



TRABAJO FIN DE MÁSTER

Regulación de ADAM10 mediada por MITF en la respuesta inmune contra el melanoma

Autor: Román Martí Díaz

Máster en Biología Molecular y Biotecnología

2018/2019



Tutor: José Neptuno Rodríguez López

Cotutor: Luis Sánchez del Campo Ferrer

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	1
2.1. Actividad proteolítica de ADAM10 sobre MICA y MICB.....	2
3. OBJETIVOS.....	2
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	2
4.1. Cultivos celulares.....	2
4.2. Modelos animales.....	2
4.3. Irradiación.....	3
4.4. Análisis bioinformático.....	3
4.5. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina.....	3
4.6. Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa.....	3
4.7. Ensayos de luciferasa.....	3
4.8. Western Blot.....	3
4.9. ARN interferente.....	4
4.10. Cuantificación de ARNm por RT-qPCR.....	4
4.11. Citometría de flujo.....	4
4.12. Microscopía confocal.....	4
4.13. Cuantificación de proteínas mediante ELISA.....	4
4.14. Ensayos de citotoxicidad.....	5
4.15. Análisis estadístico.....	5
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	5
5.1. Los estudios bioinformáticos predicen la unión de MITF al promotor de ADAM10.....	5
5.2. El factor de transcripción MITF se une al promotor de ADAM10.....	6
5.3. MITF regula positivamente los niveles de ARNm de ADAM10 en melanoma.....	6
5.4. La radiación ionizante modula la expresión de MITF en melanoma.....	7
5.5. MITF puede regular la respuesta inmunológica por medio de la actividad proteolítica de ADAM10 sobre MICA y MICB.....	8
6. CONCLUSIONES.....	9
7. BIBLIOGRAFÍA.....	10
ANEXO I: Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos empleadas en este trabajo.....	11
ANEXO II: Competencias adquiridas en la realización de este proyecto.....	11
ANEXO III: Asignaturas cursadas en el Máster en Biología Molecular y Biotecnología.....	11
ANEXO IV: Declaración de originalidad.....	11

IMÁGENES

Figura 1.....	1
Figura 2.....	5
Figura 3.....	6
Figura 4.....	7
Figura 5.....	8
Figura 6.....	9

1. RESUMEN

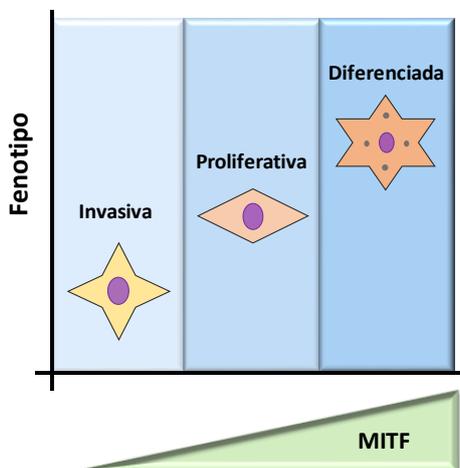
El melanoma es un tipo de cáncer con una gran capacidad de invasión que, con frecuencia, puede producir la muerte. Aunque no se conocen en profundidad los mecanismos moleculares implicados en la carcinogénesis, el conocimiento de determinados genes que actúan como reguladores maestros en el desarrollo, diferenciación, proliferación y supervivencia celular ofrece una alternativa en las futuras terapias para el tratamiento del cáncer. Un ejemplo de este tipo de genes maestros en melanoma es el Factor de Transcripción Asociado a Microftalmia (MITF). En este contexto, una mejor comprensión de los mecanismos inmunes, asociados con el establecimiento del melanoma, así como el hecho de que la radiación ionizante afecta al microambiente tumoral ha conducido al desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento de esta patología, como, por ejemplo, el uso de la radioterapia en combinación con la inmunoterapia.

Este trabajo experimental se ha centrado en evaluar la posible relación entre MITF y la activación de ADAM10 en células de melanoma, así como la capacidad de la radiación para modificar la expresión de ciertas proteínas inmunogénicas en la membrana de estas células. Los tumores, a menudo, utilizan diferentes estrategias para escapar de la detección inmune, de manera que conocer los elementos que regulan estos mecanismos de evasión podría ser útil para controlar el desarrollo y la supervivencia de estos tumores. Un ejemplo de estos sistemas de escape es el corte de las proteínas MICA y MICB por medio de la acción proteolítica de ADAM10, lo que impide que las células NK reconozcan y destruyan el cáncer. Por lo tanto, en este trabajo se analiza cómo la radiación ionizante podría afectar a la expresión y presentación de estos moduladores inmunológicos en melanoma. Curiosamente, la irradiación produce modificaciones en los niveles de expresión de MITF en células de melanoma, lo que indica que este factor de transcripción podría ser importante en la respuesta del melanoma a los mecanismos de defensa inducidos por el sistema inmune. Para confirmar el papel esencial de MITF en esta respuesta se realizaron ensayos de citotoxicidad utilizando células de melanoma con la expresión de MITF silenciada.

En general, este estudio nos permitió analizar, por primera vez, la unión de MITF al promotor de ADAM10, lo que proporciona una información importante para comprender mejor la regulación de ADAM10. Además, los resultados mostraron que la radiación ionizante induce cambios en los niveles de expresión de MITF, y por consiguiente en ADAM10, en las células de melanoma que las condiciona, de diversas maneras, a su respuesta inmune. En este sentido, los datos obtenidos podrían ser de interés, con el fin de diseñar nuevas estrategias terapéuticas basadas en la combinación de radio- e inmunoterapia que ayudaran a eliminar poblaciones tumorales capaces de evadir el sistema de defensa por medio de la escisión de proteínas transmembrana, como MICA y MICB.

2. INTRODUCCIÓN

El melanoma es un cáncer que se desarrolla por proliferación de los melanocitos, las células pigmentarias presentes en la piel. Se trata de la forma más amenazadora de cáncer de piel, caracterizada por sus propiedades invasivas y quimiorresistentes. De hecho, es una de las neoplasias más comunes en el ser humano y su frecuencia ha aumentado en los últimos años a nivel mundial. Desafortunadamente, este aumento en la incidencia no ha sido paralelo al desarrollo de nuevos agentes terapéuticos con un impacto significativo en la supervivencia [1]. Asimismo, el diagnóstico temprano de esta enfermedad es particularmente importante, ya que la supervivencia disminuye drásticamente a medida que el tumor presenta un estadio más avanzado. Se ha visto que muchos pacientes con tumores localizados en la piel se curan mediante escisión quirúrgica, sin embargo, cuando el melanoma se propaga a los ganglios linfáticos regionales, la tasa de supervivencia a los 5 años es solo del 29% y una vez que la enfermedad se ha diseminado a los órganos principales, la tasa se reduce al 7% [2]; este pronóstico desfavorable se debe en gran medida a la resistencia del melanoma a la quimioterapia convencional [3,4].



En melanoma, MITF es considerado como el principal regulador del desarrollo, diferenciación, función y supervivencia de los melanocitos [5]. Existen evidencias de que la identidad de las distintas subpoblaciones de células tumorales viene determinada por los niveles de expresión de MITF (Fig. 1). De esta manera, aquellas células con baja expresión de MITF muestran propiedades de célula madre, tienen gran capacidad de iniciar tumores y son altamente invasivas. Por el contrario, aquellas células con elevada expresión de MITF presentan un bajo potencial invasivo y expresan genes de diferenciación que conducen a la producción de melanina y a la biogénesis y transporte de melanosomas. Entre ambos extremos, se encuentran las células con niveles intermedios de MITF que tendrían capacidad proliferativa [6,7]. En este sentido, la modulación de la expresión de MITF representa un enfoque hacia la conducción de poblaciones heterogéneas de células tumorales a un fenotipo terapéuticamente sensible.

Figura 1. Esquema que representa el fenotipo de las células de melanoma en función de los niveles de expresión de MITF.

