MLH1* y *BRCA1* han sido identificados como silenciados por hipermetilación de sus promotores (Baylin, 2005; Jones and Baylin, 2002; 2007). Genes implicados en la regulación del ciclo celular, reparación del ADN, resistencia a antibióticos,

desintoxicación, diferenciación, adhesión celular, apoptosis, metástasis y angiogénesis, son susceptibles de ser hipermetilados en cáncer (Costello and Plass, 2001; Costello et al., 2000; Sharma et al., 2010b). Además de la inactivación directa de los genes supresores de tumores, la hipermetilación del ADN puede silenciar indirectamente otras clases de genes mediante el silenciamiento de factores de transcripción y genes de reparación del ADN (Sharma et al., 2010b).

En ciertos tejidos como páncreas y riñón la hipermetilación es un evento temprano y el número de eventos de hipermetilación aberrante aumenta progresivamente desde el estado precanceroso a canceroso (Arai et al., 2006; Peng et al., 2006). Además, la metilación no se produce de manera aleatoria ya que hay islas CpG que están metiladas en múltiples tipos tumorales, mientras otras islas CpG están metiladas sólo en ciertos tipos tumorales (Costello et al., 2000; Esteller and Herman, 2001). Esto concuerda con el modelo en el que la metilación de islas CpG de determinados genes podría conferir a las células cancerosas una ventaja en el crecimiento o supervivencia y por tanto los patrones de metilación surgirían dependiendo de la presión selectiva en el silenciamiento de genes del tipo tumoral examinado. Se ha sugerido que durante la carcinogénesis muchos cánceres necesitan desarrollar caracteres como evasión de la apoptosis, insensibilidad a señales para frenar el crecimiento, potencial replicativo ilimitado, autosuficiencia en señales de crecimiento, angiogénesis e invasión tisular sostenida... (Hanahan and Weinberg, 2000) que son adquiridos mediante el silenciamiento de determinados genes por metilación de sus promotores.

Sin embargo, la mayoría de los genes hipermetilados en cáncer no son genes supresores de tumores y para algunos de estos genes, la metilación del promotor podría ser el único tipo de inactivación encontrado en cáncer. Esto sugiere que la hipermetilación anormal es frecuentemente el resultado de la desregulación de la maquinaria de metilación en células cancerosas, en vez del resultado de una ventaja selectiva de un único evento de metilación que resulta en la inactivación de un gen supresor de tumores crítico (Clark, 2007).

Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron una importante disminución de la expresión de los genes *MDGA1* y *MDGA2* en todas las patologías tumorales estudiadas, que a su vez se correlacionaba con una disminución de la expresión de las proteínas correspondientes. Estas evidencias nos llevaron a investigar si podría existir una correlación entre la expresión génica disminuida de *MDGA1* y *MDGA2* y una posible hipermetilación de las secuencias promotoras de ambos genes. El análisis de las correspondientes regiones promotoras reveló que ambos promotores poseían islas CpG muy densas, con un porcentaje de CGs de más del 60%.

En un primer abordaje, se llevó a cabo un estudio de desmetilación del ADN con el agente 5-aza. Para ello se utilizaron células HeLa, que presentaban un nivel de expresión muy bajo de *MDGA1* y *MDGA2*. Asumiendo que los bajos niveles de expresión para los genes *MDGA* pudieran ser debidos a una regulación por hipermetilación de sus respectivos promotores, un tratamiento con un agente desmetilante como la 5-aza debería producir una disminución de la metilación de los promotores, favoreciendo la expresión de dichos genes. Los resultados obtenidos revelaron que la expresión de *MDGA1* y *MDGA2* se veía incrementada conforme aumentaba el tiempo de tratamiento con el agente desmetilante, lo que parecía indicar que la expresión de los genes *MDGA1* y *MDGA2* podría estar regulada por hipermetilación.

Nuestro siguiente objetivo fue analizar el estado de metilación de las secuencias promotoras de los genes *MDGA1* y *MDGA2* en muestras tumorales humanas. Este estudio se realizó a partir de ADN genómico extraído de muestras tumorales y no tumorales de pacientes con CCR. El método elegido fue el análisis por PCR específica de metilación (MSP). Este análisis era en aquel momento el más ampliamente utilizado para el análisis de metilación de ADN en un loci específico (Kristensen and Hansen, 2009). Se trata de un método con una alta sensibilidad, aunque la sensibilidad analítica también está influenciada por el diseño de oligonucleótidos, el número de ciclos de la PCR y la temperatura de hibridación (Kristensen and Hansen, 2009). Sin embargo, los ensayos de MSP están asociados generalmente a un elevado número de falsos positivos (Rand et al., 2002; Shaw et al.,

2006) provocados por eventos de emparejamientos erróneos de los oligonucleótidos con el ADN objeto de estudio, que provocan la amplificación de secuencias de ADN a pesar de no hibridar perfectamente con las mismas, y la presencia de moléculas de ADN que no han sido convertidas completamente con el tratamiento por bisulfito (Kristensen and Hansen, 2009). Esto podría explicar nuestros resultados, en los que únicamente hemos podido amplificar correctamente la secuencia no metilada del promotor del gen *MDGA1* y la secuencia metilada del promotor del gen *MDGA2*.

A la vista de nuestros resultados, actualmente se está diseñando el abordaje del estudio de hipermetilación de las secuencias promotoras de los genes *MDGA1* y *MDGA2* mediante pirosecuenciación. Este método es frecuentemente utilizado para identificar falsos positivos en los ensayos MSP (Shaw et al., 2006), y se basa en la detección de pirofosfato. Además, este método aporta una información cuantitativa de la metilación en una isla CpG (Colella et al., 2003; Tost et al., 2003; Uhlmann et al., 2002). La pirosecuenciación se basa en la luz emitida durante la síntesis de la hebra complementaria por acción de una ADN polimerasa que carece de actividad exonucleasa. Cuando los nucleótidos son incorporados se libera el pirofosfato y es convertido a ATP por acción de la enzima ATP-sulfurilasa. Las moléculas de ATP proporcionan energía a la enzima luciferasa para oxidar la luciferina en una reacción que genera luz (Kristensen and Hansen, 2009).

Además, dado que el diseño de los cebadores para el análisis del estado de metilación de los promotores mediante MSP ha constituido un punto crítico en nuestro estudio debido al elevado porcentaje en CGs presentes en estas regiones promotoras, en el momento actual se está realizando un análisis profundo de las regiones promotoras de *MDGA1* y *MDGA2* con objeto de diseñar nuevos cebadores que hagan posible este análisis de metilación.

## **6. CONCLUSIONES**

---



1. La expresión de las proteínas MDGA1 o MDGA2 incrementa la capacidad migratoria de las células MDCK, siendo este incremento mayor en las células que expresan MDGA1.
2. La expresión de las proteínas MDGA1 o MDGA2 incrementa la capacidad invasiva de las células MDCK, siendo ésta mayor en el caso de las células que expresan MDGA1.
3. La expresión de MDGA2 incrementa la capacidad de adhesión de las células MDCK a proteínas de la matriz extracelular, especialmente a fibronectina, laminina I y colágeno I. Esta propiedad parece ser debida principalmente al dominio MAM de la proteína.
4. La expresión de las proteínas MDGA1 o MDGA2 incrementa la capacidad de adhesión célula-célula de las células MDCK, que además parece ser de tipo heterofílica. Este efecto es mucho más notable en las células que expresan MDGA1. Los dominios MAM e inmunoglobulina parecen ser responsables de esta propiedad.
5. La expresión de los genes *MDGA1* y *MDGA2* se encuentra significativamente disminuida en un elevado número de pacientes con cáncer no microcítico de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer gástrico ó cáncer de esófago. Sin embargo, no se encuentra una asociación entre la disminución de la expresión de los genes *MDGA1* o *MDGA2* y las variables clínico-patológicas estudiadas.
6. Una menos expresión de los genes *MDGA1* o *MDGA2* parece proporcionar un mejor pronóstico clínico en todas las patologías tumorales analizadas, incrementando los intervalos medios libres de enfermedad y reduciendo las recidivas.

7. La disminución de la expresión de los genes *MDGA1* y *MDGA2* se corresponde con una disminución de la expresión de las proteínas correspondientes en todas las patologías tumorales analizadas.
8. Esta disminución de la expresión de las proteínas MDGA en cáncer podría deberse a una regulación de su expresión por hipermetilación de sus promotores, ya que el tratamiento con 5'-AZA-2'-deoxicitidina incrementa significativamente la expresión de las proteínas MDGA en células HeLa.

