



UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE BIOLOGÍA

**Dual-Targeting Implication in the
Regulation of Peripheral Membrane Proteins**

**Función del Mecanismo de Doble Diana en la
Regulación de Proteínas Periféricas de
Membrana**

D^a Maria Teresa Coronado Parra

2017



**UNIVERSITY OF
MURCIA**

**DEPARTMENT OF
BIOCHEMISTRY AND
MOLECULAR BIOLOGY (A)**

DUAL-TARGETING IMPLICATION IN THE REGULATION OF PERIPHERAL MEMBRANE PROTEINS

MARIA TERESA CORONADO PARRA

MEMORIA

Presentada para optar al grado de Doctor con Mención Europea

2017



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

DEPARTAMENTO DE
BIOQUÍMICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR (A)

FUNCIÓN DEL MECANISMO DE DOBLE DIANA EN LA REGULACIÓN DE PROTEÍNAS PERIFÉRICAS DE MEMBRANA

MARÍA TERESA CORONADO PARRA

MEMORIA

Presentada para optar al grado de Doctor con Mención Europea

2017

“Esta tesis doctoral está sometida a procesos de protección o transferencia de tecnología o de conocimiento, por lo que los siguientes contenidos están inhibidos en la publicación en los repositorios institucionales.

Autorizado por la Comisión General de Doctorado de la Universidad de Murcia con fecha 9 de mayo de 2017”

CAPÍTULO III:

CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LA HIPERFORINA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA EN AUSENCIA DE PKC α

CAPÍTULO IV:

CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LA SALINOMICINA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA EN AUSENCIA DE PKC α

CAPÍTULO V:

VALIDACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICO EN LAS CÉLULAS MCF-7 EN AUSENCIA DE PKC α

CAPÍTULO VI:

CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS RABFILINA-3A Y SNAP25 EN CÉLULAS PC12

ÍNDICE

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS

ENGLISH REPORT 1

ABREVIATURAS 13

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS 16

1. Proteínas periféricas de membrana. 17

2. Mecanismo de doble diana en dominios periféricos de membrana. 17

3. Los dominios C2. 21

3.1. Introducción. 21

3.2. Estructura, función y regulación. 22

4. La evolución en los dominios C2. 28

5. Los dominios C2 en las PKCs. 31

5.1. Introducción. 31

5.2. Estructura de la familia PKC. 31

6. Los dominios C2 de Rabfilina-3A. 33

6.1. Introducción. 33

6.2. Estructura de Rabfilina-3A. 34

7. Proteína Quinasa C y el cáncer. 36

7.1. Activación de las PKC. 36

7.2. Proteína Quinasa C y cáncer. 38

7.2.1. PKC en el cáncer de mama. 41

8. Rabfilina3A y la fusión de membranas. 42

9. OBJETIVOS. 44

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS 47

1. Obtención de las construcciones plasmídicas. 49

1.1. Clonación de la Rabfilina-3A. 49

1.2. Clonación del SNAP25. 51

2. Cultivos celulares. 52

2.1. Células PC12. 52

2.1.1. Medio de crecimiento para la línea PC12 y subcultivo. 53

2.1.2. Transfección de las células PC12. 53

2.2. Células MCF-7. 54

2.2.1. Medio de crecimiento para la línea MCF-7 y subcultivo. 55

2.3. Células MDA-MB-231. 55

2.3.1. Medio de crecimiento para la línea MDA-MB-231 y subcultivo. 56

3. Preparación del ensayo de ligación por proximidad en las células PC12. 57

4. Inhibición de la expresión de la PKCa por técnicas de ARN interferente. 58

5. Lisis celular. 59

6. Ensayo de migración celular.	60
7. Ensayo de proliferación.	61
8. Ensayo de apoptosis.	62
9. Microscopios.	64
9.1. Microscopio de Barrido Láser Confocal.	64
9.1.1. Introducción y concepto de microscopía confocal.	64
9.1.2. Microscopio de barrido láser confocal Leica TCS SP8.	66
9.1.3. Fluorocromos utilizados.	67
9.2. Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM).	68
10. Tinción negativa para Microscopía Electrónica de Transmisión.	70
11. Inmunofluorescencia.	70
12. Técnicas electroforéticas.	72
12.1. Gel de agarosa.	72
12.2. Gel de acrilamida.	72
12.3. Electrotransferencia (Western-blot).	73
13. Procesamiento y análisis de imagen.	74
13.1. Análisis de western blot por densitometría con Fiji-ImageJ.	74
13.2. Análisis del ensayo de ligación por proximidad (PLA) mediante el software Fiji-ImageJ.	75
14. Microarrays.	77
15. Determinación del perfil de fosforilación de quinasas.	79
16. Análisis Array Quinasas.	83
17. Aislamiento, cuantificación y análisis del ARN.	84
18. PCR a tiempo real (qPCR).	85
19. Análisis de las eficiencias y de los ratios de expresión relativa en qPCR.	87
20. Controles de calidad para el análisis del microarrays.	89
21. Análisis estadístico.	91
CAPÍTULO III. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LA HIPERFORINA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA EN AUSENCIA DE PKCa.	93
“Esta tesis doctoral está sometida a procesos de protección o transferencia de tecnología o de conocimiento, por lo que los siguientes contenidos están inhibidos en la publicación en los repositorios institucionales.	
Autorizado por la Comisión General de Doctorado de la Universidad de Murcia con fecha 9 de mayo de 2017”	
1. Introducción.	95
2. Resultados.	97
2.1. Efecto de la hiperforina en la capacidad de migración de las células MDA-MB-231.	97

2.2. Efecto de la hiperforina en la capacidad proliferativa en ausencia de PKC α en las células de cáncer de mama MDA-MB-231.	98
2.3. La hiperforina y la inhibición de la expresión de la PKC α inducen apoptosis en la línea MDA-MB-231 de cáncer de mama.	100
2.4. El papel del proceso de autofagia en presencia de hiperforina y en ausencia de PKC α en células MDA-MB-231.	103
3. Discusión.	106
CAPÍTULO IV. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LA SALINOMICINA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA EN AUSENCIA DE PKCα.	111
“Esta tesis doctoral está sometida a procesos de protección o transferencia de tecnología o de conocimiento, por lo que los siguientes contenidos están inhibidos en la publicación en los repositorios institucionales.	
Autorizado por la Comisión General de Doctorado de la Universidad de Murcia con fecha 9 de mayo de 2017”	
1. Introducción.	113
2. Resultados.	114
2.1. Efecto en capacidad proliferativa de la salinomicina bajo la inhibición de la expresión de la PKC α en células de cáncer de mama.	114
2.2. La salinomicina y la inhibición de la expresión de la PKC α no cooperan en la inducción de apoptosis en las líneas de cáncer de mama.	120
2.3. El papel del proceso de autofagia en presencia de salinomicina y en ausencia de PKC α en células de cáncer de mama.	122
3. Discusión.	126
CAPÍTULO V. VALIDACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICO EN LAS CÉLULAS MCF-7 EN AUSENCIA DE PKCα.	129
“Esta tesis doctoral está sometida a procesos de protección o transferencia de tecnología o de conocimiento, por lo que los siguientes contenidos están inhibidos en la publicación en los repositorios institucionales.	
Autorizado por la Comisión General de Doctorado de la Universidad de Murcia con fecha 9 de mayo de 2017”	
1. Introducción.	131
2. Resultados.	132
2.1. Perfil genético de células MCF-7 en ausencia de PKC α .	132
2.2. Perfil de genes sub-expresados en la línea MCF-7 inhibiendo la expresión de PKC α .	133
2.3. Perfil de genes sobre-expresados en la línea MCF-7 tras inhibir la expresión de la PKC α .	135
2.4. Validación de la expresión de transcritos en las células MCF-7 en presencia y ausencia de PKC α por qPCR.	138

2.5. Estudio del efecto sobre la capacidad proliferativa de las células MCF-7 inhibiendo la expresión de PKC α y PLC β 4, PKA2B, ErbB4 o PDGF.	141
2.6. Estudio del efecto de la inhibición de la PKC α sobre la capacidad de migración en las células MCF-7. Efecto de los inhibidores de las proteínas de los genes sobre-expresados sobre el perfil de transcritos analizado.	152
2.7. Estudio del efecto en la apoptosis de la inhibición de la PKC α en las células MCF-7 y de los inhibidores para las proteínas de los genes sobre-expresados en el perfil de transcritos analizado.	158
2.8. Perfil de fosforilación de quinasas en células MCF7.	161
3. Discusión.	166
CAPÍTULO VI. CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS RABFILINA-3A Y SNAP25 EN CÉLULAS PC12.	171
“Esta tesis doctoral está sometida a procesos de protección o transferencia de tecnología o de conocimiento, por lo que los siguientes contenidos están inhibidos en la publicación en los repositorios institucionales. Autorizado por la Comisión General de Doctorado de la Universidad de Murcia con fecha 9 de mayo de 2017”	
1. Introducción.	173
2. Resultados.	174
2.1. Caracterización de la interacción C2AB-Rabfilina-3A y SNAP25 in vitro mediante resonancia de plasmón de superficie (SPR).	174
2.2. Caracterización en células PC12 de la interacción de Rabfilina-3A con SNAP25 mediante ensayo de ligación por proximidad (PLA).	176
2.3. Caracterización en células PC12 de la interacción Rabfilina-3A/SNAP25 en ausencia de interacción con PIP2.	183
2.4. Caracterización de fusión de membranas mediante microscopía electrónica de transmisión en liposomas unilamelares pequeños (POPC/POPS/PIP2) y C2AB de Rabfilina-3A.	185
3. Discusión.	187
CAPÍTULO VII. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES.	189
1. Discusión General.	191
2. Conclusiones.	194
BIBLIOGRAFÍA	197

A mis padres, María y Manuel

A mi hermano

*“La lucha por llegar a las cumbres basta para llenar un corazón”
(Albert Camus, El Mito de Sísifo)*

AGRADECIMIENTOS

A continuación, me gustaría expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido a la realización de este trabajo.

En primer lugar, mostrar mi agradecimiento a las instituciones MICIN y a la Fundación Séneca, que concedieron proyectos al grupo de investigación *Biomembranas* y que me han permitido realizar la Tesis.

También agradecer a los Directores de Tesis, D^a. Senena Corbalán García y D. Juan Carmelo Gómez Fernández, por haberme dado la oportunidad de formar parte del grupo de investigación y la realización de este trabajo, así como el trato cercano. Especial mención a Marisen, por ser ejemplo de rigurosidad y de tesón para la CIENCIA.

Otra parte de este trabajo es resultado de la ayuda del Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia, especialmente a los Servicios de Cultivos Celulares (Juana, Pepe, Toñi, Pilar, Dori, Vero, Azucena y Laura), al Servicio de Microscopía (Maruja, Manoli, Paco, María, Jose Joaquín y Miriam), al Servicio de Análisis de Imagen (M^a Teresa, Fara, María y Antonio) y al Servicio de Biología Molecular (M^a José, Alejandro, César, Paco y M^adel Mar).

Además, quiero agradecer al Prof. D'Auria por permitirme realizar la estancia con su grupo de investigación en el Institute of Food Sciences, CNR (Italia), haciendo posible que esta Tesis Doctoral opte a la mención europea. Agradecer también a los miembros de su grupo por su tiempo empleado (Antonio y Alessandro).

Mi más sincero agradecimiento a todos los compañeros del grupo de Biomembranas con los que he tenido el placer de trabajar. Empezando en orden cronológico: GRACIAS a Marta por TODO, a Rubén, Ángel, Curro, Ana María, Virginia, Mónica, Jose Fernando, Victoria, Fran, Consuelo, Jesús, Claudio, Emilio y David (espero haberte servido de ayuda) y especial mención a Alessio, Jaime y Antonio (bro) por vuestra incondicional ayuda, a todos MUCHAS GRACIAS. Quería agradecer también a Marcos y Victoria por su ayuda con las qPCR y proliferaciones, con mención muy especial a M^a José por dejarme formar parte del mundo MbM y haber ganado una madrina, a David por su ayuda con los PLAs y la compañía en los días de confocal, a Consuelo por los análisis de los microarrays. Como no podía ser de otra manera, también quiero agradecer a MD la ayuda y el tiempo compartido en este largo camino para que al final haya merecido la pena.

Si hoy estoy escribiendo estas palabras es GRACIAS a mi familia y a la Fundación Coronado-Parra. Quiero agradecer el apoyo incondicional y el ejemplo de mis padres y mi hermano que son los verdaderos culpables de que haya llegado hasta aquí. Solo las personas le dan sentido a la existencia.

No podía acabar esta sección sin agradecer a mis amigos cercanos vuestra compañía: especial mención al núcleo duro del *triumvirato+1* (los pilares de cada día), a los *Goonies* y *al chocolate Vienes* (no hay celebración sin vuestra presencia), al *UcaUMeYankees* (por las risas), a la institución *Afterwork* porque la terapia de grupo ha sido imprescindible, a los compañeros de carrera que hoy son amigos: Mariola, Mar, Juan y Antonio J. A todos y cada uno de vosotros GRACIAS por existir.

**Muchas gracias a TODOS por haberme acompañado
en el camino**

ENGLISH REPORT

SUMMARY

I. INTRODUCTION AND OBJETIVES.

I.1. Peripheral membrane proteins.

A wide number of proteins domains lead the membrane recruitment of the cell proteins by recognizing key features of the membrane surface (Lemmon, 2008; Moravcevic et al, 2012).

The regulation of these proteins is essential to the proper function of the cellular machinery and to avoid the pathologies development. These domains are peripheral membrane proteins and they have the capacity of freely diffusing along or away from the membrane surface where they exert their function. These functions are the modulation of the membrane lipid composition, GTPases activation or connect between the second messenger pools and effector pathways downstream among many others (Driscoll & Vuidepot, 1999; Moravcevic et al., 2012).

I.2. Dual targeting mode.

Most peripheral membrane domains bind only one membrane element and when these domains do, it is in a low affinity mode. The force of this interaction increases due to additional elements located on the membrane. These components could be lipids, proteins or both. Dual targeting mode is the capacity of these peripheral membrane domains to bind two membrane lipids, two proteins or one lipid and one protein (Lemmon., 2008).

These domains could interact with a protein target in a specific way by recognizing a lipid context under a certain signaling condition. Membrane specificity is determined by its charge and curvature, this enhance the number of possibilities of combinations to develop different control cellular processes (Falke & Ziemba, 2014; Moravcevic et al., 2012).

I.3. C2 domains in PKC and Rabphilin3A.

C2 domains are one of the first peripheral membrane protein described together with C1 domains. These domains were first discovered as the regulatory regions of protein kinase C (PKC) and they directly respond to second messengers like calcium, acidic phospholipids and diacylglycerol. They achieve to gather into the plasma membrane the PKC and its activation (Oancea & Meyer, 1998).

C2 domains appear in a wide variety of eukaryotic proteins and are independent modules of 130 residues. These domains are conserved in classical PKC (α , β I, β II, γ) and their interaction with the membrane is executed in a calcium dependent manner. However, novel PKCs (ϵ , η , δ , θ) have lost the calcium interacting aminoacids and thus, they are not able to respond to calcium and are only regulated by interactions with negatively charged phospholipids. Myriad of proteins share a C2 domain in their structure and most of them are involved in membrane trafficking and fusion and signal transduction. Atypical PKCs lack C2 domains in their structure and instead contain a PB1 domain located in the N-terminus (Coussens et al., 1986; Knopf et al., 1986; Ono et al., 1986; Corbalan-Garcia & Gómez-Fernández, 2014).

Another protein that share C2 domains in their structure is rabphilin3A or exophilin1 (Geppert et al., 1994). This protein belongs to a wide family of proteins and its members are granuphilin/exophilin2/Slp4, exophilin6/Slp3 and exophilin9/Slp5 although at the beginning was called as Rab3a (Fukuda & Yamamoto, 2005; Deak et al., 2006). Rabphilin3A is a protein composed about 690 residues in the human version and 77kDa. The protein structure of rabphilin3A also has a Rab binding domain (RBD) at the N-terminal region and a Zinc-finger binding domain. C2 domain tandem appear in the C-terminal region (Izumi, 2007).

I.4. Objectives.

- Characterization of the hyperforin treatment of breast cancer cells in the presence and absence of PKC α expression.
- Characterization of the salinomycin treatment of breast cancer cells in the presence and absence of PKC α expression.
- Validation of the analysis of differential gene expression profiles of a model breast cancer cell line (MCF-7) in the presence and absence of PKC α .
- Therapy design based on the molecular markers obtained in the analysis of differential gene expression.
- Characterization the phosphorylation pathways affected under the control of PKC α on the breast cancer cell line MCF-7.
- Characterization of the Rabphilin-3A and SNAP25 interaction on PC12 cells.

II. MATERIALS AND METHODS.

II.1. Construction of expression plasmids.

Rabphilin3A and SNAP25 DNA used were purchased at OriGene Technologies, Inc (Rockville, MD, USA) and were amplified by PCR using specific primers. Plasmid constructions used along this Doctoral Thesis as follows:

CONSTRUCTION USED	MUTATIONS
HA-Rph3A-WT	--
HA-Rph3A-M1	K651A/K656A
HA-Rph3A-M2	K651A/K656A/H663A
HA-Rph3A-M3	K651A/K656A/K663A/H617A
Myc-SNAP25-WT	--
myc-SNAP25-MI	E38A/D41A/R45A
myc-SNAP25-MII	D51A/E55A/R59A

II.2. Cell culture.

MCF-7, MDA-MB-231 and PC12 have been the cell lines used along this work. MCF-7 and MDA-MB-231 are a human breast cancer model hormone and chemotherapeutic respectively and PC12 cell line is a rat pheochromocytoma used as a neuron or endocrine model.

Lipofectamine2000 was used to transfect cells with Rabphilin3A and SNAP25 DNA following manufacturer instructions with PC12 cells. To inhibit PKC α on these two MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines were transfected by electroporation technique using small interference RNA (siRNA).

II.3. Confocal microscopy and TEM.

The confocal microscope used was a Leica TCS SP8 (Leica, Heidelberg, Germany). The objectives used were PL APO 20X / 0.7 AN under dry conditions and PL APO 63X / 1.3 AN (immersion oil). The detectors used were PMT and HyD ultrasensible (30% quantum efficiency). Images were analyzed with Fiji-image J-NIH <https://fiji.sc/>.

The transmission electron microscopy (TEM) used was a PHILIPS TECNAI 12 of 120 KV and with Megaview III digital camera (EMSIS GmbH, located in Münster Germany). Negative staining technique was used with formvar-carbon grids (200 mesh).

II.4. Proliferation, Migration and Apoptosis measurements.

Proliferation experiment to measure total amount of DNA were carry out following manufacturer instructions of the kit used CyQUANT® NF Cell Proliferation Assay (Invitrogen, Oregon, USA).

Migration capacity was measured through *wound healing assay* method and photographs were taken immediately to set 0 hours and many times later till wound were closed.

Apoptosis effect was measured following the manufacturer instructions of the Vibrant® Apoptosis Assay kit (Invitrogen, Oregon, USA) by Alexa Fluor® 488 annexin V and PI for flow cytometry. This kit allowed us to detect between live cells (no fluorescence signal), death cells (red fluorescence) and early apoptotic cells (green fluorescence) and apoptotic-death cells (both, green and red fluorescence).

II.5. qPCR.

Once RNA is isolated and its quality was validated, it was necessary to obtain cDNA by RT-PCR following manufacturer instructions of the kit iScript Reverse Transcription Supermix (Bio- Rad Laboratories, Hercules, CA). Primer design to qPCR reaction was made with software Primer Express® v3.0 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA). SYBR® Green (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) was the probe used in singleplex and qPCR assay was carried out with 7500 Fast Real Time PCR System device (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA).

II.6. Proximity Ligation Assay (PLA).

In situ PLA® is a proximity ligation assay technology that consist in a pair of oligonucleotide labeled secondary antibodies (PLA probes) that generate a signal only when the two PLA probes have bound near enough, maximum distance allowed is 40 nm to the reaction could be done. PLA assay was carried out following the manufacturer instructions kit used was Duolink® In Situ (Sigma-aldrich DUO92101). The signal from each detected pair of PLA probes was visualized as an individual fluorescent spot with a confocal microscope and quantified with FIJI software.

II.7. Human Phospho-Kinase Array Kit.

The Human Phospho-Kinase Array was used to analyze the phosphorylation profile of 43 kinases and their substrates simultaneously to understand how cells recognize and respond to changes under the absence of PKC α . This array was used following the manufacturer instructions of the kit (Proteome profiler, R&D SYSTEMS, bio-technie).

III. RESULTS.

III.1. Study of the role of Hyperforin and PKC α in Breast Cancer Cell physiology.

Hyperforin is a phloroglucinol contained in *Hypericum perforatum* L herb. This compound has properties against tumors and inflammation processes among others, being it a potential interesting drug (Chiang et al., 2017; Merhi et al., 2011). For that reason, we have investigated the anti-tumoral capacity of hyperforin under the absence of PKC α in a breast cancer cell line as MDA-MB-231. The study aimed to determine if this drug was a potential solution in breast cancer models and if its mechanism was related with PKC α .

We have determined the anti-proliferative and pro-apoptotic effect of hyperforin in MDA-MB-231 cells in the presence and absence of PKC α . Only the absence of PKC α reduced 20% the proliferation capacity of these cells. Hyperforin and the inhibition of PKC α together achieved a better effect with a lower concentration of hyperforin than in the presence of PKC α .

Previous studies revealed the mechanism through hyperforin has its effect is arresting cell cycle in G2/M phase achieving anti-proliferative effect and pro-apoptotic through the activation of caspases 9, 8 and 3 by death mitochondrial pathway with the inhibition of Bcl-2 protein (Billard, Merhi, & Bauvois, 2013).

In addition, the PKC α expression level is related with Bcl-2 status in acute myeloid leukemia, for example. Samples with Bcl-2 activated had also PKC α and ERK activated (Kurinna et al., 2006). These results could suggest that hyperforin share a mechanism with PKC α in the proliferation and apoptotic pathways in MDA-MB-231.

III.2. Effect of Salinomycin and PKC α depletion treatment in Breast Cancer Cell physiology.

Salinomycin is a monocarboxylic polyether antibiotic isolated from *Streptomyces albus* that exhibits antimicrobial activity against Gram-positive bacteria, some filamentous fungi, *Plasmodium falciparum*, *Eimeria spp* and it has been used as an anticoccidial drug in poultry (Callaway & Oliver, 2009; Miyazaki et al., 1974).

We have studied the effect of salinomycin treatment with down-regulated PKC α on the proliferation capacity and on process like autophagy and apoptosis of two characteristics of malignant cancer cells, MCF-7 and MDA-MB-231 cells.

The results obtained in proliferation assays determined a completed reduction of this capacity with 10 μ M of salinomycin in both breast cancer cell lines under the presence or the absence of PKC α expression.

Increases in LC3-II levels are commonly used to monitor the induction of autophagic process. We have measured LC3B in both cell lines combining salinomycin treatment with down-regulated PKC α . LC3B-II level was increased three times with 10 μ M of salinomycin during 12 hours on MCF-7 cells and four times with 10 μ M of salinomycin during 10 hours on MDA-MB-231 cells. The absence of PKC α in both cases did not show an extra increase.

Another aspect studied in MCF-7 and MDA-MB-231 cells stimulated with different concentrations of salinomycin was programmed cell death or apoptosis. Down-regulation of PKC α increased lightly the apoptotic effect in both breast cancer cell lines reaching near 12-15%. The concentration of salinomycin treatment of 1 μ M obtained a 30% apoptosis on both cell lines in the presence or the absence of PKC α . A higher concentration of salinomycin like 10 μ M showed a great effect on the apoptosis process, MCF-7 achieved near 40% but MDA-MB-231 reaching a value of 75%. We did not obtain a significantly difference between the presence or the absence of PKC α with salinomycin treatment on the apoptosis effect.

III.3. Validation of PKC α inhibition gene profile microarray and combination treatment design.

Considering all the studies that relate PKC α and tumour progression, the next step in our investigation was trying to understand the function of this classical PKC isoform in breast cancer cells. We have inhibited the expression in MCF-7 cell line by using siRNA interference and performed a microarray analysis. The comparison of genome-wide expression patterns has enabled us to discover, for example, pathways that are modified and disrupted in breast cancer under the absence of PKC α .

After the microarray analysis, we obtained a list of genes classified into two groups: up- and down-regulated genes. Differences in gene expression were considered statistically significant when the p-value was smaller than 0.05. After classifying down-regulated genes according to KEGG pathways <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html> (Yi et al., 2006), the largest group of genes belong to pathways implicated in cancer and for up-regulated genes we highlight *inositol phosphate metabolism* and *phosphatidylinositol signaling system*. The cut-off was 1.5-fold change to choose the relevant up-regulated genes: PLC β 4, PRKA, ERBB4 and PDGFR.

We validated these results by qPCR and designed a therapy that combines to inhibit PKC α expression and other of these PLC β 4, PRKA, ERBB4 or PDGFR simultaneously. We studied this therapy through proliferation and migration capacity and the effect on apoptosis. The results obtained showed that BMS 599626 inhibitor, which is against ErbB proteins, might be a synergistic collaborator with PKC α to treat breast cancer.

Another aspect studied was analyze the phosphorylation profile of kinases and their protein substrates and was essential for understanding how MCF-7 cells respond to changes in their environment like the inhibition of PKC α expression. The *Phospho-kinase Array* simultaneously detect the relative levels of phosphorylation of 43 kinases phosphorylation sites and 2 related total proteins in the presence and absence of PKC α to compare. We obtained a general reduction of the phosphorylation levels, STAT family and mTOR among others.

Finally, these results suggest that PKC α plays an important role in this breast cancer cell line by regulating the expression of many other genes. Our hypothesis was if PKC α was a protein related directly with cancer development when PKC α was down-regulated, other oncogenes will also be down-regulated but over-express other genes to try to maintain growth. For that reason, we tested together using siRNA PKC α and some specific inhibitors of PLC β 4, PRKA, ERBB4 and PDGFR.

III.4. Characterization of Rabphilin3A and SNAP25 interaction in PC12 cells.

Membrane fusion is essential in a wide range of cellular processes, neuronal and endocrine communication among others. Rabphilin3A (Rph3A) is a membrane trafficking protein involved in the regulation of secretory vesicles exocytosis in neurons and neuroendocrine cells in a calcium dependent manner.

Our group has resolved the crystal structures of Rph3A C2B-SNAP25 and C2B-PIP₂ complexes in collaboration with the group of Dr. Verdaguer IBMB-CSIC, Barcelona. Biophysical and biochemical characterization performed in our group indicated that the bottom α -helix of C2B domain of rabphilin3A is crucial to interact with SNAP25, while the polybasic region is essential for the phosphoinositide-dependent interaction with the plasma membrane.

The Rabphilin3A and SNAP25 interactions were visualized at single-molecule resolution in an *in situ* proximity ligation assay (PLA) by a transient expression of the full-length HA-Rph3A and myc-SNAP25 in PC12 cells. PLA signals were observed both in the cytosol and plasma membrane distributed about 50% in each subcellular compartment.

Given that only Rph3A and not SNAP25 has been detected in dense core vesicles in PC12 cells, the PLA signals appearing in the cytosol might represent a population of trafficking vesicles in which Rph3A and SNAP25 converge. In addition, the signals at the plasma membrane might be associated with populations of docked vesicles due to the interaction of Rph3A with either SNAP25 alone or the SNAP25/STX1A.

For that reason, we have examined if the specific Rph3A-SNAP25 interface was critical for the interaction detected. To examine this, we carried out mutants abolishing the function of the C2B bottom α -helices and the SNAP25-Nt regions 1 and 2. A significant decrease in the number of PLA signals at the plasma membrane was observed for all mutants tested, with the only exception of myc-SNAP25-M2 for which no changes were observed.

In addition, we also characterized this interaction by surface plasmon resonance in collaboration with Dr. D'Auria group at the ISA, CNR, Italy.

Another aspect studied was the role in the membrane fusion of C2AB-Rph3A with small unilamellar vesicles (POPC/POPS/PIP₂) and negative staining by transmission electron microscopy in a PIP₂ and calcium dependent manner.

IV. CONCLUSIONS.

1. Hyperforin treatment shows an anti-proliferative and pro-apoptotic effect, and hyperforin also increases the synthesis of autophagic marker protein LC3B on MDA-MB-231 breast cancer cell line.
2. PKC α expression inhibition with hyperforin treatment achieves to completely reduce the proliferation rate of MDA-MB-231 cells. The hyperforin pro-apoptotic and pro-autophagic effect is independent of the presence and the absence of PKC α .
3. Salinomycin treatment inhibits the proliferation rate, to induce apoptosis and increase autophagic protein synthesis marker LC3B on MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines.
4. PKC α down-regulation improves the salinomycin effect; this absence achieves better and faster results with a lower salinomycin dosis and this combination gives rise to a low toxicity treatment.
5. siRNA PKC α inhibition used for gen expression profile microarray of MCF-7 cells is validated by qPCR, and the down-regulation of EGFR and ITGB6 genes obtained in microarray analysis too.
6. The combination of PKC α down-regulation and specific inhibitors used against key up-regulated microarray genes (PLC β 4, PKA, ErbB4 y PDGFR) obtained in the absence of PKC α , confirm our synergistic effect hypothesis on the proliferation rate, migration capacity and apoptosis in MCF-7 cells.
7. PKC α down-regulation reduce the relative levels of the phosphorylation protein families studied, mainly STAT protein family, FAK, mTOR, HSP60, PRAS4 and only two protein families are increased: ERK1/2 and p53.
8. We confirme residues implicated in the rabphilin3A and SNAP25 interaction. These residues belong to the α -helix C2B bottom face of rabphilin3A are K651A/K656A/K663A/H617A and E38A/D41A/R45A at N-terminal position of SNAP25.

9. The Rabphilin3A and SNAP25 interaction mechanism needs to bind PIP_2 and this happens through C2AB of rabphilin3A.

10. We characterize *in vitro* rabphilin3A and SNAP25 interaction by surface plasmon resonance (SPR) measuring the dissociation constant of $K_D = 1 \mu\text{M}$.

11. C2AB-rabphilin3A shows to be involved in the membrane fusion and curvature of the small unilamellar vesicles (SUV) in a $\text{PIP}_2/\text{Ca}^{2+}$ -dependent manner by negative staining with transmission electron microscopy (TEM).

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AOBS	Módulo separador óptico acústico
AOTF	Filtro óptico acústico modulable
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovina
CDK	Quinasa dependiente de ciclina
CBR	Región de unión a calcio
CFP	Proteína cian fluorescente
CMV	Promotor de citomegalovirus
CSC	Células madre de cáncer
DAG	Diacilglicerol
DAPS	1,2-diacetil- <i>sn</i> -fosfatidil-L-serina
DGK	Diacilglicerol quinasa
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
Dominio PH	Dominio homólogo a pleckstrina
dsADN	ADN de doble cadena
DTT	Ditiotreitol
ECFP	Proteína cian fluorescente mejorada
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFP	Proteína verde fluorescente mejorada
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal
EGTA	Ácido tetracético etilen-glicol
ER	Receptor de estrógeno
ERK	Quinasa regulada por señales extracelular
FCS	Suero fetal bovino
GAP43	Proteína activada por el crecimiento de tamaño 43 kDa
GTPasa	Hidrolasa de Guanidin trifosfato
HA	Epítipo de hemaglutinina
HBS	Tampón salino de Hepes
HSP60	Proteína de choque térmico 60
IGFBPs	Proteína de unión al factor de crecimiento de tipo insulina
Ins(1,3)P ₂	Inositol-1,3-bisfosfato
Ins(1,4,5)P ₃	Inositol-1,4,5-trisfosfato
IVT	Transcripción <i>In vitro</i>
JNK	Quinasa c-Jun
Kan ^r	Resistencia a Kanamicina
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
MARCKS	Sustratos de proteína quinasa C enriquecidos en alaninas miristiladas
MCS	Sitio de clonación múltiple
MDR	Resistencia a drogas múltiple
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDK-1	Quinasa dependiente de fosfoinosítidos-1
PI	Yoduro de propidio
PIP kinases	Quinasas de fosfoinosítidos fosfatados

PI3K	Quinasa 3 fosfoinosítido
PKA	Proteína quinasa A
PKB	Proteína quinasa B
PKC	Proteína quinasa C
PKD	Proteína quinasa D
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
PMA	Acetato de forbol miristilado
PSA	Persulfato amónico
PtdCho (PC)	Fosfatidilcolina
PtdIns(4,5)P₂	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato
PtdSer (PS)	Fosfatidilserina
RACK	Receptores de quinasa C activadas
RB	Proteína de retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT	Temperatura ambiente
RTK	Receptor tirosina quinasa
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
siRNA	ARN de interferencia pequeño
siRNA_α	ARN de interferencia pequeño que inhibe la expresión de PKC_α
STAT	Transductor de señales y activador de la transcripción
STICKs	Sustratos que interaccionan con Quinasa C
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TGF_αR	Receptor del factor de crecimiento transformante α
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. Proteínas periféricas de membrana.

La asociación de proteínas con la superficie interna de la membrana plasmática y de otras membranas intracelulares es esencial para una enorme cantidad de funciones celulares. Desde la señalización celular y tráfico celular hasta el mantenimiento de su propia estructura (Lemmon, 2008; Moravcevic et al., 2012). Se estima que el 30-40% de las proteínas celulares son proteínas asociadas a membrana, evidenciando la importancia de este tipo de proteínas para las funciones celulares (Arora & Tamm, 2001).

Las proteínas periféricas de membrana son proteínas que se asocian de modo transitorio con las membranas a través de interacciones o mecanismos basados en un equilibrio dinámico de las superficies de interacción o modificaciones post-traduccionales como GPI, palmitoilaciones o miristilaciones (Basso et al., 2016). Las proteínas periféricas pueden contactar mediante interacciones electrostáticas o puentes de hidrógeno a determinados lípidos o proteínas integrales de la membrana. Un ejemplo de proteína periférica es el citocromo c que interacciona con la superficie de la membrana interna de la mitocondria y que a pH fisiológico es catiónico pudiendo asociarse con fosfatidilserina o fosfatidilglicerol (Van Doren et al, 2017).

La regulación del funcionamiento de estas proteínas permite controlar los procesos celulares y evitar el desarrollo de patologías. Además, las proteínas periféricas de membrana o sus dominios tienen la capacidad de difundir libremente desde el citosol a la membrana plasmática u otras membranas intracelulares donde ejercen su función determinada. Esta función puede consistir en la modificación de lípidos, en la activación de GTPasas o simplemente colocalizar con sus dianas en las rutas de señalización celular. (Driscoll & Vuidepot, 1999; Lemmon, 2008). Además también participan en la regulación de las subunidades de los canales iónicos y receptores de transmembrana (Stott et al., 2015), en la respuesta inflamatoria o en la homeostasis de Ca^{2+} (Garcia et al., 2013), de los factores antimicrobianos (Vicente et al., 2013) y quinasas (Hurley, 2006) entre otras (Vauquelin & Packeu, 2009).

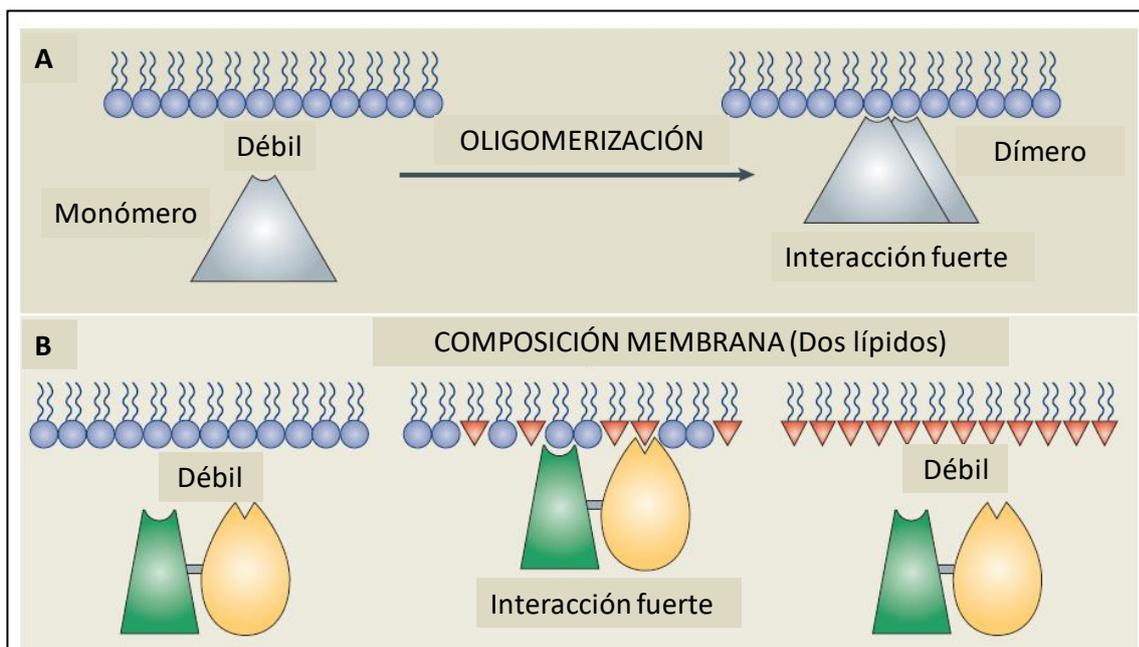
2. Mecanismo de doble diana en dominios periféricos de membrana.

La mayoría de los dominios periféricos de membrana interactúan con un solo componente de la membrana con baja especificidad y afinidad (Fig. I.1.A). La fuerza con la que se unen los dominios a las distintas membranas aumenta debido a un efecto sumatorio de la interacción de estos dominios con varios

componentes de la superficie de la membrana, éstos pueden ser de diferentes tipos como por ejemplo lípidos o proteínas e incluso ambas a la vez (Fig. I.1) (Moravcevic et al., 2012). Así, el mecanismo de doble diana alude a la capacidad de determinados dominios a unir dos lípidos de la membrana (Fig. I.1.B), dos proteínas o un lípido y una proteína, utilizando áreas diferentes dentro del mismo dominio (Fig. I.1.D, E). Esto permite a la proteína que lo posee responder a múltiples señales celulares, bien por separado o de forma simultánea mediante el reconocimiento de las dianas que se generan en las membranas celulares.

La especificidad de la membrana viene determinada por la carga, curvatura y composición, esto favorece el aumento del número de posibilidades a la hora de generar combinaciones para crear mecanismos de control celular (Fig. I.1.C).

La conclusión general sobre el área de unión entre la superficie lipídica y las proteínas periféricas de membrana es su heterogeneidad y el empleo de una gran variedad de mecanismos para asegurar que la unión tenga lugar (Figura I.1). Estos mecanismos incluyen tres modalidades: 1) las interacciones electrostáticas no específicas a través de determinadas superficies básicas de las proteínas e incluso algunas de ellas que son mediadas por cationes como por ejemplo el Ca^{2+} que cambian la carga electrostática de la superficie de la proteína donde se une para que pueda acceder a sus lípidos diana cargados negativamente. 2) interacciones por la inserción en la bicapa lipídica de una zona hidrofóbica de la proteína y 3) reconocimiento específico de la cabeza polar del fosfolípido.