A pesar de que la radioterapia sigue siendo una opción de tratamiento válida y efectiva en melanoma [8], las células cancerosas han demostrado una variedad de formas para escapar de la detección inmune. De hecho, un efecto antitumoral de larga duración a menudo se ve obstaculizado por la inmunosupresión inducida por el tumor y la pérdida de antigenicidad tumoral [9]. Varios estudios en diferentes modelos tumorales (melanoma, mama, colon, pulmón y carcinomas renales) ponen de manifiesto los posibles efectos sistémicos de la asociación entre radioterapia e inhibidores de los puntos de control del sistema inmune [10–12]. Así pues, el efecto sinérgico de radioterapia e inmunoterapia representa una oportunidad potencial para mejorar la relación terapéutica y prolongar la respuesta tumoral [13]. Por ejemplo, se ha demostrado que el anticuerpo anti-CTLA-4 solo produjo mejoría en aquellos pacientes con melanoma metastásico que recibieron radiación [14].

2.1. Actividad proteolítica de ADAM10 sobre MICA y MICB

ADAM10 es una proteína que pertenece a una superfamilia de metaloproteasas, enzimas ancladas a la membrana que están involucradas en diversos eventos biológicos, como la adhesión celular, la fusión celular, la migración celular, la escisión de proteínas de membrana y la proteólisis. Estudios sobre las características bioquímicas y las funciones biológicas de estas enzimas han descubierto que algunas ADAM (una desintegrina y metaloproteinasa) se expresan en tumores malignos y participan en la patología del cáncer [15]. En concreto, se ha comprobado que un alto porcentaje de células de melanoma positivas para ADAM10 se correlaciona con una menor infiltración de linfocitos en tumores, lo que sugiere que ADAM10 regula la respuesta inmunológica en el inicio y la progresión del melanoma [16].

Las proteínas MICA y MICB, ambos sustratos de ADAM10, se asocian con progresión de la enfermedad en varios cánceres humanos, incluyendo melanoma, cáncer de próstata, cáncer de riñón y leucemia linfocítica crónica [17–19]. Estas proteínas actúan como señales de "eat me" al sistema inmunológico, es decir, se expresan en la membrana de las células tumorales para que sean eliminadas por linfocitos citotóxicos a través de la activación del receptor 2D (NKG2D) de las células NK. Sin embargo, los tumores con frecuencia evaden esta vía de reconocimiento inmune mediante el corte proteolítico de las moléculas MICA y MICB. De hecho, se ha demostrado que el uso de anticuerpos dirigidos contra el sitio responsable de la eliminación proteolítica de MICA y MICB en los tumores provocó que las células NK pudieran detectarlos y eliminarlos [20].

3. OBJETIVOS

Muchas proteínas transmembrana involucradas en la comunicación celular entre las células inmunes y las células estructurales, por ejemplo, Notch, MICA y MICB se escinden por la familia de enzimas ADAM. En el caso de MICA y MICB se ha comprobado que tienen un papel clave en el reconocimiento de las células tumorales por el sistema inmune [21]. Esto parece estar relacionado con las evidencias que demuestran una correlación entre las células de melanoma positivas para ADAM10 y una menor respuesta del sistema inmune [16]. Por tanto, en base a estos antecedentes, y partiendo de la aun no conocida regulación de ADAM10 [22], así como de la función del factor de transcripción MITF como regulador clave del melanoma, los principales objetivos de este trabajo son:

1. Estudiar el posible papel regulador de MITF sobre la actividad de ADAM10.
2. Analizar el efecto de la radiación ionizante sobre los niveles de expresión de MITF y ADAM10.
3. Evaluar la importancia de MITF en la modulación del sistema inmune para la eliminación de tumores en melanoma.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Cultivos celulares

El mantenimiento y manipulación de los cultivos celulares fue llevado a cabo en el servicio de cultivo de tejidos (SCT) del edificio SACE de la Universidad de Murcia. Las líneas celulares de melanoma humanas IGR37, IGR39, 501mel, G361, SK-MEL-28, SK-MEL-2, Na8 y A375, así como las de ratón, B16F10, fueron suministradas por el SCT y obtenidas de la ATCC (*American Type Culture Collection*). Además, también se utilizaron las células embrionarias de riñón humano, HEK 293 y las células de linfoma de ratón, YAC-1. Asimismo, se cuenta en el laboratorio con dos líneas celulares en las que se ha eliminado la expresión de MITF mediante la técnica CRISPR/Cas9 (varios clones de IGR37 y las células B16F10, ambas KO MITF). Todas las líneas celulares fueron mantenidas en medio de cultivo EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina, 1% de aminoácidos esenciales, 1 mM de piruvato y 1% de penicilina-estreptomina e incubadas a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad.

4.2. Modelos animales

Durante este trabajo se emplearon ratones de la cepa C57BL/6, que poseen un sistema inmune similar al de los seres humanos; así como ratones nude (*Foxn1nu*), ya que son ratones inmunocomprometidos y, por tanto, constituyen una herramienta adecuada para estudiar la actividad de células inmunes como las células *Natural Killer* (NK). Se utilizaron los bazo de estos ratones para extraer las células NK y realizar ensayos de citotoxicidad.

4.3. Irradiación

Las células fueron cultivadas hasta alcanzar la densidad requerida e irradiadas mediante el irradiador de Rayos X *Yxlon Smart* del Servicio de Radioprotección y Residuos del SACE. En todos los casos, se aplicó una dosis de 10 Gray (Gy).

4.4. Análisis bioinformático

En la base de datos de Cistrome, donde se recopilan datos de accesibilidad de ChIP-Seq y cromatina, encontramos una herramienta bioinformática muy útil para los estudios de regulación epigenética y transcripción, *Cistrome Data Browser* (<http://cistrome.org/db>). Haciendo uso de los datos obtenidos de una ChIP-Seq para MITF [23], se realizaron los estudios bioinformáticos sobre la unión de MITF al promotor de ADAM10. Para el análisis de correlación entre la expresión de MITF y la de ADAM10 en melanoma se utilizó la base de datos *The Cancer Genome Atlas* (<https://portal.gdc.cancer.gov/>).

4.5. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina

Se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) utilizando el kit *Magna ChIP G* (*Millipore*) siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante. Primero se añadió formaldehído al 0.4% durante 10 min a temperatura ambiente para el entrecruzamiento y fijación de las interacciones proteína-proteína y proteína-ADN *in vivo* en las células IGR37 y 501mel, y después se fragmentó el ADN por sonicación para generar un tamaño promedio de 300 a 3000 pb. La cromatina se incubó luego con anticuerpos anti-MITF o IgG de ratón. El ADN de los lisados, antes de la inmunoprecipitación, se usó como control de cromatina total (input). Después del lavado, elución y purificación del ADN, se utilizaron 2 µl de ADN para llevar a cabo las reacciones de amplificación por PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) utilizando cebadores específicos para ADAM10 y SILV (**Ver Anexo I**), los cuales se diseñaron utilizando la herramienta *Primer3 Input v.0.4.0* (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). SILV se utiliza como control negativo, ya que los cebadores están diseñados en una zona intrónica donde MITF no se une.

4.6. Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa

Para este tipo de electroforesis se preparó un gel de agarosa al 2%. Se diluyeron 2 g de agarosa en 100 ml de tampón de electroforesis TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 2 mM, pH 8.5). Como marcador de los ácidos nucleicos se usó el bromuro de etidio. Se preparó la mezcla de unos 15-20 µl de cada muestra de ADN con 3 µl de un tampón de carga que contiene el colorante Orange G 0.25% (p/v), sacarosa 40% (p/v), EDTA 10 mM y dodecilsulfato sódico (SDS) 100 mM, y posteriormente se cargó en el gel de agarosa. El tampón de carga también se añadió a los marcadores de peso molecular (*Step ladder 50 pb* de *Sigma*). Finalmente, se utilizó el sistema *Molecular Imager ChemiDoc XRS+* (*BioRad*) junto con el software *Lab Imager*, que, además de facilitar la visualización y la captura de imágenes, permite realizar el análisis de las bandas obtenidas tras la separación.

4.7. Ensayos de luciferasa

Con el objetivo de estudiar la expresión de ADAM10 a diferentes concentraciones de MITF, se utilizó un plásmido que contenía el promotor de ADAM10 aguas arriba (*upstream*) del gen reportero de la luciferasa (LightSwitch®). Las células HEK293 se cultivaron en placas Petri de 96 pocillos (10.000 células/pocillo) y se transfectaron utilizando FuGENE6 (*Promega*) con 50 ng del plásmido reportero, junto con diferentes concentraciones del plásmido que expresa MITF y de un vector de expresión vacío. Transcurridas 48 horas de la transfección, se midió la actividad de la luciferasa por triplicado utilizando el kit indicador de luciferasa (LightSwitch®) y el lector de placas *FLUOstar Omega* del SCT.