### CONCLUSIÓN FINAL

La expresión *in vitro* de las proteínas MDGA incrementa la capacidad migratoria e invasiva de las células MDCK. Esto podría corresponderse *in vivo* con una mayor agresividad del cáncer. Por tanto, una menor expresión de MDGA1 o MDGA2 implicaría una menor capacidad migratoria e invasiva de las células tumorales, que explicaría los mejores pronósticos clínicos observados en aquellos pacientes cuya expresión de *MDGA1* o *MDGA2* se encuentra disminuida. Esta disminución de la expresión en tumores podría ser debida a una regulación de estos genes por hipermetilación de sus promotores.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

---



## A

- Abe, M., Ohira, M., Kaneda, A., Yagi, Y., Yamamoto, S., Kitano, Y., Takato, T., Nakagawara, A., and Ushijima, T. (2005). CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas. *Cancer Research* *65*, 828–834.
- Ableser, M.J., Penuela, S., Lee, J., Shao, Q., and Laird, D.W. (2013). Connexin43 Reduces Melanoma Growth within a Keratinocyte Microenvironment and During Tumorigenesis in vivo. *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M113.507228
- AJ, K., KN, S., A, P., and C, S. (2001). Expression patterns of alpha-, beta- and gamma-catenin in pancreatic cancer: correlation with E-cadherin expression, pathological features and prognosis. *Anticancer Res* *21*, 4127–4134.
- Akiyama, Y., Maesawa, C., Ogasawara, S., Terashima, M., and Masuda, T. (2003). Cell-type-specific repression of the maspin gene is disrupted frequently by demethylation at the promoter region in gastric intestinal metaplasia and cancer cells. *The American Journal of Pathology* *163*, 1911–1919.
- Alahari, S.K., Reddig, P.J., and Juliano, R.L. (2002). Biological aspects of signal transduction by cell adhesion receptors. *Int. Rev. Cytol.* *220*, 145–184.
- Allena, R. (2013). Cell Migration with Multiple Pseudopodia: Temporal and Spatial Sensing Models. *Bull Math Biol* *75*, 288–316.
- An, C., Choi, I.-S., Yao, J.C., Worah, S., Xie, K., Mansfield, P.F., Ajani, J.A., Rashid, A., Hamilton, S.R., and Wu, T.-T. (2005). Prognostic significance of CpG island methylator phenotype and microsatellite instability in gastric carcinoma. *Clin. Cancer Res.* *11*, 656–663.
- Arai, E., Kanai, Y., Ushijima, S., Fujimoto, H., Mukai, K., and Hirohashi, S. (2006). Regional DNA hypermethylation and DNA methyltransferase (DNMT) 1 protein overexpression in both renal tumors and corresponding nontumorous renal tissues. *Int. J. Cancer* *119*, 288–296.

## B

- Bachmann, M., and Möröy, T. (2005). The serine/threonine kinase Pim-1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37, 726–730.
- Barrès, R., Osler, M.E., Yan, J., Rune, A., Fritz, T., Caidahl, K., Krook, A., and Zierath, J.R. (2009). Non-CpG methylation of the PGC-1alpha promoter through DNMT3B controls mitochondrial density. *Cell Metab.* 10, 189–198.
- Bauer, H., Zweimueller-Mayer, J., Steinbacher, P., Lametschwandtner, A., and Bauer, H.C. (2010). The dual role of zonula occludens (ZO) proteins. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010, 402593.
- Baylin, S.B. (2005). DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Prac Oncol* 2, S4–S11.
- Beatriz Fernandez-Munoz, Yurrita, M.M., Ester Martin-Villara, CarrascoRamireza, P., Megiasb, D., Jaime Renarta, and Quintanilla, M. (2011). THE TRANSMEMBRANE DOMAIN OF PODOPLANIN IS REQUIRED FOR ITS ASSOCIATION WITH LIPID RAFTS AND THE INDUCTION OF EPITHELIALMESENCHYMAL TRANSITION. 43, 886-896.
- Beckmann, G., and Bork, P. (1993). An adhesive domain detected in functionally diverse receptors. *Trends Biochem. Sci.* 18, 40–41.
- Beningo, K.A., Dembo, M., Kaverina, I., Small, J.V., and Wang, Y.L. (2001). Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts. *The Journal of Cell Biology* 153, 881–888.
- Berglund, E.O., Murai, K.K., Fredette, B., Sekerková, G., Marturano, B., Weber, L., Mugnaini, E., and Ranscht, B. (1999). Ataxia and abnormal cerebellar microorganization in mice with ablated contactin gene expression. *Neuron* 24, 739–750.

- Betancur, C., Sakurai, T., and Buxbaum, J.D. (2009). The emerging role of synaptic cell-adhesion pathways in the pathogenesis of autism spectrum disorders. *Trends Neurosci.* *32*, 402–412.
- Bhatt, A.N., Mathur, R., Farooque, A., and Verma, A. (2010). Bhatt: Cancer biomarkers-Current perspectives. - Google Scholar. *Indian J Med Res* *132*, 129–149.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* *16*, 6-21.
- Bjornsson, H.T., Sigurdsson, M.I., Fallin, M.D., Irizarry, R.A., Aspelund, T., Cui, H., Yu, W., Rongione, M.A., Ekström, T.J., Harris, T.B., et al. (2008). Intra-individual change over time in DNA methylation with familial clustering. *Jama* *299*, 2877–2883.
- Blin, N., and Stafford, D.W. (1976). A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* *3*, 2303-2308.
- Bolós, V., Peinado, H., Pérez-Moreno, M.A., Fraga, M.F., Esteller, M., and Cano, A. (2003). The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *Journal of Cell Science* *116*, 499–511.
- Borradori, L., and Sonnenberg, A. (1999). Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *J. Invest. Dermatol.* *112*, 411–418.
- Bourgeron, T. (2009). A synaptic trek to autism. *Current Opinion in Neurobiology.* *19*, 231-234.
- 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*, 284-254.
- Brembeck, F.H., Schwarz-Romond, T., Bakkens, J., Wilhelm, S., Hammerschmidt, M., and Birchmeier, W. (2004). Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev.* *18*, 2225–2230.

Brümmendorf, T., and Lemmon, V. (2001). Immunoglobulin superfamily receptors: cis-interactions, intracellular adapters and alternative splicing regulate adhesion. *Current Opinion in Cell Biology* 13, 611–618.

Bucan, M., Abrahams, B.S., Wang, K., and Glessner, J.T. (2009). PLOS Genetics: Genome-Wide Analyses of Exonic Copy Number Variants in a Family-Based Study Point to Novel Autism Susceptibility Genes. *PLoS Genetics*. 5, e1000536.

Buccione, R., Caldieri, G., and Ayala, I. (2009). Invadopodia: specialized tumor cell structures for the focal degradation of the extracellular matrix. *Cancer Metastasis Rev* 28, 137–149.

Budczies, J., Klauschen, F., Sinn, B.V., Györfy, B., Schmitt, W.D., Darb-Esfahani, S., and Denkert, C. (2012). Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS ONE* 7, e51862.

## C

Caffarelli, E., and Filetici, P. (2011). Epigenetic regulation in cancer development. *Front. Biosci.* 16, 2682–2694.

Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., et al. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 15524–15529.

Carman, C.V. (2009). Mechanisms for transcellular diapedesis: probing and pathfinding by 'invadosome-like protrusions'. *Journal of Cell Science* 122, 3025–3035.

Carmona-Fontaine, C., Matthews, H.K., Kuriyama, S., Moreno, M., Dunn, G.A., Parsons, M., Stern, C.D., and Mayor, R. (2008). Contact inhibition of locomotion in vivo controls neural crest directional migration. *Nature* 456, 957–961.

Cavallaro, U., and Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 4, 118–132.

- Cavallaro, U., Niedermeyer, J., Fuxa, M., and Christofori, G. (2001). N-CAM modulates tumour-cell adhesion to matrix by inducing FGF-receptor signalling : Abstract : Nature Cell Biology. *Nat. Cell Biol.* *3*, 650–657.
- Charras, G., and Paluch, E. (2008). Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 730–736.
- Cho, M., Uemura, H., Kim, S.C., Kawada, Y., Yoshida, K., Hirao, Y., Konishi, N., Saga, S., and Yoshikawa, K. (2001). Hypomethylation of the MN/CA9 promoter and upregulated MN/CA9 expression in human renal cell carcinoma. *Br. J. Cancer* *85*, 563–567.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* *162*, 156-159.
- Ciobanasu, C., Faivre, B., and Le Clainche, C. (2014). Actomyosin-dependent formation of the mechanosensitive talin-vinculin complex reinforces actin anchoring. *Nat Commun* *5*, 3095.
- Cismasiu, V.B. (2004). The MAM (Meprin/A5-protein/PTPmu) Domain Is a Homophilic Binding Site Promoting the Lateral Dimerization of Receptor-like Protein-tyrosine Phosphatase. *Journal of Biological Chemistry* *279*, 26922–26931.
- Clark, S.J. (2007). Action at a distance: epigenetic silencing of large chromosomal regions in carcinogenesis. *Human Molecular Genetics* *16*, R88–R95.
- Cohen, N.R., Taylor, J.S., Scott, L.B., Guillery, R.W., Soriano, P., and Furley, A.J. (1998). Errors in corticospinal axon guidance in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1. *Curr. Biol.* *8*, 26–33.
- Colella, S., Shen, L., Baggerly, K.A., Issa, J.P., and Krahe, R. (2003). Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing methylation analysis of CpG sites. *BioTechniques* *35*, 146–150.
- Costello, J.F., and Plass, C. (2001). Methylation matters. *J. Med. Genet.* *38*, 285–303.

Costello, J.F., Frühwald, M.C., Smiraglia, D.J., Rush, L.J., Robertson, G.P., Gao, X., Wright, F.A., Feramisco, J.D., Peltomäki, P., Lang, J.C., et al. (2000). Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet* 24, 132–138.

Criswell, L.A. (2008). The genetic contribution to systemic lupus erythematosus. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 66, 176–183.

Crossin, K.L., and Krushel, L.A. (2000). Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Dev. Dyn.* 218, 260–279.

## D

Dahme, M., Bartsch, U., Martini, R., Anliker, B., Schachner, M., and Mantei, N. (1997). Disruption of the mouse L1 gene leads to malformations of the nervous system. *Nat Genet* 17, 346–349.

Dao, L., Gonnermann, C., and Franz, C.M. (2013). Investigating differential cell-matrix adhesion by directly comparative single-cell force spectroscopy. *J. Mol. Recognit.* 26, 578–589.

De Craene, B., and Berx, G. (2013). Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat. Rev. Cancer* 13, 97–110.

De Juan, C., Iniesta, P., Cruces, J., Sanchez, A., Massa, M.J., Gonzalez-Quevedo, R., Torres, A.J., Balibrea, J.L., and Benito, M. (1999). DNA amplification on chromosome 6p12 in non small cell lung cancer detected by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Int. J. Cancer* 84, 344–349.

