

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



“CAVEOLINA-1 FAVORECE LA ACTIVACIÓN DE RAB5 PROMOViendo LA MIGRACIÓN Y LA ACTIVACIÓN DEL EJE P85 α /TIAM1/RAC-1 EN CÉLULAS DE CÁNCER METASTÁSICO Y EN UN MODELO DE METÁSTASIS *IN VIVO* EN RATONES C57BL/6”

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Doctor en Bioquímica por:

JORGE ESTEBAN DÍAZ FUENTES

Directores de Tesis

Dr. Andrew Quest

Dr. Vicente Torres

SANTIAGO - CHILE 2015

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato :

JORGE ESTEBAN DÍAZ FUENTES

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Bioquímica , en el examen de defensa de Tesis rendido el día _____

Directores de Tesis:

Dr. Andrew Quest _____

Dr. Vicente Torres _____

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Sergio Lavandero (Presidente) _____

Dra. Francisca Bronfman _____

Dra. Roxana Pincheira _____

Dr. Juan Fernández _____

“si hablo así se debe al disciplinamiento residual que hace identificarme con los historiadores de la ciencia y también a las muchas horas pasadas, de joven, mirando al microscopio en una especie de momento disciplinario poético, pre-edípico y modernista, cuando las células parecían ser células y, los organismos, organismos”

Donna Haraway

Ciencia, Cyborgs y Mujeres: la reinención de la naturaleza.

Esta Tesis de Doctorado se realizó en el Laboratorio de Comunicaciones Celulares del Centro de Estudios Moleculares de la Célula (CEMC), Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile y en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Esta investigación se desarrolló gracias a los siguientes financiamientos:

Financiamiento otorgado a Andrew F. G. Quest.

- CONICYT-FONDAP 15130011
- Fondecyt 1130250
- Anillo ACT 1111

Financiamiento otorgado a Vicente Torres.

- Fondecyt 1140907
- Fondecyt 11100287
- Conicyt 790990021 “Inserción de nuevos investigadores en la academia”

Financiamiento otorgado a Jorge Díaz.

- Beca CONICYT de Estudios de Doctorado Nacional período 2011-2014.
- Beca CONICYT de Apoyo a la realización de Tesis Doctoral, período 2013-2014.
- Beca CONICYT de Término de Tesis, año 2014.
- Beca CONICYT para Asistencia a Congresos Nacionales, años 2011-2013.
- Beca MECESUP UCH 0717 para financiar estadías cortas en el extranjero.
- Beca CONICYT para eventos y cursos cortos en el extranjero 2014.

PUBLICACIONES OBTENIDAS DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS

Rab5 is required for Caveolin-1-enhanced Rac1 activation, migration and invasion of metastatic cancer cells.

Jorge Díaz, Pablo Mendoza, Rina Ortiz, Natalia Díaz, Lisette Leyton, Dwayne Stupack, Andrew F. G. Quest and Vicente A. Torres.

J Cell Sci. 2014 Jun 1;127(Pt 11):2401-6.

Rab5 activation promotes focal adhesion disassembly, migration and invasiveness in tumor cells.

Pablo Mendoza, Rina Ortiz, **Jorge Díaz**, Andrew F. G. Quest, Lisette Leyton, Dwayne Stupack and Vicente A. Torres.

J Cell Sci. 2013 Sep 1;126(Pt 17):3835-47.

E-cadherin determines Caveolin-1 tumor suppression or metastasis enhancing function in melanoma cells.

Lobos-González L, Aguilar L, **Díaz J**, Diaz N, Urra H, Torres VA, Silva V, Fitzpatrick C, Lladser A, Hoek KS, Leyton L, Quest AF.

Pigment Cell Melanoma Res. 2013 Jul;26(4):555-70.

A novel caveolin-1/p85 α /Rab5/Tiam1/Rac1 signaling axis in tumor cell migration and invasion.

Jorge Díaz, Pablo Mendoza, Patricio Silva, Andrew FG Quest & Vicente A Torres.

Communicative & Integrative Biology, 2014. 7:5, 1-3,

DOI: 10.4161/19420889.2014.972850

(Addendum report)

Molecular insights to a novel Caveolin-1-Rab5–Rac-1 signaling pathway important for metastatic cancer cell migration and invasion.

Jorge Díaz, Natalia Díaz, Lisette Leyton, Vicente A. Torres, and Andrew F.G. Quest.

Cancer Cell & Microenvironment 2014; 1: e332. (Brief review)

Caveolin-1 in Cell Migration and Metastasis.

S. Nunez-Wehinger, R.J. Ortiz, N. Diaz, **J. Diaz**, L. Lobos-Gonzalez and A.F.G. Quest
Curr Mol Med. 2014 Feb;14(2):255-74.

(Review)

On the Role of Rab5 in Cell Migration.

P. Mendoza, **J. Diaz** and V.A. Torres
Curr Mol Med. 2014 Feb;14(2):235-45.

(Review)

Rab5 activation as a tumor cell migration switch.

Pablo Mendoza, **Jorge Díaz**, Patricio Silva, Vicente A Torres
Small GTPases. 2014 Mar 20;5(1).

(Comentario)

Progesterone promotes focal adhesion formation and migration in breast cancer cells through induction of protease-activated receptor-1.

Diaz J, Aranda E, Henriquez S, Quezada M, Espinoza E, Bravo ML, Oliva B, Lange S, Villalon M, Jones M, Brosens JJ, Kato S, Cuello MA, Knutson TP, Lange CA, Leyton L, Owen GI.

J Endocrinol. 2012 Aug;214(2):165-75.

TRABAJOS EN REVISIÓN

ECM-specific Caveolin-1 phosphorylation on tyrosine 14 is linked to augmented melanoma cell migration, invasion and metastasis.

Rina Ortiz, Areli Cárdenas, Natalia Díaz, **Jorge Díaz**, Claudia Calderón, María Inés Díaz, Ellen Otte, Justin Cooper-White, Vicente Torres, Lisette Leyton, Andrew F.G. Quest.

(Enviado a Pigment Cell & Melanoma Research, enero 2015)

MANUSCRITOS EN PREPARACIÓN

SH2-independent recruitment of p85 α to Cav1 activates in a PI3K independent fashion the rab5-rac1 axis leading to metastasis *in vivo*.

Jorge Díaz, Pablo Mendoza, Rina Ortiz, Natalia Díaz, Lisette Leyton, Dwayne Stupack, Andrew F. G Quest. and Vicente A. Torres.

Down-regulation of Rab5 decreases characteristics associated with maintenance of cell transformation.

Patricio Silva, Nicolás Soto, **Jorge Díaz**, Pablo Mendoza, Natalia Díaz, Andrew F.G. Quest and Vicente A. Torres.

Anti-neoplastic drugs at sub-lethal doses augment caveolin-1 expression and caveolin-1 dependent migration and invasión of tumor cancer cells.

Díaz-Valdivia, Calderón, C., **Díaz, J.**, Maldonado, H., Castillo, J., Leyton, L., Torres, V., Quest, AFG.

Enhanced caveolin-1 expression favors migration, anchorage-independent growth and invasion of endometrial adenocarcinoma cells.

Natalia Díaz, Denisse Bravo, Hernán Huerta, Claudia Calderón, **Jorge Díaz**, Soledad Henríquez, Fernando Gabler, Margarita Vega, Gareth I. Owen, Vicente Torres, Lisette Leyton, Andrew F.G. Quest.

PREMIOS Y RECONOCIMIENTOS OBTENIDOS DURANTE EL TRANCURSO DE LA TESIS

Noviembre 2011

Segundo Lugar en la categoría Panel

Premio entregado a los mejores alumnos de Doctorado en el área de Biología Celular y Biotecnología

XXV Annual Meeting of the Society of Biology Cellular Chile

Noviembre 1-5, 2011, Puerto Varas – Chile.

Octubre 2012

Primer Lugar en la categoría Panel

Premio entregado a los mejores alumnos de Doctorado en el área de Biología Celular y Biotecnología XXVI Annual Meeting of the Society of Biology Cellular Chile Octubre, 23-27, 2012, Puerto Varas - Chile.

Julio 2013

Elegido el postulante a la Medalla Herman Niemayer por la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que entrega la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile

Noviembre 2014

Primer Lugar Unidad de Investigación para alumnos de Medicina segundo semestre 2014.

CONGRESOS INTERNACIONALES

International Meeting Building the Cell. French Society for Cell Biology (SBCF).
2014 París, France.

Caveolin-1 promotes migration and invasion of metastatic cancer cells via a novel Rab5/Tiam1/Rac1 signalling axis.

Jorge Díaz, Pablo Mendoza, Lisette Leyton, Andrew F.G. Quest, Vicente A.Torres.

Current advances in membrane trafficking: Implications for polarity and diseases. European Molecular Biology Organization (EMBO) Workshop.

2014 Puerto Natales, Chile.

Rab5 activation is required for Caveolin-1 to promote migration, invasion and Rac1 activation in metastatic cancer cells

Jorge Díaz, Pablo Mendoza, Lisette Leyton, Andrew F.G. Quest, Vicente A.Torres.

American Society for Cell Biology, International Federation for Cell Biology (ASCB/ifcb) Meeting.

2014 Filadelfia, USA.

Anti-neoplastic drugs at sub-lethal doses augment caveolin-1 expression and caveolin-1 dependent migration and invasión of tumor cancer cells.

Díaz-Valdivia, Calderón, C., Díaz, J., Maldonado, H., Castillo, J., Leyton, L., Torres, V., Quest, AFG.

Panamerican Asociation of Biochemistry and Molecular Biology (PABMB)

2013, Puerto Varas, Chile.

Caveolin-1 promotes migration and invasion of metastatic cancer cells via a novel Rab5-Rac1 signalling axis.

Jorge Díaz, Pablo Mendoza, Lisette Leyton, Andrew F.G. Quest, Vicente A.Torres.

Annual Meeting of American Society For Cell Biology (ASCB).

2009, San Francisco, USA.

E-cadherin is a molecular switch for Caveolin-1 function in melanoma cells that synergizes in tumor suppression and blocks Caveolin-1- enhanced metástasis.

L Lobos-González, L Aguilar, J Díaz, N Diaz, H Urra, V Silva, C Fitzpatrick, A Lladser, K.S. Hoek, L Leyton, AFG Quest

CONGRESOS NACIONALES

Chilean Society for Cell Biology Meeting XXV Sociedad de Biología Celular (SBCCH).

2011, Puerto Varas, Chile.

Rab5 activation is required for Caveolin-1 enhanced tumor cell migration.

Jorge Díaz, Lisette Leyton, Andrew F.G. Quest, Vicente Torres.

Chilean Society for Cell Biology Meeting XXVI Sociedad de Biología Celular (SBCCH).

2012, Puerto Varas, Chile.

Rab5 activation is required for Caveolin-1 mediated cell migration, Rac1 activation and invasion of cancer cells.

Jorge Díaz, Pablo Mendoza, Lisette Leyton, Andrew F.G. Quest, Vicente Torres.

TRABAJO DOCENTE

Segundo semestre 2014.

Tutor de Unidad de Investigación para Alumnos de Medicina, área cáncer e inmunología. Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

PASANTÍA INTERNACIONAL

Pasantía Doctoral Internacional, Moore Cancer Center.

University of California, San Diego (UCSD)

Estado de California, Estados Unidos.

Laboratorio Dr. Dwayne Stupack

Noviembre 2012-Mayo 2013.

AGRADECIMIENTOS

Los agradecimientos son siempre un territorio en disputa. A quién agradecer, por qué hacerlo, a quién mejor olvidar. La verdad es que es mucha la gente a la que debo agradecer su compañía y apoyo en estos años de doctorado. Podría llenar una página o dos o tres con los nombres de quienes conocí y recibí su cariño y apoyo. La vida en la ciencia es compleja, requiere de disciplina, constancia y fuerza ante la crítica. Siempre he considerado que la crítica, inclusive en el peor de los casos, es positiva. Te ayuda a ver aquello que no has percibido, a cambiar una actitud, una letra, un color, una forma de explicar.

Quiero agradecer la gran dedicación, cercanía y disponibilidad en este tiempo a Vicente Torres, a quien debo gran parte de los logros que obtuve durante estos años de doctorado pues me enseñó sobre la constancia en el trabajo y la importancia en los detalles.

Al Dr. Andrew Quest por ayudarme a entender la rigurosidad de la investigación, por su apoyo constante y severo ojo crítico. Me entregó muchas herramientas y experiencias que de seguro ayudarán en mi desempeño científico. A la Doctora Lisette Leyton, gracias por sus siempre agudos comentarios y disposición.

Agradecer a todos mis compañeros del laboratorio de comunicaciones celulares de la facultad de medicina. Especialmente al “team de migración” con quienes estuvimos tardes enteras tratando de sacar un experimento y con quienes tomé más de algún té conversando de las vicisitudes de la vida, por la confianza, las opiniones, los encuentros y desencuentros: en mi corazón disidente, Natalia Díaz, Lorena Lobos, Rina Ortiz, América Campos, Areli Cárdenas, Pamela Contreras, Valeska Cifuentes y Samuel Martínez. También a los compañeros del laboratorio de biología celular y molecular de la facultad de odontología con quienes tuve una grata y muy productiva compañía en especial a Pablo Mendoza y Patricio Silva.

Gracias a Lillian Corona, por todos sus consejos, conversaciones y la gran ayuda y disposición que siempre tuvo en los momentos complicados.

A Isabell Tanjoni, Jamie Alexandre y Sussie Morris tres amorosos amigos que conocí en San Diego, California. Mis agradecimientos por su hospitalidad y ayuda en esos meses de pasantía.

A mi familia, mi padre Jorge Luis Díaz Clavería, mi madre Leyla Fuentes Hernández y mis hermanas Sofía Díaz Fuentes y Leyla Paulina Díaz Fuentes quienes están aquí conmigo en esta tesis doctoral. Gracias por su cariño y comprensión.

A mis amigos y amigas de la vida y las letras, por las noches compartidas y las que no. A Cristeva, quién le robó el nombre a una feminista para quedárselo para siempre.

Finalmente, agradezco infinitamente el haber podido realizar un Doctorado en Bioquímica en un país donde la educación es aún un privilegio.

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	11
INDICE GENERAL	12
ABREVIATURAS	18
RESUMEN	19
SUMMARY	21

1. INTRODUCCIÓN

A. Cáncer.....	24
B. Migración celular y cáncer.....	25
C. Caveolina-1.....	27
D. Caveolina-1 en la migración celular y cáncer.....	29
E. Caveolina-1 y GTPasas.....	33
F. Caveolina-1 y Rab5.....	35
G. Rab5 y migración celular.....	36
H. P85 α , migración celular y Caveolina-1.....	37
I. Activación del eje Tiam1/Rac-1 por Rab5.....	39

RESUMEN DE LOS ANTECEDENTES	43
--	----

HIPÓTESIS	44
------------------------	----

OBJETIVO GENERAL	44
-------------------------------	----

OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
------------------------------------	----

2. METODOLOGÍA

A. Líneas Celulares	46
B. Materiales.....	48
C. Western Blot.....	49
D. Ensayo de Precipitación por Afinidad (<i>Pull-Down</i>)	52

E. Ensayo de migración por herida.....	53
F. Ensayo de migración en cámara Boyden (<i>Transwell</i>)	54
G. Ensayo de invasión en matrigel.....	54
H. Ensayo de proliferación (MTS)	55
I. Inmunoprecipitación.....	55
J. Ensayos de metástasis en ratones C57BL/6.....	56
K. Inmunofluorescencia.....	56
L. Análisis de Imágenes.....	57
LL. Co-localización.....	57
M. Medición tamaño de endosomas.....	58
N. Análisis estadístico.....	58

3. RESULTADOS

SECCION 1: CAVEOLINA-1 PROMUEVE LA ACTIVACIÓN DE RAB5 DEPENDIENTE DE p85 α EN CÉLULAS METASTÁSICAS

A. Selección de las líneas celulares metastásicas.....	61
B. Niveles de Caveolina-1 y Rab5 en células B16-F10, HT-29(US) y MDA-MB-231.....	64
C. Caveolina-1 promueve la activación de Rab5 en las líneas celulares metastásicas.....	67
D. Caveolina-1 promueve el aumento en el tamaño de los endosomas tempranos.....	69
E. Caveolina-1 promueve la activación de Rab5 a través del reclutamiento de p85 α	73
F. La expresión de p85 α disminuye la activación de Rab5 por Caveolina-1.....	75
G. Caveolina-1 promueve la activación de Rab5 de manera independiente de la actividad catalítica de PI3K.....	78
H. Caveolina-1 se une a los dos dominios SH2 de p85 α independientemente de su fosforilación en tirosina 14.....	80

SECCION 2: RAB5 ES NECESARIA PARA LA ACTIVACIÓN DE RAC-1 Y LA MIGRACIÓN CELULAR INDUCIDA POR CAVEOLINA-1

A. Silenciamiento en los niveles de Rab5.....	85
---	----

B. Rab5 es necesaria para que Caveolina-1 promueva la migración.....	87
C. La activación de Rac-1 inducida por Caveolina-1 requiere de la presencia de Rab5.....	88
D. Tiam1 es un regulador en el circuito de activación Cav1→Rab5→Rac-1.....	89

SECCION 3: CAVEOLINA-1 PROMUEVE LA INVASIÓN CELULAR Y LA METÁSTASIS *IN VIVO* DE MANERA DEPENDIENTE DE RAB5, P85α Y RAC-1

A. Caveolina-1 requiere de Rab5 para aumentar la invasión celular.....	97
B. Caveolina-1 requiere de Rab5 para promover metástasis <i>in vivo</i>	97
C. La expresión de p85α disminuye la metástasis <i>in vivo</i> promovida por Caveolina-1.....	102
D. La expresión de la mutante Rac S17N disminuye la metástasis <i>in vivo</i> promovida por Caveolina-1.....	104

CONCLUSIONES SECCIÓN 1.....	107
------------------------------------	------------

CONCLUSIONES SECCIÓN 2.....	108
------------------------------------	------------

CONCLUSIONES SECCIÓN 3.....	108
------------------------------------	------------

4. DISCUSIÓN

A. Caveolina-1 y su rol promotor de metástasis.....	110
B. Conexiones y consecuencias de la relación Caveolina-1 y Rab5.....	113
C. Eje Caveolina-1/p85α/Rab5/Tiam1/Rac-1 en los procesos que promueven migración y metástasis.....	116
D. Otra conexión: Caveolina-1 y Rab11.....	124
E. Importancia <i>in vivo</i> del eje Caveolina-1/p85α/Rab5/Tiam1/Rac-1.....	124
F. Rab5 como potencial blanco terapéutico en cancer.....	126
G. Proyección clínica.....	128

5. CONCLUSIÓN GENERAL.....	131
-----------------------------------	------------

6. ANEXOS.....	132
-----------------------	------------

7. BIBLIOGRAFÍA.....	135
-----------------------------	------------

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1 Estructura de Caveolina-1 y su anclaje a la membrana.	28
Figura 2 Niveles de Caveolina-1 durante la progresión del cáncer.	30
Figura 3 Resumen esquemático de la posible participación de Caveolina-1 en diferentes aspectos de la migración.....	32
Figura 4 Caveolina-1 activa a Rac-1 promoviendo la migración celular.....	35
Figura 5 p85 α y su posible interacción con Y14-Caveolina-1 y Rab5.	39
Figura 6 Rab5 está involucrada en migración celular mediante la activación de Rac-1.....	41
Figura 7 Caveolina-1 activa al eje p85 α /Rab5/Tiam1/Rac-1 aumentando la migración e invasión celular. Vía de activación propuesta.....	42
Figura 8 Caveolina-1 aumenta la migración en células HT-29(US) pero no en células HT-29 (ATCC).....	63
Figura 9 Expresión comparativa de Rab5 en líneas celulares de cáncer con alto y bajo potencial metastásico.	65
Figura 10 Niveles de Caveolina-1 y Rab5 en células HT-29 (US), B16-F10 y MDA-MB-231.....	66
Figura 11 Caveolina-1 activa a Rab5 en las líneas celulares HT-29(US), B16-F10 y MDA-MB-231.....	68
Figura 12 Caveolina-1 promueve un aumento en el tamaño de endosomas tempranos.....	70
Figura 13 Caveolina-1 no promueve la estabilización de Rab5 en endosomas tempranos.	71
Figura 14 Caveolina-1 co-inmunoprecipita con p85 α en células HT-29 (US) y B16-F10.	74
Figura 15 La expresión del Rab-GAP p85a disminuye la activación de Rab5 por Caveolina-1 en células B16-F10.....	76

Figura 16	
La expresión de p85a disminuye la migración celular inducida por Caveolina-1 en células HT-29(US) y MDA-MB-231.....	77
Figura 17	
Esquema-resumen de los resultados obtenidos en la Sección 1.....	78
Figura 18	
Esquema estrategia experimental.....	79
Figura 19	
Caveolina-1 promueve la activación de Rab5 en un mecanismo independiente de la actividad catalítica de PI3K.....	80
Figura 20	
Caveolina-1 se une a los dos dominios SH2 de p85α independiente de su fosforilación en tirosina 14.....	82
Figura 21	
Caveolina-1 activa parcialmente a Rab5 en presencia del inhibidor PP2 y con una mutante no fosforilable en tirosina14.....	83
Figura 22	
Obtención de sublíneas transfectadas con Caveolina-1 y silenciamiento de Rab5 endógeno mediante shRNA.....	86
Figura 23	
El silenciamiento de Rab5 reduce significativamente la migración inducida por Caveolina-1 en células HT-29(US) y B16-F10.	87
Figura 24	
La activación de Rac1 inducida por Caveolina-1 requiere de la presencia de Rab5.....	89
Figura 25	
La inhibición farmacológica de Tiam1 inhibe la activación de Rac1 y la migración celular promovida por Caveolina-1.....	90
Figura 26	
Caveolina-1 promueve el reclutamiento de Tiam1 a endosomas tempranos.	92
Figura 27	
Tiam1 es requerido por Caveolina-1 y Rab5 para promover la migración.....	94
Figura 28	
Esquema-resumen de los resultados obtenidos en la Sección 2.....	95
Figura 29	
Caveolina-1 requiere de Rab5 para promover la capacidad invasiva.	98
Figura 30	
Esquema ensayo de metástasis <i>in vivo</i> en ratones C57BL/6.	99

Figura 31	
Caveolina-1 requiere de Rab5 para promover metástasis <i>in vivo</i> en ratones C57BL/6.	101
Figura 32	
La expresión de p85 α disminuye la metástasis <i>in vivo</i> promovida por Caveolina-1 en ratones C57BL/6.....	102
Figura 33	
Caveolina-1 requiere de Rac-1 para promover metástasis <i>in vivo</i> en ratones C57BL/6.....	105
Figura 34	
Función de p85 α en la señalización de Caveolina-1 durante la migración celular mediada por Rab5.....	121
Figura 35	
Eje Caveolina-1/p85 α /Rab5/Tiam1/Rac-1 propuesto.....	130
Figura Anexo 1	
La expresión de Rac-1(S17N) no afecta a la activación de Rab5 por Caveolina-1 pero sí impide que Caveolina-1 promueva migración en línea celular HT-29(US).....	134
Figura Anexo 2	
Comparación secuencia de unión a dominios SH2 de Caspasa 8 y Caveolina-1.....	135

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1	
Dilución anticuerpos utilizados en la tesis.....	51
Tabla 2	
GEF's y GAP's de Rab5 involucrados en la migración celular.....	72
Tabla 3	
Resumen de los resultados <i>in vivo</i> de figura 31.....	100
Tabla 4	
Resumen de los resultados <i>in vivo</i> de figura 32.....	102
Tabla 5	
Resumen de los resultados <i>in vivo</i> de figura 33.....	106
Tabla 6	
Procesos por los cuales Caveolina-1 favorece procesos involucrados en la migración y metástasis en células tumorales. Resumen de antecedentes de literatura.....	118

ABREVIATURAS

BAL: benzamidina-antipaína-leupeptina

BCA: ácido bicincoínico

BSA: seroalbúmina de bovino

DMSO: dimetilsulfóxido

EDTA: ácido etilendiaminotetracético

FBS: suero fetal bovino

GFP: proteína fluorescente verde

GEF: factor intercambiador de nucleótidos

GAP: proteína activadora de GTPasa

GTP: guanosín Tri-fosfato

GDP: guanosín Di-fosfato

H: hora

HRPO: peroxidasa de rabanito

kDa: kilodaltons

MTS: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)

MCHERRY: proteína fluorescente roja

PI3K: fosfatidil inositol 3-kinasa

PMSF: fenil metil sulfonil fluoruro

RAB: Ras-related proteins in brain

shRNA: Short hairpin RNA

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida

SEM: error estándar de la media

mL: mililitro.

MMPs: metaloproteasas de matriz

mM: milimolar

Min: minutos

µg: microgramo

µL: microlitro

µm: micrómetro

µM: micromolar

RESUMEN

El cáncer constituye una de las principales causas de muerte en Chile y el mundo. Particularmente, la agresividad de esta enfermedad subyace en la diseminación de las células tumorales hacia otros tejidos, fenómeno conocido como metástasis. La metástasis es un proceso multifactorial, siendo la migración celular una de las etapas más relevantes. Caveolina-1 es una proteína de membrana que en etapas avanzadas del cáncer aumenta su expresión y promueve la migración celular y metástasis. En este contexto, Caveolina-1 ha sido asociada a un conjunto de cambios morfológicos esenciales que permiten la migración e invasión celular, entre estos, la remodelación del citoesqueleto de actina y el recambio de complejos de adhesión celular. Muchos de estos eventos dependen del tráfico endosomal, el cual a su vez es finamente regulado por diversos factores y moléculas, como las GTPasas pequeñas de la familia Rab. Una de estas proteínas es Rab5, la cual no sólo actúa como regulador maestro de la endocitosis temprana, sino que además cumple un rol fundamental en la migración celular. Trabajos recientes han descrito que la interacción entre Rab5 y Caveolina-1 influye en el tráfico endosomal, sin embargo el rol de esta interacción en la migración celular no había sido investigado.

Entre los reguladores de Rab5, p85 α (la subunidad reguladora de PI3K), se caracteriza por inhibir a Rab5, ya que posee un dominio RabGAP que estimula su actividad GTPasa. Literatura reciente ha descrito una interacción funcional entre p85 α y Caveolina-1, la cual a su vez depende de la fosforilación de Caveolina-1 en tirosina (Y14). Lo anterior cobra relevancia, ya que Caveolina-1 ejerce muchos de sus efectos en migración celular mediante la fosforilación en este residuo.

Por otro lado, trabajos recientes indican que Rab5 activa a Rac-1, a través del reclutamiento de la GEF Tiam1, fomentando la formación de *lamellipodios* y la polimerización de actina en sitios específicos de membrana. Además, trabajos de nuestro laboratorio demostraron que Caveolina-1 promueve la activación de Rac-1 en células metastásicas. Todos estos eventos llevan a que la célula adquiera cambios morfológicos que le permiten migrar. Por lo tanto, es importante investigar el papel potencial que desempeñaría Caveolina-1 en la regulación de este circuito, así como su relevancia en la migración celular.

En esta tesis, se investigó los mecanismos asociados al efecto promotor de migración y metástasis de Caveolina-1, identificando un nuevo eje de señalización “p85 α /Rab5/Tiam1/Rac-1”. A su vez, se evaluó la relevancia de este eje en un modelo preclínico, evaluando la metástasis *in vivo* en ratones C57BL/6.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis indican que Caveolina-1 promueve la migración, invasión y la activación de Rab5 en tres líneas celulares metastásicas: HT-29(US) de cáncer de colon, B16-F10 de melanoma murino y MDA-MB-231 de cáncer de mama. En relación a esto último, la expresión de Caveolina-1 promueve un aumento en el tamaño de los endosomas tempranos, pero no debido a la estabilización de Rab5 en éstos, sino que debido al secuestro de p85 α en un complejo proteico. Interesantemente, el efecto de p85 α en la inhibición de Rab5 es asociado a su actividad GAP, y no involucra la activación de PI3K.

Mediante ensayos de silenciamiento y reconstitución, se observó que la expresión y actividad de Rab5 son fundamentales para que Caveolina-1 promueva migración e invasión celular, así como también la activación de Rac-1. La activación de Rac-1 por Caveolina-1 y Rab5 requiere de Tiam1, la cual es reclutada a endosomas tempranos de manera dependiente de Caveolina-1. Finalmente, se demostró que Caveolina-1 requiere de Rab5, p85 α y Rac-1 para promover invasión *in vitro* y metástasis *in vivo* en ratones C57BL/6.

De esta manera, este trabajo de tesis aporta nueva evidencia acerca de los mecanismos moleculares involucrados en la migración y metástasis inducida por Caveolina-1, proponiendo un nuevo eje de señalización p85 α /Rab5/Tiam1/Rac-1, el cual involucra proteínas comúnmente alteradas en cáncer, y por lo tanto, contribuyendo con la identificación de nuevos blancos potenciales terapéuticos.

SUMMARY

Cancer is a leading cause of disease in Chile and worldwide. During the development and progression of this disease, normal cells convert to the cancerous state by acquiring specific characteristics. Of these metastasis is widely considered particularly important because it is this trait of cancer cells that is responsible for the large majority of deaths in cancer patients. Caveolin-1 is a membrane protein with vastly differing roles in cancer that range from functioning as a tumor suppressor to promoting tumor cell migration invasion and metastasis. Concomitant with this unfavorable role in tumor progression, expression of this protein frequently increases in advanced stages of cancer and is viewed there as a marker for poor patient prognosis and survival. In this cellular context, it is important to gain better insight to how Caveolin-1 promotes the acquisition of a more invasive cellular phenotype.

In these migration-related events, endosomal trafficking reportedly plays a fundamental role and Caveolin-1 is known to promote recycling of membrane components and the activation of GTPases at the leading edge. A key membrane-associated protein involved in such processes is Rab5, a small Rho GTPase that acts as a master regulator of early endocytosis. Recently, evidence has been provided suggesting that p85 α , the regulatory subunit of PI3K, is a Rab5 GAP that controls Rab5 inactivation. Structurally, p85 α has two SH2 domains, involved in binding to tyrosine-phosphorylated proteins, often including receptors and adaptor proteins. Caveolin-1, on the other hand, is known to promote the migratory and invasive capacity of tumor cells via phosphorylation on tyrosine-14. Furthermore, Rab5 activates Rac-1 and promotes lamellipodia formation, through recruitment of the GEF Tiam1. Together, these events lead to changes that permit cell migration. However, the precise mechanisms by which Caveolin-1 participates in the regulation of such processes and specifically whether Caveolin-1 enhanced migration and invasion in vitro involves a novel p85 α / Rab5 / Tiam1 / Rac-1 signaling axis remained to be determined. Also, a model of B16F10 murine melanoma metastasis in syngeneic C57BL / 6 mice was employed to evaluate the relevance of Rab5, p85 α and Rac-1 in promoting Caveolin-1-enhanced lung metastasis in vivo.

The results obtained during this thesis demonstrate that Caveolin-1 promoted migration, invasion and activation of Rab5 in the metastatic cell lines HT-29 (US), B16-F10 and

MDA-MB-231. Moreover, the expression of Caveolin-1 was shown to increase the average size of early endosomes in B16F10 cells, consistent with a role in the activation of Rab5. To study molecular mechanisms that explain these results, the expression of p85 α was shown to decrease Rab5 activation induced by Caveolin-1. Using inhibitors, the activation of Rab5 by Caveolin-1 was shown to be independent of PI3K activity. Moreover, expression of Rab5 was required for Caveolin-1 to promote cell migration and invasion. Importantly, the activation of the small GTPase Rac-1 induced by Caveolin-1 required the presence of Rab5 to promote migration. Furthermore, evidence is provided showing that recruitment of the Rac1 GEF Tiam1 to early endosomes was enhanced in the Caveolin-1 positive cells. Finally, using short-hairpin knock-down technology Rab5, p85 α and Rac-1 were shown to be required for Caveolin-1 to promote migration and invasion in vitro, as well as metastasis in vivo in C57BL / 6 mice.

In conclusion, the results of this thesis shed light on the molecular mechanisms involved in Caveolin-1-enhanced migration, invasion and metastasis and propose the existence of a novel p85 α / Rab5 / Tiam1 / Rac-1 signaling axis downstream of Caveolin-1 that contributes to deregulation in cancer and potentially represents an interesting target for treatments in cancer patients.

1. INTRODUCCIÓN

A. CÁNCER.

El cáncer es una de las principales enfermedades que causa muertes en Chile y en el mundo. De hecho, es la segunda causa de muerte a nivel mundial dentro de las enfermedades crónicas no transmisibles (WHO report, 2014). Esta patología causa la muerte de 8.2 millones de personas y 14 millones de nuevos casos anuales a nivel mundial, según datos recientes (Globocan, 2012).

Esta enfermedad es un fenómeno multifactorial que conlleva a la pérdida de una comunicación apropiada entre las células y su micro-ambiente. Desde un punto de vista biológico, el cáncer se define como un crecimiento anormal y desorganizado de células de un tejido específico, las cuales proliferan hasta conformar un tumor, requiriendo de la formación de nuevos vasos sanguíneos para la llegada de nutrientes y la supervivencia de las células tumorales (Weinberg et al., 1989). Se ha descrito que durante este proceso las células se “transforman” desde un estado normal a uno canceroso adquiriendo características específicas como la autosuficiencia en señales de crecimiento, la pérdida de sensibilidad a señales inhibitorias del crecimiento, resistencia a la muerte celular programada (apoptosis), potencial replicativo ilimitado, capacidad angiogénica sostenida y por último, el desarrollo de metástasis (Hanahan y Weinberg 2000, 2011).

Sin embargo, la gran mayoría de las personas con cáncer no mueren debido a los problemas del crecimiento del tumor primario, sino que debido a la

metástasis, que corresponde a la diseminación de las células tumorales hacia distintos tejidos del cuerpo (Bohle y Kalthoff, 1999).

Tanto en la angiogénesis como en la metástasis se requiere de la migración celular como un proceso fundamental para el desarrollo del cáncer.

B. MIGRACIÓN CELULAR Y CÁNCER.

La migración celular es un proceso altamente dinámico, esencial para el desarrollo, la morfogénesis embrionaria y que está relacionado con la reparación, regeneración y cicatrización de tejidos (Vicente-Manzanares et al., 2005). En organismos multicelulares, la migración celular está regulada por señales extracelulares, tales como factores solubles endocrinos o autocrinos, así como también señales no solubles de la matriz extracelular. Tales factores inician señales de movilidad celular como atracción, repulsión, adhesión e invasión, entre otros. Estas señales provocan respuestas intracelulares que van desde alteraciones en la reorganización del citoesqueleto de actina y microtúbulos, la formación de protrusiones de membranas como *ruffles*, *filopodios*, *lamellipodios* (Neto y Mesquita, 2008), hasta modificaciones en el transporte vesicular y regulación en la transcripción génica (Raftopoulou y Hall, 2004). En condiciones patológicas, se ha comprobado que la migración celular es uno de los procesos fundamentales para el desarrollo de enfermedades como la artritis, aterosclerosis, osteoporosis y tiene una particular importancia en la progresión del cáncer (Vicente-Manzanares et al., 2005).

Como mencionamos anteriormente, en el cáncer la migración celular es particularmente relevante para la angiogénesis y la metástasis. La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de tejido vascular pre-existente, cuya finalidad es entregar nutrición al tumor que está en formación. En este proceso, la proliferación y la migración de las células endoteliales es fundamental (Folkman, 1997). Por otro lado, la diseminación metastásica es la etapa donde las células cancerosas deben migrar e invadir tejidos blancos para establecer un nuevo nicho donde crecer. Para que la metástasis sea exitosa, las células tumorales deben evadir la apoptosis y proliferar para desarrollar un nuevo foco tumoral. En algunas neoplasias se ha demostrado que las células tumorales evaden las señales de muerte, migrando lejos de las células apoptóticas y produciendo moléculas de supervivencia, anti-inflamatorias o inhibidoras de la apoptosis para así completar exitosamente la metástasis celular (Gregory y Pound., 2011).

La migración celular es un proceso regulado por múltiples señales, tanto positivas como negativas. Estas señales vienen dadas por la acción de factores de crecimiento, coagulación, hormonas y proteínas de señalización, entre muchos otros. Sin embargo, es de nuestro interés estudiar el papel que desempeñan proteínas asociadas a membranas como Caveolina-1, la cual ha sido implicada en la progresión de tumores como una molécula promotora de metástasis (Quest et al., 2004 ; Williams y Lisanti, 2005; Yeh et al., 2009).

C. CAVEOLINA-1.

Caveolina-1 es una proteína integral de membrana de 21-24 kDa y que consta de regiones hidrofílicas N-terminal y C- terminal, además de un dominio central hidrofóbico que forma una horquilla de inserción en la membrana plasmática. Como se muestra en la **Figura 1**, Caveolina-1 consta de un dominio entre los residuos 82 y 101, denominado dominio de andamio (CSD) (Caveolin Scaffolding-Domain), el cual participa en la interacción de esta proteína con una importante cantidad de moléculas de señalización, claves para ejercer su función (Quest et al., 2004; Williams y Lisanti, 2005). Además, Caveolina-1 es palmitoilada en los residuos de cisteína 133, 143 y 156, lo cual promueve su oligomerización y el transporte de colesterol en las Caveolas (Monier et al., 1996, Uittenbogaard y Smart 2000). Existen dos variantes de Caveolina-1 que son generadas por *splicing* alternativo, estas variantes han sido identificadas como CAV1 α (residuos 1-174) y CAV1 β (residuos 34-174) (Kogo et al., 2004; Okamoto et al., 1998). En esta tesis, estudiamos la versión más larga (178 residuos) de la proteína que corresponde a CAV1 α . A su vez, CAV1 α puede ser fosforilada en el residuo número 14, correspondiente a una tirosina (Y14), por tirosinas-quinazas no receptoras, como Src, Fyn, Yes y c-Abl, en respuesta a diversos estímulos que promueven la migración celular (Li S. et al., 1996, Quest et al., 2008, Sanguinetti and Mastick 2003, Sanguinetti et al., 2003).