4.8. Western Blot

Para la preparación de los extractos proteicos, en primer lugar se retiró el medio de cultivo de las células y se lavaron dos veces con tampón fosfato salino (PBS). A continuación, las células fueron lisadas y recogidas con tampón de muestra desnaturizante (Tris-HCl 125 mM, glicerol 10%, SDS 2%, β-mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0.01%). Posteriormente, las muestras se sonicaron y se les aplicó un tratamiento térmico de desnaturización de 5 min a 95°C. Las proteínas de las muestras fueron separadas mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) en un gel de poliacrilamida al 10%. La transferencia se llevó a cabo por el método húmedo y se utilizaron membranas de nitrocelulosa. Una vez bloqueadas con leche desnatada, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se incubaron 2 horas con el anticuerpo secundario y después se hicieron tres lavados con PBS-Tween de 5 min para eliminar el anticuerpo no unido. La actividad peroxidasa fue revelada mediante el kit *WesternBright Quantum HRP substrate* (*Advansta*), detectada con el dispositivo de análisis *Molecular Imager ChemiDoc XRS+* (*BioRad*) y analizada con su software, *Lab Imager*.

Los anticuerpos primarios usados en estos ensayos de *Western Blot* (WB) fueron: anti-Actina (anticuerpo monoclonal de ratón, *Sigma*), anti-MITF (anticuerpo monoclonal de ratón, *Millipore*), anti-ADAM10 (anticuerpo policlonal de conejo, *Abcam*), anti-N-Cadherina (anticuerpo monoclonal de conejo, *Millipore*), anti-MICA (anticuerpo policlonal de conejo, *Invitrogen*), anti-MICB (anticuerpo policlonal de conejo, *Invitrogen*) y anti-Melan A (anticuerpo monoclonal de ratón, *Abcam*). Para los marcadores de peso molecular se utilizaron proteínas preteñidas (*Colour Protein Marker II* de *NZYTech*). Como anticuerpos secundarios, conjugados con peroxidasa, se usaron anticuerpos monoclonales anti-IgG de ratón, producido en cabra, y anti-IgG de conejo, producido en ratón (ambos fueron obtenidos de *Sigma*).

4.9. ARN interferente

Se realizaron varios ensayos de silenciamiento de MITF mediante ARN interferente (ARNi) en células de melanoma. Para ello, se utilizaron diferentes siRNAs específicos para MITF (HSS142939, HSS142940 y HSS142941; **Ver Anexo I**) y se transfectaron en células SK-MEL-28 usando Lipofectamine 2000 (*Life Technologies*). Primero se prepararon cuatro tubos, dos con Lipofectamine 2000 (etiquetados como siCN y siMITF), uno control con una secuencia no interferente y otro con el ARNi para silenciar MITF. Se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente y a continuación, se mezclaron los tubos conteniendo Lipofectamine 2000 con sus respectivos ARNi, los cuales fueron incubados durante 20 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se eliminó el medio de cultivo de los pocillos donde se encontraban las células y se añadieron 800 µl de medio de cultivo nuevo, pero sin suero y sin antibióticos (para evitar interferencias y mejorar la transfección). Acto seguido, se adicionaron 200 µl de la mezcla de los tubos previamente preparados (siCN y siMITF), en los pocillos correspondientes. Finalmente, se analizó la expresión de varias proteínas mediante WB, entre ellas MITF, 72 horas después de la transfección.

4.10. Cuantificación de ARNm por RT-qPCR

El ARN total se extrajo de los lisados de las diferentes líneas celulares de melanoma con el kit *Total RNA Isolation (NZYTech)* siguiendo el método descrito por el fabricante. A continuación, 1 µg de ARN purificado (cuantificados en un equipo *Nanodrop*) se convirtió a ADNc empleando el kit comercial *First-Strand cDNA Synthesis (NZYTech)*. En las reacciones de qPCR se emplearon 4 ng de ADNc, 200 nM de las parejas de oligonucleótidos correspondientes para los genes de MITF, ADAM10 y actina, y la mezcla SYBR Green PCR Master Mix (*Applied Biosystems*). Se utilizó el equipo *QuantStudio™ 5 Flex (Applied Biosystems)* del servicio de Biología Molecular del SACE. Los resultados se analizaron con el software *QuantStudio Design And Analysis*. Los niveles de expresión de ARNm relativos se normalizaron en función de la expresión de actina. Los cebadores (**Ver Anexo I**) para los genes analizados se diseñaron utilizando la herramienta *Primer3 Input v.0.4.0*.

4.11. Citometría de flujo

Con el fin de evaluar el efecto de la radiación ionizante sobre la expresión de MITF, las células SK-MEL-28 se sembraron en placas Petri y fueron irradiadas (10 Gy) a diferentes tiempos. Para la preparación de cada muestra, en primer lugar, las células se fijaron con formaldehído al 4% durante 15 min. Una vez fijadas y lavadas con PBS, se llevó a cabo la permeabilización, ya que MITF es nuclear. Para ello, se añadió metanol al 90% y se mantuvieron las células en hielo durante 30 min. Después, las células se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con 100 µl del anticuerpo primario (anti-MITF, *Millipore*) diluido en tampón de incubación (BSA al 0.5 % en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se realizaron dos lavados con dicho tampón y se incubaron con 100 µl del anticuerpo secundario (Alexa Fluor 488 Anti-IgG de ratón, *Life Technologies*) diluido también en tampón de incubación durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, las células se lavaron dos veces con dicho tampón y se resuspendieron en PBS para ser analizadas en el citómetro de flujo *FacsCalibur* de *Becton Dickinson*, ubicado en el SCT. Los datos obtenidos se examinaron mediante el software *Cell-Quest Pro*.

4.12. Microscopía confocal

Las células fueron crecidas sobre cubreobjetos de cristal en una placa de Petri y sometidas a irradiación (10 Gy). En cuanto a su procesamiento, primero las células fueron fijadas a temperatura ambiente durante 14 min con paraformaldehído (PFA) al 4%. Una vez fijadas y lavadas con PBS, las uniones inespecíficas se bloquearon con suero de albúmina bovino (BSA) unas 2 horas. En el caso de MITF, como es un factor de transcripción y se ubica dentro del núcleo, hay que realizar un paso de permeabilización antes del bloqueo. Para ello, estas muestras se incubaron con Tritón X-100 (*Sigma*) durante 7 min a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, se efectuaron tres lavados con PBS y las células se incubaron con el anticuerpo primario diluido en BSA al 5% en un recipiente húmedo y protegido de la luz durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las células se lavaron varias veces con PBS y se incubaron 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario diluido en BSA utilizando el mismo recipiente. Cada cubreobjetos de cristal se puso en un portaobjetos con 12 µl de *Prolong Gold Antifade* que incluye DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) en el medio de montaje, de *Life Technologies*. Las preparaciones fueron visualizadas en el microscopio confocal *Leica TCS 4D* de la Sección de Microscopía del SACE y analizadas mediante su software.

Como anticuerpos primarios se usaron anti-MITF (anticuerpo monoclonal de ratón, *Millipore*) y anti-Melan-A (anticuerpo monoclonal de ratón, *Abcam*). Los anticuerpos secundarios, conjugados con fluoróforo, fueron un anticuerpo anti-IgG de ratón producido en cabra, Alexa Fluor 488, que emite en verde y un anticuerpo anti-IgG de conejo producido también en cabra, Alexa Fluor 633, que emite en la zona roja del espectro electromagnético, ambos obtenidos de *Life Technologies*.

4.13. Cuantificación de proteínas mediante ELISA

La medida de las proteínas MICA y MICB en las células SK-MEL-28 se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante utilizando el kit *Human MICA ELISA* y el kit *Human MICB ELISA*, ambos de *Invitrogen*. Finalmente, se midió la absorbancia a 450 nm y 550 nm en el lector de placas *SpectraMax 340PC (Molecular Devices)*. Se restaron los valores de 550 nm a los valores de 450 nm para corregir las imperfecciones ópticas en la microplaca. Finalmente, mediante curvas estándar que relacionan la densidad óptica en función de la concentración de la proteína de interés, se calculó la cantidad de MICA y MICB en cada muestra.