De Juan, C., Iniesta, P., González-Quevedo, R., Morán, A., Sánchez-Pernaute, A., Torres, A.J., Balibrea, J.L., Díaz-Rubio, E., Cruces, J., and Benito, M. (2002). Genomic organization of a novel glycosylphosphatidylinositol MAM gene expressed in human tissues and tumors. *Oncogene* 21, 3089–3094.

de Pereda, J.M., Lillo, M.P., and Sonnenberg, A. (2009). Structural basis of the interaction between integrin  $\alpha 6\beta 4$  and plectin at the hemidesmosomes. *Embo J.* 28, 1180–1190.

- Deapen, D., Escalante, A., Weinrib, L., Horwitz, D., Bachman, B., Roy-Burman, P., Walker, A., and Mack, T.M. (1992). A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *35*, 311–318.
- Deb, M., Sengupta, D., and Patra, S.K. (2011). Integrin-epigenetics: a system with imperative impact on cancer. *Cancer Metastasis Rev* *31*, 221–234.
- Defamie, N., Chepied, A., and Mesnil, M. (2014). Connexins, gap junctions and tissue invasion. *FEBS Letters*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2014.01.012>
- Dejana, E.; Orsenigo, F.; Lampugnani M.G. (2008). The role of adherence junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *Journal of Cell Science.* *121*, 2115-2122.
- Denicourt, C., and Dowdy, S.F. (2004). Cip/Kip proteins: more than just CDKs inhibitors. *Genes Dev.* *18*, 851–855.
- Ding, L., Lu, Z., Lu, Q., and Chen, Y.-H. (2013). The claudin family of proteins in human malignancy: a clinical perspective. *Cancer Manag Res* *5*, 367–375.
- Diz-Muñoz, A., Krieg, M., Bergert, M., Ibarlucea-Benitez, I., Muller, D.J., Paluch, E., and Heisenberg, C.-P. (2010). Control of directed cell migration in vivo by membrane-to-cortex attachment. *PLoS Biol.* *8*, e1000544.
- Díaz-López, A., Rivas, C., Iniesta, P., Morán, A., García-Aranda, C., Megías, D., Sánchez-Pernaute, A., Torres, A., Díaz-Rubio, E., Benito, M., et al. (2005). Characterization of MDGA1, a novel human glycosylphosphatidylinositol-anchored protein localized in lipid rafts. *Experimental Cell Research* *307*, 91–99.
- Díaz-López, A. (2007). Caracterización de las proteínas noveles humanas MDGA1 y MDGA2. Implicación de MDGA1 en migración y adhesión celular. Universidad Complutense de Madrid (UCM).
- Díaz-López, A., Iniesta, P., Morán, A., Ortega, P., Fernández-Marcelo, T., Sánchez-Pernaute, A., Torres, A.J., Benito, M., and De Juan, C. (2010). Expression of Human MDGA1 Increases Cell Motility and Cell-Cell Adhesion and Reduces Adhesion to Extracellular Matrix Proteins in MDCK Cells. *Cancer Microenvironment* *4*, 23–32.

Dumbauld, D.W., Lee, T.T., Singh, A., Scrimgeour, J., Gersbach, C.A., Zamir, E.A., Fu, J., Chen, C.S., Curtis, J.E., Craig, S.W., et al. (2013). How vinculin regulates force transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* *110*, 9788–9793.

## E

Echevarria, W., and Nathanson, M.H. (2004). Gap junctions in the liver. *Molecular Pathogenesis of Cholestasis* 36–47.

Eden, A., Gaudet, F., Waghmare, A., and Jaenisch, R. (2003). Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* *300*, 455.

Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., and Jones, P.A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* *429*, 457–463.

Eilken, H.M., and Adams, R.H. (2010). Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Current Opinion in Cell Biology* *22*, 617–625.

el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* *75*, 817–825.

Emsley, J., Knight, C.G., Farndale, R.W., Barnes, M.J., and Liddington, R.C. (2000). Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1. *Cell* *101*, 47–56.

Esteller, M., and Herman, J.G. (2001). Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J. Pathol.* *196*, 1–7.

Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* *420*, 629–635.

## F

Fabbri, M., Garzon, R., Cimmino, A., Liu, Z., Zanesi, N., Callegari, E., Liu, S., Alder, H., Costinean, S., Fernandez-Cymering, C., et al. (2007). MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* *104*, 15805–15810.

- Fantin, A., Schwarz, Q., Davidson, K., Normando, E.M., Denti, L., and Ruhrberg, C. (2011). The cytoplasmic domain of neuropilin 1 is dispensable for angiogenesis, but promotes the spatial separation of retinal arteries and veins. *Development* *138*, 4185–4191.
- Feinberg, A.P., and Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* *301*, 89–92.
- Finne, J. (1982). Occurrence of unique polysialosyl carbohydrate units in glycoproteins of developing brain. *J. Biol. Chem.* *257*, 11966–11970.
- Flicek, P., Amode, M.R., Barrell, D., Beal, K., Billis, K., Brent, S., Carvalho-Silva, D., Clapham, P., Coates, G., Fitzgerald, S., et al. (2014). Ensembl 2014. *Nucleic Acids Res.* *42*, D749–D755.
- Fraga, M.F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., Bonaldi, T., Haydon, C., Ropero, S., Petrie, K., et al. (2005). Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* *37*, 391–400.
- Franke, W.W. (2009). Discovering the molecular components of intercellular junctions—a historical view. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* *1*.
- Friedl, P., Hegerfeldt, Y., and Tusch, M. (2004). Collective cell migration in morphogenesis and cancer. *International Journal of ...*
- Friedl, P., and Gilmour, D. (2009a). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 445–457.
- Friedl, P., and Gilmour, D. (2009b). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 445–457.
- Friedl, P., Locker, J., Sahai, E., and Segall, J.E. (2012). Classifying collective cancer cell invasion. *Nat. Cell Biol.* *14*, 777–783.
- Friedman, J.M., Liang, G., Liu, C.C., Wolff, E.M., Tsai, Y.C., Ye, W., Zhou, X., and Jones, P.A. (2009). The Putative Tumor Suppressor microRNA-101 Modulates the Cancer Epigenome by Repressing the Polycomb Group Protein EZH2. *Cancer Research* *69*, 2623–2629.

Frixen, U.H., Behrens, J., Sachs, M., Eberle, G., Voss, B., Warda, A., Löchner, D., and Birchmeier, W. (1991). E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *The Journal of Cell Biology* *113*, 173–185.

Fujimura, Y., Iwashita, M., Matsuzaki, F., and Yamamoto, T. (2006). MDGA1, an IgSF molecule containing a MAM domain, heterophilically associates with axon- and muscle-associated binding partners through distinct structural domains. *Brain Research* *1101*, 12–19.

Furuse, M., Itoh, M., Hirase, T., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1994). Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *The Journal of Cell Biology* *127*, 1617–1626.

## G

Galbraith, C.G., Yamada, K.M., and Sheetz, M.P. (2002). The relationship between force and focal complex development. *The Journal of Cell Biology* *159*, 695–705.

Gama-Sosa, M.A., Slagel, V.A., Trewyn, R.W., Oxenhandler, R., Kuo, K.C., Gehrke, C.W., and Ehrlich, M. (1983). The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res.* *11*, 6883–6894.

Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., and Yamada, K.M. (2001). Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 793–805.

Getsios, S., Godsel, L.M., and Green, K.J. (2005). Structural and Functional Regulation of Desmosomes. 160–177.

González Ramírez, A.E., Díaz Martínez, A., and Díaz-Anzaldúa, A. (2008). Salud mental - La epigenética y los estudios en gemelos en el campo de la psiquiatría. *Salud Mental.* *31*, 229-237.

Gopalakrishnan, S., Van Emburgh, B.O., and Robertson, K.D. (2008). DNA methylation in development and human disease. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* *647*, 30–38.

Green, K.J., and Jones, J.C. (1996). Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components. *The FASEB Journal*. *10*, 871-881.

Greger, V., Passarge, E., Höpping, W., Messmer, E., and Horsthemke, B. (1989). Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum. Genet.* *83*, 155–158.

Gumbiner, B.M. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* *84*, 345–357.

Gupton, S.L., and Gertler, F.B. (2007). Filopodia: the fingers that do the walking. *Sci. STKE* *2007*, re5.

## H

Haenisch, C., Diekmann, H., Klinger, M., Gennarini, G., Kuwada, J.Y., and Stuermer, C.A.O. (2005). The neuronal growth and regeneration associated Cntn1 (F3/F11/Contactin) gene is duplicated in fish: expression during development and retinal axon regeneration. *Mol. Cell. Neurosci.* *28*, 361–374.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57–70.

Harley, I.T.W., Kaufman, K.M., Langefeld, C.D., Harley, J.B., and Kelly, J.A. (2009). Genetic susceptibility to SLE: new insights from fine mapping and genome-wide association studies. *Nat Rev Genet* *10*, 285–290.

Harley, J.B., Kelly, J.A., and Kaufman, K.M. (2006). Unraveling the genetics of systemic lupus erythematosus. *Springer Semin. Immunopathol.* *28*, 119–130.

Harmon, R.M., and Green, K.J. (2013). Structural and Functional Diversity of Desmosomes. *Cell Commun Adhes* *20*, 171–187.

Hartsock, A., and Nelson, W.J. (2008). Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* *1778*, 660–669.

Hattori, N., and Ushijima, T. (2014). Compendium of aberrant DNA methylation and histone modifications in cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.08.140>.