Caveolina-1 oligomeriza en balsas lipídicas del trans-golgi y después llega a la membrana plasmática para formar lo que se han denominado caveolas (Lisanti et al., 1993). Las caveolas son microdominios de la membrana plasmática de entre 50 y 100 nm de diámetro, enriquecidas en colesterol y esfingolípidos (Anderson, 1998). En las caveolas se concentran proteínas involucradas en la transducción de señales, proteínas ancladas por grupos glicosil fosfatidil inositol (GPI) y moléculas modificadas por lípidos. Caveolina-1 es uno de los componentes proteicos principales de las caveolas (Anderson, 1998, Cohen et al., 2004).

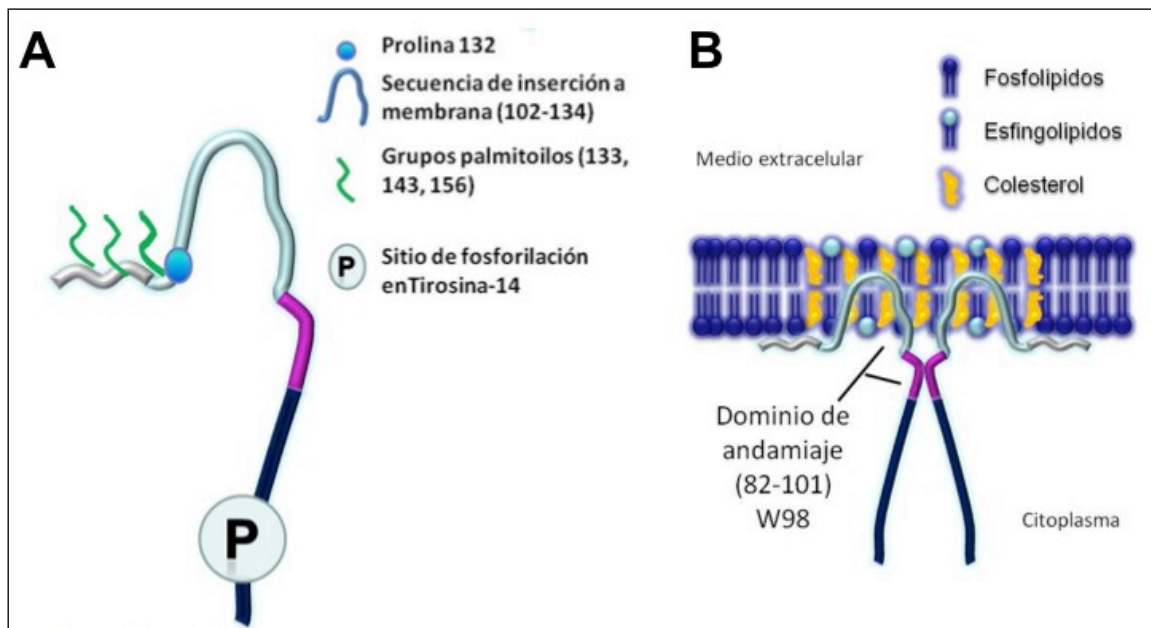


Figura 1: Estructura de Caveolina-1 y su anclaje a la membrana.

A. Estructura de Caveolina-1. Se muestran los diferentes dominios, residuos de palmitoilación y sitio de fosforilación en Tirosina-14 de Caveolina-1. **B.** Esquema del anclaje de Caveolina-1 a la membrana. Caveolina-1 se inserta en la membrana gracias a la presencia de su dominio de oligomerización, formando grupos de 14-16 monómeros de la proteína. Las regiones amino y carboxilo-terminales se encuentran ubicadas hacia el citoplasma (Modificada de Lobos et al., 2014). En los siguientes esquemas se mostrarán dímeros de Caveolina-1 anclados a la membrana solo con el objetivo de simplificar las figuras.

D. CAVEOLINA-1 EN LA MIGRACIÓN CELULAR Y CÁNCER.

El papel que desempeña Caveolina-1 en cáncer es controversial. Se ha propuesto una doble funcionalidad de Caveolina-1, donde ésta actúa tanto como supresor de tumores, así como promotor de metástasis (revisiones en Quest et al., 2004, Quest et al., 2008, Williams y Lisanti, 2005).

En nuestro laboratorio se realizó un análisis detallado, integrando datos obtenidos en líneas celulares y ensayos *in vivo*, generando un modelo que propone que la expresión de Caveolina-1 en distintos tipos de cánceres varían según el estadio en el que estos se encuentran (**Figura 2**). Específicamente, en tumores de mama, pulmón y colon, Caveolina-1 disminuye su expresión en etapas iniciales de la transformación celular, mientras que en etapas más avanzadas, la proteína aumentaría su expresión, estabilizándose en la membrana y direccionando la migración celular. De esta forma se ha propuesto que actúa como un promotor de metástasis. Ejemplo de esto es el cáncer de próstata y melanoma donde se demostró que existe un aumento en los niveles de la proteína en etapas avanzadas del cáncer (Quest et al., 2004, Quest et al., 2008, Lobos et al., 2013, Lobos et al., 2014).

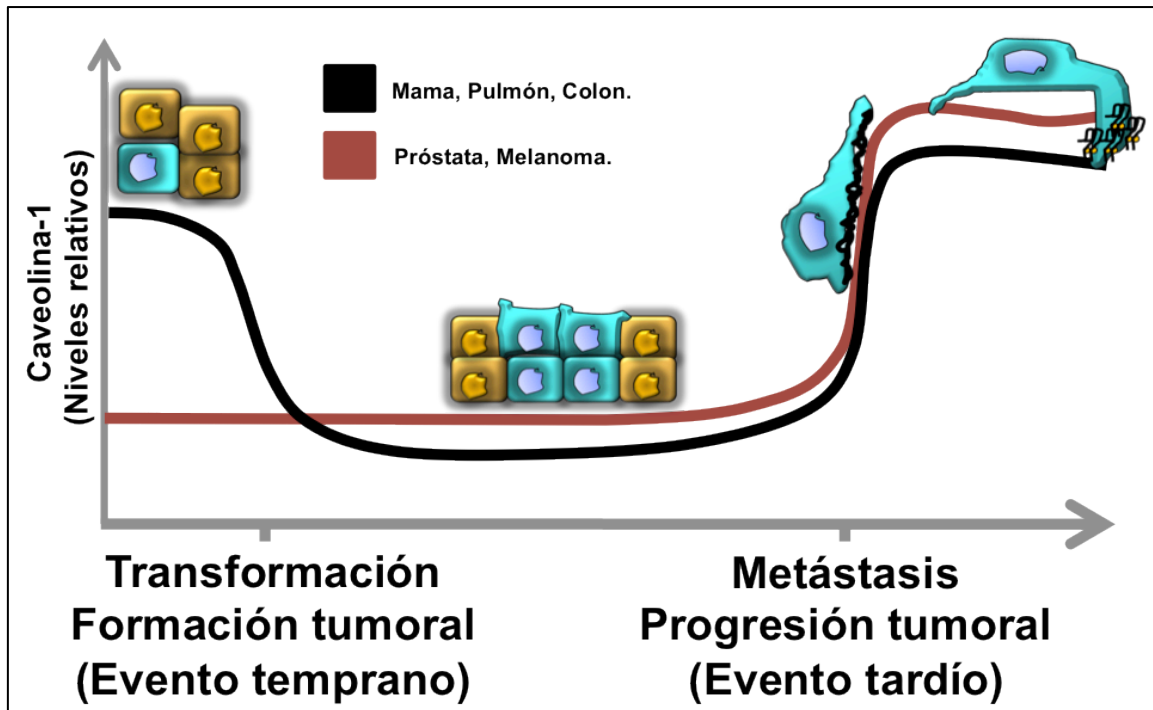


Figura 2: Niveles de Caveolina-1 durante la progresión del cáncer.

El siguiente es un esquema de nuestro laboratorio que integra la evidencia recopilada. Existe una pérdida de los niveles de Caveolina-1 durante la etapa de transformación celular comparado con un tejido normal lo que se asocia a su efecto supresor de tumores. Sin embargo, a medida que progresa el cáncer existe una re-expresión de los niveles de Caveolina-1 aumentan tanto en mama, pulmón como próstata, lo que se asocia con su rol como promotor de metástasis (Modificada de Lobos et al., 2014).

La hipótesis que propone a Caveolina-1 como supresor de tumores se ha sustentado en numerosos estudios. Entre ellos, datos en modelos *in vivo* indican que la expresión de Caveolina-1 en líneas celulares de cáncer de colon reduce la capacidad de formar tumores subcutáneos en ratones inmunosuprimidos (Bender et al., 2000). A nivel molecular, nuestro grupo ha demostrado que la expresión de Caveolina-1 está asociada a la disminución en los niveles de

Survivina (un inhibidor de la apoptosis o IAP) y Ciclooxigenasa-2 (COX2), dos proteínas que favorecen la supervivencia de células cancerosas (Torres et al, 2006, Torres et al, 2007, Rodríguez et al., 2009). Además, antecedentes más recientes de nuestro laboratorio muestran que en ensayos de formación de tumores, la inoculación de ratones C57BL/6 con células de melanoma murino B16-F10 que expresan ectópicamente Caveolina-1, reduce el volumen tumoral en un 50-60% en comparación con las células control. De manera sorprendente, la expresión de Caveolina-1 en estas mismas células lleva a un aumento en la formación de núcleos metastásicos en los pulmones del animal al inyectarlo en la vena de la cola (Lobos et al., 2013). Lo anteriormente descrito en este modelo nos permite demostrar ambos roles de Caveolina-1, tanto como supresor de tumores como promotor de metástasis *in vivo* (Lobos et al., 2013).

La función promotora de metástasis de Caveolina-1 viene acompañada de diversas características a nivel celular. Entre ellas, se ha visto que la re-expresión de Caveolina-1 en células de cáncer de pulmón es suficiente para promover la formación de *filopodios*, la migración celular y aumentar el potencial metastático de estas células (Ho et al., 2002).

Similarmente, Caveolina-1 estimula la formación de invadopodios y la degradación de la matriz extracelular aumentando el potencial migratorio e invasivo (Yamaguchi et al., 2009). Por otro lado, el aumento en la expresión de Caveolina-1 se ha asociado a incrementos en la extensión o “spreading” celular sobre matrices de colágeno, constituyendo esto uno de los fenómenos importantes para las primeras etapas de la migración (Nethe et al., 2010).

Sin embargo, el rol de Caveolina-1 durante la migración ha sido mayormente descrito en células no-metastásicas, por ejemplo en células MEFs (fibroblastos embrionarios de ratón), donde Caveolina-1 promueve aumentos en la velocidad, polarización y persistencia de la migración celular además de modular la localización subcelular y la actividad de proteínas involucradas en el proceso, como Src y Rac-1 (Grande-García et al., 2007; Joshi et al., 2008). Algunos de estos aspectos que relacionan a Caveolina-1 en migración se resumen en la **Figura 3**.

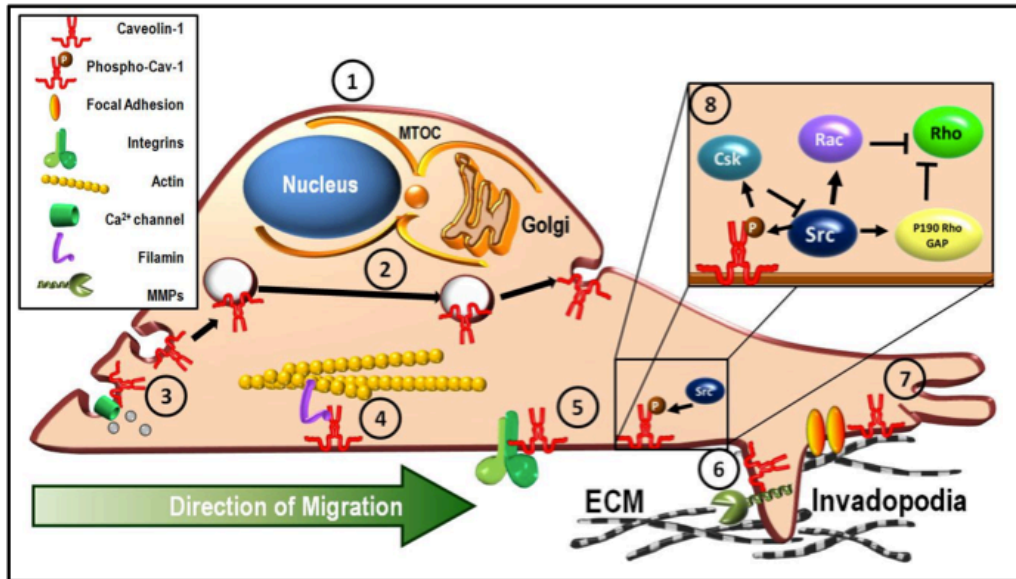


Figura 3: Resumen esquemático de la posible participación de Caveolina-1 en diferentes aspectos de la migración.

1) Polarización celular; 2) Tráfico vesicular y reciclaje de membrana; 3) Señalización por calcio en la parte trasera de la célula; 4) Unión a Actina a través de filamina; 5) Interacción con integrinas; 6) Localización y activación de MMPs; 7) Localización y maduración de las AFs y 8) Regulación de GTPasas de la familia Rho. Tomado de Núñez-Wehinger et al., 2014 (Review).

Con estos antecedentes, la presente tesis investiga el efecto promotor de metástasis de Caveolina-1, enfocándose en los mecanismos involucrados en la migración celular en modelos de células metastásicas, tanto *in vitro* como *in vivo*.

E. CAVEOLINA-1 Y GTPasas.

Durante la migración celular, Caveolina-1 permite la inserción y reciclaje de nuevo material en el frente de avance de la célula (Navarro et al., 2004). Esto lo realiza gracias a su interacción con moléculas de adhesión de la membrana plasmática, lo que le confiere un aumento en la capacidad de locomoción.

Por otro lado, se ha observado que Caveolina-1 está relacionada con la activación de Rho GTPasas, las cuales son proteínas G pequeñas esenciales en la regulación de la migración celular. La familia de las Rho GTPasas está compuesta por tres subfamilias: RhoA, Rac-1 y Cdc42 involucradas, entre otras funciones, en la formación de estructuras relacionadas con la migración celular como adhesiones focales, *lamellipodios* y *filopodios* respectivamente (Etienne-Manneville et al., 2002 ; Gupton et al., 2007; Carlier 2007).

En general, las GTPasas ciclan continuamente entre un estado activo en el cual se encuentran unido a GTP y un estado inactivo en el cual se encuentran unido a GDP. Este proceso está finamente regulado por factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs) que promueven el intercambio de nucleótidos de GDP por GTP y por las Proteínas Activadoras de GTPasas (GAPs) que

estimulan la actividad GTPasa intrínseca (Bishop et al., 2000, Bernard et al., 2004).

Se ha descrito que algunas Rho GTPasas cuentan con dominios de unión a Caveolina-1 (Caveolin Binding Domain CBD) los cuales interactúan con el dominio de andamio de Caveolina-1 (Couet et al., 1997). Esta unión es indispensable para la metástasis inducida por Caveolina-1, lo cual está asociado a un aumento en la expresión la integrina $\alpha 5$ y la activación de moléculas involucradas en migración como Src, Ras y Erk (Arpia et al., 2011).

Grande-García et al., demostraron en 2007 que en fibroblastos *knock down* para Caveolina-1, existe una disminución en la actividad de RhoA y un aumento en la actividad de Rac-1 y Cdc42 vía Src-p190RhoGAP (Grande-García et al., 2007). Contrariamente con esto, nuestro laboratorio demostró que en células metastásicas de cáncer de mama MDA-MB-231 Caveolina-1 promueve la activación de Rac-1 durante el *spreading* celular sobre una matriz de fibronectina. (Urrea et al., 2012). Por otro lado, datos recientes indican que la activación de Rac-1 por Caveolina-1 es evidente en modelos adicionales de metástasis, como en células de melanoma metastásicas B16-F10 y A375M (Lobos et al., 2013).

Además, se ha propuesto que la activación y re-localización de Rac-1 en adhesiones focales se debe a la fosforilación de Caveolina-1 en tirosina 14 (Nethe y Hordijk 2011). Algunos de estos aspectos se esquematizan en la

Figura 4.

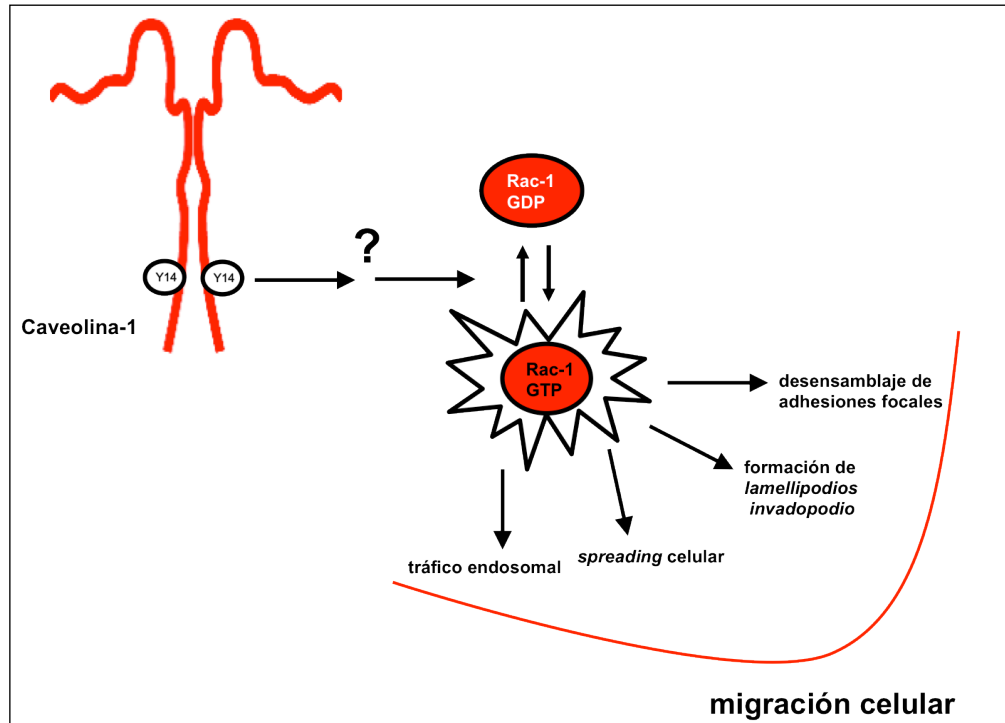


Figura 4: Caveolina-1 activa a Rac-1 promoviendo la migración celular.

Caveolina-1 promueve la activación de Rac-1 y con esto un aumento en el tráfico endosomal, el *spreading* celular, la formación de filopodios y *lamellipodios* y el desensamblaje de adhesiones focales. Caveolina-1 ejerce la mayoría de estos efectos fosforilada en tirosina14. Las moléculas involucradas en la regulación de la activación de Rac-1 por Caveolina-1 son estudiadas en la presente tesis (para más detalle, ver el texto).

F. CAVEOLINA-1 Y RAB5.

Uno de los procesos más importante en la migración celular es la formación de nuevas adhesiones de la célula con la matriz extracelular. Producto de esto, se forman nuevas protrusiones de membrana en el frente de avance, lo cual depende en gran medida del tráfico endosomal (Lanzetti et al., 2004; Palamidessi et al., 2008; Torres et al., 2010). Interesantemente, Caveolina-1 está involucrada en la endocitosis regulando el tráfico de endosomas tempranos (Schnitzer, 2001; Schubert et al., 2001; Hagiwara et al., 2008). Existen diversos reguladores del tráfico intracelular, entre los cuales se destacan las proteínas

Rab, debido a su amplio espectro de regulación. Las proteínas Rab son GTPasas pequeñas de la superfamilia Ras involucradas en la compartimentalización celular y tienen un importante rol en la formación de vesículas, su orientación y los eventos de fusión (Jordens, 2005, Stenmark et al., 2009). Existen más de 60 miembros en la familia de las Rabs, siendo las más caracterizadas Rab5, Rab21 y Rab22 en endosomas tempranos, Rab4 y Rab11, en endosomas de reciclaje, y Rab7 y Rab9 en endosomas tardíos (Stenmark et al., 2001)

A pesar de que aún se desconoce el papel preciso que cumple Caveolina-1 en el tráfico endosomal, observaciones hechas por Hagiwara et al., 2008 han indicado que Caveolina-1 interactúa con Rab5 a través de su dominio de andamiaje. Por lo tanto, esta tesis tiene por objeto investigar la activación de Rab5 por Caveolina-1 como posible mecanismo por el cual Caveolina-1 promueve la migración celular.

G. RAB5 Y MIGRACIÓN CELULAR.

De manera canónica, Rab5 coordina los eventos de la endocitosis temprana, la formación de vesículas cubiertas de clatrina, el transporte de estas vesículas y la fusión homotípica y heterotípica entre vesículas endocíticas y endosomas tempranos (Stenmark et al., 1994; Bucci et al., 1992). Sin embargo, literatura reciente ha indicado que Rab5 cumple un papel fundamental durante la migración celular (Palamidessi et al., 2008; Torres et al., 2010).

Específicamente, se ha demostrado que Rab5 se asocia en un complejo con integrina $\beta 1$, regulando así el tráfico e internalización de integrinas y el desensamblaje de las adhesiones focales (Torres et al., 2010; Mendoza et al., 2013). Rab5 también estimula la migración celular a través de la endocitosis de Receptores del tipo Tirosina Quinasa (RTKs), promoviendo la formación de *filopodios* y la remodelación del citoesqueleto de actina, de manera dependiente de su actividad (Rab5-GTP) (Lanzetti et al., 2000, Lanzetti et al., 2004). Sin embargo, la formación de *filopodios*, *lamellipodios* y de fibras de estrés inducidas por Rab5 son resultados aún controversiales, puesto que algunas publicaciones indican que este es un efecto independiente de RhoA, Cdc42 y Rac-1 (Spaargaren et al., 1994) o dependientes de Rac-1 en modelos normales y tumorales (Palamidessi et al., 2008, Torres et al., 2010). Por lo tanto, Rab5 es un blanco molecular interesante en el estudio de la migración celular inducida por Caveolina-1, ya que ambas proteínas involucran a Rac-1 (Urra et al., 2012, Torres et al., 2010, Palamidessi et al., 2008) y ambas proteínas interactúan (Hagiwara et al., 2008).

H. P85 α , MIGRACIÓN CELULAR Y CAVEOLINA-1.

Numerosas investigaciones en los últimos años se han enfocado en identificar a los reguladores de Rab5 (Mendoza et al., 2014). Uno de los reguladores clave de la actividad de Rab5 es p85 α , la subunidad regulatoria de PI3K, la cual posee una actividad proteína activadora de GTPasa de Rab5 (Rab-GAP) (Chamberlain et al., 2004). El dominio RabGAP de p85 α es una secuencia homóloga a las

RhoGAP involucradas en la regulación de GTPasas como Cdc42 y Rac-1, pero con una alta especificidad hacia Rab5, estimulando su actividad GAP intrínseca en aproximadamente 1000 veces (Chamberlain et al., 2004). Concordantemente, se observó que p85 α tiene un efecto inhibitorio sobre Rab5 en células tumorales de pulmón y neuroblastoma (Torres et al., 2008). A su vez, se ha observado que la expresión de una mutante de p85 α , que carece de su actividad GAP (p85 α - R274A), conlleva a la transformación celular en fibroblastos. Además, esta mutante causa un incremento en la magnitud y duración de la fosforilación del Receptor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGFR) y de la vía MAPK, Akt/PKB, así como un aumento en la formación de tumores *in vivo* (Chamberlain et al., 2008; 2010). Nuestro grupo ha demostrado que p85 α se une a proteínas fosforiladas—vía su dominio SH2—llevando a alteraciones en los niveles de Rab5-GTP (Torres et al., 2008). Este aumento en Rab5-GTP se tradujo en un aumento de la motilidad y metástasis de las células tumorales (Torres et al., 2010).

Con estos antecedentes, más datos que indican que Caveolina-1 promueve la migración celular dependiente de su fosforilación en Y14 (Joshi et al., 2008, Urra et al., 2012) es interesante investigar la relación entre Caveolina-1, Rab5 y p85 α . Lo anterior cobra particular relevancia y sustento con los datos publicados recientemente en donde se demuestra una interacción directa entre Caveolina-1 y p85 α , dependiente de su fosforilación en Y14 (Faulstich et al., 2013).

De esta manera el presente trabajo se propuso estudiar si la activación de Rab5 por Caveolina-1 en la migración de células metastásicas es un mecanismo dependiente de p85 α . (Ver Figura 5)

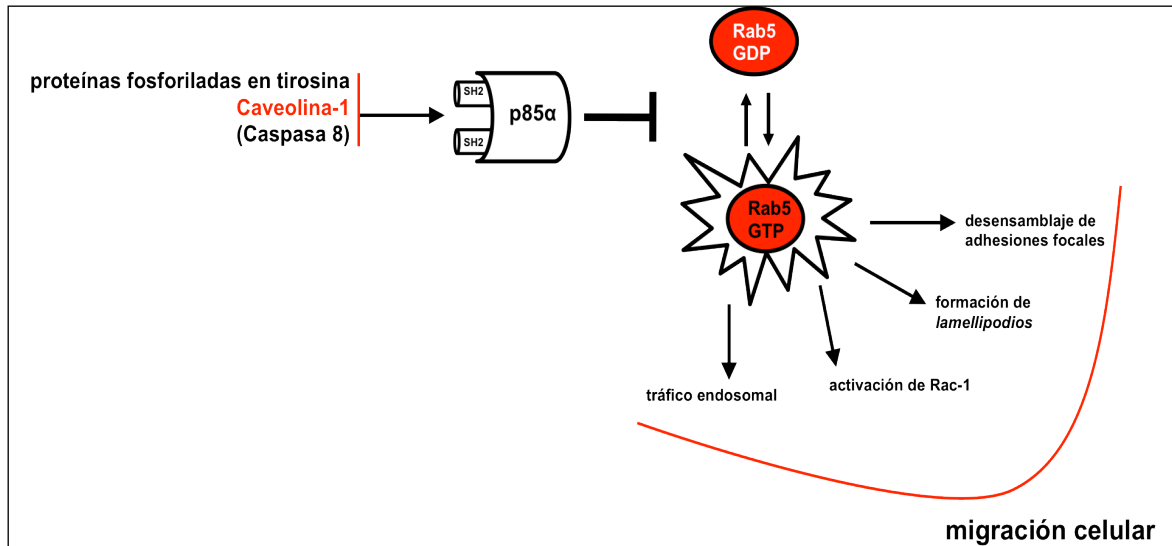


Figura 5: p85 α y su posible interacción con Y14-Caveolina-1 y Rab5.

p85 α la subunidad reguladora de PI3K, además de tener actividad GAP sobre Rab5 posee dos dominios SH2, de unión a proteínas fosforiladas en tirosina (ejemplo Caspasa8 fosforilada en tirosina 380). Caveolina-1 promueve migración celular cuando se encuentra fosforilada en tirosina14. La activación de Rab5 promueve un aumento en el tráfico endosomal, la activación de Rac-1, la formación de lamellipodios y el desensamblaje de las adhesiones focales (para más detalle, ver el texto).

I. ACTIVACIÓN DEL EJE TIAM1/RAC-1 POR RAB5.

Rac-1 es una GTPasa pequeña esencial en la formación de *lamellipodios* y en la polimerización de actina en sitios específicos de membrana (Lanzetti et al., 2004;Palamidessi et al., 2008). Esto conlleva a que la célula adquiera los cambios morfológicos que le permitan migrar.

Se ha sugerido que existe el circuito de activación Rab5→Rac-1, el cual permitiría explicar el aumento en la migración celular (Palamidessi et al., 2008). Ambas proteínas se encuentran en los endosomas tempranos, donde Rab5 es muy abundante. Sin embargo, para que se pueda completar el ciclo de activación de Rac-1, es necesario que se recluten reguladores como el GEF de Rac-1: Tiam1. Esto ocurriría en los endosomas tempranos, donde Rac-1 está en su forma inactiva. Por lo tanto, la migración mediada por endocitosis, requeriría de la activación de Rac-1 (GDP) por su GEF Tiam1, de manera dependiente de Rab5 (Lanzetti et al., 2004, Palamidessi et al., 2008). Tiam1 tiene a su vez, un papel importante en procesos asociados a la migración celular como la polaridad celular, la integridad de las uniones adherentes, las uniones estrechas y las interacciones célula-matriz (Malliri et al., 2004; Chen et al., 2005; Shepherd et al., 2010). La expresión de Tiam1 se ha documentado en muchos tipos de cáncer y la señalización de Tiam1/Rac-1 ha sido implicado en la transformación de diferentes tipos de células, por ejemplo las células de fibroblastos embrionarios de ratón (NIH 3T3) (van Leeuwen et al., 1995).

La **Figura 6** resume la activación del circuito Rab5→Rac1 en relación a la motilidad celular y su potencial migratorio.

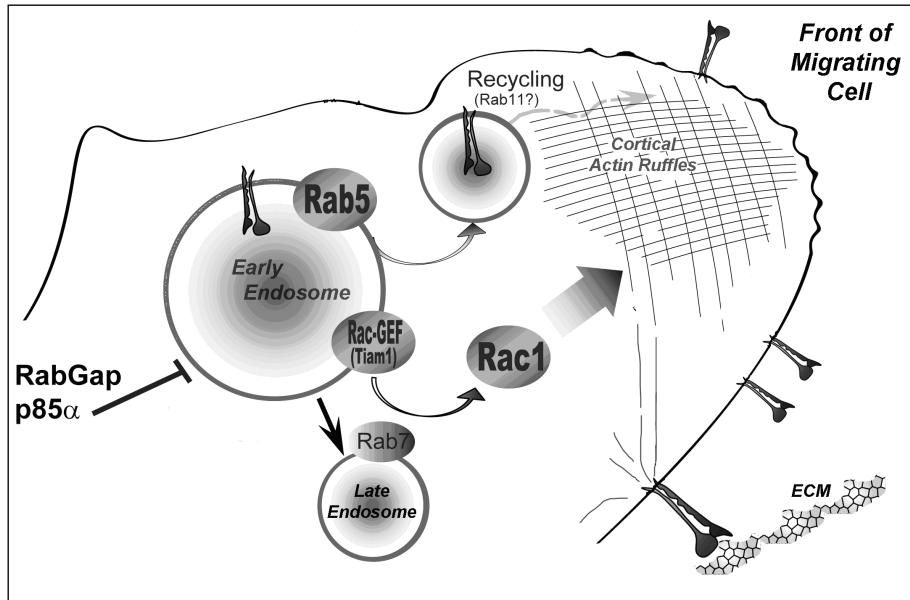


Figura 6: Rab5 está involucrada en migración celular mediante la activación de Rac-1.

La figura resume el circuito de activación Rab5-Rac-1, donde una vez activada Rab5 en endosomas tempranos se ha descrito la activación de Rac-1 por parte de su GEF tiam1. Una vez activada Rac-1 (unida a GTP) se ha visto que su distribución cambia asociándose a sectores específicos de membrana, desde donde tiene un efecto en la remodelación del citoesqueleto de actina, la formación de lamellipodios y otras estructuras que permiten la migración de las células en el frente de avance (modificado de Torres y Stupak, 2011).

Por lo tanto, en esta tesis abordamos la tarea de comprobar si Caveolina-1 promueve la migración celular dependiente de la activación de Rab5, además de comprender los mecanismos involucrados en esta regulación. Para esto, estudiamos si la activación de Rab5 por Caveolina-1 es dependiente de p85α. Además, la siguiente investigación abordó la importancia de la activación de Rac-1 río debajo de Rab5 y Caveolina-1, involucrando al GEF Tiam1, como eventos que contribuyen a la migración celular.

EN RESUMEN, LA VÍA PROPUESTA EN ESTA TESIS ES LA SIGUIENTE:

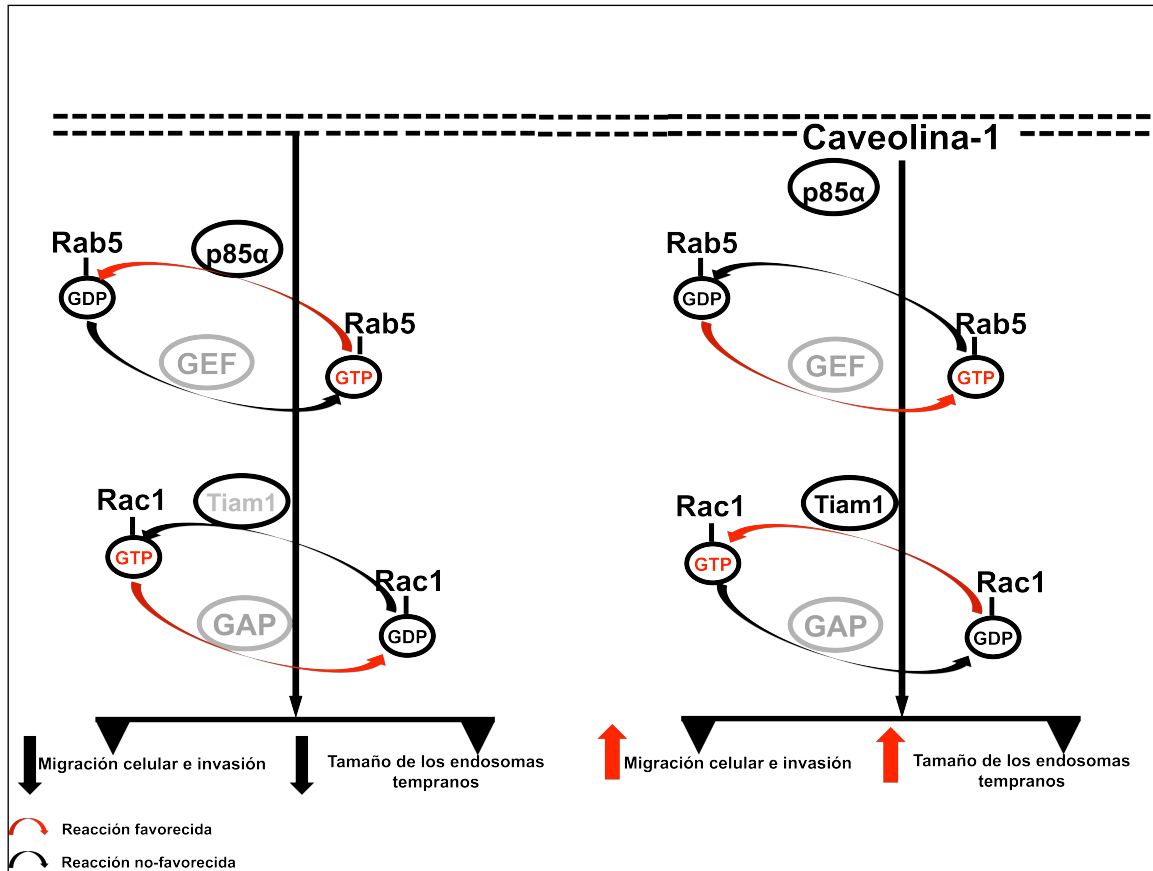


Figura 7: Caveolina-1 activa al eje p85α/Rab5/Tiam1/Rac-1 aumentando la migración e invasión celular. Vía de activación propuesta.

El esquema muestra la vía propuesta en esta tesis. Esto involucra estudiar los mecanismos de activación de Rab5 por Caveolina-1 y su efecto promotor de migración en modelos de células metastásicas. Para estudiar esta vía propuesta, analizamos si p85α, una RabGAP de Rab5 es posiblemente secuestrada por Caveolina-1 lo que lleva a una activación de Rab5. A su vez se estudió si para este aumento de la migración celular por Caveolina-1 dependiente de Rab5 es necesaria la activación de Rac-1 y el reclutamiento del GEF Tiam-1 a endosomas tempranos. De esta forma se quiso demostrar mecanísticamente cómo Caveolina-1 actúa como un promotor de migración en células de cáncer metastático. Finalmente se comprobó el efecto de las proteínas del eje en un ensayo de metástasis *in vivo* con ratones C57BL/6.

RESUMEN DE LOS ANTECEDENTES:

- La expresión de Caveolina-1 aumenta en etapas avanzadas del cáncer, promoviendo la migración celular y la metástasis.
- Caveolina-1 promueve la activación de Rac-1 en células metastásicas MDA-MB-231 y B16-F10.
- Existe una interacción física entre Caveolina-1 y Rab5 en células Cos-1.
- Rab5, además de ser un regulador maestro de la endocitosis temprana es fundamental en la migración celular.
- La activación de Rab5 lleva a la activación de Rac-1, a través de su GEF Tiam1, lo que promueve cambios en protrusiones de membrana y aumentos de migración celular.
- p85 α , la subunidad reguladora de PI3K, es una GAP que ha sido involucrado en la inactivación de Rab5. Además p85 α tiene dominios SH2 que une a proteínas tirosina fosforiladas.
- Caveolina-1 está fosforilada en células metastásicas y su fosforilación es relevante para la migración.