4.14. Ensayos de citotoxicidad

Las células diana, cultivadas en placas Petri de 96 pocillos hasta alcanzar una confluencia adecuada (unas 10.000 células/pocillo), se marcaron durante 1 hora a 37°C en 100 µl de medio de cultivo con 100 µCi de ⁵¹Cr (*Perkin Elmer*). Después del marcaje, las células diana fueron lavadas con PBS para retirar el cromo no incorporado. Las células efectoras se añadieron en diferentes relaciones E/T (efector/diana) a la placa donde se encontraban las células diana. A partir de los bazos de los ratones (tanto nude como C57BL/6) se asilaron las células de la serie blanca utilizando la solución Histopaque-1077 (*Sigma*) mediante centrifugación y, a continuación, se purificaron las células NK con el *kit Nk cell isolation II* (*Miltenyi Biotec*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de una centrifugación a baja velocidad de 2 min, se incubaron a 37°C durante 4 horas en presencia de 100 U/ml de IL-2. La liberación máxima se determinó tratando las células diana con Tritón X-100 al 1%. Para la liberación espontánea (control negativo), las células diana se incubaron sin efectores en 100 µl de medio de cultivo. Se recogieron los sobrenadantes y se midió la liberación de ⁵¹Cr en el contador de centelleo gamma (*WALLA Wizard 1470*) del Servicio de Radioprotección y Residuos del SACE. El porcentaje de liberación específica se calculó de la siguiente manera:

$$\frac{cpm \text{ de la muestra} - cpm \text{ del control negativo}}{cpm \text{ del control positivo} - cpm \text{ del control negativo}} \times 100 \quad cpm = \text{conteo por millón}$$

4.15. Análisis estadístico

Los resultados experimentales recogidos en este trabajo se expresan como la media ± la desviación estándar (DE). Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado de forma independiente. Para la comparación de datos con distribución normal se aplicó la prueba t de Student, considerándose una diferencia significativa entre grupos cuando $P < 0.05$.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Los estudios bioinformáticos predicen la unión de MITF al promotor de ADAM10

El análisis de la secuencia del promotor de ADAM10, reveló la presencia de una secuencia consenso E-Box (CANNTG), situada 262 pares de bases antes del inicio de la transcripción (**Fig. 2A**), que coincide exactamente con la secuencia de unión de MITF (CACGTG). El estudio de los datos disponibles de experimentos de ChIP-Seq para MITF en distintas células de melanoma (**Fig. 2B**), mostró la presencia de MITF en el promotor de ADAM10, de forma similar a genes regulados por MITF. En concreto, utilizando los datos de la ChIP-Seq en células 501mel [23] pudimos comprobar que efectivamente se produce un claro pico de acumulación de MITF en el promotor de ADAM10, cuyo máximo de intensidad se encuentra en la mencionada secuencia E-Box (**Fig. 2C**). Los estudios de RNA-Seq en muestras de melanoma (**Fig. 2D**) muestran que una mayor expresión de MITF se corresponde con una mayor actividad de ADAM10. Estos datos de correlación positiva se encuentran dentro del mismo orden de los que se obtienen para las correlaciones entre MITF y sus genes diana clásicos como *TYR* y *MART1*.

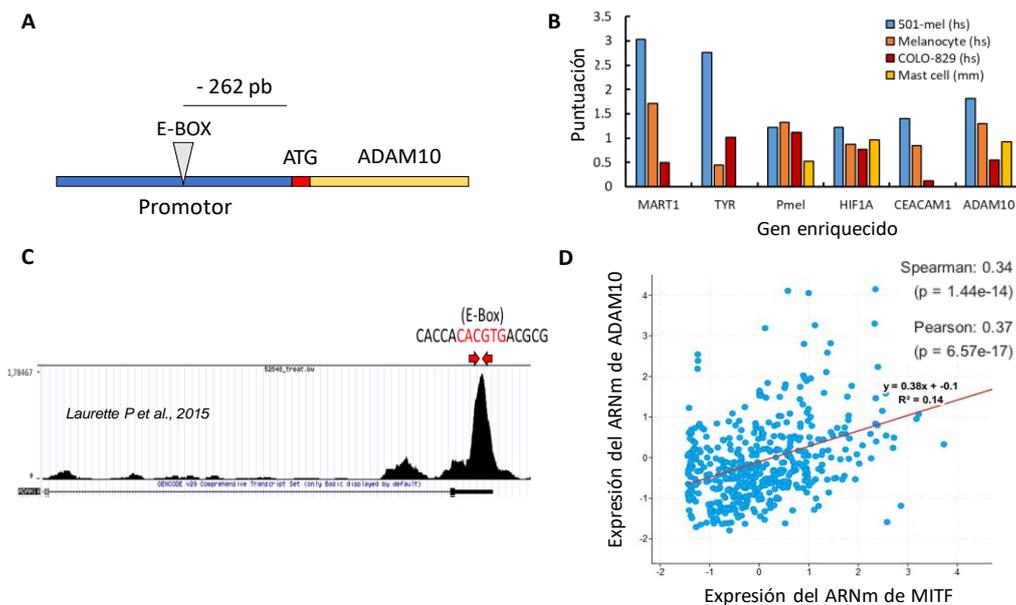


Figura 2. El análisis bioinformático de los datos de ChIP-Seq revela una posible unión de MITF al promotor de ADAM10. (A) Esquema de la posición de la secuencia E-Box en el promotor de ADAM10. **(B)** Datos de ChIP-Seq donde se utilizan diferentes tipos celulares para observar una mayor acumulación de MITF en el promotor de distintas proteínas reconocidas como dianas de MITF, como MART1/Melan A, TYR, Pmel, HIF1A o CEACAM1. Se incluye el análisis de ADAM10, donde se muestra una relación similar. **(C)** Los datos de la ChIP-Seq en células 501mel [23] indican la secuencia de unión de MITF (E-Box) al promotor de ADAM10. **(D)** El análisis de los datos normalizados de expresión en melanoma (RNA-Seq) muestra una correlación positiva para la expresión de MITF y ADAM10.

5.2. El factor de transcripción MITF se une al promotor de ADAM10

Con el fin de validar los datos obtenidos mediante estudios bioinformáticos de la unión de MITF al promotor de ADAM10, decidimos en primer lugar realizar experimentos de inmunoprecipitación de cromatina en las líneas de melanoma IGR37 y 501mel, que tienen alta expresión de MITF. Los complejos de cromatina fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-MITF y seguidamente se llevaron a cabo ensayos de PCR utilizando cebadores específicos de la región promotora de ADAM10 que incluían la secuencia E-box mencionada. Como se muestra en las Fig. 3A y 3B, de RT-PCR y PCR respectivamente, se detecta una amplificación específica de la región del promotor de ADAM10. En ausencia de dicho anticuerpo (control IgG) no se observa amplificación específica. Además, se realizó otro control negativo consistente en unos cebadores que amplifican para una zona (intrón) del gen *SILV* donde se sabe que MITF no tiene capacidad de unión. Como era de esperar, no se observó amplificación de *SILV* mientras que sí se observó una clara banda de PCR usando el ADN genómico como molde (input). A la vista de estos resultados, podemos decir que MITF se une al promotor de ADAM10 en el contexto de la cromatina de las células de melanoma IGR37 y 501mel.