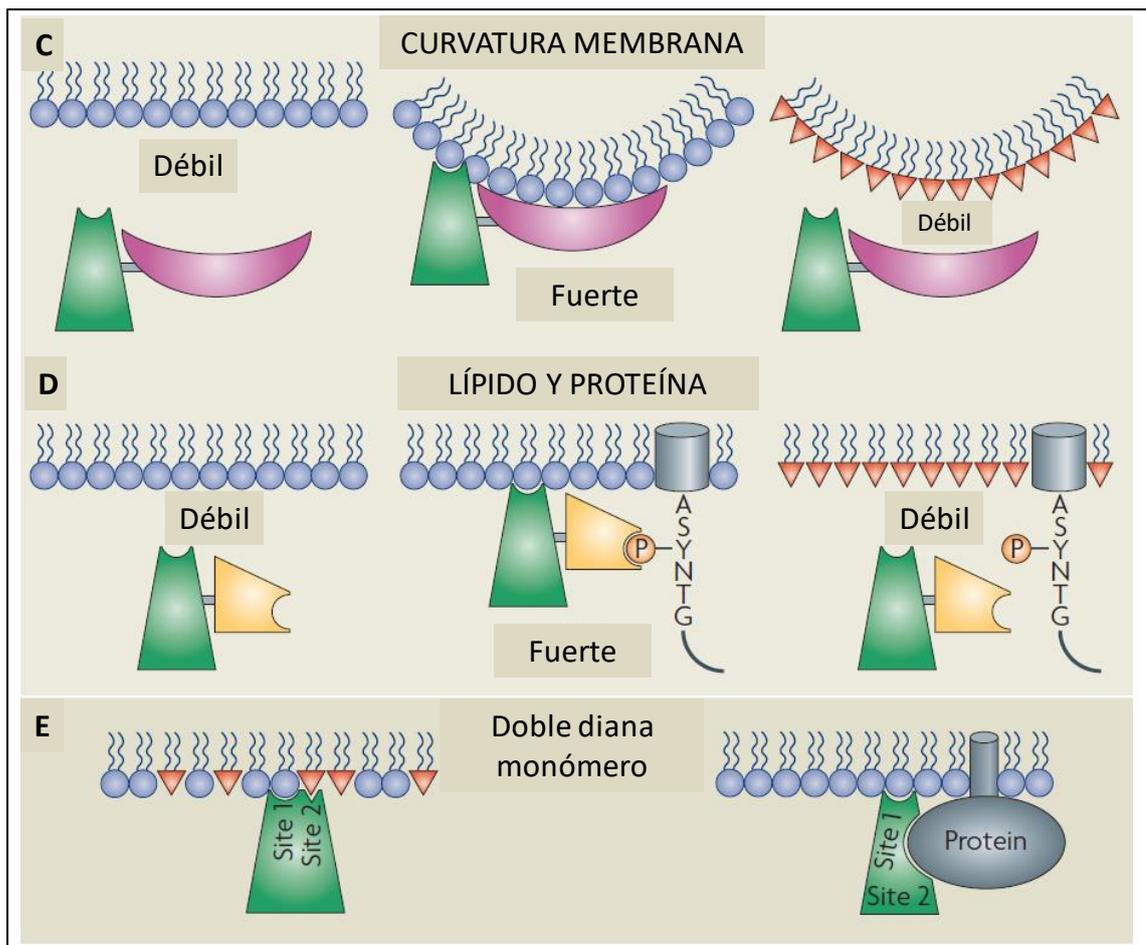


Figura I.1. Representación esquemática de los diferentes mecanismos de interacción múltiple entre las proteínas periféricas de membrana y la superficie de la bicapa lipídica. A) mecanismo que aumenta la afinidad a la membrana debido a la oligomerización, B) interacciones electrostáticas basadas en la unión a dos lípidos diferentes, C) la curvatura de la bicapa lipídica es otro parámetro determinante en este tipo de interacciones D) se puede producir el reconocimiento específico de una proteína de la membrana y/o de los fosfolípidos expuestos en la membrana, E) Mecanismo de doble diana en un monómero o dominio periférico de membrana, puede unir dos lípidos, lípido y proteína o dos proteínas Figura adaptada de (Lemmon, 2008).

En la década de los años 90 se identificaron dos clases de dominios o proteínas periféricas de membrana que presentaban propiedades comunes de reconocimiento específico para lípidos y los fosfoinosítidos comenzaron a considerarse dianas reconocidas por estas proteínas periféricas de membrana. Por un lado, están los dominios o proteínas que presentan una regulación espacial y por otro los que presentan una regulación temporal (Lemmon, 2008). En el primer caso hablamos de dominios o proteínas que solo interactúan con los lípidos que se encuentran en determinados espacios subcelulares y en el segundo caso se hallan los dominios que únicamente en determinados momentos son capaces de interactuar específicamente con determinados lípidos. La señal que puede provocar el reclutamiento de los dominios o proteínas en este último caso puede ser debida a la señalización celular o al requerimiento de algún cofactor para unirse a la membrana como por ejemplo el Ca^{2+} (Janmey et al., 1995; Driscoll & Vuidepot, 1999; Moravcevic et al., 2012).

Las membranas celulares son estructuras dinámicas cuya composición posee más de 1000 tipos diferentes de lípidos en los que se incluye a los fosfoinosítidos que se encargan de generar las señales espaciales y temporales que permite a las proteínas periféricas ejercer su función. Los fosfoinosítidos (PIP) se sintetizan en el retículo endoplasmático (ER) mediante la enzima fosfatidilinositol (PI) sintasa a partir de diacilglicerol (DAG) y de *myo*-inositol y luego son distribuidos a las distintas membranas intracelulares y a la plasmática. Tras su localización, los PI pueden ser fosforilados de forma reversible dando 7 tipos diferentes de PIPs (Figura I.2.) y son usados por diferentes dominios periféricos de membrana en función del tipo de fosforilación que presentan. Los PI representan de un 10-20% del total lipídico y los PIPs suponen menos del 1% y regulan una gran cantidad de procesos celulares como el crecimiento, la dinámica del citoesqueleto y quimiotaxis entre otras (Agranoff, Bradley, & Brady, n.d.; Di Paolo & De Camilli, 2006; Falke & Ziemba, 2014; Kufareva et al., 2014; Stahelin, Scott, & Frick, 2014; van Meer, 2005).

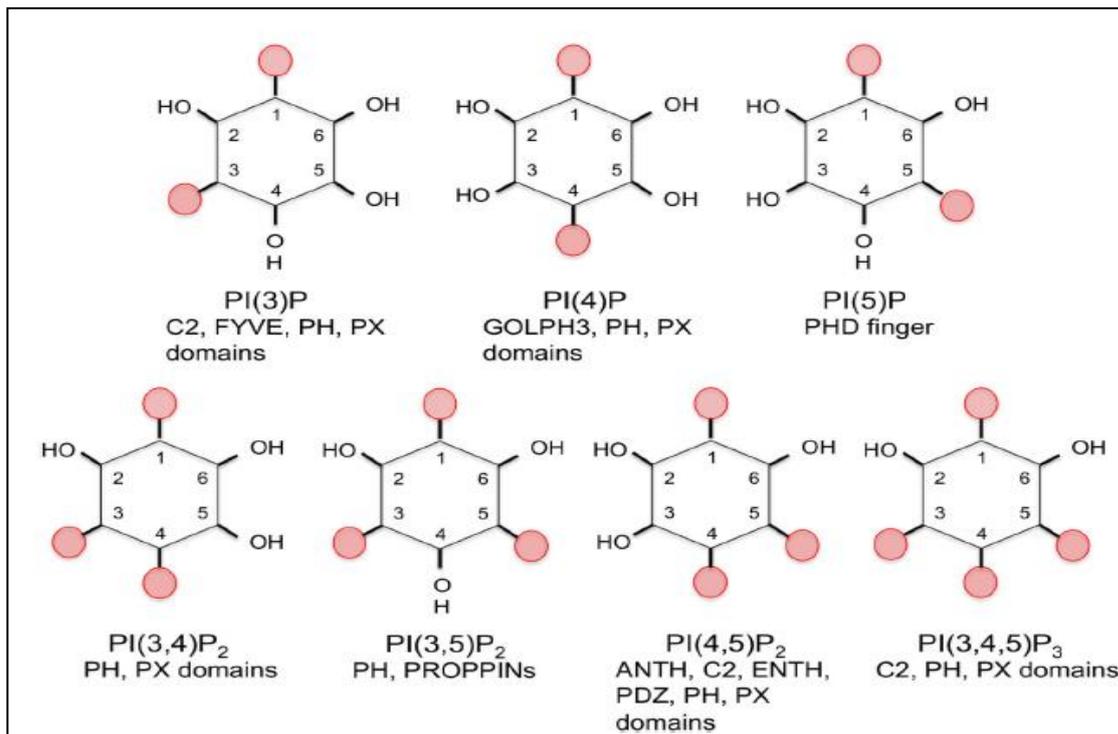


Figura I.2. Los siete tipos de PIPs presentes en las células de mamífero que son dianas de las proteínas periféricas de membrana. Cada tipo de PIPs lleva indicado debajo el dominio periférico de membrana que lo utiliza como diana (Stahelin et al., 2014).

Hay que tener en cuenta para analizar la distribución de los PIPs que están regulados por quinasas y fosfatasas y por lo tanto pueden ser fosforilados y desfosforilados rápidamente. Los PIPs más abundantes son PI(4,5)P₂ y PI(4)P y se hallan en la membrana plasmática y en el Golgi respectivamente (fig.I.3). La

cara interna de la membrana plasmática presenta 20-30% de lípidos aniónicos, esto genera un campo eléctrico negativo que atrae proteínas periféricas de membrana con superficies catiónicas, siendo el fosfolípido aniónico más abundante la fosfatidilserina (PS) en membranas plasmáticas animales. Además de ayudar al reclutamiento de proteínas catiónicas, atrae aquellas que específicamente unen PS como ocurre en el caso de los dominios C2. La presencia de PS junto con la cabeza de otros PIPs refuerza la unión, que de haber sido con un solo componente de membrana sería débil, proporcionando así un efecto sinérgico (Di Paolo & De Camilli, 2006; Olivotto, Arcangeli, Carlà, & Wanke, 1996; Stahelin et al., 2014; van Meer, 2005).

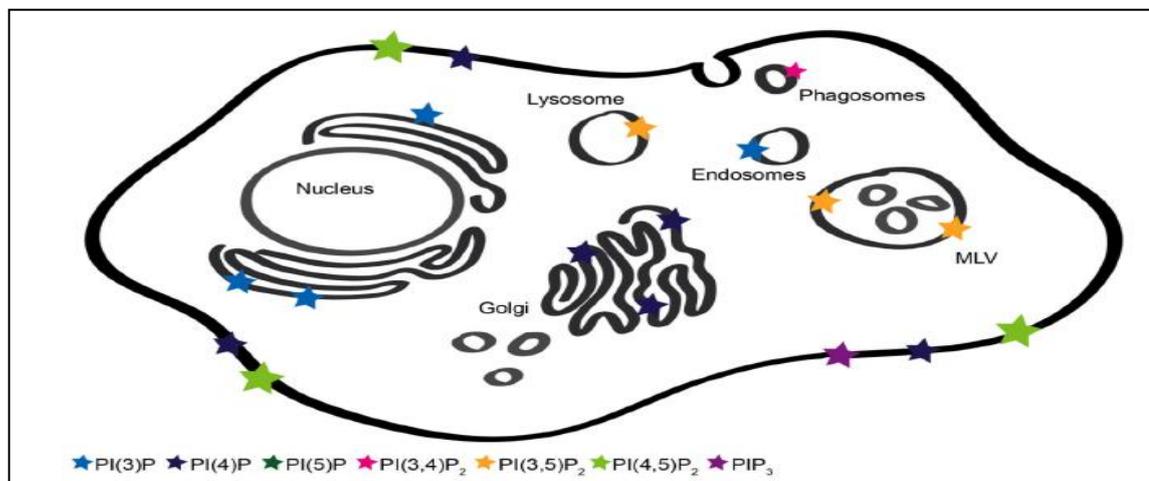


Figura I.3. Esquema de la distribución de los PIPs en una célula eucariota. Con estrellas de distintos colores se representa la localización exacta de cada tipo de PIPs (Stahelin et al., 2014).

3. Los dominios C2.

3.1. Introducción.

Los dominios C2 son un ejemplo de dominios periféricos de membrana que presentan mecanismo de doble diana y son descritos junto con los dominios C1 de la familia de la proteína quinasa C (PKC) como las primeras proteínas periféricas de membrana, pudiendo responder a diacilglicerol (DAG) y calcio y traslocar la PKC a la membrana plasmática para ejercer su función (Oancea & Meyer, 1998).

Los dominios C2 son módulos independientes de 130 residuos que se encuentran en un gran grupo de proteínas eucariotas. Estos dominios están conservados en las PKCs clásicas (α , β I, β II, γ) y su unión a la membrana es dependiente de calcio. Sin embargo, en el grupo de las PKCs nuevas (ϵ , η , δ , θ) se ha perdido la respuesta a calcio, aunque la región V0 de su dominio C2 en la región N-terminal interacciona con los fosfolípidos cargados negativamente. Se

ha descrito una gran variedad de proteínas que contienen dominios C2 conservados en sus estructuras y que están involucrados en el tráfico y fusión de membranas así como en la señalización celular (Corbalan-Garcia & Gómez-Fernández, 2014; Nalefski & Falke, 1996).

3.2. Estructura, función y regulación.

Estructuralmente estos dominios se definen como miembros de la superfamilia de los dominios C2 que unen calcio y lípidos (CaLB). La clasificación en SCOP está basada en dos topologías que se diferencian en la distinta orientación de las 8 láminas beta en cada uno de los dominios. No se han descrito cambios funcionales en función del tipo de topología.

La superfamilia de los dominios C2 incluye dos grupos, por un lado, está la variante de la proteína fosfolipasa C (PLC), también conocida como familia P y que presenta topología de tipo II. Y por otro lado está la variante de tipo sinaptotagmina a la que también se le hará referencia como familia S y que presenta topología de tipo I (Figura I.4). La principal diferencia entre las dos topologías es que la primera cadena de la topología tipo I ocupa la misma posición estructural que la octava cadena de la topología tipo II, lo que desplaza el orden de las cadenas homólogas en la estructura primaria. Además ambas estructuras son fácilmente interconvertibles pasando la del primer tipo a ser del segundo cuando los extremos amino y carboxilo se fusionan generando nuevos extremos terminales cortando el bucle entre las cadenas $\beta 1$ y $\beta 2$ (Fig.I.4) (Nalefski & Falke, 1996).

En términos generales esta superfamilia de dominios C2 está formada por 127 dominios según la base de datos CATH y a nivel funcional se obtiene 80 grupos distintos. Los dominios C2 se encuentran en una gran variedad de proteínas involucradas en diversas funciones biológicas como fosforilación, modificación de lípidos, transporte de vesículas, regulación de pequeñas GTPasas y la ubiquitinación.

Los dominios de tipo I están presentes en la familia de la sinaptotagmina que posee un amplio grupo de afinidades distintas por el Ca^{2+} incluyendo hasta aquellas que no lo unen. Otros ejemplos de proteínas que poseen uno o varios dominios C2 en su estructura son las que participan en la regulación de la liberación de neurotransmisores como por ejemplo Munc-13, Rabfilina-3A y la familia RIM/NIM entre otras (Corbalan-Garcia & Gómez-Fernández, 2014).

Algunas de las proteínas que poseen los dominios C2 de topología II que unen Ca^{2+} , son por ejemplo PLC, las proteínas supresoras de tumores PTEN/MMAC1 y las quinasas del fosfoinosítido 3 (PI3K). Sin embargo, existen

también familias de proteínas que pueden presentar ambas topologías como es el caso de la familia de las proteínas quinasas C (PKC). En el grupo de las clásicas los dominios C2 presentan la topología de tipo I y el grupo de las nuevas posee la topología de tipo II (Corbalán-García & Gómez-Fernández, 2006; Corbalán-García & Gómez-Fernández, 2014).

Tras ser estudiada su estructura mediante difracción de rayos X y por RMN se ha determinado que presenta ocho cadenas β antiparalelas, agrupadas en dos hojas de cuatro cadenas cada una, que forman un sándwich β compacto (Shao et al, 1996; Sutton & Sprang, 1998).

Las conexiones entre las cadenas y la región amino terminal son las partes con mayor variabilidad que presentan los dominios C2. En la parte superior del sándwich β se hallan las conexiones o regiones de unión a Ca^{2+} (CBR) que comprenden 5 residuos de ácido aspártico que coordinan la unión a Ca^{2+} . Además, existe una gran variabilidad en las regiones de unión entre las láminas β donde los residuos de prolina e histidina son muy abundantes haciendo posible su carácter flexible.

La estructura común de los dominios C2 son las láminas β dejando las regiones de interacción como específicas para cada dominio. Existe otra región conservada en las láminas β_3 y β_4 de los dominios de topología I que forman una región básica compuesta mayoritariamente por lisinas (LRC) que está involucrada en la unión a fosfolípidos cargados negativamente como por ejemplo PIP_2 y además también presenta interacciones de tipo proteína-proteína (Nalefski & Falke, 1996; Rizo & Südhof, 1998; Corbalán-García & Gómez-Fernández, 2014).

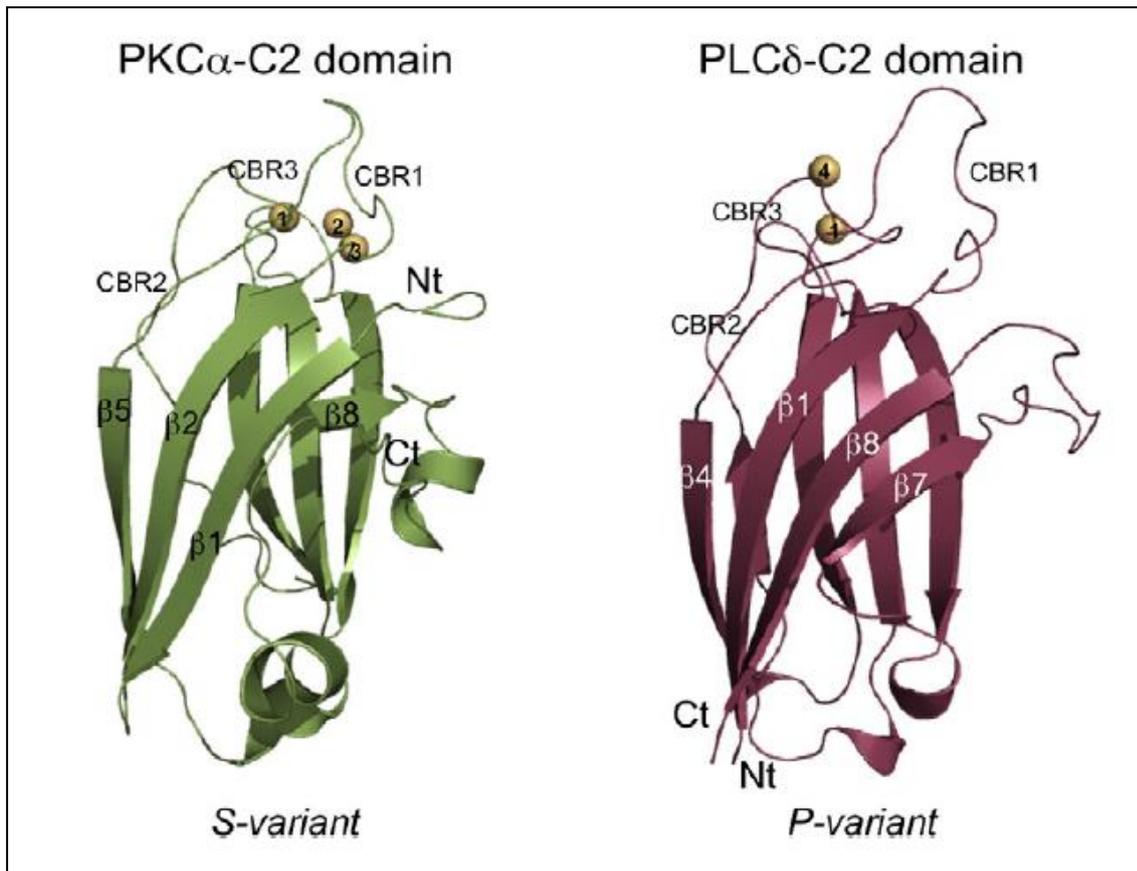


Figura I.4. Representación de las dos topologías existentes para la superfamilia de los dominios C2. La variante S (tipología I) está representada por el dominio C2 de la PKC α y la variante P (tipología II) está representada por el dominio C2 de la PLC δ . La posición de la lámina $\beta 1$ de la variante-S se superpone con la lámina $\beta 8$ en la variante-P debido al cambio de conformación que sufren, lo que deja los extremos amino y carboxilo terminal en la parte superior de la variante-S y en la parte basal de la variante-P (Corbalan-García & Gómez-Fernández, 2014).

Se utilizó la estructura en 3D del dominio C2 de la PKC α para realizar un alineamiento de secuencias basado en estructuras (VAST-MMDB) mostrando un alto grado de solapamiento con los dominios C2 de otras proteínas como son: las sinaptotagminas 1, 4, 7 y 13, rafilina3A, PI3K, piccolo y RIM1 y 2 (Figura I.5). Basándose en estos resultados la secuencia consenso de unión a PIP₂ fue propuesta e incluye a los dominios C2 que conservan seis residuos. La comparación de las secuencias primarias en este alineamiento mostró que Y195, K197, K209 y N253 de PKC α está muy conservado. El residuo K211 del C2A no resultó estar muy conservado en los dominios de algunas sinaptotagminas y piccolo, en cuyo lugar poseen residuos glutamato o valina. Sin embargo, las regiones polibásicas tienen residuos de lisina que le confieren a estos motivos el potencial electrostático positivo, dificultando la determinación de los residuos que intervienen en la interacción con PIP₂ (Corbalan-García & Gómez-Fernández, 2014). Recientemente se ha descubierto que la sustitución de un glutamato por lisina en el dominio C2A de la sinaptotagmina 1 consigue restablecer la habilidad del dominio para interactuar con el PIP₂, confirmando así la importancia de

esta región específica para la interacción con los fosfoinosítidos (Guillen et al., 2013).

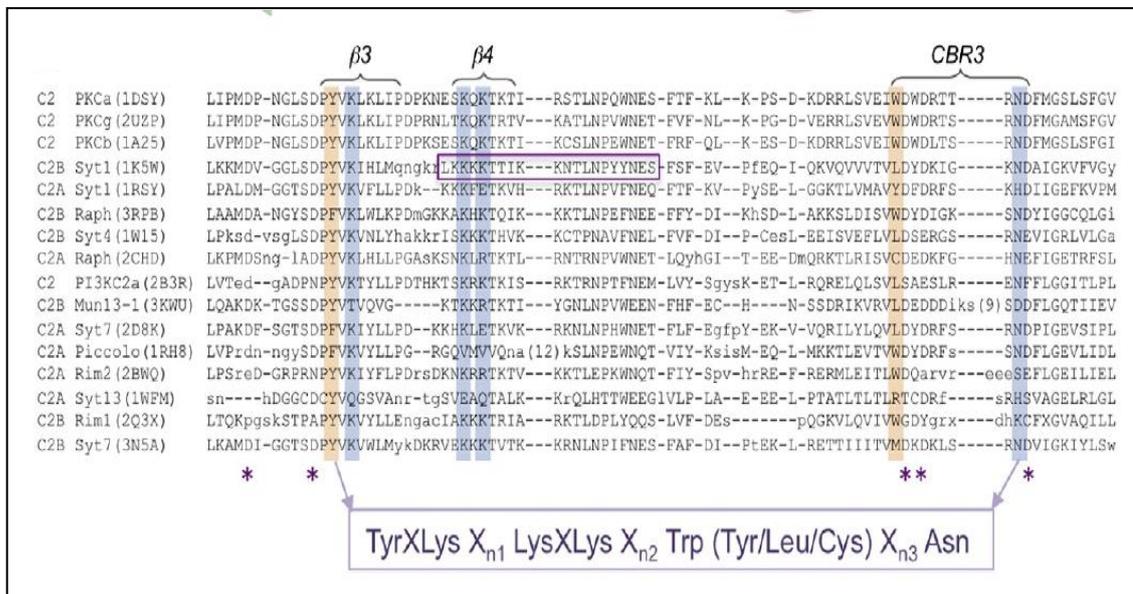


Figura 1.5. Secuencias alineadas de los dominios C2 con el dominio C2 de PKC α . Las proteínas están identificadas en la izquierda y se indica su código del PDB. Los asteriscos marcan los residuos Asp que participan en la coordinación del Ca²⁺. Se resaltan en amarillo y azul los residuos involucrados en la unión a PIP2 siendo Y195 y W245 y por otra parte K197, K209, K211 y N253 respectivamente. La caja superior resalta los residuos homólogos de los 20 aminoácidos que están involucrados en las interacciones con fosfatos del dominio C2B de algunas sinaptotagminas. La caja de la parte inferior de la imagen indica la secuencia consenso (Corbalan-García & Gómez-Fernández, 2014).

Los dominios C2 son los responsables de la interacción con calcio de algunas isoformas de las PKCs. Se han caracterizado tres sitios de unión diferentes (Ca1, Ca2 y Ca3). Todos localizados en la parte superior del β -sándwich, concretamente entre los lazos de la lámina β . Así se llamarán a los lazos localizados en esta parte del dominio como CBR1 (en inglés: calcium binding region), CBR2 y CBR3 en orden desde el extremo amino terminal.

Los resultados obtenidos de los estudios bioquímicos y celulares de la literatura sugieren un modelo secuencial de unión a membrana y activación para las PKC clásicas. En primer lugar, un incremento de Ca²⁺ intracelular podría resultar en la unión de dos iones calcio llamados Ca1 y Ca2 a la proteína cuando aún se halla en el citosol provocando así su traslocación a la membrana diana a través del dominio C2 (Figura 1.6). Una vez en la membrana, PKC penetra en la bicapa permitiendo que el dominio C1 pueda interactuar con el DAG consiguiendo así la completa activación del enzima (Bolsover et al., 2003; Conesa-Zamora et al., 2001)

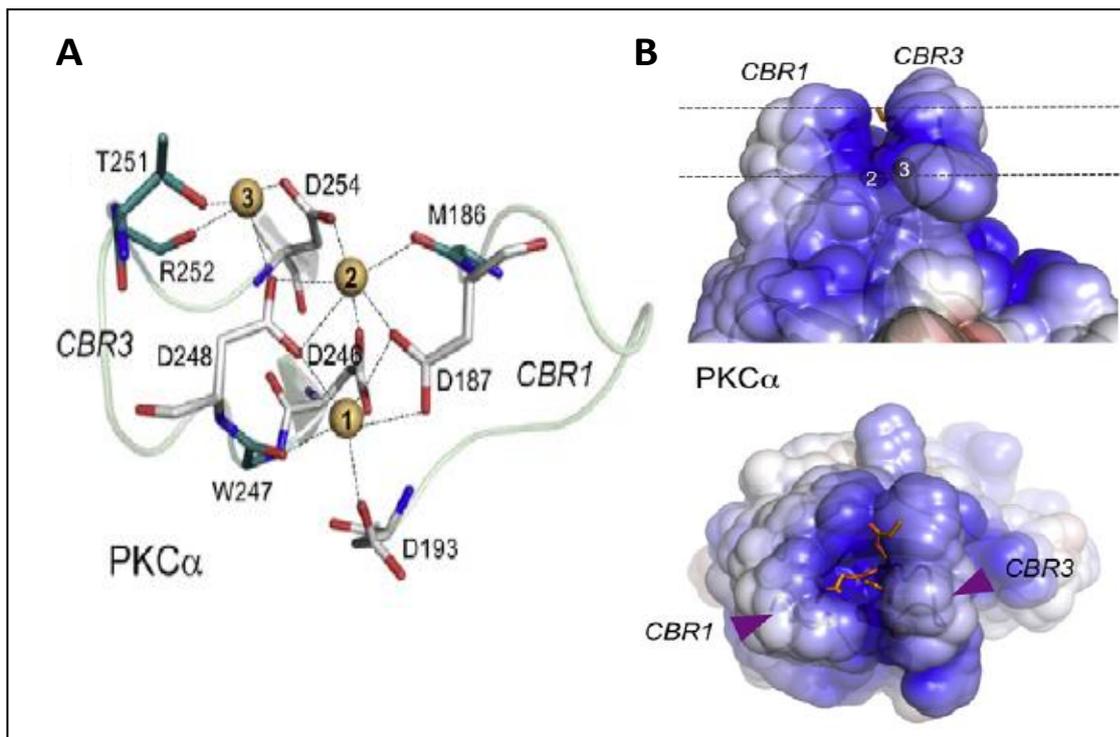


Figura I.6. Región de unión a calcio (CBR) y a fosfatidilserina del dominio C2 de PKC α y la representación de la superficie electrostática. A) Esquema de coordinación de los iones de calcio en la estructura determinada del C2 de PKC α en complejo con Ca²⁺ y DCPS. Las líneas de puntos representan la coordinación establecida entre los grupos carboxílicos y los oxígenos y Ca1 (1), Ca2 (2) y Ca3 (3). B) Superficie electrostática del dominio C2 de PKC α en presencia de calcio. Se muestra vista lateral en la parte superior y en la parte inferior la vista desde arriba (Corbalan-García & Gómez-Fernández, 2014).

La cristalización del dominio C2 de PKC α junto con Ca²⁺ y 1,2-diacetil-*sn*-fosfatidil-L-serina (DAPS) demostró la presencia de un sitio adicional para la unión de fosfolípidos aniónicos en la región próxima a la región rica en lisinas en las PKC clásicas (Biol et al., 2002). Específicamente se encontró que el residuo Lys197 y Lys 199 localizados en la lámina β 3 y los residuos Lys209 y Lys211 localizados en la lámina β 4 establecen una serie de interacciones electrostáticas con una segunda molécula como es DAPS sugiriendo que esta región interviene o participa en la interacción con membrana del dominio C2.

Otros estudios han demostrado que esta área puede unir moléculas cargadas negativamente como fosfatos, ácido fosfático fosfoinosítidos como PIP₂ (Biol et al., 2002; Marín-Vicente et al., 2008).

Un estudio bioquímico más amplio empleando diferentes fosfolípidos ácidos demuestra que el dominio C2 de PKC α une PIP₂. Esto ocurre a través de la lámina β 4 de la región rica en lisinas (Lys209/Lys211) activando así a la isoenzima siendo por tanto un mecanismo de activación diferente del clásico. El

dominio C2 de PKC γ presenta baja afinidad por este lípido, mientras que el C2 de PKC α se trasloca rápidamente a membrana con muy poca cantidad de PIP $_2$.

Además, los aminoácidos aromáticos Tyr195 y Trp245 han resultado estar implicados en la interacción específica entre el C2-PKC α y el fosfato del anillo de inositol del PIP $_2$ (Figura I.7). Estos residuos son similares a otros aminoácidos catiónicos como son Lys197, Lys209, Lys211 y Asn253 y se encuentran altamente conservados entre todos los residuos C2 de tipo I, mientras que en los dominios de tipo II no se conservan los residuos que intervienen en la interacción con el PIP $_2$ (Guerrero-Valero, Marín-Vicente, Gómez-Fernández, & Corbalán-García, 2007; Guerrero-Valero et al., 2009). Además de unir a las membranas, los dominios C2 están involucrados en interacciones proteína-proteína a través de la región rica en lisinas.

Se puede concluir que PtdSer y PIP $_2$ son muy importantes para la regulación de la localización y activación de las PKC clásicas a través de los dominios C2, específicamente a través del sitio de unión a Ca $^{2+}$ y de la región rica en lisinas (Mochly-Rosen et al., 1992; Marín-Vicente et al., 2008).

En el caso de las PKC nuevas estos dominios muestran algunas diferencias como son la localización en el extremo amino terminal, que presenta topología de tipo II y que su mecanismo de interacción con las membranas es independiente de Ca $^{2+}$. Además, contiene una región importante en la parte superior del β -sándwich, la conexión entre las láminas β se denominan lazos y región que no une Ca $^{2+}$. Los lazos 1 y 3 están localizados en esta región y forman las conexiones entre β -1 y β -2 y entre β -5 y β -6 respectivamente. El mecanismo de unión del grupo de las isoformas nuevas es distinto al de las clásicas debido a que carecen de los residuos que forman la región de unión a Ca $^{2+}$ y a la estructura de unión a lípido formada por el lazo 1 y 3.

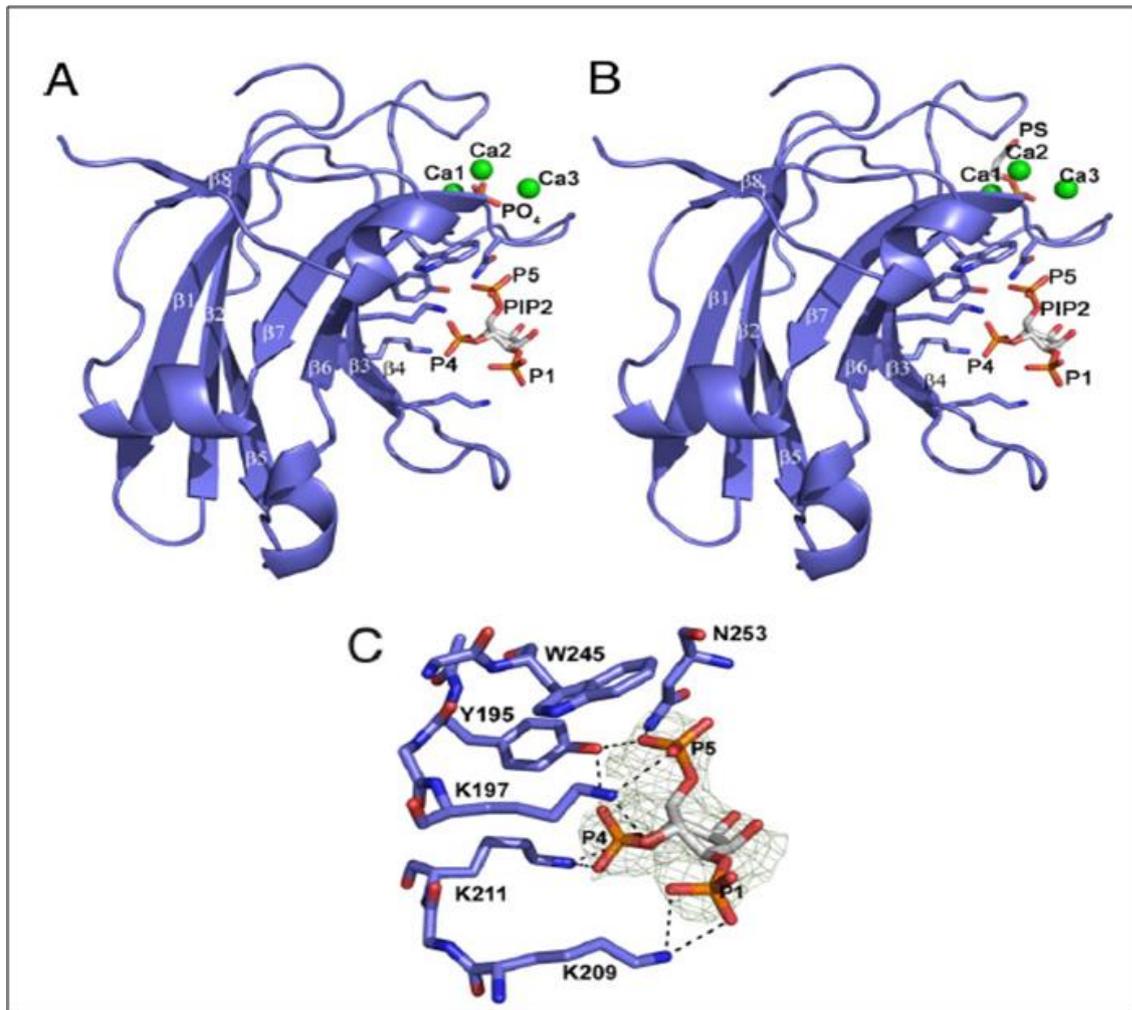


Figura I.7. Estructura de la unión del C2 de PKC α y PIP $_2$. A) Se muestra el complejo terciario del dominio C2-PKC α -Ca $^{2+}$ - PIP $_2$. B) Se muestra el complejo cuaternario del dominio C2-PKC α con Ca $^{2+}$ -PS-PIP $_2$. Los dominios C2 se representan en azul, los iones calcio son esferas verdes que se hallan en la parte superior del dominio. Los iones fosfato y las moléculas de fosfolípidos están representados con modelo de varillas. C) Vista de la cavidad formada por las láminas β_3 y β_4 mostrando las interacciones entre el dominio C2 y la cabeza IP $_3$ del PIP $_2$ y los residuos implicados en la unión. Los puentes de hidrógeno se muestran en línea discontinua (Guerrero-Valero et al., 2009).

4. La evolución en los dominios C2.

Un trabajo (Farah & Sossin, 2012) ha estudiado la evolución de las proteínas periféricas de membrana y concretamente los dominios C2 que existen en la familia de las PKC. Posteriormente, analizaron conjuntamente dos familias de proteínas donde los dominios C2 se encuentran muy conservados como es el caso de los dominios C2 de rabfilina-3A y los dominios C2 de las Ras GTPasas (Figura I.8).

Los dominios C2 son módulos periféricos de membrana que tradicionalmente han estado presentes a lo largo de la evolución en numerosas proteínas de

eucariotas. El análisis filogenético determinó que las familias de las PKC se establecieron claramente muy pronto a partir de un ancestro común. La separación de las PKC atípicas del resto de las PKC se produjo previamente a la separación de las clásicas y las nuevas entre sí. Los dominios C2 de las PKC de hongos, de las PKN y de las PKC nuevas I y II provienen presumiblemente de un ancestro común.

La capacidad de unir Ca^{2+} parece ser una mutación que dio lugar a otra rama de la que provienen los dominios C2 de rabfilina-3A, de las PKC clásicas y de las ras GTPasas. Es la capacidad de unir calcio, que no estaba presente en el ancestro más antiguo, la que se puede considerar característica común que separa los dos grandes grupos (Farah & Sossin, 2012).

Sin embargo, mediante los análisis filogenéticos de Zhang y Aravind realizados con las estructuras, se determinaron las funciones ancestrales de los dominios C2 y su diversificación en eucariotas. La pérdida de unión a calcio se considera como un suceso más moderno en la evolución de los dominios C2 y son las PKC las que aparecen de su ancestro común sin respuesta a calcio (Zhang & Aravind, 2010).

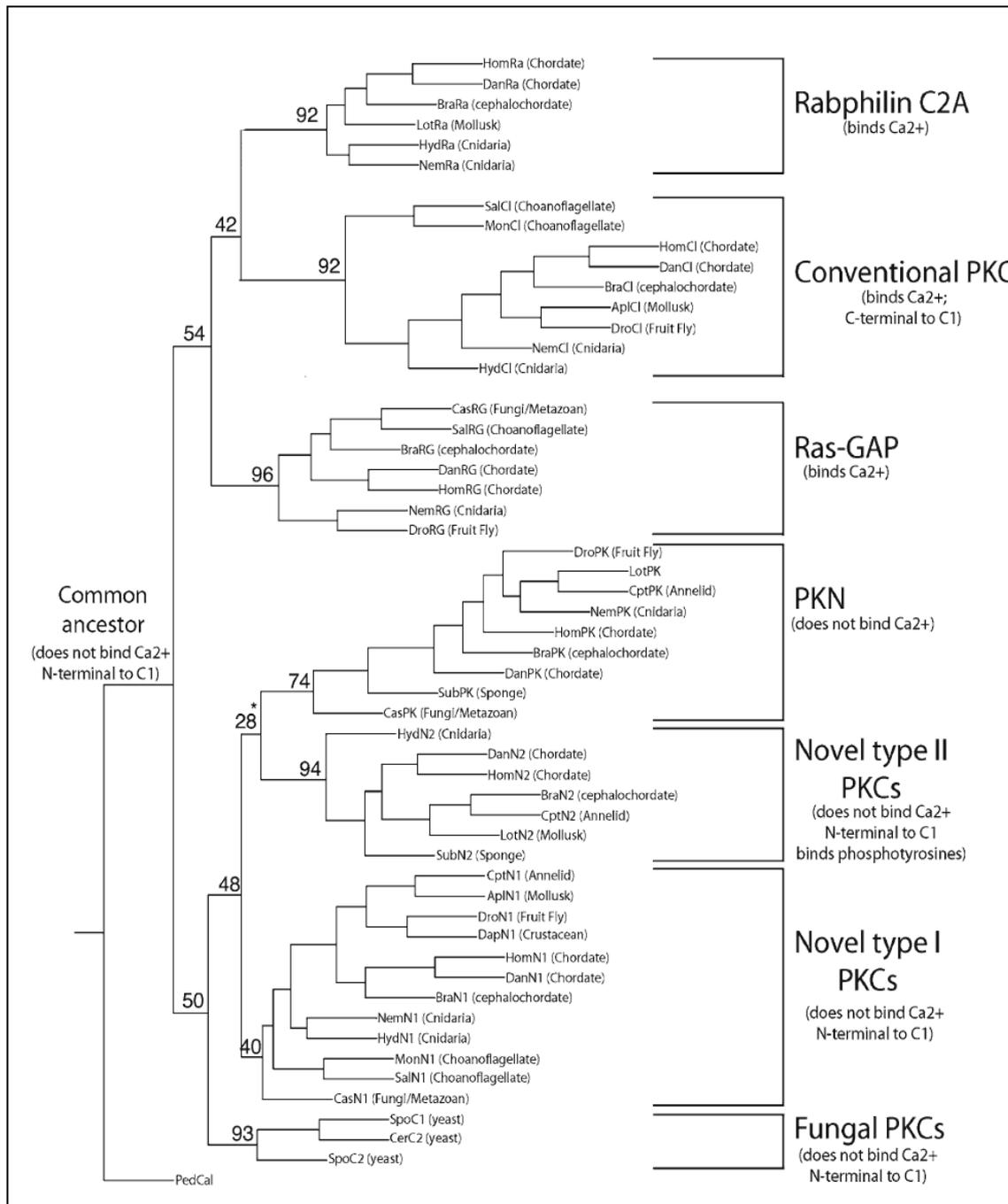


Figura I.8. Análisis filogenético de la evolución de los dominios C2 de las PKC, Rabphilina-3A y Ras GTPasas. Las secuencias son obtenidas del NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> o del JGI Genome site, <http://genome.jgi.doe.gov/>. Las secuencias fueron alineadas con el Clustal-W. Las abreviaturas que aparecen son: *Apl* Aplysia (Molusco), *Bra* Brachiostoma (Lancelet, cefalocordado), *Cas* Capsaspora (Fungi/Metazoo), *Cer* S. Cervisiae (levadura), *Cpt* Capitella (Anélido), *Dan* Danio (pez cebra; Chordate), *Dap* Daphnia (Crustáceo), *Dro* Drosophila melanogaster (mosca de la fruta), *Hom* Homo (Humano; Cordado), *Hyd* (Hydra; Cnidaria), *Lot* Lottia (Molusco), *Mon* Monosiga Brevicollis (Choanoflagellate), *Nem* Nemostella (Anemona; Cnidaria), *Sal* Salpingoeca (Choanoflagellate), *Spo* S. Pombe (levadura), *Sub* Suberites domoncula (Porífero). El número de los árboles muestra el grado de coincidencia con el árbol consenso (Farah & Sossin, 2012).