De acuerdo a los antecedentes mencionados, se propuso la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS

La asociación de Caveolina-1 con p85 α activa al eje Rab5/Tiam1/Rac-1 promoviendo la migración e invasión de células metastásicas HT-29 (US), B16-F10 y MDA-MB-231.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la migración celular dependiente de la activación de Rab5 por Caveolina-1 en células de cáncer de colon HT-29(US), cáncer de mama MDA-MB-231 y melanoma B16-F10 además de un modelo de metástasis *in vivo* en ratones C57BL/6.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1. Analizar si en células de cáncer metastásicas la expresión de Caveolina-1 promueve una activación de Rab5 dependiente de p85 α .**
- 2. Estudiar si la expresión de Caveolina-1 en células de cáncer promueve la migración celular y determinar si es un efecto dependiente de Rab5.**
- 3. Examinar si el efecto promotor de migración de Caveolina-1 está mediado por la activación de Rac-1 dependiente de su GEF Tiam1 y Rab5.**
- 4. Evaluar este efecto promotor de migración de Caveolina-1 dependiente de Rab5 en un modelo de migración *in vivo* en ratones C57BL/6 inoculados con las células B16-F10.**

2. METODOLOGÍA

A. LÍNEAS CELULARES

Las células HT29(US) son una línea metastásica de cáncer de colon derivada de la línea celular HT-29(ATCC) obtenidas directamente de la *American Type Culture Collection* (ATCC) (Torres et al., 2007). Las células B16-F10 son una línea celular de melanoma murino generadas a partir de 10 ciclos de inoculación y recuperación en el pulmón de células B16-F0 en ratones C57BL/6, correspondiendo éste último al modelo *in vivo* a utilizar durante esta tesis. La línea celular de cáncer MDA-MB-231 es derivada de la efusión pleural de un adenocarcinoma de mama, tumorigénica, metastásica y con morfología epitelial.

En células HT-29(US), se utilizaron los clones M1 y C14 de las líneas celulares transfectadas establemente con los vectores pLacIOP-Mock y pLacIOP-Caveolina-1 respectivamente (Bender et al., 2000). Además se utilizaron células B16-F10 transfectadas establemente con los mismos vectores. Las células MDA-MB-231 expresan endógenamente altos niveles de Caveolina-1 y por lo tanto esta fue silenciada mediante infección viral con shRNA según descrito por Urra et al., 2012. El silenciamiento de Rab5 fue realizado como se describió previamente (Torres et al., 2010). La metodología consiste en expresar constitutivamente un RNA corto de doble hebra, diseñado para hibridar específicamente una región de la secuencia codificante de Rab5 endógena, utilizando el sistema de silenciamiento de RNA mensajero e interfiriendo así con la expresión de la proteína. Esta metodología, involucra la utilización de un sistema de transducción lentiviral de tercera generación, el cual codifica un RNA

corto que hibrida con el RNA codificante de Rab5, produciendo la respuesta de interferencia y la degradación de los RNA mensajeros que codifican Rab5, impidiendo así la traducción de la proteína. Las células control fueron transducidas con un lentivirus codificante para una secuencia shRNA inespecífica (plasmidio 1864; Addgene, Cambridge, MA). El silenciamiento de Rab5 en células B16-F10 fue realizado usando el shRNA secuencia #F8 (Open Biosystems), mientras que en HT-29(US) se utilizó la secuencia #F10 (Open Biosystems) basándose en complementariedad de secuencias. Las líneas celulares establemente transducidas fueron seleccionadas y mantenidas en medio de cultivo conteniendo puromicina a una concentración de 2 mg/ml. Cada línea celular fue mantenida en su medio respectivo (DMEM High Glucosa para HT-29(US), DMEM F12 para MDA-MB-231 y RPMI para (B16-F10)) suplementado con Suero Fetal Bovino (SBF) al 10% y antibióticos (estreptomina 10ug/ml y penicilina 10000U/ml) a 37°C y 5% CO₂.

Las secuencias de shRNA utilizados en las células son indicadas a continuación:

Secuencia de la horquilla para shRNA contra Caveolina-1 en células MDA-MB-231, clon #1-5

CCGGCGACGTGGTCAAGATTGACTTCTCGAGAAGTCAATCTTGACCACGTC
GTTTT

Secuencia de la horquilla para shRNA contra Rab5 en células B16-F10, clon #F8

CCGGCGGGCCAAATACTGGAAATAA CTCGAGTTATTTCCAGTATTTGGCCC

GTTTTT

**Secuencia de la horquilla para shRNA contra Rab5 en células HT-29(US),
clon #F10**

CCGGCTGGTCAAGAACGATACCATACTCGAGTATGGTATCGTTCTTGACCA

GTTTTT

Sentido Loop Antisentido

B. MATERIALES

El anticuerpo monoclonal anti-Caveolina-1 (catálogo No: C13620) y el anticuerpo policlonal anti-Caveolina-1 (catálogo No: C610060) se obtuvieron en Transduction Laboratories. El anticuerpo monoclonal anti-Rab5 (catálogo No. sc46692), policlonal anti-Rab5 (catálogo No. sc28570), monoclonal anti-p85 α (catálogo No: sc33585) y policlonal anti-EEA1 (Early Endosome Antigen-1) (catálogo No: sc33585) provienen de Santa Cruz Biotechnology. El anticuerpo policlonal anti-GST proviene de Millipore (catálogo No: AB3282). El anticuerpo monoclonal anti-fosfo-Akt (Ser473) (catálogo No: 9271S) proviene de Cell Signaling Technology. El anticuerpo monoclonal anti-Rac-1 (catálogo No: 610651) proviene de Transduction Lab. El anticuerpo monoclonal anti-mCherry (catálogo 632496) proviene de Clontech. Todos los anticuerpos monoclonales utilizados fueron desarrollados en ratón y todos los anticuerpos policlonales utilizados fueron desarrollados en conejo. Los anticuerpos secundarios anti-ratón y anti-conejo acoplados a la enzima peroxidasa de rábano HRPO y el anticuerpo monoclonal anti-actina (catálogo No: A5316) provienen de Bio-Rad Laboratories.

Los anticuerpos secundarios conjugados con los fluoróforos Alexa Fluor488 y Alexa Fluor568, provienen de Invitrogen (Carlsbad, CA). El Inhibidor de PI3K, LY294002 proviene de Sigma (catálogo No: L9908). El inhibidor de Rac-1 NSC23766 fue obtenido de Santa Cruz Biotechnology (catálogo No: sc-204823). Ambos están diluidos en DMSO, por lo que se utilizó como el vehículo control en los experimentos.

Los plasmidios pLacIOP codificando las variedades de Caveolina-1 wild-type y la mutante Y14F (reemplazo del aminoácido tirosina por el de fenil-alanina) han descritos previamente por trabajos de nuestro laboratorio (Torres, et al., 2007; Urra et al., 2012; Lobos et al., 2013). Los plasmidios pEGFP-C1 codificando Rab5 wild-type, Rab5/S34N (de alta afinidad por GDP) y Rab5/Q79L (actividad GTPásica deficiente) fueron gentilmente facilitados por la Dra. Francisca Bronfman (Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile). En el plasmidio modificado pEGFP-C1-mCherry que codifica para p85 α se le realizó una delección de la secuencia codificante de GFP, y en su lugar lleva sub-clonada la secuencia codificante para mCherry. Este plasmidio fue gentilmente otorgado por el Dr. Dwayne Stupack (Moore UCSD Cancer Center, University of California San Diego, USA).

C. WESTERN BLOT

Los extractos celulares se prepararon en un tampón de lisis que contenía Hepes 20 mM pH 7.4, NP-40 0,02% y SDS 0,1%, además de inhibidores de proteasas

al 1%. Se centrifugó el lisado a 4°C por 2 min a 20000xg para obtener el sobrenadante conteniendo las proteínas. Se cuantificó las proteínas totales de los extractos usando el método del ácido Bicinconínico (BCA). Para la medición se usaron placas de 96 mm y se leyó la absorbancia de las muestras en el equipo de ELISA VersaMax (Molecular Device, Sunnyvale, USA).

Para los experimentos los anticuerpos primarios se utilizaron en las diluciones descritas en la **Tabla 1**.

ANTICUERPO	DILUCIÓN
Caveolina-1	1:3000
β-actina	1:5000
Rab5	1:3000
Tiam-1	1:100
Rac-1	1:3000
p85α	1:500
mCherry	1:2000
GFP	1:2000
GST	1:1000
p-AKT	1:1000

Tabla 1: Dilución anticuerpos utilizados en la tesis.

En la tabla se muestran las diluciones de los anticuerpos utilizados en la tesis. Todos los anticuerpos fueron diluidos en leche descremada al 5% en TBS-Tween 0,05%.

Todos los anticuerpos fueron utilizados en solución de Leche descremada al 5% en TBS-Tween 0,05%. En la electroforesis se cargó 50µg de proteínas totales por carril y la electrotransferencia se realizó durante 1 hora a 100 volts, el bloqueo de las membranas fue durante toda la noche y tanto el anticuerpo primario como secundario se incubaron durante una hora. Los anticuerpos secundarios de cabra anti-IgG de conejo y de cabra anti- IgG de ratón, se usaron en dilución 1:5000 en solución de Leche al 5%. El sistema de revelado fue el EZ-ECL kit de quimioluminiscencia obtenido de Biological Industries. La señal fue detectada por el uso de films de rayos X o mediante el uso de un sistema de quimioluminiscencia modelo Discovery 12iC de Ultralum (Claremont, CA USA). Las bandas obtenidas en los inmunoblot fueron digitalizadas y analizadas mediante el programa ImageJ.

D. ENSAYO DE PRECIPITACIÓN POR AFINIDAD (*PULL-DOWN*) DE RAB5-GTP Y RAC-1-GTP

Esta metodología permite enriquecer desde un extracto celular la fracción activa de Rab5 (Rab5-GTP) y Rac-1 (Rac-1-GTP) al incubar un homogeneizado con una proteína de fusión constituida por la enzima Glutathion-S-Transferasa (GST) fusionada al motivo de unión a Rab5 y Rac-1 en sus formas activas respectivamente. Los dominios de unión son PBD (p21 binding domain) para Rac-1 y R5BD (Rab5 binding domain) para Rab5 y han sido descritos previamente (Torres et al., 2008).

Los ensayos de *pull-down* fueron realizados como se ha reportado previamente (Torres et al, 2008), con algunas modificaciones. Brevemente, las células fueron homogenizadas en una solución isotónica compuesta por HEPES 25 mM (pH 7.4), NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, NP-40 1%, glicerol 10%, DTT 1 mM y una mezcla de inhibidores de proteasas (Benzamidina 100 µg/mL, Antipaina 10 µg/mL, Leupeptina 12,5 µg/mL). Los extractos fueron incubados por 5 minutos en hielo y centrifugados a 10,000xg durante 1 min a 4°C. Los sobrenadantes post-nucleares fueron usados para ensayos de precipitación por afinidad utilizando 30 µg de perlas de Glutathión-Sepharosa precubiertos con GST-R5BD o GST-PBD por condición. Las perlas fueron incubadas con los sobrenadantes por 15 min a 4°C en un agitador rotatorio. Posteriormente, las perlas fueron colectadas, lavadas con tampón compuesto por NP-40 al 0.01% y las muestras fueron solubilizadas, hervidas durante 5 minutos a 100°C y separadas mediante SDS-PAGE para análisis por Western blot.

E. ENSAYO DE MIGRACIÓN POR HERIDA

Para evaluar la migración celular se utilizó el ensayo de cierre de la herida, descrito previamente en trabajos y tesis de nuestro grupo. Se sembró 1×10^5 células B16-F10, MDA-MB-231 y HT-29(US) por cada pocillo en una placa de 24 pocillos. Una vez alcanzada la confluencia de 80%, en 24 h aproximadamente se hizo una herida en cada monocapa de células usando una punta de pipeta amarilla biselada. Se lavó suavemente la monocapa y se agregó 500 µL de medio sin SFB. Se tomó 6 fotografías de cada herida al tiempo 0 h, en un microscopio Olympus CKX41 con objetivo 40X. Luego se agregó 500 µL de

medio con 1% SFB para evaluar el cierre de la herida a las 24 h. El área promedio de cada herida se determinó por medio del programa Image J.

F. ENSAYO DE MIGRACIÓN EN CÁMARA BOYDEN (TRANSWELL)

Los ensayos fueron realizados en cámaras Boyden (Transwell™ Costar, 6.5 mm de diámetro, 8 μm de tamaño de poro). Las cámaras fueron pretratadas con 100 μL de fibronectina (2 μg/mL) a 4°C la noche previa al experimento. Al día siguiente se lavó los insertos con 500 μL de PBS para retirar el exceso de fibronectina y posteriormente se agregó a cada pocillo 500 μL de medio con 10% SFB. Se sembró 100.000 células suspendidas en 100 μL de medio RPMI libre de suero, en la parte superior de cada inserto. Las células fueron incubadas por 4 h a 37°C. Posteriormente, se tiñó y fijó las células con 500 μL de Cristal Violeta/metanol. Se eliminó el exceso de colorante y cuidadosamente se eliminó las células que quedaron en la cara superior del inserto, dejando sólo las que migraron hacia la cara inferior. Luego se cuantificó el número de células que migraron, contando las células de 6 campos distintos y en un aumento de 40x.

G. ENSAYO DE INVASIÓN EN MATRIGEL

Los ensayos de invasión fueron realizados en insertos de Matrigel (BD Biosciences (catálogo No: 354480). Previamente, los insertos fueron rehidratados por 2 h a 37°, luego se agregó 500 μL de medio completo a cada pocillo de la placa de 24. Se sembraron 150.000 células de las tres líneas celulares involucradas en esta tesis: B16-F10, MDA-MB-231 y HT-29 (US) en 500 μL de medio RPMI libre de suero en la cara superior de cada inserto. Las

células fueron incubadas por 22 h a 37°C. Posteriormente, las células que quedaron en la cara superior del inserto (células no invasivas) fueron eliminadas, y las que invadieron el matrigel fueron fijadas por 2 min en metanol frío, para luego ser teñidas con azul de toluidina al 1%. Se extrajo cuidadosamente las membranas de matrigel de cada inserto con un bisturí y se montaron con mowiol en un portaobjetos. Luego se cuantificó el número total de células invasivas en la membrana, utilizando un aumento de 40X en el microscopio.

H. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN (MTS)

Células B16-F10 fueron sub-cultivadas en placas de 96 pocillos, a razón de 1×10^4 células por pocillo. La proliferación celular fue evaluada usando el kit de proliferación MTS (Promega), luego de 24 h de cultivo en medio completo. Para ello, se agregó 20 µl de una mezcla 20:1 de MTS:PMS a cada pocillo. Estos fueron incubados por 1 h a 37°C y la reacción se detuvo por adición de 10 µl de SDS al 10%. Finalmente, se determinó la reducción del compuesto MTS en formazan por medición de la absorbancia a 490nm (lector de ELISA VERSA Max, Molecular Devices).

I. INMUNOPRECIPITACIÓN

La inmunoprecipitación fue realizada según lo descrito previamente por nuestro grupo (Torres et al., 2008, Mendoza et al., 2013). Los extractos celulares se prepararon en un tampón compuesto por Tris-HCl 20mM pH 7,4, NaCl 150 mM, NP-40 e inhibidores de proteasa 1%. Los sobrenadantes obtenidos después de

una centrifugación a 13,000g por 1 min a 4°C y se utilizaron para experimentos de inmunoprecipitación (500 mg de proteína total por ensayo) con el anticuerpo monoclonal de Caveolina-1 inmovilizado en perlas de proteína A/G durante 30 min. Las muestras fueron solubilizadas, hervidas durante 5 minutos a 100°C y separadas mediante SDS-PAGE para análisis por Western blot.

J. ENSAYOS DE METÁSTASIS EN RATONES C57BL/6

Ratones C57BL/6 que se encontraron entre las 8 y las 12 semanas de vida fueron sub-divididos en diferentes grupos, según los tres experimentos realizados para el objetivo 4 de esta tesis. Estos grupos recibieron una inyección intravenosa de 200.000 células, cultivadas en las condiciones antes descritas. El día 21 post inyección se extrajo el pulmón y se fijó en solución de Feketes: 70% etanol, 10% formalina y 5% ácido acético glacial (Ausubel et al., 1996). Una vez fijado el pulmón, se pesó el tejido completo. Luego, se cuantificó el número de nódulos tumorales (en negro) y posteriormente se separó el tejido nodular del parénquima pulmonar y esta masa se pesó registrando las diferencias. Se graficó como el porcentaje de masa tumoral en relación a la masa del pulmón completo.

K. INMUNOFLUORESCENCIA

Las células fueron crecidas sobre cubreobjetos de vidrio de 12mm de diámetro, lavadas con PBS, fijadas con paraformaldehído al 4% en solución PIPES (100mM, pH 6.8, conteniendo KOH 40 mM, EGTA 2 mM y MgCl₂ 2 mM) durante 15 minutos. Las células fueron permeabilizadas con Tritón X-100 al 0.1% en

solución de lavado durante 10 minutos, lavadas 2 veces y luego bloqueadas, con seroalbúmina bovina (BSA) al 1% durante 30 minutos a temperatura ambiental. Las muestras fueron incubadas con anticuerpos primarios, seguido de incubación con los respectivos anticuerpos secundarios marcados con fluoróforos Alexa Fluor. Las muestras fueron visualizadas mediante microscopía confocal, usando un microscopio spinning disk Olympus IX81 o un microscopio confocal Carl Zeiss LSM-Pascal 5.

L. ANÁLISIS DE IMÁGENES

Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal fueron sometidas a deconvolución iterativa utilizando el software Hyugens Profesional, versión 3.7.0p3 (Scientific Volume Imaging, Hilversum, The Netherlands), utilizando funciones de dispersión de punto (PSF) teóricos estimados por el mismo software a partir de los parámetros de adquisición. La razón señal/ruido fue ajustada en cada imagen con el fin de obtener la restauración óptima de las imágenes y el número de ciclos en el proceso de deconvolución se limitó a 40 iteraciones, aunque ninguno de los procesos alcanzó este límite. Finalmente las imágenes fueron recortadas utilizando el software de manipulación de imágenes Adobe Photoshop.

LL. CO-LOCALIZACIÓN

La co-localización fue evaluada en las imágenes deconvolucionadas, obtenidas mediante Microscopía Confocal (Carl Zeiss LSM-Pascal 5). El análisis fue

realizado utilizando el software Image J, por medio del plugin JACoP. Los coeficientes de Manders fueron calculados tomando como referencia al valor de GFP–Rab5 y EEA1 en los experimentos respectivos. En todos los experimentos se analizaron siempre más de 50 células por condición.

M. MEDICIÓN DE TAMAÑO DE ENDOSOMAS

El tamaño de los endosomas fue evaluado en las imágenes deconvolucionadas, obtenidas mediante Microscopía Confocal (Carl Zeiss LSM-Pascal 5). El análisis fue realizado utilizando el software Image J donde los endosomas fueron definidos en término de tamaño. Luego con estos datos se utilizó el software GraphPad Prism 5 (San Diego, CA) para calcular la distribución de porcentajes de endosomas en los intervalos definidos: 0-0.5, 0.5-2.0, 0.5-2.0 μm^2 .

N. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron comparados mediante t test no-pareados utilizando el software GraphPad Prism 5 (San Diego, CA). A menos que se indique lo contrario, al menos 3 experimentos independientes fueron analizados. Un valor $p < 0.05$ fue considerado significativo.

3. RESULTADOS

Los resultados obtenidos de este trabajo de tesis fueron organizados de acuerdo a los objetivos específicos planteados. Por lo tanto, se presentan 3 secciones de resultados: la sección 1, que agrupa al objetivo específico 1, la sección 2 que responde a los objetivos específicos 2 y 3 y la sección 3, que responde al objetivo específico 4.

SECCIÓN 1

CAVEOLINA-1 PROMUEVE LA ACTIVACIÓN DE RAB5 DEPENDIENTE DE p85 α EN CÉLULAS METASTÁSICAS

A. EFECTO DE CAVEOLINA-1 EN LA MIGRACIÓN CELULAR: SELECCIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES METASTÁSICAS.

Un trabajo previo de nuestro laboratorio indica que la expresión de Caveolina-1 en células de melanoma murino B16-F10 promueve la migración celular, mientras que el silenciamiento de Caveolina-1 endógena en células de cáncer de mama MDA-MB-231, reduce la migración celular (Urra et al., 2012). Por lo tanto, se decidió utilizar ambos modelos—con comportamiento metastásico—en el desarrollo de esta tesis. Sin embargo, para complementar nuestros estudios, se investigó un tercer modelo de células metastásicas.

Para esto, se evaluó la línea celular de cáncer de colon no metastásico HT-29(ATCC). También se utilizó la sub-línea HT-29(US), derivada de células HT-29(ATCC), las cuales presentan mayor potencial metastásico (Bender et al., 2000; Torres et al., 2007). Ambas líneas celulares fueron establemente transfectadas con el vector pLacIOP (condición mock) o con el vector pLacIOP-caveolina-1 (condición Cav1), que contiene la secuencia codificante para la proteína. Detalles sobre la caracterización de ambas líneas se encuentran en la sección materiales y métodos.

En el ensayo de migración por herida, que consiste en generar una herida en una monocapa de células y evaluar el cierre de dicha herida a las 24 h, se observó que las células HT-29(ATCC) no mostraron diferencias significativas entre la condición mock (12% de cierre de herida) y la condición Caveolina-1

(12% de cierre de herida) (**Figura 8A**). Sin embargo, la línea celular HT29(US) aumentó su capacidad migratoria en respuesta a la expresión de Caveolina-1, en comparación con la condición Mock (53% versus 34% de cierre de herida) (**Figura 8B**). De esta manera, nos propusimos evaluar los cambios en migración en células HT-29(US) medido por un ensayo de migración en cámara Boyden (transwell).

Los ensayos de migración en transwell consisten en analizar la migración de las células que tuvieron la capacidad de atravesar hacia la cara inferior de un inserto previamente cubierto con fibronectina (2 µg/ml). Mediante este ensayo, se observó que la expresión de Caveolina-1 en células HT-29(US) promueve un aumento a más del doble de la cantidad de células control que migran a través del filtro poroso (**Figura 8C**).

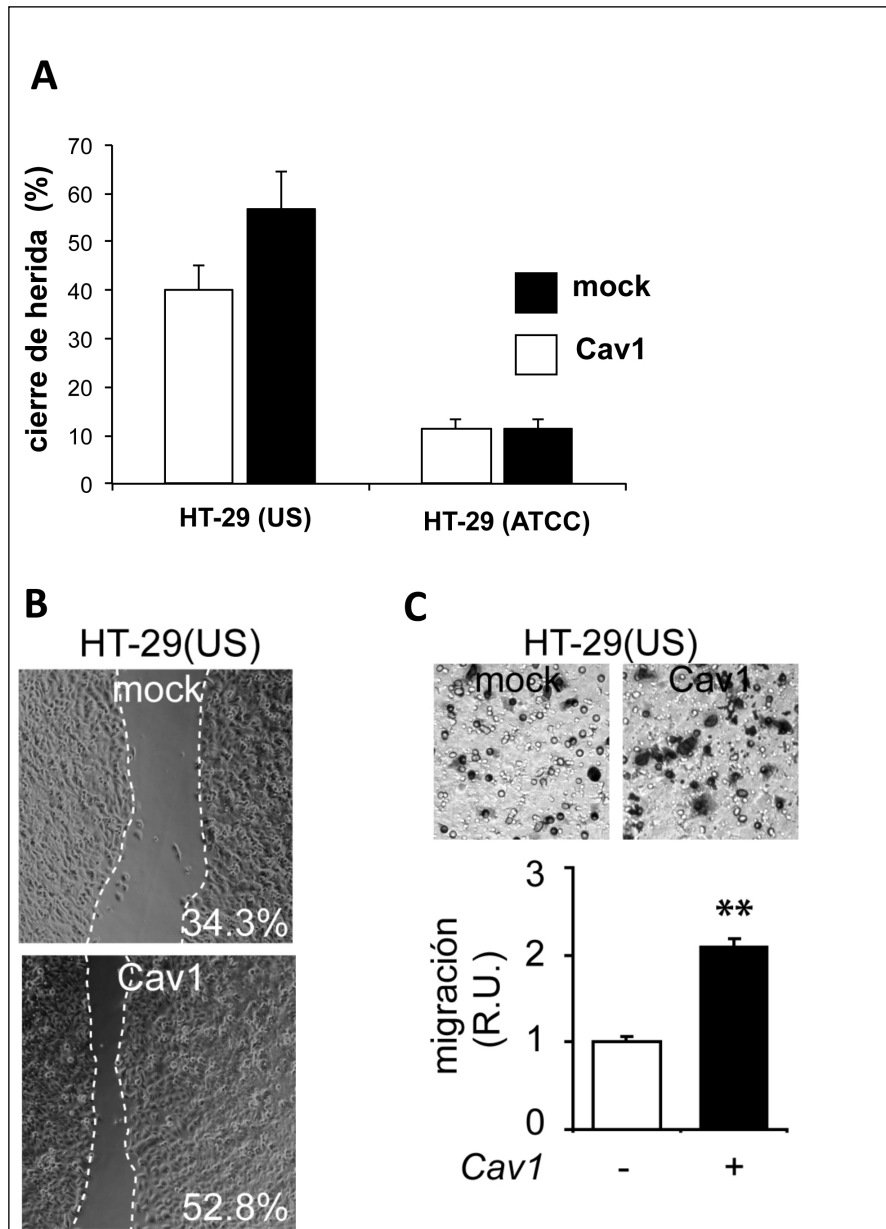


Figura 8: Caveolina-1 aumenta la migración en células HT-29(US) pero no en células HT-29 (ATCC)

A. Ensayo de migración por herida: células HT-29(US) (mock, Cav1) y células HT-29(ATCC) (mock, Cav1) fueron crecidas medio DMEM High Glucosa suplementado con 10% SFB y sembradas en placas de 24 pocillos en una cantidad necesaria para que luego de 24 h alcancen una confluencia cercana al 90%. Luego se procedió a realizar una herida con una punta de pipeta al centro de la placa, durante el ensayo se mantuvieron las células en medio 1% suero y se obtuvieron fotografías que se registraron como tiempo inicial. Luego de 24 h en cultivo se procedió a fotografiar los mismos sectores y se realizó el análisis densitométrico, calculando el porcentaje de cierre de herida como el cociente entre el área final y el área inicial, en cada caso. **B.** La fotografía muestra una figura representativa del ensayo de herida en células HT-29(US) con los respectivos valores del porcentaje de cierre de herida luego de 24h **C. Ensayo de migración en insertos (transwell):** Se sembraron 50.000 células HT-29(US) (mock, Cav1) por inserto suspendidas en 500 μ l de medio DMEM High Glucosa 0% SFB. La cara inferior de la membrana del inserto fue previamente incubada con fibronectina (2 μ g/ml), la cual sirve como estímulo quimioattractante para las células. Se dejó migrar por 2h y posteriormente se cuantificó el número de células de 6 campos diferentes en un microscopio con contraste de fases. La migración celular se muestra expresada como veces de aumento con respecto a las células control HT-29(US)M1, lo que se expresa como Unidades Relativas (R.U). Todas las figuras representan al valor promedio \pm error estándar de tres experimentos independientes (** $p < 0,01$).

Nota: los análisis de expresión de Caveolina-1 en estas células se muestran en las figuras 10 y 11.

De esta manera, teníamos tres modelos celulares con alto potencial metastásico, MDA-MB-231, HT-29(US) y B16-F10, donde Caveolina-1 promueve la migración celular.

B. NIVELES DE CAVEOLINA-1 Y RAB5 EN CÉLULAS B16-F10, HT-29(US) Y MDA-MB-231.

Con la finalidad de evaluar la expresión de Caveolina-1 y Rab5 en nuestros modelos de estudio, y determinar la relación que existe respecto al potencial metastásico, se realizaron western blots comparativo entre las líneas celulares B16-F0 (bajo potencial metastásico), B16-F10 (alto potencial metastático), HT-29(US) (alto potencial metastático), HT-29 (ATCC) (bajo potencial metastático), y además se incorporó a las células de cáncer de mama metastásico MDA-MB-231 que expresan altos niveles de Caveolina-1. Interesantemente, en células con bajo potencial metastático (HT-29 (ATCC) y B16-F0) los niveles de proteína Rab5 fueron menores que en su contraparte altamente metastáticas (HT-29 (US) y B16-F10) lo que se observa en la **Figura 9**. Se utilizaron los niveles de Rab5 en MDA-MB-231 como unidad de referencia para graficar estos resultados.

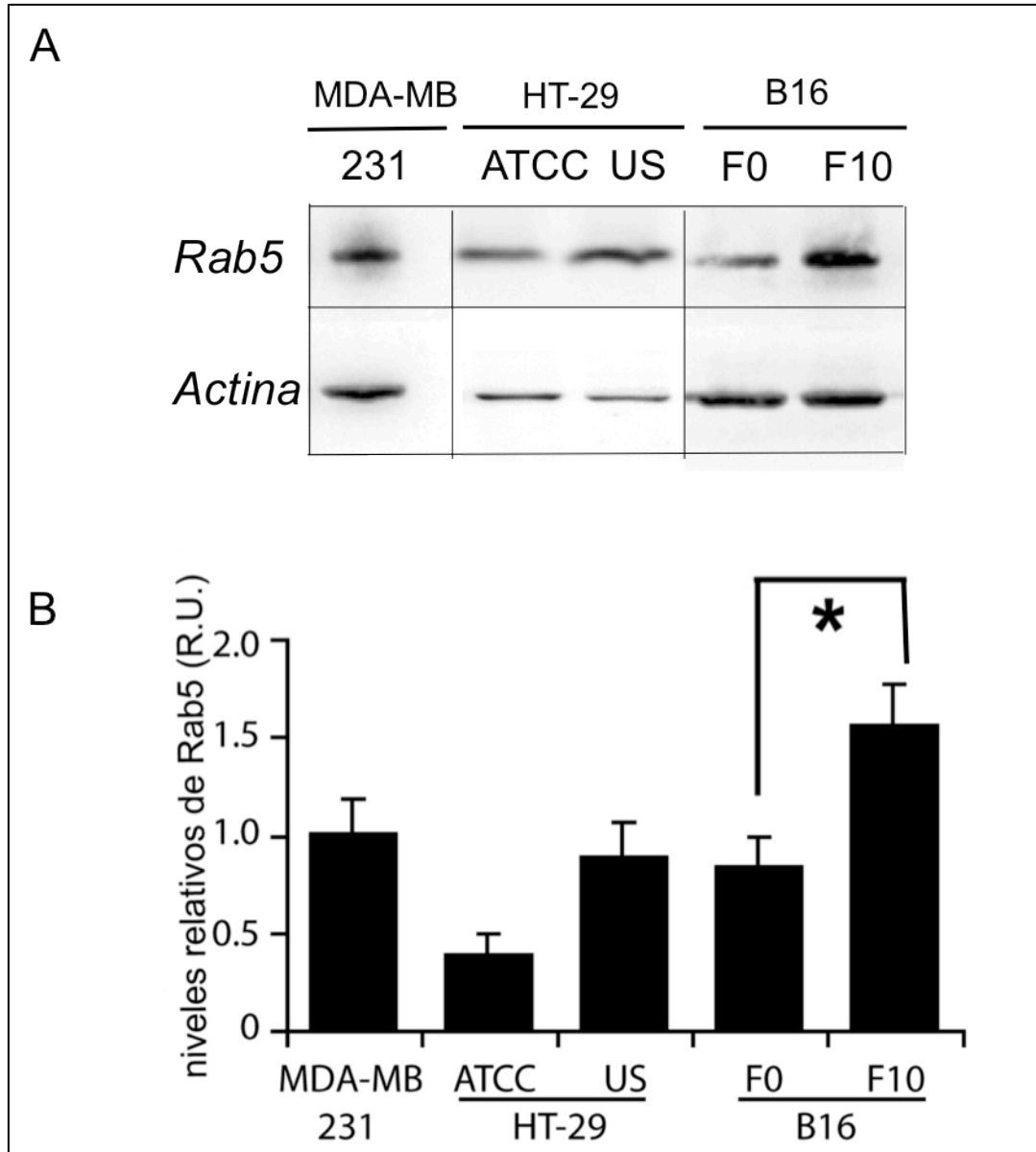


Figura 9: Expresión comparativa de Rab5 en líneas celulares de cáncer con alto y bajo potencial metastásico.

Células HT-29(US) y B16-F10 de alto potencial metastásico y células HT-29 (ATCC) y B16-F0 de bajo potencial metastásico, además de células MDA-MB-231 fueron crecidas en sus medios respectivos suplementados con 10% SFB. Posteriormente, se obtuvieron extractos celulares y se realizó un ensayo de Western Blot según descrito en materiales y métodos. Se analizaron los niveles totales de Rab5 y los niveles relativos se normalizaron por la actina. En **A.** se muestra un Western Blot representativo. En **B.** se muestra la densitometría de 3 experimentos independientes. Los datos se expresaron como unidades relativas con respecto a los niveles Rab5 en células MDA-MB-231 (media \pm SEM). (* $p < 0,05$).

Según lo dicho anteriormente, incorporamos la línea celular derivada de cáncer de mama MDA-MB-231 que expresa altos niveles de Caveolina-1, los cuales fueron silenciados mediante estrategia de infección lentiviral con *Short Hairpin* RNA específicos para la secuencia de Caveolina-1. Así se obtuvo las sub-líneas MDA-MB-231 sh-Control (sh Ctrl) y sh-Caveolina-1 (sh Cav-1).

En la **Figura 10** es posible observar los niveles de las proteínas Caveolina-1 y Rab5 en los tres modelos utilizados para esta investigación.

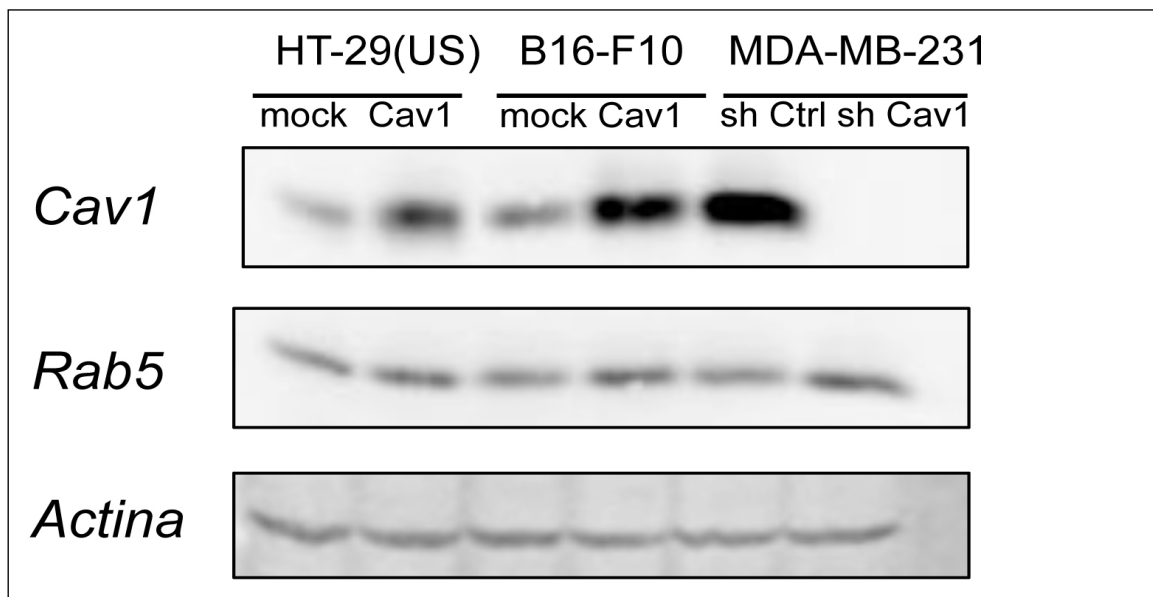


Figura 10: Niveles de Caveolina-1 y Rab5 en células HT-29 (US), B16-F10 y MDA-MB-231

Células HT-29(US) (clones M1,C14), B16-F10 (mock, Cav-1) y MDA-MB-231 (shCtrl, sh Cav-1) fueron crecidas sus medios respectivos suplementados con 10% SFB. Posteriormente, se obtuvieron extractos celulares y se realizó un ensayo Western Blot SDS-PAGE en geles al 12 % (50 µg por carril). Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa, bloqueadas e incubadas con anticuerpos primarios específicos. Después de lavar se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a HRP y se usó el método de quimioluminiscencia ECL para detectar la señal. Este es un resultado representativo, evaluando los niveles de las proteínas Caveolina-1, Rab5 y Actina.

C. CAVEOLINA-1 PROMUEVE LA ACTIVACIÓN DE RAB5 EN LAS LÍNEAS CELULARES METASTÁSICAS HT-29(US), B16-F10 Y MDA-MB-231.

Para medir la activación de Rab5 en presencia de Caveolina-1, utilizamos un ensayo de *pull-down* usando la proteína de fusión GST-R5BD, la cual contiene el dominio de unión a Rab5-GTP (R5BD), clonado desde la proteína Rabaptina 5 (Torres et al., 2008). Para precipitar el complejo, una vez homogenizadas las células, se ponen en contacto con la proteína de fusión y esferas de glutatión-sepharosa. Este ensayo ha sido ampliamente descrito y proporciona una importante herramienta para estudiar la actividad de proteínas GTPasas como Rab5 (Zerial et al., 1993; Torres et al., 2008). Los resultados muestran que la expresión de Caveolina-1 en células HT- 29(US) y B16-F10 incrementa los niveles de Rab5 activo de manera significativa (Ver **Figura 11 A y B**). A su vez, el silenciamiento de Caveolina-1 endógena en células de cáncer de mama MDA-MB-231 reduce en forma significativa a los niveles de Rab5-GTP (Ver **Figura 4C**). Estos resultados confirman que Caveolina-1 promueve la activación de Rab5 en tres modelos metastásicos distintos: cáncer de colon HT-29(US), cáncer de mama MDA-MB-231 y melanoma murino B16-F10.

Presentamos los resultados obtenidos tanto para cada una de estas líneas celulares, junto a sus respectivos análisis densitométricos, en una repetición de tres ensayos independientes (Figura **11 A, B y C**).