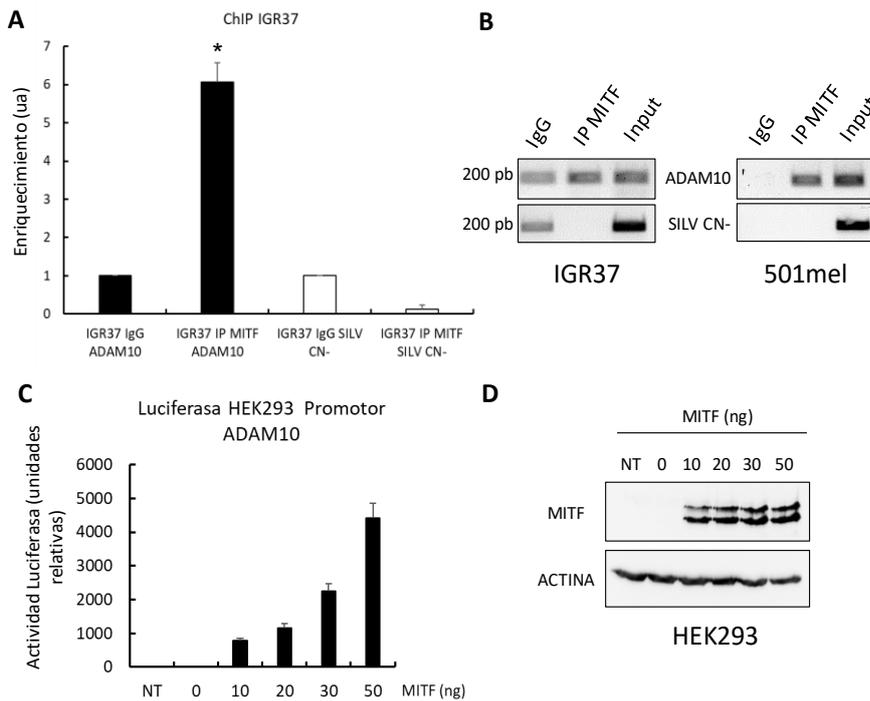


Figura 3. MITF se une al promotor de ADAM10. (A) RT-PCR de la ChIP en células IGR37 (*P < 0.05). Se observa un pico de amplificación en la región promotora de ADAM10 donde se une MITF. (B) Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa utilizando los productos de PCR de los experimentos de ChIP en las líneas celulares IGR37 y 501mel. (C) Ensayo de luciferasa donde el gen reportero de la luciferasa está controlado por el promotor de ADAM10, el cual se activa más cuanto mayor es la concentración de MITF. (D) Análisis de la cantidad de MITF por WB en las diferentes muestras utilizadas en el experimento de luciferasa. La proteína actina se ha utilizado como control de carga.

Por otro lado, en base a los resultados mostrados hasta ahora, pensamos que MITF podría estar regulando la expresión de ADAM10 mediante la activación de su transcripción. Para ello, se realizaron ensayos de luciferasa transfectando células HEK293 con un plásmido que contenía la región del promotor de ADAM10 (incluyendo la secuencia de unión a MITF) unido a un gen reportero para la expresión de luciferasa. A su vez, dichas células fueron co-transfectadas con cantidades crecientes de MITF. Los datos presentados en la Fig. 3C, revelan que al aumentar la cantidad de MITF, se produce una mayor activación del promotor de ADAM10, lo que sugiere que MITF tiene un efecto directo en la transcripción de ADAM10. Para comprobar la correcta transfección del plásmido que dirige la expresión de MITF, analizamos la cantidad de esta proteína mediante WB (Fig. 3D). Como cabía esperar, la expresión de MITF fue proporcional a la cantidad de plásmido transfectado.

5.3. MITF regula positivamente los niveles de ARNm de ADAM10 en melanoma

Con el fin de profundizar en la relación MITF/ADAM10 propuesta y conocer dicho estado en diferentes líneas de células de melanoma disponibles, se obtuvieron extractos celulares que fueron sometidos a ensayos de WB para determinar los niveles de expresión de ambas proteínas. Curiosamente, como muestra la Fig. 4A, aquellas células con altos niveles de expresión de MITF se corresponden con altos niveles de ADAM10, mientras que en las células con niveles muy bajos de MITF, no se aprecia expresión de la proteína ADAM10. Dichos resultados coincidieron con los obtenidos mediante experimentos de RT-qPCR para conocer los niveles de expresión a nivel de ARNm de MITF y ADAM10. Así, los datos de la Fig. 4B también mostraron una clara relación entre los niveles de MITF y ADAM10, donde aquellas células con mayores copias de MITF (501mel, G631, IGR37) se correspondían con mayores niveles de expresión de ADAM10, mientras que las líneas SK-MEL-2, A375, NA8 e IGR39, con muy baja expresión de MITF, resultaron tener la menor expresión de ADAM10. En la Fig. 4C, se representa el análisis de los niveles de expresión de ARNm de las células en cultivo para MITF y ADAM10, donde nuevamente se observa dicha correlación positiva.

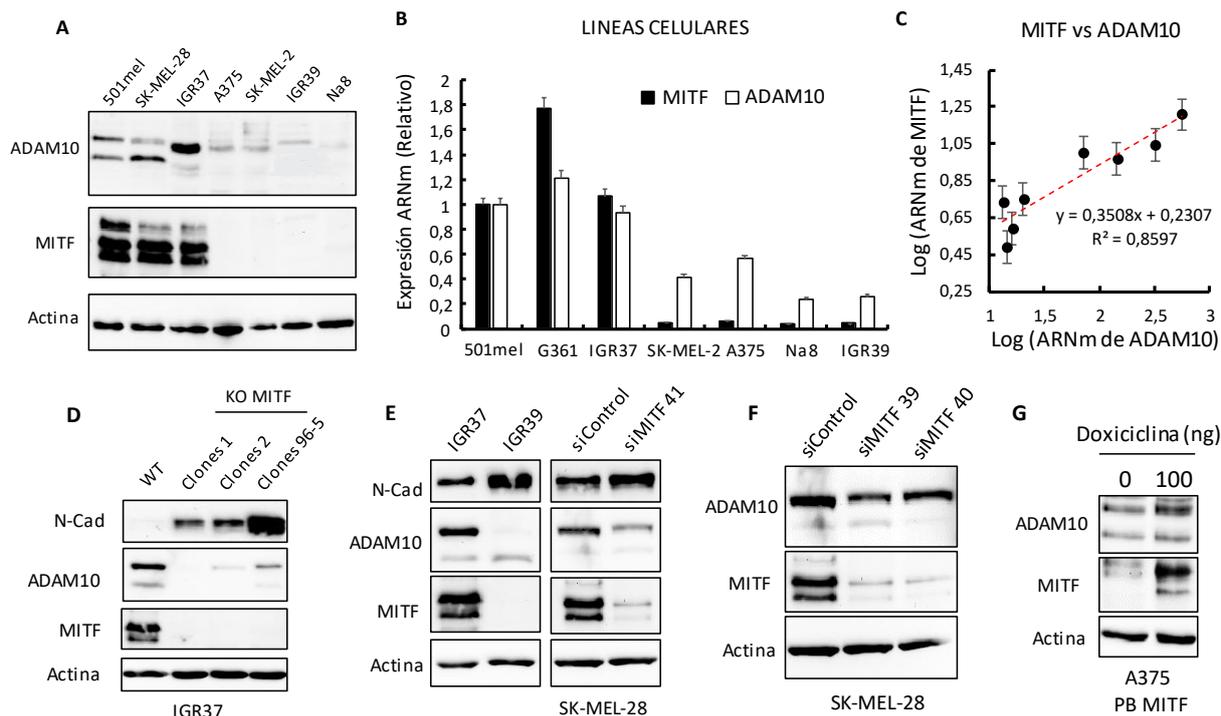


Figura 4. Relación entre MITF y ADAM10 tanto a nivel de proteína como de ARNm. (A) WB de diferentes líneas celulares de melanoma, tanto MITF positivas (501mel, SK-MEL-28 e IGR37) como MITF negativas (A375, SK-MEL-2, IGR39 y Na8) para analizar los niveles de las proteínas MITF y ADAM10. (B y C) Relación de los ARNm de MITF y de ADAM10 en diferentes líneas celulares de melanoma. Los perfiles de ARNm se han calculado en relación con la actina de cada muestra. (D) WB para analizar las proteínas N-Cad, MITF y ADAM10 en células IGR37 y varios clones KO MITF. (E) WB para analizar las proteínas N-Cad, MITF y ADAM10 en células IGR37 (MITF positivas) y células IGR39 (MITF negativas). Además, también se utilizan las células SK-MEL-28 para silenciar MITF mediante ARN interferente. (F) WB para analizar las proteínas MITF y ADAM10 en células SK-MEL-28. (G) WB para analizar las proteínas MITF y ADAM10 en células A375 inducibles para MITF (A375 PB MITF) al añadir doxiciclina. En todos los WB, la proteína actina se ha utilizado como control de carga.