5. Los dominios C2 en las PKCs.

5.1. Introducción.

Las PKC fueron descubiertas hace 40 años por Nishizuka y sus colaboradores, identificadas como proteínas dependientes de fosfolípidos y activadas por calcio (Inoue, Kishimoto, Takai, & Nishizuka, 1977; Nakamura & Yamamura, 2010). Blumberg y sus colaboradores determinaron que las PKC actuaban como receptores celulares para los esteres de forbol. Existen más de 60.000 citaciones en el PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) y más de 10.000 citaciones asociando a cáncer esta familia de proteínas, convirtiéndose en una de las familias de quinasas más estudiada (Driedger & Blumberg, 1980; Castagna et al., 1982; Sharkey, Leach, & Blumberg, 1984; Cooke et al., 2017).

Esta familia de proteínas está compuesta por 10 isoenzimas codificadas por 9 genes en mamíferos y representan el 2% del quinoma humano. Son enzimas con actividad fosfotransferasa que fosforilan específicamente residuos Ser/Thr en las proteínas diana y poseen un papel crucial en la señalización celular. Se encuentran implicadas en una enorme variedad de funciones fisiológicas como son proliferación celular, regulación del metabolismo, apoptosis, activación de plaquetas, reorganización del citoesqueleto de actina, regulación de los canales iónicos, diferenciación neural y además se encuentran implicadas en una gran variedad de patologías como son el cáncer o enfermedades del corazón y pulmón (Corbalán-García & Gómez-Fernández, 2006; Urtreger et al., 2012; Cooke et al., 2017).

5.2. Estructura de la familia PKC.

Son enzimas ubicuas, se expresan en una gran variedad de tipos celulares y cada célula puede expresar a su vez gran cantidad de estas proteínas. Las isoenzimas de la PKC se han clasificado en tres grupos en función de su estructura primaria, así como de la dependencia por los diferentes cofactores enzimáticos (figura I.9):

- **PKC clásicas o convencionales** (cPKC): comprende las isoformas PKC α , β I, β II y γ . Este grupo requiere de DAG o esteres de forbol, fosfolípidos aniónicos y Ca²⁺ para su óptima activación. Aparecen dos isoformas de la PKC β debido a un procesamiento diferencial del gen para esta enzima a nivel del ARN. Así se obtienen dos isoformas que solo se diferencian en la región V5, variando así su localización en estado activo o inactivo (Yoshitaka Ono et al., 1986; Disatnik,

Buraggi, & Mochly-Rosen, 1994; Luria, Tennenbaum, Sun, Rubinstein, & Breitbart, 2000).

- **PKC nuevas** (nPKC): este grupo comprende las isoenzimas PKC ϵ , δ (Y Ono et al., 1987), η (Osada et al., 1990) y θ (Osada et al., 1992). Además, requieren de fosfolípidos aniónicos y DAG o ésteres de forbol para su óptima activación y carecen de respuesta directa a Ca^{2+} .
- **PKC atípicas** (aPKC): están formadas por dos isoformas que son PKC ζ y por PKC ι/λ (PKC ι es como se denomina la isoforma humana (Selbie, Schmitz-Peiffer, Sheng, & Biden, 1993) y PKC λ es la isoforma en ratón (Akimoto et al., 1994)). Este grupo requiere solo de fosfolípidos ácidos para su actividad enzimática, aunque puedan ser regulados por ceramidas e interacciones proteína-proteína (Corbalán-García & Gómez-Fernández, 2006).

Se incluye un cuarto grupo según algunos autores llamado quinasas relacionadas **PKN**, está compuesto por tres miembros que son PKN1, PKN2 y PKN3 (Rosse et al., 2010). Presentan un motivo o región homóloga 1 (HR1) en lugar del dominio PB1 y además poseen un modo de regulación alostérica dependiente de proteína G. Existe un doble mecanismo de los motivos HR1a y HR1b en la familia GTPasas de Rho o Rac que desacopla el dominio pseudo sustrato PKN activando la quinasa. El extremo C-terminal de PKN1 puede necesitar también a Rho para su activación (Rosse et al., 2010).

Solo existe una isoenzima para *S. cerevisiae* que comparte características estructurales con las PKC clásicas (figura I.9), nuevas y atípicas de mamíferos, así como con el grupo de las relacionadas PKN. Así *S. cerevisiae* presenta dominios HR1, C1, C2 y un dominio quinasa del tipo Ser/Thr quinasa. La región reguladora de las isoenzimas clásicas y nuevas en mamíferos son los dominios C1 (C1A y C1B) que unen DAG y ésteres de forbol y el dominio C2. En el grupo de las clásicas tiene la misma estructura que las nuevas solo que la posición de estos dominios está invertida. Además las isoformas clásicas son sensibles a Ca^{2+} y a fosfolípidos aniónicos, en cambio las nuevas no son sensibles a Ca^{2+} (Corbalán-García & Gómez-Fernández, 2006; Rosse et al., 2010; Newton et al., 2016).

El grupo de las PKC atípicas no presentan dominio C2, en su lugar poseen un dominio PB1 localizado en el extremo amino terminal y además también posee un dominio C1 que no tiene respuesta a DAG. El dominio PB1 posee 85 aminoácidos e interacciona con otras proteínas con el mismo dominio como por ejemplo: PAR6 o MAPK5 o ZIP/p62 mediante interacciones PB1-PB1 (Corbalán-

García & Gómez-Fernández, 2006; Rosse et al., 2010). El dominio PB1 se puede clasificar en dos grupos I y II. El primero presenta un dominio de unión denominado OPCA (dominio de interacción que contiene repeticiones del octicosapéptido) formado por una secuencia consenso de 28 aminoácidos con residuos ácidos e hidrofóbicos conservados. El segundo tipo tiene un residuo conservado de Lys en la hoja β (Wilson et al., 2003; Moscat, Diaz-Meco, & Wooten, 2009).

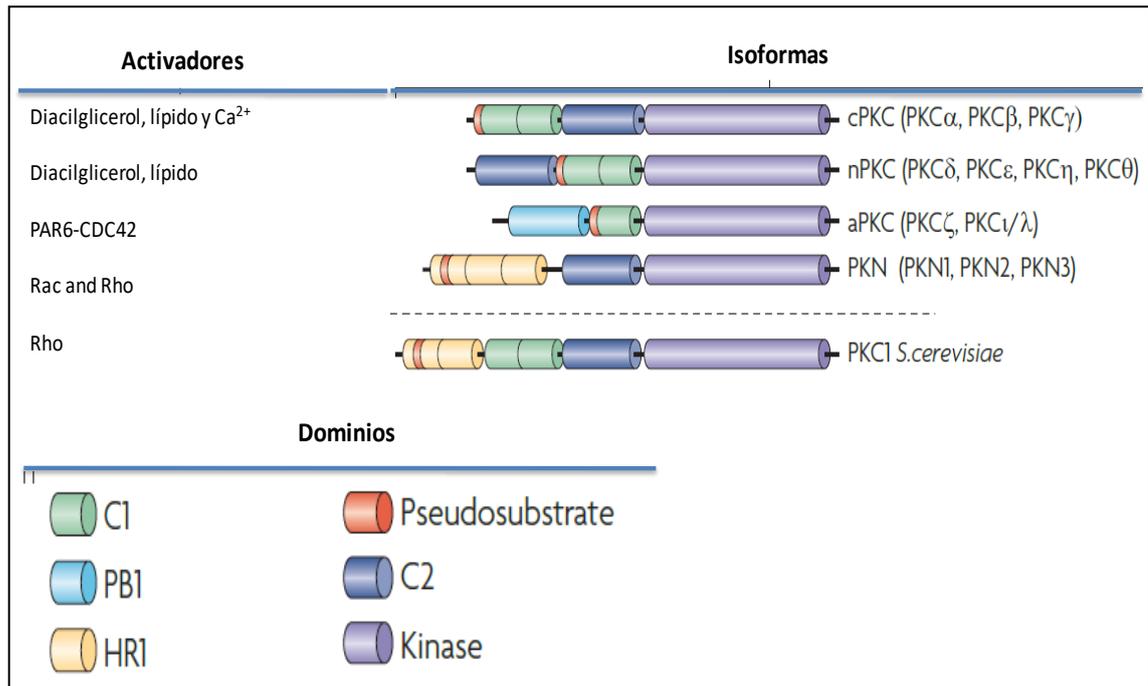


Figura I.9. Clasificación esquemática de la super familia de las PKCs según su estructura primaria y los requerimientos de cofactores para su activación enzimática óptima. Se muestran los distintos dominios que las forman, así como los requerimientos de cofactores para su regulación. En mamíferos la familia de las PKCs se puede dividir en cuatro grupos en función de los dominios reguladores. Se muestra la isoforma presente en *S. cerevisiae* y los cuatro grupos de mamíferos: clásicas (cPKC), las nuevas (nPKC), las atípicas (aPKC) y las quinasas relacionadas con PKC (PKN). En el extremo amino terminal se encuentra la región reguladora, con el dominio pseudosustrato (color rojo), los dominios C1 (color verde), C2 (color azul oscuro), el dominio HR1 (color amarillo) y el PB1 (color azul claro) que unen diferentes cofactores según el tipo de isoenzima. En el extremo carboxilo terminal, se encuentra la región catalítica del enzima con el dominio quinasa (color violeta) de unión al ATP y al sustrato (Rosse et al., 2010).

6. Los dominios C2 de Rabfilina-3A.

6.1. Introducción.

Los dominios C2 también se encuentran involucrados en el tráfico y fusión de membranas, siendo este tipo de procesos esenciales para múltiples funciones celulares entre las que se encuentra la comunicación neuronal (Jahn & Fasshauer, 2012). Las neuronas son capaces de relacionarse mediante la liberación de neurotransmisores a través de la sinapsis y para ello se requiere

un gran número de proteínas que regulen este mecanismo (Xie et al., 2017). Los componentes centrales de este proceso son el complejo SNARE (Receptor de Proteína de fijación soluble del factor sensible a n-etilmaleimida) que está formado por la sintaxina 1A, VAMP2 (sinaptobrevina) y SNAP25 (proteína 25 asociada al sinaptosoma) que forman un ramillete de cuatro hélices y se encargan de unir las vesículas a las membranas para que tenga lugar la fusión (Brunger et al., 2009; Sutton et al., 1998).

Existen más proteínas que participan y que a su vez comparten en sus estructuras el dominio C2 siendo este contexto celular otro ejemplo del mecanismo de doble diana. Los dominios regulan mediante la unión a Ca^{2+} , a fosfolípidos y la interacción con otras proteínas el complicado mecanismo que implica la liberación de vesículas (Südhof, 2012). Una de las proteínas implicadas y que posee dominios C2 en su estructura es rabfilina3A. Se encuentra relacionada en la regulación dependiente de Ca^{2+} de la exocitosis de vesículas secretoras en neuronas y células endocrinas, aunque su papel exacto es hoy tema de debate (Fukuda, Kanno, & Yamamoto, 2004; Xie et al., 2017).

Se ha demostrado que Rab3 y Rab27 tienen como diana a rabfilina3A en el contexto de las vesículas secretoras, concretamente interaccionan a través del dominio de unión a rab que también está presente en esta proteína (Shirataki et al., 1993). Además, en su extremo carboxilo-terminal posee un tándem de dos dominios C2 que son los responsables de unir Ca^{2+} , la especificidad de fosfolípidos de membrana y la capacidad de interaccionar con otras proteínas (Chung et al., 1998; Guillen et al., 2013). Se ha determinado que el dominio C2B interacciona con SNAP25 para regular el acoplamiento de las vesículas de núcleo denso en las células PC12 y en la regulación de la recaptación de las vesículas sinápticas en las neuronas del hipocampo embrional (Deák et al., 2006; Tsuboi, Kanno, & Fukuda, 2007).

6.2. Estructura de Rabfilina-3A.

La rabfilina-3A o exofilina 1 pertenece a una amplia familia de proteínas cuyos miembros son granulofilina/exofilina 2/Slp4, exofilina 6/Slp3 y exofilina 9/Slp5 aunque originalmente fue identificada como proteína Rab3a (Deak et al., 2006; Fukuda & Yamamoto, 2005). Son 690 aminoácidos en la versión humana confiriéndole una masa de 77 kDa. Su estructura posee en el extremo amino terminal un región o dominio de unión a proteínas Rab además de un motivo de unión de dedos zinc y en el extremo carboxilo terminal presenta un tándem de dominios C2 (Figura I.10) (Izumi, 2007).

Trabajos previos de nuestro grupo determinaron la estructura 3D del dominio C2A de rabfilina3A en complejo tanto con PIP₂ o con IP₃ y su regulación dependiente de Ca²⁺ (figura I.11). Este trabajo sugiere un mecanismo de unión a calcio para este dominio C2A que explica los cambios conformacionales observados entre las formas libre y unida a este ion.

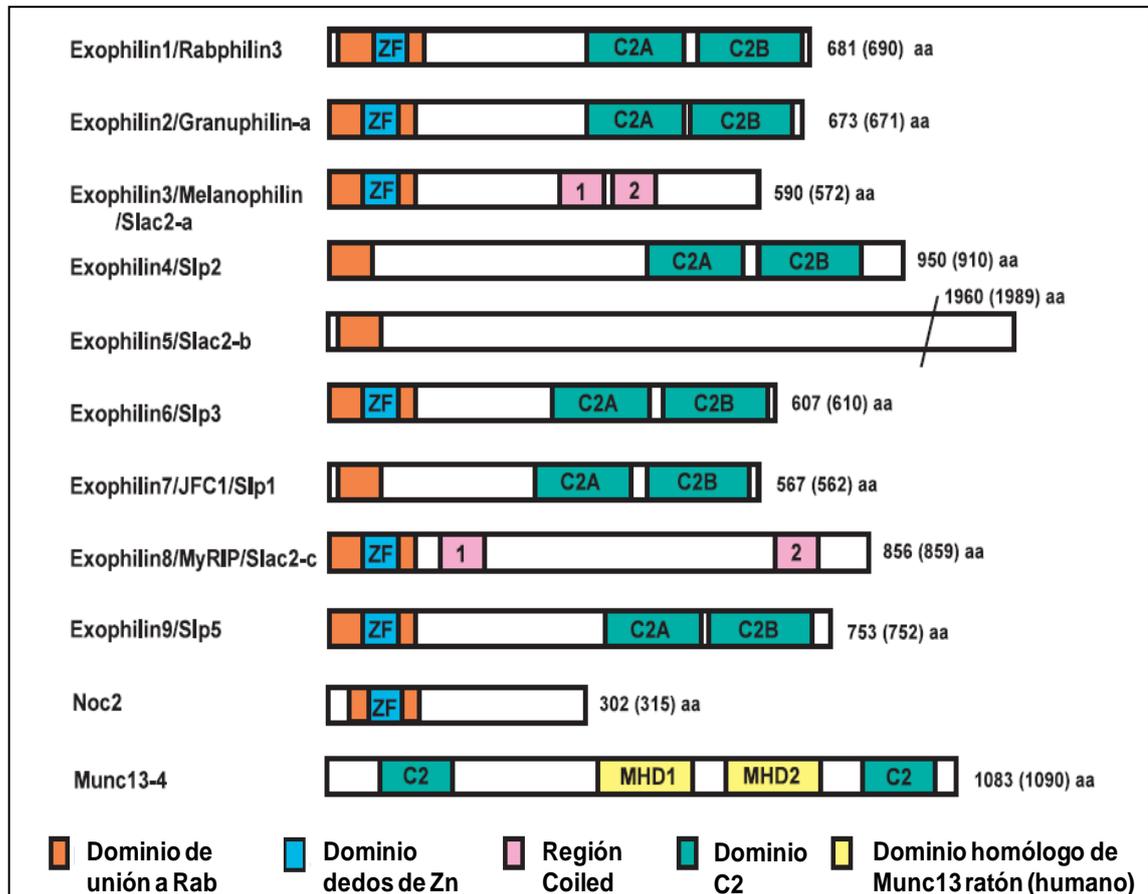


Figura I.10. Estructura de la familia de proteínas de efectores de Rab27. Se encuentra Rabfilina3A/exofilina1, granulofilina-a/exofilina2, melanofilina/exofilina3/Slac2-a, Slp2/exofilina4, Slac2-b/exofilina5, Slp3/exofilina6, Slp1/JFC1/exofilina7, Slac2-c/MyRIP/exofilina8, Slp5/exofilina9, Noc2 y Munc13-4. Los diferentes dominios que están presentes en las distintas proteínas son: Dominios de unión a Rab (naranja), Dominios de dedos de Zinc (azul), Región de tipo Coiled (rosa), Dominios C2 (turquesa) y Dominios homólogos al de Munc13 en ratón (amarillo) (Izumi, 2007).

Además, reveló el mecanismo específico molecular mediado por PIP₂ a través de la región básica rica en lisinas que demostró ser un mecanismo combinado dependiente de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. La posición precisa de los residuos de Lys en las cadenas β3-β4 del dominio C2 determina su capacidad para interactuar con algunos fosfoinosítidos específicamente, lo que sugiere que puede ser un paso clave para la localización y orientación de la proteína en las membranas desencadenando la fusión de las vesículas (Guillen et al., 2013).

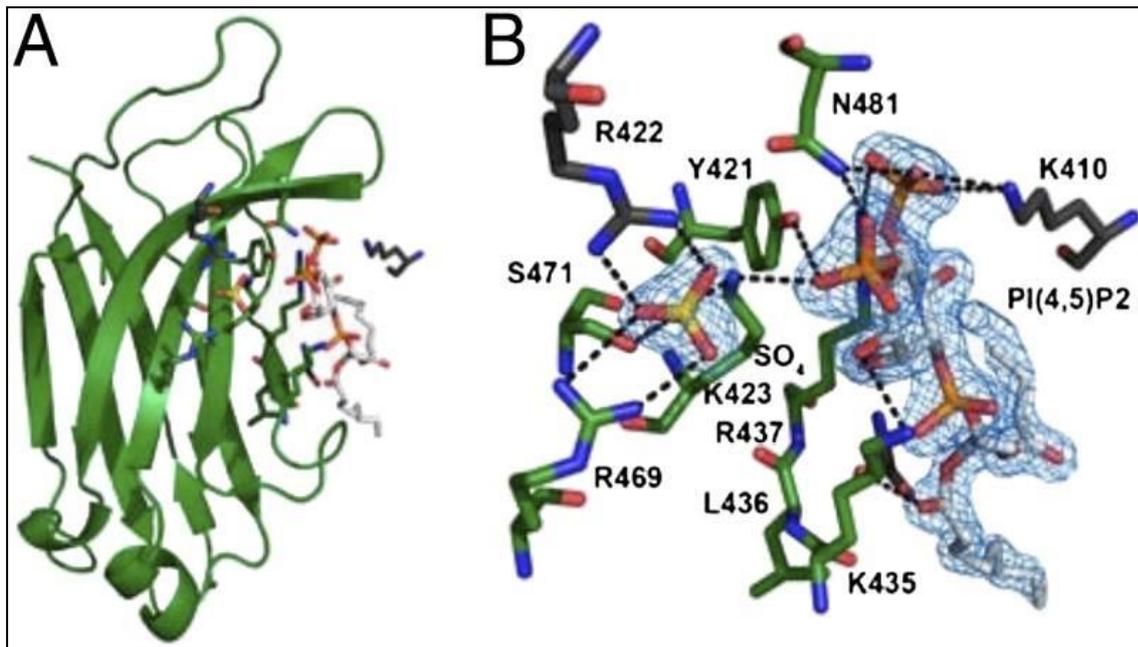


Figura I.11. Estructura del dominio C2A de rabfilina-3A unido a PIP₂. A) Estructura del complejo dominio C2A de rabfilina-3A interaccionando con PIP₂. La molécula de C2A se muestra en verde con las cadenas de aminoácidos del bolsillo formado por las cadenas β3-β4 en modelo de varillas que son las responsables de la unión al PIP₂. Los iones fosfato y la molécula de fosfolípido también son mostrados con modelo de varillas. B) Vista superior del bolsillo formado por las cadenas β3-β4 mostrando en detalle los residuos que intervienen en la interacción con el fosfolípido mostrados con modelo de varillas. Los puentes de hidrógeno se muestran con línea discontinua (Guillen et al., 2013).

7. Proteína Quinasa C y el cáncer.

7.1. Activación de las PKC.

El proceso de activación general de las PKC tiene lugar en varias etapas. Si partimos del estado inactivo del enzima, observamos en la figura I.12 que el dominio pseudo-sustrato está unido al centro activo del dominio catalítico impidiendo así que realice su función. Para que se produzca la activación, el dominio regulador C2 debe unir calcio en un primer paso que le permitirá ahora interactuar con la membrana a través de la fosfatidilserina (PS). Ahora es posible que tenga lugar la siguiente etapa que consiste en la unión del dominio C1A al DAG de la membrana, lo cual produce que salga el dominio pseudo-sustrato del centro activo del dominio catalítico quedando ya PKC en estado activo. Mediante las fosforilaciones de las proteínas diana regulan las rutas de apoptosis y la expresión de genes (Das, Ramani, & Suraju, 2016).

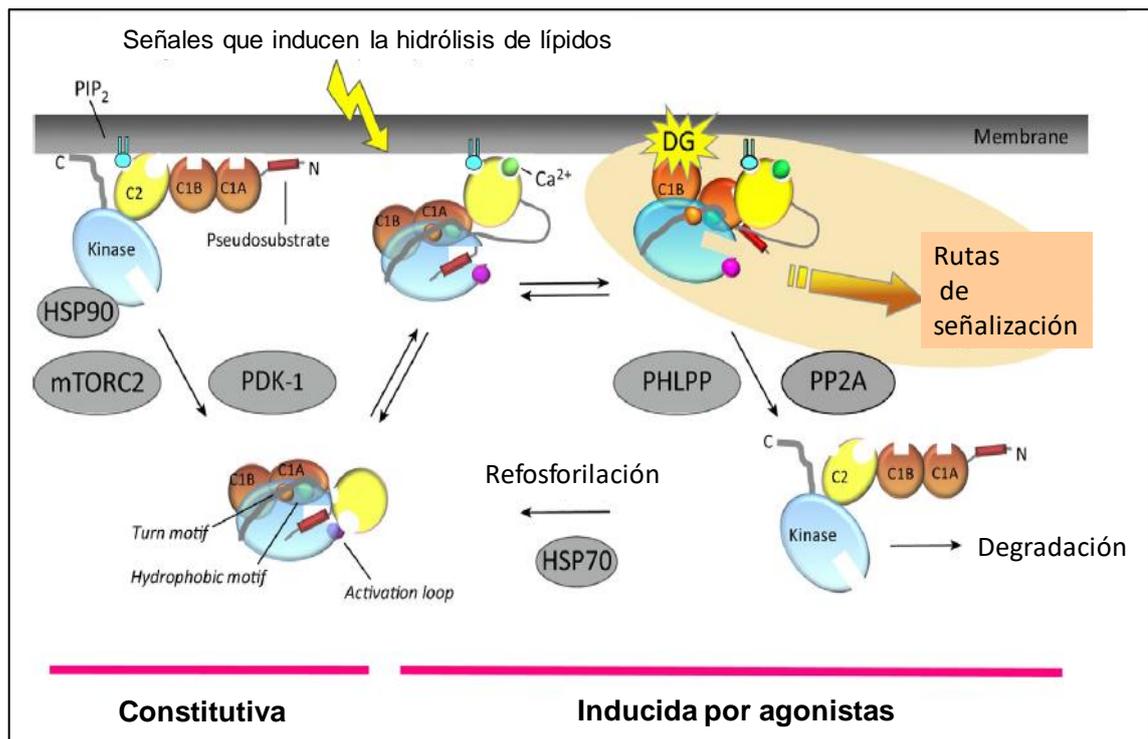


Figura I.12. Esquema del proceso de activación de las PKC. El dominio C2 une calcio citosólico en el estado inactivo de las PKC. Ahora el C2 se une a la membrana a través de la PS tirando de los dominios C1B y C1A separándolos del dominio catalítico. El dominio C1A une DAG tirando ahora del dominio pseudo-sustrato dejando libre el sitio activo y como consecuencia activando las PKC (Newton & Brognard, 2017).

En el caso de las PKC clásicas pueden responder a diferentes estímulos celulares a través de los dominios C1 y C2. Un incremento de calcio citosólico provoca la traslocación de la PKC α a la membrana plasmática como en el proceso general, pero ahora en este caso pueden ocurrir dos situaciones. Por un lado si los microdominios de la membrana están enriquecidos solo con PS, la interacción del dominio C2 es necesaria junto a la del dominio C1A al DAG para como hemos explicado en el proceso general obtener el estado activo del enzima (Figura I.13 A-C) (Corbalan-García & Gomez-Fernandez, 2014).

Por otro lado, si los microdominios de la membrana están enriquecidos con PS y PIP₂ los dominios C2 se unen con una orientación diferente al interactuar en dos zonas de la membrana. Esta situación indica que se produce un cambio conformacional en el dominio C1B que provoca el estado activo de la PKC α (Figura I.13 A y D) (Ausili et al., 2011; Sánchez-Bautista et al., 2009).

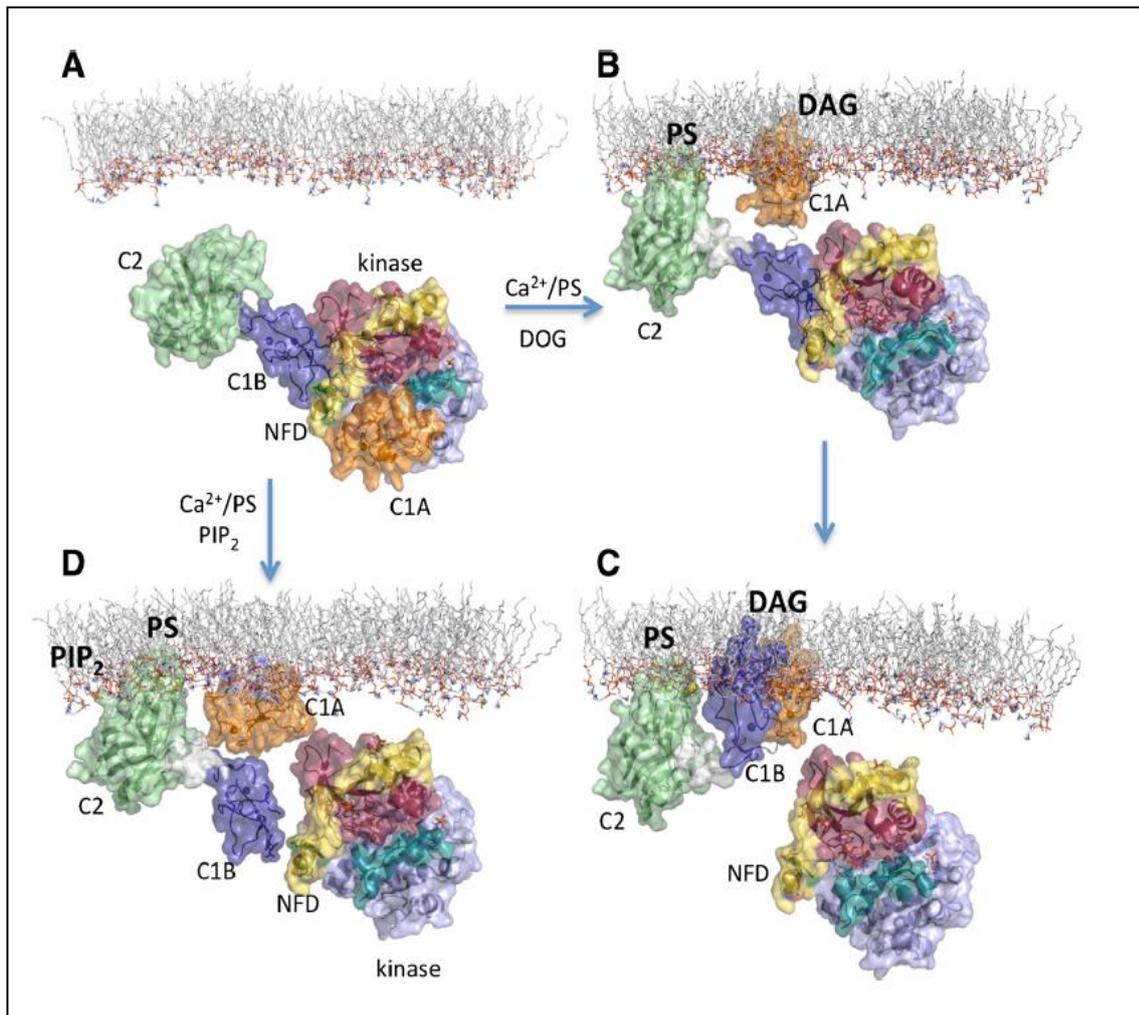


Figura I.13. Modelo molecular para la activación de las PKC clásicas. Existen dos situaciones dependiendo del tipo de enriquecimiento lipídico que presente la membrana plasmática. A) estado inactivo de la cPKC. B) si actúan como activadores Ca^{2+} , POPS y DAG, C) estado activo de la cPKC mediante el proceso general de activación D) cuando los activadores son Ca^{2+} , POPS, DAG y PIP_2 (Corbalan-García & Gómez-Fernández, 2014).

7.2. Proteína Quinasa C y cáncer.

Las isoformas de las PKC presentan distintos patrones de fosforilación de sustratos, activación de las rutas de señalización y la regulación de la expresión de genes provocando en el contexto del cáncer numerosas respuestas que van desde la proliferación, supervivencia, motilidad y se asocia su activación a fenotipos asociados con la progresión de los tumores y metástasis (Cooke et al., 2017).

Los sustratos que son fosforilados por las PKC se podrían usar como dianas terapéuticas, biomarcadores para monitorizar la progresión de algunas enfermedades o para seguir la evolución del tratamiento farmacológico aplicado

a las PKC como mediadoras. Esta familia de proteínas fosforila residuos Ser y Thr que están rodeados por residuos básicos. Además existe un solapamiento de sitios de fosforilación con las secuencias consenso de otras quinasas a nivel celular, lo cual supone un problema para la identificación de los sustratos relevantes a nivel fisiológico de las PKC (Nishikawa, Toker, Johannes, Songyang, & Cantley, 1997). Se han determinado usando librerías de péptidos orientados (Kiss & Steinberg, 1985; Nishikawa et al., 1997).

El laboratorio de Shokat ha desarrollado un método de búsqueda llamado “filtros de selectividad” para aumentar la especificidad del inhibidor. Este método está basado por un lado en un residuo hidrofóbico conservado y de gran tamaño llamado “gatekeeper” (Met, Leu, Phe o Thr) que se encuentra en el centro activo de las quinasas e interacciona con el grupo N₆ del ATP y, por otro lado, un residuo normalmente Cys que también está dentro del centro activo. Este residuo es sustituido por una Gly o una Ala permitiendo así a las quinasas mutantes y no a las de fenotipo salvaje que puedan aceptar gran cantidad de análogos del ATP en su centro activo (C. Zhang et al., 2005). Así, se han identificado una gran cantidad de productos fosforilados por las quinasas, como por ejemplo las tirosinas quinasas Src, JNK y ERK2 (Habelhah et al., 2001; Shah & Shokat, 2002; Eblen et al., 2003). Rotenberg y sus colaboradores realizaron otra búsqueda para identificar los sustratos de las PKC en células de mamífero mediante co-inmunoprecipitaciones de PKC α , PKC δ y PKC ζ . Uno de los sustratos encontrados de la isoenzima PKC α fue α 6-tubulina (Abeyweera, Chen, & Rotenberg, 2009; Chen et al, 2012).

Mediante el uso de dianas rastreables de quinasas, inmunoprecipitaciones o marcaje de isotopos estables con aminoácidos en cultivos celulares (SILAC) se realizó una caracterización de la localización de las isoformas de las PKC tras su activación en los distintos compartimentos intracelulares y la caracterización de sus fosfoproteomas. Por ejemplo, en el caso de la PKC δ se determinó su papel en la muerte celular o la ruta de fosforilaciones a partir de esta isoforma. Un análisis funcional exhaustivo tras esta caracterización permitirá revelar las rutas de cada isoforma y las posibilidades que presentan como efectores o biomarcadores teniendo en cuenta siempre el contexto celular/tisular en el que se han hallado los resultados (Cooke et al., 2017).

Los efectos de la activación de las PKC pueden ser redundantes e incluso opuestos dependiendo del tipo de isoenzima y del contexto celular/tisular. Mientras que los estudios iniciales demostraban que la activación de las PKC a través de los ésteres de forbol tenía un efecto mitogénico, hoy día se ha demostrado que pueden incluso inhibir la proliferación o provocar una respuesta apoptótica dependiendo del tipo celular (Griner & Kazanietz, 2007). Se ha demostrado por ejemplo la función anti-proliferativa de la isoforma PKC δ mediante la inhibición del ciclo celular, provocando un aumento de células en

fase G2/M. PKC δ inhibe la división celular como respuesta a la estimulación celular con acetato de forbol miristilado (PMA o TPA) y además se encuentra relacionada en la activación del inhibidor p21 que para el ciclo celular en fase G1 (Nakagawa et al., 2005; Watanabe et al., 1992).

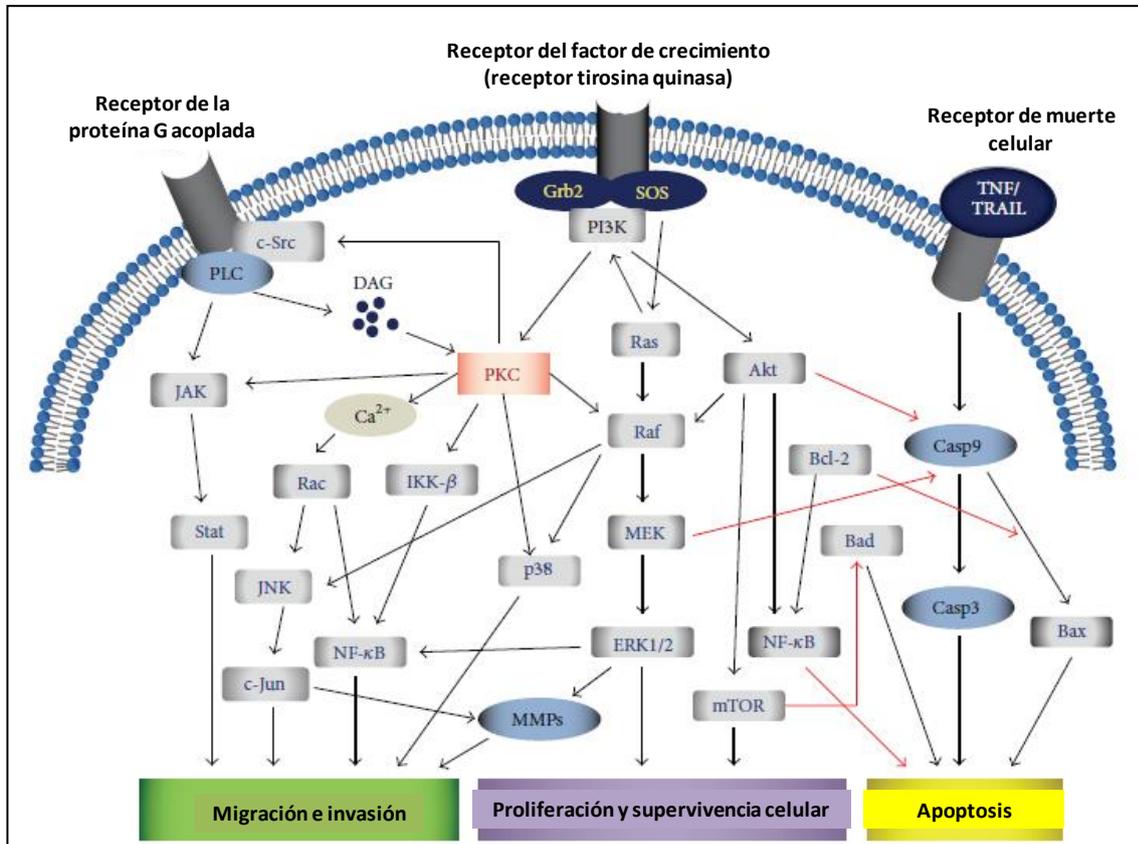


Figura I.14. Rutas de señalización y transducción de las PKC y su regulación durante el cáncer. Las isoenzimas intervienen de forma directa o indirecta en funciones biológicas como la migración, invasión, supervivencia, proliferación y apoptosis. Las flechas negras indican activación de la cascada y las flechas rojas indican inhibición de esa ruta (Kang, 2014).

Hay dos rutas que resultan activadas a través de las PKC: MEK/ERK y PI3K/Akt (Figura I.14). Esta última ruta se ha relacionado con la inhibición del proceso de apoptosis mediante la fosforilación de las proteínas diana que poseen función pro-apoptótica. Además, activan factores de transcripción como NF- κ B, y esto induce la expresión de genes implicados en la supervivencia. Por tanto, una desregulación en la actividad o expresión de las PKC puede desencadenar en un aumento en los procesos de supervivencia y proliferación celular contribuyendo así a los procesos de transformación celular. Otros procesos muy importantes en patologías como el cáncer es el caso de la motilidad celular y la capacidad de invasión de las células. Se ha determinado que la isoforma PKC α incrementa la tumorigenicidad y metástasis, la PKC β II con un aumento de la capacidad invasiva probablemente a través de Ras y MEK. PKC ϵ en cambio, disminuye la capacidad de invasión, es capaz de reducir el crecimiento del tumor

y el desarrollo de metástasis y si por el contrario se encuentra sobre-expresada presenta el efecto contrario. En el caso de PKC δ , cuando se encuentra inhibida se ha asociado a mayores niveles de capacidad invasiva mediante la secreción de proteasas y ocurre lo contrario cuando se presenta sobre-expresada, siendo así el caso contrario de la PKC ϵ (Urtreger, Kazanietz, & Bal de Kier Joffé, 2012).

7.2.1. PKC en el cáncer de mama.

La localización y expresión de las PKC está regulada en los procesos de diferenciación de las glándulas mamarias y está descrita la presencia de una sobreexpresión de algunas PKC en el cáncer de mama, así como en las líneas celulares de cáncer de mama. Los procesos asociados en este tipo de patologías como son las señales apoptóticas y las señales mitogénicas se encuentran a su vez regulados por las PKC (Urtreger, Kazanietz, & Bal de Kier Joffé, 2012). Se ha determinado la existencia de una desregulación en los niveles de expresión de las PKC en este tipo de patologías por ello se ha convertido en diana terapéutica, especialmente en el caso de la isoforma clásica PKC α que se encuentra sobre-expresada en este tipo de tumores (Lahn et al., 2004; Tan et al., 2006).