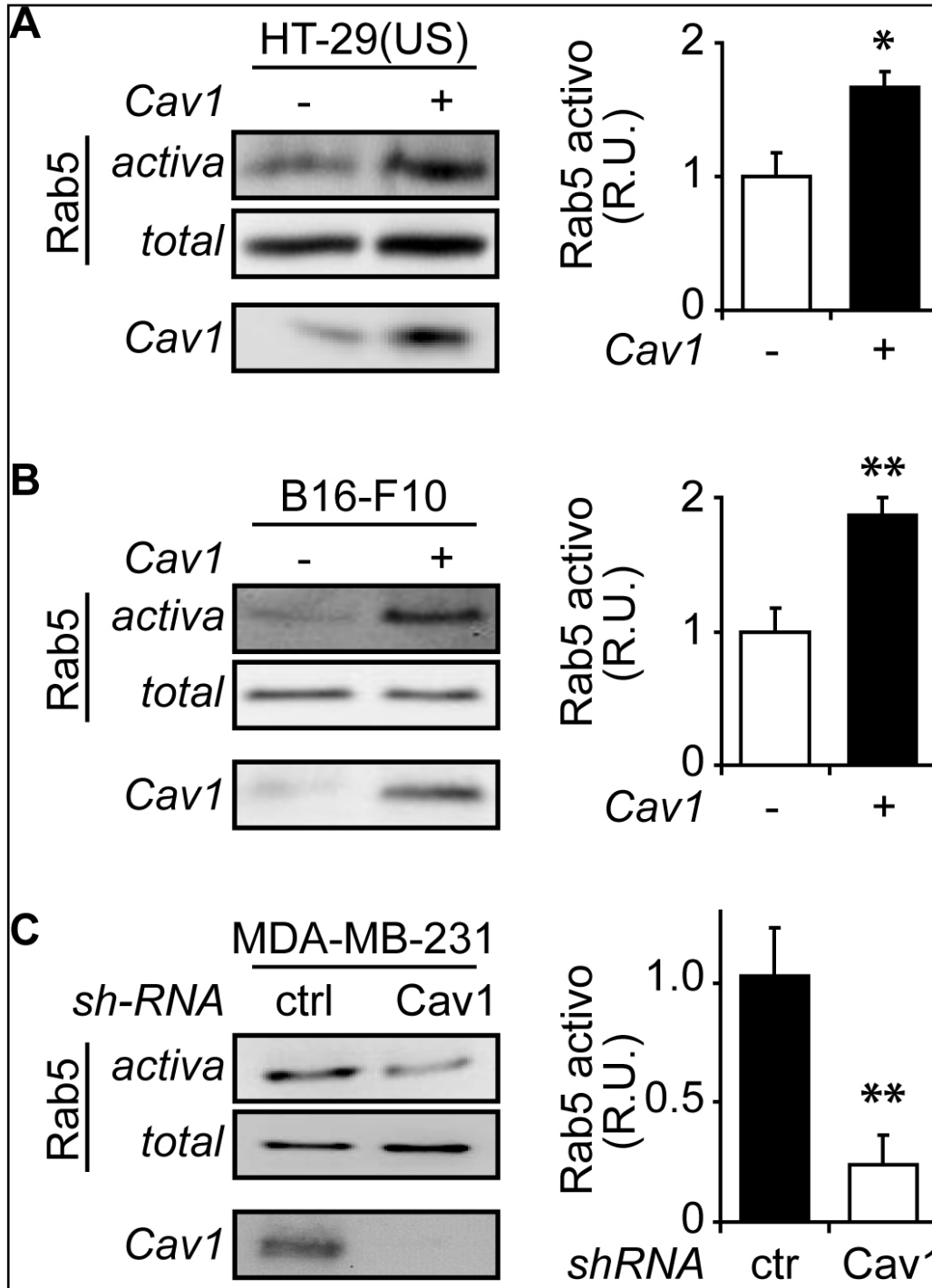


Figura 11: Caveolina-1 activa a Rab5 en las líneas celulares HT-29(US), B16-F10 y MDA-MB-231

Células HT-29(US) (clones M1,C14), B16-F10 (mock, Cav-1) y MDA-MB-231 (shCtrl, sh Cav-1) fueron crecidas en sus medios respectivos suplementados con 10% SFB. Posteriormente, se obtuvieron extractos celulares y se realizó el ensayo *pull-down* con la proteína de fusión R5BD-GST según descrito en materiales y métodos. En **A**, **B** y **C** se muestra un Western Blot representativo y la densitometría de 3 experimentos independientes de *pull-down* R5BD (promedio +/- error estándar) en células HT-29(US), B16-F10 y MDA-MB-231, respectivamente. R.U. expresa las veces de aumento en relación a sus respectivos controles. Rab5 fue detectada mediante Western Blot según se explica en materiales y métodos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

D. CAVEOLINA-1 PROMUEVE UN AUMENTO EN EL TAMAÑO DE LOS ENDOSOMAS TEMPRANOS.

El tamaño de los endosomas tempranos fue evaluado por ensayos de inmunofluorescencia en células B16-F10 (mock, Cav1), utilizando anticuerpos dirigidos contra Rab5 y el antígeno endosomal temprano (EEA1). Se analizó el porcentaje de la frecuencia de endosomas EEA1-positivos de diferentes tamaños, utilizando el programa Image J (para detalles ver la sección materiales y métodos). Consideramos tres intervalos de tamaño divididos de la siguiente manera: 0-0.5, 0.5-2.0, >2.0 μm^2 . Como se muestra en la **Figura 12**, la expresión de Caveolina-1 aumenta el porcentaje de endosomas de mayor tamaño llegando hasta a un promedio de 3.5 μm^2 de superficie. Estas observaciones sugieren que Caveolina-1 promueve la acumulación de endosomas grandes, presumiblemente por la activación sostenida de Rab5. Sin embargo, en este escenario no podemos excluir la posibilidad de que Caveolina-1 bloquee el proceso de maduración del endosoma. Esta posibilidad se analizará con mayor profundidad en la sección de **Discusión**.

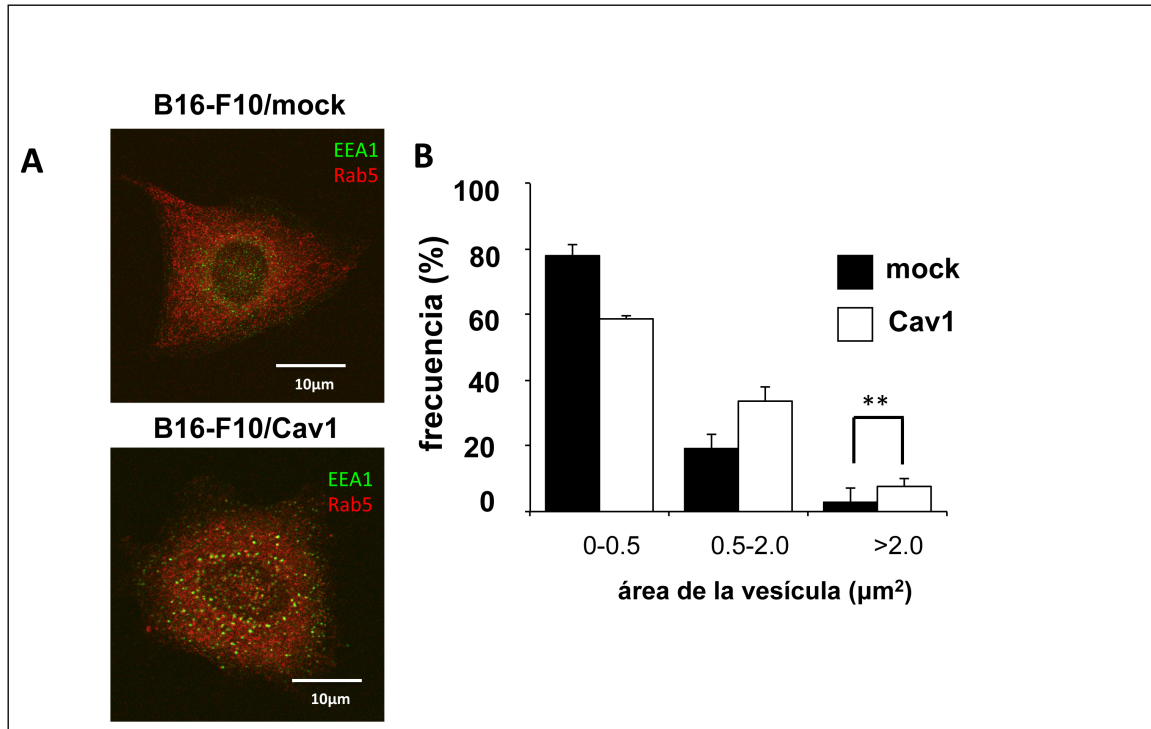


Figura 12: Caveolina-1 promueve un aumento en el tamaño de endosomas tempranos.

Células B16-F10 (mock, Cav-1) fueron crecidas sobre cubreobjetos en su medio respectivo suplementado con 10% SFB durante 24 h las muestras fueron fijadas y teñidas con anticuerpo anti-EEA1(verde) y anticuerpo anti-Rab5 (rojo). Las muestras se analizaron por microscopía confocal. El tamaño de las vesículas fue calculado con el software Image J (ver detalles en materiales y métodos). Tres categorías de diferentes tamaños (0-0.5, 0.5-2.0, 0.5-2.0 μm²) fueron distinguidas y comparados. Los gráficos corresponden al valor promedio de las frecuencias totales de endosomas entre los rangos de tamaños. Se analizaron al menos 100 células por condición. En **A**. Se muestran imágenes representativas del experimento y en **B**. Se observa la cuantificación de 3 experimentos (**p<0,01).

Por otro lado, se cuantificó el grado de co-localización entre Rab5 y EEA1 (como marcador constitutivo de endosomas tempranos) para evaluar si el aumento en el tamaño de endosomas tempranos se traduce también en una mayor tasa de estabilización de Rab5 por Caveolina-1. El análisis no arrojó diferencias significativas entre las condiciones mock y Cav1 (**Figura 13**).

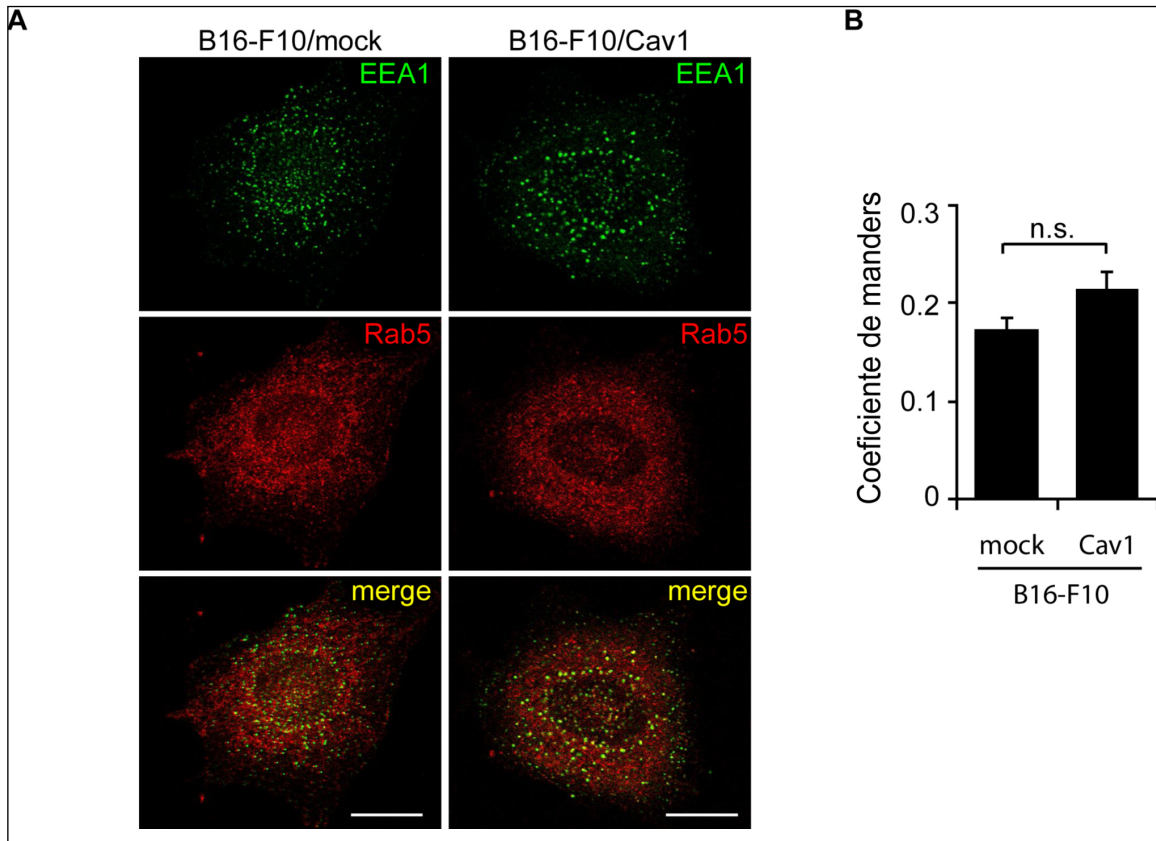


Figura 13 : Caveolina-1 no promueve la estabilización de Rab5 en endosomas tempranos. Células B16-F10 (mock, Cav-1) fueron crecidas sobre cubreobjetos en su medio respectivo suplementado con 10% SFB durante 24 h las muestras fueron fijadas y teñidas con anticuerpo anti-EEA1(verde) y anticuerpo anti-Rab5 (rojo). Las muestras se analizaron por microscopía confocal y las imágenes representativas se muestran en **A**. Se muestran imágenes representativas y la barra de magnificación que representa una distancia de 10 μ m. **B** La gráfica representa los coeficientes de Manders y se calcularon con el software Image J. Se muestra el promedio +/- error estándar de 3 experimentos. No se obtuvieron diferencias significativas.

Estos resultados sugieren que la activación de Rab5 por Caveolina-1 no se debe a una estabilización de Rab5 en endosomas tempranos, y que probablemente se debe a un mecanismo indirecto, involucrando a reguladores del ciclo activación/inactivación de la proteína. Con este razonamiento, realizamos un análisis de los posibles GEF's y GAP's de Rab5 donde p85 α , la sub-unidad reguladora de las PI3K de clase I, resultó ser un candidato

interesante, por antecedentes que sugieren su interacción con Caveolina-1 como se observa en la **Tabla 2**.

Rab5-GEF	Rol en migración Celular	Referencia	Interacción/ asociación con Caveolina-1	Referencia
RIN1	RIN1 reduce el efecto de la señalización de Receptores de Tirosina Quinasa (RTK) y disminuye la migración celular	Hu et al., 2008	—	
	La fosforilación de la serina 292 de RIN1 inhibe la migración celular modulada por Abl.	Ziegler et al., 2011	—	
RIN2	RIN2 forma un complejo con R-Ras y Rab5 para controlar la adhesión celular endotelial, la endocitosis de integrinas y la activación de Rac-1.	Sandri et al., 2012	—	
RIN3	RIN3 es un Rab5-GEF que previene la migración celular.	Janson et al., 2011	—	
ALS2/Alsln	ALS2 es reclutado a ruffles de membrana a través de la activación de Rac-1.	Kunita et al., 2007	—	
	Alsln es un GEF para Rab5 y Rac1 y colocaliza con Rac-1 a los ruffles de membrana y lamelipodios.	Topp et al., 2004	—	
Rab5-GAP				
RN-Tre	Rab5 se propone como una GTPasa involucrada en el remodelamiento de actina. RN-Tre tiene actividad GAP sobre Rab5.	Lanzetti et al., 2000	—	
p85 α	p85 α es escuestrada por Caspasa-8 fosforilada. La fosforilación de Caspasa 8 es seguida por la activación de Rab5 y la migración celular.	Torres et al., 2008, 2010	formación de complejo proteico con Cav-1 en células AGS	Faulstich et al., 2013
p120RasGAP	La disminución de 120RasGAP aumenta la migración celular y atenúa el reciclaje de integrinas.	Mai et al., 2011	—	
	p120RasGAP se asocia en un complejo con p190RhoGAP y la Quinasa de Adhesión Focal (FAK) para regular la polarización celular.	Tomar et al., 2009	—	
	p120RasGAP promueve la activación de c-Src y la invasión tumoral.	Chan et al., 2012	—	
TSC2	La inhibición de TSC2 aumenta la expresión de la integrina $\alpha 1$ y reduce la migración celular.	Moir et al., 2012	—	
	Células de fibroblasto knock-out para TSC2 reducen la migración celular, y la activación de Cdc42 y Rac1.	Larson et al., 2010	—	
	TSC2 inhibe la migración celular regulando la actividad de RhoA.	Goncharova et al., 2006	—	

Tabla 2: GEF's y GAP's de Rab5 involucrados en la migración celular.

La tabla muestra los diferentes GEF's y GAP's de Rab5 involucrados en la migración celular. De estos reguladores se documenta su relación con Caveolina-1. Modificado de Mendoza et al., 2014 (Review).

En este contexto, es importante evaluar la regulación de la hidrólisis de Rab5-GTP por p85 α como ha sido estudiada en el contexto de migración celular anteriormente (Chamberlain et al., 2004, Torres et al., 2008).

E. CAVEOLINA-1 PROMUEVE LA ACTIVACIÓN DE RAB5 A TRAVÉS DEL RECLUTAMIENTO DE P85 α .

La proteína p85 α es particularmente interesante, ya que además de ser un GAP de Rab5, también previene la migración celular dependiente de Rab5 (Chamberlain et al., 2004, Torres et al., 2008). A su vez, en un reciente trabajo se demostró que p85 α se une *in vitro* en un mismo complejo proteico con Caveolina-1 en células de cáncer gástrico AGS (Faulstich et al., 2013) como se destaca en la **Tabla 2**. Con estos antecedentes, se evaluó la asociación de p85 α con Caveolina-1, así como el efecto de p85 α en la activación de Rab5 y la migración celular en ensayos de inmuprecipitación, *pull-down* y migración por transwell respectivamente.

En primer lugar, mediante inmunoprecipitación en células HT-29(US), se observó que p85 α se asocia en un complejo proteico con Caveolina-1 (**Figura 14 A**). Del mismo modo, en células B16-F10-Cav1, se realizó una transfección transitoria de las construcciones mCherry (-) y mCherry-p85 α (+) con el objetivo de verificar si Caveolina-1 se asocia con p85 α ectópicamente expresada. Así se observó que Caveolina-1 se asocia con mCherry-p85 α pero no con mCherry solo

(Figura 14 B). Estos resultados siguen una asociación en complejos proteicos entre Caveolina-1 y p85 α en modelos de células HT-29(US) y B16-F10.

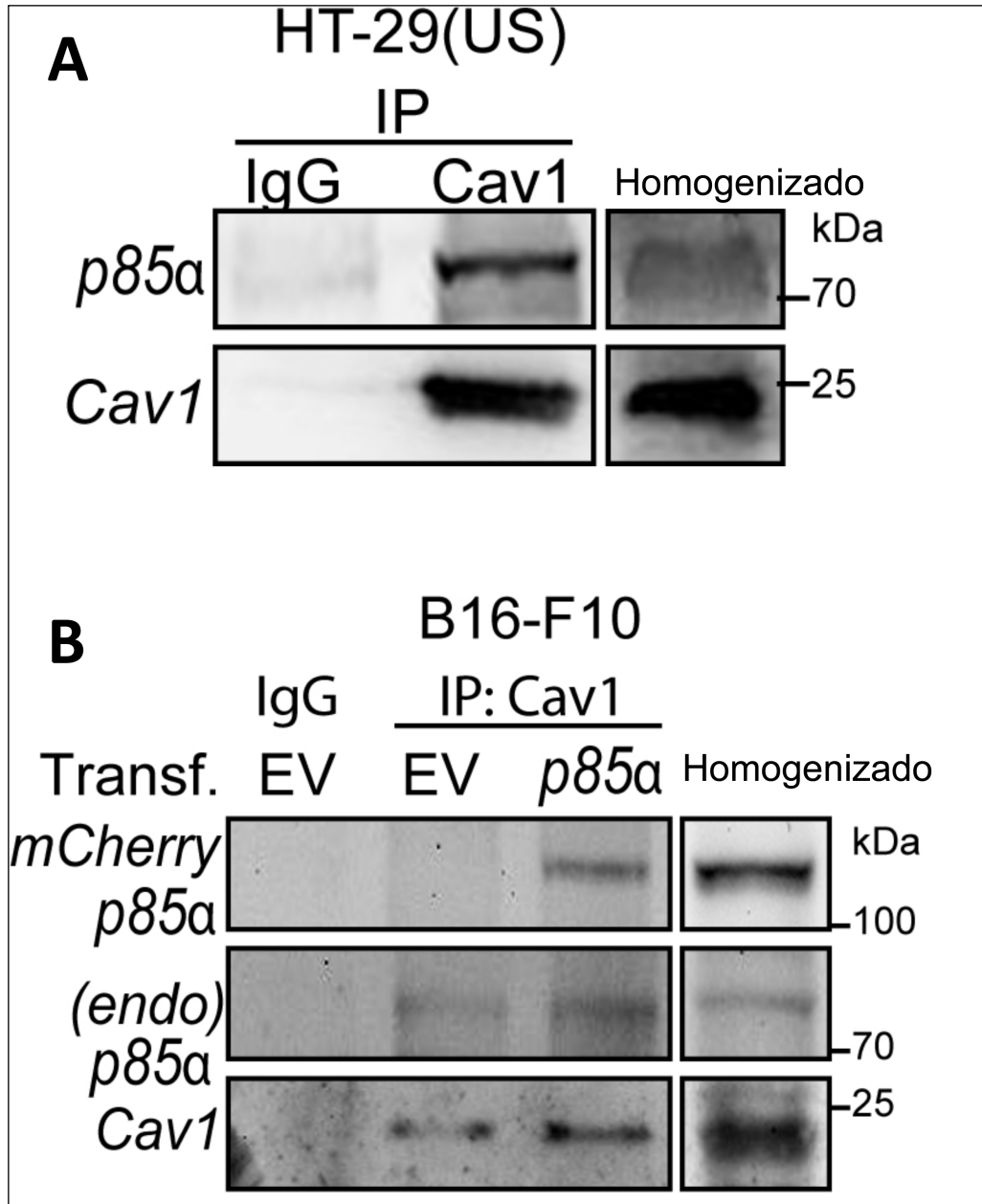


Figura 14: Caveolina-1 co-inmunoprecipita con p85 α en células HT-29(US) y B16-F10.

A. Células HT-29(US) (clon C14: Cav1) fueron crecidas en sus medios respectivos suplementado con 10% SFB. Posteriormente, se obtuvieron extractos celulares y se realizó una inmunoprecipitación con el anticuerpo policlonal contra Cav1, según lo descrito en materiales y métodos. Las proteínas p85 α y Cav1 fueron detectadas mediante Western Blot. Para detectar el homogenizado celular se cargaron 50 μ g de proteínas. IgG representa un anticuerpo irrelevante como control, anti-GFP. La imagen es representativa de 2 experimentos independientes. **B.** Células B16-F10 (Cav-1) fueron transfectadas con el vector mCherry-p85 α por 24h. Posteriormente se obtuvieron extractos celulares y se realizó una inmunoprecipitación de la misma manera que en **A**. La imagen es representativa de 2 experimentos independientes.

F. LA EXPRESIÓN DE P85 α DISMINUYE LA ACTIVACIÓN DE RAB5 POR CAVEOLINA-1 EN CÉLULAS B16-F10.

Para evaluar si la expresión de p85 α en células B16-10 interfiere con la activación Rab5 dependiente de Caveolina-1, se realizó un ensayo de *pull-down* R5BD-GST en células transfectadas con mCherry (-) o mCherry-p85 α (+). Los resultados demuestran que Caveolina-1 promueve la activación de Rab5, induciendo un aumento de 2,2 veces de la forma Rab5-GTP, mientras que la expresión de p85 α disminuye los niveles de Rab5-GTP en células B16-F10 que expresan Caveolina-1 (**Figura 15**). Bajo estas mismas condiciones, se realizaron ensayos de migración por transwell, tanto con células B16-F10 como células MDA-MB-231 transfectadas transitoriamente con las construcciones mCherry (-) o mCherry-p85 α (+). Se observó que la expresión de p85 α reduce la migración celular inducida por Caveolina-1 en ambas líneas celulares (**Figura 16**). Estos resultados sugieren que p85 α regula la activación de Rab5 y la migración celular inducida por Caveolina-1.

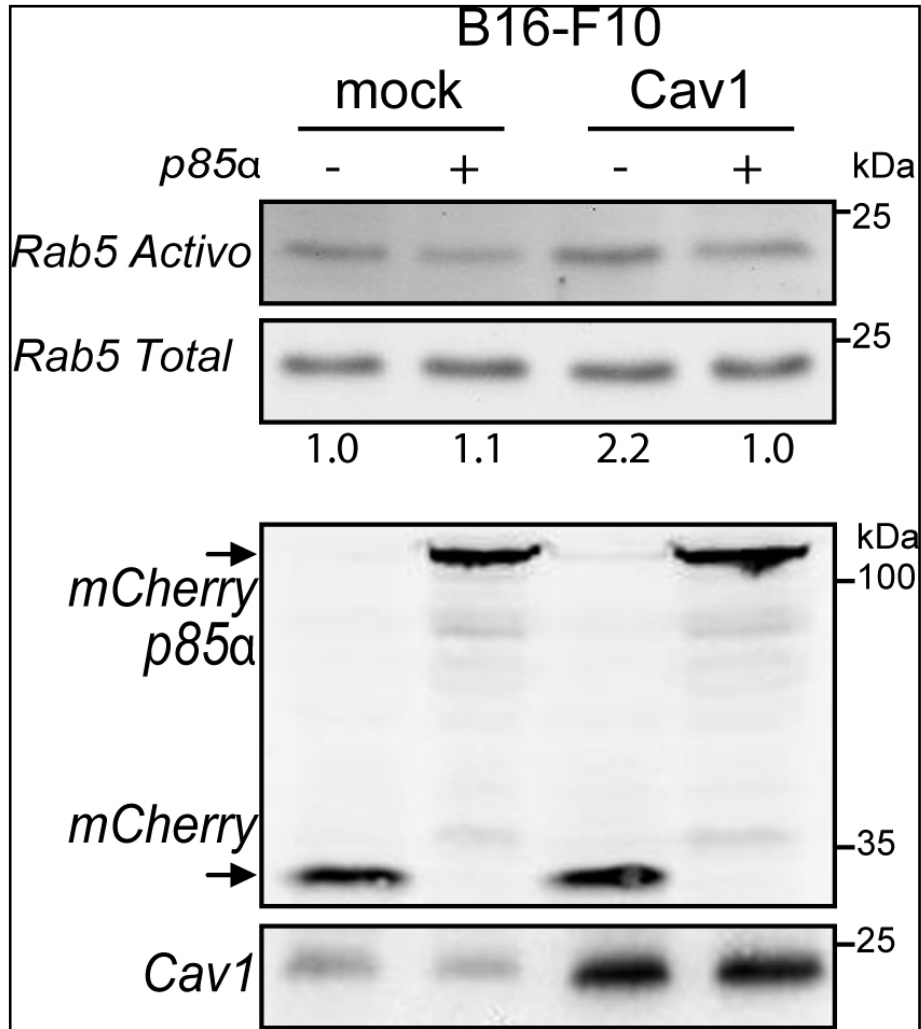


Figura 15: La expresión del Rab-GAP *p85α* disminuye la activación de Rab5 por Caveolina-1 en células B16-F10

Células B16-F10 (Cav-1) fueron transfectadas con el vector mCherry-*p85α* y su control vacío, crecidas en su medio respectivo suplementado con 10% SFB por 24h posteriormente se obtuvieron los extractos celulares y se realizó un ensayo *pull-down* con la proteína de fusión R5BD-GST según descrito en materiales y métodos. Las proteínas Rab5 *p85α*, Cav1 y mCherry fueron detectada mediante Western Blot. Los niveles de Rab5-GTP fueron cuantificados por densitometría y normalizadas contra Rab5 total (números bajo la imagen). Los resultados fueron los siguientes: B16-F10(mock/mCherry-*p85α*) ($1,1 \pm 0,8$), B16-F10(Cav1/mCherry) ($2,2 \pm 0,7$) y B16 F10(Cav1/mCherry-*p85α*) ($1,0 \pm 0,3$). En el panel inferior se muestra la expresión de mCherry/mCherry-*p85α*. Estos resultados fueron obtenidos de cuatro experimentos independientes.

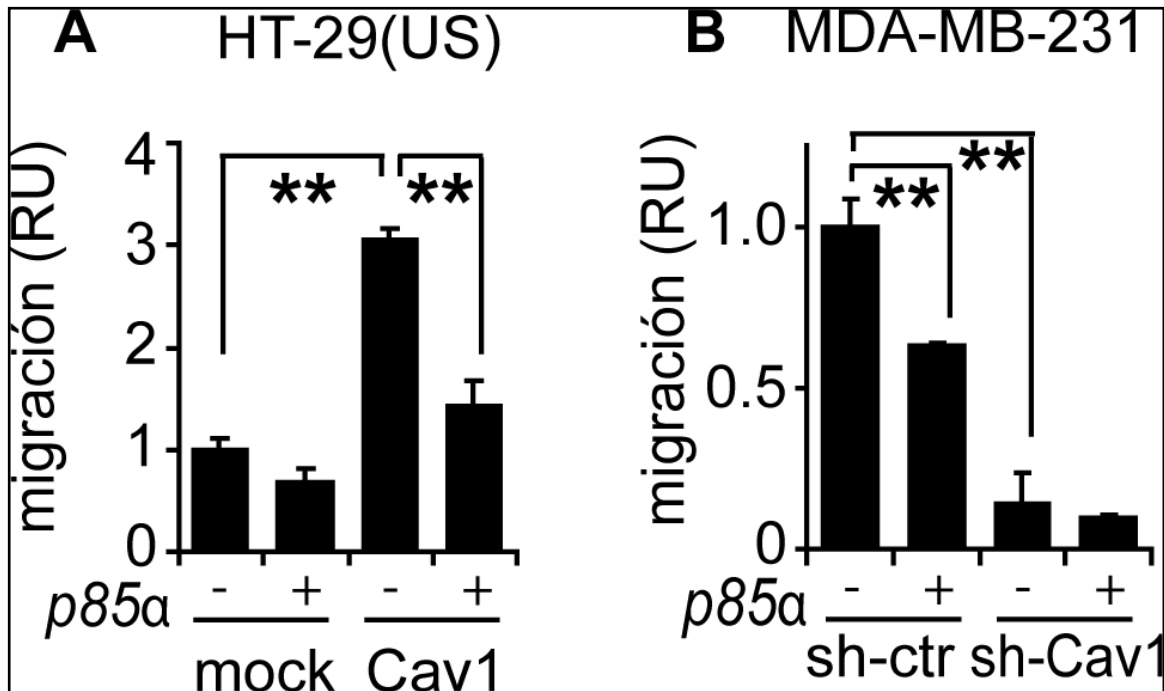


Figura 16: La expresión de p85 α disminuye la migración celular inducida por Caveolina-1 en células HT-29(US) y MDA-MB-231

Células HT-29(US) (clones M1,C14), MDA-MB-231 (shCtrl, sh Cav1) fueron transfectadas con el vector mCherry-p85 α y su control vacío, crecidas en su medio respectivo suplementado con 10% SFB por 24h. Se sembraron 50.000 células HT-29(US) (clones M1,C14) y MDA-MB-231 (shCtrl, sh Cav1) por inserto suspendidas en 500 μ l del medio 0% SFB. La cara inferior de la membrana del inserto fue previamente incubada con fibronectina (2 μ g/ml). Se dejó migrar las células por 2 h y posteriormente se cuantificó el número de células de 6 campos diferentes en un microscopio con contraste de fases. La migración celular se muestra expresada como veces de aumento con respecto a las células control HT-29(US)M1 y MDA-MB-231 shCtrl, (R.U). Todas las figuras corresponden al valor promedio \pm error estándar de tres experimentos independientes (**p<0,01).

De esta manera, podemos sugerir que la interacción de p85 α con Caveolina-1 activa a Rab5, estimulando la migración y un aumento en el tamaño de endosomas temprano en células metastásicas.

Estos resultados se esquematizan en la **Figura 17**, que representa un resumen de los resultados obtenidos hasta este objetivo.

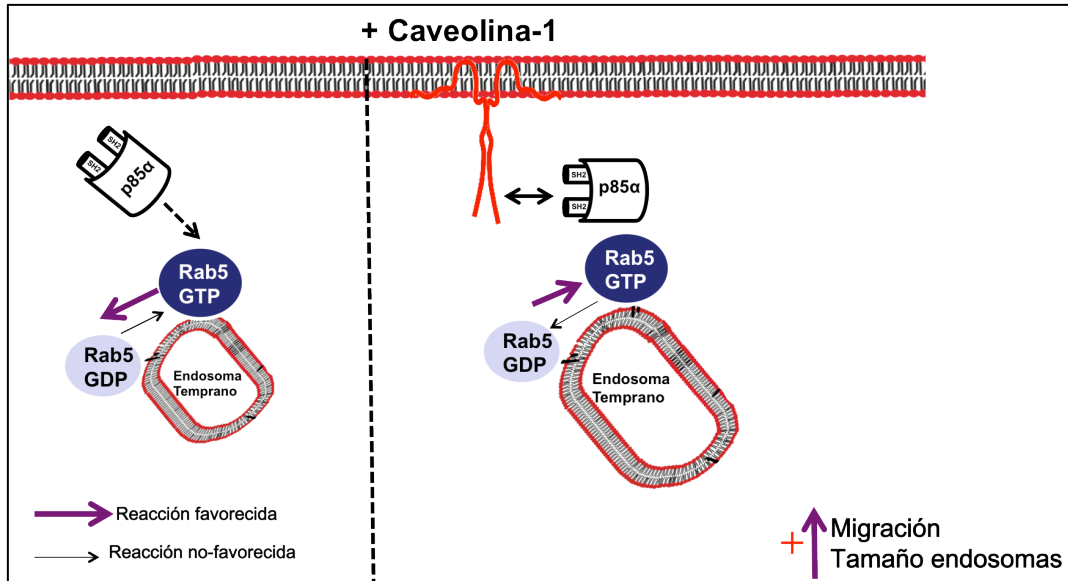


Figura 17: Caveolina-1 recluta a p85 α promoviendo un aumento en la activación de Rab5, un aumento en el tamaño de los endosomas tempranos y en la migración celular
 El siguiente esquema muestra un resumen de los resultados obtenidos en la sección 1 de esta tesis.

G. CAVEOLINA-1 PROMUEVE LA ACTIVACIÓN DE RAB5 DE MANERA INDEPENDIENTE DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE PI3K.

La proteína p85 α es la subunidad reguladora de las PI3K de Clase I, compuesta además por una subunidad catalítica llamada p110. Por lo tanto, una interrogante que surgió era averiguar si p85 α requiere de la actividad catalítica de PI3K para ejercer su efecto GAP sobre Rab5. Con esto se respondería si p110 es necesaria para la activación de Rab5 por Caveolina-1. Para ello, se utilizó un inhibidor comercial de las PI3K, LY294002 a una concentración de 10 μ M. Como una manera de controlar la efectividad del inhibidor se verificó la fosforilación de AKT en serina 473, dado que es un blanco molecular de esta

vía. Se realizó un pre-tratamiento con el inhibidor por 1h y posteriormente Rab5-GTP se midió en ensayos de *pull-down* R5BD (**Figura 18**).

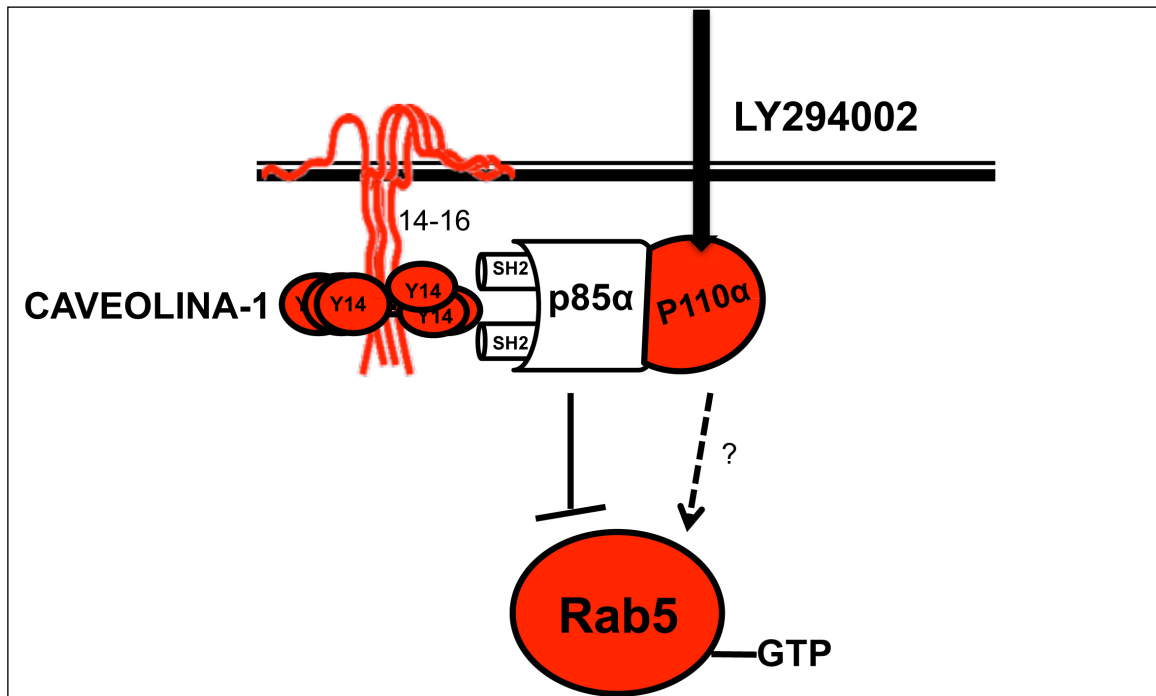


Figura 18: El siguiente esquema representa la estrategia experimental para determinar si la activación de Rab5 por Caveolina-1 es un mecanismo dependiente de la actividad catalítica de PI3K. Se muestran los oligómeros de 14-16 moléculas según descrito por literatura (Quest et al., 2008)

Se observó que el tratamiento con LY294002 no interfirió con la activación de Rab5 por Caveolina-1, indicando que Caveolina-1 no requiere de la actividad catalítica de PI3K para promover la activación de Rab5 (**Figura 19**).