Otra forma para comprobar la regulación de la expresión de ADAM10 a través de MITF consiste en variar la expresión de MITF en las líneas celulares mediante experimentos de silenciamiento o sobreexpresión. Para los experimentos de silenciamiento se utilizaron dos estrategias CRISPR/Cas9 KO y siRNA. Como se muestra en las **Fig. 4D, 4E y 4F**, los resultados obtenidos estuvieron de acuerdo con lo anterior, ya que sugieren que la ausencia de MITF provoca la disminución de los niveles de ADAM10. Además, si atendemos al comportamiento de la proteína N-Cadherina (N-Cad), un conocido sustrato de ADAM10 [24], observamos que cuando se disminuyeron los niveles de MITF se produce una acumulación de N-Cad, debido a la falta de ADAM10 y la imposibilidad de ser cortada por este, lo que refuerza la regulación de ADAM10 por MITF y sus efectos en la fisiología celular. Por otro lado, se generó una línea estable inducible mediante doxiciclina para MITF. Como se observa en la **Fig. 4G**, el análisis de extractos de la línea A375 inducible, sin inducir e inducida con doxiciclina, mostró la eficiente inducción de la expresión de MITF y como se esperaba, un aumento en la expresión de ADAM10.

5.4. La radiación ionizante modula la expresión de MITF en melanoma

Una vez comprobado que MITF parece regular transcripcionalmente la expresión de ADAM10, se quiso comprobar el efecto de la radiación sobre MITF, ya que la radiación ionizante es una estrategia terapéutica utilizada en la clínica. Como se muestra en la **Fig. 5A**, MITF aumenta de forma muy evidente tras la irradiación con 10 Gy, donde se observa una mayor acumulación de MITF entre las 24 – 48 horas tras aplicar dicho tratamiento. El análisis de la expresión de MITF a nivel de ARNm mediante RT-qPCR en las células IGR37 e IGR39 (**Fig. 5B y 5C**) también mostró el incremento en la expresión de MITF 24 horas después de la irradiación. Finalmente, los resultados obtenidos mediante citometría de flujo en la línea celular de melanoma SK-MEL-28 a distintas horas tras la irradiación (**Fig. 5D**) igualmente corroboraron el aumento en la expresión de MITF, llegando a su máximo en este caso a las 24 horas después de la irradiación.

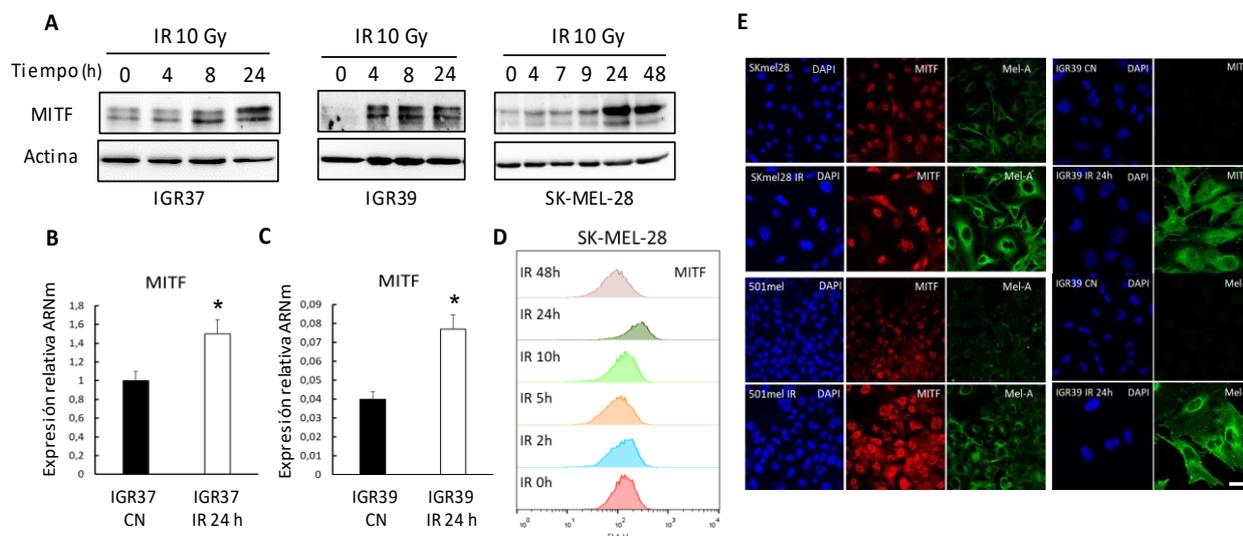


Figura 5. MITF presenta un claro aumento de expresión a las 24 horas después de la irradiación. (A) Análisis de MITF por WB en tres líneas celulares de melanoma humanas (SK-MEL-28, IGR37 y IGR39) tras irradiación con 10 Gy. La proteína actina se ha utilizado como control de carga. (B y C) Cuantificación del ARNm de MITF en células control y tratadas (IGR37 y IGR39) tras irradiación con 10 Gy. Los perfiles de ARNm se han calculado en relación con la actina de cada muestra (* $P < 0.05$). (D) Análisis de la expresión de MITF en células SK-MEL-28 por citometría de flujo a diferentes tiempos tras irradiación con 10 Gy. (E) Análisis mediante microscopía confocal de las proteínas MITF y Melan A al tratar las muestras con irradiación (10 Gy) y comparar los resultados 24 horas después con respecto las células control (SK-MEL-28, 501mel e IGR39). El DAPI (azul) se utiliza para marcar los núcleos (ADN) de las células. Escala: 20 μ m.

Con el fin de confirmar este aumento de MITF con la irradiación, analizamos la expresión de las proteínas MITF y Melan A en las líneas celulares SK-MEL-28, 501mel e IGR39, las cuales fueron sometidas a irradiación y después de 24 horas fueron fijadas para su visualización mediante microscopía confocal junto con células controles no irradiadas. La **Fig. 5E** muestra que en todas las líneas estudiadas se produce un evidente aumento en la expresión de MITF y que dicha sobreexpresión es funcional resultando en el incremento de la expresión de la proteína de membrana Melan A, cuya expresión está regulada directamente por MITF. Además, destaca el efecto producido sobre la línea celular IGR39 donde los niveles normales de MITF y, por tanto de Melan A, son muy bajos y, sin embargo, aumentan claramente tras la irradiación.

5.5. MITF puede regular la respuesta inmunológica por medio de la actividad proteolítica de ADAM10 sobre MICA y MICB

Teniendo en cuenta los anteriores resultados, se puede deducir que, si las células de melanoma responden a la radiación ionizante aumentando la expresión de MITF, esto debería llevar asociado también un incremento de ADAM10. Con el fin de evaluar esta posibilidad, distintas líneas celulares de melanoma fueron sometidas a una dosis de 10 Gy y su ARNm fue purificado tras 24 y 48 horas. El análisis de los niveles de MITF y ADAM10 mediante RT-qPCR (**Fig. 6A**), mostró un claro aumento en la expresión de ambas proteínas tras la irradiación, lo que confirmaba nuestra hipótesis. No obstante, pensamos que este aumento de ADAM10, podría tener un efecto en el corte proteolítico en membrana de sus sustratos conocidos como MICA y MICB. Por tanto, en primer lugar, realizamos un experimento de WB (**Fig. 6B**) en las células de melanoma SK-MEL-28 a diferentes tiempos de irradiación, así como en estas células a los mismos tiempos sin irradiar (control). Curiosamente, analizando los resultados obtenidos, representados también mediante diagramas de barras, se observa que en las muestras sometidas a irradiación puesto que se produce un incremento de MITF, acompañado de un aumento en la expresión de ADAM10, se reducen los niveles de MICA y MICB debido probablemente al corte proteolítico por ADAM10. En cambio, en el control no irradiado, todas las proteínas permanecen al mismo nivel debido a que no hay efecto sobre MITF ante la falta de irradiación.

Por otro lado, con el fin de determinar el aumento del corte proteolítico de MICA y MICB en células SK-MEL-28, se realizaron ensayos de ELISA en los que se determinó la presencia de dichas proteínas en el medio extracelular una vez cortadas por ADAM10. En la **Fig. 6C** se muestra cómo se produce una mayor acumulación en el medio de MICA respecto a las células no irradiadas. Además, para determinar la importancia de MITF en este proceso se realizó otro ensayo tipo ELISA en células SK-MEL-28 silenciando MITF mediante siRNA, irradiadas y no irradiadas, y comparándolas con células controles no silenciadas para MITF (siCN). Como se observa en la **Fig. 6D**, la irradiación provoca una acumulación de MICB en el medio y este aumento es dependiente de MITF, ya que en células silenciadas para MITF no se produce dicha acumulación tras la irradiación.