Ha sido ampliamente documentado el papel de la PKC α en el crecimiento de los tumores y su implicación en la progresión de los mismos a pesar de poseer un papel dual en el cáncer, siendo promotor y a veces supresor tumoral (Griner & Kazanietz, 2007; Kang, 2014; Newton & Brognard, 2017b). Particularmente en el cáncer de mama se ha establecido que la sobre-expresión de PKC α confiere un fenotipo más agresivo y resistencia a la quimioterapia en aquellas líneas celulares ER positivas y además presentan elevados niveles de PKC α . Por ejemplo, si comparamos las líneas celulares con distintos grados de expresión de PKC α podemos ver que en líneas donde la expresión presenta niveles muy bajos como es el caso de la línea T47-D la capacidad proliferativa es también deficiente. Sin embargo, las líneas que tienen altos niveles de expresión como son por ejemplo MCF-7 y MDA-MB-231 poseen a su vez una capacidad proliferativa elevada, capacidad para migrar e incluso invasiva en el segundo caso. También se ha encontrado a la PKC α en el proceso de la transición epitelio mesénquima y que además confiere a las células una alta capacidad invasiva y de movilidad en las células de cáncer de mama (Tam et al., 2013; Urtreger, Kazanietz, & Bal De Kier Joffé, 2012; Hsu et al., 2014).

8. Rabfilina3A y la fusión de membranas.

Se ha demostrado en la literatura que los niveles de rabfilina-3A se ven afectados si se inhiben los niveles de expresión de Rab3 en un 70% en neuronas (C. Li et al., 1994). Los análisis fenotípicos de los ratones knockout para rabfilina-3A no han demostrado que sea necesaria para la función de la subfamilia Rab3 (Schlüter et al., 1999). Rabfilina-3A interacciona con Rab3 en su forma activa que presenta GTP a través de los residuos SGAWFF del dominio de dedos de zinc permitiendo así su unión a las vesículas sinápticas y se disocia de ellas al hidrolizar el GTP (Ostermeier & Brunger, 1999). Trabajos posteriores en *C. elegans* demostraron que la pérdida de la función de rabfilina-3A explicaba un defecto en la transmisión sináptica en los mutantes de Rab27 pero no en los mutantes de Rab3 (Mahoney et al., 2006).

Las células PC12 han sido usadas ampliamente como modelo para el estudio de proteínas relacionadas con la fusión de membranas. Se ha determinado en la literatura que rabfilina-3A puede interaccionar con Rab3a, Rab27a e incluso con Rab8a (Fukuda et al., 2004). Además se ha determinado que rabfilina-3A y Noc2 interaccionan con Rab27A/B en células PC12 (M. Fukuda, Kanno, & Yamamoto, 2004). Ensayos de sobre-expresión de rabfilina-3A en estas mismas células la han relacionado con un aumento en la actividad secretora de las células (Tsuboi & Fukuda, 2005). También se ha determinado que el dominio C2 muestra afinidad por los fosfolípidos de membrana como PS y PIP₂ dependiente de calcio y el dominio C2B interacciona con SNAP25. Se ha demostrado que rabfilina-3A también interviene en la regulación de la unión de las vesículas de núcleo denso y/o el *re-priming* de las vesículas sinápticas después de que se haya agotado el conjunto de vesículas listo para ser liberado (Tsuboi & Fukuda, 2005; Deak et al., 2006).

Rabfilina-3A también es capaz de interaccionar con α -actinina a través del extremo amino terminal, es decir, la misma región con la que se une a Rab3a y se ha descrito tanto *in vitro* como en células PC12. En los ensayos *in vitro* se ha demostrado que rabfilina-3A activa la asociación de α -actinina con F-actina para formar su estructura en paquetes. Estos datos sugieren que la asociación de rabfilina-3A con α -actinina puede facilitar la unión de tipo granular a las redes de F-actina creadas por α -actinina (Kato et al., 1996; Baldini et al., 2005).

Además, también se ha descrito que, a través de la misma región anterior, rabfilina-3A interacciona con rabaptina-5, que es una proteína efectora de Rab5 que interviene en la regulación de la endocitosis. Esta interacción se inhibe en presencia de Rab3a, pudiendo rabfilina-3A jugar otro papel en la regulación del proceso endocítico y posteriormente participar en la exocitosis mediante su interacción con Rab3. Aún no existe consenso sobre el mecanismo en el que

rabfilina-3A interviene en la regulación de la exocitosis (Ohya et al, 1998; Coppola et al., 2001; Izumi, 2007). Estudios actuales han mostrado que rabfilina-3A también interacciona con el receptor del dominio N-metil-D-aspartato (NMDA) a través de su dominio N-terminal, implicándola así en las neuronas postsinápticas (Stanic et al., 2015).

A nivel patológico, la pérdida de rabfilina-3A se ha asociado a enfermedades como Alzheimer debido a la disfunción del complejo SNARE en las neuronas que resultan afectadas con un incremento de la proteína β -amiloide y a otras patologías como la enfermedad de Huntington, donde se ha descrito una disminución en los niveles de rabfilina-3A y SNAP25 en el córtex de estos pacientes con la consecuente influencia en la regulación de la liberación de los neurotransmisores (Smith et al., 2007; Tan et al., 2014).

Los síntomas de la enfermedad de Parkinson o de Alzheimer son muy similares a los de la demencia causada por los cuerpos de Lewy (LB), y esto dificulta su correcto diagnóstico (Galasko, 2017; Harding & Halliday, 2001). Se ha determinado que en el cerebro sano se produce la interacción de rabfilina-3A con Rab3a y en cambio, en los cerebros con demencia por LB hay un descenso de esta interacción y se produce un incremento de la unión Rab3a con α -sinucleína en los agregados presentes en este tipo de demencia (Galasko, 2017; Leenders et al., 2001). Debido a que estas tres proteínas intervienen en la liberación de neurotransmisores, el desbalance generado sugiere la afección del proceso en esta enfermedad (Dalfó et al, 2004).

9. OBJETIVOS.

Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio han determinado la importancia de unas proteínas periféricas de membrana como son los dominios C2 y su importancia en determinados procesos como el cáncer de mama a través de la isoforma PKC α . Se demostró la importancia de la región de unión de Ca²⁺ para la correcta localización y activación de la PKC α (Conesa-Zamora et al., 2001). Se ha determinado también en los dominios C2 la región polibásica que interviene en la activación y localización de la PKC α mediante la interacción con PIP₂ (Conesa-Zamora et al., 2001; Guerrero-Valero et al., 2009; Marín-Vicente et al., 2008).

Además, se ha determinado el papel de estos dominios periféricos de membrana en otras proteínas relacionadas con patologías neurodegenerativas como es el caso de rabphilina3A y sinaptotagima1. Estos hallazgos sugieren un mecanismo de unión a calcio del dominio C2A de rabfilina3A que explica los cambios conformacionales observados entre las formas libre y unida a Ca²⁺. Además se reveló el mecanismo específico molecular a través de PIP₂ mediante la región básica rica en lisinas del dominio que demostró no ser únicamente un mecanismo dependiente de interacciones electrostáticas (Guillen et al., 2013).

En base a estos conocimientos y a la reciente determinación de la estructura tridimensional del dominio C2B de rabfilina en complejo con SNAP25 y con PIP₂, que indica un conjunto de residuos clave que están interaccionando. Parte del trabajo de esta tesis doctoral ha consistido en la validación de la función de los residuos aminoacídicos en un sistema biológico como las células PC12.

Para resolver todas estas cuestiones se propusieron los siguientes objetivos:

- Caracterización del tratamiento basado en la inhibición de la expresión de PKC α en combinación con hiperforina para el cáncer de mama.
- Caracterización del tratamiento basado en la inhibición de la expresión de PKC α en combinación con salinomicina para el cáncer de mama.
- Validación del análisis del perfil diferencial de transcritos de células de cáncer de mama con inhibición de la expresión de PKC α .
- Diseño y estudio del efecto de una terapia combinada basada en la disminución de la expresión de PKC α combinada con fármacos inhibidores de las proteínas sobre-expresadas como consecuencia.

- Determinación de rutas de señalización directamente fosforiladas por PKC α en la línea de cáncer de mama MCF-7.
- Caracterización de la interacción de Rabfilina3A con SNAP25 en células PC12.

CAPÍTULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención de las construcciones plasmídicas.

Los distintos ADN de Rabfilina-3A y SNAP25 se amplificaron por PCR mediante el diseño de oligonucleótidos específicos y una polimerasa de ADN de alta fidelidad. Los vectores se linealizaron mediante la digestión con enzimas de restricción y se cuantificó la concentración de ADN del inserto y del vector mediante un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDropTech, Wilmington, DE, USA). Posteriormente, se ensamblaron mediante la reacción de Gibson (E2611S de NEB.Inc) y posteriormente se realizó la búsqueda de clones positivos mediante transformación de bacterias de la cepa DH10B de *E. coli*, para proceder a la amplificación, purificación y secuenciación de clones individuales.

1.1. Clonación de la Rabfilina-3A.

El cADN de la Rabfilina-3A y del SNAP25 fueron adquiridos en OriGene Technologies, Inc (Rockville, MD, USA). En el caso de la Rabfilina-3A se clonó en el plásmido pCGN (figura II.1) unida al extremo carboxilo terminal de un epítipo de hemaglutinina (HA-tagged). Esta HA-Rabfilina-3A se incorporó al vector de expresión de mamíferos pCGN. Este vector contiene tanto el promotor de citomegalovirus (CMV) como un sitio de policlonación que permite la expresión de genes fusionados en su extremo 3' al epítipo de hemaglutinina (HA). Este epítipo de hemaglutinina fue utilizado en los ensayos de ligación por proximidad (PLA), ya que permite usar el anticuerpo anti-HA de muy alta afinidad por dicha secuencia.

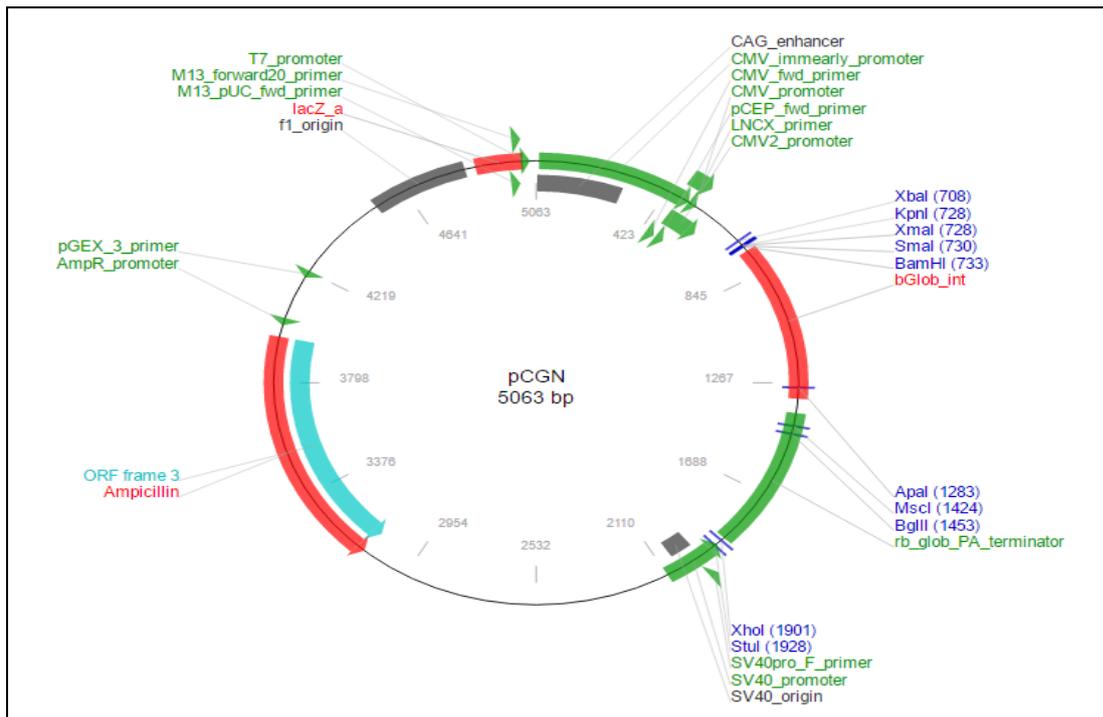


Figura II.1. Mapa del vector de clonación pCGN usado para Rabfilina-3A. Imagen tomada de <https://www.addgene.org>

Para la obtención de los mutantes de la Rabfilina-3A empleados, se utilizó la Rabfilina-3A silvestre incluida en el vector pCGN como molde (HA-Rabfilina3A-WT-pCGN) y mediante un protocolo de mutagénesis dirigida (Quickchange XL site directed mutagenesis, Agilent, Santa Clara, CA, Estados Unidos) se sustituyeron puntualmente los residuos deseados. Para obtener las construcciones de Rabfilina-3A tanto el silvestre como los mutantes se utilizaron en las PCRs los siguientes oligonucleótidos:

Forward:

5'GACTATGCCAGCCTGGGAGGACCTTCTAGAATGACTGACACCGTG

Reverse:

**5'CCACGTGTCAAGTGATTGAGGATCCTGAGAACTTCAGGGTGAGTTT
GGG**

Los productos de PCR se ligaron con el vector pCGN usando la reacción de Gibson (E2611S de NEB.Inc), el vector y el inserto se trataron con las enzimas de restricción XbaI/BamHI-HF y los constructos obtenidos finalmente son los indicados en la tabla II.1.

Tabla II.1. Construcciones empleadas de Rabfilina-3A.

MUTANTE	MUTACIONES
HA-Rph3A-WT	--
HA-Rph3A-M1	K651A/K656A
HA-Rph3A-M2	K651A/K656A/H663A
HA-Rph3A-M3	K651A/K656A/K663A/H617A

1.2. Clonación del SNAP25.

En el caso de SNAP25 se utilizó el plásmido pCMV6-Entry (figura II.2) unida al extremo carboxilo terminal con un epítipo de myc (myc-tagged) de OriGene Technologies, Inc (Rockville, MD, USA). El plásmido contiene un nuevo sistema denominado Entry-PrecisionShuttle para permitir una fácil subclonación de un ORF de un vector a otro, gracias a tener flanqueado el ORF por dos endonucleasas con una secuencia de corte muy poco frecuente como son Sgf I (extremo 5') y Mlu I (extremo 3').

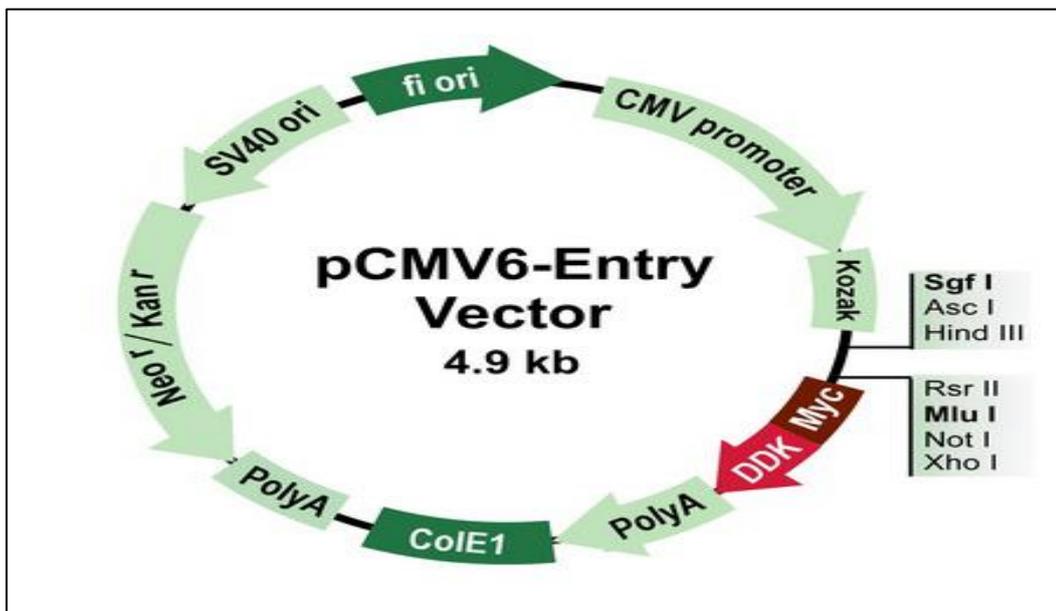


Figura II.2. Mapa del vector de clonación pCMV6-Entry para SNAP25. Imagen tomada de <http://www.origene.com>

Para la obtención de los mutantes de SNAP25 utilizados, se utilizó el SNAP25 silvestre incluido en el vector pCMV6-Entry como molde (myc-SNAP25-

WT-pCMV6-Entry) y mediante un protocolo de mutagénesis dirigida (Quickchange XL site directed mutagenesis, Agilent, Santa Clara, CA, Estados Unidos) se sustituyeron puntualmente los residuos deseados mostrados en la tabla II.2.

Para la obtención de las construcciones de SNAP25 tanto el silvestre como los dos mutantes se utilizaron en las PCRs los siguientes oligonucleótidos:

Forward:

5' CCGCGATCGCATGGCCGAAGACGCAGACATGCGC

Reverse:

5' CTGCTCGAGACCACTTCCCAGCATCTTTGTTGC

Tabla II.2. Construcciones empleadas de SNAP25.

MUTANTE	MUTACIONES
Myc-SNAP25-WT	--
myc-SNAP25-M1	E38A/D41A/R45A
myc-SNAP25-M2	D51A/E55A/R59A

2. Cultivos celulares.

2.1. Células PC12.

Las células PC12 (figura II.3) proceden de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC, 88022401) y se encuentran en el Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia (SAI). Estas células derivan de un feocromocitoma de la médula suprarrenal murino pudiendo desarrollar características fenotípicas neuronales al ser tratadas con el Factor de Crecimiento Neuronal (NGF). Es una línea celular ampliamente utilizada como modelo del sistema neuronal debido a su relación con las células cromafines adrenales y con las neuronas del sistema simpático.

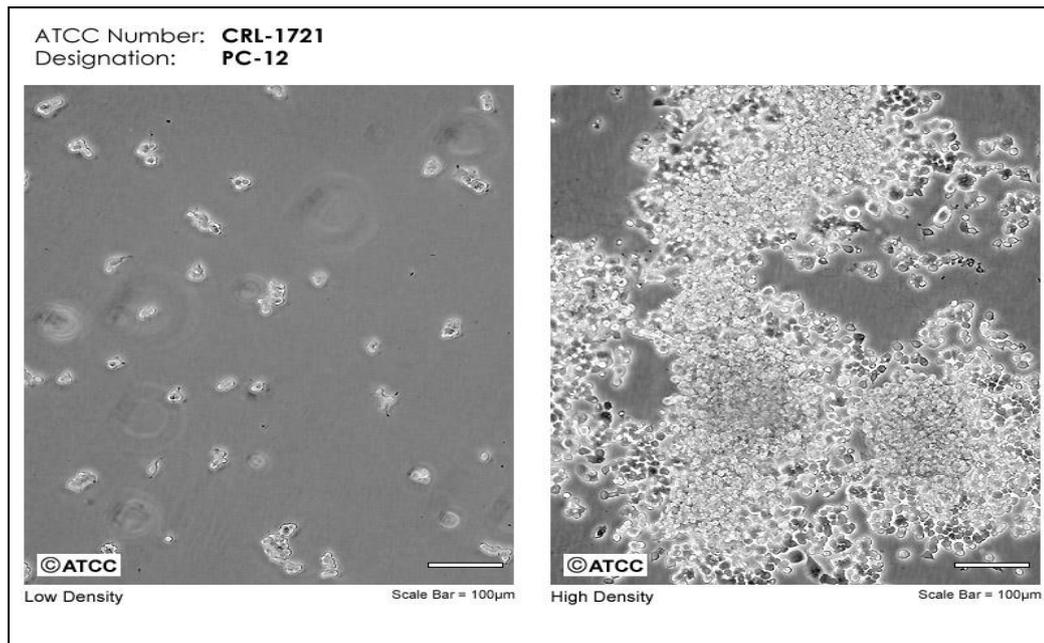


Figura II.3. Células PC12. La micrografía de la izquierda muestra las células después de un subcultivo (baja densidad) y en la micrografía de la derecha podemos observar un cultivo de alta densidad celular (Imagen tomada de <https://www.lgcstandards-atcc.org>).

2.1.1. Medio de crecimiento para la línea PC12 y subcultivo.

El medio de cultivo para las células PC12 es Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) sin rojo fenol y con 4500 mg/L de glucosa. Está suplementado con un 10% (v/v) de suero de caballo (HS), suero bovino fetal al 5% (FCS), antibióticos (penicilina 50 unidades/ml y estreptomycin 50 µg/ml), piruvato sódico 110 mg/ml (p/v) y glutamina 2 mM. Se mantienen en incubadores de atmósfera de 37°C y 7.5% de CO₂.

Cuando las células alcanzan la confluencia, es decir, con una concentración aproximadamente de 2×10^6 células/ml se diluyen con una proporción de 1:4 a 1:6 tras un proceso mecánico de separación con el raspador y son sembradas en un nuevo frasco de cultivo ventilado y colocadas en el incubador.

2.1.2. Transfección de las células PC12.

El método empleado para transfectar las células PC12 fue lipofectamina 2000 (Invitrogen, Oregon, USA). Este método se basa en la formación de complejos entre lípidos catiónicos y ADN. El complejo resultante posee afinidad por la membrana y permite la entrada del ADN en el citosol (Ohki et al, 2001).

Las células se sembraron en distintos formatos previamente a su transfección, siendo desde una placa de 3.5 cm de diámetro a una placa de 15 pocillos (μ -Slide ibidi) con un tamaño de 0.4 cm de diámetro.

Para la formación de los complejos de liposomas catiónicos y el ADN se diluyó previamente por separado tanto el ADN como la solución comercial de lipofectamina 2000 en DMEM sin antibiótico ni suero con una dilución aproximada de 1:10 (pocillo placa de 15: 0.2-0.5 μ l de lipofectamina 2000 y 200-500ng de ADN y en las placas de 3.5 cm de diámetro: 2-3 μ l de lipofectamina 2000 y 2-3 μ g de ADN) y se incubó durante 5 minutos a 25°C. Una vez que ambos componentes estaban diluidos se mezclaron en una proporción de 1:1. Se incubó la mezcla a 25°C durante 5-15 minutos. Se dejó incubar en el medio de crecimiento con las células durante 48 horas a 37°C y 7.5 % CO₂ que permitió la expresión de las proteínas transfectadas.

2.2. Células MCF-7.

Las células MCF-7 (figura II.4) son una línea celular procedente de una muestra aislada del tejido epitelial de la glándula mamaria de una mujer caucásica de 69 años en 1970. La paciente presentaba un adenocarcinoma de mama metastásico de efusión pleural. MCF-7 es el acrónimo de “Michigan Cancer Foundation-7”, refiriéndose al instituto de Detroit donde la línea fue establecida en 1973 por Herbert Soule y colaboradores (Soule et al, 1973). Las células MCF-7 se utilizaron como modelo no invasivo en los estudios de cáncer de mama. La línea se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC, HTB-22). Estas células contienen características del epitelio mamario diferenciado como es la habilidad de procesar el estradiol vía receptores de estrógeno citoplasmático (ER+) y poseer la capacidad de crecer agrupadas. Particularmente esta línea celular presenta una alta cantidad de este receptor haciéndolas muy útiles para el estudio de los mecanismos relacionados con estas hormonas.

Las células MCF7 poseen altos niveles de p70S6K y podrían ser marcadores para mTOR y el PDK-1. Otras características importantes de esta línea son que su crecimiento puede ser inhibido mediante el tratamiento con el Factor de Necrosis Tumoral α (TNF α) y que pueden secretar las Proteínas de Unión a los Factores de Crecimiento similares a la Insulina (IGFBPs) (Sugarman et al., 1985; Takahashi & Suzuki, 1993).

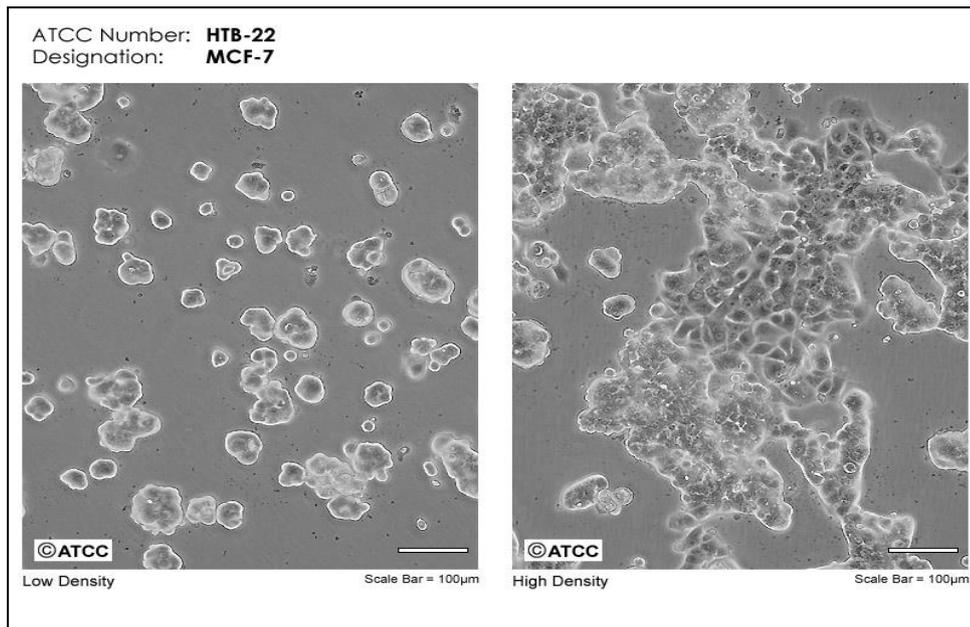


Figure II.4. Células MCF-7. La micrografía de la izquierda muestra las células después de un subcultivo (baja densidad) y en la micrografía de la derecha podemos observar un cultivo de alta densidad celular (Imagen tomada de <https://www.lgcstandards-atcc.org>).

2.2.1. Medio de crecimiento para la línea MCF-7 y subcultivo.

El medio de cultivo para las células MCF-7 fue DMEM sin rojo fenol y con 4500 mg/L de glucosa. Se suplementó con un 10% (v/v) de suero bovino fetal (FCS), antibióticos (penicilina 50 unidades/ml y estreptomycin 50 µg/ml), piruvato de sodio 110 mg/ml y glutamina 2 mM. Se mantuvieron en incubadores de atmósfera de 37°C y 7.5% de CO₂.

El medio fue reemplazado cada dos días. Las células se diluyeron al alcanzar 80-85% de confluencia a los 5 días aproximadamente. Para despegarlas de la superficie del frasco de cultivo se utilizó un procedimiento enzimático con tripsina/EDTA (0.25% tripsina/0.53 mM), se incubaron durante 2 minutos a 37°C. Tras la tripsinización las células se recogieron, se añadió 8 ml de medio de cultivo y se centrifugó a 200g durante 5 minutos para eliminar el sobrenadante y añadir medio de crecimiento fresco. Se diluyeron siguiendo una proporción que oscila de 1:2 a 1:3 y se volvieron a sembrar en los frascos de cultivo.

2.3. Células MDA-MB-231.

Las células MDA-MB-231 (figura II.5) es una línea celular aislada por Cailleau y sus colaboradores en 1973 de una efusión pleural de una paciente con cáncer de mama en el “Anderson Hospital de Houston” (Cailleau et al, 1974). Las células son mantenidas en el Servicio de Apoyo a la Investigación de la

Universidad de Murcia (SAI), previamente adquiridas de la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC, HTB-26). Esta línea celular es ampliamente utilizada como modelo de estudio por su alta capacidad metastásica en cáncer de mama. Sus principales características epiteliales son el crecimiento en monocapa y su morfología. Poseen una alta capacidad invasiva y expresan el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) y el receptor del factor de crecimiento transformante alfa (TGF α R) (BATES et al., 1990).

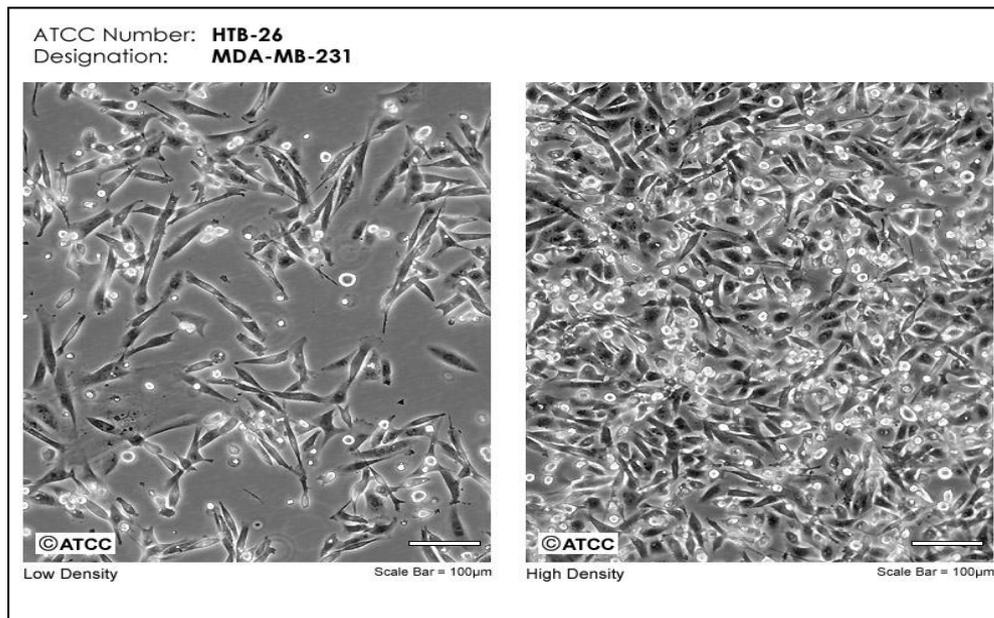


Figure II.5. Células MDA-MB-231. La micrografía de la izquierda muestra las células después de un subcultivo (baja densidad) y en la micrografía de la derecha podemos observar un cultivo de alta densidad celular (Imagen tomada de <https://www.lgcstandards-atcc.org>).

2.3.1. Medio de crecimiento para la línea MDA-MB-231 y subcultivo.

El medio de cultivo y el tratamiento para las células MDA-MB-231 es muy parecido al de la línea MCF-7 aunque con algunas diferencias. Los componentes principales son DMEM sin rojo fenol y con 4500 mg/L de glucosa. Está suplementado con un 10% (v/v) de suero bovino fetal (FCS), antibióticos (penicilina 50 unidades/ml y estreptomycin 50 μ g/ml), piruvato de sodio 110 mg/ml, glutamina 2 mM y con aminoácidos no esenciales. Se mantienen en incubadores de atmósfera de 37°C y 7.5% de CO₂.

El medio no fue reemplazado directamente cada dos días porque hay células en suspensión. Tras 2-3 días el medio se recogió y se centrifugó para recuperar las células en suspensión con medio fresco de crecimiento. Las células se diluyeron al alcanzar 80-85% de confluencia a los 5 días aproximadamente. Para despegarlas de la superficie del frasco de cultivo se utilizó un procedimiento

enzimático que contiene tripsina/EDTA (0.25% tripsina/0.53 mM), se incubaron durante 2 minutos a 37°C. Tras la tripsinización, las células se recogieron, se añadieron 8 ml de medio de cultivo y se centrifugó a 200g durante 5 minutos para eliminar el sobrenadante y añadir medio de crecimiento fresco. Se diluyeron siguiendo una proporción que oscila de 1:4 a 1:6 y se volvió a sembrar en los frascos de cultivo.

3. Preparación del ensayo de ligación por proximidad en las células PC12.

Las células fueron fijadas con 4% para-formaldehído en PBS durante 10 minutos. Tras lavar después del proceso de fijación se procedió a la permeabilización con 0.1% Triton-X100 en PBS durante 10 minutos a 25°C y posteriormente las células fueron bloqueadas con 1% albumina de suero bovina (BSA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluido en 1% BSA y 0.15% saponina durante 1 h a 37°C (Anticuerpo HA-probe (F-7) sc-7392 (ratón) 1:200 y el anticuerpo Anti-Myc tag ab9106 (conejo) 1:200).

Después de la incubación con el anticuerpo primario se siguió el protocolo de las instrucciones del kit Duolink® In Situ (Sigma-aldrich DUO92101). Tras la incubación con el anticuerpo primario se lavó con PBS tres veces. Después se realizó un nuevo bloqueo con 1% BSA/PBS durante 20 minutos a 25°C. Para la incubación con los anticuerpos secundarios llamados en este kit PLA PROBES, se diluyó 1:4 (AbMINUS y AbPLUS) en el mismo tampón usado para los anticuerpos primarios. La incubación se realizó en la cámara de humedad durante 1 hora a 37°C (figura II.6.A).

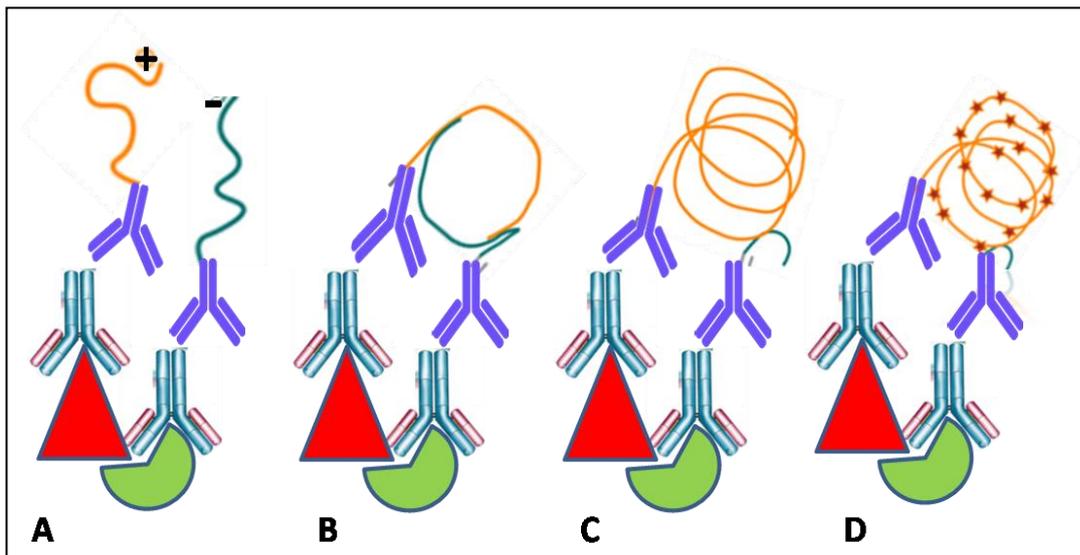


Figura II.6. Esquema del ensayo de ligación por proximidad (PLA). A. Unión de los anticuerpos secundarios PLA PROBES (anticuerpos violetas) a los primarios que están unidos a las proteínas a estudiar. B. Proceso de Ligación que ocurre cuando los anticuerpos se hallan a una distancia menor de 40 nm. C y D. Proceso de amplificación con la polimerasa en círculo rodante con los oligonucleótidos conjugados con las sondas fluorescentes que permitirán su visualización.

Se realizaron dos lavados con el tampón de lavado tipo A durante 5 minutos cada uno. Tras ello se procedió al proceso de ligación para el que se diluyó el tampón 1:4 y se añadió ligasa 1U/ μ l y se incubó a 37°C durante 1 hora (figura II.6.B). Se repitió el lavado con tampón de tipo A dos veces durante 2 minutos. Por último, se realizó el proceso de amplificación (figura II.6.C y D). Se diluyó el tampón 1:4 y se añadió la polimerasa de círculo rodante diluida 1:80, se incubó 30 minutos a 37°C.

Se lavaron dos veces con tampón B durante 10 minutos cada vez. Tras este proceso, si vamos a realizar un marcaje de otras proteínas para ayudar a su visualización o análisis de las muestras (counterstaining) volvíamos a lavar esta vez con tampón de lavado A y se realizó el protocolo detallado para la inmunofluorescencia. Los anticuerpos primarios usados han sido HA-tag sc7392 (1:200) y myc-tag ab9106 (1:200). Los anticuerpos secundarios utilizados eran cabra anti-ratón IgG (Alexa Fluor® 488) preadsorbed ab150117 y policlonal de cabra anti-conejo IgG (Alexa Fluor® 647), pre-adsorbed ab150083, abcam). Por último, se procedió al montaje de las muestras con la solución comercial Duolink mounting solution (Sigma-Aldrich Co. LLC, Madrid, España).

4. Inhibición de la expresión de la PKC α por técnicas de ARN interferente.

En los Capítulos III, IV y V de esta Tesis Doctoral se han utilizado dúplex de ARN interferente para realizar la inhibición de la expresión de la PKC α . Para

ello se han usado secuencias prediseñadas de stealth siRNA (Invitrogen, Oregon, USA), que inhiben específicamente la PKC α en las distintas líneas celulares empleadas mediante electroporación (GenBank ENSG00000154229). Las secuencias de cada uno de los ARN utilizados fueron:

Para la línea celular MCF-7:

5'- UCCAAACGGGCUUUCAGAUCCUUAU -3'

Y para la línea MDA-MB-231:

5'- CCAUCGGAUUGUUCUUCUUAUAA -3'

y un control no específico del genoma de mamíferos:

5'-AGGUAGUGUAAUCGCCUUGUCGCCUUG-3'.

Las dos líneas celulares fueron electroporadas en un tampón comercial de electroporación Mirus Ingenio® Electroporation Solution (Mirus Bio LLC, USA). Se resuspendieron 3×10^6 de células de cada línea en 300 μ l de tampón de electroporación Mirus en cubetas de electroporación de 0.4 cm de BioRad. La concentración de oligos usada ha sido de 1 μ M siRNA en ambos casos. El electro-shock se realizó en un electroporador de BioRad (BioRad Laboratories, CA, USA) bajo las siguientes condiciones:

Se eligió un perfil de onda cuadrada de 900 Voltios para las células MCF-7 y de 1000 Voltios para las células MDA-MB-231. El electro-shock tuvo una duración de 0.4 ms y se repitió dos veces con una pausa de 5 s entre ambos. Las células fueron resuspendidas con la mayor brevedad posible en medio de cultivo fresco y quedaron disponibles para la preparación de los experimentos necesarios.

5. Lisis celular.

Se resuspendieron las células PC12 en tampón de lisis con una concentración de $4-5 \times 10^6$ células en 100 μ l. La composición del tampón de lisis fue 50 mM Tris HCl pH 8.4, 10 mM NaCl, inhibidor comercial de proteasas cOmplete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Tablets y de fosfatasa PhosSTOP (Sigma-Aldrich Chemistry, S.A., Madrid, Spain). Se incubaron a 4°C durante 15 minutos y se pasaron por una jeringa de insulina 15 veces a 4°C y se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante quedó listo para los distintos ensayos requeridos.

Para los capítulos III, IV y V, las células utilizadas fueron MCF-7 y MDA-

MB-231 previamente electroporadas para producir el silenciamiento génico de la PKC α . Posteriormente se resuspendieron en tampón de lisis a una concentración de 1×10^6 células en 300 μ l. La composición del tampón de lisis fue 50 mM Tris HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40 (Roche Diagnostic, GmbH, Germany), 10% glycerol, inhibidor comercial de proteasas cOmplete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Tablets y de fosfatasas PhosSTOP (Sigma-Aldrich Chemistry, S.A., Madrid, Spain).

Los ensayos de inhibición de la expresión de PKC α se analizaron mediante western blot de muestras tomadas durante 8 días después de la transfección con el siRNA de interferencia. Una vez que las células se resuspendieron en el tampón de lisis, se pasaron por una jeringa de insulina 10 veces a 4°C y se centrifugaron a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se mezclaron con el tampón de carga de electroforesis (200 mM Tris HCl pH 6.8, 250 mM DTT, 5% SDS, 37.5% glicerol y 0.015% azul de bromofenol) y se analizaron en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) cuyo porcentaje se expresará en cada experimento en particular.

6. Ensayo de migración celular.

Se ha estudiado la capacidad de migración de las células MCF-7 y MDA-MB-231 y con el tratamiento de diferentes fármacos mediante el ensayo de cierre de *wound healing* (Yarrow, Perlman, Westwood, & Mitchison, 2004).

Para realizar estos experimentos las células se transfectaron por electroporación y se sembraron del orden de 300.000 células/pocillo para MCF-7 y de 240.000 células/pocillo para MDA-MB-231 en placas de 24 pocillos. Fue necesario que alcanzaran una confluencia del 90-95% en el día de máxima inhibición de PKC α (72 horas para las células MCF-7 y 96 horas para las MDA-MB-231). Se dejaron crecer las células con medio de crecimiento y pasados 2 días para las MCF-7 y 3 para las MDA-MB-231 se les retiró el medio de crecimiento y se añadió nuevo medio con el suero bovino fetal reducido al 0.5 % durante 16-24 horas con el fin de sincronizar las células y que comenzaran a ser estimuladas una vez se hizo la herida en el cultivo a recuperar.

Esta herida del cultivo en monocapa se realizó con una punta de plástico de 10 μ l y se lavó el cultivo con tampón PBS para eliminar las células que se habían eliminado y se añadió medio de crecimiento completo.

El ensayo fue monitorizado mediante la toma de micrografías desde el mismo momento de realizar la herida que se consideró como 0 horas y luego cada 2 horas hasta que la monocapa cerró por completo la sección.

7. Ensayo de proliferación.

Para los ensayos de proliferación se ha utilizado un kit comercial CyQUANT® NF Cell Proliferation Assay (Invitrogen, Oregon, USA). Se siguió el protocolo de las instrucciones del fabricante. El ensayo consistió en medir la cantidad de ADN celular mediante su tinción con una sonda fluorescente siendo una medida aproximadamente proporcional al número de células existente. Se evitó así el uso de anticuerpos, enzimas o cualquier otro tipo de ensayo que pueda depender de la actividad fisiológica y por lo tanto introducir una variabilidad que puede ser independiente del número de células.

El protocolo consistió en retirar el medio de cultivo de los pocillos donde las células de tipo adherente han sido sembradas y tratadas en los diferentes casos. Se añadió la disolución de permeabilización y tinción del ADN y se incubó durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se leyeron los resultados en un lector de placas a punto final (figura II.7).

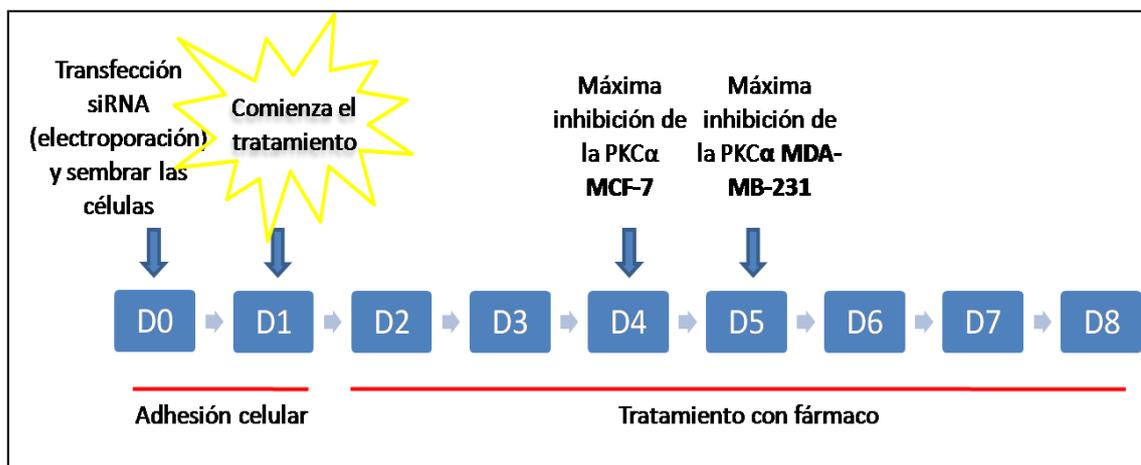


Figura II.7. Flujo de trabajo ensayo proliferaciones. La transfección de las células se realizó el día 0 (D0), se dejaron 24 horas para que la adhesión celular tuviera lugar y se comenzó el tratamiento el día (D1) previo a una medida del ADN total de partida. En los sucesivos días se fue tomando el mismo tipo de medida de ADN total.

El protocolo del ensayo es el siguiente:

Las dos líneas celulares de cáncer de mama empleadas son MCF-7 y MDA-MB-231 se electroporaron para realizar la inhibición de la PKC α como se ha indicado anteriormente. Posteriormente se sembraron del orden de 1×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos con medio de crecimiento durante 24 horas para su adhesión en un incubador de 37°C y con atmósfera al 7.5% de CO₂.

Tras este período de incubación se retiró el medio de crecimiento por aspiración y se añadió 75 μ l de solución de tinción (una mezcla CyQUANT® NF

de agente permeabilizante y la sonda fluorescente). A las 24 horas se realizó la medida para establecer el nivel de ADN de partida de los ensayos de proliferación. Tras estas 24 horas de adhesión celular comenzó también el tratamiento de las diferentes drogas para evaluar su efecto en la capacidad proliferativa. Se diluyeron en diferentes concentraciones en el mismo medio de crecimiento y se usaron controles para el diluyente de los mismos fármacos.

Además, es necesario en este tipo de ensayos la realización de una curva patrón diaria para poder cuantificar la cantidad de ADN cada 24 horas. Esta curva se realizó con al menos 6 concentraciones de ADN conocidas y se incubó con la misma mezcla que las células. La placa fue cubierta para evitar el contacto de la disolución con la luz y se introdujo en el incubador a 37°C durante 1 hora para que pueda permeabilizar y teñir el ADN, midiéndose así la fluorescencia a punto final. Tras esta incubación se midió la intensidad de fluorescencia de cada muestra y de la curva patrón en un espectrofotómetro lector multi-modal synergy de Biotek con una excitación de 480 nm y detectando la emisión a 520 nm. Cada condición fue testada en tres pocillos y al menos en tres experimentos independientes.

8. Ensayo de apoptosis.

Para los ensayos de apoptosis se han utilizado cambios que distinguen este proceso de otros tipos de muerte celular no programada como pueda ser la necrosis o la muerte accidental de las células. El proceso de apoptosis implica una serie de características morfológicas y cambios bioquímicos que pueden ser utilizados como marcadores del proceso apoptótico. En este caso se eligió la pérdida de la asimetría de la membrana plasmática (Ja-Young Kim et al., 2002). En las células vivas, la fosfatidilserina (PS) se halla localizada en la cara interna de la membrana plasmática. Sin embargo, en las células apoptóticas la PS es trasladada desde la cara interna de la membrana plasmática a la cara externa, pudiendo ser detectada por el anticoagulante humano anexina V (van Engeland et al, 1998). La anexina V tiene un peso molecular de 35–36 kDa y es una proteína de unión a fosfolípido dependiente de Ca^{2+} que tiene una alta afinidad por PS. Además anexina V es conjugada con un fluoróforo para poder ser identificada en las células apoptóticas en las que la PS se encuentra expuesta en la cara extracelular de la membrana plasmática (van Engeland et al., 1998).

Para realizar los ensayos de apoptosis se utilizó un kit comercial Vibrant® Apoptosis Assay kit (Invitrogen, Oregon, USA) con la anexina V conjugada con Alexa Fluor® 488 y con yoduro de propidio (IP) para citometría de flujo. Así se distinguió entre las células vivas que no daban fluorescencia, las células muertas cuya señal era fluorescencia roja debido al yoduro de propidio que ha podido

penetrar en la célula y teñir el ADN, las células apoptóticas, pero no muertas que daban fluorescencia verde (anexina V) y las células doblemente marcadas, es decir, células apoptóticas y muertas que eran positivas para fluorescencia roja y verde a la vez (figura II.8). Se siguieron las instrucciones indicadas en el protocolo del kit.

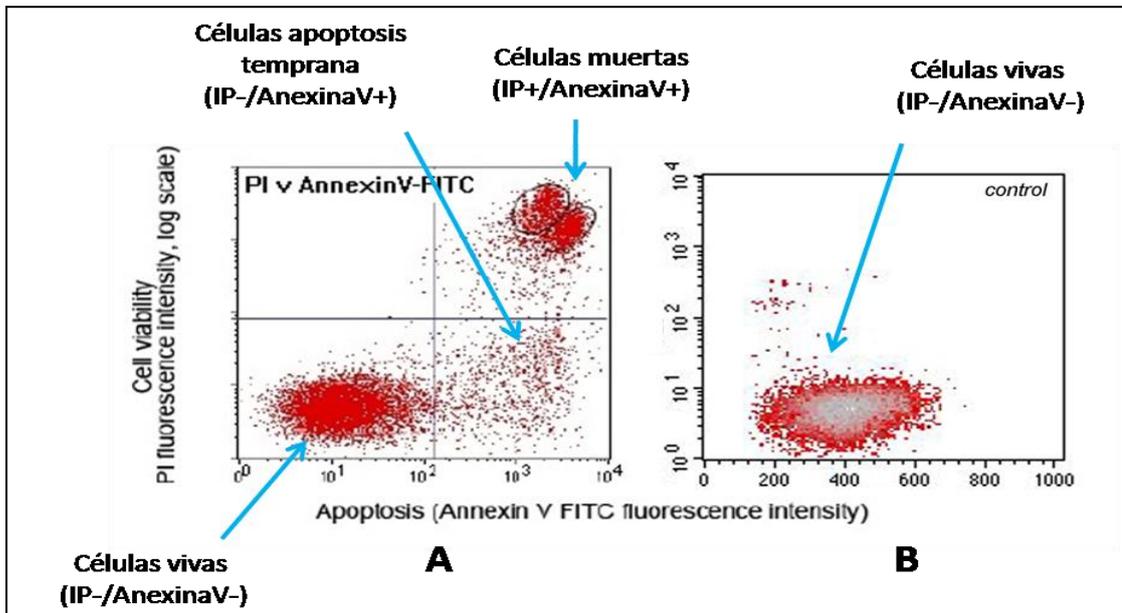


Figura II.8. Dot plot de los diferentes estados de apoptosis. En el gráfico A y B se puede apreciar la población doble negativa (IP-/AnexinaV-) para las células control. En el gráfico B se muestran células que no han recibido ningún tratamiento, es decir, corresponden a lo que llamamos un control negativo donde prácticamente toda la población es doble negativa para ambas sondas. En cambio, el gráfico A son células tratadas con un control positivo de apoptosis, donde podemos observar la población de células en apoptosis temprana (IP-/AnexinaV+) y también la población de células muertas, es decir, doble positivas (IP+/AnexinaV*). (Imagen tomada de www.beckmancoulter.com).

Este ensayo se utilizó para estudiar el efecto en la apoptosis de las células MCF-7 y MDA-MB-231 en ausencia de PKC α (siRNA PKC α) y con el tratamiento de diferentes fármacos. Las células se sembraron tras la electroporación con siRNA (control e inhibición PKC α) con una proporción de 3×10^5 células/placa de 3.5 cm de diámetro. Se incubaron a 37°C y 7.5% of CO $_2$ con medio de crecimiento durante 24 horas para la adhesión celular. Tras este periodo se retiró el medio de crecimiento y se añadió el medio con los diferentes fármacos a estudiar. Se utilizaron controles negativos (células cultivadas solo con medio de crecimiento) y controles positivos (estimulando con estaurosporina a una concentración de 2 μ M durante 24 horas). Las células se trataron durante 4 y 5 días, MCF-7 y MDA-MB-231 respectivamente para alcanzar el máximo de la inhibición de la PKC α .

Tras el tratamiento las células se recogieron de las placas mediante tratamiento enzimático (tripsina), se contaron y separaron en alícuotas de 2×10^5

células. Se lavaron con tampón PBS dos veces y por último se resuspendieron en 100 μ l de 1X de tampón de unión a anexina V. A continuación, se añadieron 5 μ l Alexa Fluor® 488 anexina V y 1 μ l 100 μ g/ml yoduro de propidio (IP) a cada muestra. Las muestras se incubaron durante 15 minutos a 25°C tras ello se añadió 400 μ l de tampón de unión a anexina V a cada muestra y a continuación se midió por citometría de flujo con una emisión de fluorescencia a 525 nm (FL1) para la anexina V y a 575 nm (FL3) para el yoduro de propidio.

El citómetro de flujo usado para analizar las muestras ha sido el modelo Epics XL (Beckman Coulter, Barcelona, España) que posee 15 mW a 488 nm para el láser de argón-ion para la excitación y detectores para la emisión para las longitudes de onda de 525, 575, 620 y 675 nm. Este equipo se encuentra en la Sección de Cultivos de Tejidos de la Universidad de Murcia.

9. Microscopios.

9.1. Microscopio de Barrido Láser Confocal.

9.1.1. Introducción y concepto de microscopía confocal.

Marvin Minsky patentó el concepto de imagen confocal en 1957, que se diferencia de una imagen de fluorescencia convencional en la iluminación puntual de la muestra mediante el uso del “pinhole” en un plano óptico conjugado frente al detector quedando descartada la información que queda fuera del plano focal. Debido a este tipo de adquisición es necesario una exploración (scanning) del espécimen para la adquisición de una imagen, bien sea bi o tridimensional (mediante la exploración de varios planos). El tamaño del plano focal se define como el cuadrado de la apertura numérica (AN) de la lente del objetivo. También viene determinado por las propiedades ópticas del espécimen y el índice de refracción del ambiente (figura II.9).

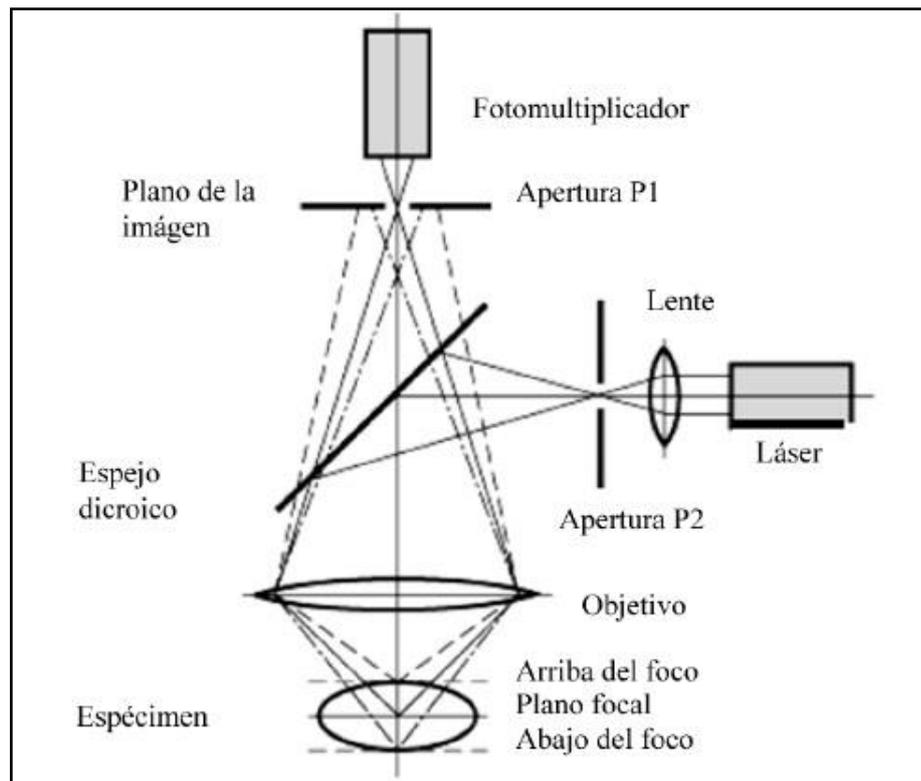


Figura II.9. Representación del funcionamiento básico de un microscopio confocal láser. Se observa la luz del láser que excita a la muestra tras pasar por el pinhole (apertura P2 en la imagen) y es filtrada en el espejo dicroico. La luz que emite la muestra atraviesa de nuevo los espejos dicroicos y el segundo pinhole (apertura P1), siendo así la información de un solo plano la que es captada. En este esquema vemos una representación básica de un microscopio no invertido y que carece del sistema AOBS incorporado en el microscopio utilizado en esta Tesis Doctoral (Bacallao & Stelzer, 1989).

La fuente de luz que usa un microscopio confocal es un láser y de su estabilidad depende la capacidad de hacer medidas cuantitativas pudiendo corregir por píxel al tomar la imagen. El sistema AOTF (Filtro óptico acústico modulable) consiste en modificar el sistema de filtros del microscopio para seleccionar las longitudes de excitación y evitar el fotoblanqueo de la muestra, ya que también se utiliza para desactivar el láser durante los tiempos en los que no se adquiere la imagen. Es un cristal con un generador y un receptor de ultrasonidos que reemplaza a los filtros de excitación. Consigue modificar la frecuencia y potencia de ultrasonidos que se le aplica y además se puede variar la potencia de las líneas seleccionadas.

En este tipo de microscopía se requiere un divisor de haz que separe la luz de la excitación (va hacia la muestra) de la luz que la muestra emite en respuesta porque ambos haces usan el mismo camino, es decir, la luz de excitación que llega a la muestra va por el mismo recorrido que se recoge la emisión. Para ello Leica posee el sistema AOBS o Divisor de Haz Acústico Óptico (figura II.10). Es un cristal activo de TeO_2 completamente transparente y con la máxima eficiencia de fotones. Las propiedades de transmisión del cristal cambian al acoplarle una onda acústica y lo hace en microsegundos, cambiando

la frecuencia de radio de la onda. Las bandas de reflexión de este sistema presentan un corte muy marcado y un paso de banda delgado permitiendo la recogida de hasta 30% más de luz de emisión.

El AOBS soporta hasta ocho bandas de reflexión, incluso con líneas de excitación muy próximas. Pudiendo separar sondas muy cercanas sin necesidad de recurrir al "Unmixing" y los posibles artefactos que conlleva.

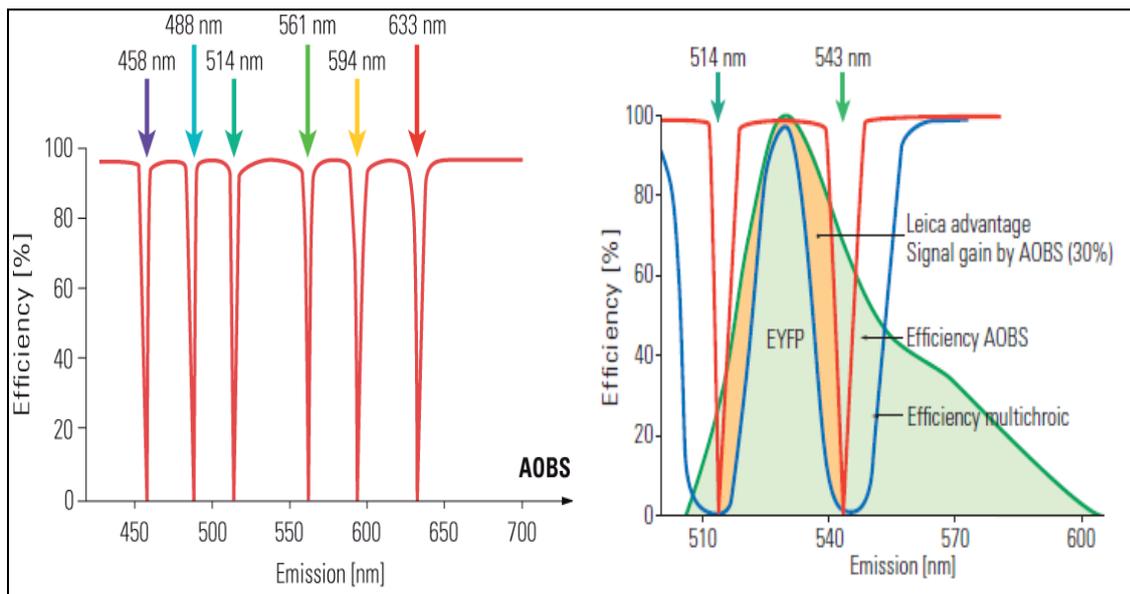


Fig. II.10. Representación de la forma de distribución de la luz mediante el sistema AOBS. se observa la forma de distribución de la luz por el sistema AOBS, en este caso la modulación de la longitud de onda que incide sobre la muestra o se refleja desde ésta, es controlada por este sistema, sin necesidad de cambiarlo según el fluorocromo utilizado (Tomado de la página www.leica-microsystems.com).

El detector sólo recibe luz de un punto de la muestra, así este microscopio sólo recibe en cada momento información de un punto del espécimen. Por lo tanto, para obtener una imagen se debe mover el punto de enfoque iluminado o se debe mover la muestra. En base a estas dos opciones existen dos tipos de microscopios confocales. Por un lado, el de escaneo estacionario donde la muestra se mueve según el movimiento del escaneo, mientras que los elementos ópticos permanecen estables y el otro tipo realiza un escaneo por espejo (espectral) donde el punto iluminado se escanea sobre la muestra fija, conducido por espejos pequeños, rápidos y galvanométricos.

9.1.2. Microscopio de barrido láser confocal Leica TCS SP8.

Las inmunofluorescencias o los ensayos de ligación por proximidad fueron analizados en un microscopio de barrido láser confocal Leica TCS SP8 (Leica,

Heidelberg, Germany) situado en el Servicio de Microscopía del Laboratorio de Investigación Biosanitaria de la Universidad de Murcia (LAIB). Este equipo cuenta con un láser de onda continua 405 nm láser, con una láser multilínea de argón (458, 476, 488, 496 y 514 nm), un láser amarillo (DPSS 561 nm) y otro rojo HeNe (633 nm). Los objetivos usados han sido en seco PL APO 20X / 0.7 AN y de inmersión en glicerol PL APO 63X / 1.3 AN. Los detectores usados han sido los PMT y 2 detectores híbridos HyD ultrasensibles (30% de eficiencia cuántica).

El rendimiento fotónico y su alta velocidad se deben a que los componentes ópticos se acoplan de forma que consiguen optimizar la fluorescencia fotónica del contraste de la imagen y mejorar la viabilidad de las células si se trabaja con células vivas. Además, posee un sistema de barrido con una velocidad superior, pudiendo conseguir del orden de 428 imágenes/s, que junto al sistema de Galvoflow (galvanómetro Super Z) permite recoger imágenes con una resolución confocal completa.

9.1.3. Fluorocromos utilizados.

Los fluoróforos usados fueron DAPI, Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 546, Alexa Fluor® 647, Cy3 (tabla II.3). Además, en la figura II.11 se pueden observar los distintos espectros de absorción y emisión de los anticuerpos secundarios fluorescentes utilizados en los ensayos de ligación por proximidad utilizando el *fluorescence spectra viewer* de la página www.thermofisher.com.

Table II.3. Fluorocromos utilizados.

Fluoróforo	λ Excitación máx. (nm)	λ Emisión máx. (nm)	Rango de emisión (nm)
DAPI	360	450	420-550
Alexa Fluor 488	488	530	520-580
Alexa Fluor 546	535	575	560-600
Cy3	554	579	540-620
Alexa Fluor 647	630	655	630-780

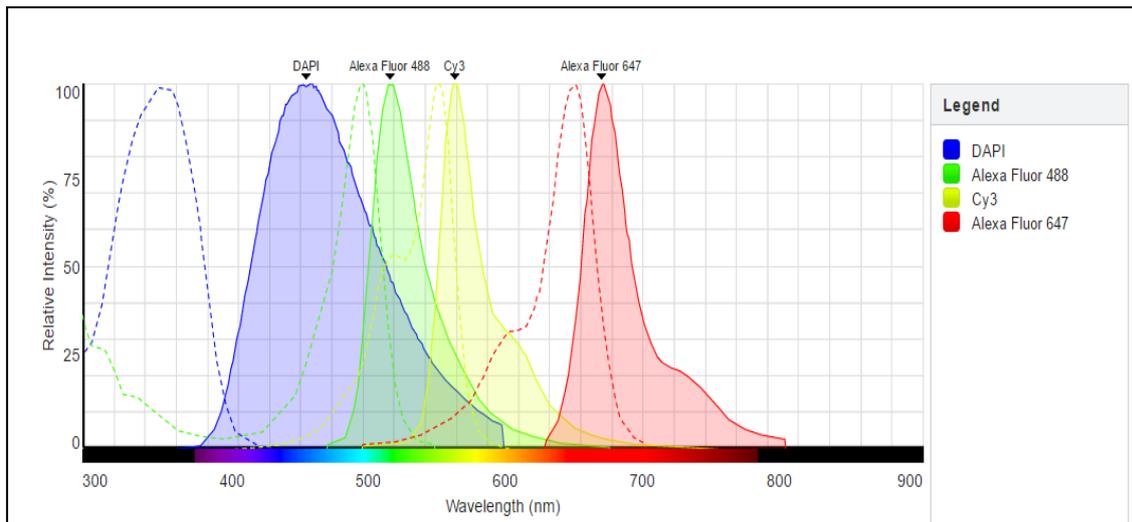


Figura II.11. Espectros de absorción y emisión de los anticuerpos secundarios fluorescentes utilizados en los ensayos de ligación por proximidad. Espectros de absorción (línea discontinua) y emisión (línea continua) del fluorocromo DAPI (línea azul), del anticuerpo Alexa fluor 488 (línea verde), el fluorocromo Cy3 (línea amarilla), el anticuerpo Alexa fluor 647 nm (línea roja) (Representación hecha con Fluorescence spectra viewer de <https://www.thermofisher.com>).

9.2. Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM).

La primera idea de microscopio electrónico de transmisión (TEM) surge en 1932 por Knoll y Ruska (David B. Williams & Carter, 2009). No es hasta 1939 cuando se comercializan los primeros modelos de TEM por Siemens y Halske. Su óptica básica se mantiene hasta nuestros días. Hoy en día solo se ve aumentado el número de lentes para incrementar los aumentos e incrementar su versatilidad. Este equipo proporciona información directa de las estructuras que oscilan entre 0,2 y 200 nm.

El microscopio electrónico de transmisión (TEM) se basa en los fenómenos físico-atómicos producidos por un haz de electrones suficientemente acelerado que colisiona con un espécimen suficientemente delgado. Al colisionar los electrones con el espécimen, parte de ellos serán dispersados en función de la composición de la muestra y de su grosor. Obteniéndose la imagen formada por los electrones dispersados de la cara contraria a la que ha sido irradiada (figura II.12). Existe un gradiente entre los electrones que atraviesan la muestra directamente y los que se ven desviados por completo.

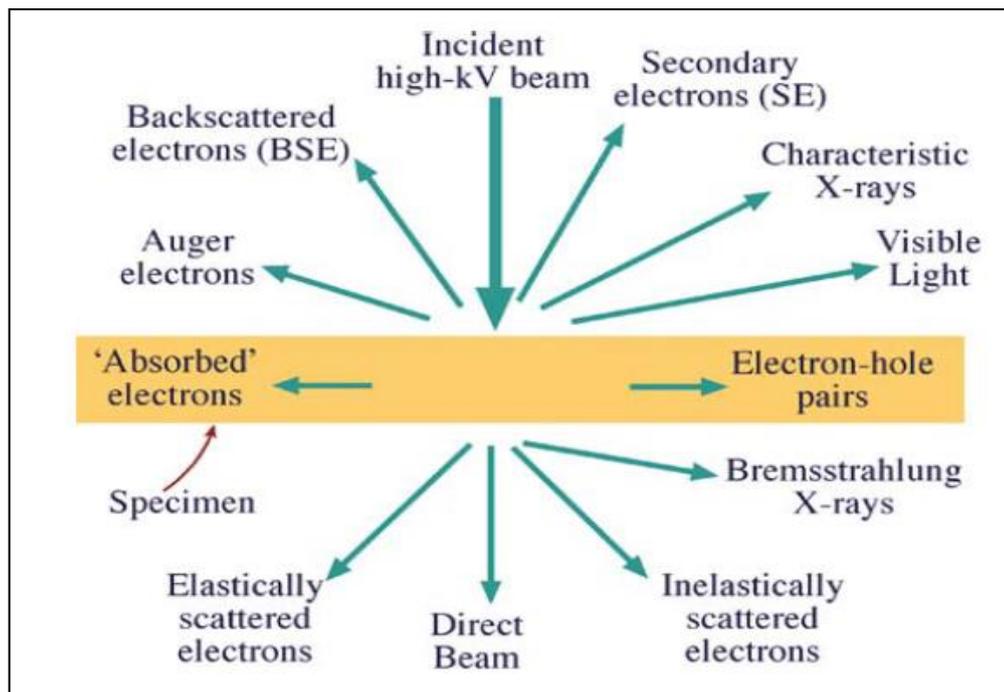


Figura II.12. Esquema representativo de las señales generadas por un espécimen tras la interacción con los electrones producidos por un haz de alta energía. Las direcciones mostradas no tienen por qué coincidir con la dirección física de la señal, si no que hacen referencia hacia donde la señal es más fuerte y es detectada (Williams & Carter, 2009).

Las partes principales del TEM son:

- La columna (la óptica electrónica, llamada así por su forma vertical y cilíndrica).
- El sistema de vacío que permite tener una baja presión en el interior de la columna.
- Sistema de refrigeración.
- Corrientes de alimentación y sus controles.
- Dispositivos para la captura de imágenes.

En la parte superior de la columna se halla el dispositivo generador de electrones o también llamado cañón electrónico. A continuación, se encuentran lentes condensadoras o magnéticas que se encuentran en el interior de la columna y que se encargan de enfocar, dirigir y concentrar el haz de electrones. Por otra parte, el sistema de vacío es una pieza fundamental porque el aire puede desviar los electrones. La placa fotográfica o pantalla fluorescente se halla detrás del objeto a visualizar para capturar la imagen aumentada. Finalmente, todos los electrones son conducidos para formar una imagen final sobre una cámara digital de tipo Megaview III (EMSIS GmbH, Münster, Germany). Es una cámara de tipo CCD (dispositivo de carga acoplada) cuyo chip es de 10.2 mm x 8.3 mm, con una resolución 1376 x 1032 pixel y que se encarga de convertir la señal luminosa en eléctrica. Las lentes generan los aumentos que le confieren el

poder de resolución. La imagen resultante posee diferentes intensidades de gris que se correlacionan con la dispersión de los electrones incidentes sobre la muestra.

El microscopio de transmisión utilizado en el capítulo VI ha sido un PHILIPS TECNAI 12 con 120 KV y que posee una cámara digital de tipo Megaview III (EMSIS GmbH, Münster, Germany).

10. Tinción negativa para Microscopía Electrónica de Transmisión.

Este tipo de ensayo se ha utilizado para la caracterización de los eventos de fusión en vesículas dependiente del dominio doble C2AB de Rabfilina-3A en diferentes condiciones. Para ello se prepararon vesículas unilamelares pequeñas (SUV) con una mezcla lipídica de POPC/POPS/PIP₂ (65:25:10 mol/mol). La concentración final de los SUV fue de 0.4 mM y se incubaron en tampón Tris/NaCl a una concentración final de 25 mM. En los casos donde se ha estudiado la fusión bajo condiciones de calcio, la concentración usada fue de 0.2 mM y en forma de CaCl₂. Por el contrario, cuando se ha trabajado en ausencia de calcio se ha utilizado un agente quelante (EGTA) a 1 mM. Las proteínas testadas se han empleado en la misma concentración final de 15 μM.

El protocolo empleado ha sido la incubación a 25°C durante 10 minutos de los liposomas (SUV) con el tampón y la proteína a estudiar con y sin condiciones de calcio para cada muestra. Tras la incubación se colocó sobre un parafilm una gota de la mezcla y otra de acetato de uranilo (AcUr). Con unas pinzas se sujetó una rejilla Formvar/carbón de 200 agujeros (mesh) con la que se carga la mezcla por contacto, secándose el exceso sin tocar la superficie de la rejilla (la superficie de trabajo de la rejilla es la cara mate). Tras cargar la rejilla con la muestra se procedió a contrastar con el AcUr también por contacto durante 10 s y se secó el exceso del mismo modo. Se dejó secar durante al menos 5 minutos y se procedió a su visualización en el microscopio electrónico de transmisión.

11. Inmunofluorescencia.

Para la realización de las inmunofluorescencias se han llevado a cabo los siguientes pasos después de preparar las células en las condiciones apropiadas según el tipo de ensayo:

- Se realizó un lavado previo de las células con PBS (0.008 M fosfato de sodio, 0.002 M fosfato de potasio, 0.15 M NaCl, pH 7.4) a temperatura

ambiente al proceso de fijación. Para ello se añadió formaldehído 2% durante 10 min, seguido de la incubación de las células con cloruro de amonio 50 mM durante otros 5 min, para neutralizar la acción del formaldehído.

- Una vez fijadas, las células se lavaron convenientemente con PBS y a continuación se permeabilizaron con Tritón X100 en PBS durante 10 min, para las líneas celulares MCF-7 y PC12 la concentración de Tritón X100 usada es del 0.1% y para el caso de MDA-MD-231 se utilizó una concentración de Tritón X100 del 0.5%, todo ello a temperatura ambiente.
- Se procedió con otro lavado con PBS.
- A 25°C y en cámara de humedad se realizó el bloqueo con Image-iT-FX signal enhancer (Invitrogen, Oregon, USA) durante 30 min.
- El anticuerpo primario correspondiente se diluyó en BSA 1% y saponina 0.15% en PBS y se incubó durante 1 h a 37°C dentro de la cámara húmeda para evitar la deshidratación de la muestra. Las diluciones de los distintos anticuerpos varían en función de la proteína a estudiar:
 - PKC α ab4124 (1:100) Abcam, Cambridge Science Park.
 - HA sc7392 (1:200) Santa Cruz Biotechnology, Inc.
 - Myc ab9106 (1:200) Abcam, Cambridge Science Park.
 - SNAP25
 - ab41455 (1:200) Abcam, Cambridge Science Park.
 - BD610367 (1:50) BD Biosciences: Becton Dickinson.
 - Rabfilina-3A sc390915 (1:100) Santa Cruz Biotechnology, Inc.
- Lavado con PBS.
- Bloqueo con BSA al 1% en PBS durante 20 min a 25°C.
- Incubación con anticuerpo secundario durante 1 h en oscuridad a 25°C diluido en BSA al 1% y en saponina al 0.15% en PBS. Los anticuerpos secundarios van conjugados con un fluoróforo permitiendo así la visualización de la proteína a estudiar en el microscopio confocal. Se han usado con las siguientes diluciones:
 - Alexa fluor 488 (1:1000) ab150117 Abcam, Cambridge Science P.
 - Alexa fluor 546 (1:1000) Invitrogen, Oregon, USA.
 - Alexa fluor 647 (1:500) A11083 Invitrogen, Oregon, USA.

Se realizó un último proceso de lavado con PBS y se procedió al montaje en un porta o se añadió directamente la solución DAPI-Prolong Gold antifade reagent (Invitrogen, Oregon, USA) si está en placa de pocillos para su directa visualización al microscopio.

12. Técnicas electroforéticas.

Se han utilizado dos métodos de electroforesis: agarosa y acrilamida. El primer método es usado para separar fragmentos de ADN y de ARN de diferente tamaño y el segundo método se ha usado para separar proteínas de diferente tamaño.

12.1. Gel de agarosa.

La cantidad de agarosa correspondiente para el porcentaje de gel a utilizar se disolvió en el tampón TAE que contiene trizma base 24.2% (p/v), ácido acético glacial 5.7% (v/v), EDTA 50 mM pH 8.0. Antes de que el proceso de polimerización de la agarosa comenzara se añadió la tinción del ADN comercial SERVA DNA Stain G usando una dilución de 1:30.000, para poder visualizar los fragmentos de ADN posteriormente. El ADN se cargó en el gel mezclado con tampón de carga (azul de bromofenol 0.25% (p/v), glicerol 30% (v/v), Tris 0.5 mM pH 8.0). Las muestras se sometieron a un voltaje de 90 voltios durante 45 minutos y fueron visualizadas en una fuente ultravioleta (UV) para visualizar los fragmentos de ADN.

12.2. Gel de acrilamida.

Los geles de poliacrilamida usados se realizaron en condiciones desnaturizantes con la presencia de SDS (SDS-PAGE), siguiendo el método desarrollado por *Laemmli (1970)*. Este sistema fue utilizado en el Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad Laboratories, CA, USA). Para cada electroforesis se utilizaron dos tipos de gel. Por un lado, se encuentra el gel separador, en el que las muestras se van a separar en función de su tamaño. Para ello se preparó una mezcla de acrilamida-bisacrilamida 10% (p/v), disuelta en tampón Tris-HCl 0.375 M pH 8.8 y SDS 0.1% (p/v). El gel se polimerizó con persulfato amónico (PSA) 0.064% (p/v) y TEMED 0.064% (v/v). Cuando el gel separador estaba polimerizado, se preparó sobre éste el otro tipo de gel, el gel concentrador, el cual contiene acrilamida-bisacrilamida 5% (p/v), disuelta en tampón Tris-HCl 0.130 M pH 6.8 y SDS 0.1% (p/v), con PSA 0.1% (p/v) y TEMED 0.1% (v/v) como agentes polimerizantes. La función del gel concentrador es conseguir que las proteínas penetren al mismo tiempo en el gel separador.

Las muestras se disolvieron en tampón de carga (40 mM Tris-HCl pH6.8, 50 mM DTT (p/v), 1% SDS (p/v), 7.5% glicerol (p/v) y 0.003% azul de bromofenol (p/v)) antes de cargar el gel concentrador. El tampón de recorrido para que tenga lugar la electroforesis contiene 25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glicina y 0.1 % SDS (p/v). Se cargaron las muestras en los geles y se aplicó a un voltaje de 100

V hasta que el frente pasó el gel concentrador y entonces se incrementó el voltaje hasta 120-160 V y el frente llegó al final del gel separador.

12.3. Electrotransferencia (Western blots).

Una vez que ha acabado la electroforesis del gel de acrilamida con las muestras adecuadas, se transfirieron desde ese gel a la membrana de nitrocelulosa Hybond ECL (GE) que tiene un tamaño de poro de 0.2 μm . Se realizó en un sistema turbo de transferencia en semi-seco "Trans-Blot Turbo Transfer System" (BioRad Laboratories, CA, USA) con un potencial de 25V durante 20 minutos. El tampón de transferencia se enfrió a 4°C y contiene el 1% (v/v) del tampón comercial NuPAGE® Novex® y se añadió un 10% extra de metanol (v/v).

Una vez ha acabado el proceso de la transferencia y las proteínas están en la membrana de nitrocelulosa se procedió al proceso de bloqueo con albúmina de suero bovina (BSA) a una concentración del 2% (p/v) diluida en TBST (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM y Tween-20 0.1% (v/v)) durante 2 h a 25°C con agitación leve. Así se consiguió bloquear las posibles interacciones inespecíficas de los anticuerpos que se usaron a continuación.

Tras este período de bloqueo de la membrana se realizó la incubación con los anticuerpos primarios que se diluyeron en la misma disolución de bloqueo (2% BSA en TBST). La incubación tuvo lugar durante toda la noche a 4°C. Las concentraciones empleadas de los anticuerpos primarios varían según la proteína a detectar:

- PKC α ab32376, dilución 1:1000 (conejo).
- GAPDH ab9485, dilución 1:2000 (conejo).
- HA sc7392, dilución 1:500 (ratón).
- Myc ab9106, dilución 1:500 (conejo).
- SNAP25
- ab41455, dilución 1:500 (conejo).
- BD610367, dilución 1:1000 (ratón).
- Rabfilina-3A sc390915, dilución 1:100 (ratón).
- Sintaxina1a ab41453 dilución 1:500 (conejo).
- VAMP2 SYSY 104202 dilución 1:1000 (conejo).

A la mañana siguiente se realizó un proceso de lavado en agitación con el tampón TBST y después se incubó con el anticuerpo secundario contra la especie en la que haya sido hecho el anticuerpo primario. Los anticuerpos secundarios se diluyeron en la misma disolución que el primario (2% BSA en TBST) y se incubaron durante 1 hora a 25°C. Los anticuerpos secundarios

empleados van conjugados con la peroxidasa de rábano picante (HRP) o una sonda fluorescente. Las diluciones empleadas fueron:

- Anticuerpo de cabra anti-ratón ab5887, dilución 1:2000 (abcam)
- Anticuerpo de cabra anti-conejo ab6112 dilución 1:2000 (abcam)
- Anticuerpo de cabra anti-ratón Alexa fluor 488 A11017 dilución 1:1500 (Invitrogen)

Tras la incubación con el anticuerpo secundario se realizó otro proceso de lavado con tampón TBST. Si se ha utilizado un anticuerpo secundario conjugado con una sonda fluorescente se puede visualizar directamente. En cambio, si se ha utilizado conjugado con HRP requiere un revelado basado en una reacción quimioluminiscente.

Se ha usado un kit comercial WesternBright ECL-HRP substrate (Advansta) basado en dos componentes que son mezclados en una proporción 1:1 y en la que la membrana se incubaron durante dos minutos previos a su revelado. Esta incubación permitió la emisión de quimioluminiscencia tras la conversión del sustrato de la reacción y fue captado por el equipo Amersham Imager 600 series (GE) que posee una cámara CCD (con una resolución de 2048 × 1536, 3.2 Mpixel y un rango dinámico de 16-bit, 4.8 órdenes de magnitud) y que está ubicado en el Servicio de Imagen del Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia. Para el revelado del Alexa fluor 488 se utilizó el modo fluorescencia, si es para cualquier otro anticuerpo conjugado con HRP usaríamos la opción quimioluminiscencia, en ambos casos usando la opción “*high dynamic range*” para obtener la mejor señal sin que llegue a saturación para poder analizarlas posteriormente por densitometría en el programa Fiji-image J-NIH (Schindelin et al., 2012).

13. Procesamiento y análisis de imagen.

13.1. Análisis de western blot por densitometría con Fiji-ImageJ.

Para comenzar el análisis del western blot la imagen debía estar en formato tif y en 8 bits. El software Fiji-ImageJ interpreta los datos crudos de la imagen en tres dimensiones tomando el ancho y alto de las bandas donde hay señal quimioluminiscente. Esto se realizó tras seleccionar las áreas a estudiar y utilizando la herramienta “*Plot lines*”. La densidad de una banda es una medida como el volumen total bajo el pico tridimensional que se apreciaba como imagen bidimensional en el perfil obtenido en el punto 2 del flujo de trabajo de la figura II.13. Se ajustó manualmente con precisión el área a estudiar eliminando el ruido

de la propia imagen mediante el uso de “Straight” (líneas azules del punto 3 de la figura II.13.1.). Tras haber delimitado el área pudimos cuantificar ésta en cada uno de los casos o bandas mediante la herramienta “Wand (tracing) tool” que nos permitió ir seleccionando una a una y obteniendo el valor del área como se aprecia en los puntos 4 y 5 de la figura II.13 del flujo de trabajo para este análisis. Estos resultados se utilizaron para cuantificar las diferencias relativas entre las condiciones testadas en cada uno de los western blot realizados.

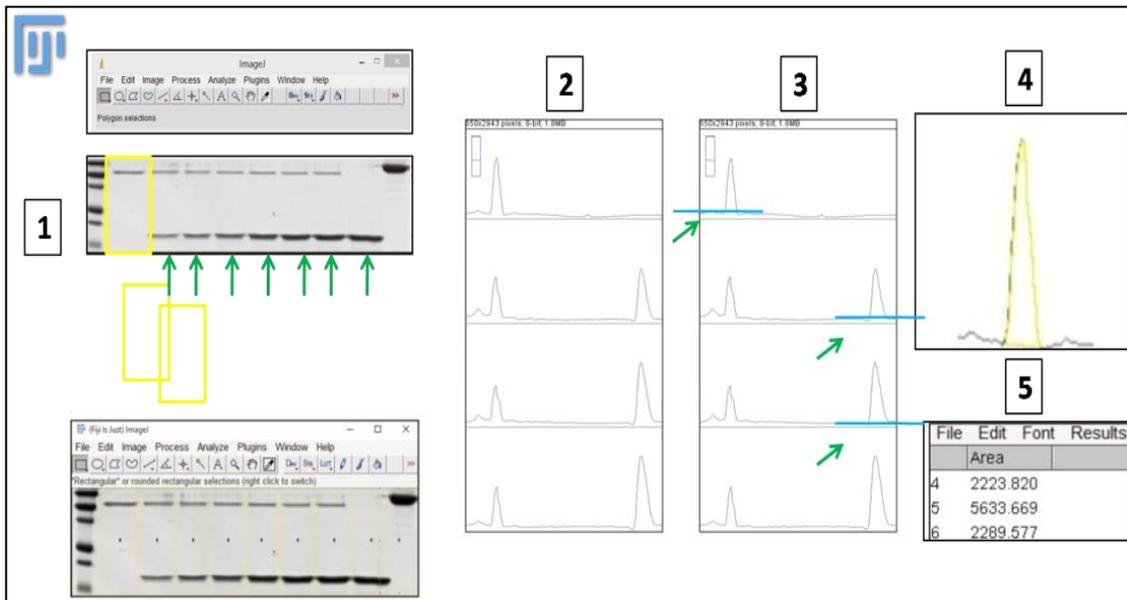


Figure II.13. Flujo de trabajo para analizar un western-blot mediante densitometría usando el software Fiji-ImageJ. En el primer paso (1) se seleccionan las áreas de interés a estudiar. Después se dibujan los perfiles que representan la intensidad de los pixeles de cada banda presente dentro de las áreas seleccionadas en el paso 1. Como tercer paso (3) ajustan los perfiles de cada banda eliminando las zonas que representen ruido basal (líneas azules). En el paso cuarto (4) se van identificando uno a uno los picos obtenidos resultando en un valor correspondiente para cada uno en forma del área que representa (5).

13.2. Análisis del ensayo de ligación por proximidad (PLA) mediante el software Fiji-ImageJ.

El análisis de las imágenes obtenidas por el ensayo de ligación por proximidad (PLA) requirió la detección de los puntos máximos que equivalen a cada una de las reacciones que ha tenido lugar por la proximidad de las proteínas a estudiar. Cada stack de imágenes contenía en este ensayo diferentes tinciones aunque para este análisis requeríamos el uso del canal del Alexa 647 en el que se marcó el SNAP25 y que nos sirvió como guía para delimitar la célula ya que es una proteína de membrana. Fue en ese canal donde seleccionamos célula a célula su forma mediante la herramienta del software “ROI”. Una vez delimitada se cambió al canal del Cy3 donde se encontraban las señales positivas del ensayo a cuantificar. Se utilizó ahora la herramienta “Find Maxima” del software Fiji-ImageJ y mediante el ajuste manual de la tolerancia del ruido de cada imagen se obtuvo el número de puntos por célula (Fig. II.14).

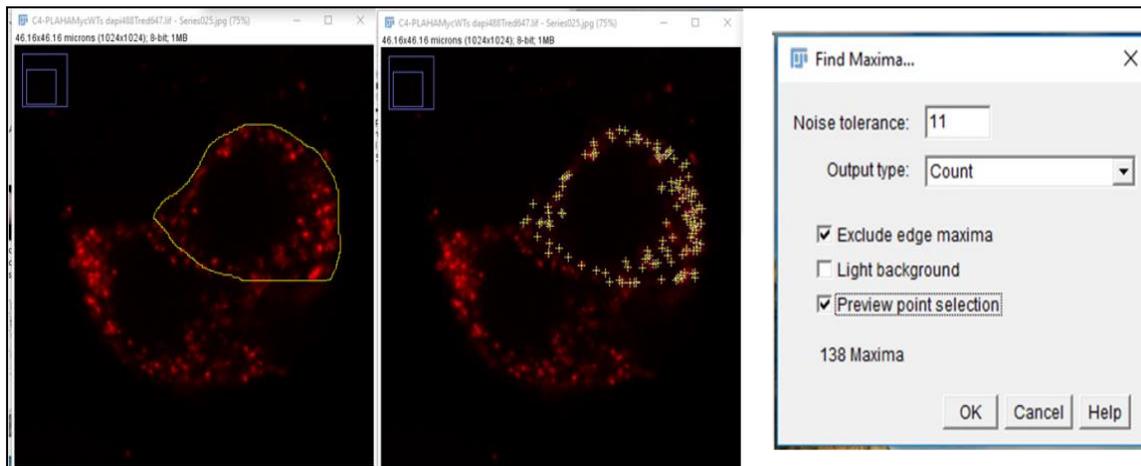


Figura II.14. Análisis de puntos obtenidos mediante el ensayo de ligación por proximidad en la célula total. Se seleccionan las áreas de interés, en este caso cada una de las células a cuantificar y mediante el software Fiji se cuantifican el número de puntos obtenidos (Find Maxima tool).

Otro tipo de análisis empleado con las imágenes obtenidas del ensayo PLA ha sido su cuantificación en la membrana y en el citoplasma. Para ello se recurrió de nuevo a la imagen donde está teñida la proteína SNAP25 que se encuentra solamente en la membrana pudiendo seleccionar un ROI en esta zona únicamente. Se volvió de nuevo al canal de Cy3 para proceder mediante “Find Maxima” a la cuantificación de los puntos en dicha región. Se realizó este mismo análisis célula a célula obteniendo así el número de máximos en la célula total y en la membrana y la diferencia en cada célula que corresponde a los máximos del citoplasma en cada caso (Fig. II.15).

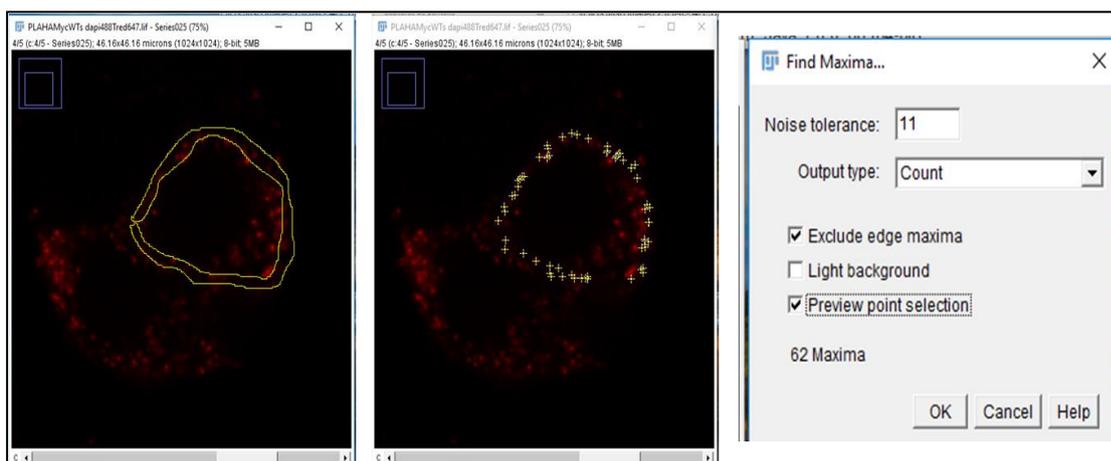


Figura II.15. Análisis de puntos obtenidos mediante el ensayo de ligación por proximidad en la membrana celular. Se seleccionan las áreas de interés, en este caso la membrana plasmática de cada una de las células a cuantificar y mediante el software Fiji se cuantifican el número de puntos obtenidos (Find Maxima tool).

14. Microarrays.

El estudio de los transcritos de ARN en ausencia de PKC α en los que se basó el capítulo V fue realizado anteriormente en el Departamento de Bioquímica

y Biología Molecular-A de la Universidad de Murcia por el Dr. Rubén López Nicolás como se resume a continuación.

Se transfectaron las células MCF-7 mediante electroporación del mismo modo que se indica en pasos previos (siRNA PKC α) y se recogieron las células los días de máxima inhibición. Posteriormente se extrajo el ARN total utilizando el RNeasy Plus kit para después marcarlo con biotina. El proceso de marcaje requiere una serie de pasos (figura II.16):

- la transcripción reversa.
- purificación del cADN obtenido.
- transcripción *in vitro* del cADN donde el nuevo ARN sintetizado se marcó con biotina.
- se utilizó el kit comercial MessageAmp™ II-Biotin *Enhanced Kit* siguiendo las condiciones del fabricante.
- el ARN marcado se fragmentó para hibridarlo con el GeneChip® Probe Array (Affymetrix) durante 16 horas a 45°C.
- Se introdujo el chip en las “Fluidics Stations” antes de escanearlo en el Affymetrix® GeneChip® Scanner 3000.

Tras el escaneo, los resultados obtenidos se analizaron con el programa R para la extracción de una lista de los genes expresados con diferencias significativas entre las células donde se ha inhibido la expresión de PKC α y las que se han transfectado con un ARN interferente control para secuencias del genoma de mamíferos.

Por último los genes resultantes se introdujeron en la base de datos “GENECODIS” <http://genecodis.cnb.csic.es/> y se realizó una clasificación basada en Gene Ontology y también en KEGG pathways.

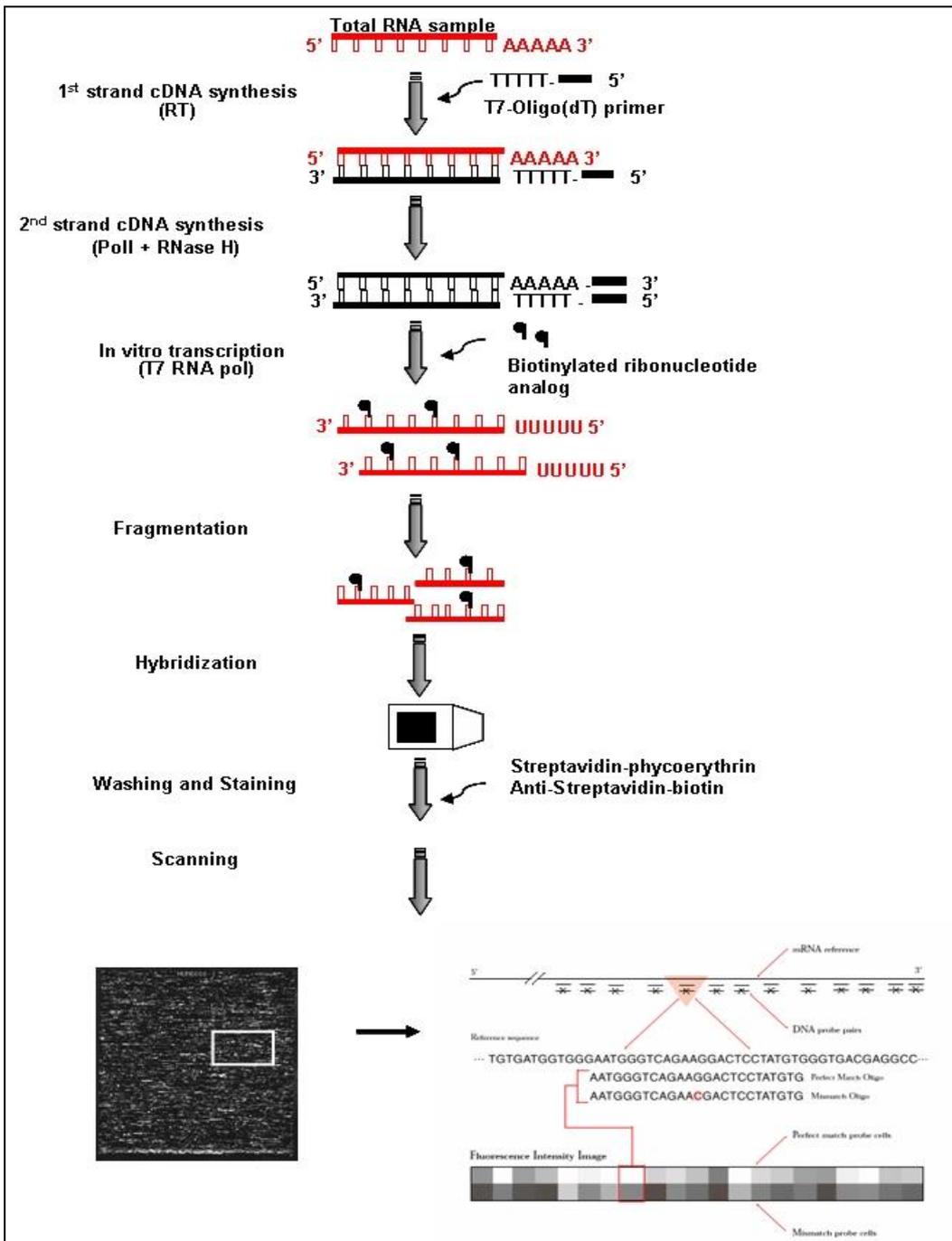


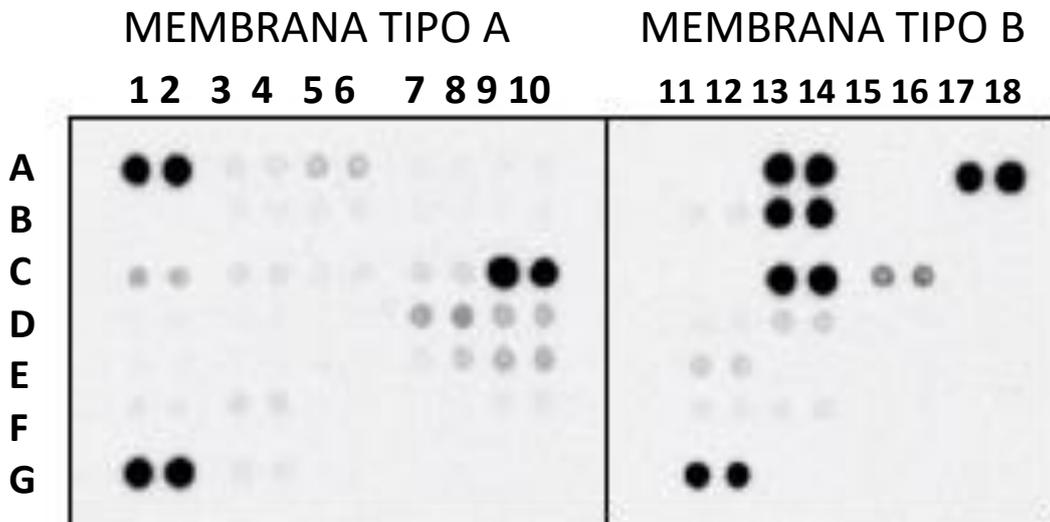
Figure II.16. Un ciclo de preparación de las muestras para el estudio del perfil de expresión génica.

El flujo de trabajo muestra los pasos desde la extracción del ARN o poli(A)-ARN. El cebador posee una cola poli (T) y el sitio de unión de la polimerasa T7 [T7-oligo (dT) cebador] es usado para la transcripción reversa, resultando en la síntesis de una primera cadena complementaria ADN (cADN). La segunda cadena de cADN es completada obteniéndose una doble cadena de cADN. En un ciclo de este método, la doble cadena de cADN es usada como molde para la transcripción in vitro con ribonucleótidos biotinilados. Obtuvimos así una muestra de ARN biotinilado. Después se procedió a la fragmentación del cARN y la muestra estaba preparada para ser analizada hibridando en el array, lavada, teñida y finalmente escaneada.

15. Determinación del perfil de fosforilación de quinasas.

Analizar el perfil de fosforilación de quinasas y de sus proteínas sustrato es esencial para la comprensión de cómo las células reconocen y responden a los cambios de su entorno. En el capítulo V se utilizó el kit comercial Phosphokinase Array de humanos (Proteome profiler, R&D SYSTEMS, bio-technie). Se han analizado simultáneamente niveles relativos de la fosforilación de 43 sitios de fosforilación de quinasas y 2 proteínas totales relacionadas.

El principio de este ensayo consiste en la captura de anticuerpos control y de las proteínas a analizar en dos puntos por duplicado en membranas de nitrocelulosa. Los lisados celulares se diluyeron y se incubaron toda la noche con las membranas permitiendo ser detectados posteriormente por estreptavidina-HRP y con una solución quimioluminiscente. La señal obtenida en los diferentes puntos correspondía a la cantidad de proteína fosforilada unida (figura II.17) y para hallar la correspondencia de cada punto con los distintos casos se utilizó la plantilla del array mostrada en la figura II.18.



FigII.17. Membranas control de un lisado de MCF-7 sin tratar. La parte de la izquierda corresponde con la membrana A y la parte de la derecha corresponde a la membrana B.

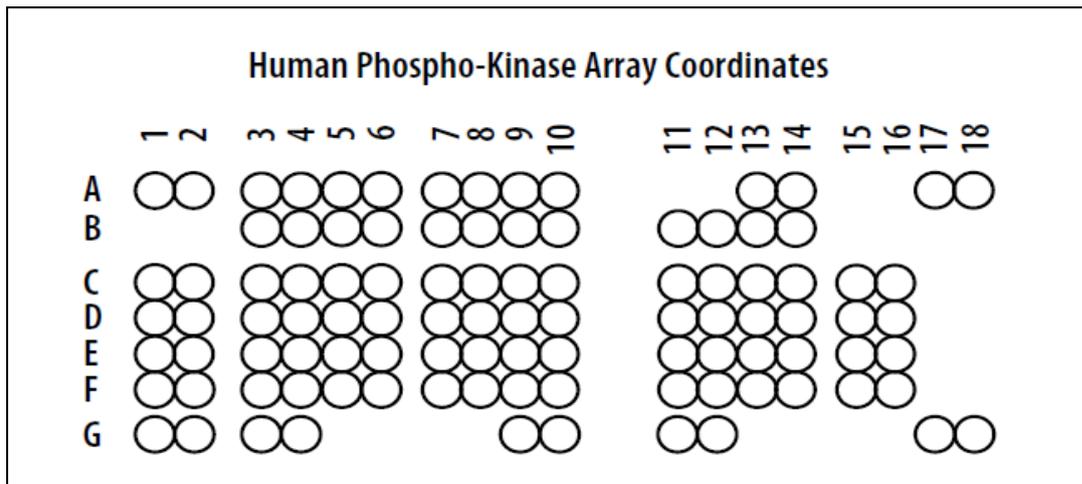


Figura II.18. Plantilla de las membranas del kit de estudio del perfil de fosforilaciones de quinasas en humanos. En esta plantilla se observan las dos membranas con los puntos disponibles a estudiar. La membrana tipo A acaba en la columna nº10 y la membrana tipo B comprende desde la columna nº11 hasta la nº18. En las tablas II.15.1. y II.15.2 de este capítulo se puede comprobar la correspondencia de cada uno de los puntos de las membranas.

Se siguieron las instrucciones comerciales que se resumen en los pasos descritos a continuación:

- Las membranas fueron bloqueadas con 1 ml de tampón comercial Array Buffer 1 por cada membrana. Se realizó en agitación durante 1 hora y a temperatura ambiente.
- Posteriormente se preparó el lisado celular con un volumen de 2 ml por muestra para poner 1 ml para la membrana tipo A y otro ml para la membrana tipo B. Las células que se utilizaron fueron MCF-7 y se transfectaron para silenciar la PKC α mediante electroporación como se indicó anteriormente y se sembraron en placas recogiendo los días de máxima inhibición como también se ha indicado anteriormente.
- La concentración celular fue de 5×10^6 células lisadas en 500 μ l de tampón de lisis del kit (nº 6) y mediante el uso de jeringa, se incubó a 4°C durante 30 minutos y se centrifugó a 14.000 g durante 5 minutos. El volumen máximo permitido es de 334 μ l por array set (membrana A y membrana B) y se completó el volumen hasta 2 ml con el tampón Array1.
- Se eliminó el tampón de bloqueo y se añadió el lisado celular en ambas membranas y se dejó incubar toda la noche en agitación y a 4°C.
- Lavado con el tampón comercial en placas con un volumen de 20 ml, un total de tres veces durante 10 minutos cada vez y en agitación.
- Se preparó 1 ml del Coctel A de detección de anticuerpos (DAC-A) para la membrana A y otro ml se añadió del coctel B (DAC-B) para la membrana B.

- Para la preparación de la dilución de estos cocteles de anticuerpos tanto A como B, se preparó el tampón Array 2/3 que consistió en mezclar 2 ml del tampón 5x Array nº 2 con 8 ml del tampón Array nº 3. Se tomó 20 µl del stock Coctel tipo A y se diluyó en 1 ml de tampón Array tipo 2/3 e igualmente se hizo con el coctel tipo B. Los anticuerpos se incubaron con las membranas durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación.
- Lavado de las membranas con el tampón comercial de la misma forma indicada en el lavado anterior.
- Se procedió a incubar ahora las membranas con 1ml de estreptavidina-HRP (1:1000) durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación.
- Lavado como en pasos anteriores.
- Revelado de las membranas. Para ello se utilizó la mezcla de los reactivos Chemi Reagent con una dilución 1:1. Esta incubación permitió la emisión de quimioluminiscencia tras la conversión del sustrato de la reacción y fue captado por el equipo Amersham Imager 600 series (GE) como se ha indicado anteriormente en el Western blot. Las imágenes obtenidas fueron analizadas por densitometría con el Fiji-ImageJ-NIH como se indica en ese mismo apartado.

A continuación, se detallan las coordenadas de las membranas y las proteínas que se chequean en cada caso (Tablas II.4 y II.5). Se incluyen los controles positivos y negativos (indicado en la tabla como Reference spot y PBS Negative control, respectivamente).

Tabla II.4. Proteínas y sitios de fosforilación que se estudian en cada uno de los puntos de las distintas membranas.

Membrane/ Coordinate	Target/Control	Phosphorylation Site	DuoSet® IC (Total) ELISA Development System	DuoSet® IC (Phospho) ELISA Development System
A-A1, A2	Reference Spot	—	—	—
A-A3, A4	p38α	T180/Y182	DYC8691B	DYC869B
A-A5, A6	ERK1/2	T202/Y204, T185/ Y187	—	DYC1018B
A-A7, A8	JNK 1/2/3	T183/Y185, T221/ Y223	DYC1205	DYC1387
A-A9, A10	GSK-3α/β	S21/S9	DYC2157	DYC2630
B-A13, A14	p53	S392	DYC1043	DYC2996
B-A17, A18	Reference Spot	—	—	—
A-B3, B4	EGF R	Y1086	DYC1854	—
A-B5, B6	MSK1/2	S376/S360	—	—
A-B7, B8	AMPKα1	T183	DYC3197	DYC3528
A-B9, B10	Akt 1/2/3	S473	—	DYC887B
B-B11, B12	Akt 1/2/3	T308	—	—
B-B13, B14	p53	S46	DYC1043	DYC1489
A-C1, C2	TOR	S2448	—	DYC1665
A-C3, C4	CREB	S133	—	DYC2510
A-C5, C6	HSP27	S78/S82	DYC1580	DYC2314
A-C7, C8	AMPKα2	T172	—	—
A-C9, C10	β-Catenin	—	DYC1329	—
B-C11, C12	p70 S6 Kinase	T389	DYC8962	DYC896
B-C13, C14	p53	S15	DYC1043	DYC1839
B-C15, C16	c-Jun	S63	—	—
A-D1, D2	Src	Y419	—	DYC2685
A-D3, D4	Lyn	Y397	—	DYC3936
A-D5, D6	Lck	Y394	—	—
A-D7, D8	STAT2	Y689	—	—
A-D9, D10	STAT5a	Y694	—	—
B-D11, D12	p70 S6 Kinase	T421/S424	DYC8962	DYC8965
B-D13, D14	RSK1/2/3	S380/S386/S377	—	DYC889B
B-D15, D16	eNOS	S1177	—	—

Tabla II.5. Continuación de la tabla anterior para saber las proteínas y sitios de fosforilación que se estudian en cada uno de los puntos de las distintas membranas.

Membrane/ Coordinate	Target/Control	Phosphorylation Site	DuoSet® IC (Total) ELISA Development System	DuoSet® IC (Phospho) ELISA Development System
A-E1, E2	Fyn	Y420	—	—
A-E3, E4	Yes	Y426	—	DYC3929
A-E5, E6	Fgr	Y412	—	—
A-E7, E8	STAT6	Y641	—	—
A-E9, E10	STAT5b	Y699	—	—
B-E11, E12	STAT3	Y705	—	DYC4607B
B-E13, E14	p27	T198	DYC2256	—
B-E15, E16	PLC-γ1	Y783	—	—
A-F1, F2	Hck	Y411	—	—
A-F3, F4	Chk-2	T68	—	DYC1626
A-F5, F6	FAK	Y397	DYC4467	DYC4528
A-F7, F8	PDGF Rβ	Y751	DYC385	DYC3096
A-F9, F10	STAT5a/b	Y694/Y699	—	—
B-F11, F12	STAT3	S727	—	—
B-F13, F14	WNK1	T60	—	DYC4720
B-F15, F16	PYK2	Y402	—	—
A-G1, G2	Reference Spot	—	—	—
A-G3, G4	PRAS40	T246	—	DYC6890
A-G9, G10	PBS (Negative Control)	—	—	—
B-G11, G12	HSP60	—	DYC1800	—
B-G17, G18	PBS (Negative Control)	—	—	—

16. Análisis Array Quinasas.

Para el análisis del perfil de fosforilación de quinasas se realizó otra densitometría como se ha descrito en el apartado 13.1 de este mismo capítulo. Las diferencias residieron en el tratamiento previo de la imagen. Al ser una serie de puntos a comparar entre membranas distintas se requirió la realización de una plantilla generada mediante el software Fiji-ImageJ y el uso de ROI manager. Cada membrana estaba provista de controles negativos y positivos para poder cuantificar de forma relativa los resultados obtenidos en la imagen quimioluminiscente. Además cada elemento de estudio estaba por duplicado. Los controles positivos del ensayo se consideraron la señal máxima a partir de la cual se relativizaron el resto de medidas en porcentaje. Los controles negativos se consideraron el ruido a extraer de todas las medidas (Figura II.19).

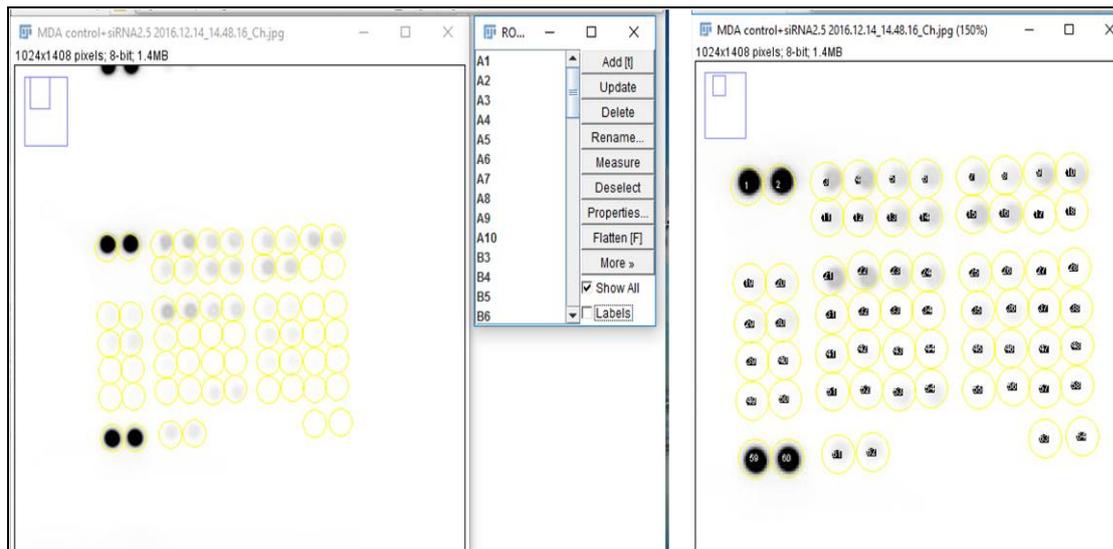


Fig. II.19. Análisis de las membranas del Array de quinasas fosforiladas. Se seleccionaron las zonas de interés, es decir, donde estaban los puntos con anticuerpos fijados usando el ROI manager se generó una plantilla para utilizarla en las membranas a comparar para igualar áreas de estudio. Se midió la intensidad de la señal y por comparación con las condiciones control se han obtenido los resultados.

17. Aislamiento, cuantificación y análisis del ARN.

Se han preparado las muestras de la misma forma que se ha descrito anteriormente en este mismo capítulo. Se transfectaron y en el día de máxima inhibición para las células MCF-7 se extrajo su ARN mensajero con RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) para la validación mediante PCR a tiempo real (qPCR). Posteriormente se analizó la extracción con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDropTech, Wilmington, DE, USA) midiendo concentración y relación de absorbancia a 260/280 y 260/230. Las muestras utilizadas fueron las que presentaban un rango de absorbancia de 260/280 >2.0 y 260/230 de 2.0-2.2 para asegurar una baja contaminación de proteínas y compuestos fenólicos que actúan como inhibidores de la reacción de PCR. Además se comprobó que las moléculas de ARN aisladas presentaban la calidad y concentración suficientes para hacer una PCR a tiempo real mediante un sistema electroforético capilar 2100 Bioanalyzer de Agilent Technologies mostrado en la figura II.20 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) ubicado en el Servicio de Biología Molecular (SAI) de la Universidad de Murcia. Este equipo permitió determinar la concentración, calidad y tamaño de ADN, ARN y proteínas. Combinaba la rapidez en la separación electroforética y el análisis de los datos, con una reproducibilidad, resolución y sensibilidad muy elevadas. Se utilizó un chip RNA 6000 Pico con una sensibilidad de 50-5000 pg/μl.

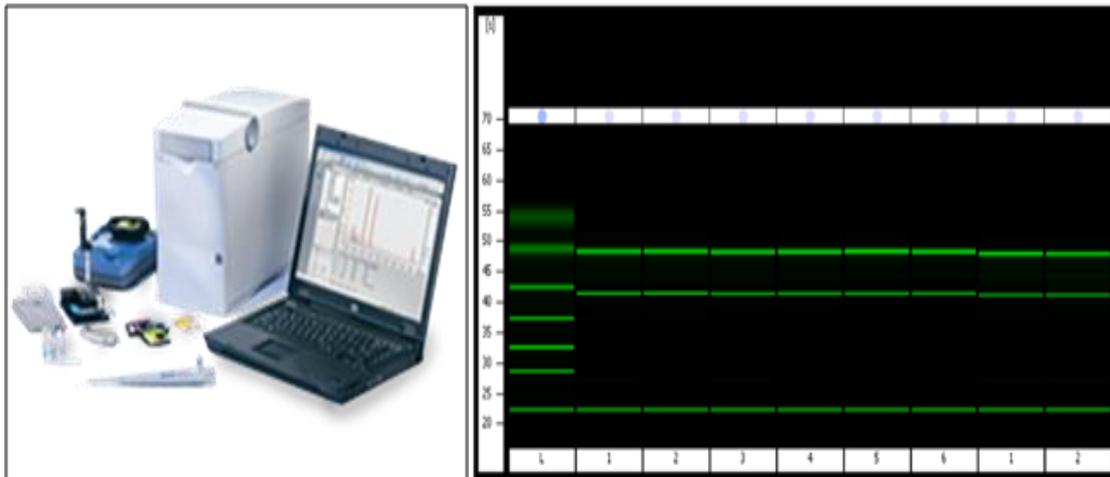


Figura II. 20. Imagen del bioanalizador de Agilent Technologies (izquierda) y representación de las muestras analizadas (derecha).

18. PCR a tiempo real (qPCR).

Una vez aisladas las muestras de ARNm y analizadas para asegurarnos que la muestra de partida posee la calidad necesaria se procedió a la obtención del cADN que se utilizó en la PCR a tiempo real (qPCR). El paso de conversión de ARN a ADN se llevó a cabo mediante RT-PCR (reacción de PCR con transcriptasa reversa) usando un kit comercial iScript Reverse Transcription Supermix (Bio- Rad Laboratories, Hercules, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Por otra parte, también fue necesario diseñar los oligos o cebadores para las diferentes reacciones de qPCR y se utilizó el software Primer Express® v3.0 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) (Tabla II.6). Los pares de oligonucleótidos pueden formar estructuras secundarias o dímeros, dicha tendencia se evaluó con el software OligoAnalyzer v1.0.3 (Freeware, Teemu Kuulasmaa, Finland) en la concentración final de sales a la que se trabajó que fue 50 mM. Además, se hicieron controles sin cADN (*No Template Controls*, NTCs) para comprobar la ausencia de estas formaciones ya que podían resultar como falsos positivos. La qPCR se realizó en el equipo 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) ubicado en el Servicio de Biología Molecular del SAI de la Universidad de Murcia.

Tabla II.6. Oligonucleótidos utilizados para los ensayos de qPCR y sus concentraciones.

RefSeq	NOMBRE GEN	SECUENCIAS OLIGONUCLEÓTIDOS	[nM] qPCR
NM_002046	GAPDH	5' ACATCGCTCAGACACCATG 3' TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG	100
NM_002737	PRKCA	5'TCCAGATTATATCGCCCCAGA 3' CCGGCAAGCATTTCATACAAC	100
NM_001042599	ERBB4	5'CAGATGCTACGGACCTTACG 3' AACACATGCTCCACTGTCAT	100
NM_001172646	PLCB4	5'AGATCGAAAGTGCTGACCAAG 3' GCTCATCTTCTACAGTGACCAG	100
NM_002736	PRKA2B	5'CTACAATCACTGCTACCTCTCC 3' TCTCTTTTTGGCATTGTTTTTAC	100
NM_005228	EGFR	5'CTGCTGCCACAACCAGT 3' TTCACATCCATCTGGTACGTG	200
NM_000888	ITGB6	5'TGGTGACCCCTGTA ACTCTA 3' AGAACCATCCTTTGAGAAATCTTC	100
NM_033023	PDGFA	5'CGTCCGCCAACTTCCTG 3' CTTCTGACGTATTCCACCCTT	200
NM_001174046	SPAM1	5'GAGACATTGGGTGGCTGGAT 3' AGGATTGTTTTTCAAGTTGCATCA	200
NM_005213	CSTA	5'ACTAGTCAAGCCTAATGCAACT 3' GTGAATTGATAGTCCACGATCCA	200

La sonda utilizada fue SYBR® Green (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) que es inespecífica e interacciona con la hendidura menor del ADN dando lugar a un complejo ADN-sonda que absorbe luz a 497 nm y emite fluorescencia con un máximo de 520 nm que puede ser cuantificado (Figura II.21). Al ser la sonda inespecífica las muestras se midieron en singleplex (cada muestra en un pocillo independiente), se realizaron curvas de calibración indirectas basadas en la cantidad inicial de ARN. Además se utilizó ROX™ como referencia pasiva. Finalmente, para cada gen y condición se llevaron a cabo duplicados técnicos y triplicados biológicos.

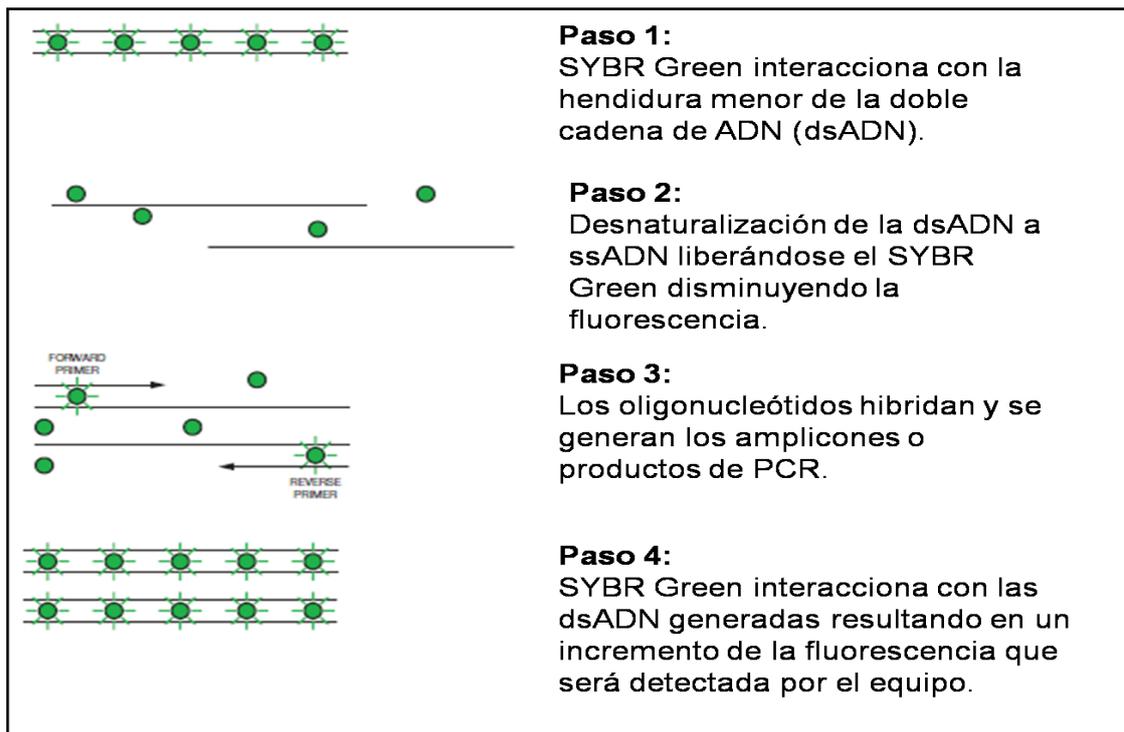


Figura II.21. Esquema funcionamiento de la sonda SYBR Green utilizada en los ensayos de qPCR. Esta sonda se une de forma inespecífica a las dobles cadenas de ADN (dsADN) como ocurre en el paso 1 y 4. En el primer paso se unirá pero al someter a las moléculas de dsADN a una desnaturalización (paso 2) se pierde esta interacción y permite que los oligos o cebadores hibriden para que se amplifiquen los fragmentos (paso 3). Finalmente en el último paso (4) obtendremos una amplificación de las moléculas de dsADN con el SYBR Green unido emitiendo una señal de fluorescencia medible por el equipo de qPCR (imagen tomada de www.thermofisher.com).

19. Análisis de las eficiencias y de los ratios de expresión relativa en qPCR.

Se realizó una cuantificación en términos absolutos. Se relacionó la señal de amplificación obtenida con el contenido en ADN mediante curvas de calibrado (Figura II.22). Para ello es necesario que la qPCR de la muestra y la de las muestras de la recta de calibrado posean la misma eficiencia de amplificación (E) (Bustin et al., 2013). Se calculó para cada gen a partir de la pendiente de la recta que representa de forma semilogarítmica el ciclo umbral (Ct) frente a los ng de ARN de partida (Applied biosystems, 2014). Así la eficiencia (E) se obtiene cómo se indica en la ecuación (1), será adimensional y comparable entre reacciones RT-Q-PCR:

$$E = 10^{\left(\frac{1}{\text{pendiente}}\right)} - 1 \quad (1)$$

Lo importante es que los genes de referencia sean reales, es decir, no sufran de variaciones con el tratamiento a estudiar. Se eligieron dos genes para normalizar, por un lado la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y por otro la molécula de adhesión espermática 1 o hialuronidasa PH-20 (SPAM1).

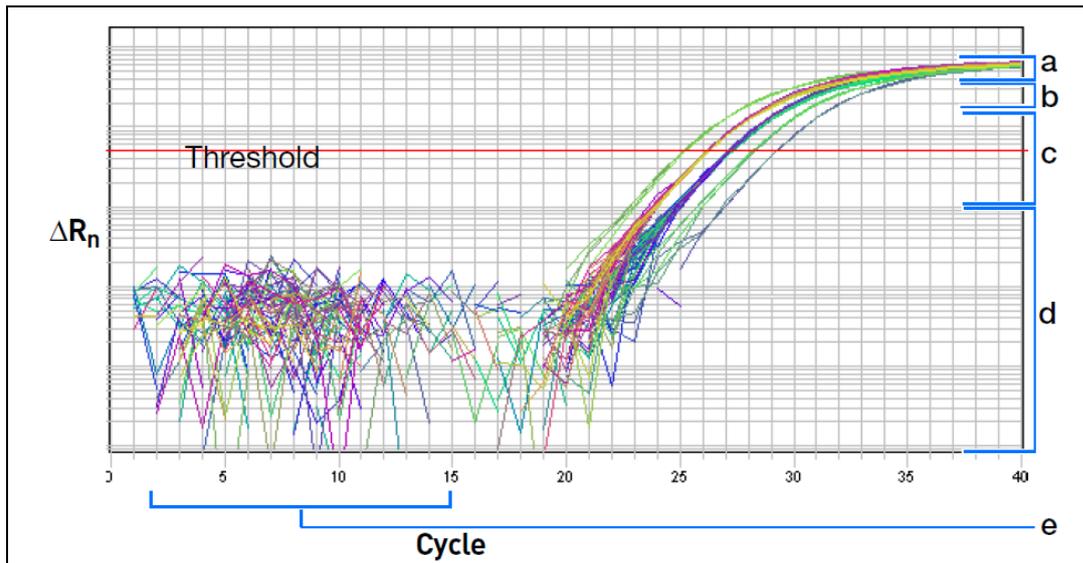


Figura II.22. Ejemplo de curva de amplificación. Vemos la fase de Plateau (a), la fase lineal (b), la fase exponencial (c), el ruido que se obtiene (d) y la línea de base que marca el inicio del rango de la fluorescencia (e).

Se utilizó la ratio (R) calculada con la expresión relativa de las eficiencias y los valores de Ct de los genes que se cuantificaron y los de referencia. Además para evitar las variaciones inespecíficas de la técnica se siguió el modelo matemático de eficiencias corregidas de la ecuación (2) (Filion Martin., 2012; M W Pfaffl, 2001).

$$R = \frac{(E_{obj})^{\Delta Ct_{obj} (control-siRNA)}}{(E_{ref})^{\Delta Ct_{ref} (control-siRNA)}} \quad (2)$$

Los datos obtenidos se analizaron con el software REST© 2009 y también para el cálculo de las expresiones relativas ($p < 0.05\%$). Dicho software realiza un test de aleatorización (*Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*©) que tiene la ventaja de calcular sin hacer suposiciones sobre la distribución de probabilidad de los datos (Filion Martin., 2012; Michael W Pfaffl, Horgan, & Dempfle, 2002).

20. Controles de calidad para el análisis del microarrays.

Antes de analizar los datos obtenidos de los microarrays se llevó a cabo el control de calidad del microarray (<http://arrayanalysis.org/main.html>). Para ello se realizó un análisis de comparación entre microarrays denominado PCA (en inglés: Principle Component Analysis) después de que los datos hayan sido normalizados con el algoritmo RMA (en inglés: Robust Multiarray Average). Se obtuvieron como se muestra en la figura II.23 los cinco microarrays que fueron seleccionados para su posterior análisis, en rojo los que pertenecían a las células control y en azul a los microarrays de las células a las que se les inhibió la expresión de PKC α .

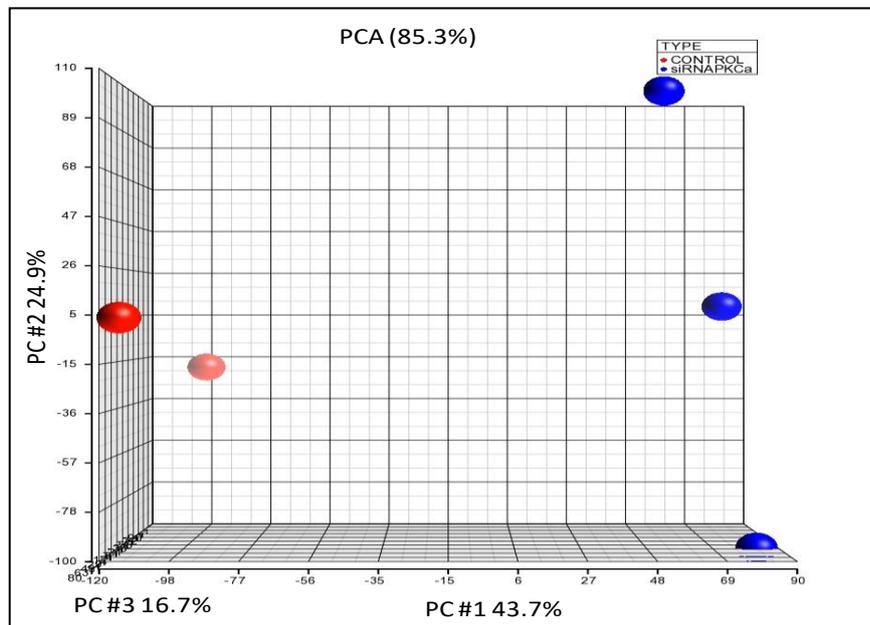


Figura II.23. Representación del análisis PCA (análisis de componentes principales) después de la normalización RMA. Las esferas de color rojo representan los microarrays de las células MCF-7 control y en azul se representan los microarrays de las células MCF-7 a las que se inhibió la expresión de PKC α . Las 5 esferas representan los microarrays analizados que explican el 85.3% de los datos.

Posteriormente se comprobó la distribución de los microarrays mediante el cálculo de expresiones relativas en escala logarítmica, llamado RLE (en inglés: Relative Log Expression). Estos valores son calculados para cada gen mediante la relación entre la expresión del gen estudiado y la mediana de todos los genes analizados. Se espera que no haya variaciones en el array resultando en proporciones alrededor de 0 y una distribución similar traduciéndose como datos con calidad suficiente para poder ser analizados. En el caso de los controles se observó la homogeneidad entre ellos (figura II.24 muestras 1 y 2), al igual que ocurrió en el caso de los tres microarrays para las células con la PKC α silenciada (figura II.24 muestras 3, 4 y 5).

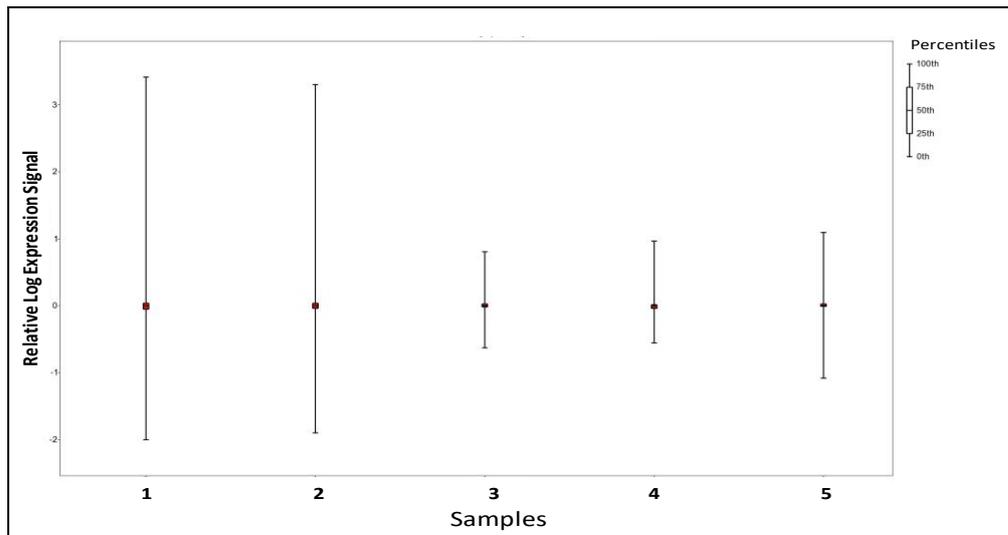


Figura II.24. Representación RLE plot (expresión relativa en escala logarítmica) de los microarrays analizados. Se representan los microarrays de las células control (1 y 2) y los de las células en ausencia de PKC α (3, 4 y 5).

Otros controles que se llevaron a cabo fue el control de integridad del ARN, que verifica el estado de las moléculas ya que se podrían haber visto afectadas en el proceso de preparación y que estuvieran fragmentadas. Se representa en la figura II.25 la intensidad media de cada gen con respecto a la intensidad del conjunto de genes. En Affymetrix se realizan normalmente varias pruebas para el mismo gen, comprobando así, si está íntegro. La degradación comienza en el extremo 5', esperando que las intensidades globales obtenidas sean menores que las de 3'. Si la degradación del ARN es alta, se obtendrían pendientes desde 5' a 3' en las curvas de intensidad. En nuestro caso no se observó dicha degradación (figura II.25). Además, también se realizaron controles de marcaje y de hibridación previos al análisis de los datos.

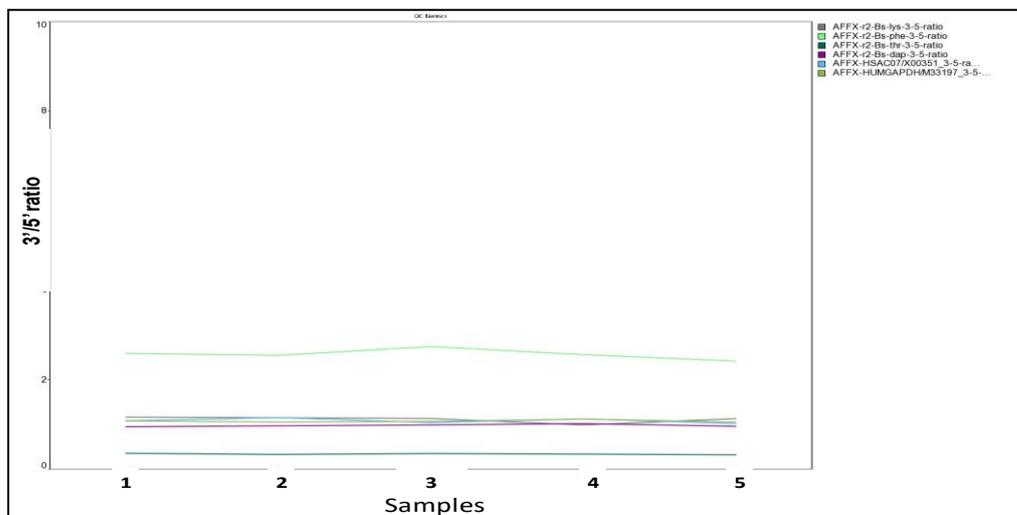


Figura II.25. Control de calidad del ARN usado en los microarrays. Se representan las intensidades medias de las sondas de Affymetrix para comprobar si hay degradación. 1 y 2 son los microarrays de las células control y 3, 4 y 5 son los microarrays de las células con la expresión de PKC α inhibida.

21. Análisis estadístico.

La significación estadística se evaluó mediante el test de la distribución t de Student, D'Agostino & Pearson omnibus normality test ($\alpha=0.05$), Kruskal-Wallis, χ^2 y el análisis de la varianza, en los casos en los que cada uno de estos análisis pudiera aplicarse. El valor de $p<0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Estos análisis se realizaron gracias al uso del programa GraphPad (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

CAPÍTULO III

CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LA HIPERFORINA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA EN AUSENCIA DE PKC α

“Esta tesis doctoral está sometida a procesos de protección o transferencia de tecnología o de conocimiento, por lo que los siguientes contenidos están inhibidos en la publicación en los repositorios institucionales.

Autorizado por la Comisión General de Doctorado de la Universidad de Murcia con fecha 9 de mayo de 2017”

RESUMEN

La isoforma clásica α de la familia de las PKC posee un importante papel en el cáncer de mama, en la mayoría de los casos se encuentra sobre-expresada favoreciendo la supervivencia y desarrollo de los tumores. Por otra parte, la hiperforina es un fluoroglucinol que se encuentra en la hierba de San Juan *Hypericum perforatum* L. Este compuesto posee muy diversas propiedades entre las que se encuentra su capacidad anti-tumoral. Por ello, en este capítulo se diseñó una terapia combinada basada en la inhibición de la expresión de PKC α junto con el tratamiento de hiperforina. Así, se consiguió inhibir la proliferación celular de la línea de cáncer de mama MDA-MB-231 con una concentración baja de hiperforina, teniendo así un tratamiento con menor toxicidad. Además, este tratamiento combinado aumentó los niveles de apoptosis y la síntesis de proteínas marcadoras de los procesos de autofagia. Los resultados de este capítulo sugieren que PKC α e hiperforina pueden cooperar en alguna de las rutas de sus mecanismos de acción.

CAPÍTULO IV

CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LA SALINOMICINA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA EN AUSENCIA DE PKC α

“Esta tesis doctoral está sometida a procesos de protección o transferencia de tecnología o de conocimiento, por lo que los siguientes contenidos están inhibidos en la publicación en los repositorios institucionales.

Autorizado por la Comisión General de Doctorado de la Universidad de Murcia con fecha 9 de mayo de 2017”

RESUMEN

La salinomicina es un ionóforo de potasio con propiedades antibióticas aislado de *Streptomyces albus*. Recientemente se ha descubierto su efecto anti-tumoral porque consiguió reducir 300 veces más la proporción de células madre de cáncer en comparación con el paclitaxel. Por otra parte, la isoforma clásica α de la familia de las PKC posee un importante papel en el cáncer de mama, en la mayoría de los casos se encuentra sobre-expresada favoreciendo la supervivencia y desarrollo de los tumores. En este capítulo se diseñó una terapia combinada que consistió en la inhibición de la expresión de PKC α y el tratamiento con hiperforina en dos líneas modelo de cáncer de mama como son MCF-7 y MDA-MB-231. Se consiguió inhibir la capacidad proliferativa en ambos casos. Además, se observó el incremento en los niveles de apoptosis y el aumento en la síntesis de proteínas marcadoras de autofagia como LC3B. Los resultados sugieren que la salinomicina junto a PKC α podrían ser un buen tratamiento para este tipo de patologías siendo necesarios futuros estudios.

CAPÍTULO V

VALIDACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICO EN LAS CÉLULAS MCF-7 EN AUSENCIA DE PKC α

“Esta tesis doctoral está sometida a procesos de protección o transferencia de tecnología o de conocimiento, por lo que los siguientes contenidos están inhibidos en la publicación en los repositorios institucionales.

Autorizado por la Comisión General de Doctorado de la Universidad de Murcia con fecha 9 de mayo de 2017”

RESUMEN

El estudio del perfil de expresión génica de células y tejidos ha supuesto uno de los avances más importantes en medicina permitiendo analizar los cambios que ocurren en patologías como el cáncer de mama estudiado en este capítulo. Tras comprobar que el papel de PKC α es clave en esta patología, se decidió analizar este tipo de estudio en la línea celular MCF-7. En este capítulo se han validado los resultados del microarray mediante qPCR y se diseñó una terapia combinada basada en los cambios observados en el perfil génico tras la inhibición de PKC α . Esto se realizó mediante el uso de inhibidores específicos contra proteínas sobre-expresadas en las rutas activadas como consecuencia de la ausencia de PKC α . Esta terapia fue validada mediante ensayos de proliferación, migración y apoptosis. Además, se realizó un estudio de los cambios registrados en el perfil de fosforilación en esta línea celular al inhibir la expresión de PKC α , dejando clara su posición estratégica en este tipo de patologías.

CAPÍTULO VI

CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS RABFILINA-3A Y SNAP25 EN CÉLULAS PC12

“Esta tesis doctoral está sometida a procesos de protección o transferencia de tecnología o de conocimiento, por lo que los siguientes contenidos están inhibidos en la publicación en los repositorios institucionales.

Autorizado por la Comisión General de Doctorado de la Universidad de Murcia con fecha 9 de mayo de 2017”

RESUMEN

Numerosas proteínas involucradas en la liberación de los neurotransmisores comparten un dominio regulador estructural como es el dominio C2. Rabfilina3A es una de estas proteínas y está involucrada en la regulación de la exocitosis de vesículas regulada por Ca^{2+} en neuronas y células endocrinas, pero su función exacta está aún por determinar. Nuestro grupo en colaboración con el IBMB-CSIC ha determinado las estructuras cristalinas de los complejos formados por el C2B de rabfilina3A con SNAP25 y C2B con fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP_2). En este capítulo se ha utilizado el ensayo de ligación por proximidad (PLA) para caracterizar los mecanismos moleculares que median la interacción de Rabfilina3A con SNAP25 en células PC12. Además, también se ha conseguido caracterizar la unión *in vitro* mediante la técnica de resonancia de plasmón de superficie (SPR) del dominio C2AB de rabfilina3A con SNAP25. Por otro lado, se ha determinado que el tándem de dominios C2AB posee un efecto sobre la curvatura y fusión de membranas lipídicas SUV, compuestas por POPC/POPS/ PIP_2 y visualizadas mediante tinción negativa con microscopía electrónica de transmisión (TEM).

CAPÍTULO VII

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

1. Discusión General.

Las proteínas de membrana engloban las denominadas proteínas periféricas de membrana. Son proteínas que se asocian de modo transitorio con las membranas a través de interacciones o mecanismos basados en un equilibrio dinámico de las superficies de interacción o modificaciones post-traduccionales como GPI, palmitoilaciones o miristilaciones (Basso et al., 2016). Además, la regulación del funcionamiento de estas proteínas permite controlar los procesos celulares y evitar el desarrollo de patologías. Además, las proteínas periféricas de membrana o simples dominios tienen la capacidad de difundir libremente desde el citosol a la membrana plasmática u otras membranas intracelulares donde ejercen su función determinada.

Los dominios C2 son un ejemplo de dominios periféricos de membrana que presentan mecanismo de doble diana y son descritos junto con los dominios C1 de la familia de la proteína quinasa C (PKC) como las primeras proteínas periféricas de membrana, pudiendo responder a diacilglicerol (DAG) y calcio y traslocar la PKC a la membrana plasmática para ejercer su función (Oancea & Meyer, 1998).

En esta tesis doctoral se ha trabajado con dos ejemplos de proteínas que comparten en su estructura el dominio regulador periférico C2, como son la isoforma clásica PKC α y la proteína Rabfilina-3A.

Por un lado, se ha estudiado el potencial de dos compuestos que son la hiperforina y la salinomicina como posibles fármacos para el tratamiento del cáncer de mama con las líneas modelo para el tratamiento quimioterápico y hormonal MDA-MB-231 y MCF-7, respectivamente y su relación con PKC α .

La inhibición de la expresión de PKC α consigue reducir al 50% y al 20% la capacidad proliferativa en las células MCF-7 y MDA-MB-231, respectivamente. La hiperforina posee un efecto anti-tumoral, debido a que reduce la proliferación y es pro-apoptótica. Además, induce la expresión de proteínas marcadoras del proceso de autofagia. Cuando este tratamiento se empleó junto con la inhibición de PKC α se consiguió una reducción total de la capacidad proliferativa de forma más rápida y a menor concentración de ésta, pudiendo reducir los niveles de toxicidad. El mismo efecto ocurrió con los niveles de apoptosis. Los datos sugieren que la hiperforina comparta algún mecanismo de acción con la PKC α en el proceso de proliferación y de apoptosis de la línea celular MDA-MB-231.

En el caso de la salinomicina los resultados confirmaron que el tratamiento con salinomicina en las células MCF-7 y MDA-MB-231 redujo de forma muy significativa la capacidad de proliferación. Al combinar este tratamiento con la

ausencia de PKC α se pudo obtener la inhibición de dicha capacidad a menor concentración de salinomicina evitando los problemas de citotoxicidad observados *in vivo*. La relación de la salinomicina y la apoptosis ha sido ampliamente descrita en multitud de cánceres incluyendo el de mama y resultó igualmente efectiva presentando un efecto pro-apoptótico en ambas líneas celulares, pero sin efecto cooperativo con la ausencia de PKC α . Se estudió también el efecto en el proceso de autofagia mediante la expresión de proteínas marcadoras como es LC3B e indujo un incremento en los niveles de expresión para esta proteína. Además, interesa remarcar que la salinomicina provoca la recuperación de la sensibilidad a tratamientos quimioterápicos mediante la inhibición de genes como la proteína de resistencia en el cáncer de mama (BCRP) y proteínas de resistencia múltiple a fármacos (MDR). Se requerirán más investigaciones para comprender y descubrir el mecanismo de acción de hiperforina y de salinomicina.

Debido a que PKC α posee un importante papel en el cáncer de mama ya que en la mayoría de los casos se encuentra sobre-expresada favoreciendo la supervivencia y desarrollo de los tumores se realizó un estudio del perfil génico de las células MCF-7 con el fin de comprender que cambios ocurrían en el genoma al inhibir la expresión de PKC α . En esta tesis doctoral se han validado los resultados mediante qPCR y se realizó el diseño y validación de una terapia combinada con la inhibición de otros genes (PLC β 4, PKA, ErbB4 y PDGFR) que se veían sobre-expresados como consecuencia de la ausencia de PKC α . Los resultados obtenidos sobre el efecto en la capacidad de proliferación, migración y apoptosis en ausencia de PKC α y los inhibidores específicos confirman nuestra hipótesis de un posible efecto sinérgico de esta estrategia. Además, se estudió el perfil de fosforilaciones en las células MCF-7. Se observó un descenso generalizado de la fosforilación relativa a las quinasas estudiadas al inhibir la expresión de PKC α y eran comparadas con las células control. Destacando entre ellas la familia de proteínas STAT o mTOR. Los resultados obtenidos bajo esta estrategia sugieren que las propias células MCF-7 tratan de compensar los cambios que la ausencia de PKC α provoca. Inhibir la expresión de PKC α supone una bajada en la capacidad de proliferación, en la migración y una inducción de apoptosis, que combinada con los inhibidores empleados se puede considerar como potencial terapia efectiva en el tratamiento para cáncer de mama.

El otro ejemplo de proteína que comparte en su estructura un dominio periférico de membrana es rabfilina3A. En este caso, la proteína posee un tándem que consiste en dos dominios C2, C2A y C2B. Las interacciones observadas por las diferentes técnicas entre la α -hélice del C2B de rabfilina y la región N-terminal de la proteína SNAP25 tienen lugar tanto en el citosol como en la membrana plasmática. Nuestro grupo ha determinado las estructuras cristalinas de los complejos formados por el C2B de rabfilina3A con SNAP25 y

C2B con fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP₂) en colaboración con el grupo de la Dra. Verdaguer (Instituto de Biología Molecular de Barcelona-IBMB-CSIC). Estas estructuras junto con los ensayos bioquímicos realizados para su caracterización mostraron como el dominio C2 de rabfilina3A requiere la cooperación de PIP₂/Ca²⁺ y SNAP25 para unirse a la membrana plasmática. En este capítulo se ha utilizado el ensayo de ligación por proximidad (PLA) para caracterizar los mecanismos moleculares que median la interacción de Rabfilina3A-SNAP25 en células PC12, así se determinaron los residuos implicados en la interacción de estas dos proteínas que son K651A/K656A/K663A/H617A para rabfilina3A y para el SNAP25 son E38A/D41A/R45A. También se determinó que esta interacción es un mecanismo dependiente de la unión a PIP₂ a través de la misma técnica de PLA. Por otro lado, se caracterizó *in vitro* la interacción mediante resonancia de plasmón de superficie (SPR) permitiendo calcular la constante de disociación. Además, se demostró el efecto que el C2AB tiene sobre la curvatura y fusión de membranas lipídicas (SUV) dependiente de la unión a PIP₂ y a Ca²⁺ mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Los resultados sugieren un modelo que explicaría como rabfilina3A regula en varios pasos el proceso de fusión de vesículas de núcleo denso en las células PC12. La presencia de calcio podría promover la interacción con los fosfolípidos cargados negativamente a través de las regiones de unión a calcio del C2B de rabfilina, forzando a los dominios a interaccionar con la membrana a través de un punto adicional, distorsionando así la curvatura de la membrana. La nueva conformación adquirida se explica por la unión a PIP₂ a través de la región polibásica de los dominios C2 contribuyendo así a la deformación de la membrana.

2. Conclusiones.

El estudio realizado con los dos ejemplos de proteínas que comparten el dominio C2 en su estructura, contribuye a ampliar el conocimiento acerca del mecanismo molecular que tiene lugar en dos contextos celulares diferentes. Por un lado, en el cáncer de mama para PKC α mediante el uso de líneas celulares modelo como son MCF-7 y MDA-MB-231 y por otro, en la liberación de vesículas para rabfilina3A en células PC12. Así se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Se ha demostrado el efecto anti-proliferativo, pro-apoptótico y pro-autofágico de la hiperforina en células de cáncer de mama MDA-MB-231.
2. La inhibición de la expresión de PKC α en combinación con el tratamiento de hiperforina consigue alcanzar una reducción total de la capacidad proliferativa de las células MDA-MB-231. El efecto pro-apoptótico y pro-autofágico de la hiperforina no se ve alterado por la ausencia de PKC α .
3. La salinomicina es capaz de inhibir la capacidad proliferativa, incrementar los niveles de apoptosis y de síntesis de proteínas marcadoras de autofagia como es LC3B en las líneas celulares de mama MCF-7 y MDA-MB-231.
4. Los efectos de salinomicina sobre estas células pueden ser mejorados cuando se inhibe la expresión de PKC α , pudiendo bajar la dosis empleada de salinomicina y por tanto la toxicidad del tratamiento.
5. Se ha validado mediante qPCR el silenciamiento de PKC α mediante siRNA en las células MCF-7, así como la sub-expresión de los genes EGFR e ITGB6 apoyando así los resultados obtenidos por el microarray.
6. El uso de inhibidores específicos de las proteínas (PLC β 4, PKA, ErbB4 y PDGFR), cuyos genes habían resultado sobre-expresados en el microarray debido a la ausencia de PKC α , confirmaron nuestra hipótesis de un posible efecto sinérgico en la capacidad proliferativa, de migración y apoptosis cuando se combina con la inhibición de la expresión de PKC α .

7. El silenciamiento de PKC α provoca una disminución general en los niveles de fosforilación relativa a diferentes familias de quinasas estudiadas: la familia proteínas STAT, la quinasa de adhesión focal (FAK), mTOR, HSP60, PRAS40 y dos aumentos de los niveles de fosforilación que son ERK1/2 y p53.
8. Se confirmaron los residuos implicados en la interacción de rabfilina3A con SNAP25. Los residuos de rabfilina3A se encuentran en el α -hélice del dominio C2B y son K651A/K656A/K663A/H617A y los residuos de SNAP25 son E38A/D41A/R45A y están en el extremo N-terminal. Esto se determinó mediante ensayos de ligación por proximidad (PLA) en células PC12.
9. También se confirmó que la interacción de rabfilina3A y SNAP25 es un mecanismo dependiente de la unión a PIP₂ a través del tándem C2AB de rabfilina mediante la misma técnica de PLA.
10. Se caracterizó *in vitro* la interacción mediante resonancia de plasmón de superficie (SPR) permitiendo calcular la constante de disociación $K_D = 1 \mu\text{M}$.
11. Además, se demostró que el C2AB de rabfilina3A tiene efecto sobre la curvatura y fusión de membranas lipídicas (SUV) dependiente de la unión a PIP₂ y a Ca²⁺ mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).

BIBLIOGRAFÍA

- Abeyweera, T. P., Chen, X., & Rotenberg, S. A. (2009). Phosphorylation of alpha6-tubulin by protein kinase Calpha activates motility of human breast cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(26), 17648–56. <https://doi.org/10.1074/jbc.M902005200>
- Agostinis, P., Vantieghem, A., Merlevede, W., & de Witte, P. A. M. (2002). Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34(3), 221–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11849990>
- Agranoff, B. W., Bradley, R. M., & Brady, R. O. (n.d.). The Enzymatic Synthesis of Inositol Phosphatide*. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/233/5/1077.full.pdf>
- Akimoto, K., Mizuno, K., Osada, S., Hirai, S., Tanuma, S., Suzuki, K., & Ohno, S. (1994). A new member of the third class in the protein kinase C family, PKC lambda, expressed dominantly in an undifferentiated mouse embryonal carcinoma cell line and also in many tissues and cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(17), 12677–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7513693>
- Aleman, M., Magdesian, K. G., Peterson, T. S., & Galey, F. D. (2007). Salinomycin toxicosis in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 230(12), 1822–1826. <https://doi.org/10.2460/javma.230.12.1822>
- An, H., Kim, J. Y., Oh, E., Lee, N., Cho, Y., & Seo, J. H. (2015). Salinomycin Promotes Anoikis and Decreases the CD44+/CD24- Stem-Like Population via Inhibition of STAT3 Activation in MDA-MB-231 Cells. *PLoS One*, 10(11), e0141919. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141919>
- Applied biosystems. (n.d.). Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR. *White Paper*.
- Arafat, K., Iratni, R., Takahashi, T., Parekh, K., Al Dhaheri, Y., Adrian, T. E., & Attoub, S. (2013). Inhibitory Effects of Salinomycin on Cell Survival, Colony Growth, Migration, and Invasion of Human Non-Small Cell Lung Cancer A549 and LNM35: Involvement of NAG-1. *PLoS ONE*, 8(6), e66931. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066931>
- Arora, A., & Tamm, L. K. (2001). Biophysical approaches to membrane protein structure determination. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(5), 540–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11785753>
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., ... Sherlock, G. (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, 25(1), 25–29. <https://doi.org/10.1038/75556>
- Ausili, A., Corbalán-García, S., Gómez-Fernández, J. C., & Marsh, D. (2011). Membrane docking of the C2 domain from protein kinase Cα as seen by polarized ATR-IR. The role of PIP₂. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808(3), 684–95. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.11.035>
- Avato, P., Raffo, F., Guglielmi, G., Vitali, C., & Rosato, A. (2004). Extracts from St John's wort and their antimicrobial activity. *Phytotherapy Research*, 18(3), 230–232. <https://doi.org/10.1002/ptr.1430>
- Bacallao, R., & Stelzer, E. H. (1989). Preservation of biological specimens for observation in a confocal fluorescence microscope and operational principles of confocal fluorescence microscopy. *Methods in Cell Biology*, 31, 437–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2674628>
- Baldini, G., Martelli, A. M., Tabellini, G., Horn, C., Machaca, K., Narducci, P., & Baldini, G. (2005). Rabphilin Localizes with the Cell Actin Cytoskeleton and Stimulates Association of Granules with F-actin Cross-linked by -Actinin. *Journal of Biological Chemistry*, 280(41), 34974–34984. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502695200>
- Basso, L. G. M., Mendes, L. F. S., & Costa-Filho, A. J. (2016). The two sides of a lipid-protein story. *Biophysical Reviews*, 8(2), 179–191. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0199-5>
- BATES, S. E., VALVERIUS, E. M., ENNIS, B. W., BRONZERT, D. A., SHERIDAN, J. P.,

- STAMPFER, M. R., ... DICKSON, R. B. (1990). Expression of the Transforming Growth Factor- α /Epidermal Growth Factor Receptor Pathway in Normal Human Breast Epithelial Cells. *Endocrinology*, 126(1), 596–607. <https://doi.org/10.1210/endo-126-1-596>
- Beerhues, L. (2006). Hyperforin. *Phytochemistry*, 67(20), 2201–2207. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.08.017>
- Billard, C., Merhi, F., & Bauvois, B. (2013). Mechanistic insights into the antileukemic activity of hyperforin. *Current Cancer Drug Targets*, 13(1), 1–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22924417>
- Biol, N. J. M., Ochoa, W. F., Corbalán-garcía, S., Eritja, R., Rodríguez-alfaro, J. A., Gómez-fernández, J. C., & Verdaguer, N. (2002). Additional Binding Sites for Anionic Phospholipids and Calcium Ions in the Crystal Structures of Complexes of the C2 Domain of Protein Kinase C α , 320(2), 277–291. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00464-3](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00464-3)
- Bolsover, S. R., Gomez-fernandez, J. C., & Corbalan-garcia, S. (2003). Role of the Ca²⁺ / Phosphatidylserine Binding Region of the C2 Domain in the Translocation of Protein Kinase C α to the Plasma Membrane *, 278(12), 10282–10290. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212145200>
- Bosco, R., Melloni, E., Celeghini, C., Rimondi, E., Vaccarezza, M., & Zauli, G. (2011). Fine tuning of protein kinase C (PKC) isoforms in cancer: shortening the distance from the laboratory to the bedside. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 11(3), 185–99. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21534929>
- Brunger, A. T., Weninger, K., Bowen, M., & Chu, S. (2009). Single-molecule studies of the neuronal SNARE fusion machinery. *Annual Review of Biochemistry*, 78(1), 903–28. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.070306.103621>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., ... Vandesompele, J. (2013). The need for transparency and good practices in the qPCR literature. *Nature Publishing Group*, 10. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2697>
- Caiazza, F., Elliott, L., Fennelly, D., Sheahan, K., Doherty, G. A., & Ryan, E. J. (2015). Targeting EGFR in metastatic colorectal cancer beyond the limitations of KRAS status: alternative biomarkers and therapeutic strategies. *Biomarkers in Medicine*, 9(4), 363–375. <https://doi.org/10.2217/bmm.15.5>
- Caiazza, F., Harvey, B. J., & Thomas, W. (2010). Cytosolic Phospholipase A₂ Activation Correlates with HER2 Overexpression and Mediates Estrogen-Dependent Breast Cancer Cell Growth. *Molecular Endocrinology*, 24(5), 953–968. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0293>
- Cailleau, R., Young, R., Olivé, M., & Reeves, W. J. (1974). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *Journal of the National Cancer Institute*, 53(3), 661–74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4412247>
- Callaway, T. R., & Oliver, S. P. (2009). On-Farm Strategies to Reduce Foodborne Pathogen Contamination. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(7), 753–753. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.9996>
- Carmona-Saez, P., Chagoyen, M., Tirado, F., Carazo, J. M., & Pascual-Montano, A. (2007). GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists, 8(1). <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-1-r3>
- Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U., & Nishizuka, Y. (1982). Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(13), 7847–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7085651>
- Chaachouay, H., Ohneseit, P., Toulany, M., Kehlbach, R., Multhoff, G., & Rodemann, H. P. (2011). Autophagy contributes to resistance of tumor cells to ionizing radiation. *Radiotherapy and Oncology*, 99(3), 287–292. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2011.06.002>
- Chapman, H. D., Jeffers, T. K., & Williams, R. B. (2010). Forty years of monensin for the

- control of coccidiosis in poultry. *Poultry Science*, 89(9), 1788–1801. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-00931>
- Chen, X., Zhao, X., Abeyweera, T. P., & Rotenberg, S. A. (2012). Analysis of substrates of protein kinase C isoforms in human breast cells by the traceable kinase method. *Biochemistry*, 51(36), 7087–97. <https://doi.org/10.1021/bi300999c>
- CHIANG, I.-T., CHEN, W.-T., TSENG, C.-W., CHEN, Y.-C., KUO, Y.-C., CHEN, B.-J., ... WANG, W.-S. (2017). Hyperforin Inhibits Cell Growth by Inducing Intrinsic and Extrinsic Apoptotic Pathways in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Anticancer Research*, 37(1), 161–168. <https://doi.org/10.21873/anticancer.11301>
- Choghaei, E., Khamisipour, G., Falahati, M., Naeimi, B., Mossahebi-Mohammadi, M., Tahmasebi, R., ... Hashemi, Z. S. (2016). Knockdown of microRNA-29a Changes the Expression of Heat Shock Proteins in Breast Carcinoma MCF-7 Cells. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 23(1), 69–78. <https://doi.org/10.3727/096504015X14478843952906>
- Chung, S. H., Song, W. J., Kim, K., Bednarski, J. J., Chen, J., Prestwich, G. D., & Holz, R. W. (1998). The C2 domains of Rabphilin3A specifically bind phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate containing vesicles in a Ca²⁺-dependent manner. In vitro characteristics and possible significance. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(17), 10240–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9553075>
- Chung, S. S., Adekoya, D., Enenmoh, I., Clarke, O., Wang, P., Sarkyssian, M., ... Vadgama, J. V. (2017). Salinomycin Abolished STAT3 and STAT1 Interactions and Reduced Telomerase Activity in Colorectal Cancer Cells, 454. <https://doi.org/10.21873/anticancer.11336>
- Conesa-Zamora et al. (2001). Identification of the Phosphatidylserine Binding Site in the C2 Domain that Is Important for PKC R Activation and in Vivo Cell Localization †, 13898–13905.
- Cooke, M., Magimaidas, A., Casado-Medrano, V., & Kazanietz, M. G. (2017). Protein kinase C in cancer: The top five unanswered questions. *Molecular Carcinogenesis*, (January). <https://doi.org/10.1002/mc.22617>
- Coppola, T., Hirling, H., Perret-Menoud, V., Gattesco, S., Catsicas, S., Joberty, G., ... Regazzi, R. (2001). Rabphilin dissociated from Rab3 promotes endocytosis through interaction with Rabaptin-5. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 9), 1757–64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11309205>
- Corbalan-García, S., & Gomez-Fernandez, J. C. (2014). Classical protein kinases C are regulated by concerted interaction with lipids: the importance of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Biophys. Rev.*, 6(1), 3–14. <https://doi.org/10.1007/s12551-013-0125-z>
- Corbalan-García, S., & Gómez-Fernández, J. C. (2014). Signaling through C2 domains: More than one lipid target ☆. *BBA - Biomembranes*, 1838, 1536–1547. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.008>
- Corbalán-García, S., & Gómez-Fernández, J. C. (2006). Protein kinase C regulatory domains: the art of decoding many different signals in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1761(7), 633–54. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.04.015>
- Corbalán-García, S., Guerrero-Valero, M., Marín-Vicente, C., & Gómez-Fernández, J. C. (2007). The C2 domains of classical/conventional PKCs are specific PtdIns(4,5) P₂-sensing domains. *Biochemical Society Transactions*, 35(5), 1046–1048. <https://doi.org/10.1042/BST0351046>
- Corder, G. W., & Foreman, D. I. (2011). Nonparametric Statistics: An Introduction. In *Nonparametric Statistics for Non-Statisticians* (pp. 1–11). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118165881.ch1>
- Coussens, L., Parker, P. J., Rhee, L., Yang-Feng, T. L., Chen, E., Waterfield, M. D., ... Ullrich, A. (1986). Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science (New York, N.Y.)*, 233(4766), 859–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3755548>

- Cubas, R., Zhang, S., Li, M., Chen, C., & Yao, Q. (2010). Trop2 expression contributes to tumor pathogenesis by activating the ERK MAPK pathway. *Molecular Cancer*, 9(1), 253. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-253>
- Dalfó, E., Barrachina, M., Rosa, J. L., Ambrosio, S., & Ferrer, I. (2004). Abnormal alpha-synuclein interactions with rab3a and rabphilin in diffuse Lewy body disease. *Neurobiology of Disease*, 16(1), 92–7. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.01.001>
- Das, J., Ramani, R., & Suraju, M. O. (2016). Polyphenol compounds and PKC signaling. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1860(10), 2107–2121. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.06.022>
- Deák, F., Shin, O.-H., Kavalali, E. T., & Südhof, T. C. (2006). Cellular/Molecular Structural Determinants of Synaptobrevin 2 Function in Synaptic Vesicle Fusion. *Journal of Neuroscience*, 26(25), 6668–6676. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5272-05.2006>
- Deák, F., Shin, O.-H., Tang, J., Hanson, P., Ubach, J., Jahn, R., ... Südhof, T. C. (2006). Rabphilin regulates SNARE-dependent re-priming of synaptic vesicles for fusion. *The EMBO Journal*, 25(12), 2856–66. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601165>
- Deak, F., Shin, O. H., Tang, J., Hanson, P., Ubach, J., Jahn, R., ... Südhof, T. C. (2006). Rabphilin regulates SNARE-dependent re-priming of synaptic vesicles for fusion. *Embo J*, 25(12), 2856–2866. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601165>
- Dewangan, J., Srivastava, S., & Rath, S. K. (2017). Salinomycin: A new paradigm in cancer therapy. *Tumor Biology*, 39(3), 101042831769503. <https://doi.org/10.1177/1010428317695035>
- Di Paolo, G., & De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*, 443(7112), 651–7. <https://doi.org/10.1038/nature05185>
- Disatnik, M.-H., Buraggi, G., & Mochly-Rosen, D. (1994). Localization of Protein Kinase C Isozymes in Cardiac Myocytes. *Experimental Cell Research*, 210(2), 287–297. <https://doi.org/10.1006/excr.1994.1041>
- Dopazo, J. (2006). Functional Interpretation of Microarray Experiments. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 10(3), 398–410. <https://doi.org/10.1089/omi.2006.10.398>
- Driedger, P. E., & Blumberg, P. M. (1980). Specific binding of phorbol ester tumor promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(1), 567–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6965793>
- Driscoll, P. C., & Vuidepot, A. L. (1999). Peripheral membrane proteins: FYVE sticky fingers. *Current Biology: CB*, 9(22), R857-60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10574756>
- Eblen, S. T., Kumar, N. V., Shah, K., Henderson, M. J., Watts, C. K. W., Shokat, K. M., & Weber, M. J. (2003). Identification of Novel ERK2 Substrates through Use of an Engineered Kinase and ATP Analogs. *Journal of Biological Chemistry*, 278(17), 14926–14935. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300485200>
- Ebrey, R. J. (1999). Antibacterial activity of hyperforin from St John's wort. *The Lancet*, 354(9180), 777. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)76020-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)76020-7)
- Everitt, B. S. (1994). Book reviews : Fisher LD, van Belle G 1993: Biostatistics: a methodology for the health sciences. New York: John Wiley and Sons. 991pp. £62.00 (\$86.50). ISBN 0 471 584657. *Statistical Methods in Medical Research*, 3(1), 103–103. <https://doi.org/10.1177/096228029400300107>
- Falke, J. J., & Ziemba, B. P. (2014). Interplay between phosphoinositide lipids and calcium signals at the leading edge of chemotaxing ameboid cells. *Chemistry and Physics of Lipids*, 182, 73–9. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2014.01.002>
- Farah, C. A., & Sossin, W. S. (2012). The role of C2 domains in PKC signaling. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2_29
- Filion Martin. (2012). *Quantitative real-time PCR in applied microbiology*. Caister

- Academic Press. Retrieved from <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=i-NqN530zhQC&oi=fnd&pg=PR5&dq=Filion+M.+Quantitative+real-time+PCR+in+applied+microbiology.+2012.+Norfolk:+Caister+Academic&ots=idPGhVtAT6&sig=tnBD2XM7uNfP7JGp7AvTnkDvUiA#v=onepage&q&f=false>
- Fuchs, D., Daniel, V., Sadeghi, M., Opelz, G., & Naujokat, C. (2010). Salinomycin overcomes ABC transporter-mediated multidrug and apoptosis resistance in human leukemia stem cell-like KG-1a cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *394*(4), 1098–1104. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.03.138>
- Fukuda, M., Kanno, E., & Yamamoto, A. (2004). Rabphilin and Noc2 Are Recruited to Dense-core Vesicles through Specific Interaction with Rab27A in PC12 Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(13), 13065–13075. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306812200>
- Fukuda, M., Kanno, E., & Yamamoto, A. (2004). Rabphilin and Noc2 are recruited to dense-core vesicles through specific interaction with Rab27A in PC12 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(13), 13065–75. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306812200>
- Fukuda, M., & Yamamoto, A. (2005). Assay of the Rab-Binding Specificity of Rabphilin and Noc2: Target Molecules for Rab27. In *Methods in enzymology* (Vol. 403, pp. 469–481). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)03041-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)03041-7)
- Galasko, D. (2017). Lewy Body Disorders. *Neurologic Clinics*, *35*(2), 325–338. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2017.01.004>
- Gao, H., Zhong, F., Xie, J., Peng, J., & Han, Z. (2016). PTTG promotes invasion in human breast cancer cell line by upregulating EMMPRIN via FAK/Akt/mTOR signaling. *American Journal of Cancer Research*, *6*(2), 425–39. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27186413>
- Garcia, A. F., Lopes, J. L. S., Costa-Filho, A. J., Wallace, B. A., & Araujo, A. P. U. (2013). Membrane Interactions of S100A12 (Calgranulin C). *PLoS ONE*, *8*(12), e82555. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082555>
- Gaster, B., & Holroyd, J. (2000). St John's wort for depression: a systematic review. *Archives of Internal Medicine*, *160*(2), 152–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647752>
- Geppert, M., Bolshakov, V. Y., Siegelbaum, S. A., Takei, K., De Camilli, P., Hammer, R. E., & Südhof, T. C. (1994). The role of Rab3A in neurotransmitter release. *Nature*, *369*(6480), 493–497. <https://doi.org/10.1038/369493a0>
- Greeson, J. M., Sanford, B., & Monti, D. A. (2001). St. John's wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. *Psychopharmacology*, *153*(4), 402–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11243487>
- Griner, E. M., & Kazanietz, M. G. (2007). Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, *7*(4), 281–94. <https://doi.org/10.1038/nrc2110>
- Guerrero-Valero, M., Ferrer-Orta, C., Querol-Audí, J., Marin-Vicente, C., Fita, I., Gómez-Fernández, J. C., ... Corbalán-García, S. (2009). Structural and mechanistic insights into the association of PKC α -C2 domain to PtdIns(4,5)P₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(16), 6603–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813099106>
- Guerrero-Valero, M., Marin-Vicente, C., Gómez-Fernández, J. C., & Corbalán-García, S. (2007). The C2 Domains of Classical PKCs are Specific PtdIns(4,5)P₂-sensing Domains with Different Affinities for Membrane Binding. *Journal of Molecular Biology*, *371*(3), 608–621. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.086>
- Guillen, J., Ferrer-Orta, C., Buxaderas, M., Perez-Sanchez, D., Guerrero-Valero, M., Luengo-Gil, G., ... Corbalán-García, S. (2013). Structural insights into the Ca²⁺ and PI(4,5)P₂ binding modes of the C2 domains of rabphilin 3A and synaptotagmin 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(51), 20503–20508.

- <https://doi.org/10.1073/pnas.1316179110>
- Gupta, G. K., Gupta, V. K., Shukla, P., Pant, A. B., & Mishra, P. R. (2009). Investigations on cellular interaction of polyelectrolyte based nano-walled reservoir using MCF-7 cell lines: a novel chemotherapeutic approach. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61(12), 1601–1607. <https://doi.org/10.1211/jpp/61.12.0003>
- Gurevich, A. I., Dobrynin, V. N., Kolosov, M. N., Popravko, S. A., & Riabova, I. D. (1971). [Antibiotic hyperforin from *Hypericum perforatum* L]. *Antibiotiki*, 16(6), 510–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5000144>
- Habelhah, H., Shah, K., Huang, L., Burlingame, A. L., Shokat, K. M., & Ronai, Z. (2001). Identification of new JNK substrate using ATP pocket mutant JNK and a corresponding ATP analogue. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(21), 18090–5. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011396200>
- Harding, A. J., & Halliday, G. M. (2001). Cortical Lewy body pathology in the diagnosis of dementia. *Acta Neuropathologica*, 102(4), 355–63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11603811>
- Hare, S. H., & Harvey, A. J. (2017). mTOR function and therapeutic targeting in breast cancer. *Am J Cancer Res*, 7(3), 383–404. Retrieved from www.ajcr.us
- He, H., Dang, Y., Dai, F., Guo, Z., Wu, J., She, X., ... Yu, L. (2003). Post-translational modifications of three members of the human MAP1LC3 family and detection of a novel type of modification for MAP1LC3B. *Journal of Biological Chemistry*, 278(31), 29278–29287. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303800200>
- He, M., Fu, Y., Yan, Y., Xiao, Q., Wu, H., Yao, W., ... Wei, M. (2015). The Hedgehog signalling pathway mediates drug response of MCF-7 mammosphere cells in breast cancer patients. *Clinical Science*, 129(9), 809–822. <https://doi.org/10.1042/CS20140592>
- Hostanska, K., Bommer, S., Weber, M., Krasniqi, B., & Saller, R. (2003). Comparison of the growth-inhibitory effect of *Hypericum perforatum* L. extracts, differing in the concentration of phloroglucinols and flavonoids, on leukaemia cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 55(7), 973–980. <https://doi.org/10.1211/0022357021251>
- Hsu, Y.-H., Yao, J., Chan, L.-C., Wu, T.-J., Hsu, J. L., Fang, Y.-F., ... Hung, M.-C. (2014). Definition of PKC-, CDK6, and MET as Therapeutic Targets in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Research*, 74(17), 4822–4835. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0584>
- Hurley, J. (2006). Membrane binding domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1761(8), 805–811. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.02.020>
- Inoue, M., Kishimoto, A., Takai, Y., & Nishizuka, Y. (1977). Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. *The Journal of Biological Chemistry*, 252(21), 7610–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/199594>
- Izumi, T. (2007). Physiological Roles of Rab27 Effectors in Regulated Exocytosis. *Endocrine Journal*, 54(54), 649–657. Retrieved from https://www.jstage.jst.go.jp/article/endocrj/54/5/54_KR-78/_pdf
- Jahn, R., & Fasshauer, D. (2012). Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature*, 490(7419), 201–7. <https://doi.org/10.1038/nature11320>
- Janmey, P. A., Schnabel, P., Pipkorn, R., Camps, M., Gierschik, P., & al., et. (1995). Protein regulation by phosphatidylinositol lipids. *Chemistry & Biology*, 2(2), 61–5. [https://doi.org/10.1016/1074-5521\(95\)90276-7](https://doi.org/10.1016/1074-5521(95)90276-7)
- Jiann-Der Lee, J.-D., Ting-An Chien, T.-A., Chung-Hsien Huang, C.-H., Chien-Tsai Wu, C.-T., & Shin-Tseng Lee, S.-T. (2008). A navigation system of cerebral endovascular surgery integrating multiple space-guiding trackers. In *2008 30th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology*

- Society* (Vol. 2008, pp. 3269–3272). IEEE.
<https://doi.org/10.1109/IEMBS.2008.4649902>
- Kang, J.-H. (2014). Protein Kinase C (PKC) isozymes and cancer. *New Journal of Science*, 2014, 168–173. <https://doi.org/10.1155/2014/231418>
- Kato, M., Sasaki, T., Ohya, T., Nakanishi, H., Nishioka, H., Imamura, M., & Takai, Y. (1996). Physical and functional interaction of rabphilin-3A with alpha-actinin. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(50), 31775–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8943213>
- Khatri, P., Drăghici, S., & Edu, C. W. (n.d.). Ontological analysis of gene expression data: current tools, limitations, and open problems. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti565>
- Kim, J.-H., Chae, M., Kim, W. K., Kim, Y.-J., Kang, H. S., Kim, H. S., & Yoon, S. (2011). Salinomycin sensitizes cancer cells to the effects of doxorubicin and etoposide treatment by increasing DNA damage and reducing p21 protein. *British Journal of Pharmacology*, 162(3), 773–784. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01089.x>
- Kim, J.-Y., Kim, Y.-H., Chang, I., Kim, S., Pak, Y. K., Oh, B.-H., ... Lee, M.-S. (2002). Resistance of mitochondrial DNA-deficient cells to TRAIL: role of Bax in TRAIL-induced apoptosis. *Oncogene*, 21(20), 3139–3148. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205406>
- Kim, J.-Y., Lee, E., Park, K., Park, W.-Y., Jung, H. H., Ahn, J. S., ... Park, Y. H. (2017). Clinical implications of genomic profiles in metastatic breast cancer with a focus on TP53 and PIK3CA, the most frequently mutated genes. *Oncotarget*, 8(17), 27997–28007. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15881>
- Kiss, Z., & Steinberg, R. A. (1985). Phorbol ester-mediated protein phosphorylations in S49 mouse lymphoma cells. *Cancer Research*, 45(6), 2732–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3157448>
- Klionsky DJ. (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. - PubMed - NCBI. *Autophagy*, 8(4), 445–544. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22966490>
- Knopf, J. L., Lee, M. H., Sultzman, L. A., Kriz, R. W., Loomis, C. R., Hewick, R. M., ... Clark, S. C. (1986). Cloning and expression of multiple protein kinase C cDNAs. *Cell*, 46(4), 491–502. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90874-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90874-3)
- Kufareva, I., Lenoir, M., Dancea, F., Sridhar, P., Raush, E., Bissig, C., ... Overduin, M. (2014). Discovery of novel membrane binding structures and functions. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, 92(6), 555–63. <https://doi.org/10.1139/bcb-2014-0074>
- Kuma, A., Matsui, M., & Mizushima, N. (n.d.). LC3, an autophagosome marker, can be incorporated into protein aggregates independent of autophagy: caution in the interpretation of LC3 localization. *Autophagy*, 3(4), 323–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17387262>
- Kurinna, S., Konopleva, M., Palla, S. L., Chen, W., Kornblau, S., Contractor, R., ... Ruvolo, P. P. (2006). Bcl2 phosphorylation and active PKC α are associated with poor survival in AML. *Leukemia*, 20(7), 1316–1319. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404248>
- Laakmann, G., Diemel, A., & Kieser, M. (1998). Clinical significance of hyperforin for the efficacy of Hypericum extracts on depressive disorders of different severities. *Phytomedicine*, 5(6), 435–442. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(98\)80039-1](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(98)80039-1)
- Lahn, M., Köhler, G., Sundell, K., Su, C., Li, S., Paterson, B. M., & Bumol, T. F. (2004). Protein Kinase C Alpha Expression in Breast and Ovarian Cancer. *Oncology*, 67(1), 1–10. <https://doi.org/10.1159/000080279>
- Lawvere, S., & Mahoney, M. C. (2005). St. John's wort. *American Family Physician*, 72(11), 2249–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16342849>
- Leenders, A. G., Lopes da Silva, F. H., Ghijsen, W. E., & Verhage, M. (2001). Rab3a is

- involved in transport of synaptic vesicles to the active zone in mouse brain nerve terminals. *Molecular Biology of the Cell*, 12(10), 3095–102. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11598194>
- Lei, Y., Zhang, D., Yu, J., Dong, H., Zhang, J., & Yang, S. (2017). Targeting autophagy in cancer stem cells as an anticancer therapy. *Cancer Letters*, 393, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.02.012>
- Lemmon, M. A. (2008). Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(2), 99–111. <https://doi.org/10.1038/nrm2328>
- Li, C., Takei, K., Geppert, M., Daniell, L., Stenius, K., Chapman, E. R., ... Südhof, T. C. (1994). Synaptic targeting of rabphilin-3A, a synaptic vesicle Ca²⁺/phospholipid-binding protein, depends on rab3A/3C. *Neuron*, 13(4), 885–98. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7946335>
- Li, Y., Xu, M., Ding, X., Yan, C., Song, Z., Chen, L., ... Yang, C. (2016). Protein kinase C controls lysosome biogenesis independently of mTORC1. *Nature Cell Biology*, 18(10), 1065–1077. <https://doi.org/10.1038/ncb3407>
- Lolas Hamameh, S., Renbaum, P., Kamal, L., Dweik, D., Salahat, M., Jaraysa, T., ... Kanaan, M. (2017). Genomic analysis of inherited breast cancer among Palestinian women: Genetic heterogeneity and a founder mutation in TP53. *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.30771>
- Lu, D., & Carson, D. A. (2011). Inhibition of Wnt signaling and cancer stem cells. *Oncotarget*, 2(8), 587. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.309>
- Lu, H., Chen, I., Shimoda, L. A., Park, Y., Zhang, C., Tran, L., ... Semenza, G. L. (2017). Chemotherapy-Induced Ca²⁺ Release Stimulates Breast Cancer Stem Cell Enrichment. *Cell Reports*, 18(8), 1946–1957. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.001>
- Lu, Y., Ma, W., Mao, J., Yu, X., Hou, Z., Fan, S., ... Li, L. (2015). Salinomycin exerts anticancer effects on human breast carcinoma MCF-7 cancer stem cells via modulation of Hedgehog signaling. *Chemico-Biological Interactions*, 228, 100–7. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.12.002>
- Lui, A. J., Geanes, E. S., Ogony, J., Behbod, F., Marquess, J., Valdez, K., ... Lewis-Wambi, J. (2017). IFITM1 suppression blocks proliferation and invasion of aromatase inhibitor-resistant breast cancer in vivo by JAK/STAT-mediated induction of p21. *Cancer Letters*, 399, 29–43. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.04.005>
- Luria, A., Tennenbaum, T., Sun, Q. Y., Rubinstein, S., & Breitbart, H. (2000). Differential localization of conventional protein kinase C isoforms during mouse oocyte development. *Biology of Reproduction*, 62(6), 1564–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10819756>
- Mahmoudi, T., Parra, M., Vries, R. G. J., Kauder, S. E., Verrijzer, C. P., Ott, M., & Verdin, E. (2006). The SWI/SNF Chromatin-remodeling Complex Is a Cofactor for Tat Transactivation of the HIV Promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 281(29), 19960–19968. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603336200>
- Mahoney, T. R., Liu, Q., Itoh, T., Luo, S., Hadwiger, G., Vincent, R., ... Nonet, M. L. (2006). Regulation of synaptic transmission by RAB-3 and RAB-27 in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Biology of the Cell*, 17(6), 2617–25. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-12-1170>
- Mao, J., Fan, S., Ma, W., Fan, P., Wang, B., Zhang, J., ... Li, L. (2014). Roles of Wnt/ β -catenin signaling in the gastric cancer stem cells proliferation and salinomycin treatment. *Cell Death and Disease*, 5(1), e1039. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.515>
- Marín-Vicente, C., Nicolás, F. E., Gómez-Fernández, J. C., & Corbalán-García, S. (2008). The PtdIns(4,5)P₂ ligand itself influences the localization of PKC α in the plasma membrane of intact living cells. *Journal of Molecular Biology*, 377(4), 1038–52. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.12.011>

- Masur, K., Lang, K., Niggemann, B., Zanker, K. S., & Entschladen, F. (2001). High PKC alpha and low E-cadherin expression contribute to high migratory activity of colon carcinoma cells. *Molecular Biology of the Cell*, 12(7), 1973–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11451996>
- McKiernan, C. J., Stabila, P. F., & Macara, I. G. (1996). Role of the Rab3A-binding domain in targeting of rabphilin-3A to vesicle membranes of PC12 cells. *Molecular and Cellular Biology*, 16(9), 4985–95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8756657>
- Medina, C. P., López, C., & Claramunt, R. M. (2006). Theoretical studies on the tautomerism of 1,5,6,7-tetrahydro-4H-indazol-4-ones. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 11(6), 415–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17962774>
- Merhi, F., Tang, R., Piedfer, M., Mathieu, J., Bombarda, I., Zaher, M., ... Bauvois, B. (2011). Hyperforin Inhibits Akt1 Kinase Activity and Promotes Caspase-Mediated Apoptosis Involving Bad and Noxa Activation in Human Myeloid Tumor Cells. *PLoS ONE*, 6(10), e25963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025963>
- Miyazaki, Y., Shibuya, M., Sugawara, H., Kawaguchi, O., & Hirsoe, C. (1974). Salinomycin, a new polyether antibiotic. *The Journal of Antibiotics*, 27(11), 814–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4452657>
- Mochly-Rosen, D., Miller, K. G., Scheller, R. H., Khaner, H., Lopez, J., & Smith, B. L. (1992). p65 fragments, homologous to the C2 region of protein kinase C, bind to the intracellular receptors for protein kinase C. *Biochemistry*, 31(35), 8120–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1326322>
- Moravcevic, K., Oxley, C. L., & Lemmon, M. A. (2012). Conditional Peripheral Membrane Proteins: Facing up to Limited Specificity. *Structure*, 20(1), 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.11.012>
- Moscat, J., Diaz-Meco, M. T., & Wooten, M. W. (2009). Of the atypical PKCs, Par-4 and p62: recent understandings of the biology and pathology of a PB1-dominated complex. *Cell Death and Differentiation*, 16(11), 1426–1437. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.119>
- Mowers, E. E., Sharifi, M. N., & Macleod, K. F. (2017). Autophagy in cancer metastasis. *Oncogene*, 36(12), 1619–1630. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.333>
- Nakagawa, M., Oliva, J. L., Kothapalli, D., Fournier, A., Assoian, R. K., & Kazanietz, M. G. (2005). Phorbol ester-induced G1 phase arrest selectively mediated by protein kinase Cdelta-dependent induction of p21. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 33926–34. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505748200>
- Nakamura, S. -i., & Yamamura, H. (2010). Yasutomi Nishizuka: Father of protein kinase C. *Journal of Biochemistry*, 148(2), 125–130. <https://doi.org/10.1093/jb/mvq066>
- Nalefski, E. A., & Falke, J. J. (1996). The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 5(12), 2375–90. <https://doi.org/10.1002/pro.5560051201>
- Nathan, P. J. (2001). *Hypericum perforatum* (St John's Wort): a non-selective reuptake inhibitor? A review of the recent advances in its pharmacology. *Journal of Psychopharmacology*, 15(1), 47–54. <https://doi.org/10.1177/026988110101500109>
- Naujokat, C., Fuchs, D., & Opelz, G. (2010). Salinomycin in cancer: A new mission for an old agent. *Molecular Medicine Reports*, 3(4), 555–9. https://doi.org/10.3892/mmr_00000296
- Newton, A. C., Antal, C. E., & Steinberg, S. F. (2016). Protein kinase C mechanisms that contribute to cardiac remodelling, 1499–1510. <https://doi.org/10.1042/CS20160036>
- Newton, A. C., & Brognard, J. (2017a). Reversing the Paradigm: Protein Kinase C as a Tumor Suppressor. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(5), 438–447. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.02.002>
- Newton, A. C., & Brognard, J. (2017b). Reversing the Paradigm: Protein Kinase C as a Tumor Suppressor. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(5), 438–447.

- <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.02.002>
- Nishikawa, K., Toker, A., Johannes, F. J., Songyang, Z., & Cantley, L. C. (1997). Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(2), 952–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8995387>
- Oancea, E., & Meyer, T. (1998). Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals. *Cell*, 95(3), 307–18. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9814702>
- Ohki, E. C., Tilkins, M. L., Ciccarone, V. C., & Price, P. J. (2001). Improving the transfection efficiency of post-mitotic neurons. *Journal of Neuroscience Methods*, 112(2), 95–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11716945>
- Ohya, T., Sasaki, T., Kato, M., & Takai, Y. (1998). Involvement of Rabphilin3 in endocytosis through interaction with Rabaptin5. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(1), 613–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9417123>
- Ojo, O. O., Bhadauria, S., & Rath, S. K. (2013). Dose-dependent adverse effects of salinomycin on male reproductive organs and fertility in mice. *PLoS One*, 8(7), e69086. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069086>
- Olivotto, M., Arcangeli, A., Carlà, M., & Wanke, E. (1996). Electric fields at the plasma membrane level: A neglected element in the mechanisms of cell signalling. *BioEssays*, 18(6), 495–504. <https://doi.org/10.1002/bies.950180612>
- Ono, Y., Fujii, T., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi, K., & Nishizuka, Y. (1987). Identification of three additional members of rat protein kinase C family: delta-, epsilon- and zeta-subspecies. *FEBS Letters*, 226(1), 125–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3691811>
- Ono, Y., Kurokawa, T., Kawahara, K., Nishimura, O., Marumoto, R., Igarashi, K., ... Nishizuka, Y. (1986). Cloning of rat brain protein kinase C complementary DNA. *FEBS Letters*, 203(2), 111–115. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(86\)80724-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(86)80724-4)
- Osada, S., Mizuno, K., Saido, T. C., Akita, Y., Suzuki, K., Kuroki, T., & Ohno, S. (1990). A phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC eta, a new member of the protein kinase C family predominantly expressed in lung and skin. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(36), 22434–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2266135>
- Osada, S., Mizuno, K., Saido, T. C., Suzuki, K., Kuroki, T., & Ohno, S. (1992). A new member of the protein kinase C family, nPKC theta, predominantly expressed in skeletal muscle. *Molecular and Cellular Biology*, 12(9), 3930–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1508194>
- Ostermeier, C., & Brunger, A. T. (1999). Structural basis of Rab effector specificity: crystal structure of the small G protein Rab3A complexed with the effector domain of rabphilin-3A. *Cell*, 96(3), 363–74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10025402>
- Ozpolat, B., & Benbrook, D. M. (2015). Targeting autophagy in cancer management - strategies and developments. *Cancer Management and Research*, 7, 291–9. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S34859>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328886>
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9), e36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11972351>
- Plumlee, K. H., Johnson, B., & Galey, F. D. (1995). Acute Salinomycin Toxicosis of Pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 7(3), 419–420. <https://doi.org/10.1177/104063879500700327>

- Quiney, C., Billard, C., Faussat, A.-M., Salanoubat, C., & Kolb, J.-P. (2007). Hyperforin inhibits P-gp and BCRP activities in chronic lymphocytic leukaemia cells and myeloid cells. *Leukemia & Lymphoma*, 48(8), 1587–1599. <https://doi.org/10.1080/10428190701474332>
- Rizo, J., & Südhof, T. C. (1998). C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(26), 15879–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9632630>
- Rizo, J., & Xu, J. (2015). The Synaptic Vesicle Release Machinery. *Annual Review of Biophysics*, 44(1), 339–367. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-060414-034057>
- Rosse, C., Linch, M., Kermorgant, S., Cameron, A. J. M., Boeckeler, K., & Parker, P. J. (2010). PKC and the control of localized signal dynamics. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(2), 103–112. <https://doi.org/10.1038/nrm2847>
- Saftig, P., & Haas, A. (2016). Turn up the lysosome. *Nature Cell Biology*, 18(10), 1025–1027. <https://doi.org/10.1038/ncb3409>
- Sánchez-Bautista, S., Corbalán-García, S., Pérez-Lara, A., & Gómez-Fernández, J. C. (2009). A comparison of the membrane binding properties of C1B domains of PKC γ , PKC δ , and PKC ϵ . *Biophysical Journal*, 96(9), 3638–47. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.02.021>
- Schempp, C. M., Müller, K. A., Winghofer, B., Schöpf, E., & Simon, J. C. (2002). [St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). A plant with relevance for dermatology]. *Der Hautarzt; Zeitschrift Fur Dermatologie, Venerologie, Und Verwandte Gebiete*, 53(5), 316–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12063742>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–82. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schlüter, O. M., Schnell, E., Verhage, M., Tzonopoulos, T., Nicoll, R. A., Janz, R., ... Südhof, T. C. (1999). Rabphilin knock-out mice reveal that rabphilin is not required for rab3 function in regulating neurotransmitter release. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(14), 5834–46. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10407024>
- Selbie, L. A., Schmitz-Peiffer, C., Sheng, Y., & Biden, T. J. (1993). Molecular cloning and characterization of PKC iota, an atypical isoform of protein kinase C derived from insulin-secreting cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(32), 24296–302. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8226978>
- Shah, K., & Shokat, K. M. (2002). A chemical genetic screen for direct v-Src substrates reveals ordered assembly of a retrograde signaling pathway. *Chemistry & Biology*, 9(1), 35–47. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11841937>
- Shakya, P., Marslin, G., Siram, K., Beerhues, L., & Franklin, G. (2017). Elicitation as a tool to improve the profiles of high-value secondary metabolites and pharmacological properties of *Hypericum perforatum*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. <https://doi.org/10.1111/jphp.12743>
- Shao, X., Davletov, B. A., Sutton, R. B., Südhof, T. C., & Rizo, J. (1996). Bipartite Ca²⁺-Binding Motif in C2 Domains of Synaptotagmin and Protein Kinase C. *Science*, 273(5272). Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/273/5272/248>
- Sharkey, N. A., Leach, K. L., & Blumberg, P. M. (1984). Competitive inhibition by diacylglycerol of specific phorbol ester binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(2), 607–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6320198>
- Shirataki, H., Kaibuchi, K., Sakoda, T., Kishida, S., Yamaguchi, T., Wada, K., ... Takai, Y. (1993). Rabphilin-3A, a putative target protein for smg p25A/rab3A p25 small GTP-binding protein related to synaptotagmin. *Molecular and Cellular Biology*, 13(4), 2061–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8384302>
- Smith, R., Klein, P., Koc-Schmitz, Y., Waldvogel, H. J., Faull, R. L. M., Brundin, P., ... Li,

- J.-Y. (2007). Loss of SNAP-25 and rabphilin 3a in sensory-motor cortex in Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry*, 0(0), 070630082917008-???. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04703.x>
- Sou, Y., Tanida, I., Komatsu, M., Ueno, T., & Kominami, E. (2006). Phosphatidylserine in addition to phosphatidylethanolamine is an in vitro target of the mammalian Atg8 modifiers, LC3, GABARAP, and GATE-16. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(6), 3017–24. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505888200>
- Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., & Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 51(5), 1409–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4357757>
- Southwell, I. A., & Bourke, C. A. (2001). Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L. (St. John's Wort). *Phytochemistry*, 56(5), 437–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11261576>
- Stahelin, R. V., Scott, J. L., & Frick, C. T. (2014). Cellular and Molecular Interaction of Phosphoinositides and Peripheral Proteins. *Chem Phys Lipids*, 182(3), 3–18. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2014.02.002>
- Stanic, J., Carta, M., Eberini, I., Pelucchi, S., Marcello, E., Genazzani, A. A., ... Gardoni, F. (2015). Rabphilin 3A retains NMDA receptors at synaptic sites through interaction with GluN2A/PSD-95 complex. *Nature Communications*, 6, 10181. <https://doi.org/10.1038/ncomms10181>
- Steverding, D., Antoszczak, M., & Huczyński, A. (2016). In vitro activity of salinomycin and monensin derivatives against *Trypanosoma brucei*. *Parasites & Vectors*, 9(1), 409. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1698-8>
- Stott, J. B., Povstyan, O. V., Carr, G., Barrese, V., & Greenwood, I. A. (2015). G-protein $\beta\gamma$ subunits are positive regulators of Kv7.4 and native vascular Kv7 channel activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(20), 6497–502. <https://doi.org/10.1073/pnas.1418605112>
- Südhof, T. C. (2012). The Presynaptic Active Zone. *Neuron*, 75(1), 11–25. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.012>
- Sugarman, B. J., Aggarwal, B. B., Hass, P. E., Figari, I. S., Palladino, M. A., & Shepard, H. M. (1985). Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science (New York, N.Y.)*, 230(4728), 943–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3933111>
- Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R., & Brunger, A. T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*, 395(6700), 347–53. <https://doi.org/10.1038/26412>
- Sutton, R. B., & Sprang, S. R. (1998). Structure of the protein kinase C beta phospholipid-binding C2 domain complexed with Ca^{2+} . *Structure (London, England: 1993)*, 6(11), 1395–405. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9817842>
- Takahashi, K., & Suzuki, K. (1993). Association of insulin-like growth-factor-I-induced DNA synthesis with phosphorylation and nuclear exclusion of p53 in human breast cancer MCF-7 cells. *International Journal of Cancer*, 55(3), 453–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8375929>
- Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E. A., Grønborg, M., Riedel, D., ... Jahn, R. (2006). Molecular Anatomy of a Trafficking Organelle. *Cell*, 127(4), 831–846. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.030>
- Tam, W. L., Lu, H., Buikhuisen, J., Soh, B. S., Lim, E., Reinhardt, F., ... Weinberg, R. A. (2013). Protein kinase C α is a central signaling node and therapeutic target for breast cancer stem cells. *Cancer Cell*, 24(3), 347–64. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.08.005>
- Tan, M. G. K., Lee, C., Lee, J. H., Francis, P. T., Williams, R. J., Ramírez, M. J., ... Lai, M. K. P. (2014). Decreased rabphilin 3A immunoreactivity in Alzheimer's disease is associated with A β burden. *Neurochemistry International*, 64, 29–36.

- <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.10.013>
- Tan, M., Li, P., Sun, M., Yin, G., & Yu, D. (2006). Upregulation and activation of PKC alpha by ErbB2 through Src promotes breast cancer cell invasion that can be blocked by combined treatment with PKC alpha and Src inhibitors. *Oncogene*, 25(23), 3286–95. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209361>
- Tanida, I., Ueno, T., & Kominami, E. (2008). LC3 and Autophagy. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 445, pp. 77–88). https://doi.org/10.1007/978-1-59745-157-4_4
- Tarca, A. L., Romero, R., & Draghici, S. (2006). Analysis of microarray experiments of gene expression profiling. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 195(2), 373–388. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2006.07.001>
- Tedeschi, E., Menegazzi, M., Margotto, D., Suzuki, H., Förstermann, U., & Kleinert, H. (2003). Anti-Inflammatory Actions of St. John's Wort: Inhibition of Human Inducible Nitric-Oxide Synthase Expression by Down-Regulating Signal Transducer and Activator of Transcription-1 (STAT-1) Activation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 307(1), 254–261. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.054460>
- The Gene Ontology Consortium. (2017). Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D331–D338. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1108>
- Tsuboi, T., & Fukuda, M. (2005). The C2B Domain of Rabphilin Directly Interacts with SNAP-25 and Regulates the Docking Step of Dense Core Vesicle Exocytosis in PC12 Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(47), 39253–39259. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507173200>
- Tsuboi, T., Kanno, E., & Fukuda, M. (2007). The polybasic sequence in the C2B domain of rabphilin is required for the vesicle docking step in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*, 100(3), 770–9. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04266.x>
- Turcotte, S., & Giaccia, A. J. (2010). Targeting cancer cells through autophagy for anticancer therapy. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(2), 246–251. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.12.007>
- Urtreger, A. J., Kazanietz, M. G., & Bal de Kier Joffé, E. D. (2012). Contribution of individual PKC isoforms to breast cancer progression. *IUBMB Life*, 64(1), 18–26. <https://doi.org/10.1002/iub.574>
- Urtreger, A. J., Kazanietz, M. G., & Bal De Kier Joffé, E. D. (2012). Contribution of individual PKC isoforms to breast cancer progression. *IUBMB Life*, 64(1), 18–26. <https://doi.org/10.1002/iub.574>
- Van Assen, E. J. (2006). A case of salinomycin intoxication in turkeys. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*, 47(3), 256–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16604983>
- Van Doren, S. R., Marcink, T. C., Koppiseti, R. K., Jurkevich, A., & Fulcher, Y. G. (2017). Peripheral membrane associations of matrix metalloproteinases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.04.013>
- van Engeland, M., Nieland, L. J., Ramaekers, F. C., Schutte, B., & Reutelingsperger, C. P. (1998). Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 31(1), 1–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9450519>
- van Meer, G. (2005). Cellular lipidomics. *The EMBO Journal*, 24(18), 3159–3165. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600798>
- Van Swearingen, A. E. D., Sambade, M. J., Siegel, M. B., Sud, S., McNeill, R. S., Bevil, S. M., ... Anders, C. K. (2017). Combined kinase inhibitors of MEK1/2 and either PI3K or PDGFR are efficacious in intracranial triple-negative breast cancer. *Neuro-Oncology*. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox052>
- Vauquelin, G., & Packeu, A. (2009). Ligands, their receptors and ... plasma membranes.

- Molecular and Cellular Endocrinology*, 311(1–2), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.07.022>
- Vicente, E. F., Basso, L. G. M., Cespedes, G. F., Lorenzón, E. N., Castro, M. S., Mendes-Giannini, M. J. S., ... Cilli, E. M. (2013). Dynamics and conformational studies of TOAC spin labeled analogues of Ctx(Ile(21))-Ha peptide from *Hypsiboas albopunctatus*. *PLoS One*, 8(4), e60818. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060818>
- Watanabe, T., Ono, Y., Taniyama, Y., Hazama, K., Igarashi, K., Ogita, K., ... Nishizuka, Y. (1992). Cell division arrest induced by phorbol ester in CHO cells overexpressing protein kinase C-delta subspecies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(21), 10159–63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1438205>
- Weisstein, E. W. (2003). *CRC concise encyclopedia of mathematics*. Chapman & Hall/CRC. Retrieved from https://books.google.es/books?id=D_XKBQAAQBAJ&pg=PA410&dq=Weisstein,+Eric+W.+«Chi-Squared+Test»&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjD-_G8xLLTAhWGWxQKHAM0DvMQ6AEIJDA#v=onepage&q=Weisstein%2C+Eric+W.+«Chi-Squared+Test»&f=false
- Wilhelm, B. G., Mandad, S., Truckenbrodt, S., Kröhnert, K., Schäfer, C., Rammner, B., ... Rizzoli, S. O. (2014). Composition of isolated synaptic boutons reveals the amounts of vesicle trafficking proteins. *Science (New York, N. Y.)*, 344(6187), 1023–8. <https://doi.org/10.1126/science.1252884>
- Williams, D. B. (David B., & Carter, C. B. (2009). *Transmission electron microscopy: a textbook for materials science*. Springer. Retrieved from https://books.google.es/books?id=dXdrG39VtUoC&pg=PA4&pg=PA4&dq=1932+por+Knoll+y+Ruska+tem&source=bl&ots=rOdoKNugsM&sig=Od_AszE0VWY1oPiZ-M2_W1BCKWU&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjui4Gz0aHTAhWDQyYKHbcSAn0Q6AEIPjAK#v=onepage&q=1932+por+Knoll+y+Ruska+tem&f=false
- Williams, D. B., & Carter, C. B. (2009). The Transmission Electron Microscope. In *Transmission Electron Microscopy* (pp. 3–22). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-0-387-76501-3_1
- Wilson, M. I., Gill, D. J., Perisic, O., Quinn, M. T., & Williams, R. L. (2003). PB1 domain-mediated heterodimerization in NADPH oxidase and signaling complexes of atypical protein kinase C with Par6 and p62. *Molecular Cell*, 12(1), 39–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12887891>
- Xie, Z., Long, J., Liu, J., Chai, Z., Kang, X., & Wang, C. (2017). Molecular Mechanisms for the Coupling of Endocytosis to Exocytosis in Neurons. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, 47. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00047>
- Yarrow, J. C., Perlman, Z. E., Westwood, N. J., & Mitchison, T. J. (2004). A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. *BMC Biotechnology*, 4(1), 21. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-4-21>
- Yi, M., Horton, J., Cohen, J., Hobbs, H., & Stephens, R. (2006). WholePathwayScope: a comprehensive pathway-based analysis tool for high-throughput data. *BMC Bioinformatics*, 7(1), 30. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-30>
- Yuan, K., Wu, H., Wang, Y., Chen, H., Jiao, M., & Fu, R. (2014). Phospho-PRAS40Thr246 predicts trastuzumab response in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Oncology Letters*, 9(2), 785–789. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.2744>
- Zhang, C., Kenski, D. M., Paulson, J. L., Bonshtien, A., Sessa, G., Cross, J. V., ... Shokat, K. M. (2005). A second-site suppressor strategy for chemical genetic analysis of diverse protein kinases. *Nature Methods*, 2(6), 435–41. <https://doi.org/10.1038/nmeth764>

- Zhang, D., & Aravind, L. (2010). Identification of novel families and classification of the C2 domain superfamily elucidate the origin and evolution of membrane targeting activities in eukaryotes. *Gene*, 469(1–2), 18–30. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2010.08.006>