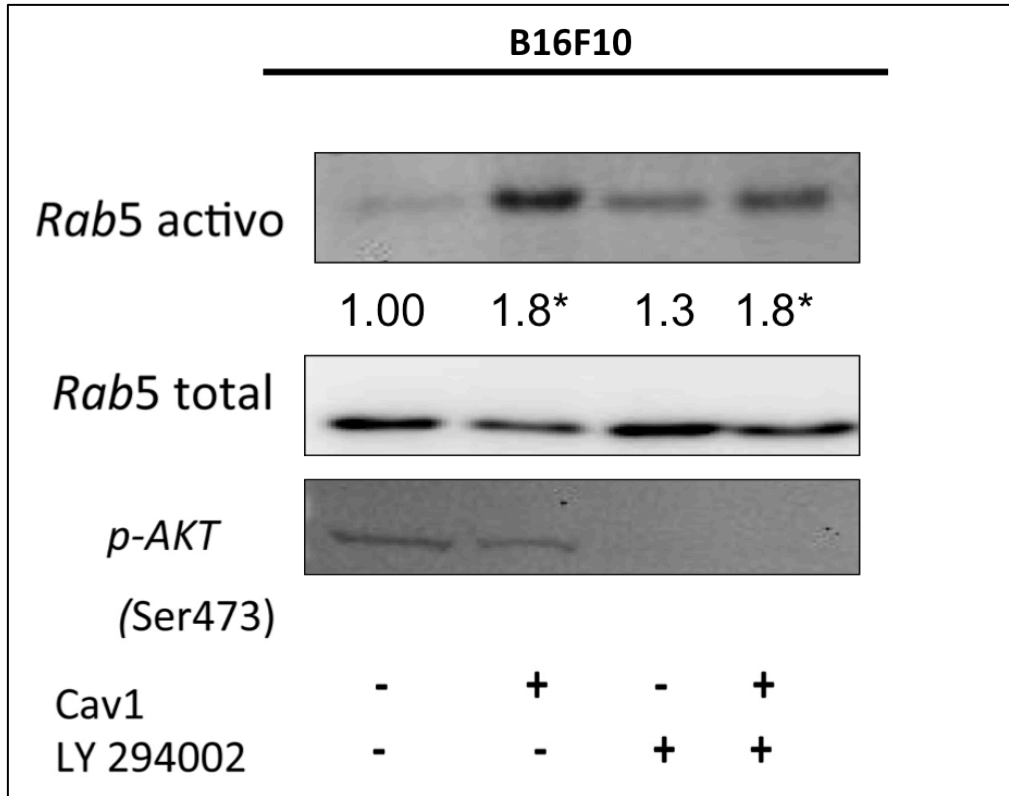


Figura 19: Caveolina-1 promueve la activación de Rab5 en un mecanismo independiente de la actividad catalítica de PI3K

Células B16-F10(mock, Cav-1) fueron crecidas en su medios respectivo suplementado con 10% SFB. Posteriormente las células fueron tratadas con el inhibidor de PI3K LY294002 a una concentración de 10 μ M por 60 minutos con su vehículo control respectivo (DMSO). Luego de esto se realizaron experimentos de *pull-down* con la proteína R5BD-GST) según descrito en materiales y métodos.

Los números bajo la figura representan el valor residual de Rab5-GTP expresado como el cuociente de las densitometrías entre las proteínas en estado activo y el total. La imágenes corresponden al valor promedio \pm error estándar de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticas son respecto a la condición control de cada experimento (* $p < 0,05$).

H. CAVEOLINA-1 SE UNE A LOS DOS DOMINIOS SH2 DE P85 α INDEPENDIENTEMENTE DE SU FOSFORILACIÓN EN TIROSINA 14.

La estructura de p85 α cuenta con un dominio RabGAP y dos dominios de homología a Src2 (SH2), éstos últimos son importantes en la unión de proteínas fosforiladas en tirosina. Resultados de nuestro laboratorio indican que la

inhibición farmacológica de la fosforilación de Caveolina-1 en tirosina 14 disminuye su capacidad migratoria (Urra et al., 2012). Con estos antecedentes, se procedió a analizar en primer lugar si Caveolina-1 se une a p85 α a través de alguno de los dominios SH2 de p85 α (N-SH2 y C-SH2). Se realizaron ensayos de *pull-down* con las construcciones GST-N-SH2-p85 α y GST-C-SH2-p85 α en extractos de células B16-F10 y MDA-MB-231 que expresan Caveolina-1. Las células fueron pre-incubadas con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a una concentración de 5 mM por 20 min, con el fin de inducir la fosforilación de Caveolina-1 (Urra et al., 2012). Los resultados indican que Caveolina-1 se une tanto a los dominios N-SH2 y C-SH2 de p85 α , siendo por tanto independiente de la fosforilación de Caveolina-1 en tirosina 14 (**Figura 20**). Con el objetivo de evaluar de manera más específica la importancia de la tirosina 14 en la activación de Rab5 por Caveolina-1, se desarrollaron dos estrategias diferentes. Por un lado, se utilizó el inhibidor de Src-PTKs, PP2, a una concentración de 10 μ M por una hora, con el fin de evaluar si la activación de Rab5 por Caveolina-1 depende de la kinasa de la familia Src. Se tienen antecedentes que PP2 previene la migración e invasión de células metastásicas B16-F10 inducidas por Caveolina-1 (Tesis Doctorado en Farmacología de nuestro laboratorio, estudiante Rina Ortiz). El tratamiento con PP2 redujo parcialmente la activación de Rab5 por Caveolina-1 (**Figura 21 A**).

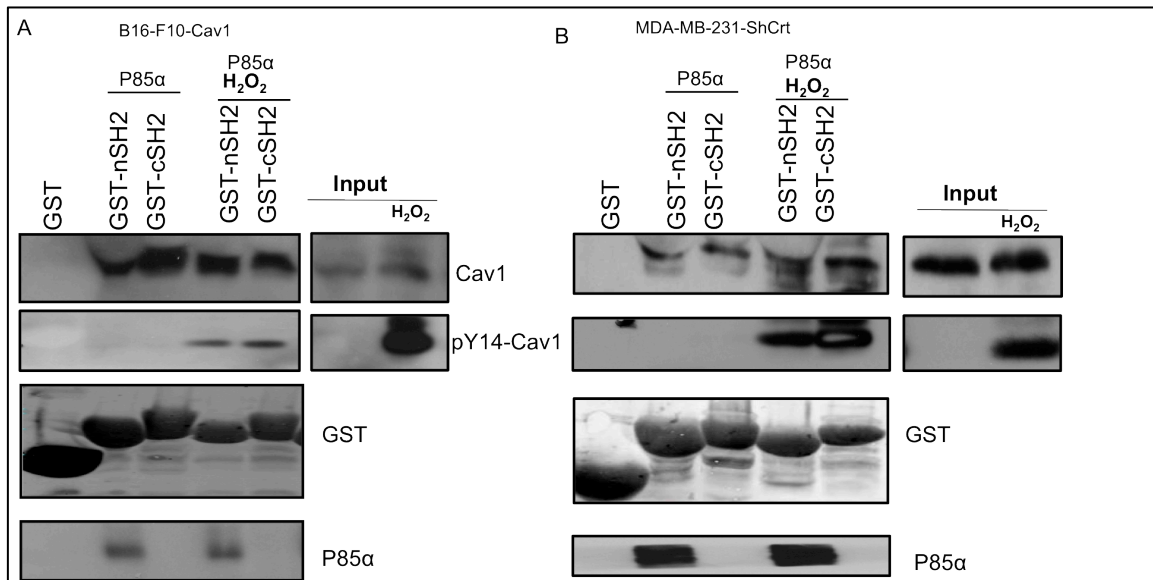


Figura 20: Caveolina-1 se une a los dos dominios SH2 de p85 α independiente de su fosforilación en tirosina14

Células B16-F10 (Cav-1) y MDA-MB-231 (shCtrl) fueron crecidas su medio respectivos suplementado con 10%SFB. Posteriormente, se obtuvieron extractos celulares y se realizó el ensayo *pull-down* con las construcciones GST-N-SH2-p85 α y GST-C-SH2-p85 α además de su control GST descrito en la sección de materiales y métodos.

Como control para evaluar la fosforilación de Cav1 en tirosina 14, las células fueron tratadas con H₂O₂ (5 mM) por 20 min. En el Western Blot se observa la expresión de Cav1, p-14 Cav1, GST y p85 α . Esta última fue detectada con un anticuerpo monoclonal que sólo reconoce el dominio n-SH2 de p85 α . Ambas figuras son representativas de tres experimentos independientes.

La segunda estrategia se basó en evaluar la activación de Rab5 por mutantes de Caveolina-1 en su residuo de tirosina 14. Mediante mutagénesis sitio-dirigida se generó una mutación no fosforilable de la tirosina 14, al reemplazar este aminoácido por fenilalanina (Cav1/Y14F). Estas mutantes fueron desarrolladas durante las tesis de doctorado de las estudiantes Rina Ortiz y Lorena Lobos.

Los resultados indican que a pesar de la mutación en tirosina 14, Caveolina-1 es aún capaz de activar a Rab5, aunque en menor grado que la versión Caveolina-1 *wild type* (Figura 21 B).

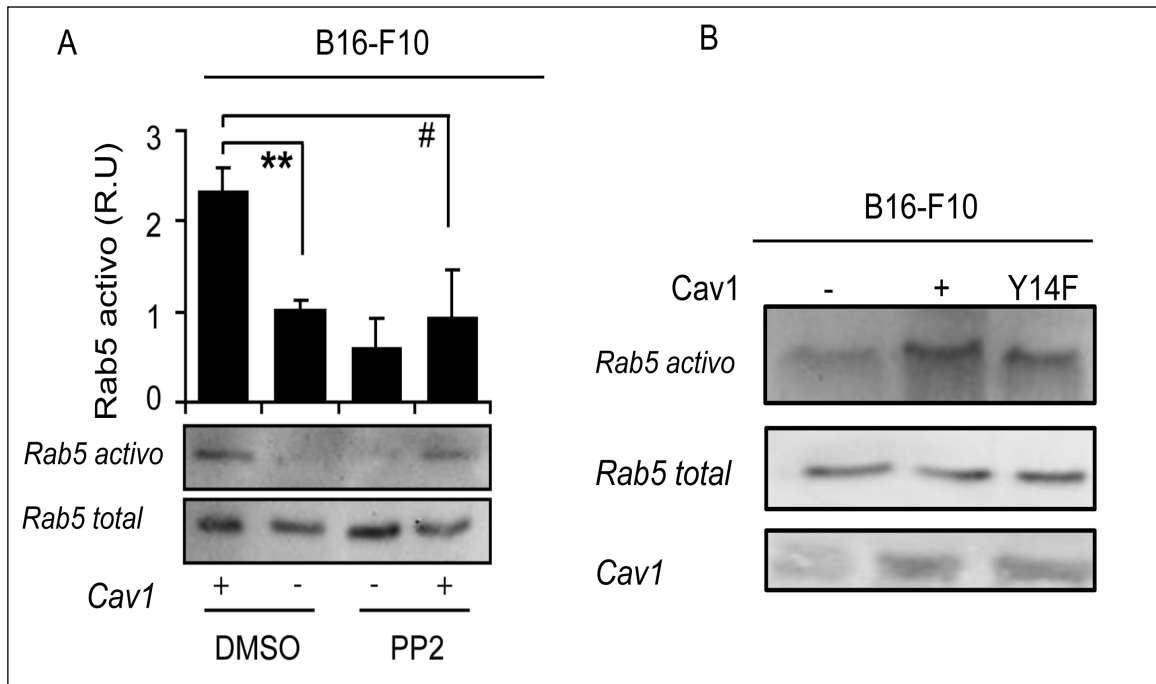


Figura 21: Caveolina-1 activa parcialmente a Rab5 en presencia del inhibidor PP2 y con una mutante no fosforilable en tirosina14.

A. Células B16-F10 (mock, Cav-1) fueron crecidas en sus medios respectivos suplementado con 10%SFB. Posteriormente, las células se trataron por una hora 10 μ M de PP2 con su vehículo control respectivo (DMSO) y se realizó el ensayo *pull-down* con la proteína R5BD-GST. Los niveles de activación se muestran como veces de aumento de la proteína en estado activo con respecto a la proteína total. Cada barra corresponde al valor promedio \pm error estándar de cuatro experimentos independientes (** $p < 0,01$; # $p = 0,0912$, no significativo).

B. Una vez generadas las líneas estables que expresan Caveolina-1 mutada en tirosina14(Cav1/Y14F: mutante no fosforilable), se obtuvieron extractos proteicos y se realizó el ensayo Pull-Down con la proteína R5BD-GST. Los niveles de activación de Rab5 y los niveles de Caveolina-1 se muestran en la figura representando a dos experimentos independientes.

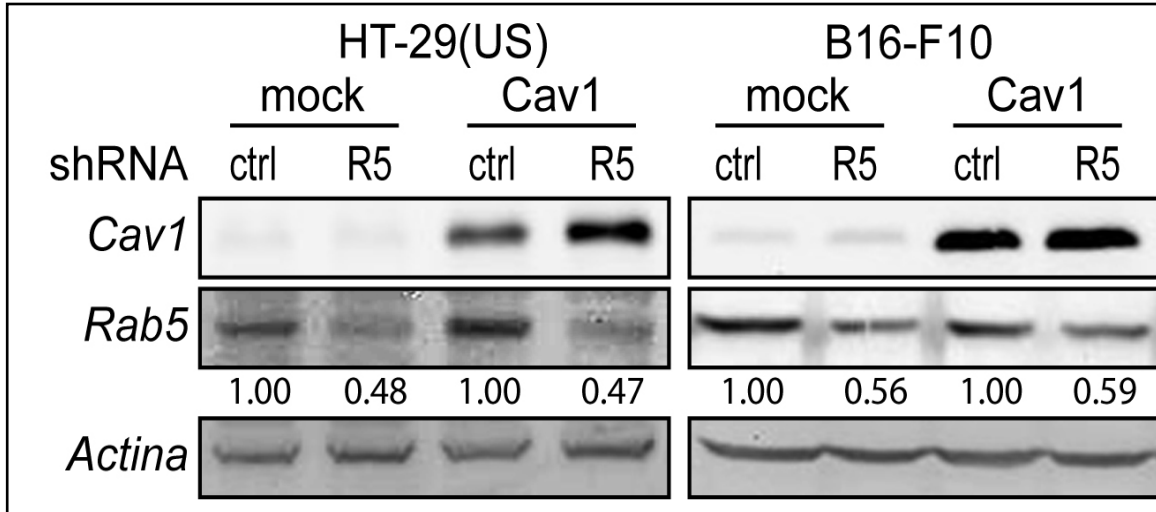
SECCIÓN 2

**RAB5 ES NECESARIA PARA LA ACTIVACIÓN DE
RAC-1 Y LA MIGRACIÓN CELULAR INDUCIDA
POR CAVEOLINA-1**

A. SILENCIAMIENTO EN LOS NIVELES DE RAB5 EN CÉLULAS HT-29(US) Y B16-F10.

Para determinar si Rab5 es necesario para la estimulación de la migración inducida por Caveolina-1, se silenció a Rab5 endógena mediante transducciones con lentivirus que codifican para shRNA específicos en células HT-29(US) y B16-F10. Se utilizaron dos construcciones diferentes de shRNA contra Rab5 (secuencia F10 para HT-29(US) y secuencia F8 para B16-F10, además de una secuencia comercial control usada en cada línea celular). Las secuencias específicas de los short hairpin RNA y más detalles del proceso de transducción y silenciamiento se encuentra en la sección materiales y métodos.

En células HT-29(US)-Cav1, el tratamiento con shRNA- F10 produjo una baja de un 52%, mientras que en células B16-F10-Cav-1, el tratamiento con shRNA-F8 produjo una baja de un 48% en los niveles de Rab5 (**Figura 22**). Para confirmar que esta baja en los niveles proteicos de Rab5 coincidieran con una disminución de la forma activa (Rab5-GTP), se realizó un *pull-down* R5BD-GST. Se observó que en las células B16-F10-Cav-1-shR5, la baja obtenida para Rab5 total se relaciona directamente con una disminución en la forma activa (50% reducción, resultados no mostrados).



Como una manera de controlar que la baja en los niveles de Rab5 no tiene efecto en la viabilidad de estas células se realizó un ensayo de MTS en las

Figura 22: Obtención de sublíneas transfectadas con Caveolina-1 y silenciamiento de Rab5 endógeno mediante shRNA

Se realizó una infección lentiviral con el objetivo de disminuir los niveles de Rab5 endógeno en células HT-29(US) (clones M1,C14) y B16-F10 (mock y Cav1). Posteriormente a la infección se obtuvieron extractos celulares y se realizó Western Blot para verificar los niveles de las proteínas involucradas. Se muestran imágenes representativas de 3 experimentos independientes. Los números bajo la figura representan el valor residual de Rab5, obtenido como el cociente de las densitometrías entre Rab5 y Actina. Los resultados fueron los siguientes: HT 29(US)(M1/shRNA Rab5) ($0,48 \pm 0,24$), HT 29(US)(C14/shRNA Rab5) ($0,47 \pm 0,19$), B16 F10(mock/shRNA Rab5) ($0,56 \pm 0,13$), and B16 F10(Cav1/shRNA Rab5) ($0,59 \pm 0,10$). Las imágenes corresponden al valor promedio \pm error estándar de tres experimentos independientes

células B16-F10 (más detalles en la sección materiales y métodos). Se observó que el silenciamiento de Rab5 no afectó la viabilidad ni de las células B16-F10-mock, como B16-F10-Cav1. El porcentaje de la viabilidad de las en todas las sublíneas celulares fue siempre superior al 85% (resultados no mostrados).

B. RAB5 ES NECESARIA PARA QUE CAVEOLINA-1 PROMUEVA LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS HT-29(US) Y B16-F10.

Una vez generadas las líneas celulares HT-29(US) y B16-F10 con baja expresión de Rab5, en presencia o ausencia de Caveolina-1 (**Figura 22**), se realizaron ensayos de migración por herida (**Figura 23 A**) y por transwell (**Figura 23 B**).

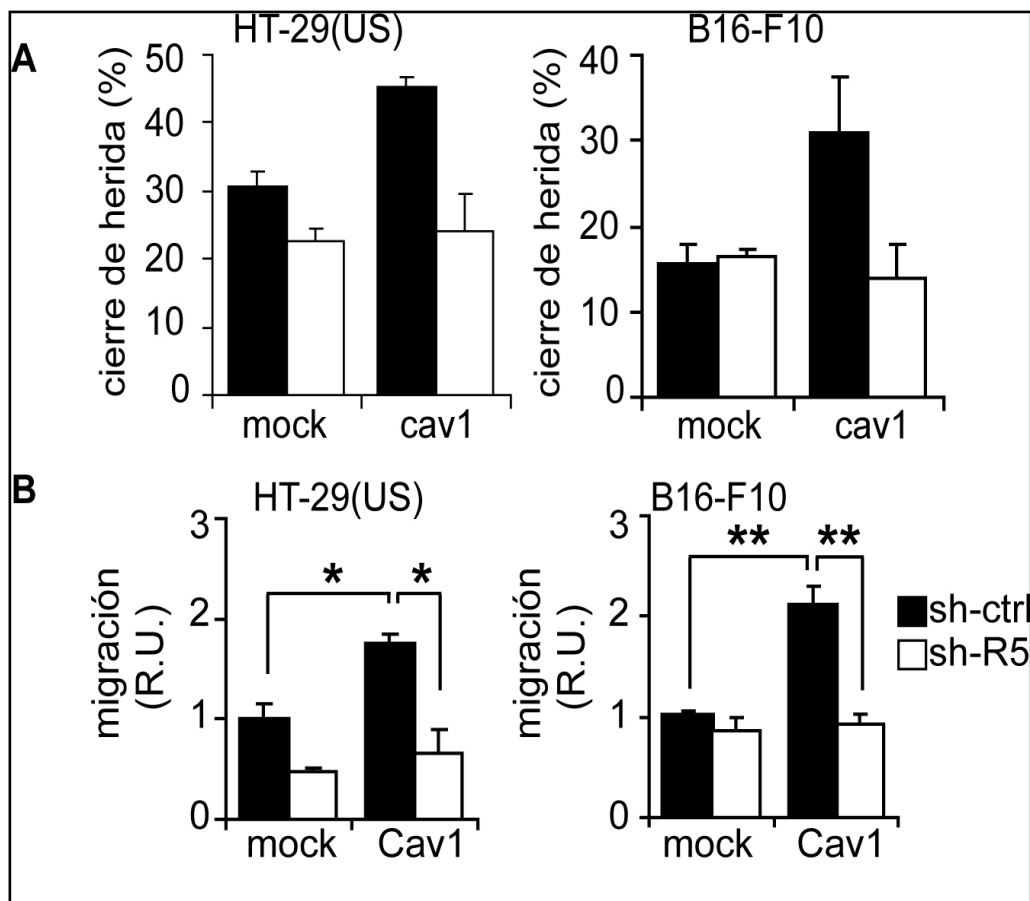


Figura 23 : El silenciamiento de Rab5 reduce significativamente la migración inducida por Caveolina-1 en células HT-29(US) y B16-F10

A. Se representan las cuantificaciones del porcentaje de cierre de área en ensayos de migración por herida de células HT-29(US) y B16-F10 que expresan Caveolina-1 y a las cuales se les silenció a Rab5. Los ensayos fueron realizados por 24h **B.** Se muestran las cuantificaciones de los ensayos de migración en cámara boyden (transwell). Las células que lograron migrar fueron visualizadas por tinción con cristal violeta como se explica en materiales y métodos. Los resultados se expresan en veces de aumento sobre el control (R.U). Todos los datos representan una repetición de tres experimentos independientes (valor promedio \pm error estándar). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Tanto en las células HT-29(US) como en las células B16-F10 el silenciamiento de Rab5 se tradujo en una baja significativa en la migración celular inducida por Caveolina-1 (**Figura 22**).

Estos datos nos indican que Caveolina-1 requiere de Rab5 para promover migración de células metastásicas HT-29(US) y B16-F10.

C. LA ACTIVACIÓN DE RAC-1 INDUCIDA POR CAVEOLINA-1 REQUIERE DE LA PRESENCIA DE RAB5.

Se ha atribuido a la GTPasa Rac-1 un rol protagónico en el proceso de migración celular inducido por Caveolina-1 (Urra et al., 2012). Por lo tanto, se procedió a evaluar la activación de Rac-1 por Caveolina-1 en células HT-29(US) y B16-F10 donde se redujo la expresión de Rab5 mediante shRNA específicos. Para ello se realizaron ensayos de *pull-down* para Rac-1, usando la proteína de fusión PBD-GST, la cual contiene el dominio de unión de p21 a la forma activa Rac1-GTP (Manser et al., 1994). Se observó que en ambos modelos metastásicos, HT-29(US) y B16-F10, Caveolina-1 promueve la activación de Rac-1 de manera significativa y que esta activación se ve inhibida casi completamente cuando se reducen los niveles de Rab5 (**Figura 24**).

**D. TIAM1 ES UN REGULADOR EN EL CIRCUITO DE ACTIVACIÓN
CAV1→RAB5→RAC-1.**

Se ha propuesto que el circuito de activación Rab5→Rac-1 sería fundamental durante la migración celular (Lanzetti et al., 2004) y que a su vez el GEF de Rac1, Tiam1, sería el responsable de promover la activación de Rac-1 en endosomas tempranos inducido por Rab5 (Palamidessi et al., 2008).

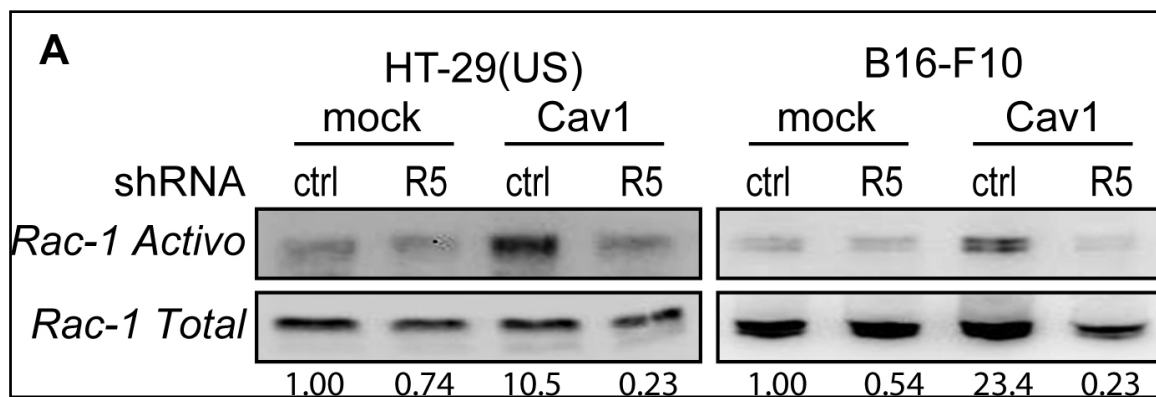


Figura 24 : La activación de Rac1 inducida por Caveolina-1 requiere de la presencia de Rab5.

Las células HT-29(US) y B16-F10 que expresan Caveolina-1 y a las que se les silenció la proteína Rab5 fueron crecidas en sus medios respectivos suplementados con 10% SFB. Posteriormente, se obtuvo extractos celulares y se realizó el ensayo *pull-down* con la proteína de fusión PBD-GST según descrito en materiales y métodos. Se muestra un Western Blot representativo del ensayo de *pull-down* en células HT-29(US) y B16-F10, respectivamente. Los números bajo la figura representan el nivel residual de Rac-1-GTP expresado como el cociente de las densitometrías entre Rac1 activo y Rac1 total. Los resultados fueron los siguientes: HT-29(US)(M1/shRNA ctrl) ($1,00 \pm 0,6$), HT-29(US)(M1/shRNA Rab5) ($0,74 \pm 0,6$), HT-29(US)(C14/shRNA ctrl) ($10,5 \pm 1,4$), HT-29(US)(C14/shRNA Rab5) ($0,23 \pm 0,1$), B16-F10(mock/shRNA ctrl) ($1,00 \pm 0,5$), B16-F10(mock/shRNA Rab5) ($0,54 \pm 0,3$), B16-F10(Cav1/shRNA ctrl) ($23,4 \pm 10,3$) y B16-F10(Cav-1/shRNA Rab5) ($0,23 \pm 0,1$). La imágenes corresponden al valor promedio \pm error estándar de tres experimentos independientes.

Por lo anterior, se investigó si la activación de Rac-1 por Caveolina-1 y Rab5 depende de Tiam1. Para ello, realizamos un ensayo de inhibición farmacológica de Tiam1 con el inhibidor comercial de Rac-1 NSC23766 a una concentración de 10 μ M por 30 min, y luego se realizaron ensayos de migración y ensayos de *pull-*

down PDB-GST de Rac1. Los resultados obtenidos nos muestran que al inhibir a Tiam1, Caveolina-1 no es capaz de promover la migración celular ni tampoco la activación de Rac-1 como muestra la **Figura 25**. Sin embargo, se ha visto que NSC23766 inhibe la activación de Rac-1 por los GEF Tiam-1y Trio (Gao et al., 2004). Por tanto no podemos descartar completamente la participación de Trio en estos efectos.

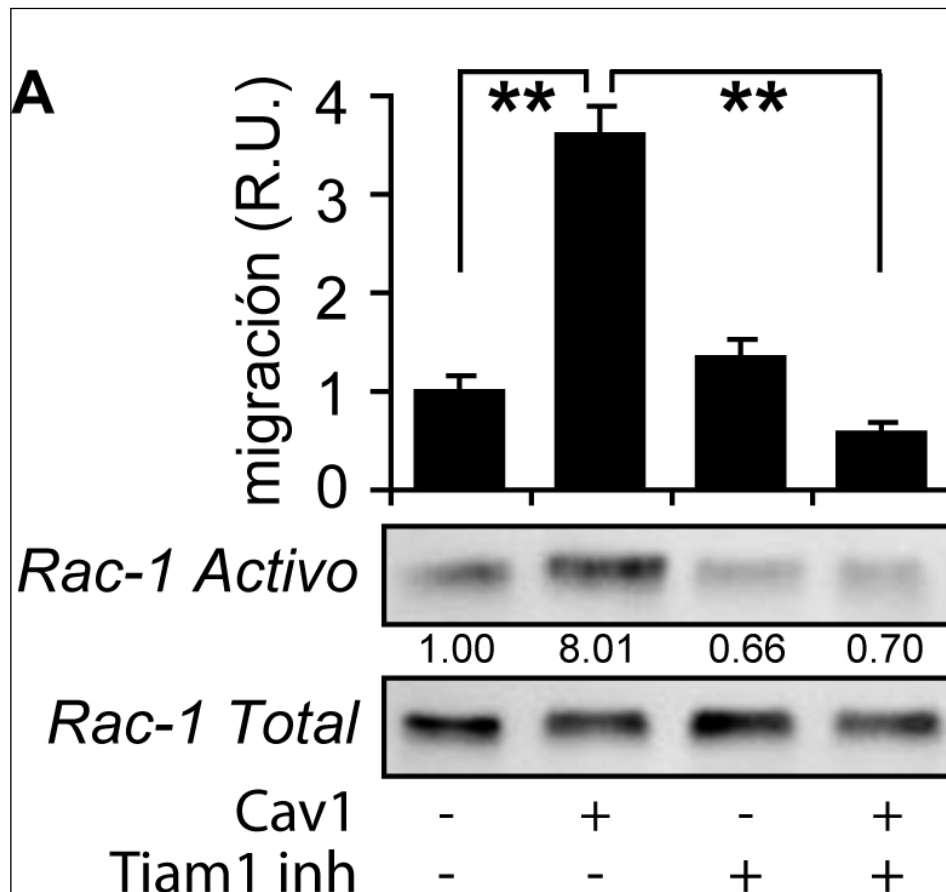


Figura 25: La inhibición farmacológica de Tiam1 inhibe la activación de Rac1 y la migración celular promovida por Caveolina-1.

Células HT-29 (mock, Cav-1) fueron crecidas en sus medios respectivos con 10 %SFB. Posteriormente las células fueron tratadas con el inhibidor de Tiam1 NSC23766 a una concentración de 10 μ M por 30 min con su vehículo control respectivo (DMSO). Luego de esto se realizaron experimentos de migración por transwell y ensayo *pull-down* con la proteína PBD-GST (panel inferior).

En la gráfica superior se muestran las cuantificaciones de los ensayos de migración. Las células que lograron migrar fueron visualizadas por tinción con cristal violeta como se explica en materiales y métodos. Los resultados se expresan en veces de aumento sobre el control (R.U). Todos los datos representan una repetición de tres experimentos independientes (valor promedio \pm error estándar) $**p < 0,01$. Los números bajo la figura representan el valor residual de Rac1-GTP expresado como el cuociente de las densitometrías entre Rac1 activo y Rac1 total. Los resultados fueron los siguientes: HT-29(US)(M1)/DMSO (1,00 \pm 0,1), HT-29(US)(C14)/DMSO (8,01 \pm 5,2), HT-29(US)(M1)/NSC23766 (0,66 \pm 0,4) and HT-29(US)(C14)/NSC23766 (0,70 \pm 0,5). La imágenes corresponden al valor promedio \pm error estándar de tres experimentos independientes.

Por otro lado, se evaluó si Caveolina-1 promueve el reclutamiento de Tiam1 a endosomas tempranos Rab5-positivos. Con este fin, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia en células B16-F10 transfectadas con la construcción EGFP-Rab5 (wild type), donde se detectó Tiam1 con un anticuerpo monoclonal. Los resultados de estos experimentos indicaron que Caveolina-1 promueve un aumento moderado, pero significativo de la co-localización entre Rab5 y Tiam1 (**Figura 26**). Esto nos sugiere que el aumento en la activación de Rac-1 por Caveolina1 se debe, al menos en parte, a un reclutamiento de Tiam1 hacia endosomas tempranos positivos para Rab5.

Por último, se evaluó la participación de Tiam1, en la migración celular inducida por Rab5, río debajo de Caveolina-1. Para ello, en células HT-29(US)-mock, se transfectó la mutante constitutivamente activa de Rab5 (GFP-Rab5/Q79L) la cual carece de actividad GTPasa. A su vez, células HT-29(US)-Cav1 fueron transfectadas con la mutante inactiva de Rab5 (GFP- Rab5/S34N) que posee más afinidad por GDP que por GTP. Todas estas células se incubaron con el inhibidor de Tiam1 NSC23766 a una concentración de 10 μ M por 30 min. Luego de esto, se realizaron ensayos de migración por transwell.

Se observó que la transfección de la mutante activa de Rab5 en células B16-F10-mock fue suficiente para obtener un aumento en la migración, similar a lo observado en presencia de Caveolina-1.

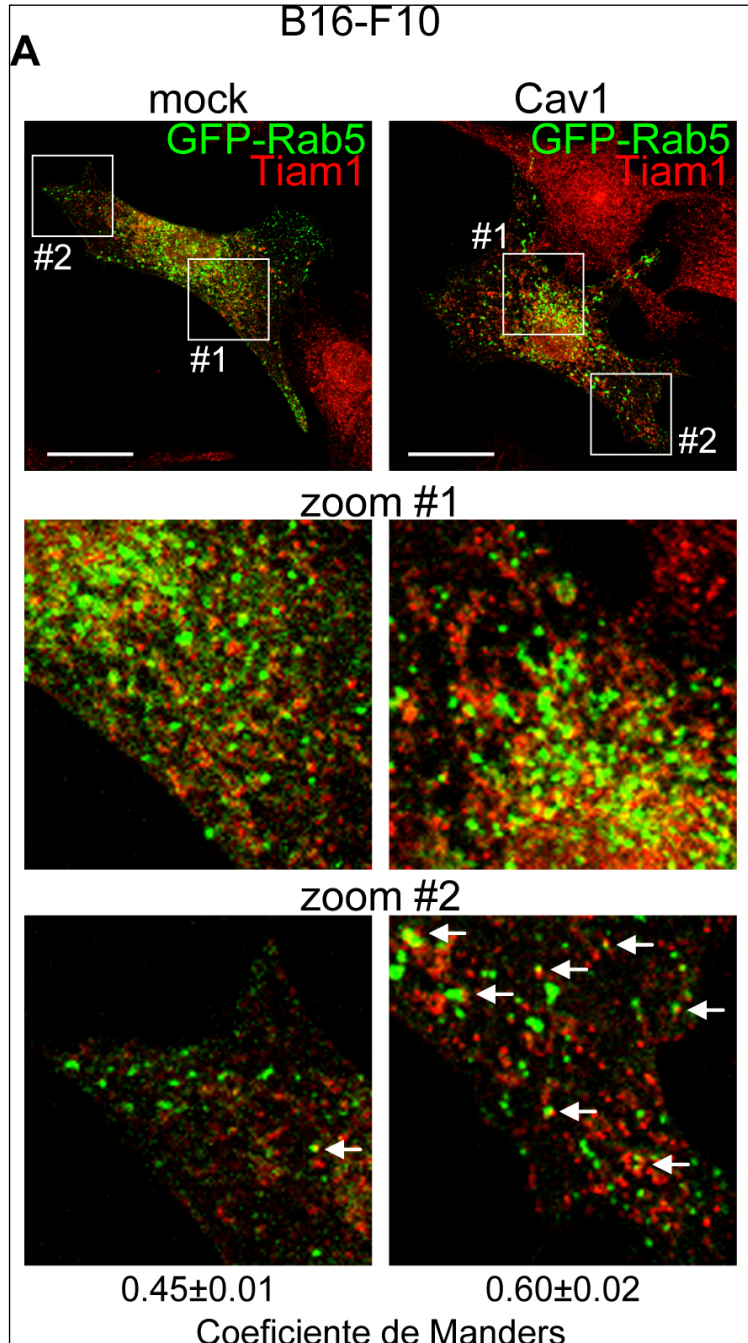


Figura 26: Caveolina-1 promueve el reclutamiento de Tiam1 a endosomas tempranos.

Células B16-F10 (Cav-1) fueron transfectadas con la construcción pEGFP-Rab5/*wild type* (verde) y su control vacío, crecidas en su medio respectivo suplementado con 10% SFB por 24h. Luego fueron replaqueadas sobre cubreobjetos en su medio respectivo con 10% SFB durante 24 h. Luego fueron fijadas, permeabilizadas y teñidas con anticuerpo anti-Tiam1 (rojo). Las muestras se analizaron por microscopía confocal. Las flechas indican co-localización, lo que fue cuantificado y expresado numéricamente con el coeficiente de manders ($n=3$, $p<0,01$) y se calcularon con el programa Image J. Se muestran dos Zoom(#1 #2) de las figuras para observar más claramente el grado de co-localización. La barra representa la distancia de 10 μ m.

Además la transfección de la mutante inactiva de Rab5 en Células B16-F10-Cav1 disminuyó significativamente la migración celular inducida por Caveolina-1 (**Figura 20**). Importantemente, el tratamiento de células HT-29(US)-mock-(GFP-Rab5/Q79L) con el inhibidor farmacológico de Tiam1 NSC23766 disminuyó la migración celular inducida por la mutante Rab5/Q79L (**Figura 27**).

De esta manera, podemos concluir que la activación de Rab5 por Caveolina-1 promueve un reclutamiento del GEF Tiam-1 a endosomas tempranos. Este evento estimula la migración celular y la activación de Rac-1 en células B16-F10 y HT-29(US).