Finalmente, dado que las proteínas MICA y MICB son necesarias para el reconocimiento del sistema inmune por medio de las células NK [20] y, que como hemos visto, su presencia en membrana está determinada por la actividad proteolítica de ADAM10, realizamos experimentos de citotoxicidad con cromo radiactivo en un ensayo de co-cultivo de células YAC-1 (control positivo) o de células de melanoma de ratón irradiadas (B16F10 y B16F10 KO MITF) y de células NK purificadas utilizando bazos de ratones C57BL/6 y de ratones inmunodeprimidos (*Foxn1nu*). Los resultados obtenidos (Fig. 6E y 6F) revelan claramente como la citotoxicidad de las células NK fue notablemente superior sobre las células de melanoma irradiadas que no expresan MITF (KO-IR) en relación con las células parentales irradiadas (B16-IR). En definitiva, observamos que tanto en los ratones nude como en los C57BL/6 las células NK reconocen mejor a las células de melanoma que tienen silenciado MITF, en este caso mediante CRISPR/Cas9, lo que sugiere que MITF está inhibiendo tal vez de forma indirecta a través de la expresión de ADAM10 la actividad de las células NK.

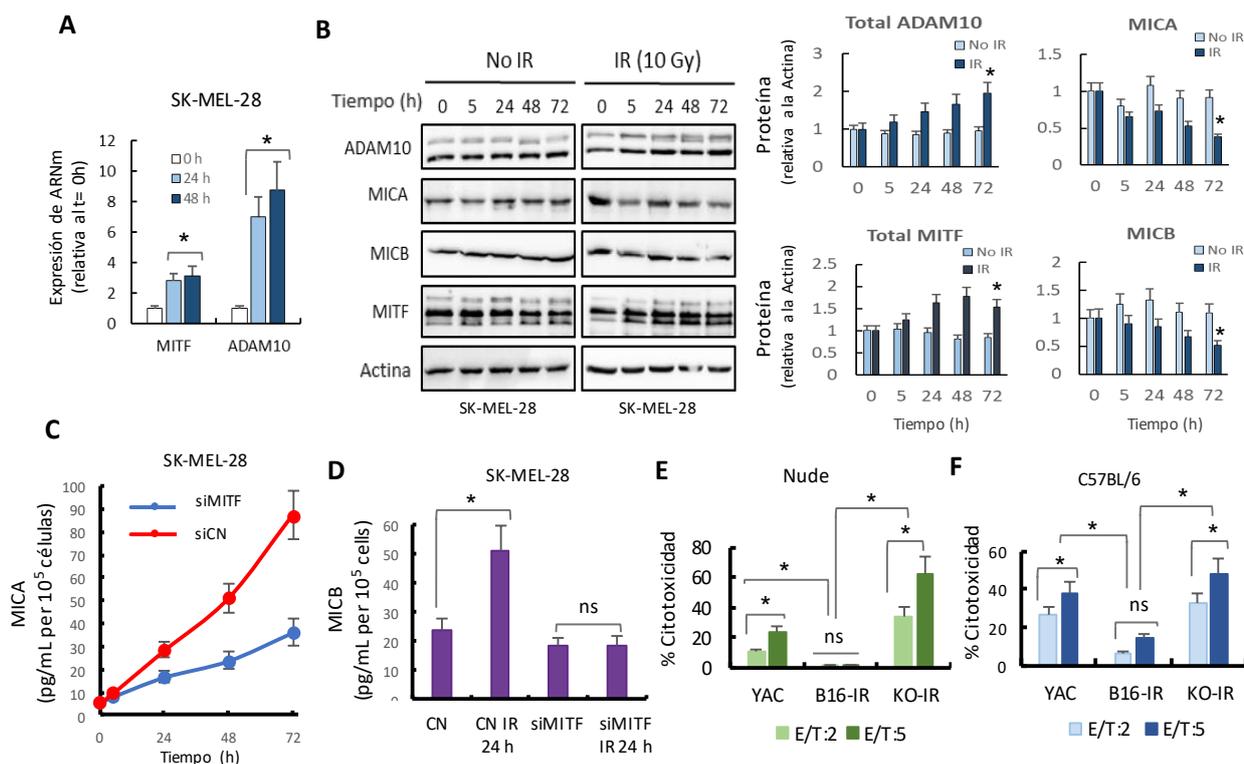


Figura 6. Efecto de la radiación ionizante en la actividad proteolítica de ADAM10 sobre MICA y MICB y la actividad citotóxica de células NK de ratón. (A) Cuantificación del ARNm de MITF y ADAM10 en SK-MEL-28 tras 24 y 48 h de irradiación (10 Gy). Las diferencias en la expresión de mRNA de MITF y ADAM10 a las 24 y 48 horas fueron estadísticamente significativas ($*P < 0.05$) con respecto al control no irradiado (0 h) (B) Análisis de MITF, ADAM10, MICA y MICB por WB (izquierda) en células SK-MEL-28 tras irradiación con 10 Gy a diferentes tiempos. La actina se utilizó como control de carga. A la derecha aparecen los resultados de cada proteína representados en diagrama de barras ($*P < 0.05$). (C) Ensayo de ELISA en células SK-MEL-28 para determinar la concentración de MICA en el medio extracelular. Los datos muestran la media \pm DE y la variación en la concentración de MICA tras la irradiación resultó estadísticamente significativa respecto al control a todos los tiempos ensayados ($P < 0.05$). (D) Ensayo de ELISA en células SK-MEL-28 para determinar la concentración de MICB en el medio extracelular ($*P < 0.05$). (E) Ensayo de citotoxicidad utilizando ratones nude ($*P < 0.05$). En verde claro se representa una relación de dos veces las células efectoras (células NK) sobre las células diana, mientras que en verde oscuro dicha relación es de cinco veces. (F) Ensayo de citotoxicidad utilizando ratones de la cepa C57BL/6 ($*P < 0.05$). En azul claro se representa una relación de dos veces las células efectoras (células NK) sobre las células diana, mientras que en azul oscuro dicha relación es de cinco veces.

6. CONCLUSIONES

Dado el papel de MITF en la integración de muchos aspectos de la biología del melanoma y el hecho de que un estado MITF bajo se correlaciona con la resistencia a los medicamentos, entender cómo el microambiente tumoral afecta a la expresión de MITF es clave para el desarrollo de terapias eficaces contra el melanoma. Aquí revelamos un vínculo interesante y previamente insospechado entre MITF y ADAM10, así como entre la radiación y la expresión de moléculas inmunológicas en membrana (MICA y MICB) de las células de melanoma. Por tanto, las principales conclusiones derivadas de este trabajo de investigación son las siguientes:

- Todos los resultados expuestos demuestran que existe una relación entre la expresión de MITF y ADAM10 en melanoma, en concreto, que la regulación de la expresión de ADAM10 está mediada de forma directa a nivel transcripcional por la unión del factor de transcripción MITF al promotor de ADAM10.

- La irradiación ionizante en células de melanoma provoca un incremento en la expresión de MITF y este, dada su capacidad de unirse al promotor de ADAM10, activa su transcripción aumentando su expresión.
- Los ensayos de citotoxicidad confirman todo lo anterior, ya que como sería de esperar, al silenciar la expresión de MITF, la irradiación no va a provocar la inducción en la expresión de ADAM10, por tanto la exposición en membrana de MICA y MICB se acumula, ya que no es cortada por ADAM10, lo que permite que MICA y MICB estén disponibles para ser reconocidas por las células NK, las cuales se encargan de la eliminación de las células tumorales con mayor eficacia.