- He, L., and Hannon, G.J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 5, 522–531.
- He, L., Thomson, J.M., Hemann, M.T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S.W., Hannon, G.J., et al. (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 435, 828–833.
- Hebbes, T.R., Thorne, A.W., and Crane-Robinson, C. (1988). A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *Embo J.* 7, 1395–1402.
- Hellquist, A., Zucchelli, M., Lindgren, C.M., Saarialho-Kere, U., Järvinen, T.M., Koskenmies, S., Julkunen, H., Onkamo, P., Skoog, T., Panelius, J., et al. (2009). Identification of MAMDC1 as a candidate susceptibility gene for systemic lupus erythematosus (SLE). *PLoS ONE* 4, e8037.
- Hildebrandt, H., Becker, C., Glüer, S., Rösner, H., Gerardy-Schahn, R., and Rahmann, H. (1998). Polysialic acid on the neural cell adhesion molecule correlates with expression of polysialyltransferases and promotes neuroblastoma cell growth. *Cancer Research* 58, 779–784.
- Hill, V.K., Shinawi, T., Ricketts, C.J., Krex, D., Schackert, G., Bauer, J., Wei, W., Cruickshank, G., Maher, E.R., and Latif, F. (2014). Stability of the CpG island methylator phenotype during glioma progression and identification of methylated loci in secondary glioblastomas. *BMC Cancer* 14, 506.
- Hochberg, M.C. (1987). The application of genetic epidemiology to systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 14, 867–869.
- Holthöfer, B., Windoffer, R., Troyanovsky, S., and Leube, R.E. (2007). Structure and Function of Desmosomes. In *International Review of Cytology*, (Elsevier), pp. 65–163.
- Horwitz, D.L. (1997). Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process. *Cell* 84, 359–369.

Hoshikawa, Y., Kwon, H.J., Yoshida, M., Horinouchi, S., and Beppu, T. (1994). Trichostatin A induces morphological changes and gelsolin expression by inhibiting histone deacetylase in human carcinoma cell lines. *Experimental Cell Research* 214, 189–197.

Howard, G., Eiges, R., Gaudet, F., Jaenisch, R., and Eden, A. (2008). Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice. *Oncogene* 27, 404–408.

## I

Ilantzis, C., Jothy, S., Alpert, L.C., Draber, P., and Stanners, C.P. (1997). Cell-surface levels of human carcinoembryonic antigen are inversely correlated with colonocyte differentiation in colon carcinogenesis. *Lab. Invest.* 76, 703–716.

Indra, I., Troyanovsky, R., and Troyanovsky, S.M. (2014). Afadin controls cadherin cluster stability using clathrin-independent mechanism. *Tissue Barriers* 2, e28687.

Iorio, M.V., and Croce, C.M. (2012). Causes and consequences of microRNA dysregulation. *Cancer J* 18, 215–222.

Ishikawa, T., Gotoh, N., Murayama, C., Abe, T., Iwashita, M., Matsuzaki, F., Suzuki, T., and Yamamoto, T. (2010). IgSF molecule MDGA1 is involved in radial migration and positioning of a subset of cortical upper-layer neurons. *Dev. Dyn.* 240, 96–107.

Ivanov, A.I., and Naydenov, N.G. (2013). Dynamics and Regulation of Epithelial Adherens Junctions: Recent Discoveries and Controversies. *Int Rev Cell Mol Biol* 303, 27–99.

## J

Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074–1080.

Jiang, C., and Pugh, B.F. (2009). Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. *Nat Rev Genet* 10, 161–172.

Jiang, W., Gorbea, C.M., Flannery, A.V., Beynon, R.J., Grant, G.A., and Bond, J.S. (1992). The alpha subunit of meprin A. Molecular cloning and sequencing, differential expression in inbred mouse strains, and evidence for divergent evolution of the alpha and beta subunits. *J. Biol. Chem.* *267*, 9185–9193.

Jones, P.A., and Baylin, S.B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* *3*, 415–428.

Jones, P.A., and Baylin, S.B. (2007). The Epigenomics of Cancer. *Cell* *128*, 683–692.

Julenius, K. (2004). Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology* *15*, 153–164.

## K

K N, H., Chow, M.Z., Baker, E.K., Pal, S., Bassal, S., Brasacchio, D., Wang, L., Craig, J.M., Jones, P.L., Sif, S., et al. (2005). Brahma links the SWI/SNF chromatin-remodeling complex with MeCP2-dependent transcriptional silencing. *Nat Genet* *37*, 254–264.

Kalli, A.C., Campbell, I.D., and Sansom, M.S.P. (2013). Conformational changes in talin on binding to anionic phospholipid membranes facilitate signaling by integrin transmembrane helices. *PLoS Comput. Biol.* *9*, e1003316.

Kametani, Y., and Takeichi, M. (2007). Basal-to-apical cadherin flow at cell junctions. *Nat. Cell Biol.* *9*, 92–98.

Kamiguchi, H., and Lemmon, V. (2000). IgCAMs: bidirectional signals underlying neurite growth. *Current Opinion in Cell Biology* *12*, 598–605.

Kang, M., Ryu, J., Lee, D., Lee, M.-S., Kim, H.-J., Nam, S.H., Song, H.E., Choi, J., Lee, G.-H., Kim, T.Y., et al. (2014). Correlations between Transmembrane 4 L6 Family Member 5 (TM4SF5), CD151, and CD63 in Liver Fibrotic Phenotypes and Hepatic Migration and Invasive Capacities. *PLoS ONE* *9*, e102817.

Kanzaki, N., Ogita, H., Komura, H., Ozaki, M., Sakamoto, Y., Majima, T., Ijuin, T., Takenawa, T., and Takai, Y. (2008). Involvement of the nectin-afadin complex in PDGF-induced cell survival. *Journal of Cell Science* *121*, 2008–2017.

- Kikuchi, A., Yamamoto, H., and Kishida, S. (2007). Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors. *Cell. Signal.* *19*, 659–671.
- Kim, G.-D., Ni, J., Kelesoglu, N., Roberts, R.J., and Pradhan, S. (2002). Cooperation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Embo J.* *21*, 4183–4195.
- Kim, J., Kaye, F.J., Henslee, J.G., Shively, J.E., Park, J.G., Lai, S.L., Linnoila, R.I., Mulshine, J.L., and Gazdar, A.F. (1992). Expression of carcinoembryonic antigen and related genes in lung and gastrointestinal cancers. *Int. J. Cancer* *52*, 718–725.
- Kiosses, W.B., Shattil, S.J., Pampori, N., and Schwartz, M.A. (2001). Rac recruits high-affinity integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 to lamellipodia in endothelial cell migration. *Nat. Cell Biol.* *3*, 316–320.
- Ko, J., Zhang, C., Arac, D., Boucard, A.A., Brunger, A.T., and Südhof, T.C. (2009). Neuroligin-1 performs neurexin-dependent and neurexin-independent functions in synapse validation. *Embo J.* *28*, 3244–3255.
- Koch, S. (2012). Neuropilin signalling in angiogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* *40*, 20–25.
- Kohno, T., Morishita, K., Takano, H., Shapiro, D.N., and Yokota, J. (1994). Homozygous deletion at chromosome 2q33 in human small-cell lung carcinoma identified by arbitrarily primed PCR genomic fingerprinting. *Oncogene* *9*, 103–108.
- Komminoth, P., Roth, J., Lackie, P.M., Bitter-Suermann, D., and Heitz, P.U. (1991). Polysialic acid of the neural cell adhesion molecule distinguishes small cell lung carcinoma from carcinoids. *The American Journal of Pathology* *139*, 297–304.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* *128*, 693–705.
- Kristensen, L.S., and Hansen, L.L. (2009). PCR-Based Methods for Detecting Single-Locus DNA Methylation Biomarkers in Cancer Diagnostics, Prognostics, and Response to Treatment. *Clinical Chemistry* *55*, 1471–1483.

Kuramochi, M., Fukuhara, H., Nobukuni, T., Kanbe, T., Maruyama, T., Ghosh, H.P., Pletcher, M., Isomura, M., Onizuka, M., Kitamura, T., et al. (2001). TSLC1 is a tumor-suppressor gene in human non-small-cell lung cancer. *Nat Genet* 27, 427–430.

Kurose, K., Hiratsuka, K., Ishiwata, K., Nishikawa, J., Nonen, S., Azuma, J., Kato, M., Wakeno, M., Okugawa, G., Kinoshita, T., et al. (2012). Genome-wide association study of SSRI/SNRI-induced sexual dysfunction in a Japanese cohort with major depression. *Psychiatry Research* 1–6. doi:10.1016/j.psychres.2012.01.023

## L

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.

Lam, P.V.N., Goldman, R., Karagiannis, K., Narsule, T., Simonyan, V., Soika, V., and Mazumder, R. (2013). Structure-based comparative analysis and prediction of N-linked glycosylation sites in evolutionarily distant eukaryotes. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 11, 96–104.

Larsen, M., Tremblay, M.L., and Yamada, K.M. (2003). Phosphatases in cell-matrix adhesion and migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 700–711.

Lee, K., Kim, Y., Lee, S.-J., Qiang, Y., Lee, D., Lee, H.W., Kim, H., Je, H.S., Südhof, T.C., and Ko, J. (2013). MDGAs interact selectively with neuroligin-2 but not other neuroligins to regulate inhibitory synapse development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 110, 336–341.

Li, J., Liu, J., Feng, G., Li, T., Zhao, Q., Li, Y., Hu, Z., Zheng, L., Zeng, Z., Wang, T., et al. (2010). The MDGA1 gene confers risk to schizophrenia and bipolar disorder. *Schizophrenia Research* 1–7. doi:10.1016/j.schres.2010.11.002

Liang, Q.-L., Chen, G.-Q., Li, Z.-Y., and Wang, B.-R. (2011). Function and histopathology of a cell adhesion molecule TSLC1 in cancer. *Cancer Invest.* 29, 107–112.

Lin, J.C., Jeong, S., Liang, G., Takai, D., Fatemi, M., Tsai, Y.C., Egger, G., Gal-Yam, E.N., and Jones, P.A. (2007). Role of nucleosomal occupancy in the epigenetic silencing of the MLH1 CpG island. *Cancer Cell* 12, 432–444.

- Ling, C., Poulsen, P., Simonsson, S., Rönn, T., Holmkvist, J., Almgren, P., Hagert, P., Nilsson, E., Mabey, A.G., Nilsson, P., et al. (2007). Genetic and epigenetic factors are associated with expression of respiratory chain component NDUF6 in human skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* *117*, 3427–3435.
- Litwack, E.D., Babey, R., Buser, R., Gesemann, M., and O'Leary, D.D.M. (2004). Identification and characterization of two novel brain-derived immunoglobulin superfamily members with a unique structural organization. *Molecular and Cellular Neuroscience* *25*, 263–274.
- Logan, C.Y., and Nusse, R. (2004). THE WNT SIGNALING PATHWAY IN DEVELOPMENT AND DISEASE. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *20*, 781–810.
- Lowe, J.B., and Marth, J.D. (2003). A GENETIC APPROACH TO IMMUNOGLOBULIN FUNCTION. *Annu. Rev. Biochem.* *72*, 643–691.
- Ludwig, J.A., and Weinstein, J.N. (2005). Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nat. Rev. Cancer* *5*, 845–856.
- Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* *389*, 251–260.
- Lung, H.L., Cheung, A.K.L., Xie, D., Cheng, Y., Kwong, F.M., Murakami, Y., Guan, X.-Y., Sham, J.S., Chua, D., Protopopov, A.I., et al. (2006). TSLC1 is a tumor suppressor gene associated with metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Research* *66*, 9385–9392.
- ## M
- Mack, S.C., Witt, H., Piro, R.M., Gu, L., Zuyderduyn, S., Stütz, A.M., Wang, X., Gallo, M., Garzia, L., Zayne, K., et al. (2014). Epigenomic alterations define lethal CIMP-positive ependymomas of infancy. *Nature* *506*, 445–450.
- Mao, X., Seidlitz, E., Truant, R., Hitt, M., and Ghosh, H.P. (2004). Re-expression of TSLC1 in a non-small-cell lung cancer cell line induces apoptosis and inhibits tumor growth. *Oncogene* *23*, 5632–5642.

- Mariner, D.J., Anastasiadis, P., Keilhack, H., Böhmer, F.D., Wang, J., and Reynolds, A.B. (2001). Identification of Src phosphorylation sites in the catenin p120ctn. *J. Biol. Chem.* *276*, 28006–28013.
- Mbalaviele, G., Dunstan, C.R., Sasaki, A., Williams, P.J., Mundy, G.R., and Yoneda, T. (1996). E-cadherin expression in human breast cancer cells suppresses the development of osteolytic bone metastases in an experimental metastasis model. *Cancer Research* *56*, 4063–4070.
- McLachlan, R.W., and Yap, A.S. (2007). Not so simple: the complexity of phosphotyrosine signaling at cadherin adhesive contacts - Springer. *J Mol Med* *85*, 545–554.
- Mierke, C.T. (2009). The Role of Vinculin in the Regulation of the Mechanical Properties of Cells. *Cell Biochem Biophys* *53*, 115–126.
- Molina, V., and Shoenfeld, Y. (2005). Infection, vaccines and other environmental triggers of autoimmunity. *Autoimmunity* *38*, 235–245.
- Montell, D.J. (2008). Morphogenetic cell movements: diversity from modular mechanical properties. *Science* *322*, 1502–1505.
- Moreno-Bueno, G., Peinado, H., Molina, P., Olmeda, D., Cubillo, E., Santos, V., Palacios, J., Portillo, F., and Cano, A. (2009). The morphological and molecular features of the epithelial-to-mesenchymal transition. *Nat Protoc* *4*, 1591–1613.
- Mountain, C.F. (1986). A new international staging system for lung cancer. *Chest.* *89*, 225S-233S.
- Mountain, C.F. (1997). Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest.* *111*, 1710-1717.
- Mountain, C.F. (2009). A new international staging system for lung cancer. 1986. *Chest.* *136*.
- Mukoyama, Y.-S., Gerber, H.-P., Ferrara, N., Gu, C., and Anderson, D.J. (2005). Peripheral nerve-derived VEGF promotes arterial differentiation via neuropilin 1-mediated positive feedback. *Development* *132*, 941–952.

## N

Nakopoulou, L., Gakiopoulou-Givalou, H., Karayiannakis, A.J., Giannopoulou, I., Keramopoulos, A., Davaris, P., and Pignatelli, M. (2002). Abnormal alpha-catenin expression in invasive breast cancer correlates with poor patient survival. *Histopathology* 40, 536–546.

Nelson, W.J. (2008). Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 149–155.

Niethammer, P. (2002). Cosignaling of NCAM via lipid rafts and the FGF receptor is required for neuritogenesis. *The Journal of Cell Biology* 157, 521–532.

Nishigaki, M., Aoyagi, K., Danjoh, I., Fukaya, M., Yanagihara, K., Sakamoto, H., Yoshida, T., and Sasaki, H. (2005). Discovery of aberrant expression of R-RAS by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays. *Cancer Research* 65, 2115–2124.

Noushmehr, H., Weisenberger, D.J., Diefes, K., Phillips, H.S., Pujara, K., Berman, B.P., Pan, F., Pelloski, C.E., Sulman, E.P., Bhat, K.P., et al. (2010). Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* 17, 510–522.

## O

Ohtani-Fujita, N., Fujita, T., Aoike, A., Osifchin, N.E., Robbins, P.D., and Sakai, T. (1993). CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Oncogene* 8, 1063–1067.

Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247–257.

Okazaki, T., Takita, J., Kohno, T., Handa, H., and Yokota, J. (1996). Detection of amplified genomic sequences in human small-cell lung carcinoma cells by arbitrarily primed-PCR genomic fingerprinting. *Hum. Genet.* 98, 253–258.

## P

- Panicker, A.K., Buhusi, M., Thelen, K., and Maness, P.F. (2003). Cellular signalling mechanisms of neural cell adhesion molecules. *Front. Biosci.* 8, d900–d911.
- Peck, D., and Walsh, F.S. (1993). Differential effects of over-expressed neural cell adhesion molecule isoforms on myoblast fusion. *The Journal of Cell Biology* 123, 1587–1595.
- Peinado, H., Portillo, F., and Cano, A. (2004). Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 48, 365–375.
- Peinado, H., Quintanilla, M., and Cano, A. (2003). Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J. Biol. Chem.* 278, 21113–21123.
- Peinado, M.A., Malkhosyan, S., Velazquez, A., and Perucho, M. (1992). Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 10065–10069.
- Peng, D.-F., Kanai, Y., Sawada, M., Ushijima, S., Hiraoka, N., Kitazawa, S., and Hirohashi, S. (2006). DNA methylation of multiple tumor-related genes in association with overexpression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) during multistage carcinogenesis of the pancreas. *Carcinogenesis* 27, 1160–1168.
- Perez-Moreno, M., and Fuchs, E. (2006). Catenins: keeping cells from getting their signals crossed. *Developmental Cell* 11, 601–612.
- Perl, A.K., Dahl, U., Wilgenbus, P., Cremer, H., Semb, H., and Christofori, G. (1999). Reduced expression of neural cell adhesion molecule induces metastatic dissemination of pancreatic beta tumor cells. *Nat Med* 5, 286–291.
- Petersen, O.W., Nielsen, H.L., Gudjonsson, T., Villadsen, R., Rank, F., Niebuhr, E., Bissell, M.J., and Rønnov-Jessen, L. (2003). Epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer can provide a nonmalignant stroma. *The American Journal of Pathology* 162, 391–402.

Pettem, K.L., Yokomaku, D., Takahashi, H., Ge, Y., and Craig, A.M. (2013). Interaction between autism-linked MDGAs and neuroligins suppresses inhibitory synapse development. *The Journal of Cell Biology* 200, 321–336.

Pérez-Moreno, M.A., Locascio, A., Rodrigo, I., Dhondt, G., Portillo, F., Nieto, M.A., and Cano, A. (2001). A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *J. Biol. Chem.* 276, 27424–27431.

Pimenta, A.F., Fischer, I., and Levitt, P. (1996). cDNA cloning and structural analysis of the human limbic-system-associated membrane protein (LAMP). *Gene* 170, 189–195.

Plein, A., Fantin, A., and Ruhrberg, C. (2014). Neuropilin regulation of angiogenesis, arteriogenesis, and vascular permeability. *Microcirculation* 21, 315–323.

## R

Rand, K., Qu, W., Ho, T., Clark, S.J., and Molloy, P. (2002). Conversion-specific detection of DNA methylation using real-time polymerase chain reaction (ConLight-MSP) to avoid false positives. *Methods* 27, 114–120.

Rhodes, B., and Vyse, T.J. (2008). The genetics of SLE: an update in the light of genome-wide association studies. *Rheumatology (Oxford)* 47, 1603–1611.

Ridley, A.J. (2011). Life at the leading edge. *Cell* 145, 1012–1022.

Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., and Horwitz, A.R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302, 1704–1709.

Riggs, A.D., and Jones, P.A. (1983). *ADVANCES IN CANCER RESEARCH*. Vol. 40. Academic Press, INC. 111 Fifth Avenue, New York.

Robertson, K.D. (2005). DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 6, 597–610.

Rodríguez, J., Frigola, J., Vendrell, E., Risques, R.-A., Fraga, M.F., Morales, C., Moreno, V., Esteller, M., Capellà, G., Ribas, M., et al. (2006). Chromosomal instability correlates with genome-wide DNA demethylation in human primary colorectal cancers. *Cancer Research* 66, 8462–9468.

Rodríguez, O.C., Schaefer, A.W., Mandato, C.A., Forscher, P., Bement, W.M., and Waterman-Storer, C.M. (2003). Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat. Cell Biol.* 5, 599–609.

Rullo, O.J., and Tsao, B.P. (2013). Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 72 *Suppl* 2, ii56–ii61.

Rutishauser, U. (2008). Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci* 9, 26–35.

Rønn, L.C.B., Hartz, B.P., and Bock, E. (1998). The neural cell adhesion molecule (NCAM) in development and plasticity of the nervous system. *Experimental Gerontology* 33, 853–864.

Rørth, P. (2009). Collective cell migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25, 407–429.

Rørth, P. (2012). Fellow travellers: emergent properties of collective cell migration. *EMBO Reports* 13, 984–991.

## S

Saito, Y., and Jones, P.A. (2006). Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells. *Cc* 5, 2220–2222.

Saitoh, Y., Bruner, J.M., Levin, V.A., and Kyritsis, A.P. (1998). Identification of allelic loss on chromosome arm 6p in human astrocytomas by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Genes Chromosomes Cancer* 22, 165–170.

Sala-Valdés, M., Ailane, N., Greco, C., Rubinstein, E., and Boucheix, C. (2012). Targeting tetraspanins in cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* 16, 985–997.

Sambrook, J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York.

- Sano, S., Takashima, S., Niwa, H., Yokoi, H., Shimada, A., Arenz, A., Wittbrodt, J., and Takeda, H. (2009). Characterization of teleost *Mdga1* using a gene-trap approach in medaka (*Oryzias latipes*). *Genesis* *47*, 505–513.
- Santenard, A., and Torres-Padilla, M.-E. (2009). Epigenetic reprogramming in mammalian reproduction: contribution from histone variants. *Epigenetics* *4*, 80–84.
- Sarma, K., and Reinberg, D. (2005). Histone variants meet their match. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 139–149.
- Sato, N., Maitra, A., Fukushima, N., van Heek, N.T., Matsubayashi, H., Iacobuzio-Donahue, C.A., Rosty, C., and Goggins, M. (2003). Frequent hypomethylation of multiple genes overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Research* *63*, 4158–4166.
- Schachner, M. (1997). Neural recognition molecules and synaptic plasticity. *Current Opinion in Cell Biology.* *9*, 627–634.
- Scheidegger, E.P., Lackie, P.M., Papay, J., and Roth, J. (1994). In vitro and in vivo growth of clonal sublines of human small cell lung carcinoma is modulated by polysialic acid of the neural cell adhesion molecule. *Lab. Invest.* *70*, 95–106.
- Scott, R.W., Hooper, S., Crighton, D., Li, A., König, I., Munro, J., Trivier, E., Wickman, G., Morin, P., Croft, D.R., et al. (2010). LIM kinases are required for invasive path generation by tumor and tumor-associated stromal cells. *The Journal of Cell Biology* *191*, 169–185.
- Seltmann, K., Roth, W., Kröger, C., Loschke, F., Lederer, M., Hüttelmaier, S., and Magin, T.M. (2013). Keratins mediate localization of hemidesmosomes and repress cell motility. *J. Invest. Dermatol.* *133*, 181–190.
- Sharma, A., Heuck, C.J., Fazzari, M.J., Mehta, J., Singhal, S., Grealley, J.M., and Verma, A. (2010a). DNA methylation alterations in multiple myeloma as a model for epigenetic changes in cancer. *WIREs Syst Biol Med* *2*, 654–669.
- Sharma, S., Kelly, T.K., and Jones, P.A. (2010b). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* *31*, 27–36.

- Shaw, R.J., Akufo-Tetteh, E.K., Risk, J.M., Field, J.K., and Liloglou, T. (2006). Methylation enrichment pyrosequencing: combining the specificity of MSP with validation by pyrosequencing. *Nucleic Acids Res.* *34*, e78.
- Shin, M.H., Lee, E.-G., Lee, S.-H., Lee, Y.S., and Son, H. (2002). Neural cell adhesion molecule (NCAM) promotes the differentiation of hippocampal precursor cells to a neuronal lineage, especially to a glutamatergic neural cell type. *Exp. Mol. Med.* *34*, 401–410.
- Shivaswamy, S., Bhinge, A., Zhao, Y., Jones, S., Hirst, M., and Iyer, V.R. (2008). Dynamic remodeling of individual nucleosomes across a eukaryotic genome in response to transcriptional perturbation. *PLoS Biol.* *6*, e65.
- Sidransky, D. (2002). Emerging molecular markers of cancer. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 210–219.
- Smith, C.L., and Peterson, C.L. (2004). ATP-Dependent Chromatin Remodeling. *Current Topics in Developmental Biology.* *65*, 115-148.
- Soker, S., Miao, H.-Q., Nomi, M., Takashima, S., and Klagsbrun, M. (2002). VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *J. Cell. Biochem.* *85*, 357–368.
- Srinivasan, S., Wang, F., Glavas, S., Ott, A., Hofmann, F., Aktories, K., Kalman, D., and Bourne, H.R. (2003). Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis. *The Journal of Cell Biology* *160*, 375–385.
- Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* *403*, 41–45.
- Sutor, B., and Hagerty, T. (2005). Involvement of gap junctions in the development of the neocortex. *Biochim. Biophys. Acta* *1719*, 59–68.
- Suzuki, M.M., and Bird, A. (2008). DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet* *9*, 465–476.

Südhof, T.C. (2008). Neuroligins and neuroligins link synaptic function to cognitive disease. *Nature* 455, 903–911.

## T

Takagi, S., Hirata, T., Agata, K., Mochii, M., Eguchi, G., and Fujisawa, H. (1991). The A5 antigen, a candidate for the neuronal recognition molecule, has homologies to complement components and coagulation factors. *Neuron* 7, 295–307.

Takagi, S., Kasuya, Y., Shimizu, M., Matsuura, T., Tsuboi, M., Kawakami, A., and Fujisawa, H. (1995). Expression of a cell adhesion molecule, neuropilin, in the developing chick nervous system. *Dev. Biol.* 170, 207–222.

Takai, D., and Jones, P.A. (2002). Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *99*, 3740–3745.

Takeda, Y., Kazarov, A.R., Butterfield, C.E., Hopkins, B.D., Benjamin, L.E., Kaipainen, A., and Hemler, M.E. (2007). Deletion of tetraspanin Cd151 results in decreased pathologic angiogenesis in vivo and in vitro. *Blood* 109, 1524–1532.

Takeuchi, A. (2006). Radial Migration of Superficial Layer Cortical Neurons Controlled by Novel Ig Cell Adhesion Molecule MDGA1. *Journal of Neuroscience* 26, 4460–4464.

Takeuchi, A., Hamasaki, T., Litwack, E.D., and O'Leary, D.D.M. (2007). Novel IgCAM, MDGA1, expressed in unique cortical area- and layer-specific patterns and transiently by distinct forebrain populations of Cajal-Retzius neurons. *Cereb. Cortex* 17, 1531–1541.

TEODORIDIS, J., STRATHDEE, G., and BROWN, R. (2004). Epigenetic silencing mediated by CpG island methylation: potential as a therapeutic target and as a biomarker. *Drug Resistance Updates* 7, 267–278.

Testa, J.E., Brooks, P.C., Lin, J.M., and Quigley, J.P. (1999). Eukaryotic expression cloning with an antimetastatic monoclonal antibody identifies a tetraspanin (PETA-3/CD151) as an effector of human tumor cell migration and metastasis. *Cancer Research* 59, 3812–3820.

Thiery, J.P. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 2, 442–454.

Thompson, E.W. (2005). Carcinoma Invasion and Metastasis: A Role for Epithelial-Mesenchymal Transition? *Cancer Research* 65, 5991–5995.

Thompson, M.G., Foley, D.A., and Colley, K.J. (2013). The polysialyltransferases interact with sequences in two domains of the neural cell adhesion molecule to allow its polysialylation. *Journal of Biological Chemistry* 288, 7282–7293.

Tost, J., Dunker, J., and Gut, I.G. (2003). Analysis and quantification of multiple methylation variable positions in CpG islands by Pyrosequencing. *BioTechniques* 35, 152–156.

Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J.G., Baylin, S.B., and Issa, J.P.J. (1999a). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 8681–8686.

Toyota, M., Ahuja, N., Suzuki, H., Itoh, F., Ohe-Toyota, M., Imai, K., Baylin, S.B., and Issa, J.P. (1999b). Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype. *Cancer Research* 59, 5438–5442.

Tsao, B.P. (2004). Update on human systemic lupus erythematosus genetics. *Curr Opin Rheumatol* 16, 513–521.

Turnbull, R.B., Jr, Kyle, K., Watson, F.R., and Spratt, J. (1967). Cancer of the colon: the influence of the no-touch isolation technic on survival rates. *Ann. Surg.* 166, 420-427.

## U

Uhlmann, K., Brinckmann, A., Toliat, M.R., Ritter, H., and Nürnberg, P. (2002). Evaluation of a potential epigenetic biomarker by quantitative methyl-single nucleotide polymorphism analysis. *Electrophoresis* 23, 4072–4079.

Ushijima, T. (2005). Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* 5, 223–231.

Ushijima, T., Watanabe, N., Okochi, E., Kaneda, A., Sugimura, T., and Miyamoto, K. (2003). Fidelity of the methylation pattern and its variation in the genome. *Genome Research* 13, 868–874.

## V

Van der Weyden, L., Arends, M.J., Rust, A.G., Pouligiannis, G., McIntyre, R.E., and Adams, D.J. (2012). Increased tumorigenesis associated with loss of the tumor suppressor gene *Cadm1*. *Mol. Cancer* *11*, 29.

Varoqueaux, F., Jamain, S., and Brose, N. (2004). Neuroligin 2 is exclusively localized to inhibitory synapses. *European Journal of Cell Biology* *83*, 449–456.

Vitorino, P., and Meyer, T. (2008). Modular control of endothelial sheet migration. *Genes Dev.* *22*, 3268–3281.

Vleminckx, K., Vakaet, L., Mareel, M., Fiers, W., and van Roy, F. (1991). Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* *66*, 107–119.

Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* *10*, 789–799.

## W

Walsh, F.S., and Doherty, P. (1997). Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *13*, 425–456.

Wang, X., He, L., Wu, Y.I., Hahn, K.M., and Montell, D.J. (2010). Light-mediated activation reveals a key role for Rac in collective guidance of cell movement in vivo. *Nat. Cell Biol.* *12*, 591–597.

Wang, Y., and Leung, F.C.C. (2004). An evaluation of new criteria for CpG islands in the human genome as gene markers. *Bioinformatics.* *20*, 1170–1177.

Webb, D.J., Parsons, J.T., and Horwitz, A.F. (2002). Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again. *Nat. Cell Biol.* *4*, E97–E100.

Weijer, C.J. (2009). Collective cell migration in development. *Journal of Cell Science* *122*, 3215–3223.

Weissleder, R., and Ntziachristos, V. (2003). Shedding light onto live molecular targets. *Nat Med* *9*, 123–128.

Wędzony, K., Chocyk, A., and Maćkowiak, M. (2013). Potential roles of NCAM/PSA-NCAM proteins in depression and the mechanism of action of antidepressant drugs. *Pharmacol Rep* *65*, 1471–1478.

Wijnhoven, B.P., Dinjens, W.N., and Pignatelli, M. (2000). E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br J Surg* *87*, 992–1005.

Wilson, D.J., Kim, D.S., Clarke, G.A., Marshall-Clarke, S., and Moss, D.J. (1996). A family of glycoproteins (GP55), which inhibit neurite outgrowth, are members of the Ig superfamily and are related to OBCAM, neurotrimin, LAMP and CEPU-1. *Journal of Cell Science* *109* (Pt 13), 3129–3138.

Wysocka, J., Swigut, T., Xiao, H., Milne, T.A., Kwon, S.Y., Landry, J., Kauer, M., Tackett, A.J., Chait, B.T., Badenhorst, P., et al. (2006). A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature* *442*, 86–90.

## Y

Yamada, S., and Nelson, W.J. (2007). Localized zones of Rho and Rac activities drive initiation and expansion of epithelial cell-cell adhesion. *The Journal of Cell Biology* *178*, 517–527.

Yan, J., Zierath, J.R., and Barrès, R. (2011). Evidence for non-CpG methylation in mammals. *Experimental Cell Research* *317*, 2555–2561.

Yang, X.H., Flores, L.M., Li, Q., Zhou, P., Xu, F., Krop, I.E., and Hemler, M.E. (2010). Disruption of Laminin-Integrin-CD151-Focal Adhesion Kinase Axis Sensitizes Breast Cancer Cells to ErbB2 Antagonists. *Cancer Research* *70*, 2256–2263.

Yáñez-Mó, M., Barreiro, O., Gordon-Alonso, M., Sala-Valdés, M., and Sánchez-Madrid, F. (2009). Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends Cell Biol.* *19*, 434–446.

Yoshihara, Y., Kawasaki, M., Tani, A., Tamada, A., Nagata, S., Kagamiyama, H., and Mori, K. (1994). BIG-1: A new TAG-1/F3-related member of the immunoglobulin superfamily with neurite outgrowth-promoting activity. *Neuron* *13*, 415–426.

Yuan, G.-C., Liu, Y.-J., Dion, M.F., Slack, M.D., Wu, L.F., Altschuler, S.J., and Rando, O.J. (2005). Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*. *Science* *309*, 626–630.

## Z

Zhang, L., Luo, J., Wan, P., WU, J., Laski, F., and Chen, J. (2011). Regulation of cofilin phosphorylation and asymmetry in collective cell migration during morphogenesis. *Development* *138*, 455–464.



## **8. RECURSOS ELECTRÓNICOS**

---



- <http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/facs.html>
- [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)
- <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/index.html>
- <http://themedicalbiochemistrypage.org/dna.php>



## SUMMARY

### INTRODUCTION

Identification and characterization of the *MDGA1* gene (MAM Domain containing a Glycosylphosphatidylinositol Anchor 1), originally termed GPIM, was previously performed in our laboratory (Díaz-López et al., 2005). Human MDGA1 (hMDGA1) is a 955-aa glycoprotein (137KDa) attached to the cell membrane by a GPI anchor. Its structure consists of a signal peptide at the N-terminal, followed by six immunoglobulin-like (Ig) domains, one single fibronectin type III (FnIII) domain, a MAM (Meprin, A5 protein, receptor protein-tyrosine phosphatase  $\mu$ ) domain and a cleavage site for GPI located in the C-terminal (De Juan et al., 2002).

MDGA1 has a homologous protein called MDGA2 (MAM Domain containing a Glycosylphosphatidylinositol Anchor 2), a 956-aa glycoprotein (135KDa) with the same structure as MDGA1 and attached to the cell membrane by a GPI anchor (Litwack et al., 2004). Previous laboratory data have shown that both proteins, MDGA1 and MDGA2, are localized in lipid rafts (Díaz-López et al., 2005; Díaz-López, 2007), both are susceptible to be cleaved by phosphatidylinositol specific phospholipase C (PI-PLC) (Díaz-López et al., 2005; Litwack et al., 2004) and, similar to other proteins sorted via the secretory pathway, hMDGA1 and hMDGA2 undergoes post-translational modification consisting of N-glycosylation (Díaz-López et al., 2005; Díaz-López, 2007).

MDGA proteins have been postulated as a member of the immunoglobulin superfamily (IgSF), the largest class of Cell Adhesion Molecules (CAMs), containing both a MAM domain and a GPI anchored {DiazLopez:2005jd, Litwack:2004kz, DeJuan:2002dp, Fujimura:2006io, Takeuchi:2007ku, Takeuchi:2006cc}. These structural features make them a unique proteins as they are the first GPI-linked IgSF molecules containing a MAM domain described to our knowledge {DiazLopez:2010ib}.

On the other hand, MDGA1 and MDGA2 are expressed in multiple human tissues such as brain, heart, skeleton muscle and placenta (De Juan et al., 2002). However, The expression levels of MDGA2 are lower than MDGA1 in adult brain (Díaz-López, 2007). In rat, MDGA1 and MDGA2 are exclusively expressed in the peripheral and central nervous system and have different localization; MDGA1 is expressed at high levels in developing interneurons while MDGA2 is predominantly expressed in spinal motoneurons and some subpopulations of spinal interneurons (Litwack et al., 2004). In contrast to the rat counterpart, expression of chicken MDGA1 in commissural interneurons is rather low and can be observed just at later stages, raising the question of whether some functions of the mammalian MDGA1 can be covered by the MDGA2 homolog in chicken (Fujimura et al., 2006). Moreover, recent studies have demonstrated the implication of MDGA1 and MDGA2 in different diseases such as autism (Pettem et al., 2013), bipolar disorders, schizophrenia (Li et al., 2010), systemic lupus erythematosus {Hellquist:2009fy}, and sexual dysfunction (Kurose et al., 2012).

Previous laboratory data have shown that MDGA1 expressed in MDCK cells increases migration and cell-cell adhesion and decreases adhesion to extracellular matrix proteins {DiazLopez:2010ib}. Moreover, preliminary data showed that MDGA proteins seem to be downregulated in cancer {DiazLopez:2007wy}.

Taking into account all the data mentioned above, our aims in the present work are:

- Investigate MDGA2 implication in migration and cell adhesion.
- Study MDGA1 and MDGA2 implication in cellular invasion.
- Analyse the *MDGA1* and *MDGA2* expression in different human tumoral pathologies by Quantitative Real-Time PCR and immunohistochemistry.
- Investigate the methylation status of *MDGA1* and *MDGA2* gene promoters.

## **MATERIAL AND METHODS**

pFLAG fusion proteins were generated previously in our laboratory. pFLAG expression vector without coding regions served as an empty vector control (EV). Then MDCK cells were transfected using Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent (Invitrogen™ Life Technologies) according to the manufacturer's instructions, and selected by adding 750 µg/ml of geneticine (G418) over 3 weeks. All resistant clones were collected in order to obtain a polyclonal stable cell lines (MDGA1, MDGA2, IgGPI or MAMGPI MDCK cells). In all cases, in-frame fusion proteins generated were confirmed by sequencing, and their expression was verified by western blotting and immunofluorescence.

Cell migration capacity was analysed in MDGA1 and MDGA2 stable cell lines by wound healing assay (using a time-lapse microscopy at time intervals of 10 minutes for up to 15 hours) as well as by transwell chambers (Becton Dickinson; cells that had migrated to the lower chamber were fixed with methanol, stained with crystal violet (0.2% in 2% ethanol) and counted in an optical microscope). Moreover, invasion assays were performed in MDGA1 and MDGA2 stable cell lines by using BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chambers (Becton Dickinson). Cells were then treated as in migration assays and counted in an optical microscope. Proliferation assays were developed in order to confirm that the differences observed in migration and invasion assays were due to the expression of MDGA1 or MDGA2 proteins.

Cell adhesion to extracellular matrix proteins was studied by using Cytoselec cell adhesion kit (CytoSelect™, Cell Biolabs) that contains 48-well plates coated with fibronectin, laminin-I, collagen-I, collagen-IV or fibrinogen. Cell adhesion was quantified by measuring the absorbance at a wavelength of 560 nm in a PowerWave XS microplate reader (BioTek). On the other hand, cell to cell adhesion assays were performed by using VIBRANT® Cell Adhesion Assay (Molecular Probes) following the manufacturer's instructions. Relative fluorescence intensity of the adherent calcein-labeled cells was measured in a fluorescence microplate reader (FL600 BioTek), using a standard fluorescein filter with an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm. Results were expressed as a percentage of adhesion relative to control cells.

In relation to the analysis of the *MDGA1* and *MDGA2* expression in cancer, 88 primary non-small cell-lung cancers (NSCLC), 49 primary colorectal cancers (CRC), 56 primary gastric cancers (GC) and 25 primary esophageal cancers (EC), and their corresponding non tumoral control tissue samples were obtained from patients who underwent surgery at San Carlos Hospital of Madrid, Spain. All the patients included in the study were collected without any selection of age, gender or tumour stage and any of them received a previous treatment of chemotherapy or radiotherapy before diagnosis. The median follow-up period for patients was 5 years.

Expression levels of *MDGA1* and *MDGA2* were analysed by Quantitative real-time PCR using Taqman® probes (FAM™ dye-labelled Taqman® MGB probes; Applied Biosystem, USA), following the manufacturer's instructions. The comparative threshold cycle (Ct) method was used to calculate the relative expression of those genes. The quantification of the target genes' expression was calculated by normalizing its Ct values with the expression of an endogenous gene *GAPDH*, which was used as an inner control. Moreover, the expression of the target genes was normalized with respect to its expression in a pool of no tumoral samples, which was used as a calibrator. Finally, the amount of target genes was expressed as  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Relative Quantification, RQ).  $\Delta Ct = Ct_{(target\ gene)} - Ct_{(GAPDH)}$ ;  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(for\ any\ sample)} - \Delta Ct_{(for\ the\ calibrator)}$ .

Immunohistochemistry was used to investigate the expression of MDGA1 and MDGA2 in tumoral samples compared with no tumoral samples. Immunohistochemistry staining was performed at Citopath Anatomopathology laboratories using an Autostainerlink 48 (Dako). GP854 (Eurogentec) and anti-MDGA2 (R&D Systems) specific antibodies against MDGA1 and MDGA2 respectively were used.

The methylation status of the *MDGA1* and *MDGA2* gene promoters was analysed firstly by qRT-PCR in HeLa cells treated over 4 days with 5'-AZA-2'-deoxycitidine. Afterwards, the methylation status of both promoters were analysed by Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction (MSP) in CRC.

Statistical analysis was performed using IBM SPSS (Statistical Package for social science) Statistics 19 software. A p-value of  $< 0.05$  was considered a statistically significant difference.

## **RESULTS**

The migration capacity of cells was analysed firstly by wound healing assay. The distance advanced by cells to close the wound was measured at 3, 6, 9 and 15 hours after scratching (time 0). Cells which stably express MDGA1 show a migration increase of 40% ( $p=0.020$ ) with respect to the control cells at 3 hours, 56% ( $p=0.004$ ) at 6 hours and 88% at 9 hours ( $p<0.001$ ) respectively after scratching. These cells are capable of closing the wound in 9 hours. On the other hand, cells expressing MDGA2 show a significantly higher migration capacity in comparison to control cells from 15 hours after scratching, showing an increase of 19% ( $p=0.003$ ). Transwell chamber migration results showed statistically significant differences in migration capacity between cells stably expressing MDGA1 ( $107\pm 13$ ) or MDGA2 ( $20\pm 2$ ), compared to control cells ( $5\pm 1$ ), after 24 hours of migration ( $p<0.001$  in both cases; mean  $\pm$  typical error).

Invasion capacity of cells expressing MDGA1 ( $17.7\pm 2$ ) or MDGA2 ( $3.1\pm 0.6$ ) was significantly higher than control cells ( $0.4\pm 0.1$ ) in both cases ( $p<0.001$  mean  $\pm$  typical error). Statistical analysis indicated that there is no significant difference in the proliferation of cells expressing MDGA1 or MDGA2 compared to control cells ( $p>0.1$ ).

Concerning cell adhesion to extracellular matrix, cells expressing MDGA2 showed an increase of 22.7% in adhesion to fibronectin and an increase of 16.6% and 18.75% in adhesion to laminin I and collagen I respectively. Conversely, IgGPI showed similar adhesion values than control cells to extracellular matrix proteins. Surprisingly, cells expressing MAMGPI increases the adhesion to cell matrix proteins more than the full-length protein: 57.7% to fibrinogen and 84.6% to laminin I. However, the statistical analysis of the results doesn't reveal significant differences with respect to control cells.

The effect of MDGA1, MDGA2, MAMGPI and IgGPI on cell-cell adhesion was also investigated. Cell adhesion capacity was significantly increased in cells expressing MDGA1 (4.35 fold,  $p=0.004$ ) or MDGA2 (2.5 fold,  $p=0.015$ ) as compared to control cells when MDGA1 or MDGA2 respectively monolayer was used. Similar results were obtained when using a control cells monolayer. When MAMGPI or IgGPI expressing cells were used in adhesion assays, we also observed an adhesion increase compared to control cells with the two-monolayer substrates assayed.

Expression of *MDGA1* and *MDGA2* genes was analysed by qRT-PCR in several human tumoral pathologies. A total of 88 NSCLC, 49 CRC, 56 GC and 25 EC patients were analysed. The results reveal that *MDGA1* was downregulated in 72% of NSCLC, 63% of CRC, 46% of GC and 40% of EC patients, while *MDGA2* was downregulated in 74% of NSCLC, 86% CRC, 86% GC and 64% of EC patients. In addition, if we consider both genes together, we could observe that in a high percentage of patients both genes appeared downregulated simultaneously: 52% of NSCLC, 59% of CRC, 46% of GC and 32% of EC patients. However, no statistical differences were observed among the *MDGA1* and/or *MDGA2* expression and the clinical-pathological characteristics of the tumours included in the study. On the other hand, it seems that *MDGA1* and *MDGA2* expression levels could have a prognostic value. In this way, a markedly downregulation of these genes increases the disease-free interval.

In order to confirm that this transcriptional downregulation could be reflected in a downregulation of the protein, an immunohistochemistry study was performed. In this case, we compared the expression of each gene in tumoral and no tumoral-paired samples of each patient. The results showed a down-regulation of both genes in all the pathologies studied, confirming the results obtained by qRT-PCR.

Then, the methylation status of the *MDGA1* and *MDGA2* gene promoter was analysed in HeLa cells by using a demethylation agent (5'-AZA-2'-deoxycitidine). HeLa cells were treated over 4 days with 5'-AZA-2'-deoxycitidine and expression of *MDGA1* and *MDGA2* was analysed by qRT-PCR each 24 hours. The results showed that MDGAs expression were rising over the treatment of HeLa cells with the demethylation agent. This

means that probably *MDGA1* and *MDGA2* were regulated by methylation. Next, we investigated the methylation status of the promoters of *MDGA1* and *MDGA2* in human CRC tumours by MSP. However no clear results were obtained. Due to the design of the primers is a clue step in the analysis of the methylation status of the gene promoter, at the moment we are designing new primers in order to be possible this study.

## **CONCLUSIONS**

*In vitro* expression of MDGA proteins increase the migration and invasion capacity of MDCK cells. This fact could correspond *in vivo* with a higher aggressiveness of the cancer disease. Thus, a downregulation of MDGA1 or MDGA2 expression could involve a decrease in the migratory and invasive capacity of tumoral cells. Altogether, could explain the better prognostic values observed in those patients who present lower expression levels of MDGA1 or MDGA2. This downregulation of MDGA1 or MDGA2 could be regulated by methylation of their gene promoter regions.

## **REFERENCES**

De Juan, C., Iniesta, P., González-Quevedo, R., Morán, A., Sánchez-Pernaute, A., Torres, A.J., Balibrea, J.L., Díaz-Rubio, E., Cruces, J., and Benito, M. (2002). Genomic organization of a novel glycosylphosphatidylinositol MAM gene expressed in human tissues and tumors. *Oncogene 21*, 3089–3094.

Díaz-López, A., Rivas, C., Iniesta, P., Morán, A., García-Aranda, C., Megías, D., Sánchez-Pernaute, A., Torres, A., Díaz-Rubio, E., Benito, M., et al. (2005). Characterization of MDGA1, a novel human glycosylphosphatidylinositol-anchored protein localized in lipid rafts. *Experimental Cell Research 307*, 91–99.

Díaz-López, A. (2007). Caracterización de las proteínas noveles humanas MDGA1 y MDGA2. Implicación de MDGA1 en migración y adhesión celular. Universidad Complutense de Madrid (UCM).

Díaz-López, A., Iniesta, P., Morán, A., Ortega, P., Fernández-Marcelo, T., Sánchez-Pernaute, A., Torres, A.J., Benito, M., and De Juan, C. (2010). Expression of Human MDGA1 Increases Cell Motility and Cell-Cell Adhesion and Reduces Adhesion to Extracellular Matrix Proteins in MDCK Cells. *Cancer Microenvironment* 4, 23–32.

Fujimura, Y., Iwashita, M., Matsuzaki, F., and Yamamoto, T. (2006). MDGA1, an IgSF molecule containing a MAM domain, heterophilically associates with axon- and muscle-associated binding partners through distinct structural domains. *Brain Research* 1101, 12–19.

Kurose, K., Hiratsuka, K., Ishiwata, K., Nishikawa, J., Nonen, S., Azuma, J., Kato, M., Wakeno, M., Okugawa, G., Kinoshita, T., et al. (2012). Genome-wide association study of SSRI/SNRI-induced sexual dysfunction in a Japanese cohort with major depression. *Psychiatry Research* 1–6. doi:10.1016/j.psychres.2012.01.023

Li, J., Liu, J., Feng, G., Li, T., Zhao, Q., Li, Y., Hu, Z., Zheng, L., Zeng, Z., Wang, T., et al. (2010). The MDGA1 gene confers risk to schizophrenia and bipolar disorder. *Schizophrenia Research* 1–7. doi:10.1016/j.schres.2010.11.002

Litwack, E.D., Babey, R., Buser, R., Gesemann, M., and O'Leary, D.D.M. (2004). Identification and characterization of two novel brain-derived immunoglobulin superfamily members with a unique structural organization. *Molecular and Cellular Neuroscience* 25, 263–274.

Pettem, K.L., Yokomaku, D., Takahashi, H., Ge, Y., and Craig, A.M. (2013). Interaction between autism-linked MDGAs and neuroligins suppresses inhibitory synapse development. *The Journal of Cell Biology* 200, 321–336.