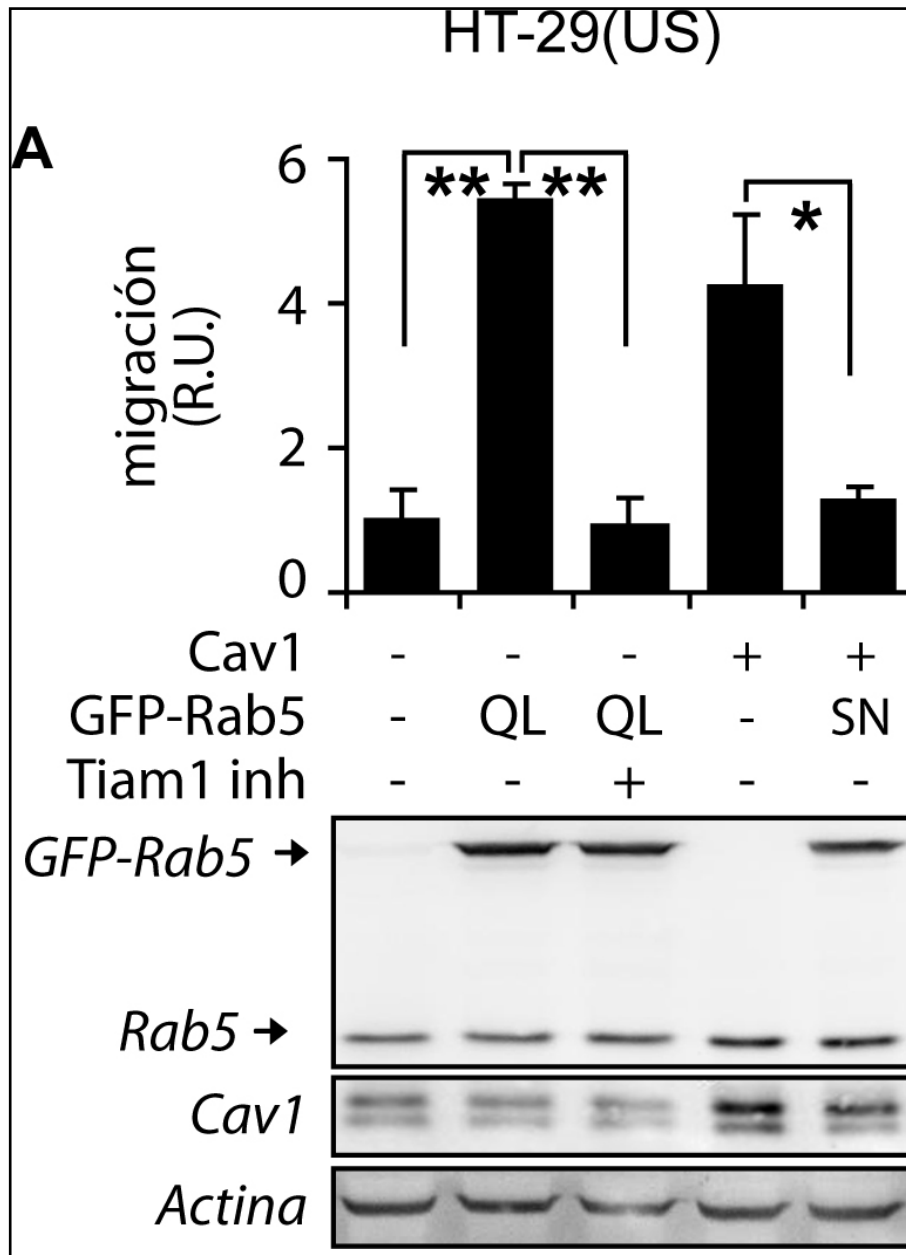


Figura 27: Tiam1 es requerido por Caveolina-1 y Rab5 para promover la migración

Células HT-29(US) (mock, Cav-1) fueron crecidas en su medio respectivo suplementado con 10% SFB. Posteriormente estas células fueron transfectadas con las construcciones GFP-Rab5/Q79L y con GFP-Rab5/S34N. Luego de esto se realizaron experimentos de migración en cámara boyden (transwell). Las proteínas Rab5, Cav1 y actina fueron detectadas mediante Western Blot (panel inferior). En la gráfica superior se muestran las cuantificaciones de los ensayos de migración. Las células que lograron migrar fueron visualizadas por tinción con cristal violeta como se explica en materiales y métodos. Los resultados se expresan en veces de aumento sobre el control (R.U). Todos los datos representan una repetición de tres experimentos independientes (valor promedio \pm error estándar) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Estos resultados se esquematizan en la **Figura 28**, la cual representa un resumen de los resultados obtenidos hasta esta sección de la tesis.

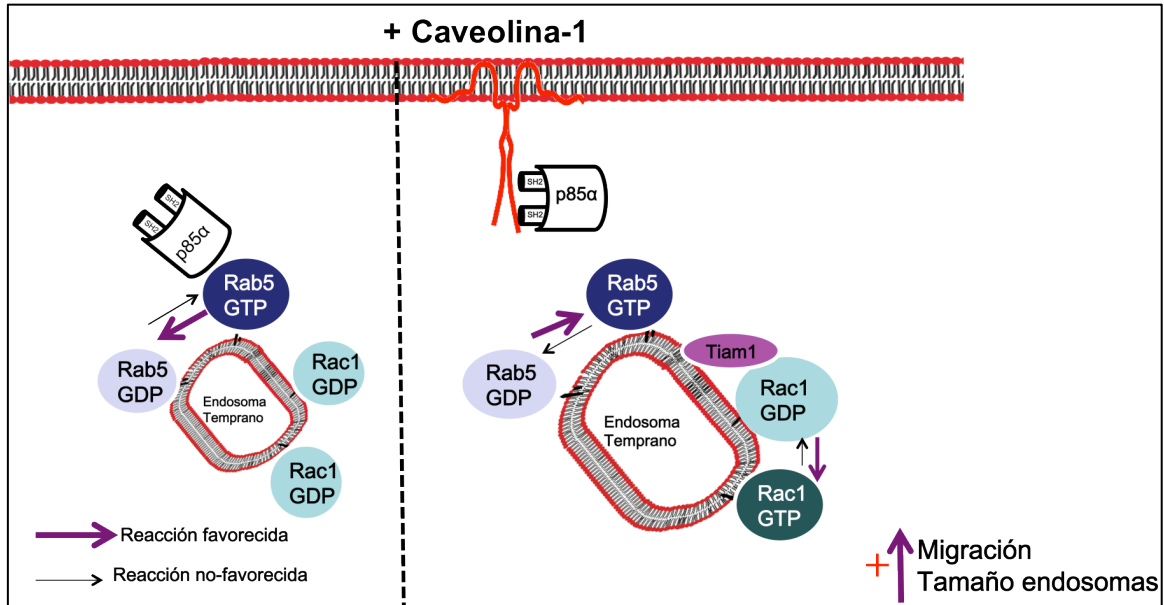


Figura 28 : Descripción del eje Caveolina-1 / p85α / Rab5 / Tiam1 / Rac-1.

El siguiente esquema muestra un resumen de los resultados obtenidos hasta la sección 2 de esta investigación.

SECCION 3

**CAVEOLINA-1 PROMUEVE LA INVASIÓN
CELULAR Y LA METÁSTASIS IN VIVO DE
MANERA DEPENDIENTE DE RAB5, P85 α Y RAC-1**

A. CAVEOLINA-1 REQUIERE DE RAB5 PARA AUMENTAR LA INVASIÓN DE CÉLULAS B16- F10 Y HT-29 (US).

Para evaluar la capacidad invasiva de las células, se realizaron ensayos de matrigel, los cuales permiten estudiar la degradación de componentes de la matriz extracelular. Se evaluó la capacidad invasiva de células B16-F10 y HT-29 (US) utilizando 150.000 células por condición. Luego de 24 h de incubación, se cuantificó las células que atravesaron las membranas de los insertos con matrigel.

Como se observa en la **Figura 29**, las células B16-F10 y HT-29(US) que expresan Caveolina-1 tienen una mayor capacidad invasiva que las células mock. El efecto de promoción de invasión de Caveolina-1 es drásticamente revertido cuando se silencia a Rab5.

B. CAVEOLINA-1 REQUIERE DE RAB5 PARA PROMOVER METÁSTASIS *IN VIVO* EN RATONES C57BL/6

Para evaluar el requerimiento de Caveolina-1 y Rab5 en un ensayo de metástasis *in vivo*, se utilizó el modelo isogénico de metástasis directa de ratones C57BL/6, que consiste en inyectar células B16-F10 en la vena de la cola del animal, de manera que las células hacen metástasis directa y exclusivamente hacia el pulmón.

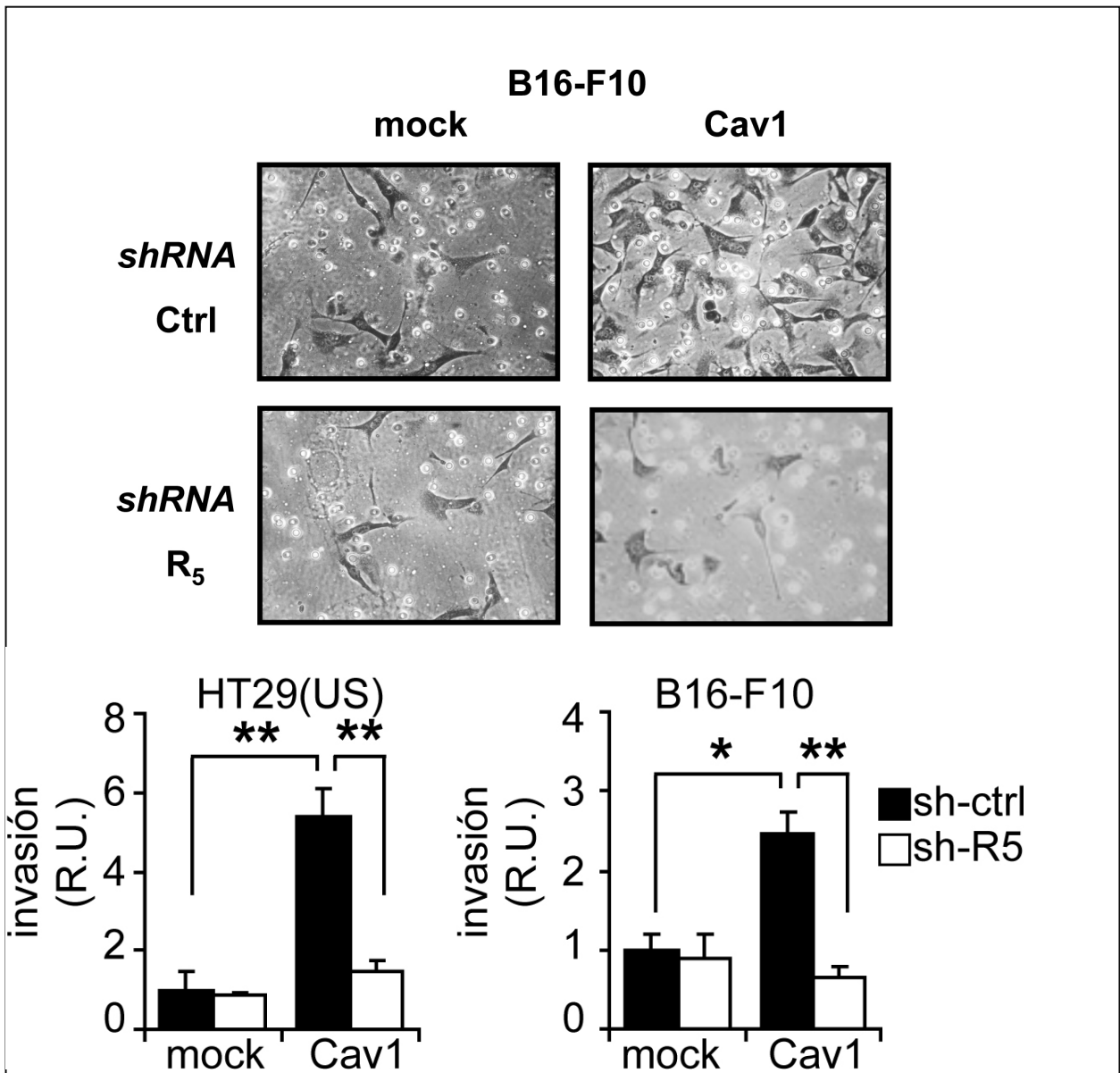


Figura 29: Caveolina-1 requiere de Rab5 para promover la capacidad invasiva.

Células B16-F10 y HT-29 (US) fueron crecidas en su medio respectivo suplementado con 10% SFB. Posteriormente se sembró 150.000 células suspendidas en 500 μ l de medio RPMI 0% SFB en cada inserto de Matrigel. Se cuantificó el total de células que invadieron las membranas de los insertos luego de 24 h. En el panel superior se observan imágenes de las células B16-F10 con y sin Caveolina-1, además de las células que fueron infectadas con shRNA para Rab5, como sus controles. Los gráficos inferiores muestran la cuantificación de la invasión de ambos modelos celulares. La invasión celular se muestra expresada como veces de aumento con respecto a las células control (R.U). Cada barra corresponde al valor promedio \pm error estándar de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

El análisis de la metástasis se lleva a cabo 21 días post-inyección, según la metodología de trabajo descrita previamente por nuestro laboratorio (Lobos et al., 2013). En el esquema de la **Figura 30** se resume la metodología utilizada en este experimento.

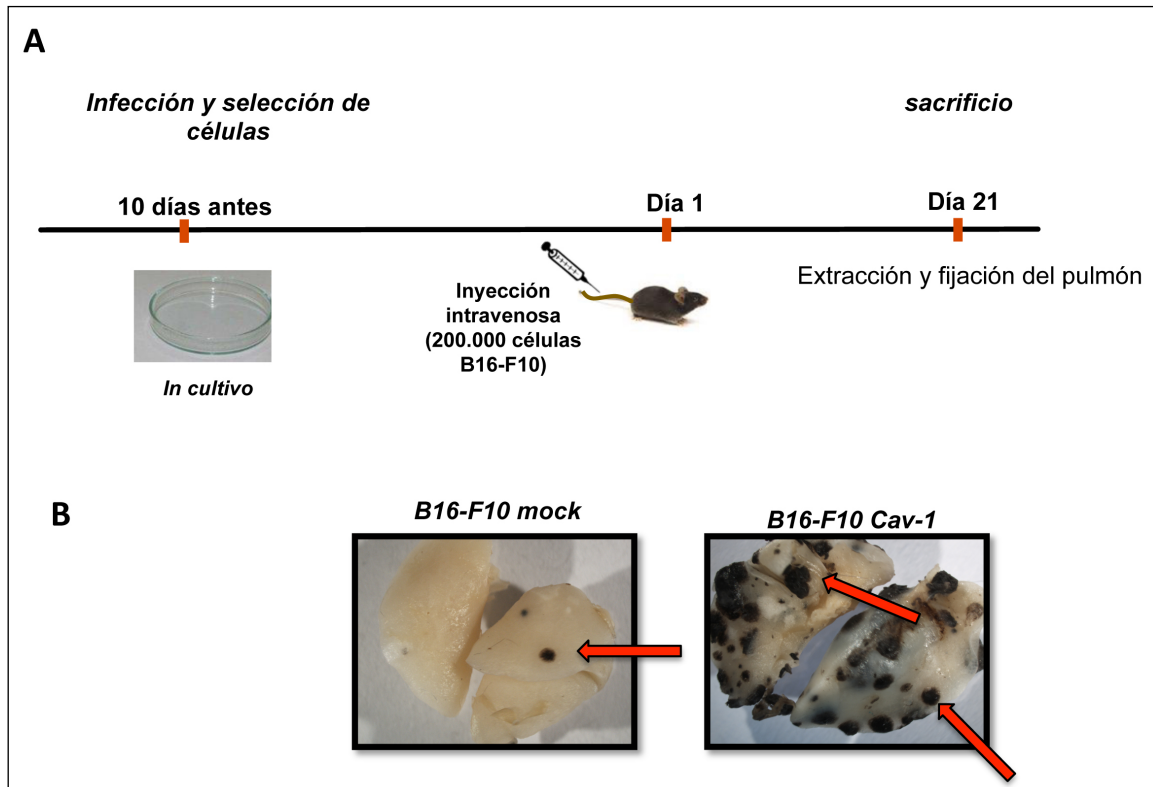


Figura 30: Esquema ensayo de metástasis *in vivo* en ratones C57BL/6

A. Esquema del curso temporal del ensayo de metástasis y preparación de las células en cultivo. Al día 1 se inocularon a los animales por la vía intravenosa, 200.000 células en 500 μ L de solución fisiológica. Se sacrificó los animales el día 21 siguiendo el protocolo de referencia y se realizó una necropsia para examinar nódulos metastásicos, cuantificando el % de la masa tumoral versus la masa completa del pulmón. **B.** Fotografías de pulmones fijados para análisis. Las fotografías fueron tomadas con un aumento del 4X en lupa, en la fotografía del lado derecho se observan los nódulos melanocíticos formados por las células B16-F10-mock marcados por la flecha. En la fotografía del lado izquierdo se observa el aumento significativo en los nódulos metastásicos formados por las células B16-F10-Cav-1 según fue publicado por Lobos et al., 2013.

Se inocularon las células B16-F10-mock y B16-F10-Cav1, tratadas con shControl y shRab5 y los animales fueron evaluados a los 21 días post-inoculación. Se cuantificó la masa tumoral contenida en los nódulos metastásicos en el pulmón. Se observa que las células B16-F10-Cav1 son capaces de generar más metástasis en los pulmones alcanzando un promedio de 23,4%, en comparación con células B16-F10-mock que llegan a un 6,3% de masa tumoral comprada con la masa total del pulmón como se observa en la **Figura 31**. Interesantemente, el silenciamiento de Rab5 causó una significativa disminución de la masa de nódulos metastásicos aún en presencia de Caveolina-1 (5,7% de masa). Esto apoya nuestra hipótesis que Caveolina-1 requiere de la presencia de Rab5 para promover la metástasis, similarmente a lo observado en migración e invasión. En la **Tabla 3** se muestran todos los valores promedios y el número de ratones utilizados en este experimento.

Células inoculadas	Masa pulmonar tumoral promedio (%)	Número de Ratones
B16-F10(mock/shRNA ctrl)	6,3	6
B16-F10(mock/shRNA Rab5)	1,9	7
B16-F10(Cav1/shRNA ctrl)	23,4	8
B16-F10(Cav1/shRNA Rab5)	5,7	7

Tabla 3: Resumen de los resultados *in vivo* figura 31

En la tabla se muestran los resultados de la masa pulmonar promedio (%) y el número de ratones según condiciones de inoculación.

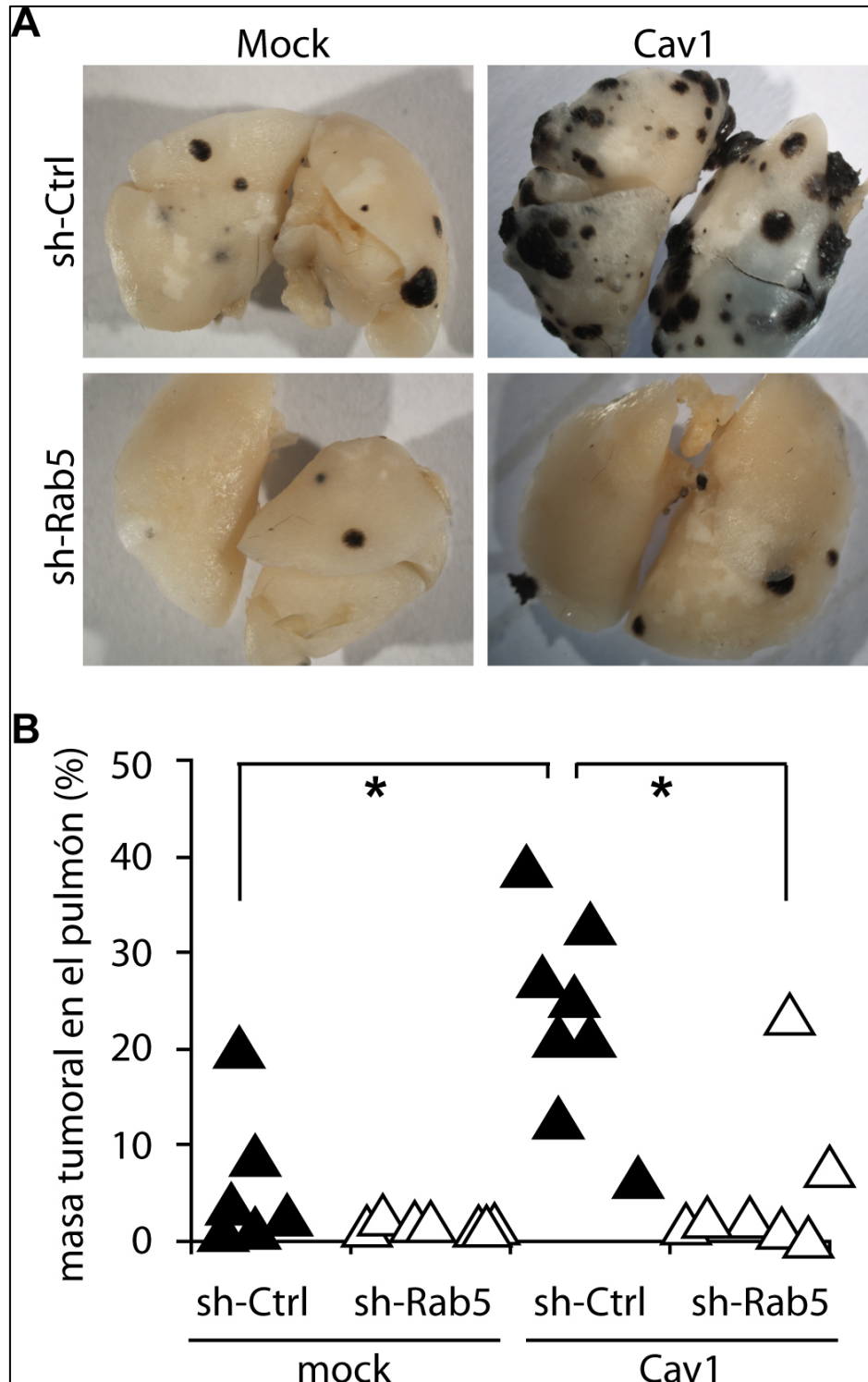


Figura 31: Caveolina-1 requiere de Rab5 para promover metástasis in vivo en ratones C57BL/6. Se inyectó 200.000 células B16-F10-mock y B16-F10-Cav1, además de las células que fueron infectadas con shRNA para Rab5, como sus controles. Las células se administraron intravenosamente por la vena de la cola. A los 21 días se sacrificó a los animales, se extrajo los pulmones y se fijaron en la solución Feketes, para luego cuantificar el número de nódulos metastásicos presentes en este órgano. **A** se observan imágenes representativas de los pulmones obtenidos luego de realizado el experimento in vivo. **B** se observa la cuantificación de la masa tumoral, la cual se encuentra expresada como el porcentaje del cociente de la masa tumoral en el pulmón respecto a la masa del pulmón completa. Cada triángulo representa a un animal al que se le realizó la inoculación (* $p < 0,05$).

C. LA EXPRESIÓN DE P85 α DISMINUYE LA METÁSTASIS *IN VIVO* PROMOVIDA POR CAVEOLINA-1 EN RATONES C57BL/6.

Como una manera de extender a un modelo *in vivo* los resultados obtenidos en la sección 1, realizamos un ensayo de metástasis en ratones C57BL/6 usando las células B16-F10-mock y B16-F10-Cav1, transfectadas transitoriamente con las construcciones mCherry y mCherry-p85 α , con el objeto de verificar si la expresión de p85 α tiene la capacidad de disminuir la metástasis inducida por Caveolina-1. Los resultados muestran una baja significativa en el porcentaje de la masa tumoral en el pulmón de las células Caveolina-1 positivas cuando estas fueron transfectadas con mCherry-p85 α pero no con mCherry solo como se observa en la **Figura 32**. Estos resultados sugieren que la expresión de p85 α disminuye la metástasis *in vivo* promovida por Caveolina-1 en ratones C57BL/6. Todos los resultados se muestran en la **Tabla 4**.

Células inoculadas	Masa pulmonar tumoral promedio (%)	Número de Ratones
B16-F10(mock/mCherry)	25,2	4
B16-F10(mock/mCherry-p85 α)	28,6	4
B16-F10(Cav1/mCherry)	47,8	5
B16-F10(Cav1/mCherry-p85 α)	9,8	5

Tabla 4: Resumen de los resultados *in vivo* figura 32

En la tabla se muestran los resultados de la masa pulmonar promedio (%) y el número de ratones utilizados en este ensayo según condiciones de inoculación.

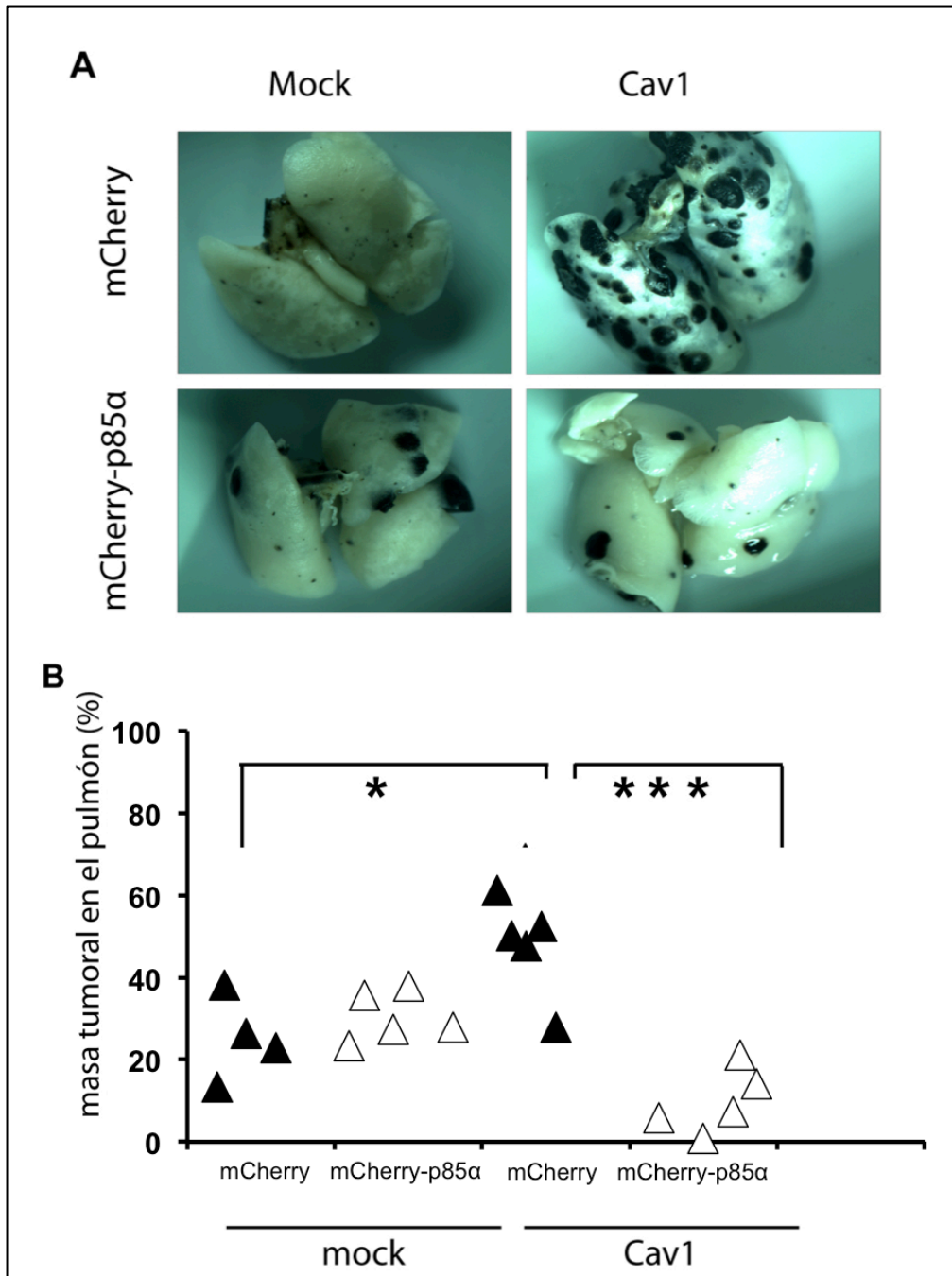


Figura 32: La expresión de p85α disminuye la metástasis *in vivo* promovida por Caveolina-1 en ratones C57BL/6.

Se inyectó 200.000 células B16-F10-mock-mCherry y B16-F10-Cav1-mCherry, además de las células que fueron transfectadas con la construcción mCherry-p85α, como sus controles. Las células se administraron intravenosamente por la vena de la cola. A los 21 días se sacrificó a los animales, se extrajo los pulmones y se fijaron en la solución Feketes, para luego cuantificar el número de nódulos metastásicos presentes en este órgano. **A** se observan imágenes representativas de los pulmones obtenidos luego de realizado el experimento *in vivo*. **B** se observa la cuantificación de la masa tumoral, la cual se encuentra expresada como el porcentaje del cociente de la masa tumoral en el pulmón respecto a la masa del pulmón completa. Cada triángulo representa a un animal al que se le realizó la inoculación (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

D. LA EXPRESIÓN DE LA MUTANTE RAC S17N DISMINUYE LA METÁSTASIS IN VIVO PROMOVIDA POR CAVEOLINA-1 EN RATONES C57BL/6.

Se ha demostrado que Caveolina-1 promueve un aumento en la migración de células metastásicas MDA-MB-231 y B16-F10 mediante la activación de Rac-1 *in vitro* (Urra et al., 2012, Lobos et al., 2013 y resultados de esta tesis). Sin embargo nunca se ha probado la importancia de la presencia de Rac-1 *in vivo* para el efecto promotor de metástasis de Caveolina-1. Es por esto que realizamos un ensayo de metástasis *in vivo* en células B16-F10 que expresan Caveolina-1 y las cuales fueron transfectadas con una dominante negativa de Rac1 denominada GFP-Rac-1(S17N), además de sus respectivos controles. Luego de obtener estas células transfectadas, se realizó el ensayo de metástasis *in vivo* y se analizó a los ratones al día 21 post-inoculación. Se observó que la expresión de la mutante de Rac-1 S17N disminuye significativamente en un 7,8% la metástasis al pulmón en presencia de Caveolina-1 comparado con las células que no expresan la mutante como se muestra en la **Figura 33**. Todos los resultados se muestran en la **Tabla 5**.

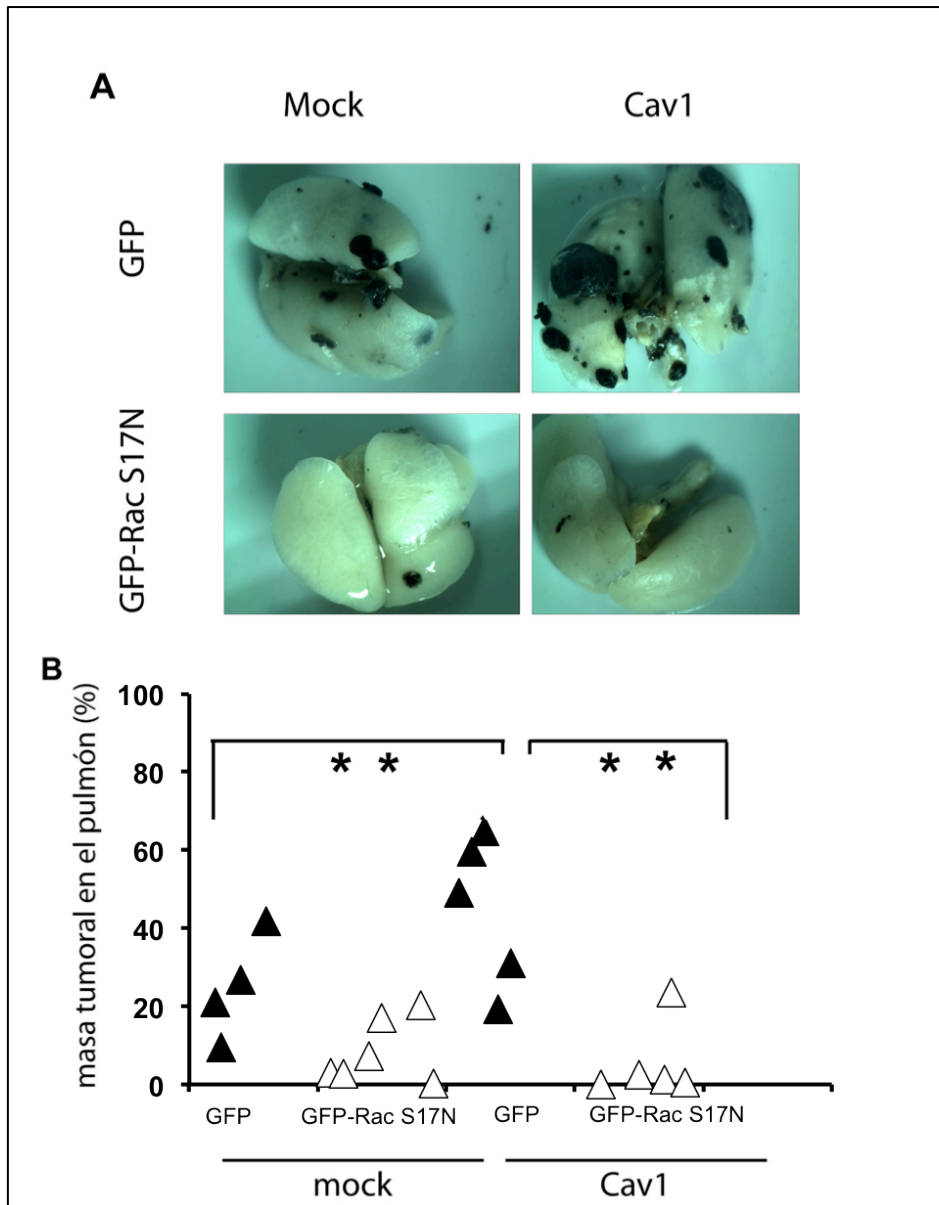


Figura 33 : Caveolina-1 requiere de Rac1 para promover metástasis *in vivo* en ratones C57BL/6

Se inyectó 200.000 células B16-F10-mock-GFP y B16-F10-Cav1-GFP, además de las células que fueron transfectadas con la construcción GFP-Rac-1 S17N y sus controles. Las células se administraron intravenosamente por la vena de la cola. A los 21 días se sacrificó a los animales, se extrajo los pulmones y se fijaron en la solución Feketes, para luego cuantificar el número de nódulos metastásicos presentes en este órgano. **A** se observan imágenes representativas de los pulmones obtenidos luego de realizado el experimento *in vivo*. **B** se observa la cuantificación de la masa tumoral, la cual se encuentra expresada como el porcentaje del cociente de la masa tumoral en el pulmón respecto a la masa del pulmón completa. Cada triángulo representa a un animal al que se le realizó la inoculación (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$).

Células inoculadas	Masa pulmonar tumoral promedio (%)	Número de Ratones
B16-F10(mock/GFP)	22,5	6
B16-F10(mock/GFP-Rac S17N)	8,3	6
B16-F10(Cav1/GFP)	44,7	5
B16-F10(Cav1/GFP-Rac S17N)	7,8	6

Tabla 5: Resumen de los resultados *in vivo* figura 33

En la tabla se muestran los resultados de la masa pulmonar promedio (%) y el número de ratones utilizados según condiciones de inoculación.

CONCLUSIONES GENERALES

De las tres secciones de resultados, se puede concluir que:

SECCIÓN 1

CAVEOLINA-1 PROMUEVE LA ACTIVACIÓN DE RAB5 DEPENDIENTE DE p85 α EN CÉLULAS METASTÁSICAS.

- Caveolina-1 promueve la migración celular y la activación de Rab5 en las líneas celulares metastásicas HT-29(US), B16-F10 y MDA-MB-231.
- Caveolina-1 promueve un aumento en el tamaño de los endosomas tempranos.
- La expresión de p85 α disminuye la migración celular y la activación de Rab5 promovida por Caveolina-1.
- Caveolina-1 promueve la activación de Rab5 de manera independiente de la actividad catalítica de PI3K.
- Caveolina-1 activa parcialmente a Rab5 en presencia del inhibidor de kinasas de la familia Src, PP2, y con una mutante no fosforilable en tirosina14 en células B16-F10.
- El mecanismo de activación de Rab5 por Caveolina-1, es parcialmente dependiente de su fosforilación en tirosina 14, lo cual sugiere que hay un mecanismo aún más complejo.

SECCIÓN 2

RAB5 ES NECESARIA PARA LA ACTIVACIÓN DE RAC-1 Y LA MIGRACIÓN CELULAR INDUCIDA POR CAVEOLINA-1.

- Rab5 es requerido para que Caveolina-1 promueva migración en células metastásicas HT-29(US) y B16-F10.
- La activación de Rac-1 inducida por Caveolina-1 requiere de la presencia de Rab5.
- Tiam1 es requerido por Caveolina-1 y Rab5 para promover la migración.
- Caveolina-1 promueve el reclutamiento de Tiam1 a endosomas tempranos.

SECCIÓN 3

CAVEOLINA-1 PROMUEVE LA INVASIÓN CELULAR Y LA METÁSTASIS IN VIVO DE MANERA DEPENDIENTE DE RAB5, P85 α Y RAC-1.

- Caveolina-1 requiere de Rab5 para promover la invasión.
- Caveolina-1 requiere de Rab5 y Rac-1 para promover metástasis *in vivo* en ratones C57BL/6.
- La expresión de p85 α disminuye la metástasis *in vivo* promovida por Caveolina-1 en ratones C57BL/6.

4. DISCUSIÓN

El cáncer es una de las enfermedades crónicas no-transmisible que más muertes produce en el mundo luego de las enfermedades cardiovasculares (WHO report, 2014). La mayoría de los pacientes que presentan esta patología no mueren por las complicaciones que trae el crecimiento del tumor primario sino que por la diseminación de las células tumorales, lo que conocemos como metástasis (Bohle y Kalthoff 1999). La metástasis involucra una serie de cambios fisiológicos, como degradación de la matriz extracelular, invasión del estroma, intravasación a la circulación, extravasación, migración, invasión y proliferación en otros tejidos y órganos diferentes del tumor primario (Bohle y Kalthoff 1999; Geho et al. 2005). Dada la importancia de comprender las bases moleculares de la metástasis, esta tesis se enfocó en estudiar los mecanismos moleculares que podrían explicar este efecto en tres diferentes líneas celulares de cáncer con características metastásicas: cáncer de colon HT-29(US), melanoma murino B16-F10 y cáncer de mama MDA-MB-231. Se determinó la conexión de proteínas involucradas en la promoción de la metástasis como Caveolina-1, con otras moléculas que han emergido como importantes blancos moleculares en cáncer, como Rab5 y Rac-1.

A. CAVEOLINA-1 Y SU ROL PROMOTOR DE METÁSTASIS.

Caveolina-1 es una proteína con una región hidrofóbica que se inserta en la membrana donde regula numerosas cascadas de señalización importantes para entender su papel dual en el desarrollo y progresión del cáncer, tanto como supresor de tumores, así como promotor de la metástasis (Razani et al., 2001, Quest et al. 2004, Williams y Lisanti, 2005).

La expresión de Caveolina-1 puede variar drásticamente, dependiendo del modelo de estudio, en donde una disminución de su expresión en etapas tempranas de la tumorigénesis se asocia con el desarrollo de cáncer de pulmón, mama, colon y ovario, así como sarcomas y osteosarcomas (Quest et al. 2008). Además, la re-expresión de Caveolina-1 en líneas celulares tumorales es a menudo suficiente para prevenir el crecimiento tumoral en modelos ortotópicos (Bender et al., 2002; Bender et al., 2000; Lee et al., 1998; Razani et al., 1999). Sin embargo, y a pesar de la pérdida temprana de Caveolina-1 en diferentes tipos de cáncer, su expresión aumenta considerablemente en etapas avanzadas del desarrollo tumoral como la metástasis. Además, en tejidos que normalmente carecen de expresión de Caveolina-1, como próstata y melanocitos, la progresión del cáncer se asocia directamente con la expresión de Caveolina-1 (Lobos et al., 2013; Lobos et al., 2014; Thompson et al., 2010; Thompson et al., 1999). Por lo tanto, es importante destacar que el aumento de Caveolina-1 está vinculado a la malignidad del tumor, mal pronóstico del paciente, aumento en la invasividad y metástasis, así como resistencia a múltiples fármacos (Ando et al., 2007, Núñez-Wehinger et al., 2014, Quest et al., 2008;. Quest et al., 2004, Quest et al., 2013, Tirado et al., 2010).

Estudios realizados en nuestro laboratorio durante los últimos años han intentado entender este escenario paradójico, tanto *in vitro* como *in vivo* (Bender et al., 2000, Lobos et al., 2013). A nivel *in vivo*, se ha demostrado que la sobre-expresión de Caveolina-1 en células de melanoma murino B16-F10 lleva a un aumento de tres veces más metástasis pulmonar en ensayos de metástasis en

ratones C57BL/6 (Lobos et. al, 2013). A nivel *in vitro*, hemos demostrado que la expresión de Caveolina-1 en células de cáncer de mama MDA-MB-231 y melanoma B16-F10, aumenta el recambio de adhesiones focales, promueve la activación de la GTPasa Rac-1 y estimula la migración celular por un mecanismo poco claro (Lobos et al., 2013, Urra et al., 2012).

Ante este escenario, el objetivo de esta tesis fue determinar los mecanismos por los cuales Caveolina-1 activa a Rac-1 para aumentar la migración celular, la invasión y las consecuencias que esto tiene en un modelo de metástasis in vivo en ratones C57BL/6.

En primer lugar, se demostró que Caveolina-1 no tan sólo promueve la migración en células MDA-MB-231 y B16-F10, sino también en un modelo previamente no evaluado, HT-29(US). Importantemente, en todas estas líneas celulares, Caveolina-1 llevó a la activación de Rab5, tanto por sobre-expresión en células B16-F10 y HT-29(US) (aumento los niveles Rab5-GTP), como por silenciamiento en células MDA-MB-231 (reducción de los niveles de Rab5-GTP). Estos datos indican que la sobre-expresión de Caveolina-1 promueve tanto la migración como la activación Rab5 en los tres modelos de células metastásicas analizadas en esta tesis. Por otro lado, el silenciamiento de Rab5 mediante shRNA se correlacionó no tan sólo con una disminución en la migración celular, sino también con una baja en la activación de Rac-1, inclusive en presencia de Caveolina-1. Este efecto promotor de migración de Caveolina-1 fue acompañado de un aumento del reclutamiento del GEF de Rac-1, Tiam1 a endosomas tempranos positivos para Rab5.

Además, se demostró que Caveolina-1 recluta a p85 α , un GAP de Rab5, promoviendo así el aumento en la forma activa de Rab5 y la migración celular. Estos efectos fueron revertidos por la sobre-expresión p85 α . Por último, en esta tesis demostramos la importancia *in vivo* de cada una de estas proteínas, Caveolina-1 p85 α , Rab5 y Rac-1, en un modelo de metástasis *in vivo* en ratones C57BL/6 .

En su conjunto, los resultados de esta tesis apuntan hacia la existencia de un nuevo eje de señalización Caveolina-1/p85 α /Rab5/Tiam1/Rac-1, el cual controla la migración e invasión de células metastásicas.

B. CONEXIONES Y CONSECUENCIAS DE LA RELACIÓN CAVEOLINA-1 Y RAB5.

Cuando iniciamos esta investigación observamos que los niveles proteicos de Rab5 son mayores en células con alta capacidad metastásica (HT-29 (US) y B16-F10) respecto a sus contrapartes menos invasivas (HT-29 (ATCC) y B16-F0) (**Figura 9**). A pesar de que estos modelos celulares derivan de diferentes especies, tejidos y contextos celulares, hay una interesante correlación entre el potencial metastásico de cada línea celular y la expresión de Rab5. Estos datos proporcionan información valiosa acerca de la posible relevancia de Rab5 en la agresividad y capacidad metastásica. Asimismo, es importante constatar que la expresión de otras proteínas que componen este eje como Tiam1 y Rac-1, son también comúnmente alteradas en cáncer, y que su sobre-expresión se asocia a

un mal pronóstico en pacientes (Shang et al., 2014; Liu S et al, 2014;. Ji J et al., 2015).

Basados en nuestras observaciones, proponemos un modelo en que la activación de Rab5 por Caveolina-1 ocurre en endosomas tempranos, lo cual se relaciona con un aumento del tamaño de estas vesículas en presencia de Caveolina-1 (**Figura 12**). Este incremento en el tamaño de los endosomas tempranos podría deberse a un aumento en los procesos de fusión endosomal, mediado por Rab5. De hecho, en muchas investigaciones se ha observado que la sola expresión de la mutante constitutivamente activa de Rab5 (Q79L) promueve la presencia de endosomas “gigantes” (Stenmark et al, 1994; Zerial, 1993). Sin embargo, no podemos excluir el hecho que Caveolina-1 estuviese bloqueando el proceso de maduración endosomal, dado que se ha propuesto una asociación espacial entre Caveolina-1 ubiquitinada y Rab7, esta última esencial en la endocitosis tardía (Hayer et al., 2010). Apoyando esto último, datos recientes indican que diferentes mutantes de Caveolina-1 tanto en sus regiones NH2 y COOH terminal, como en los dominios de oligomerización e intramembrana co-localizan con Rab5, además de estar vinculada con la ubiquitinación e interacción con Rab7 en células de osteosarcoma U2OS. (Kirchner et al., 2013).

Se sabe que Caveolina-1 se distribuye ubicuamente en la célula, encontrándose tanto en la membrana plasmática, el retículo endoplasmático, el complejo de

Golgi, en vesículas de exportación hacia la membrana plasmática y difusa en el citoplasma (Quest et al., 2004; Williams y Lisanti, 2005). Pese a que se ha descrito una re-distribución de Caveolina-1 durante la migración de fibroblastos excluyéndose del borde celular delantero y polarizándose en la parte trasera de la célula (Sun et al., 2007), nuestro laboratorio ha descrito que no existe polarización de Caveolina-1 en células metastásicas MDA-MB-231 y B16-F10 lo que nos sugiere que la polarización de Caveolina-1 no es requerida para la migración de las células metastásicas (Urra et al. 2012). Dado que Rab5 si se re-localiza bajo estímulos pro-migratorios en células tumorales y metastásicas (Torres et al., 2010, Mendoza et al., 2013), no podemos concluir acerca de una asociación física o en un complejo entre estas proteínas. Es importante destacar que esta tesis no se enfocó en estudiar las distribuciones específicas de cada una de las moléculas involucradas sino más bien en los efectos de activación, aumento de migración, invasión, metástasis o precipitación conjunta. Un análisis más detallado de la distribución de las proteínas involucradas en el eje propuesto permitiría entender más profundamente estos efectos.

C. EJE CAVEOLINA-1/P85 α /RAB5/TIAM1/RAC-1 EN LOS PROCESOS QUE PROMUEVEN MIGRACIÓN Y METÁSTASIS.

Muchos estudios han demostrado que Caveolina-1 es fundamental para promover la migración y metástasis tumoral, debido a que aumenta los procesos de invasión, remodelación de la matriz extracelular, polarización, recambio de adhesiones focales, invasión, fosforilación de la quinasa de adhesión focal (FAK), disminución en la expresión de E-Cadherina, además de otros procesos en células tumorales (Datos de literatura se encuentran resumidos en la **Tabla 6**). Con el objetivo de conectar estos hallazgos con Rab5, es importante destacar el reciente trabajo de nuestro grupo el cual involucra a Rab5 en muchos de los mismos procesos descritos para Caveolina-1 (Mendoza et al., 2013). De hecho, estos resultados vinculan a Rab5 y la migración celular a través de la endocitosis de integrinas y el desensamble de adhesiones focales, demostrando que Rab5 se activa en la periferia celular, durante el proceso de adhesión y migración celular (Mendoza et al., 2013). En este mismo trabajo se detectó una asociación en complejo entre Rab5, la integrina β 1 y algunos componentes de las Adhesiones Focales, como Paxilina, Vinculina y FAK. Por otro lado, resultados descritos por otros grupos indican que Caveolina-1 interactúa con la integrina β 1, regulando la adhesión celular a través de las proteínas quinasas de la familia Src y FAK, lo cual aumenta la adhesión, migración e invasión (Preissner et al., 2000). Además, resultados descritos en nuestro laboratorio (Tesis Doctorado en Farmacología, estudiante Rina Ortiz, 2014) muestran que la expresión de Caveolina-1 aumenta la cantidad de

integrina $\beta 1$ en la superficie celular de manera dependiente de Fibronectina. Estos antecedentes permitirían proponer que el aumento en la activación de Rab5 por Caveolina-1 promueve el tráfico de la integrina $\beta 1$ hacia la superficie celular, permitiendo el recambio de adhesiones focales y la migración celular. Otra posibilidad que permitiría explicar el aumento en la invasión celular mediada por Caveolina-1 y Rab5 está relacionada con la liberación de las enzimas proteolíticas que degradan componentes de la matriz extracelular, llamadas metaloproteasas. Resultados de nuestro laboratorio han demostrado que Caveolina-1 promueve la secreción de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9 al sobrenadante de las células (Tesis Doctorado en Farmacología, estudiante Rina Ortiz, 2014). Por otro lado, Rab5 está controlando la secreción de las mismas enzimas (Mendoza et al., 2013) y por tanto, investigar estas posibilidades constituyen una proyección interesante para futuras investigaciones.

Por lo tanto, un análisis más profundo de la relación entre estas proteínas como la integrina $\beta 1$ y las proteínas que conforman las adhesiones focales, además de la secreción de metaloproteasas podrían explicar de mejor manera el aumento en la forma activa de Rab5 por Caveolina-1.

Con estos datos, más los resultados de esta tesis sería importante seguir profundizando en la conexión entre Rab5 y Caveolina-1 estudiando los procesos descritos que conectan a ambas proteínas con la finalidad de tener las bases

moleculares que expliquen el rol promotor de metástasis de Caveolina-1 y estudiar su conexión con el recambio de adhesiones focales, *spreading* y secreción de metaloproteasas.

Modelo	Manipulación	Efecto	Referencia
Líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231, T47D, BT549, Hs578T, MDA-MB-453 y SK-BR-3	Silenciamiento de Caveolina-1 / re-expresión de Caveolina-1	MT1-MMP se localiza en <i>lipid raft</i> y co-localiza con Caveolina-1 en invadopodios.	Yamaguchi et al., 2009.
Líneas celulares de carcinoma Hepatocelular humano	Expresión de Caveolina-1	Aumento de la motilidad y la invasión, además de la baja en la expresión de E-cadherina. Aumento de secreción de MMP-2 así como la expresión de MMP-9 y MT1-MMP.	Cokakli et al., 2009.
Células de cáncer de pulmón H1299	Silenciamiento de Caveolina-1 / expresión de Caveolina-1-Y14F	La inhibición de la proliferación celular y reducción de la fosforilación de la quinasa de adhesión focal (FAK). Reducción de la invasión, la migración y la actividad MMP.	Shatz et al., 2010.
Carcinoma nasofaríngeo (CNE1, CNE2 y C666-1)	Silenciamiento de Caveolina-1 / expresión de Caveolina-1	El aumento de la migración celular y la secreción de MMP-3 y MMP-11. Reducción de la secreción de MMP-3 y MMP-11.	Du et al., 2009.
Células de cáncer de pulmón NCI-H446	Expresión de Caveolina-1	La reducción en la expresión de E-cadherina y aumento de la expresión y la actividad de MMP-3.	Yeh et al., 2009.
Glioblastoma U-87 y células de fibrosarcoma HT-1080	Expresión de Caveolina-1	Aumento secreción de MT1-MMP y activación de pro MMP-2 dentro de la fracción caveolar.	Annabi et al., 2001.

Tabla 6: Procesos por los cuales Caveolina-1 favorece procesos involucrados en la migración y metástasis en células tumorales.

La tabla resume las evidencias disponible que relaciona a Caveolina-1 en el aumento de la invasión, la actividad MMPs y la regulación de la matriz extracelular en células tumorales. El tipo de célula estudiado, el enfoque experimental usado para manipular los niveles de Caveolina-1, los efectos observados y las referencias correspondientes son indicados. La Tabla es una versión modificada del Review Núñez-Wehinger et al., 2014.

La migración y metástasis *in vivo* inducida por Caveolina-1 ha sido asociada a su fosforilación en tirosina 14. De hecho, se ha reportado que la fosforilación de

Caveolina-1 es necesaria para estabilizar su localización en las adhesiones focales y la interacción con proteínas como FAK y paxilina (Nethe and Hordijk 2011) promoviendo el desensamblaje de éstas y permitiendo la migración de células tumorales (Goetz et al., 2008). Por tanto, en esta tesis se evaluó la participación de la tirosina 14 en la activación de Rab5 por Caveolina-1 y su efecto en migración celular. Utilizamos para ello tanto una estrategia farmacológica, inhibiendo la fosforilación de Caveolina-1 con el inhibidor PP2 (Inhibidor de proteínas tirosinas kinasas de la familia Src), así como también usando una mutante no fosforilable de la Caveolina-1 (Y14F). En ambos casos realizamos ensayos de *pull-down* con R5BD-GST y se observó una activación parcial de Rab5 comparado con sus respectivos controles, es decir, con la versión no mutada de la proteína y con el vehículo control del inhibidor (**Figura 21**).

Estas observaciones, junto a un estudio previo publicado por Hagiwara et al., 2009 donde se demuestra que el segmento que comprende desde el residuo 81 hasta el 178 de Caveolina-1 es el responsable de la activación de Rab5, nos lleva a proponer que el segmento que contiene a la tirosina 14 no está involucrado en la activación de Rab5 por Caveolina-1, lo que podría explicar parcialmente el resultado obtenido. De esta forma será importante estudiar a futuro cuáles son los segmentos de Caveolina-1 implicados en la activación de Rab5 y la migración celular.

Dado que Caveolina-1 no promueve la activación de Rab5 directamente, nos enfocamos en identificar el mediador involucrado en una putativa activación indirecta de Rab5 por Caveolina-1. Aquí, la proteína p85 α , correspondiente a la subunidad reguladora de la PI3K fue particularmente interesante porque además de ser un Rab5-GAP, interactúa directamente con Caveolina-1 y tiene efectos en migración (Faulstich et al., 2013). De hecho, en líneas celulares de neuroblastoma se observó que p85 α tiene un efecto inhibitorio sobre Rab5 y la migración (Torres et al., 2008).

Nuestros resultados obtenidos por inmunoprecipitación demostraron que p85 α está presente en un complejo proteico con Caveolina-1 en los dos modelos de células metastásicas HT-29(US) y B16-F10 (**Figura 14**). Interesantemente, p85 α disminuyó tanto la activación de Rab5 como la migración celular promovida por Caveolina-1 en ambos modelos celulares. Postulamos un modelo por el cual p85 α es secuestrada en un complejo con Caveolina-1 promoviendo la activación de Rab5 y Rac-1, el reclutamiento de Tiam-1 a endosomas tempranos, la invasión y la migración celular (**Figura 28**).

Es importante mencionar que este mecanismo de “secuestro” es homólogo al descrito por Torres et al., 2008 donde la Caspasa 8 promueve la activación de Rab5 en células de neuroblastoma vía reclutamiento de p85 α . Caspasa 8 en su función canónica es la enzima iniciadora de la vía extrínseca de apoptosis, pero también ha sido descrita como una proteína señalizadora que promueve

migración y metástasis (Cursi et al, 2006; Senft et al., 2006; Torres et al., 2008). En estudios previos se demostró que la fosforilación de Caspasa 8 en su residuo de tirosina 380 crea un sitio de unión SH2 (Barbero et al., 2008), el cual interactúa directamente con p85 α , promoviendo la inactivación Rab5 (Torres et al., 2008). El esquema ilustrado en la **Figura 34** resume los hallazgos previamente identificados para la regulación de Rab5 por p85 α , incorporando la función de Caspasa 8 y Caveolina-1.

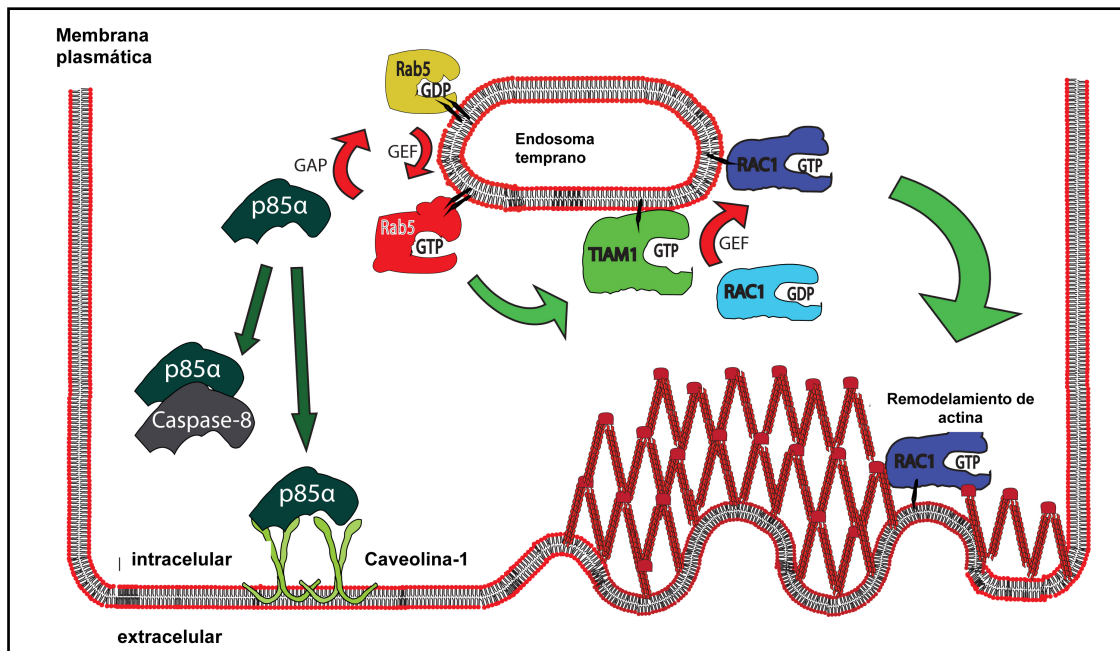


Figura 34: Función de p85 α en la señalización de Caveolina-1 durante la migración celular mediada por Rab5.

En el esquema se presentan las funciones de p85 α y el eje Caveolina-1/p85 α /Rab5/Tiam1/Rac-1 que evaluó esta tesis. Además, se incluye a Caspasa 8 la cual utiliza un mecanismo análogo (Torres et al., 2008). La figura es una versión modificada del Addendum Díaz et al., 2014. (ver página 5).

Rac-1, como regulador central en la migración celular ha sido recientemente indentificado como blanco de acción de Caveolina-1 (Urra et al., 2012), y por tanto comprender cómo se conectan estas dos proteínas nos llevó a indagar

sobre reguladores de Rac-1, que de algún manera se relacionen con Caveolina-1. La GTPasa Rab5 fue un candidato clave ya que interacciona con Caveolina-1 (Hagiwara et al., 2009) y activa a Rac-1 (Palamidessi et al., 2008). Rab5 es un regulador clave de la dinámica de endosomas tempranos y resultados recientes de nuestro laboratorio la han implicado en procesos asociados a la migración como el tráfico de integrinas, el recambio de adhesiones focales y la expansión o “*spreading*” celular (Mendoza et al., 2014). Algunas investigaciones han demostrado que Rab5 activa Rac-1 mediante del reclutamiento del GEF Tiam1 a los endosomas tempranos promoviendo con ello un aumento de la macropinocitosis de receptores de la superficie celular y la migración celular (Palamidessi et al., 2008). Sin embargo, los eventos de señalización río arriba en la activación de Rab5 y la migración celular son aún poco comprendidos.

Investigamos la participación de Tiam1 en la migración y en la activación de Rac-1 inducida por Caveolina-1, utilizando el inhibidor comercial NSC2376. Este inhibidor tiene un efecto de inhibición selectivo tanto de Tiam1 y como del GEF Trio (Gao et al., 2004), por lo que no podemos descartar un efecto de este último en los procesos mediados por Caveolina-1 y Rab5 (**Figura 25 y Figura 27**). Sin embargo, proponemos a Tiam1 como la molécula involucrada ya que además del ensayo de inhibición, observamos que Caveolina-1 promueve significativamente el reclutamiento de Tiam1 a endosomas tempranos EEA1 positivos (**Figura 26**).

Otro aspecto que queda pendiente por evaluar es si Caveolina-1, además de aumentar el reclutamiento de Tiam1 a endosomas tempranos, promueve también la activación de este, lo que se traduciría en la fosforilación de treonina, como ha sido reportado en la literatura (Fleming et al., 1997). Una de esas posibles interacciones podría estar dada por la Proteína Quinasa C (PKC) que está implicada en la fosforilación de Tiam1 (Fleming et al., 1999) y que a su vez interactúa con Caveolina-1 (Oka et al., 1997, Felley-Bosco et al., 2000).

D. OTRA CONEXIÓN: CAVEOLINA-1 Y RAB11.

Esta tesis propone un modelo para la conexión entre una proteína de andamiaje que regula la señalización celular como Caveolina-1 y una proteína involucrada en el tráfico endosomal como Rab5, todo esto dentro del contexto de migración celular. Ahora bien, la literatura actualmente disponible presenta solamente una conexión entre proteínas de tal naturaleza como es el caso de Caveolina-1 y Rab11. En el trabajo de Lapierre et al., 2012 se analiza la relación entre Caveolina-1 y Rab11 un marcador bien definido de los endosomas de reciclaje en células MDCK. Sin embargo, en este modelo Caveolina-1 se encuentra polarizada, a diferencia de lo descrito para células metastásicas usadas en esta tesis (Urra et al., 2012). En esta investigación se comprueba una regulación coordinada entre ambas proteínas en los sistemas de reciclaje apical, lo que demuestra que tanto Caveolina-1 como Rab11 son componentes de la misma vía. Sin embargo, se desconoce la función de esta conexión en migración celular (Lapierre et al., 2012).

E. IMPORTANCIA *IN VIVO* DEL EJE CAVEOLINA-1/P85 α /RAB5/TIAM1/RAC-1.

En esta investigación trabajamos con un modelo de metástasis *in vivo* en ratones C57BL/6, utilizando la línea de melanoma murino B16-F10 cuya gran ventaja radica en ser una línea singénica y donde por lo tanto no existe rechazo inmunológico en el animal (Ausubel et al., 1996). De esta manera, no es necesario trabajar con ratones inmunodeprimidos. Otra ventaja de este modelo es la rapidez, ya que gracias a trabajos previos en los cuales se inocularon células B16-F10 que expresaban Caveolina-1 se observó que al día 21 post-inoculación es posible detectar diferencias significativas en la colonización de células de melanoma en el pulmón del animal comparado con las células control (Lobos et al., 2013). En esta investigación utilizamos este modelo para evaluar además de la importancia de Rac-1 en la metástasis, el efecto de Rab5 y p85 α . De esta manera, en las **Figuras 31, 32 y 33** es posible observar que tanto el silenciamiento de Rab5 como la sobre-expresión de p85 α y Rac-1 en presencia de Caveolina-1 disminuyó significativamente el rol promotor de metástasis de la proteína. Importantemente, se comprobó con los experimentos que estas tres proteínas son clave para que Caveolina-1 promueva la migración, invasión y metástasis *in vivo*.

Pese a que no se investigó directamente el efecto de Tiam1 en nuestros modelos *in vivo*, se podría proponer que esta proteína tiene un muy importante rol en el proceso de metástasis en base a otros antecedentes, donde se observa que la expresión de Tiam-1 se relaciona con tumores aún más agresivos y un mayor desarrollo de metástasis (Malliri et al., 2002).

En nuestros ensayos de metástasis *in vivo* en ratones C57BL/6 no estudiamos específicamente en qué etapa de la metástasis están involucradas las proteínas Caveolina-1, Rac-1, Rab5 y p85 α , una situación importante a considerar para futuras investigaciones. Aún así, investigaciones de nuestro laboratorio han determinado que Caveolina-1 promueve un aumento en la transvasación de células B16-F10 medido por un ensayo migración transendotelial (Tesis Doctorado en Farmacología Rina Ortiz 2015) sugiriendo su posible participación en los procesos de extravasación y extravasación de las células tumorales. Sin embargo, en el ensayo de metástasis *in vivo* que realizamos durante esta tesis, solamente sería relevante el efecto de Caveolina-1 sobre la extravasación dado que se inyectan las células por la vena lateral de la cola del animal; evitando de esta manera la necesidad del proceso de intravasación.

De todas maneras, sería interesante investigar si Rab5, Rac-1 y p85 α juegan un papel importante en este proceso tomando en consideración los resultados obtenidos en el experimento de metástasis *in vivo*. Otra importante posibilidad a estudiar es si Rab5, p85 α y Rac-1 están involucradas en la colonización de las células con el endotelio del pulmón, lo que se ha descrito ocurre a través de la molécula de adhesión Lu-ECAM1 (Zhu et al. 1991). De hecho, se ha reportado que en ratones *knock-out* para Caveolina-1, las células B16-F10 son incapaces de adherirse y de transmigrar a través del endotelio. Esto se debe a que Caveolina-1 regula la expresión de las proteínas de adhesión ICAM y VCAM en el endotelio de los vasos sanguíneos (Capozza et al. 2012), lo cual deja en

evidencia que Caveolina-1 en el microambiente tumoral también contribuye a la generación de la metástasis. Estudiar si estas otras moléculas tienen un efecto en este proceso daría luces de los mecanismos celulares por los cuales Caveolina-1 promueve un aumento en la metástasis.

F. RAB5 COMO POTENCIAL BLANCO TERAPÉUTICO EN CÁNCER.

El pronóstico de los pacientes con cáncer depende del nivel de avance de la enfermedad, de su estado fisiológico y de la naturaleza del tumor a nivel molecular. Dentro de esto último, aún no se dispone de factores de pronóstico que marquen, de forma específica, el cambio a una enfermedad invasiva y metastásica en los tipos tumorales estudiados en esta tesis (cáncer de mama, colon y melanoma). A pesar que algunas de las moléculas que completan el eje que estudiamos han sido postuladas como blancos terapéuticos debido a su amplia desregulación en cáncer como Rac-1 (Bid et al., 2013), estos estudios hacen hincapié en que aún son muy emergentes. Caveolina-1 han sido propuesta como una molécula que se asocia con un mal pronóstico en cáncer de mama, sin embargo estas investigaciones sólo se han realizado mediante estrategias de meta-análisis in silico (análisis que combinan estadísticas de diferentes estudios) (Ma X et al., 2013). Además, este tipo de investigaciones no integra el hecho que Caveolina-1 ejerce la mayoría de sus funciones promotoras de metástasis cuando se encuentra fosforilada en tirosina 14 (Urra et al., 2012; Lobos et al., 2013; Tesis Doctorado en Farmacología Rina Ortiz 2015). Es por esto que sería ideal contar con un análisis que integre ambas características

(expresión y fosforilación) para entregar una predicción más segura y considerar a Caveolina-1 como un marcador condicional. Con los resultados de esta tesis, más los datos de literatura que involucran a la expresión de Rab5 en varios tipos de cánceres de tipo metastásicos de mama, ovario y tiroides (Frittoli et al., 2014; Zhao et al., 2010; Croizet-Berger et al., 2002) proponemos a Rab5 como un nuevo marcador de malignidad avanzada en cáncer. Específicamente, los datos obtenidos tanto en ensayos de migración e invasión in vitro (**Figuras 23 y 29**) como los ensayos de metástasis in vivo (**Figura 31**) en presencia de Caveolina-1 proponen a Rab5 como un nuevo blanco terapéutico para la prevención de la progresión hacia la metástasis en los modelos tumorales de la presente investigación. Complementando estos datos hemos observado recientemente que la expresión de Rab5 mantiene características asociadas a la transformación celular como el crecimiento independiente de anclaje, la apoptosis y la proliferación celular (Silva et al., 2015 trabajo en revisión). Sin embargo, es importante seguir profundizando en los mecanismos moleculares que están controlando la conexión de Rab5 y Caveolina-1, lo que permitiría un mejor entendimiento de los eventos moleculares claves en la progresión del cáncer. En este sentido, se han detectado algunos blancos moleculares bloqueados por Rab5 como el Factor Inducible de Hipoxia (HIF1 α), una molécula de adaptación a hipoxia que también ha sido vinculada con Caveolina-1. De hecho, otros trabajos de nuestro laboratorio (Tesis Doctoral en Bioquímica Carlos Sanhueza) demostraron que Caveolina-1 inhibe a HIF1 α y que las células B16-F10 que expresaron Caveolina-1 en hipoxia disminuyen la expresión del

Factor de Crecimiento Endotelial (VEGF) generando en los ensayos in vivo tumores más pequeños y menos vasculados. Esta es otra manera de vincular a Rab5 con Caveolina-1.

Todos estos antecedentes nos permiten postular a Rab5 como una importante molécula a estudiar como blanco terapéutico en etapas avanzadas del cáncer.

G. PROYECCIÓN CLÍNICA.

Cada una de las proteínas del eje Caveolina-1/Rab5/Tiam1/Rac-1 que estudiamos en esta tesis cumple funciones importantes relacionadas con la endocitosis, la proliferación, la regulación de la señalización celular, además de estar desreguladas en diferentes tipos de cáncer. Esto las propone como importantes bio-marcadores en cáncer. Sin embargo, no es posible apuntar a una terapia clínica que suprima completamente su expresión debido a los argumentos anteriormente expuestos.

Demostramos que la interacción de Caveolina-1 con p85 α es la que promueve la activación del eje Rab5/Tiam1/Rac-1 en nuestros modelos de células con alto potencial metastásico de cáncer de colon HT-29(US), de melanoma murino B16-F10 y de cáncer de mama MDA-MB231. Por tanto, sería importante buscar una terapia molecular que impida tal interacción con el objetivo que p85 α pueda ejercer su efecto GAP sobre Rab5 y de esta forma disminuir la activación del eje de señalización propuesto, la migración, invasión y metástasis *in vivo*. En

nuestro laboratorio se ha demostrado que la expresión de E-cadherina estaría estabilizando a Caveolina-1 en la membrana plasmática y además disminuyendo la activación de Rac-1 y la metástasis *in vivo* en el modelo B16-F10 (Lobos et al., 2013;2014). Además, se ha observado que la expresión de E-cadherina en la membrana en conjunto con Caveolina-1 estaría promoviendo el reclutamiento de varios complejos proteicos que involucran a β -catenina (Torres et al., 2007) como también a proteínas asociadas al citoesqueleto como GalNacPtase, p120ctn, β -catenin, PTP1B, RPTP μ (Derycke et al., 2004) lo que desencadena una baja en la activación de GTPasas involucradas en la migración como Rac-1 y Cdc42 en modelos que incluyen a melanomas y a cáncer de colon HT-29. Resultados preliminares de nuestro grupo han demostrado que la expresión de E-Cadherina en nuestros modelos B16-F10 y HT-29(US) disminuye los niveles de activación de Rab5 por Caveolina-1 (Proyecto de tesis estudiante Doctorado en Bioquímica, Natalia Díaz). Es por esto que proponemos como una futura proyección clínica, en células que sobre-expresan Caveolina-1, aumentar la expresión de E-cadherina con estrategias que integren a promotores específicos de cáncer de colon, melanoma y mama con el objetivo de bloquear la interacción Caveolina-1/p85 α y de esta forma frenar la migración, activación de Rac-1, la invasión y metástasis *in vivo*.

POR LO TANTO, EN BASE A LOS RESULTADOS DESCRITOS EN ESTA TESIS, PROPONEMOS EL SIGUIENTE MODELO:

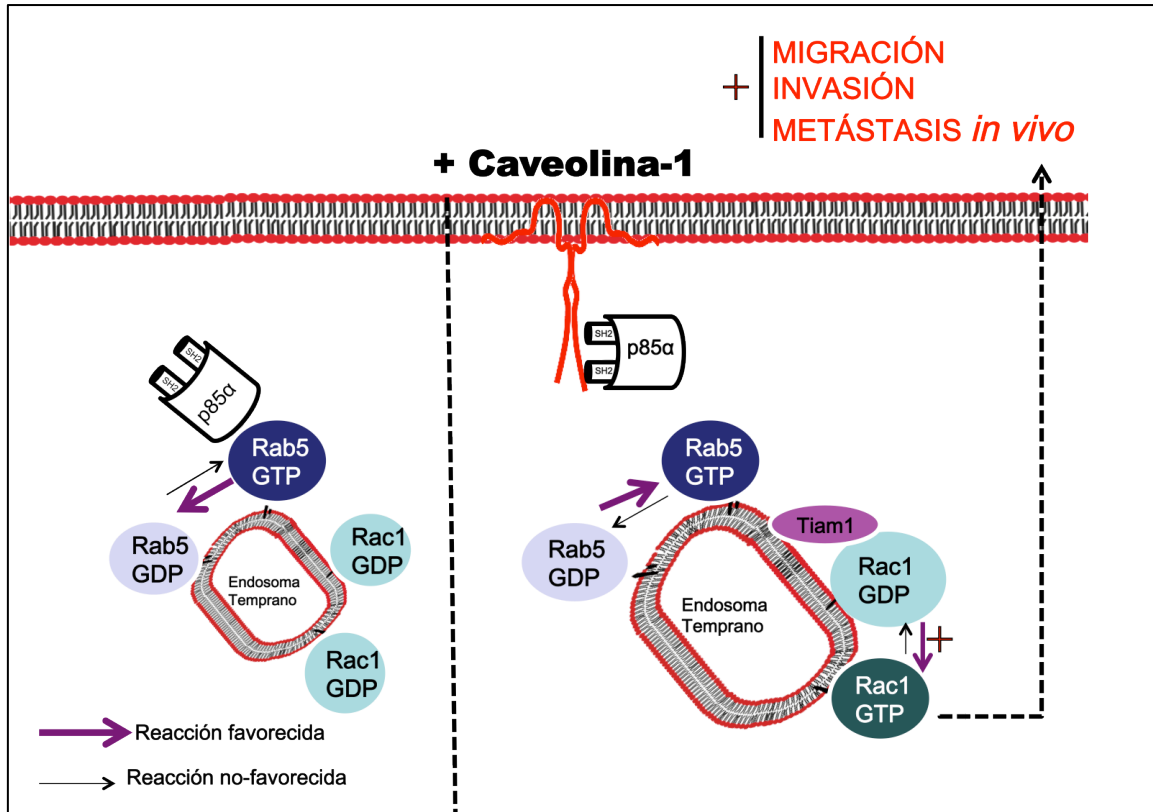


Figura 35: Eje Caveolina-1/p85α/Rab5/Tiam1/Rac-1 propuesto en esta tesis.

La figura resume los principales resultados obtenidos en el transcurso de esta tesis que indican que Caveolina-1 secuestra al Rab GAP p85α iniciando una cascada de activación que involucra la activación de Rab5, Rac-1 y el reclutamiento del GEF Tiam-1 a endosomas tempranos. Estos procesos de activación promueven un aumento tanto en la migración como en la invasión celular inducida por Caveolina-1. A su vez se evaluó la importancia de las proteínas del eje en un modelo de metástasis *in vivo* en ratones C57/BL6.

5.CONCLUSIÓN GENERAL

5. CONCLUSIÓN GENERAL

La presente investigación nos permite comprender los mecanismos moleculares que utiliza Caveolina-1 para promover la migración, invasión y metástasis en tres diferentes modelos de células en etapas avanzadas del cáncer. Asimismo, Caveolina-1 promueve un aumento en la activación de Rab5 y en el tamaño de endosomas tempranos. Importantemente, la presencia y activación de Rab5 es fundamental para la migración e invasión celular promovida por Caveolina-1.

A su vez, la expresión de Caveolina-1 promueve un aumento en la activación de Rac-1 de manera dependiente de Rab5. En relación a esto, Caveolina-1 promueve un reclutamiento del GEF de Rac-1, Tiam1 a endosomas tempranos lo que permitiría comprender esta activación secuencial. Mecanísticamente, se implica a la RabGAP p85 α , en efectos dependientes de Caveolina-1, dado que Caveolina-1 secuestra a p85 α lo que impide la inactivación de Rab5 y aumento de la migración celular. Usando un modelo pre-clínico, se demostró que Caveolina-1 requiere de p85 α , Rab5 y Rac-1 para promover la metástasis *in vivo* en ratones C57BL/6.

Esta tesis describe un nuevo eje de señalización **Caveolina-1/p85 α /Rab5/Tiam1/Rac-1** que permite comprender el aumento de migración, invasión y metástasis dependiente de Caveolina-1, involucrando moléculas generalmente alteradas en cáncer y aportando un mecanismo novedoso que da luz a una futura terapia anti-metastásica vía inhibición de estas proteínas.

6. ANEXOS

Durante el desarrollo de la tesis realizamos algunos análisis y experimentos que no tienen una directa relación con los objetivos planteados para la tesis pero que apoyaron su desarrollo. A continuación los detallamos.

Expresión de la mutante Rac-1(S17N), Ensayo de pull-down para Rab5 (R5BD), ensayo de migración por herida y en cámara Boyden (transwell) en células HT-29(US).

Se ha propuesto un circuito de activación que involucra en orden secuencial tanto a las GPTasas Ras, Rab5, a Rac1 y su GEF Tiam-1 (Palamidessi et al., 2008). Como una manera de verificar la direccionalidad de la vía de activación propuesta para esta tesis, realizamos una transfección transitoria de una dominante negativa de Rac1 denominada Rac-1(S17N) en las células HT-29(US) con y sin la expresión de Caveolina-1. Luego de obtener estas células transfectadas, realizamos tanto un ensayo de *pull-down* para Rab5 (R5BD) como ensayos de migración por herida y cámara Boyden (transwell). Nuestros resultados preliminares nos indican que la expresión del dominante negativo Rac1(S17N) no tiene efectos sobre la activación de Rab5 por Caveolina-1 (**Ver Figura anexo 1 A**), lo que nos confirma preliminarmente la secuencialidad de activación Caveolina-1 → Rab5 → Rac-1. Sin embargo, en los ensayos de migración tanto por herida como en cámara Boyden (transwell) la mutante de Rac-1(S17N) impidió el aumento de migración promovido por Caveolina-1, lo

que verifica la importancia de Rac1 en la promoción de la migración en este modelo de células metastásicas (Ver **figura anexo 1 B y C**)

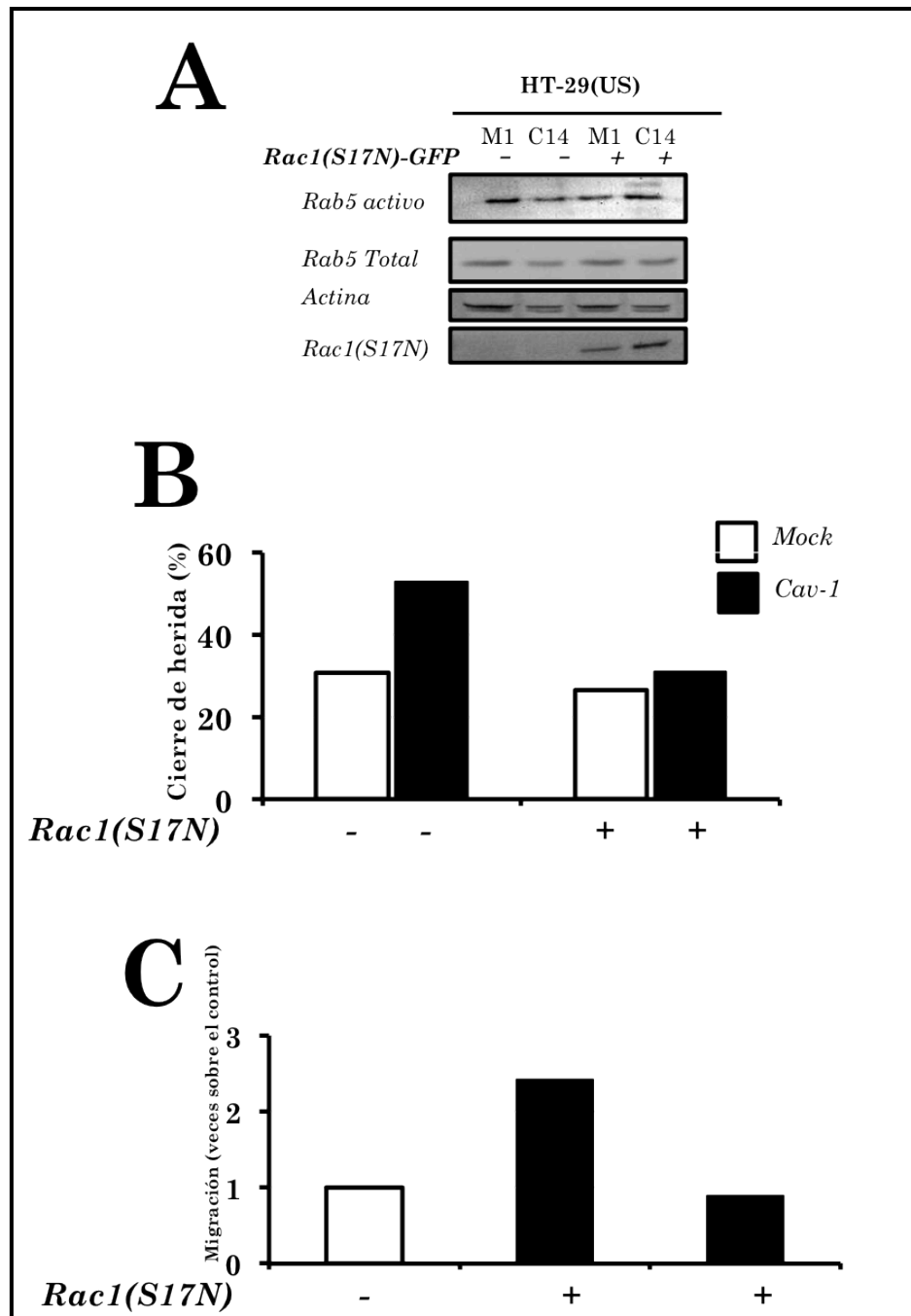


Figura anexo 1: La expresión de Rac-1(S17N) no afecta a la activación de Rab5 por Caveolina-1 pero sí impide que Caveolina-1 promueva migración en línea celular HT-29(US)

Se realizó una transfección transitoria de Rac1(S17N) en células HT29(US) (clones M1,C14) Posteriormente se obtuvieron los extractos celulares y se realizó el ensayo *Pull-Down* con la proteína de fusión R5BD-GST según descrito en materiales y métodos. En **A** se muestra un Western Blot representativo. En **B** se observa la cuantificación de un ensayo de migración por herida. En **C** se observa la cuantificación de la migración en cámara Boyden (transwell) de un experimento. Se grafica como veces de aumento sobre el control.

Comparación secuencia de unión a dominios SH2 de Caspasa 8 y Caveolina-1.

Sabemos por los trabajos de Torres et al., 2008 que Caspasa 8 fosforilada en tirosina 380 se une mediante a p85 mediante su dominio SH2, como una manera de aproximarnos en nuestro sistema hicimos una comparación simple de secuencia de ambas proteínas como se muestra en la **Figura Anexo2**.

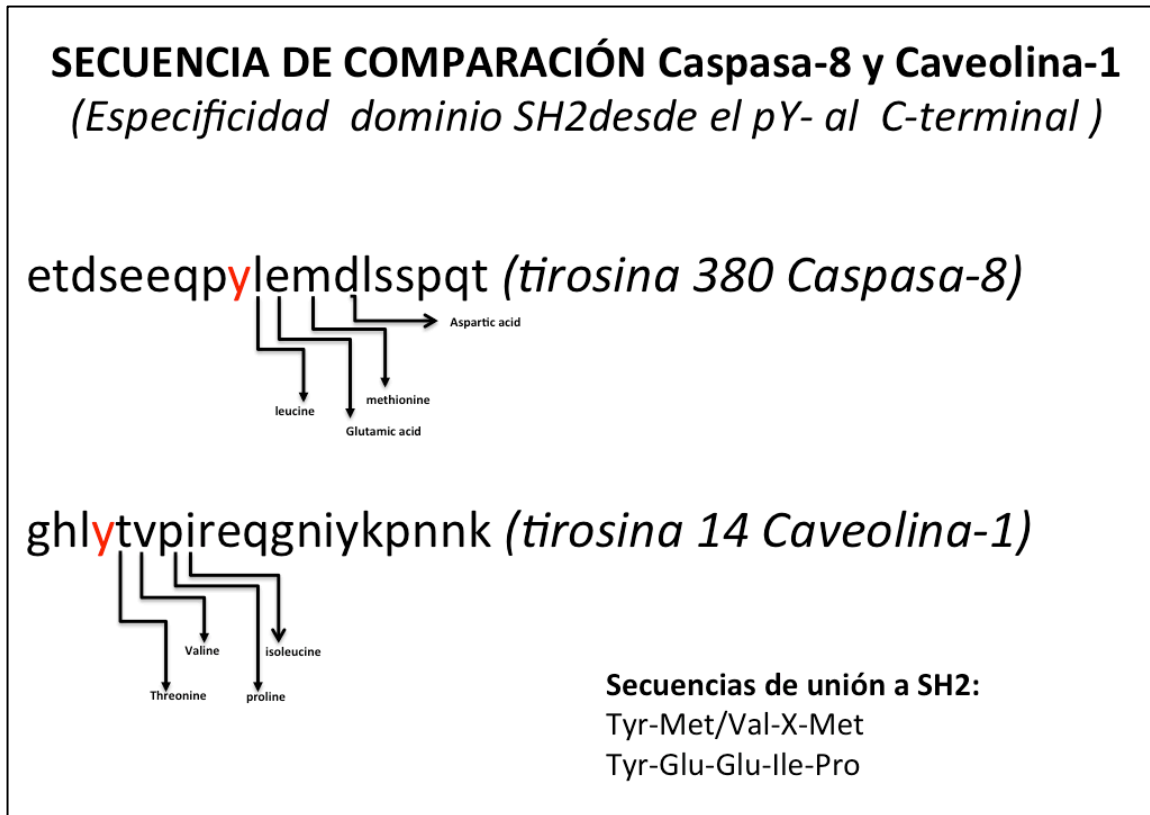


Figura anexo 2: Comparación secuencia de unión a dominios SH2 de Caspasa 8 y Caveolina-1.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, R.G. (1998). The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* 67, 199-225.
- Ando T, Ishiguro H, Kimura M, Mitsui A, Mori Y, Sugito N, Tomoda K, Mori R, Harada K, Katada T, Ogawa R, Fujii Y, Kuwabara Y. The overexpression of caveolin-1 and caveolin-2 correlates with a poor prognosis and tumor progression in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2007.18(3):601-9.
- Annabi B, Lachambre M, Bousquet-Gagnon N, Page M, Gingras D, Beliveau R. Localization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in caveolae membrane domains. *Biochem J.* 2001. 1;353(Pt3):547-53.
- Arpaia E, Blaser H, Quintela-Fandino M, Duncan G, Leong HS, Ablack A, Nambiar, SC, Lind EF, Silvester J, Fleming CK, Rufini A, Tusche MW, Brüstle A, Ohashi PS, Lewis JD, Mak TW. The interaction between caveolin-1 and Rho-GTPases promotes metastasis by controlling the expression of alpha5-integrin and the activation of Src, Ras and Erk. *Oncogene.* 2011.10.1038/onc.2011.288.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith J, Struhl K (1996) *Current Protocols in Molecular Biology* (Current Prot Mol Biol).
- Barbero S, Barilà D, Mielgo A, Stagni V, Clair K, Stupack D. Identification of a critical tyrosine residue in caspase 8 that promotes cell migration. *J Biol Chem.* 2008.9;283(19):13031-4.
- Bender FC, Reymond MA, Bron C, Quest AF. Caveolin-1 levels are down-regulated in human colon tumors, and ectopic expression of caveolin-1 in colon carcinoma cell lines reduces cell tumorigenicity. *Cancer Res.* 2000. 60(20):5870-8.
- Bernards A, Settleman J. GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol.* 2004.14(7):377-85. Review.
- Bishop AL, Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J.* 2000. 348 (2):241-55.
- Böhle AS, Kalthoff H. Molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis. *Langenbecks Arch Surg.* 1999. 384(2):133-40. Review.
- Bucci C, Parton RG, Mather IH, Stunnenberg H, Simons K, Hoflack B, Zerial M.

The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell*. 1992.4;70(5):715-28.

- Capozza F, Trimmer C, Castello-Cros R, Katiyar S, Whitaker-Menezes D, Follenzi A, Crosariol M, Llaverias G, Sotgia F, Pestell RG, Lisanti MP. Genetic ablation of Cav1 differentially affects melanoma tumor growth and metastasis in mice: role of Cav1 in Shh heterotypic signaling and transendothelial migration. *Cancer Res*. 2012 May 1;72(9):2262-74.
- Carlier MF, Pantaloni D. Control of actin assembly dynamics in cell motility. *J Biol Chem*. 2007.10;282(32):23005-9.
- Chamberlain, M. D.; Berry, T. R.; Pastor, M. C.; Anderson, D. H. The p85alpha subunit of phosphatidylinositol 3'-kinase binds to and stimulates the GTPase activity of Rab proteins. *J Biol Chem*, 2004, 279, 48607-48614.
- Chamberlain MD, Chan T, Oberg JC, Hawrysh AD, James KM, Saxena A, Xiang J, Anderson DH. Disrupted RabGAP function of the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase results in cell transformation. *J Biol Chem*. 2008. 6;283(23):15861-8.
- Chan PC, Chen HC. p120RasGAP-mediated activation of c- Src is critical for oncogenic Ras to induce tumor invasion. *Cancer Res* 2012; 72(9): 2405-15.
- Chen X, Macara IG. Par-3 controls tight junction assembly through the Rac exchange factor Tiam1. *Nat Cell Biol*. 2005 Mar;7(3):262-9.
- Coelho Neto J, Mesquita ON. Living cell motility. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci*. 2008 (1864):319-28.
- Cokakli M, Erdal E, Nart D, Yilmaz F, Sagol O, Kilic M, et al. Differential expression of Caveolin-1 in hepatocellular carcinoma: correlation with differentiation state, motility and invasion. *BMC Cancer*. 2009;9:65.
- Cohen, A.W., Hnasko, R., Schubert, W., & Lisanti, M.P. (2004). Role of caveolae & caveolins in health & disease. *Physiol Rev* 84, 1341-1379.
- Couet J, Li S, Okamoto T, Ikezu T, Lisanti MP. (1997). Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J Biol Chem* 272: 6525–6533.
- Croizet-Berger K, Daumerie C, Couvreur M, Courtoy PJ, van den Hove MF: The endocytic catalysts, Rab5a and Rab7, are tandem regulators of thyroid hormone production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99(12):8277-8282.

- Cursi S, Rufini A, Stagni V, Condò I, Matafora V, Bachi A, Bonifazi AP, Coppola L, Superti-Furga G, Testi R, Barilà D. Src kinase phosphorylates Caspase-8 on Tyr380: a novel mechanism of apoptosis suppression. *EMBO J.* 2006 May 3;25(9):1895-905.
- Derycke LD, Bracke ME. N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *Int J Dev Biol.* 2004;48(5-6):463-76. Review.
- Du ZM, Hu CF, Shao Q, Huang MY, Kou CW, Zhu XF, et al. Upregulation of caveolin-1 and CD147 expression in nasopharyngeal carcinoma enhanced tumor cell migration and correlated with poor prognosis of the patients. *Int J Cancer.* 2009. 15;125(8):1832-41.
- Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature.* 2002. 12;420(6916):629-35. Review.
- Faulstich M, Böttcher JP, Meyer TF, Fraunholz M, Rudel T. Pilus phase variation switches gonococcal adherence to invasion by caveolin-1-dependent host cell signaling. *PLoS Pathog.* 2013;9(5):e1003373.
- Felley-Bosco E, Bender FC, Courjault-Gautier F, Bron C, Quest AF. Caveolin-1 down-regulates inducible nitric oxide synthase via the proteasome pathway in human colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Dec 19;97(26):14334-9.
- Fleming IN, Elliott CM, Collard JG, Exton JH. Lysophosphatidic acid induces threonine phosphorylation of Tiam1 in Swiss 3T3 fibroblasts via activation of protein kinase C. *J Biol Chem.* 1997 Dec 26;272(52):33105-10.
- Fleming IN, Elliott CM, Buchanan FG, Downes CP, Exton JH. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates Tiam1 by reversible protein phosphorylation. *J Biol Chem.* 1999 Apr 30;274(18):12753-8.
- Frittoli E, Palamidessi A, Marighetti P, Confalonieri S, Bianchi F, Malinverno C, Mazzarol G, Viale G, Martin-Padura I, Garre M et al: A RAB5/RAB4 recycling circuitry induces a proteolytic invasive program and promotes tumor dissemination. *J Cell Biol* 2014, 206(2):307-328.
- Fritz G, Just I, Kaina B. Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int J Cancer.* 1999. 31;81(5):682-7.
- Folkman M.D. Mechanisms of Angiogenesis. *Nature* 1997. 386: 671-4.

- Gao Y, Dickerson JB, Guo F, Zheng J, Zheng Y. Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 May 18;101(20):7618-23.
- Geho DH, Bandle RW, Clair T, Liotta LA. Physiological mechanisms of tumor-cell invasion and migration. *Physiology (Bethesda)*. 2005 Jun;20:194-200. Review.
- Globocan, I. (2012). http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. World Health Organization.
- Goetz JG, Joshi B, Lajoie P, Strugnelli SS, Scudamore T, Kojic LD, Nabi IR. Concerted regulation of focal adhesion dynamics by galectin-3 and tyrosine-phosphorylated caveolin-1. *J Cell Biol*. 2008 Mar 24;180(6):1261-75.
- Goncharova EA, Goncharov DA, Lim PN, Noonan D, Krymskaya VP. Modulation of cell migration and invasiveness by tumor suppressor TSC2 in lymphangiomyomatosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 34(4): 473-80.
- Grande-García A, Echarri A, de Rooij J, Alderson NB, Waterman-Storer CM, Valdivielso JM, del Pozo MA. Caveolin-1 regulates cell polarization and directional migration through Src kinase and Rho GTPases. *J Cell Biol*. 2007 21;177(4):683-94.
- Gregory CD, Pound JD. Cell death in the neighbourhood: direct microenvironmental effects of apoptosis in normal and neoplastic tissues. *J Pathol*. 2011. 223(2):177-94.
- Gupton SL, Gertler FB. Filopodia: the fingers that do the walking. *Sci STKE*. 2007. 21;2007(400):re5. Review.
- Hagiwara M, Shirai Y, Nomura R, Sasaki M, Kobayashi K, Tadokoro T, Yamamoto Y. Caveolin-1 activates Rab5 and enhances endocytosis through direct interaction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009. 378(1):73-8.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011. Mar 4;144(5):646-74.
- Hayer A, Stoeber M, Ritz D, Engel S, Meyer HH, Helenius A. Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation. *J Cell Biol*. 2010. 1;191(3):615-29.
- Ho, C. C., Huang, P. H., Huang, H. Y., Chen, Y. H., Yang, P. C. & Hsu, S. M. (2002). Up-regulated caveolin-1 accentuates the metastasis capability of lung adenocarcinoma by inducing filopodia formation. *Am J Pathol* 161(5): 1647-1656.

- Hu G, Ye RD, Dinauer MC, Malik AB, Minshall RD. Neutrophil caveolin-1 expression contributes to mechanism of lung inflammation and injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008. 294(2):L178-86.
- Janson C, Kasahara N, Prendergast GC, Colicelli J. RIN3 is a negative regulator of mast cell responses to SCF. *PLoS One* 2012; 7(11): e49615.
- Ji J, Feng X, Shi M, Cai Q, Yu Y, Zhu Z, Zhang J. Rac1 is correlated with aggressiveness and a potential therapeutic target for gastric cancer. *Int J Oncol*. 2015. 46(3):1343-53.
- Jordens, I.; Marsman, M.; Kuijl, C.; Neefjes, J. Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion. *Traffic*, 2005, 6, 1070-1077.
- Joshi B, Strugnell SS, Goetz JG, Kojic LD, Cox ME, Griffith OL, Chan SK, Jones SJ, Leung SP, Masoudi H, Leung S, Wiseman SM, Nabi IR. Phosphorylated caveolin-1 regulates Rho/ROCK-dependent focal adhesion dynamics and tumor cell migration and invasion. *Cancer Res*. 2008. 68(20):8210-20.
- Kirchner P, Bug M, Meyer H. Ubiquitination of the N-terminal region of caveolin-1 regulates endosomal sorting by the VCP/p97 AAA-ATPase. *J Biol Chem*. 2013. 8;288(10):7363-72.
- Kogo H, Aiba T, Fujimoto T. Cell type-specific occurrence of caveolin-1alpha and -1beta in the lung caused by expression of distinct mRNAs. *J Biol Chem*. 2004.11;279(24):25574-81.
- Kunita R, Otomo A, Mizumura H, Suzuki-Utsunomiya K, Hadano S, Ikeda JE. The Rab5 activator ALS2/alsin acts as a novel Rac1 effector through Rac1-activated endocytosis. *J Biol Chem*. 2007. 1;282(22):16599-611.
- Lanzetti L, Palamidessi A, Areces L, Scita G, Di Fiore PP. Rab5 is a signalling GTPase involved in actin remodelling by receptor tyrosine kinases. *Nature*. 2004. 429(6989):309-14
- Lanzetti L, Rybin V, Malabarba MG, Christoforidis S, Scita G, Zerial M, Di Fiore PP. The Eps8 protein coordinates EGF receptor signalling through Rac and trafficking through Rab5. *Nature*. 2000. 408(6810):374-7.
- Lapierre LA, Avant KM, Caldwell CM, Oztan A, Apodaca G, Knowles BC, Roland JT, Ducharme NA, Goldenring JR. Phosphorylation of Rab11-FIP2 regulates polarity in MDCK cells. *Mol Biol Cell*. 2012. 23(12):2302-18.
- Larson Y, Liu J, Stevens PD, Li X, Li J, Evers BM, Gao T. Tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) regulates cell migration and polarity through activation of

CDC42 and RAC1. *J Biol Chem*. 2010. 6;285(32):24987-98.

- Lee H, Volonte D, Galbiati F, Iyengar P, Lublin DM, Bregman DB, Wilson MT, Campos-Gonzalez R, Bouzahzah B, Pestell RG, Scherer PE, Lisanti MP. Constitutive and growth factor-regulated phosphorylation of caveolin-1 occurs at the same site (Tyr-14) in vivo: identification of a c-Src/caveolin-1/Grb7 signaling cassette. *Mol endocrinol*. 2000, 14(11):1750–1775.
- Li S, Seitz R, Lisanti MP. Phosphorylation of caveolin by src tyrosine kinases. The alpha-isoform of caveolin is selectively phosphorylated by v-Src in vivo. *J Biol Chem*. 1996. 16;271(7):3863-8.
- Lisanti MP, Tang ZL, Sargiacomo M. Caveolin forms a hetero-oligomeric protein complex that interacts with an apical GPI-linked protein: implications for the biogenesis of caveolae. *J Cell Biol*. 1993. 123(3):595-604.
- Liu J, Lee P, Galbiati F, Kitsis RN, Lisanti MP. Caveolin-1 expression sensitizes fibroblastic and epithelial cells to apoptotic stimulation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001.
- Liu S, Li Y, Qi W, Zhao Y, Huang A, Sheng W, Lei B, Lin P, Zhu H, Li W, Shen H. Expression of Tiam1 predicts lymph node metastasis and poor survival of lung adenocarcinoma patients. *Diagn Pathol*. 2014. 24;9:69.
- Lobos-González L, Aguilar L, Diaz J, Diaz N, Urra H, Torres VA, Silva V, Fitzpatrick C, Lladser A, Hoek KS, Leyton L, Quest AF. E-cadherin determines Caveolin-1 tumor suppression or metastasis enhancing function in melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2013. 26(4):555-70.
- Lobos-Gonzalez L, Aguilar-Guzmán L, Fernandez JG, Muñoz N, Hossain M, Bieneck S, Silva V, Burzio V, Sviderskaya EV, Bennett DC, Leyton L, Quest AF. Caveolin-1 is a risk factor for postsurgery metastasis in preclinical melanoma models. *Melanoma Res*. 2014. 24(2):108-19.
- Mai A, Veltel S, Pellinen T, Padzik A, Coffey E, Marjomäki V, Ivaska J. Competitive binding of Rab21 and p120RasGAP to integrins regulates receptor traffic and migration. *J Cell Biol*. 2011. 25;194(2):291-306.
- Malliri A, van Es S, Huveneers S, Collard JG. The Rac exchange factor Tiam1 is required for the establishment and maintenance of cadherin-based adhesions. *J Biol Chem*. 2004 Jul 16;279(29):30092-8.
- Malliri A, van der Kammen RA, Clark K, van der Valk M, Michiels F, Collard JG. Mice deficient in the Rac activator Tiam1 are resistant to Ras-induced skin

- tumours. *Nature*. 2002 Jun 20;417(6891):867-71.
- Manser E, Leung T, Salihuddin H, Zhao ZS, Lim L. A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature*. 1994. 6;367(6458):40-6.
 - Mendoza P, Díaz J, Torres VA. On the role of Rab5 in cell migration. *Curr Mol Med*. 2014. 14(2):235-45.
 - Mendoza P, Ortiz R, Díaz J, Quest AF, Leyton L, Stupack D, Torres VA. Rab5 activation promotes focal adhesion disassembly, migration and invasiveness in tumor cells. *J Cell Sci*. 2013. 1;126(Pt 17):3835-47.
 - Moir LM, Black JL, Krymskaya VP. TSC2 modulates cell adhesion and migration via integrin-alpha1beta1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012; 303(8): L703-10.
 - Monier S, Dietzen DJ, Hastings WR, Lublin DM, Kurzchalia TV. Oligomerization of VIP21-caveolin in vitro is stabilized by long chain fatty acylation or cholesterol. *FEBS Lett*. 1996. 17;388(2-3):143-9.
 - Navarro A, Anand-Apte B, Parat MO. A role for caveolae in cell migration. *FASEB J*. 18:1801–11 (2004).
 - Nethe M, Anthony EC, Fernandez-Borja M, Dee R, Geerts D, Hensbergen PJ, Deelder AM, Schmidt G, Hordijk PL. Focal-adhesion targeting links caveolin-1 to a Rac1-degradation pathway. *J Cell Sci*. 2010. 123(11):1948-58.
 - Nethe M, Hordijk PL. A model for phospho-caveolin-1-driven turnover of focal adhesions. *Cell Adh Migr*. 2011 Jan-Feb;5(1):59-64.
 - Núñez-Wehinger S, Ortiz RJ, Díaz N, Díaz J, Lobos-González L, Quest AF. Caveolin-1 in cell migration and metastasis. *Curr Mol Med*. 2014 Feb;14(2):255-74. Review.
 - Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem*. 1998. 6;273(10):5419-22. Review.
 - Palamidessi A, Frittoli E, Garré M, Faretta M, Mione M, Testa I, Diaspro A, Lanzetti L, Scita G, Di Fiore PP. Endocytic trafficking of Rac is required for the spatial restriction of signaling in cell migration. *Cell*. 2008. 134(1):135-47.
 - Park JH, Han HJ. Caveolin-1 plays important role in EGF-induced migration and proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of PI3K/Akt and ERK. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009.297(4):C935-44.

- Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010. 11(9):633-43.
- Preissner KT, Kanse SM, May AE. Urokinase receptor: a molecular organizer in cellular communication. *Curr Opin Cell Biol.* 2000. 12(5):621-8. Review.
- Quest AF, Gutierrez-Pajares JL, Torres VA. Caveolin-1: an ambiguous partner in cell signalling and cancer. *J Cell Mol Med.* 2008 (4):1130-50.
- Quest AF, Leyton L, Párraga M. Caveolins, caveolae, and lipid rafts in cellular transport, signaling, and disease. *Biochem Cell Biol.* 2004. 82(1):129-44.
- Raftopoulou M, Hall A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol.* 2004. 265(1):23-32.
- Razani B, Schlegel A, Liu J, Lisanti MP. Caveolin-1, a putative tumour suppressor gene. *Biochem Soc Trans.* 2001. 29(Pt 4):494-9. Review.
- Rodríguez, D. A., Tapia, J. C., Fernandez, J. G., Torres, V. A., Munoz, N., Galleguillos, D., Leyton, L. & Quest, A. F. (2009). Caveolin-1-mediated suppression of cyclooxygenase-2 via a beta-catenin-Tcf/Lef-dependent transcriptional mechanism reduced prostaglandin E2 production and survivin expression. *Mol Biol Cell* 20(8): 2297-2310.
- Sandri C, Caccavari F, Valdembri D, Camillo C, Vettel S, Santambrogio M, Lanzetti L, Bussolino F, Ivaska J, Serini G. The R-Ras/RIN2/Rab5 complex controls endothelial cell adhesion and morphogenesis via active integrin endocytosis and Rac signaling. *Cell Res.* 2012. 22(10):1479-501.
- Sanguinetti AR, Mastick CC. c-Abl is required for oxidative stress-induced phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine 14. *Cell Signal.* 2003.15(3):289-98.
- Sanguinetti AR, Cao H, Corley Mastick C. Fyn is required for oxidative- and hyperosmotic-stress-induced tyrosine phosphorylation of caveolin-1. *Biochem J.* 2003. 15;376(Pt 1):159-68.
- Schubert W, Frank PG, Razani B, Park DS, Chow CW, Lisanti MP. Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo. *J Biol Chem.* 2001. 28;276(52):48619-22.
- Schnitzer JE. Caveolae: from basic trafficking mechanisms to targeting transcytosis for tissue-specific drug and gene delivery in vivo. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001. 49(3):265-80.

- Senft J, Helfer B, Frisch SM. Caspase-8 interacts with the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase to regulate cell adhesion and motility. *Cancer Res.* 2007.15;67(24):11505-9.
- Shang L, Liu HJ, Hao JJ, Jiang YY, Shi F, Zhang Y, Cai Y, Xu X, Jia XM, Zhan QM, Wang MR. A panel of overexpressed proteins for prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One.* 2014. 22;9(10):e111045.
- Shatz M, Lustig G, Reich R, Liscovitch M. Caveolin-1 mutants P132L and Y14F are dominant negative regulators of invasion, migration and aggregation in H1299 lung cancer cells. *Exp Cell Res.* 2010.10;316(10):1748-62.
- Shepherd TR, Klaus SM, Liu X, Ramaswamy S, DeMali KA, Fuentes EJ. The Tiam1 PDZ domain couples to Syndecan1 and promotes cell-matrix adhesion. *J Mol Biol.* 2010 May 21;398(5):730-46.
- Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T, Lisanti MP. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol.* 1999. 19(11):7289-304.
- Spaargaren, M.; Bos, J. L. Rab5 induces Rac-independent lamellipodia formation and cell migration. *Mol Biol Cell,* 1999. 10:3239-3250.
- Stenmark, H.; Olkkonen, V. M. The Rab GTPase family. *Genome Biol,* 2001, 2, REVIEWS3007.
- Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009. 10(8):513-25.
- Sun XH, Flynn DC, Castranova V, Millecchia LL, Beardsley AR, Liu J. Identification of a novel domain at the N terminus of caveolin-1 that controls rear polarization of the protein and caveolae formation. *J Biol Chem.* 2007 Mar 9;282(10):7232-41.
- Tirado OM, MacCarthy CM, Fatima N, Villar J, Mateo-Lozano S, Notario V. Caveolin-1 promotes resistance to chemotherapy-induced apoptosis in Ewing's sarcoma cells by modulating PKCalpha phosphorylation. *Int J Cancer.* 2010.15;126(2):426-36.
- Thompson TC, Timme TL, Li L, Goltsov A. Caveolin-1, a metastasis-related gene that promotes cell survival in prostate cancer. *Apoptosis.* 1999. 4(4):233-7.
- Thompson TC, Tahir SA, Li L, Watanabe M, Naruishi K, Yang G, Kadmon D, Logothetis CJ, Troncoso P, Ren C, Goltsov A, Park S. The role of caveolin-1 in

- prostate cancer: clinical implications. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2010. 13(1):6-11.
- Tomar A, Lim ST, Lim Y, Schlaepfer DD. A FAK- p120RasGAP-p190RhoGAP complex regulates polarity in migrating cells. *J Cell Sci* 2009; 122(Pt 11): 1852-62.
 - Torres, V. A., Tapia, J. C., Rodriguez, D. A., Parraga, M., Lisboa, P., Montoya, M., Leyton, L. & Quest, A. F. Caveolin-1 controls cell proliferation and cell death by suppressing expression of the inhibitor of apoptosis protein survivin. *J Cell Sci* 2006. 119(Pt 9): 1812-1823.
 - Torres V.A., Mielgo A, Barilà D, Anderson DH, Stupack D. Caspase 8 promotes peripheral localization and activation of Rab5. *J Biol Chem.* 2008 26;283(52):36280-9.
 - Torres V.A., Mielgo A, Barbero S, Hsiao R, Wilkins JA, Stupack DG. Rab5 mediates caspase-8-promoted cell motility and metastasis. *Mol Biol Cell.* 2010 15;21(2):369-76.
 - Torres V.A., Tapia J.C., Rodriguez D.A., Lladser A, Arredondo C, Leyton L, Quest AF. E-cadherin is required for caveolin-1-mediated down-regulation of the inhibitor of apoptosis protein survivin via reduced beta-catenin-Tcf/Lef-dependent transcription. *Mol Cell Biol.* 2007 27(21):7703-17.
 - Torres VA, Stupack DG. Rab5 in the regulation of cell motility and invasion. *Curr Protein Pept Sci.* 2011, 12(1):43-51.
 - Topp JD, Gray NW, Gerard RD, Horazdovsky BF. Alsln is a Rab5 and Rac1 guanine nucleotide exchange factor. *J Biol Chem.* 2004 Jun 4;279(23):24612-23.
 - Uittenbogaard A, Smart EJ. Palmitoylation of caveolin-1 is required for cholesterol binding, chaperone complex formation, and rapid transport of cholesterol to caveolae. *J Biol Chem.* 2000 Aug 18;275(33):25595-9.
 - Urra H, Torres VA, Ortiz RJ, Lobos L, Díaz MI, Díaz N, Härtel S, Leyton L, Quest AF. Caveolin-1-enhanced motility and focal adhesion turnover require tyrosine-14 but not accumulation to the rear in metastatic cancer cells. *PLoS One.* 2012;7(4):e33085
 - Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* 1997 11(18):2295-322.
 - Van Leeuwen FN, van der Kammen RA, Habets GG, Collard JG. Oncogenic activity of Tiam1 and Rac1 in NIH3T3 cells. *Oncogene.* 1995 Dec 7;11(11):2215-21.

- Vicente-Manzanares M, Webb DJ, Horwitz AR. Cell migration at a glance. *J Cell Sci.* 2005. 118(21):4917-9. Review.
- Wang T, Ming Z, Xiaochun W, Hong W. Rab7: role of its protein interaction cascades in endo-lysosomal traffic. *Cell Signal.* 2011. 23(3):516-21.
- Weinberg RA. Positive and negative controls on cell growth. *Biochemistry.* 1989. Oct 17;28(21):8263-9. Review.
- WHO report. (2014). Global Status Report Noncommunicable Diseases. World Health Organization.
- Williams TM, Lisanti MP. Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005.288(3):C494-506.
- Yamaguchi H, Takeo Y, Yoshida S, Kouchi Z, Nakamura Y, Fukami K. Lipid rafts and caveolin-1 are required for invadopodia formation and extracellular matrix degradation by human breast cancer cells. *Cancer Res.* 2009. 69(22):8594-602.
- Yeh D, Chen C, Sun MZ, Shao S, Hao L, Song Y, Gong L, Hu J, Wang Q. Caveolin-1 is an important factor for the metastasis and proliferation of human small cell lung cancer NCI-H446 cell. *Anat Rec (Hoboken).* 2009. 292(10):1584-92.
- Zerial M, McBride HRS. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Feb;2(2):107-17. Review. Erratum in: *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001. 2(3):216.
- Zerial M, Stenmark H. Rab GTPases in vesicular transport. *Curr Opin Cell Biol.* 1993 Aug;5(4):613-20.
- Zech, T.; Machesky, L. Rab5 and rac team up in cell motility. *Cell*, 2008, 134, 18-20.
- Zhao Z, Liu XF, Wu HC, Zou SB, Wang JY, Ni PH, Chen XH, Fan QS: Rab5a overexpression promoting ovarian cancer cell proliferation may be associated with APPL1-related epidermal growth factor signaling pathway. *Cancer Sci* 2010, 101(6):1454-1462.
- Ziegler S, Eiseler T, Scholz RP, Beck A, Link G, Hausser A. A novel protein kinase D phosphorylation site in the tumor suppressor Rab interactor 1 is critical for coordination of cell migration. *Mol Biol Cell.* 2011. 1;22(5):570-80.

- Zhu DZ, Cheng CF, Pauli BU. Mediation of lung metastasis of murine melanomas by a lung-specific endothelial cell adhesion molecule. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Nov 1;88(21):9568-72.