A modo de resumen, podemos decir que el objetivo principal de este Trabajo Fin de Máster ha sido logrado con éxito, lo cual habrá servido de base para futuras investigaciones destinadas a comprender de forma más integrada la relación entre radiación y la expresión de proteínas inmunológicas en membrana de células de melanoma, con el objetivo de diseñar nuevas estrategias para el tratamiento del cáncer de piel de tipo melanoma, donde MITF tiene un papel clave, tal y como se ha visto en este trabajo.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Sánchez-del-Campo, L. *et al.* Cellular and Molecular Mechanisms of Methotrexate Resistance in Melanoma. En: *Melanoma - From Early Detection to Treatment* (Ed. In Tech). 391–409 (2013).
- [2] Wu, S. & Singh, R. K. Resistance to Chemotherapy and Molecularly Targeted Therapies: Rationale for Combination Therapy in Malignant Melanoma. *Curr. Mol. Med.* 11, 553–563 (2011).
- [3] Ascierto, P. A., Streicher, H. Z. & Sznol, M. Melanoma: a model for testing new agents in combination therapies. *J. Transl. Med.* 8, 38 (2010).
- [4] Sánchez-del-Campo, L., Montenegro, M. F., Cabezas-Herrera, J. & Rodríguez-López, J. N. The critical role of alpha-folate receptor in the resistance of melanoma to methotrexate. *Pigment Cell Melanoma Res.* 22, 588–600 (2009).
- [5] Koludrovic, D. & Davidson, I. MITF, the Janus transcription factor of melanoma. *Future Oncol. Lond. Engl.* 9, 235–244 (2013).
- [6] Carreira, S. *et al.* Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes Dev.* 20, 3426–3439 (2006).
- [7] Cheli, Y. *et al.* Hypoxia and MITF control metastatic behaviour in mouse and human melanoma cells. *Oncogene* 31, 2461–2470 (2012).
- [8] Delaney, G., Jacob, S., Featherstone, C. & Barton, M. The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer* 104, 1129–1137 (2005).
- [9] Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 3, 991–998 (2002).
- [10] Dewan, M. Z. *et al.* Fractionated but not single dose radiotherapy induces an immune-mediated abscopal effect when combined with anti-CTLA-4 antibody. *Clin. Cancer Res.* 15, 5379–5388 (2009).
- [11] Park, S. S. *et al.* PD-1 Restrains Radiotherapy-Induced Abscopal Effect. *Cancer Immunol. Res.* 3, 610–619 (2015).
- [12] Sharabi, A. B. *et al.* Stereotactic Radiation Therapy Augments Antigen-Specific PD-1-Mediated Antitumor Immune Responses via Cross-Presentation of Tumor Antigen. *Cancer Immunol. Res.* 3, 345–355 (2015).
- [13] Chajon, E., Castelli, J., Marsiglia, H. & De Crevoisier, R. The synergistic effect of radiotherapy and immunotherapy: A promising but not simple partnership. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 111, 124–132 (2017).
- [14] Vanpouille-Box, C., Formenti, S. C. & Demaria, S. Toward Precision Radiotherapy for Use with Immune Checkpoint Blockers. *Clin. Cancer Res.* 24, 259–265 (2018).
- [15] Mochizuki, S. & Okada, Y. ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer Sci.* 98, 621–628 (2007).
- [16] Donizy, P., Zietek, M., Leskiewicz, M., Halon, A. & Matkowski, R. High Percentage of ADAM-10 Positive Melanoma Cells Correlates with Paucity of Tumor-Infiltrating Lymphocytes but Does Not Predict Prognosis in Cutaneous Melanoma Patients. *Anal. Cell. Pathol.* 2015, 1–7 (2015).
- [17] Koguchi, Y. *et al.* Serum Immunoregulatory Proteins as Predictors of Overall Survival of Metastatic Melanoma Patients Treated with Ipilimumab. *Cancer Res.* 75, 5084–5092 (2015).
- [18] Chitadze, G. *et al.* Shedding of endogenous MHC class I-related chain molecules A and B from different human tumor entities: heterogeneous involvement of the 'a disintegrin and metalloproteases' 10 and 17. *Int. J. Cancer* 133, 1557–1566 (2013).
- [19] Huergo-Zapico, L. *et al.* Expansion of NK Cells and Reduction of NKG2D Expression in Chronic Lymphocytic Leukemia. Correlation with Progressive Disease. *PLoS ONE* 9, e108326 (2014).
- [20] Ferrari de Andrade, L. *et al.* Antibody-mediated inhibition of MICA and MICB shedding promotes NK cell-driven tumor immunity. *Science* 359, 1537–1542 (2018).
- [21] Nausch, N. & Cerwenka, A. NKG2D ligands in tumor immunity. *Oncogene* 27, 5944–5958 (2008).
- [22] Lambrecht, B. N., Vanderkerken, M. & Hammad, H. The emerging role of ADAM metalloproteinases in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 18, 745–758 (2018).
- [23] Laurette, P. *et al.* Transcription factor MITF and remodeler BRG1 define chromatin organisation at regulatory elements in melanoma cells. *eLife* 4, e06857 (2015).
- [24] Musumeci, G. *et al.* ADAM-10 could mediate cleavage of N-cadherin promoting apoptosis in human atherosclerotic lesions leading to vulnerable plaque: A morphological and immunohistochemical study. *Acta Histochem.* 116, 1148–1158 (2014).

ANEXO I: Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos empleadas en este trabajo

			Secuencia de oligonucleótidos	Procedencia
Cebador ChIP	SILV	Cebador FW*	5'-CATGGAGAACTTCCAAAAGGTGG-3'	<i>Invitrogen</i>
		Cebador RV**	5'-TACTCTCCCAGGGAGTATAAGT-3'	<i>Invitrogen</i>
	ADAM10	Cebador FW*	5'-GCGCGTCACGTGGTGAGGAA-3'	<i>Invitrogen</i>
		Cebador RV**	5'-CCCTGGCAGGAGAAAACGGCG-3'	<i>Invitrogen</i>
Cebador PCR	Actina	Cebador FW*	5'-AGAAAATCTGGCACCACACC-3'	<i>Invitrogen</i>
		Cebador RV**	5'-GGGGTGTGAAGGTCTCAA-3'	<i>Invitrogen</i>
	MITF	Cebador FW*	5'-GCGCAAAAGAACTTGAAAAC-3'	<i>Invitrogen</i>
		Cebador RV**	5'-CGTGGATGGAATAAGGGAAA-3'	<i>Invitrogen</i>
	ADAM10	Cebador FW*	5'-CTGCCCAGCATCTGACCCTAA-3'	<i>Invitrogen</i>
		Cebador RV**	5'-TTGCCATCAGAAGTGGCACAC-3'	<i>Invitrogen</i>
ARN interferente	siRNA de MITF	HSS142939	5'-CCACGGGTCTCTGCTCTCCAGATTT-3'	<i>Invitrogen</i>
		HSS142940	5'-GACATCCTGATGGACGACACCCTTT-3'	<i>Invitrogen</i>
		HSS142941	5'-CCAACCGGCATTTGTTGCTCAGAAT-3'	<i>Invitrogen</i>

*FW: Forward; **RV: Reverse

ANEXO II: Competencias adquiridas en la realización de este proyecto

- Desarrollo, planificación de protocolos de experimentación, interpretación de resultados y análisis de datos.
- Manejo y aprendizaje de una amplia gama de técnicas básicas de Biología Celular, así como de Biología Molecular y cultivos celulares. A destacar: Detección de proteínas mediante *Western Blot*, RT-PCR, inmunoprecipitación de cromatina, ensayos de luciferasa para la expresión génica a nivel transcripcional, citometría de flujo, ELISA, microscopía confocal y trabajo con cromo radiactivo (citotoxicidad).
- Diseño racional de experimentos para poner a prueba la hipótesis de trabajo.
- Evaluación crítica de los resultados obtenidos y capacidad de resolución de problemas en el diseño experimental.
- Consulta y análisis de bases de datos y bibliografía con el fin de identificar experimentos y resultados de importancia.

Además, muchos de los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, forman parte de un documento actualmente en preparación para su publicación.

ANEXO III: Asignaturas cursadas en el Máster en Biología Molecular y Biotecnología

Cultivo y transformación de células y tejidos vegetales (6 ECTS)

Avances en Genética Molecular (6 ECTS)

Nuevos modelos animales en investigación biomédica (6 ECTS)

Técnicas electroforéticas (6 ECTS)

Regulación de la expresión génica (6 ECTS)

Seminarios de Biología Molecular y Biotecnología (6 ECTS)

ANEXO IV: Declaración de originalidad

Román Martí Díaz, estudiante del Máster en Biología Molecular y Biotecnología de la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia, declaro: Que el Trabajo Fin de Máster que presento para su exposición y defensa titulado "Regulación de ADAM10 mediada por MITF en la respuesta inmune contra el melanoma" y cuyos tutores son D. José Neptuno Rodríguez López y D. Luis Sánchez del Campo Ferrer es original y que todas las fuentes utilizadas han sido debidamente citadas en el mismo.

Murcia, a 05 de Julio de 2019.

Firmado:

