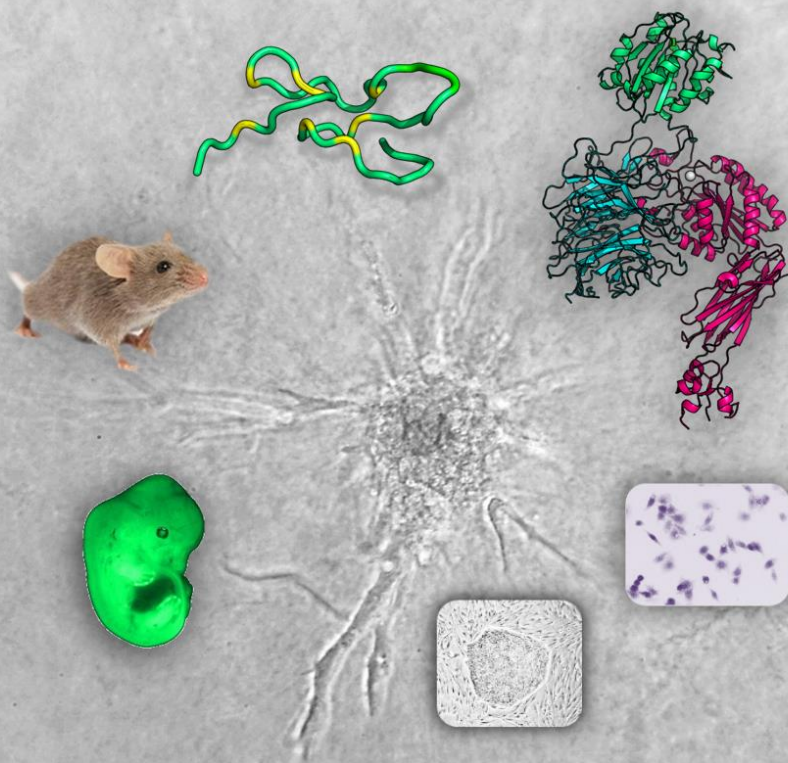


# Caracterización de la disintegrina antiangiogénica jerdostatina. Generación de un modelo transgénico animal



**Gema Bolás González-Lliverós**

Tesis Doctoral, 2016







VNIVERSITAT  
ID VALÈNCIA



**Doctorado en Biotecnología**

**Departament de Bioquímica i Biologia Molecular**

**Caracterización de la disintegrina  
antiangiogénica jerdostatina. Generación  
de un modelo transgénico animal**

**Gema Bolás González-Lliberós**

Tesis Doctoral 2016

Directores: Dr. Juan José Calvete Chornet

Dra. Libia Sanz Sanz







VNIVERSITAT  
ID VALÈNCIA



INSTITUTO DE  
BIOMEDICINA DE  
VALENCIA CSIC

**Doctorado en Biotecnología**

**Departament de Bioquímica i Biologia Molecular**

**Caracterización de la disintegrina  
antiangiogénica jerdostatina. Generación  
de un modelo transgénico animal**

**Gema Bolás González-Lliberós**

Tesis Doctoral 2016

Memoria presentada por Gema Bolás González-Lliberós para  
optar al grado de Doctora por la Universidad de Valencia

Dirigida por el Dr. Juan José Calvete y la Dra. Libia Sanz





MINISTERIO  
DE ECONOMÍA  
Y COMPETITIVIDAD



**CSIC**  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

JUAN JOSÉ CALVETE CHORNET, Doctor en Ciencias Biológicas y Profesor de Investigación en el Instituto de Biomedicina de Valencia del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

LIBIA SANZ SANZ, Doctora en Ciencias Químicas y Técnico Superior Especializado en el Instituto de Biomedicina de Valencia del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

INFORMAN: que Gema Bolás González-Lliberós, Licenciada en Bioquímica por la Universitat de València, ha realizado bajo su dirección el trabajo que con el título "Caracterización de la disintegrina antiangiogénica jerdostatina. Generación de un modelo transgénico animal" presenta para optar al grado de Doctora por la Universitat de València.

Valencia, Julio de 2016

Dr. Juan José Calvete Chornet

Dra. Libia Sanz Sanz



Este trabajo se ha realizado con el soporte económico de los proyectos de investigación que se enumeran a continuación:

BFU2007-61563: Enfoque "top-down" aplicado a la venómica. Evolución de la familia de las disintegrinas y evaluación del uso de la disintegrina jerdostatina para la visualización in vivo de angiogénesis dependiente de la integrina  $\alpha_1\beta_1$ . Ministerio de Ciencia e Innovación (IP. Juan José Calvete Chornet)

BFU2010-17373: Venómica Traslacional. Ministerio de Ciencia e Innovación (IP. Juan José Calvete Chornet)

PROMETEO 2010/005. Generalitat Valenciana (IP. Juan José Calvete Chornet)

Gema Bolás González-Lliberós ha disfrutado de una beca predoctoral JAE-PreDoctoral (07\_00680) otorgada por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).



**A mis padres**







Esta tesis se la quiero dedicar principalmente a mi familia, especialmente a mis padres. Quienes me conocen saben que no soy muy dada a los sentimentalismos, de forma que me es complicado poder reflejar en palabras el cariño, respeto y agradecimiento que siento hacia ellos. Gracias por vuestra comprensión, esfuerzo y sacrificio, por transmitirme los valores que han forjado mi personalidad para poder superar con ilusión esta etapa de mi vida. A mis hermanos Amparo y Jaime, por estar ahí siempre que los he necesitado. Gracias por vuestro apoyo y confianza, este trabajo os lo dedico a vosotros.

Me gustaría darle las gracias a mi director de tesis Juanjo, por brindarme la oportunidad de realizar la Tesis Doctoral y que, complicación tras complicación, ha permitido evaluar mi paciencia, constancia y ha desarrollado mis inquietudes científicas. Gracias a mi codirectora Libia, a pesar de ir muy liada, siempre has encontrado tiempo para nuestras dudas o problemas, gracias por tu paciencia, dedicación y por toda tu ayuda.

Por supuesto, mi mayor agradecimiento es para mis compañeros de *Calvete's lab*. Con todos ellos he compartido muy buenos momentos tanto en el laboratorio como fuera y he encontrado buenos amigos que me han escuchado, ayudado y apoyado, ¡gracias por todo! En especial quiero agradecer a Paula, con la que trabajé durante los primeros años, gracias por ser como eres, este trabajo es en parte tuyo. A las chicas disintegrinas: Raquel "doctotal", Carol "*walking on sunshine*" y Betti "betiélago", al "capitán planeta" Davinia, al "chico Linux" Jordi; a Alicia por su ayuda con los ratones, a "la cubana" Yania, a los estudiantes y todos los extranjeros que han pasado por el laboratorio (que son muchos). Gracias



## Agradecimientos

---

por las risas y por crear un ambiente donde se puede ir a trabajar a gusto. También quisiera agradecer a mis compañeros del IBV, los que están y los que se han ido, Enea, Donderis, Marian, a mi "sister", Sara, Alicia, Lorena, Ada y a todos los que, en algún momento, me han prestado su ayuda, protocolos y materiales.

Esta tesis doctoral ha supuesto un dolor de cabeza constante, novatos en el área de la transgénesis y biología celular, no habría sido posible sin la ayuda y los conocimientos de la Dra. Marta Casado y Carme. Gracias por todo el tiempo que habéis dedicado a este proyecto, creo que todas hemos aprendido mucho de esta experiencia, a pesar de todas las dificultades he disfrutado y ha sido un placer haber trabajado con vosotras.

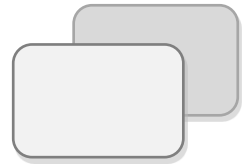
Durante la tesis he tenido la suerte de trabajar con otros grupos de trabajo, cuyas colaboraciones han sido siempre muy positivas. Gracias al Dr. Johannes Eble por acogerme durante unos meses en su laboratorio en Frankfurt y a Flavia por su ayuda y amistad. Tanto en el ámbito profesional, como en el personal, la experiencia fue muy positiva, aprendí muchísimo y los resultados obtenidos me animaron a seguir. También agradecer a la Dra. Nuria Flames por proporcionarme ratones, a Laura Chirivella, Laura Remesal, Elia y Benito por toda vuestra ayuda con los ratones, con el microscopio confocal, por los protocolos y todo el material, gracias por acogerme temporalmente en vuestro laboratorio, sin vuestra ayuda no habría podido terminar.

¡GRACIAS a todos!



---

# Índice







<b>Capítulo I: Caracterización de la disintegrina antiangiogénica jerdostatina.....</b>	<b>1</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>3</b>
1. Las integrinas.....	5
1.1. Distribución de las integrinas .....	6
1.2. Características estructurales de las integrinas.....	8
1.3. Señalización mediada por integrinas.....	12
1.4. Las integrinas: potenciales dianas terapéuticas.....	14
2. La integrina $\alpha_1\beta_1$ .....	15
2.1. Distribucion tisular .....	16
2.2. Unión de $\alpha_1\beta_1$ al colágeno.....	16
2.3. La integrina $\alpha_1\beta_1$ en el sistema vascular.....	21
2.3.1. Las células del músculo liso vascular .....	24
2.3.2. Las células del endotelio vascular .....	26
2.3.2.1 Angiogénesis.....	27
2.4 Inhibidores de $\alpha_1\beta_1$ .....	29
3. El veneno de serpiente .....	30
3.1. Las disintegrinas .....	32
3.1.1. Origen de la familia de las disintegrinas.....	32
3.1.2. Motivos de unión de las disintegrinas.....	35
3.1.3. Mecanismos de unión de las disintegrinas.....	37
3.1.4. Importancia biológica de las disintegrinas .....	39
3.2. Disintegrinas cortas con motivo (R/K)TS.....	41
3.2.1. Jerdostatina.....	44



3.2.2. Las disintegrinas cortas KTS: agentes antiangiogénicos y antitumorales específicos de la integrina $\alpha_1\beta_1$ .....	48
<b>Objetivos</b> .....	<b>49</b>
<b>Material y Métodos</b> .....	<b>53</b>
1. Reactivos .....	55
2. Líneas celulares.....	55
2.1. Bacterias.....	55
2.2. Cultivos de células de insecto .....	55
2.3. Cultivos celulares de mamíferos.....	56
2.3.1. Condiciones de crecimiento celular .....	57
3. Plásmidos utilizados .....	58
3.1. Vectores de expresión en bacterias .....	58
3.2. Vectores de expresión en células de insecto.....	59
4. Diseño de cebadores.....	60
5. Anticuerpos y péptidos inmunogénicos.....	61
6. Diseño, amplificación y clonaje .....	62
6.1. Purificación de fragmentos de PCR.....	63
6.2. Clonación.....	63
6.2.1. Vectores .....	63
6.2.2. Introducción de ADN exógeno .....	64
6.2.2.1. En bacterias.....	64
6.2.2.2. En las células de insecto.....	65
6.2.3. Selección de clones positivos .....	65
6.3. Cuantificación del ADN.....	65



6.4. Secuenciación y análisis de secuencias.....	65
7.-Expresión y purificación de proteínas recombinantes .....	66
7.1. En bacterias.....	66
7.1.1. Expresión y purificación de jerdostatina recombinante.....	66
7.1.2. Expresión y purificación del dominio $\alpha_1$ -A.....	68
7.2. En células de insecto .....	69
8. Purificación de lebestatina a partir del veneno de serpiente.....	70
9. Análisis de proteínas.....	71
9.1. Electroforesis, transferencia e inmunodetección.....	71
9.2 Identificación por espectrometría de masas.....	72
9.3. Citometría de flujo (FAC) .....	73
10. Ensayos de actividad de las proteínas recombinantes.....	74
10.1. Ensayos de unión de las proteínas recombinantes.....	74
10.1.1. Unión de la integrina soluble $\alpha_1\beta_1$ a CB3.....	74
10.1.2. Unión de jerdostatina recombinante a $\alpha_1\beta_1$ .....	75
10.1.3. Ensayo de inhibición de r-jerdostatina .....	75
10.2. Análisis de la adhesión celular <i>in vitro</i> .....	76
10.3. Estudio de la adhesión y migración en tiempo real .....	77
10.4. Análisis de la proliferación celular.....	78
10.5. Ensayos de inhibición de angiogénesis.....	79
10.5.1. Formación <i>in vitro</i> de esferoides.....	80
10.5.2. Formación <i>in vitro</i> de túbulos capilares .....	82
11. Análisis estadístico .....	83
12. Modelado del complejo integrina-disintegrina.....	84





<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>85</b>
1. Expresión y purificación de r-jerdostatina en bacterias.....	88
2. Purificación del ectodominio de la integrina $\alpha_1\beta_1$ .....	91
3. Ensayos de interacción jerdostatina- $\alpha_1\beta_1$ .....	93
3.1. Jerdostatina recombinante se une al ectodominio de $\alpha_1\beta_1$ .....	93
3.2. Jerdostatina inhibe la unión de $\alpha_1\beta_1$ a CB3 .....	95
3.3. Jerdostatina no se une al dominio $\alpha_1$ -A .....	97
4. Caracterización de la actividad biológica de jerdostatina recombinante.....	99
4.1. Inhibición de la adhesión de CMLV a CB3 .....	100
4.1.1. Inhibición de la adhesión de HASMC .....	102
4.1.2. Inhibición de la adhesión de RASMC.....	104
4.2. Inhibición de la migración de RASMC.....	108
4.3. Efecto sobre la proliferación de RASMC.....	112
4.4. Inhibición de la angiogénesis .....	114
5. Discusión .....	118
5.1. Jerdostatina interacciona con la integrina $\alpha_1\beta_1$ .....	119
5.2. Caracterización de la actividad biológica de las disintegrinas (R/K)TS .....	123
5.2.1. Actividad de r-jerdostatina en la adhesión de CMLV .....	124
5.2.2. Actividad de r-jerdostatina en la migración de CMLV .....	126
5.2.3. Actividad de r-jerdostatina en la proliferación de CMLV....	126
5.2.4. Jerdostatina como agente antiangiogénico .....	130

**Capítulo II: Generación de un modelo transgénico animal...133**

<b>Introducción.....</b>	<b>135</b>
1. El ratón como modelo experimental.....	137
2. Ratones modificados genéticamente (RMG).....	138
2.1 Mutagénesis dirigida. Integración específica mediante recombinación homóloga.....	140
2.2. Sistema de recombinación Cre/LoxP.....	143
2.2.1- Control espacio-temporal de la expresión.....	145
3. Generación de ratones transgénicos condicionales.....	148
<b>Objetivos.....</b>	<b>151</b>
<b>Material y Métodos.....</b>	<b>155</b>
1. Reactivos.....	157
2. Líneas celulares.....	157
2.1 Cultivos celulares de mamíferos.....	157
2.2. Condiciones de crecimiento celular.....	159
3. Animales de experimentación.....	161
4. Vectores de expresión en células de mamífero.....	162
5. Diseño de cebadores.....	163
6. Anticuerpos y péptidos inmunogénicos.....	165
7. Diseño de vectores de expresión.....	166
7.1. Vectores de expresión en células de mamífero.....	166
8. Introducción de ADN exógeno en las células de mamífero.....	168
9. Purificación de jerдостatina recombinante.....	169
10. Análisis de proteínas.....	170



10.1. Western blot y dot blot .....	170
10.2. Identificación por espectrometría de masas .....	171
11. Ensayo de actividad de jerдостatina recombinante .....	172
12. Generación de la línea transgénica B6; 129P2-Tg(ROSA) 26Sor <sup>tm1(EGFP,Jerдостatina)</sup> Upme.....	173
12.1. Diseño y clonación .....	173
12.2. Introducción de ADN exógeno y selección .....	174
12.3. Análisis del ADN transgénico .....	176
12.3.1. Extracción de ADN .....	176
12.3.2. PCR.....	178
12.3.3. Southern blot .....	181
12.4. Recuento de cromosomas.....	187
12.5. Microinyección e implantación.....	189
12.6. Identificación de ratones transgénicos.....	190
13. Recombinación Cre/loxP .....	195
13.1. Recombinación y expresión <i>in vitro</i> de células MEF .....	195
13.1.1. Análisis de la recombinación.....	195
13.1.2. Análisis de la transcripción.....	195
13.1.3. Análisis de la expresión .....	197
13.2. Recombinación en los ratones transgénicos.....	197
13.2.1. Modelo de expresión constitutiva.....	197
13.2.2. Modelo de expresión condicional.....	199
13.3. Análisis de la recombinación, transcripción y expresión .....	200
13.3.1. Análisis de la recombinación .....	200



13.3.2. Análisis de la transcripción .....	200
13.3.3. Análisis de la expresión.....	203
<b>Resultados y Discusión .....</b>	<b>205</b>
1. Generación de un modelo animal para el estudio de jerdostatina ....	207
1.1. Diseño línea transgénica .....	207
2. Expresión y purificación de jerdostatina recombinante en células de mamífero.....	209
2.1. Expresión de Jerdostatina-EGFP .....	209
2.2. Expresión de SP <sub>SEAP</sub> -Flag-Jerdostatina.....	212
2.3. Expresión de SP <sub>BM40</sub> -Flag-Jerdostatina.....	214
3. Actividad <i>in vitro</i> de Flag-Jerdostatina recombinante.....	218
3.1. Flag-Jerdostatina recombinante se une al ectodominio $\alpha_1\beta_1$ . ....	218
3.2. Flag-Jerdostatina recombinante inhibe la adhesión de células RuGLi al colágeno.....	219
4. Generación de un ratón transgénico para jerdostatina .....	221
4.1. Identificación de células ES transgénicas .....	222
4.2. Identificación de ratones transgénicos.....	226
5. Expresión de Flag-jerdostatina .....	235
5.1. Recombinación Cre/loxP <i>in vitro</i> .....	236
5.1.1. Recombinación <i>in vitro</i> en MEFs aislados de ratones TgJerd.....	236
5.2. Recombinación en los ratones transgénicos.....	241
5.2.1. Expresión condicional de Cre.....	241
5.2.1. Expresión constitutiva de Cre.....	245
6. Discusión.....	250



## Índice

---

<b>Discusión general</b> .....	<b>255</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>263</b>
<b>Bibliografía</b> .....	<b>269</b>
<b>Anexos</b> .....	<b>299</b>
<b>Abrebiaturas</b> .....	<b>307</b>

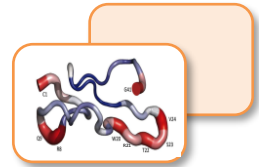
## **Capítulo I**

# **Caracterización de la disintegrina antiangiogénica jerdostatina**



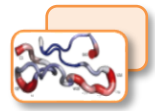
---

# Introducción



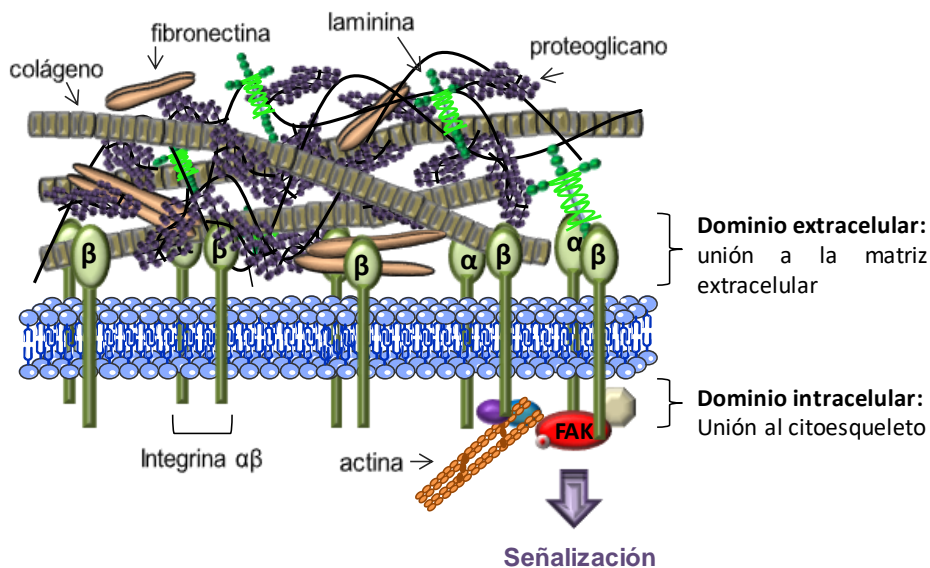






## 1. Las integrinas

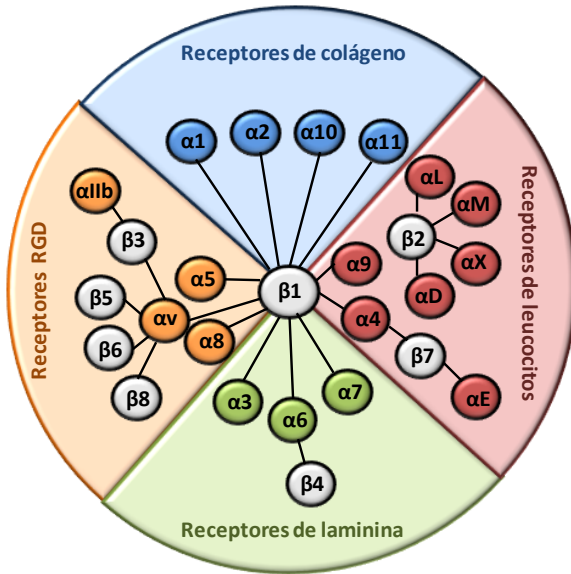
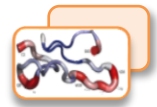
Las integrinas son una superfamilia de glicoproteínas, receptores transmembrana que median en las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular (Hynes, 2002). Estos receptores se unen a componentes de la matriz extracelular (MEC) como la fibronectina, colágeno y laminina, a otras moléculas de adhesión como las ICAM-1 de la superfamilia de las inmunoglobulinas, o a moléculas solubles como el fibrinógeno y el factor von Willebrand relacionadas con la coagulación (Humphries et al., 2006). A nivel intracelular interactúan con proteínas que las conectan funcionalmente con el citoesqueleto y con enzimas que desencadenan cascadas de señalización (Figura 1). Estas rutas de señalización son integradas en la célula junto con otras señales, regulando respuestas tan diversas como la adhesión, migración, proliferación, diferenciación y muerte celular (Wu and Dedhar, 2001; Calderwood et al., 2013).



**Figura 1. Componentes de la matriz extracelular.** Los principales componentes son el colágeno, la fibronectina, la laminina y los proteoglicanos. Las integrinas unen la célula a la MEC a través de su dominio extracelular y anclan el citoesqueleto a la membrana plasmática a través de su dominio intracelular, mediando la señalización. Adaptado de Karp y Patton, 2013.

## 1.1. Distribución de las integrinas

Las integrinas son heterodímeros formadas por dos cadenas polipeptídicas transmembrana  $\alpha$  y  $\beta$ , no unidas covalentemente. Se conocen al menos 18 subunidades  $\alpha$  y 8  $\beta$  en humanos (Barczyk et al., 2010), que al combinarse generan 24 heterodímeros diferentes (Figura 2). Cada uno de estos receptores presenta diferente unión a ligando y están presentes en distintos tipos celulares (Tabla 1).



**Figura 2.**  
**Representación de las**  
**diferentes**  
**combinaciones de las**  
**subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ .**

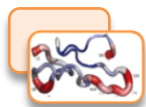
Adaptado de Barczyk et al., 2010.

**Tabla 1. Distribución celular y ligandos de algunas integrinas de vertebrados.**

Adaptada de Niu and Chen, 2012.

Integrinas	Distribución celular	Ligando
$\alpha_1\beta_1$	Células endoteliales, músculo liso, fibroblastos	CnIV, CnI, Ln,
$\alpha_2\beta_1$	Células endoteliales, epiteliales, plaquetas	CnIV, CnI, Ln, Tn
$\alpha_3\beta_1$	Queratinocitos	Ln
$\alpha_4\beta_1$	Leucocitos, células endoteliales	Fn, VCAM-1
$\alpha_5\beta_1$	Fibroblastos	Fn,
$\alpha_1\beta_2$	Linfocitos T	ICAM-1, ICAM-2
$\alpha_M\beta_2$	Monocitos	Fg, ICAM-1
$\alpha_V\beta_3$	Células endoteliales, musculo liso, osteoclastos, plaquetas, fibroblastos, leucocitos, epiteliales	Fg, Vn, Tn, Opn, Tsp, vWF
$\alpha_{11b}\beta_3$	Plaquetas	Fg, Fn, vWF
$\alpha_6\beta_4$	Células epiteliales	Ln
$\alpha_V\beta_5$	Células endoteliales, musculo liso, osteoclastos, plaquetas, leucocitos, epiteliales	Fg, Vn, Fn, Opn, Tsp

Fg: fibrinógeno, Fn: fibronectina, Cn: colágeno, Ln: laminina, Vn: vitronectin, vWF: factor von Willebrand, Opn: osteopontin, Tn: tenascin, Tsp: trombospondin.



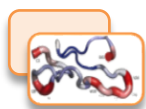
### 1.2. Características estructurales de las integrinas

Tanto la subunidad  $\alpha$  como la  $\beta$  poseen tres dominios estructurales: el extracelular, por el que se unen a la MEC; el dominio transmembrana y el intracelular o citoplasmático. Además, algunas integrinas contienen en el dominio extracelular de la subunidad  $\alpha$  ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_{10}$ ,  $\alpha_{11}$ ,  $\alpha_M$ ,  $\alpha_L$ ,  $\alpha_D$ ,  $\alpha_X$ ), insertado en la región N-terminal, el dominio de inserción "I" o "dominio  $\alpha$ -A" (~200 aa), homólogo al dominio A del factor von Willebrand (Figura 3B) (Dickeson and Santoro, 1998; Xiong et al., 2002; Gardner, 2003). El análisis genético de diferentes especies de vertebrados, reveló que la estructura de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  se encuentra altamente conservada (Hynes, 1992). Del mismo modo, el dominio de inserción  $\alpha$ -A también está conservado y tiene una historia evolutiva reciente ya que, solamente, se ha encontrado en vertebrados (Chouhan et al., 2014).

La región extracelular de la subunidad  $\alpha$  contiene un dominio con siete repeticiones hélice  $\beta$ , estructura tipo toroidal "β-propeller", donde el dominio  $\alpha$ -A se encuentra insertado, seguido del dominio "thigh" y dos dominios "calf". El dominio  $\alpha$ -A contiene un epítipo de unión de cationes divalentes denominado MIDAS ("Metal-ion dependent adhesive site") que juega un papel importante en la unión de ligandos (Figura 3) (Lee et al., 1995).

El dominio extracelular de la subunidad  $\beta$  contiene motivos estructurales de tipo hélice-bucle-hélice "EF HAND", denominado dominio "A-like" o "β-A", donde se encuentra el sitio MIDAS, seguido por un dominio PSI (plexina/semaforina/integrina), un dominio híbrido, cuatro





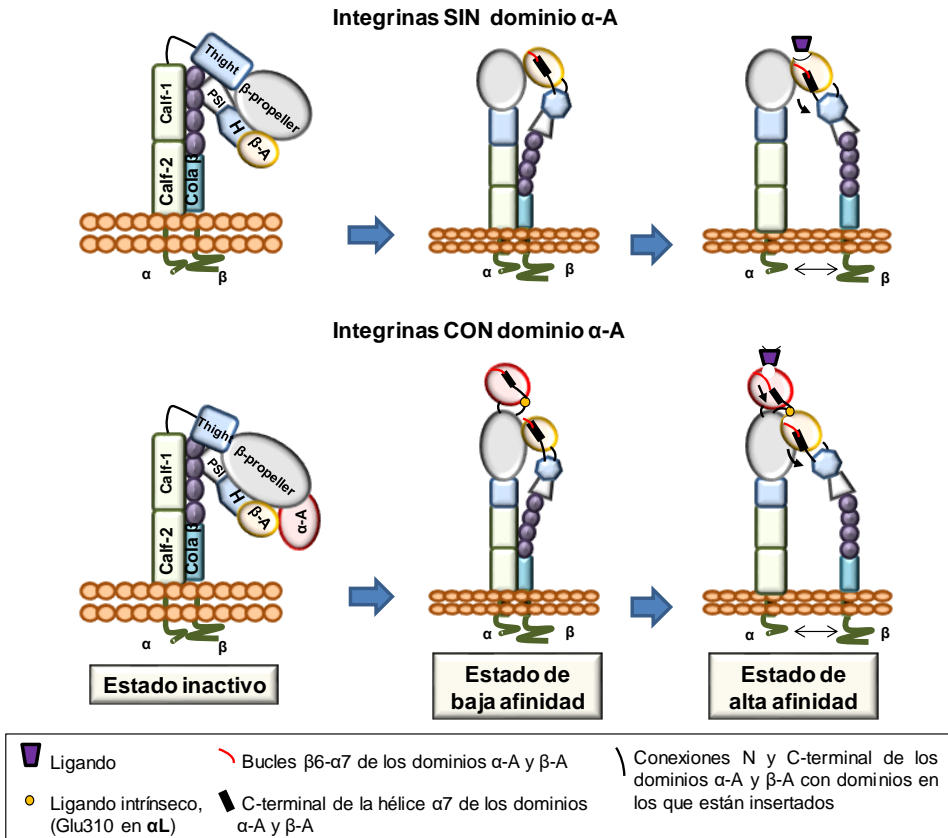
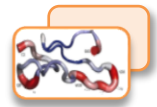
## Introducción

---

imprescindibles para mantener la capacidad de adhesión de la integrina, permitiendo los cambios conformacionales que afectan al receptor tras la unión del ligando (Dickeson et al., 1997; Wegener et al., 2007).

El análisis por cristalografía de rayos X permitió definir las bases estructurales del reconocimiento integrina-ligando. Así, datos estructurales de la integrina humana  $\alpha_v\beta_3$  acomplejada con un péptido sintético Arg-Gly-Asp (RGD), revelaron que la cadena lateral de la arginina y la glicina interaccionan con la subunidad  $\alpha_v$  y el aspartato con el dominio  $\beta$ -A, situando la región de unión de ligando en la interfase entre ambas subunidades. Estos datos mostraron que los cationes divalentes del dominio  $\beta$ -A (MIDAS) son críticos para la unión del péptido sintético RGD a la integrina. La comparación de la estructura de la integrina humana  $\alpha_v\beta_3$  con y sin péptido RGD unido, permitió determinar que se produce un movimiento de 1.5 Å hacia el tripéptido en la activación de la integrina (Xiong et al., 2001, 2002).

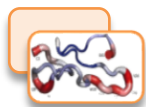
Posteriores estudios cristalográficos del dominio extracelular, tanto de  $\alpha_{IIb}\beta_3$  como de  $\alpha_v\beta_3$ , revelaron que las integrinas pueden encontrarse en tres conformaciones: abierta (forma activa), intermedia (estado de baja afinidad) o cerrada (inactiva). En condiciones de reposo o estado de baja afinidad por el ligando, la integrina se encuentra plegada sobre sí misma y cuando une el ligando, el receptor se encuentra extendido (Xiao et al., 2004; Zhu et al., 2008, 2013; Su et al., 2016) (Figura 4).



**Figura 4. Modelo de activación de las integrinas.** Adaptado de Zhu et al., 1013.

Asimismo, la región citoplasmática participa en el ensamblaje de un conjunto de proteínas intracelulares. La mayoría de las regiones citoplasmáticas contienen uno o dos motivos NPxY/F (donde x es un aminoácido cualquiera) que forman parte de la secuencia de reconocimiento de los dominios de unión a fosfotirosinas, presentes en una gran cantidad de proteínas señalizadoras del citoesqueleto. La fosforilación representa un modelo de regulación de las interacciones de integrinas con otras proteínas de la cara citoplasmática de la membrana





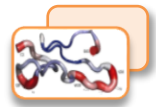
celular, conexión que es esencial para las funciones mediadas por integrinas (Clark and Brugge, 1995; Katyal et al., 2013).

Adicionalmente, se consideran los fenómenos de "clustering" o agrupamiento de receptores como otra forma de aumentar la afinidad por el ligando. Las integrinas forman grupos en los que numerosas proteínas citoplasmáticas se unen para formar un enlace entre la matriz extracelular y el citoesqueleto de la célula (Cluzel et al., 2005).

### **1.3. Señalización mediada por integrinas**

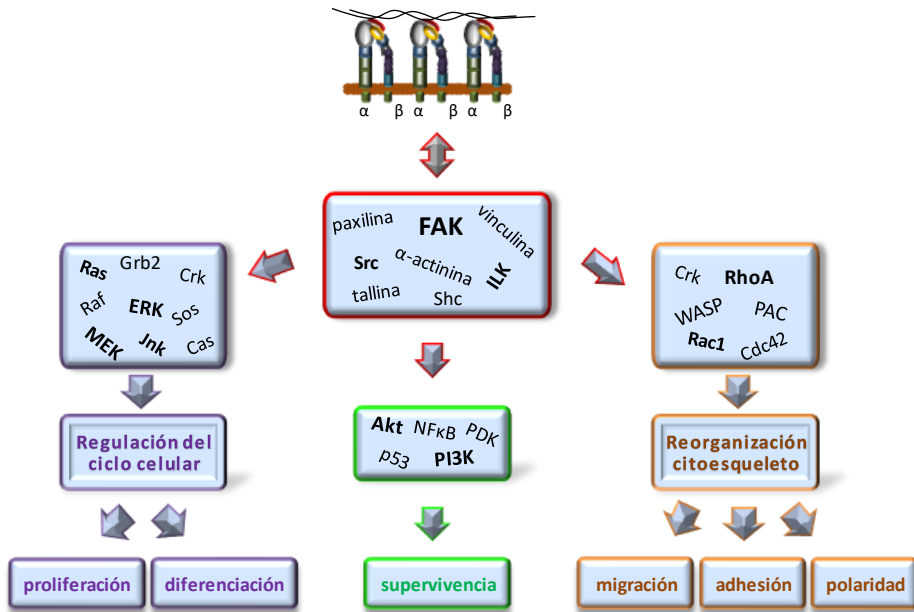
La interacción entre integrinas y componentes de la matriz extracelular constituye un mecanismo fundamental, ya que señales transmitidas a los dominios de las integrinas modulan la expresión de genes implicados en la regulación de múltiples procesos celulares. Existen dos tipos de sistemas de señalización mediados por integrinas, uno cuyo origen es la propia célula portadora de la integrina hacia el exterior (señalización "*inside-out*") y otro donde, tras la unión de un ligando extracelular, se produce la activación de los receptores y comienza así el reclutamiento de proteínas de señalización intracelular ("*outside-in*") (Hynes, 2002; Kim et al., 2003; Ye et al., 2011; Ginsberg, 2014).

En la señalización "*inside-out*", un gran número de proteínas del citoesqueleto, como la talina, y kindlina se unen a las colas citoplasmáticas (motivo NPxY) de las integrinas, desencadenando un cambio de conformación que conduce a la activación de la integrina (Tadokoro et al., 2003; Moser et al., 2009; Margadant et al., 2013). El mecanismo de



activación implica a quinasas de la familia Src y a la fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) (Calderwood et al., 2002, 2013; Wegener et al., 2007, Bouaouina et al., 2008).

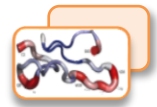
En la señalización "*outside-in*", la unión del ligando extracelular conduce a la agrupación ("cluster") de integrinas en complejos de adhesión focal en la membrana, y los cambios alostéricos producidos tras la unión del ligando conducen al reclutamiento de proteínas señalizadoras citoplasmáticas, que a su vez interactúan con proteínas del citoesqueleto como la vinculina, la tensina y la actina (Brakebusch and Fässler, 2003; Hu et al., 2007). En los complejos también se asocian proteínas involucradas en la generación de señales de activación como la quinasa de adhesión focal (FAK) o la quinasa ligada a integrinas (ILK). Estas quinasas se encargan de reclutar y fosforilar proteínas señalizadoras y adaptadoras generando cascadas de señalización celular. Estas señales pueden tener efecto sinérgico o antagónico con rutas activadas por otros receptores celulares como PI3K, Akt, la familia de Rho GTPasas o las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), produciéndose complejos procesos de integración de señales que convergen en puntos comunes y finalmente resultan en respuestas relacionadas con la regulación del ciclo celular, reorganización del citoesqueleto y supervivencia (Figura 5) (Giancotti and Ruoslahti, 1999; Schwartz and Ginsberg, 2002; Ling et al., 2002; Huveneers and Danen, 2009; Niu et al., 2012).



**Figura 5. Diagrama de las vías de señalización de las integrinas.** A través de la interacción con proteínas citoplasmáticas, las integrinas desencadenan múltiples vías de señalización que conducen a la organización del citoesqueleto, la motilidad celular, la proliferación, y la supervivencia celular.

## 1.4. Las integrinas: potenciales dianas terapéuticas

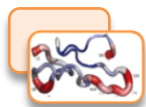
Además de sus múltiples funciones fisiológicas, las integrinas participan en diversos procesos patológicos. La supresión de genes que codifican para las integrinas en ratones "knock-outs" o KO mostraron que determinadas integrinas poseen un papel esencial en el desarrollo animal ( $\beta_1$ ,  $\alpha_1\beta_1$ ), en la integridad de la piel ( $\alpha_6\beta_4$ ), en procesos de inflamación y autoinmunidad ( $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_7$ ,  $\alpha_9\beta_1$  y  $\beta_2$ ), en la formación de los agregados plaquetarios causantes de trombosis e isquemia cardíaca ( $\alpha_{11b}\beta_3$ ), en tumorigénesis y angiogénesis ( $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha v\beta_3$ ,  $\alpha v\beta_5$ ), entre otras patologías (Jin and Varner, 2004; Taverna et al., 2005).



Los antagonistas de estas integrinas representan, por tanto, potenciales dianas terapéuticas (Shimaoka and Springer, 2003; Gabriel and Oliveira, 2006; Meyer et al., 2006; Ley et al., 2016). A este respecto cabe destacar la producción de fármacos que actúan bloqueando las integrinas como el anticuerpo monoclonal humanizado, ReoPro (abciximab) que bloquea a  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  y se utiliza para la prevención de isquemias cardiacas (Artoni et al., 2004) o Tysabri (natalizumab), un inhibidor que reconoce la subunidad  $\alpha_4$  y se utiliza en el tratamiento de formas recidivantes de la esclerosis múltiple (O'Connor, 2007). También se han desarrollado muchos antagonistas sintéticos de bajo peso molecular como Tirofiban (Aggrastat®) y Eptifibatide (Integrilin®), inhibidores del receptor plaquetario del fibrinógeno  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ , que se utilizan en clínica para prevenir el riesgo de infarto de miocardio o trombosis (Koh and Kini, 2012). Por otra parte, se han estudiado como agentes inhibidores de angiogénesis los fragmentos derivados de componentes de la MEC, como endostatina (colágeno tipo XVIII), tumstatina (colágeno IV) (Sudhakar and Boosani, 2008); así como un conjunto de antagonistas naturales selectivos de integrinas presentes en el veneno de serpiente como obtustatina, lebestatina y viperistatina (Marcinkiewicz, 2013).

## 2. La integrina $\alpha_1\beta_1$

La integrina  $\alpha_1\beta_1$  es uno de los principales receptores de unión a colágeno. Sus subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  se encuentran codificadas en diferentes genes (ITGA1, ITGB1) localizados en dos cromosomas distintos en



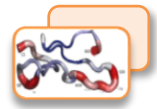
humanos (5q11.1, 10p11.2). La subunidad  $\alpha_1$ , descubierta por Hemler (1986), es una de las subunidades de unión a colágeno que, junto con  $\alpha_2$ ,  $\alpha_{10}$  y  $\alpha_{11}$ , poseen en la subunidad  $\alpha$  el dominio A, y a su vez, forman heterodímeros con  $\beta_1$ . Sin embargo, estas cuatro subunidades poseen diferente distribución celular y afinidad por el colágeno, lo que sugiere que participan en distintas funciones fisiológicas. De entre todas las integrinas,  $\alpha_1\beta_1$  está estrechamente relacionada con la integrina  $\alpha_2\beta_1$ , estructuralmente son muy similares y ambas unen el colágeno tipo I y IV, aunque con diferente afinidad (Nykvist et al., 2000; Tulla et al., 2008).

### 2.1. Distribucion tisular

La integrina  $\alpha_1\beta_1$  se expresa en muchos tipos celulares, incluyendo células neuronales (Tomaselli et al., 1993), mesenquimales (Ekholm et al., 2002), fibroblastos (Soligo et al., 1990), pericitos (Szulgit et al., 2002) y condrocitos (Loeser et al., 1995). Se encuentra principalmente en el músculo liso vascular y visceral (Belkin et al., 1990) y en el endotelio vascular, cuya expresión está regulada por el factor de crecimiento endotelial (VEGF) durante la angiogénesis (Senger et al., 1997; 2002; Defilippi et al., 1991).

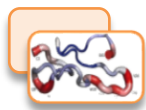
### 2.2. Unión de $\alpha_1\beta_1$ al colágeno

La integrina  $\alpha_1\beta_1$  se une a componentes de la matriz extracelular, principalmente al colágeno (tipo I y IV) y a la laminina-1. De entre los dos tipos de colágeno, posee una mayor afinidad por el colágeno tipo IV

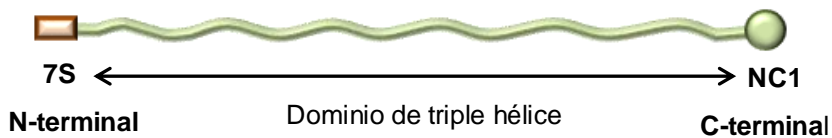


(Syfrig et al., 1991). El colágeno tipo IV es el principal componente de la membrana basal (Tanjore and Kalluri, 2006; Alberts et al., 2007), capa de la matriz extracelular que separa el tejido epitelial/endotelial y envuelve células del músculo liso, células adiposas y células de Schwann (Osidak et al., 2015). La membrana basal es el sustrato sobre el que las células se adhieren, migran y proliferan, y puede influir directamente sobre la forma y el funcionamiento celular (Aumailley and Timpl, 1986; Khoshnoodi et al., 2008).

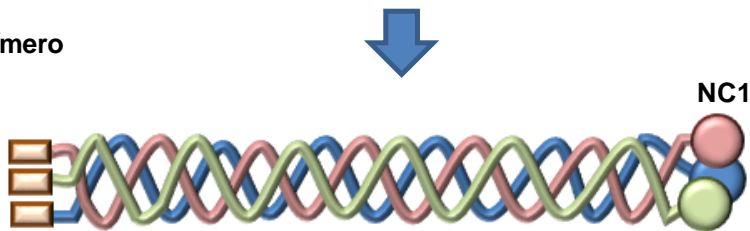
El colágeno tipo IV en los mamíferos deriva de seis cadenas  $\alpha$  polipeptídicas ( $\alpha 1$ -  $\alpha 6$ ), que se dividen en tres dominios: un dominio N-terminal (7S), un dominio intermedio de triple hélice helicoidal (repeticiones GXY, X=prolina; Y=hidroxiprolina) y un dominio C-terminal globular no colágeno-1 (NC1) (Gordon and Hahn, 2010). Las cadenas  $\alpha$  de colágeno tipo IV se autoensamblan para formar predominantemente heterotrímeros ( $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ ,  $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$  y  $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$ ) asociados a través de sus dominios NC1 (Figura 6). En la matriz extracelular, dan lugar a una red no fibrilar compleja, formando un fieltro de moléculas orientadas al azar, asociadas a proteoglicanos, a laminina y fibronectina (Kalluri, 2003).



### Cadena $\alpha$ del colágeno tipo IV

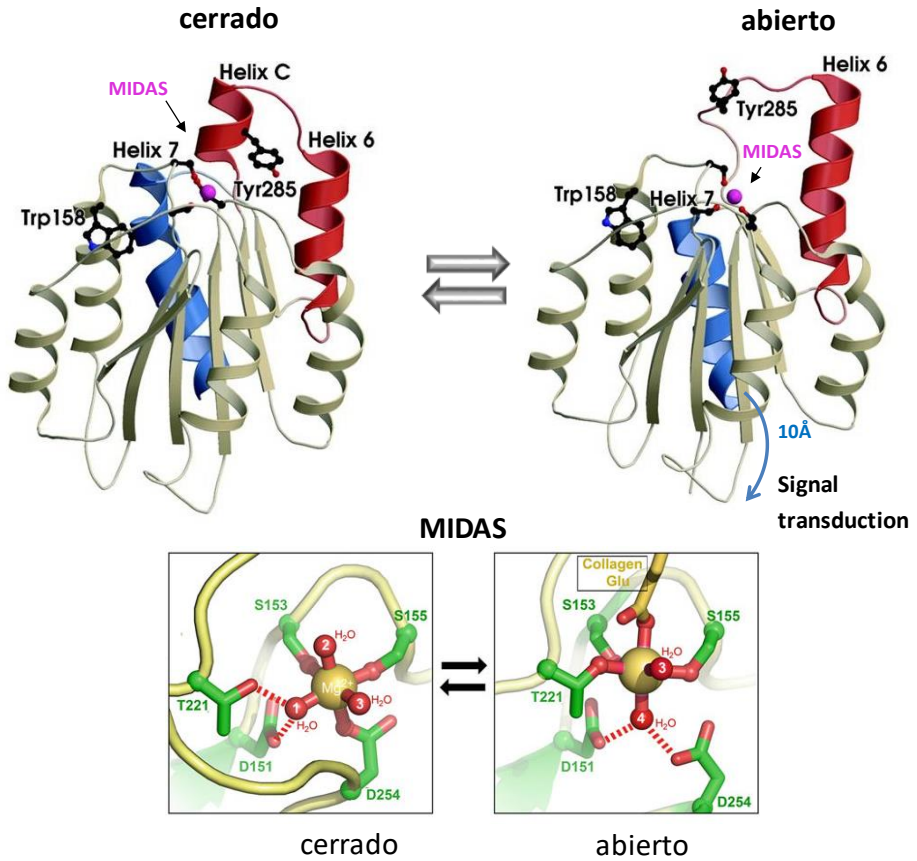
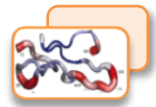


### Heterotrímero



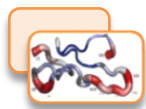
**Figura 6. Estructura del colágeno tipo IV.** Localización en la cadena  $\alpha$  de los tres dominios: dominio 7S, la triple hélice helicoidal y dominio NC1. Las cadenas  $\alpha$ , se asocian formando un heterotrímero a través del dominio NC1. Adaptado de Kalluri, 2003.

El dominio  $\alpha$ -A desempeña un papel directo en la unión a colágeno. Este dominio contiene un motivo MIDAS y está formado por siete hélices alrededor de una zona central formada por 5 hojas beta paralelas y una anti paralela (Figura 7). La interacción del colágeno altera la coordinación del ión metálico en la región MIDAS, generando cambios conformacionales que se traducen en un aumento de la afinidad del ligando. Estos cambios conformacionales se transfieren al resto del ectodominio de la integrina y finalmente a la cola citoplasmática, iniciando así la señalización intracelular (Emsley et al., 2000; Shimaoka et al., 2003) (Figura 7).



**Figura 7. Cambios conformacionales del dominio  $\alpha$ -A tras la unión del ligando.** En este modelo, la unión del ligando induce un cambio de una conformación "cerrada" (sin ligando) a "abierto" (con ligando), donde un residuo de glutámico del colágeno se coordina con el  $Mg^{2+}$  del sitio MIDAS (en rosa), provocando cambios conformacionales en las hélices  $\alpha$ C y  $\alpha$ 6 (en rojo) cerca del sitio MIDAS y la hélice  $\alpha$ 7 (en azul), que sufre un movimiento de 10 Å, interaccionando con el dominio  $\beta$ -A, provocando una reorganización de la topología global del receptor, e iniciando la señalización. Adaptado de Nymalm et al., 2004.





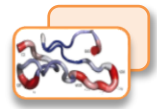
## Introducción

---

Dentro de la triple hélice del colágeno existen motivos específicos de unión al dominio  $\alpha$ -A, como la secuencia GXX'GEX'', donde X puede ser reemplazada por residuos hidrofóbicos (F/L/A), X' por 4-hidroxiprolina O/S y X'' por R/N (Knight et al., 2000; Kim et al., 2005; Raynal et al., 2006). Esta secuencia de reconocimiento representa un sitio de unión en colágenos I y IV para las integrinas  $\alpha_2\beta_1$  y  $\alpha_1\beta_1$  (Tulla et al., 2001; Hamaia et al., 2012).

Estudios cristalográficos por rayos X y RMN de los dominios  $\alpha_1$ -A (PDB 1PT6) y  $\alpha_2$ -A (PDB 1AOX) unidos a homotrímeros GXX'GEX' en triple hélice (PDB 2M32, 1DZI, 4BJ3) y a péptidos cíclicos (PDB 1QCY) mostraron que los dominios  $\alpha_1$ -A y  $\alpha_2$ -A unen ligandos de forma muy parecida (sitios de unión solapan o son adyacentes) pero con distinta afinidad. Esta diferencia se debe a: **a)** las dimensiones de ambos dominios son distintas,  $\alpha_1$ -A es más largo, más ancho y más profundo, permitiendo más contactos con los residuos del colágeno; **b)** diferencias en los residuos que rodean la región MIDAS, que generan diferentes superficies de unión al ligando **c)** la diferente disposición de la hélice  $\alpha$ C cerca del sitio MIDAS (Käpylä et al., 2000; Xu et al., 2000; Karpusas et al., 2003; Nymalm et al., 2004; Lambert et al., 2008; Weinreb et al., 2012; Chin et al., 2013).

Además de las diferencias estructurales entre los dominios-A de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , la integrina  $\alpha_1\beta_1$  tiene más afinidad por el colágeno tipo IV, indicativo de la existencia de una superficie de reconocimiento diferente entre colágenos fibrilares (tipo I) y no fibrilares (IV) (Kern et al.,



1993, Abair et al., 2008). Existe muy poca información sobre cómo las integrinas reconocen a los colágenos no fibrilares. La unión entre el colágeno IV y  $\alpha_1\beta_1$  parece ser dependiente de la conformación y se ha relacionado con la existencia de un fragmento heterotrimérico derivado del bromuro de cianógeno denominado CB3, que incluye los residuos 388-551 de  $\alpha_1$  (IV) y los residuos 407-570 de  $\alpha_2$  (IV), situado a 100 nm del extremo amino del colágeno IV, donde la triple hélice se encuentra estabilizada por puentes disulfuro (Vandenberg et al., 1991; Eble et al., 1993; Renner et al., 2004).

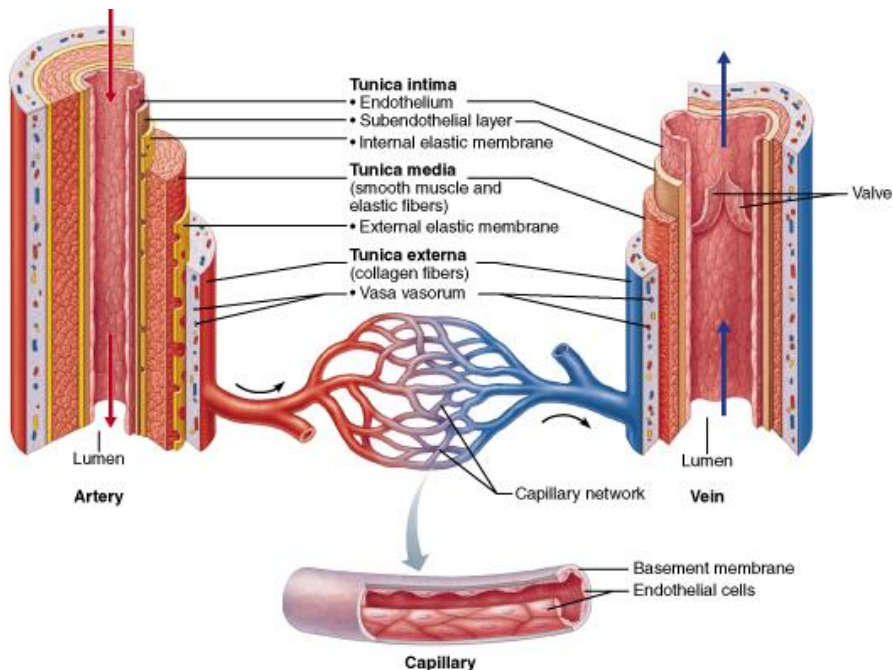
Posteriormente, se identificaron fragmentos del dominio NC1 de la cadena  $\alpha_1$  (arresten),  $\alpha_2$  (canstatina) y  $\alpha_3$  (tumstatina) del colágeno tipo IV, que se unen con alta afinidad a  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$  y  $\alpha_v\beta_3$  respectivamente. Estos fragmentos poseen propiedades antiproliferativas, proapoptótica y antiangiogénicas, sugiriendo la existencia de diferentes sitios de unión a integrinas dentro del colágeno IV con diferentes actividades (Colorado et al., 2000; Petitclerc et al., 2000; Magnon et al., 2005; Sudhakar et al., 2005).

### **2.3. La integrina $\alpha_1\beta_1$ en el sistema vascular**

La red vascular la componen los vasos sanguíneos (arterias, venas y capilares) diseñados específicamente para dar cabida a niveles de flujo y presión sanguínea variable. La estructura de la red vascular consiste en la disposición concéntrica de tres capas: la túnica íntima, es la capa más interna formada por células endoteliales y la lámina elástica interna; la túnica media, formada por células musculares lisas (CML) y la lámina

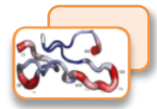


elástica externa; y la túnica adventicia, formada por fibras de colágeno y fibras elásticas (Figura 8).



**Figura 8. Composición de los vasos sanguíneos.** En el dibujo se muestran los tres tipos de vasos sanguíneos: arterias, venas y capilares; indicando la localización de las tres capas que los forman: túnica íntima, media y externa (adventicia). Imagen de Marieb and Nicpon, 2012.

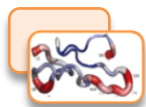
Como principales componentes celulares de los vasos sanguíneos, las células endoteliales y del músculo liso mantienen la integridad vascular. Las interacciones célula-matriz son esenciales para las funciones mecánicas de la pared vascular, en la función vascular normal y en el crecimiento, incluyendo la angiogénesis (Moiseeva, 2001). Las integrinas son los principales receptores involucrados en la adhesión, migración, proliferación y supervivencia de las células que forman los vasos, así como



en las patologías asociadas (Rupp and Little, 2001; Senger et al., 2002; Plow et al., 2014).

El estudio de modelos de ratones "knock-out" (KO) de subunidades específicas de integrinas permitieron determinar las funciones de estos receptores en el sistema vascular. Así, el modelo de ratón KO para la subunidad  $\beta_1$  mostró que la falta de esta subunidad es letal en la fase de preimplantación (Fassler and Meyer, 1995; Stephens et al., 1995). Posteriormente, estudios del modelo de ratón KO para  $\beta_1$ , específico de células endoteliales, mostraron que esta subunidad es necesaria para un correcto desarrollo vascular en ratones adultos, siendo letal en el estadio 10 (E10) al producirse graves fallos en el desarrollo vascular y hemorragias internas (Carlson et al., 2008; Lei et al., 2008; Tanjore et al., 2008). Además, la supresión de la integrina  $\beta_1$  provocó como resultado la pérdida de control vasomotor y reveló una fibrosis progresiva en las arterias asociada con apoptosis de las células del músculo liso vascular (Abraham et al., 2008; Liu and Leask, 2012). Sin embargo, a pesar de los efectos catastróficos sobre el músculo liso vascular, el músculo liso visceral permaneció intacto, lo que indicó que el músculo liso vascular, pero no visceral, es particularmente sensible a la supresión de la integrina  $\beta_1$  (Turlo et al., 2013).

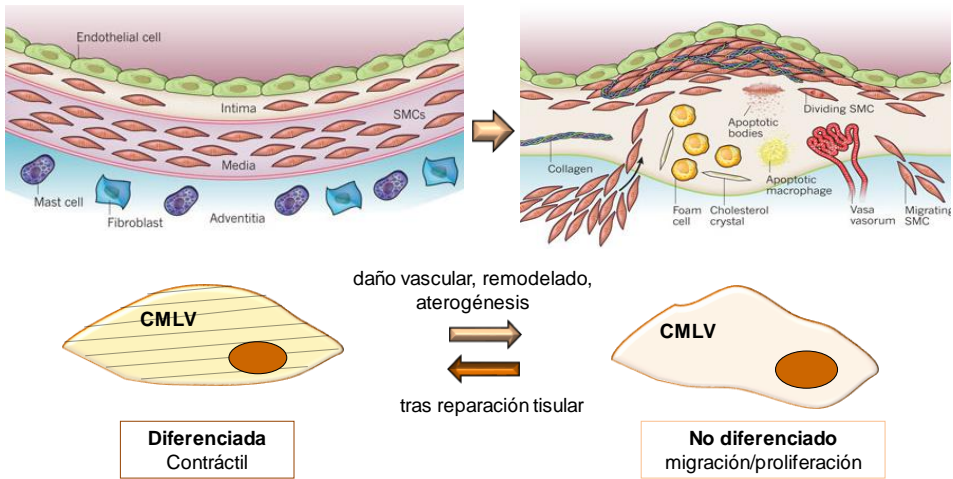
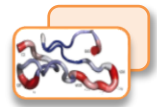
No obstante, los ratones KO para la subunidad  $\alpha_1$  son viables y fértiles (Gardner et al., 1996, 1999). Estos ratones muestran un desarrollo normal del sistema vascular, siendo, además, capaces de reducir la progresión tumoral asociada a un proceso angiogénico (Pozzi et al., 2000).



Por otra parte, las células del músculo liso vascular del animal  $\alpha_1$ -KO, mostraron un desarrollo normal, afectando solamente al tono vascular (Louis et al., 2007).

### **2.3.1. Las células del músculo liso vascular**

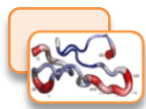
Las células del músculo liso vascular (CMLV), normalmente residen en la túnica media de la pared arterial y están implicadas en el desarrollo vascular, regulando la homeostasis y el tono vascular (Rensen et al., 2007; Nemen-Guanzon et al., 2012). Las CMLV son muy versátiles, poseen dos fenotipos, un fenotipo contráctil (o diferenciado) que funciona como regulador de la vasodilatación, la vasoconstricción y el flujo sanguíneo, y un fenotipo sintético (no diferenciado), donde las CMLV son móviles y participan en la remodelación vascular (Glukhova et al., 1991; Hao et al., 2003; Gomez and Owens, 2012). Las células del músculo liso exhiben una gran capacidad para oscilar entre ambos fenotipos (Halayko and Solway, 2001). Esta característica permite a las células contráctiles de la pared de una arteria, convertirse en sintéticas, migrar y proliferar antes de convertirse en contráctiles de nuevo, pero desafortunadamente, esta modulación del fenotipo también puede contribuir a patologías vasculares, tales como aterosclerosis, hiperplasia y restenosis (Bishop et al., 2001; Doran et al., 2008) (Figura 9).



**Figura 9. Papel de las células del músculo liso vascular durante la progresión de la aterosclerosis.** La progresión de la lesión implica un cambio fenotípico, las CMLV contráctiles pasan a ser células sintéticas, comienzan a migrar hacia la capa íntima, proliferan y sintetizan componentes de la matriz extracelular como colágeno, elastina y proteoglicanos. Adaptado de Libby et al; 2011.

Esta plasticidad fenotípica está influenciada por la composición de la MEC y modulada por los receptores de la matriz, como las integrinas (Hedin et al., 1988; Gotwals et al., 1996; Bunni et al., 2010), por la presencia de factores de crecimiento y por factores mecánicos (Rensen, 2007).

En las CMLV, las integrinas forman complejos de adhesión focal, permiten el anclaje a la matriz de la pared vascular, conectan con el sistema de microfilamentos contráctil intracelular (Mackay and Hall, 1998; Kim et al., 2008; Min et al., 2012; Saphirstein et al., 2013) y activan cascadas de señalización intracelular que originan cambios en la morfología celular y en el citoesqueleto (Martínez-Lemus et al., 2003; Hynes, 2009; Schwartz, 2010; Kappert et al., 2010).

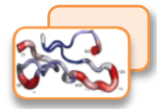


Las integrinas están, además, involucradas en la reparación vascular tras una lesión. Para llegar a las zonas dañadas de la pared del vaso, los receptores permiten que las células se adhieran y migren a través de la matriz intersticial y la membrana basal, causando la remodelación del citoesqueleto y desprendimiento de las adhesiones focales. Durante la migración las CMLV necesitan extender lamelipodios mediante polimerización de actina, deslizarse rompiendo los contactos célula-matriz y generar una fuerza motriz para impulsarse hacia adelante. Todos estos procesos están regulados por  $\text{Ca}^{2+}$ , la quinasa de adhesión focal (FAK), fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2), proteínas G y cascadas de señalización originadas por proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Ross, 1993; Schapira et al., 2005; Cukierman et al., 2001; Louis and Zahradka, 2010).

Las principales subunidades de integrinas expresadas por las CMLV son  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_v$  y  $\beta_1$  (Moiseeva, 2001). Los modelos de ratón KO (Abraham et al., 2008; Liu and Leask, 2012) mostraron la implicación de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  durante el desarrollo vascular que, junto a otras integrinas, participan en el mantenimiento vascular y en las patologías asociadas, convirtiéndose en objetivo para el diseño de fármacos cardiovasculares.

### **2.3.2. Las células del endotelio vascular**

El endotelio vascular está formado por una monocapa de células endoteliales que se encuentran recubriendo la zona interna de todos los



vasos sanguíneos. El endotelio protege la pared arterial frente a lesiones y contribuye a la regulación de la homeostasis vascular y permeabilidad, también tiene funciones antitrombóticas, controla la actividad de las células musculares lisas (CML) de la túnica media y regula procesos inflamatorios e inmunes (Folkman and Shing 1992; Cines et al., 1998; Sandoo et al., 2010; Durand and Gutterman, 2013; Tabas et al., 2015).

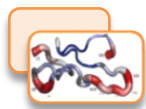
Las integrinas presentes en las células endoteliales que expresan la subunidad  $\beta_1$  en su superficie son  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$  y  $\alpha_v$  (Rupp and Little, 2001; Stupack and Cheresch, 2002). El estudio de ratones  $\alpha_1$ -KO reveló la existencia de una reducción en la angiogénesis vascular, resaltando el papel de este receptor  $\alpha_1\beta_1$  durante este proceso (Senger et al., 2002; Chen et al., 2005; Malan et al., 2010).

### 2.3.2.1 Angiogénesis

La habilidad de un tumor primario para crecer y propagarse depende de su capacidad para estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos, generalmente a partir de los ya existentes, necesarios para la renovación de los productos metabólicos gastados, proliferación y diseminación. Este proceso se denomina angiogénesis y se ha convertido en diana de nuevas terapias anticancerígenas (Folkman, 1971; Hanahan and Weinberg, 2011).

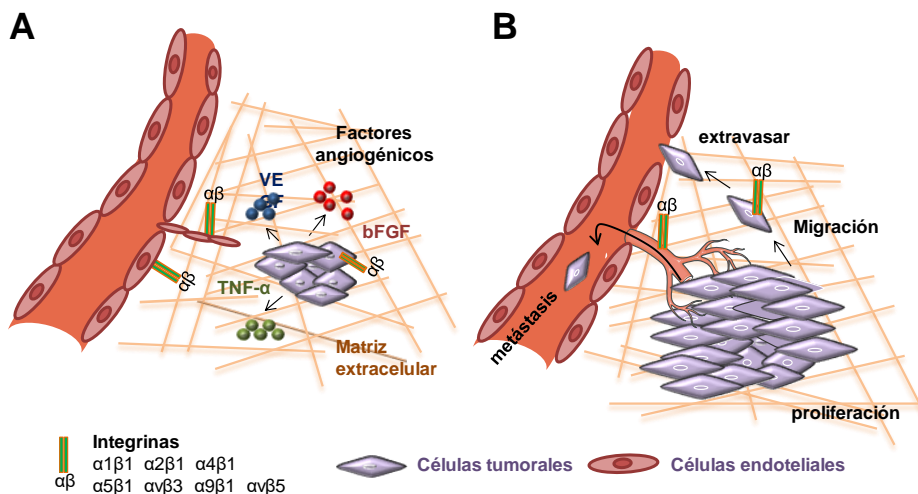
Para la formación de nuevos vasos sanguíneos, las células tumorales manipulan el microambiente a través factores de crecimiento, citoquinas y otros factores proangiogénicos para promover la invasión y





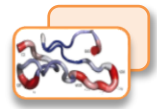
## Introducción

la supervivencia celular. Durante la angiogénesis, las células endoteliales, inducidas por estos factores, sobreexpresan en su superficie integrinas que activan distintas vías de señalización intracelular implicadas en la remodelación de la MEC, la reorganización del citoesqueleto, migración y proliferación fundamentales durante un proceso tumoral (Avraamides et al., 2008; Rathinam and Alahari, 2010) contribuyendo al crecimiento del tumor y a su diseminación (Figura 10).



**Figura 10. Angiogénesis y metástasis. A)** Las células tumorales inducen la formación de nuevos vasos sanguíneos a través de las integrinas, mediante la secreción de factores de crecimiento, como el bFGF y VEGF. **B)** La extravasación es un prerequisite de la metástasis, tras la invasión de la matriz, las células tumorales penetran las paredes vasculares y entran en la circulación sanguínea. Adaptado de Avraamides et al., 2008.

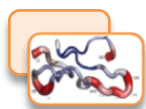
En la última década, el uso de animales KO ha permitido demostrar el papel regulador de las integrinas de unión a colágeno  $\alpha 1\beta 1$  (Pozzi et al., 2000) y  $\alpha 2\beta 1$  (Zhang et al., 2008) en la angiogénesis tumoral, en el cáncer y en los procesos metastásicos (Chen et al., 2005; Yoshimura et al., 2009;



Ibaragi et al., 2011). El análisis de ratones  $\alpha_1$ -KO, mostró que durante la remodelación vascular se produce una regulación positiva de la expresión de la integrina  $\alpha_1\beta_1$  (Chen et al., 2005), en consecuencia, el bloqueo de esta integrina mediante la interrupción de la unión a su ligando, puede producir un efecto antiangiogénico. Estos hallazgos enfatizan el papel de la integrina  $\alpha_1\beta_1$  en la angiogénesis y resaltan su importancia como diana en el descubrimiento de nuevos fármacos.

### **2.4 Inhibidores de $\alpha_1\beta_1$**

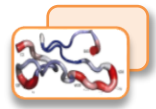
El conjunto de integrinas que contienen el dominio-A en la subunidad  $\alpha$  es objeto de estudio en el desarrollo de fármacos contra enfermedades inflamatorias, vasculares y el cáncer (Senger et al., 2002; Eble, 2005). Existen muy pocos inhibidores específicos frente al receptor  $\alpha_1\beta_1$ , entre los cuales cabe destacar el fragmento endógeno del colágeno IV, arresten (Aikio et al., 2012), péptidos sintéticos (Momic et al., 2014), anticuerpos humanizados (Goodman and Picard, 2012) y una serie de péptidos provenientes del veneno de las serpientes, inhibidores naturales únicos y específicos de la integrina  $\alpha_1\beta_1$  que se caracterizan por la presencia de un tripéptido (Arg/Lys)-Gly-Asp (R/K)TS en su estructura (Marcinkiewicz et al., 2003; Olza et al., 2005; Brown et al., 2008).



### 3. El veneno de serpiente

El veneno de las serpientes contiene un arsenal de toxinas cuyo cometido natural es inmovilizar y matar a la presa. La efectividad de los venenos, optimizada durante millones de años por selección natural, radica en la habilidad de sus toxinas de interferir en procesos biológicos de la víctima, no siempre de forma letal, que incluyen la coagulación de la sangre, la regulación de la presión arterial y la transmisión del impulso nervioso o muscular (Gutiérrez et al., 2010).

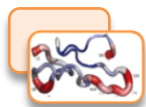
En el mundo existen unas 3000 especies de serpientes de las que unas 600 son venenosas. Las especies de serpientes venenosas se clasifican esencialmente en cuatro grandes familias, *Viperidae* (víboras y serpientes de cascabel) y *Elapidae* (cobras, mambas, serpientes de coral), *Atractaspidae* y *Colubridae* (culebras). Aunque en el veneno existe una gran variedad de moléculas (proteínas enzimáticas, no enzimáticas, péptidos, iones metálicos y compuestos orgánicos) que varía según la especie (interespecífico e intraespecífico), estudios proteómicos de los componentes del veneno de serpientes han revelado que, en realidad, se pueden clasificar en un número limitado de familias, entre las que destacan las metaloproteasas (SVMP), fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), serin proteinasas (SPs), lectinas de tipo C (CTLs), disintegrinas (DISs), proteínas ricas en cisteína (*Cysteine-Rich Secretory Proteins*, CRISPs) y las L-aminoácido oxidasas (LAOs) (Calvete et al., 2007b; Calvete, 2011; Casewell et al., 2014).



Del mismo modo, el veneno puede clasificarse según su efecto fisiopatológico como hemorrágico, si afecta principalmente el sistema cardiovascular; neurotóxico, si afecta al sistema nervioso central (SNC); miotóxico si afecta al sistema muscular o citotóxico, si afecta a la fisiología celular (Fox and Serrano, 2007).

Es asimismo importante resaltar la gran variedad de isoformas de cada familia proteica presentes en todos los venenos analizados. Esta variedad contribuye a la complejidad proteica de los venenos y a la diversidad de los efectos biológicos. No es, pues, de extrañar que se hayan descrito multitud de actividades biológicas asociadas a miembros de la misma familia proteica. Así, diferentes isoenzimas de las fosfolipasas A<sub>2</sub> provocan hemolisis, miotoxicidad, neurotoxicidad, cardiotoxicidad, edemas y actividad anti- o procoagulante (Kini, 2004, 2005).

El estudio de los componentes del veneno de serpiente es interesante por los efectos fisiológicos que ocasionan a través de su interacción con diferentes dianas moleculares. De esta forma, las proteínas aisladas de venenos de serpientes, letales en determinadas circunstancias, son utilizadas como herramientas moleculares para el diseño de drogas de relevancia en el diagnóstico y en la terapia de diferentes patologías como inflamación, cáncer o enfermedades autoinmunes (Koh et al., 2006; Fox and Serrano, 2007; Georgieva et al., 2008).



### 3.1. Las disintegrinas

#### 3.1.1. Origen de la familia de las disintegrinas

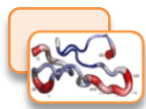
El veneno de vipéridos contiene metaloproteasas solubles dependientes de  $Zn^{2+}$ , denominadas SVMP (“Snake Venom MetalloProteinases”). Estas SVMPs pertenecen a la subfamilia de reprolisinas junto con las ADAMs humanas (“A Disintegrin And Metalloproteinase”) (White, 2003; Casewell, 2012). Las SVMP se organizan en forma de dominios estructurales según el siguiente orden: **a)** un dominio propéptido N-terminal; **b)** un dominio metaloproteasa, con un sitio activo de unión a  $Zn^{+2}$ ; **c)** un dominio disintegrina con las secuencias Arg-Gly-Asp (RGD) o Lys-Arg-Asp (KGD) de unión a integrinas y **d)** un dominio C-terminal rico en cisteína (Wolfsberg et al., 1995; Gutiérrez, 2000; Fox and Serrano, 2005, 2008; Brust et al., 2013). Las SVMP se clasifican en diferentes tipos, de PI a PIV, según el número de dominios que contengan (Markland and Swenson, 2013). Las PI presentan solamente el dominio metaloproteasa. Las PII tienen el dominio metaloproteasa y un dominio disintegrina en el extremo carboxilo terminal. Las SVMP-PIII presentan los dos dominios anteriores y un dominio rico en cisteínas. Las PIV, adicionalmente a los dominios anteriores, contienen dominios de lectina tipo C unidos mediante enlaces disulfuro entre si y al dominio rico en cisteínas (Fox and Serrano, 2005). Las SVMPs de la clase PIII han sido aisladas de venenos de serpientes de las familias *Viperidae*, *Elapidae*, *Atractaspididae* y *Colubridae*, en tanto las



SVMPs de las clases PII y PI solamente se han descrito en venenos de la familia *Viperidae* (Gutierrez et al., 2005; Fox and Serrano, 2008).

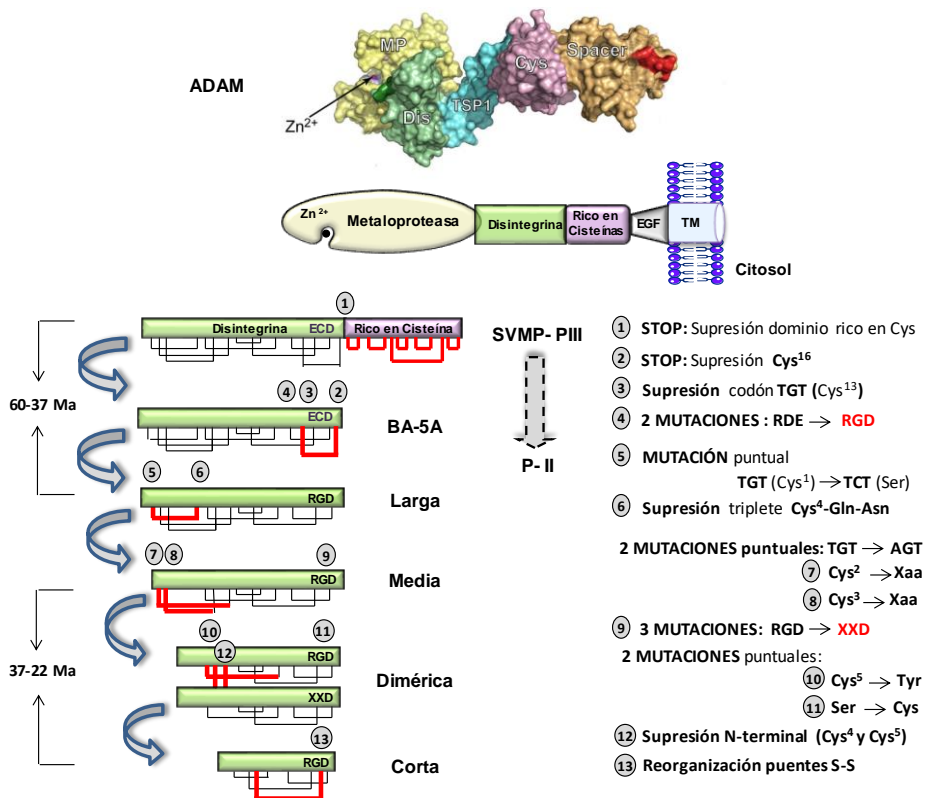
Las disintegrinas, objeto de estudio de esta Tesis Doctoral, fueron descritas en el laboratorio de Stephan Niewiarowski (Temple University, Philadelphia, USA) a finales de la década de 1980 (Huang et al., 1987; Niewiarowski et al., 1994). Las disintegrinas son polipéptidos, sin actividad enzimática, de 40-84 aminoácidos y de bajo peso molecular (4-16 kDa), cuya estructura está fuertemente tramada por 4-10 enlaces disulfuro inter- e intramoleculares (Calvete et al., 2009; Calvete, 2010). Las disintegrinas son liberadas al veneno de serpiente de la familia *Viperidae* por procesamiento proteolítico de las SVMPs-PII (Kini and Evans, 1992) o sintetizadas a partir de ARNm cortos que carecen de la región codificante para metaloproteasa (Okuda et al., 2002; Vija et al., 2009).

Atendiendo a su tamaño y al número de enlaces disulfuro (SS), la familia de disintegrinas se clasifican en largas: ~84 aminoácidos y 7 SS, medias: ~70 residuos y 6 SS, diméricas (homo- o heterodímeros) de subunidades de ~67 aminoácidos incluyendo 4 SS por subunidad y 2 SS intercatenarios, y cortas: ~40-49 aminoácidos y 4 SS; que se originaron por divergencia evolutiva mediante un mecanismo de minimización tanto a nivel genético (pérdida de intrones) como estructural (pérdida sucesiva de enlaces disulfuro) (Calvete et al., 2003, 2005). La amplificación del transcrito BA-5A, un intermediario en el paso de las SVMPs PIII hacia las disintegrinas largas, confirmó el modelo de evolución de las disintegrinas

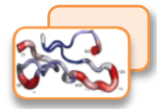


## Introducción

y reveló el orden de sucesos independientes que dieron lugar a las disintegrinas cortas (Juarez et al., 2006) (Figura 11).



**Figura 11. Esquema de la vía evolutiva de las disintegrinas.** El esquema representa el proceso de minimización estructural y diversificación que tuvo lugar a partir de una proteína de la familia SVMP-P-III por pérdida sucesiva de los diferentes dominios y reorganización de enlaces disulfuro (en rojo). El dominio metaloproteasa de las P-III y P-II se ha eliminado para simplificar la figura. EGF: "Epidermal growth factor"; TM: dominio transmembrana, Ma: millones de años. Adaptado de Calvete, 2010.



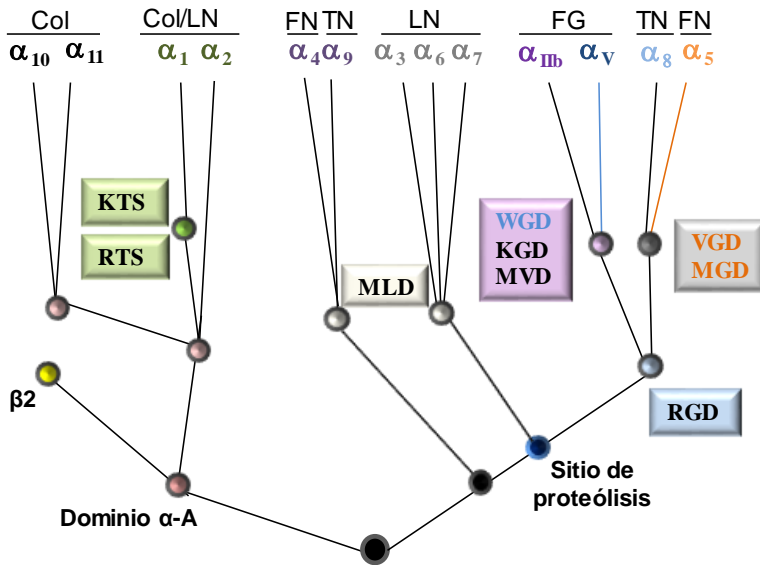
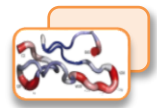
### 3.1.2. Motivos de unión de las disintegrinas

Las disintegrinas constituyen una familia de antagonistas de receptores de la familia de las integrinas  $\beta_1$  y  $\beta_3$  (Calvete, 2010, 2013), con la excepción de la integrina  $\alpha_2\beta_1$  que es reconocida por lectinas tipo C (Ogawa et al., 2005). Las disintegrinas fueron descubiertas como agentes inhibidores de la agregación plaquetaria, actuando como antagonistas de la integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Los primeros estudios bioquímicos y estructurales evidenciaron que el mecanismo antiagregante se producía a través de un tripéptido RGD, localizado en el ápice de un bucle móvil mantenido en la conformación activa por enlaces disulfuro y considerado el motivo de unión a la integrina (Calvete et al., 1991; Monleon et al., 2005). Este motivo ya había sido descrito previamente en los componentes endógenos de la matriz extracelular como el fibrinógeno, vitronectina y fibronectina (Arnaout et al., 2005).

Además del motivo de inhibición de agregación plaquetaria RGD, considerado el motivo de reconocimiento ancestral que reconoce a las integrinas  $\alpha_8\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_V\beta_1$ ,  $\alpha_V\beta_3$  y  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , se han caracterizado disintegrinas que poseen distintos tripéptidos activos frente a otros sistemas de interacción integrina-ligando. Entre los distintos motivos de unión a integrinas, VGD y MGD bloquean la función de la integrina  $\alpha_5\beta_1$ ; el tripéptido MLD interacciona con  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_7\beta_1$ ,  $\alpha_9\beta_1$  y  $\alpha_4\beta_7$ , KGD y WGD bloquean las integrinas  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_V\beta_3$  y  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , MVD a  $\alpha_{IIb}\beta_3$  y finalmente los motivos KTS y RTS antagonizan selectivamente la unión de colágeno I y IV a la integrina  $\alpha_1\beta_1$  (Figura 12) (Calvete et al., 2007a; Calvete et al., 2009; Calvete, 2010).







**Figura 13. Diagrama de evolución de los motivos de unión a integrinas.** Representación de la adaptación evolutiva de los diferentes motivos de unión respecto a la subunidad  $\alpha$  de las integrinas. Los motivos (R/K)TS se agrupan en un clado diferente dentro de la familia de las disintegrinas, tras la aparición del dominio  $\alpha$ -A. Esta representación no se encuentra escalada de acuerdo con una distancia evolutiva. Los motivos de las disintegrinas y las integrinas que reconocen están representados en el mismo color. Los componentes de la matriz están indicados como Col: colágeno; LN: laminina; FN: fibronectina; TN: tenascín; FG: fibrinógeno. Adaptado de Sanz et al., 2006.

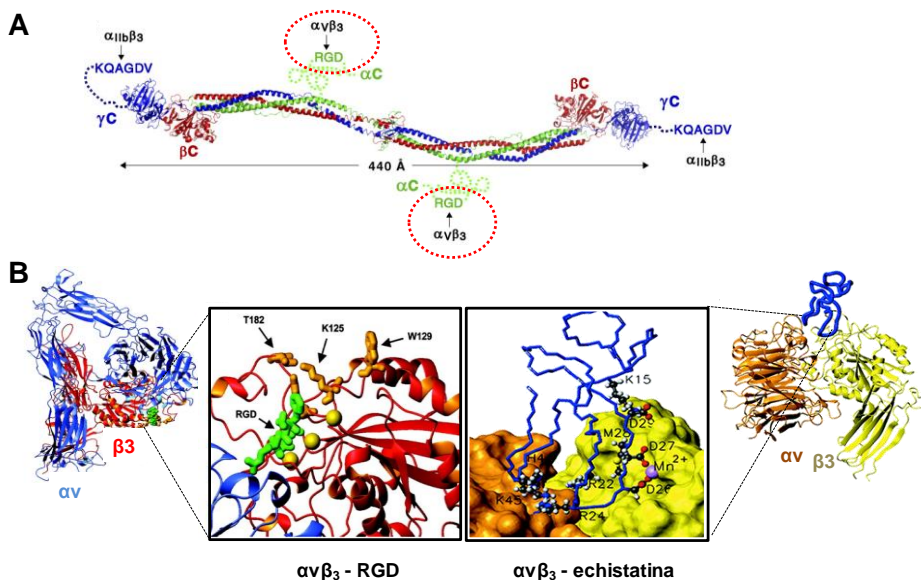
### 3.1.3. Mecanismos de unión de las disintegrinas

La resolución de las estructuras de los dominios extracelulares de la integrina  $\alpha_v\beta_3$  humana acomplejada con un péptido sintético cíclico RGD (Xiong et al., 2002) reveló que las disintegrinas podrían actuar mimetizando el mecanismo de unión del componente de la matriz extracelular a la integrina a través del motivo de unión tripéptido (Monleón et al., 2005) (Figura 14 B). Así, con la excepción del tripéptido

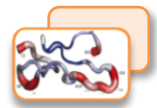


## Introducción

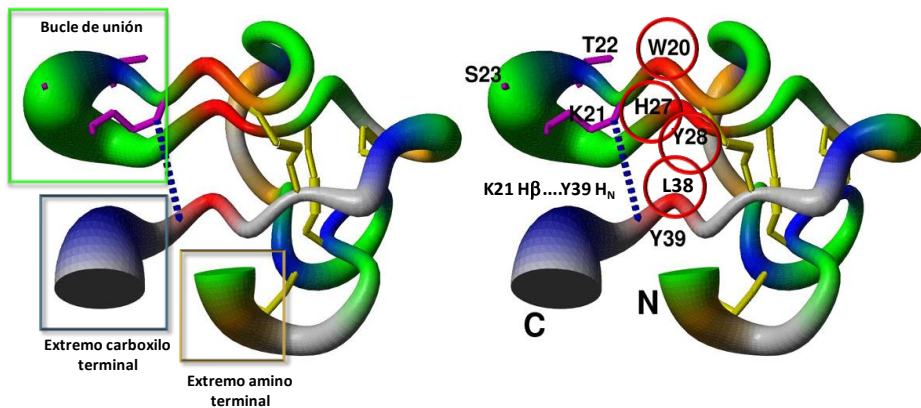
(R/K)TS, el aspartato podría ser responsable de la unión de disintegrinas a integrinas que comparten una subunidad  $\beta$ , mientras que los otros dos residuos del motivo de unión a integrina (RG, KG, MG, WG, ML o VG) podrían dictar la especificidad mediante la interacción con la subunidad  $\alpha$  (Calvete, 2005).



**Figura 14. Mimetización estructural de las disintegrinas. A)** El fibrinógeno se une a la integrina  $\alpha\beta_3$  a través del motivo Arg-Asp-Gly (RGD) localizado en el extremo carboxi-terminal de la cadena  $A\alpha$  ( $\alpha C$ ) del fibrinógeno (Springer et al., 2008). **B)** La comparación del ectodominio de la integrina  $\alpha\beta_3$  en complejo con un ligando sintético RGD (en verde) (Artoni et al., 2004; Xiao et al., 2004) y el modelo de interacción entre la integrina y la disintegrina equistatina, que presenta un motivo RGD en el ápice del bucle de unión, revela que la disintegrina mimetiza el mecanismo de unión del fibrinógeno. Las esferas amarillas y morada representan los iones divalentes situados en la región MIDAS (Xiong et al., 2002; Monleón et al., 2005).



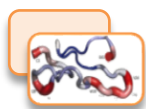
Estudios por RMN y mutagénesis revelaron que los aminoácidos adyacentes al bucle de unión de integrinas y el extremo C- terminal, conforman el epítipo funcional que interacciona con las integrinas (Figura 15). Estas dos regiones presentan un movimiento concertado con el bucle de unión, modulando la unión de la disintegrina a su receptor, induciendo cambios conformacionales que confieren diferente afinidad y potencia (Monleón et al. 2003, 2005; Carbajo et al, 2011, 2015).



**Figura 15. Epítipo de unión a la integrina.** Estructura por RMN de la disintegrina corta obtustatina (PDB 1MPZ), con motivo KTS (K21T22S23). Los residuos W20, H27, Y28 y L38 permiten un aumento de la flexibilidad del esqueleto proteico, lo que sugiere que el extremo carboxilo terminal y el bucle de unión a integrina muestran ciertos movimientos concertados, articulados en estos residuos. El correcto emparejamiento de cisteínas (amarillo) determina la conformación de las disintegrinas. Adaptado de Monleón et al., 2003.

### 3.1.4. Importancia biológica de las disintegrinas

Las disintegrinas son antagonistas de las integrinas y por tanto posibles agentes terapéuticos en muchas patologías relacionadas con estos receptores. Existen una gran variedad de disintegrinas con

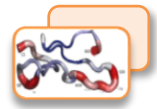


propiedades antiagregantes o anticancerígenas que inhiben, entre otros procesos, el crecimiento tumoral y la metástasis (Swenson et al., 2007; Marcinkiewicz, 2013) (Tabla 2). También, se han purificado formas recombinantes de disintegrinas que interactúan con las integrinas de manera más fuerte que sus formas nativas, como r-salmosin (Kim et al., 2004).

**Tabla 2. Disintegrinas con actividad antitumoral.**

Disintegrina	Estructura	Motivo	Integrina diana	Ligando	Referencia
Contortostatina	homodímero	RGD	$\alpha 5\beta 1$ , $\alpha v\beta 5$	Fn	Swenson et al., 2007 Lin et al., 2010
VLO5	heterodímero	VGD, MLD	$\alpha 9\beta 1$	VCAM, TN	McLane et al., 2008 Gupta et al., 2013
salmosina	media monomérica	RGD	$\alpha v\beta 3$	Vn	Hong et al., 2003
saxatilina	media monomérica	RGD	$\alpha v\beta 3$	Vn	Jang et al., 2007
jarastatina	media monomérica	RGD	$\alpha v\beta 3$ , $\alpha 5\beta$ , $\alpha M\beta 2$	Vn,Fn, ICAM-1	Oliva et al., 2007
DisBa-01	media monomérica	RGD	$\alpha v\beta 3$	Vn	Montenegro et al., 2012
eristostatina	corta monomérica	RGD	$\alpha 11\beta 3$	Fg	Hailey et al 2013
echistatina	corta monomérica	RGD	$\alpha v\beta 3$	Vn	Gan et al., 1996 Shah et al., 2012
accutina	corta monomérica	RGD	$\alpha v\beta 3$	Vn	Yeh et al., 1998, 2001
triflavina	corta monomérica	RGD	$\alpha v\beta 3$	Vn	Sheu et al., 1997
obtustatina	corta monomérica	KTS	$\alpha 1\beta 1$	col IV	Brown et al., 2008
viperistatina	corta, monomérica	KTS	$\alpha 1\beta 1$	col IV	Staniszewska et al., 2009
lebestatina	corta monomérica	KTS	$\alpha 1\beta 1$	col IV	Olfa et al., 2005

Vn: vitronectina; Fn: fibronectina; Fg: fibrinogeno; TN: tenascin; ICAM-1: moléculas de adhesión intercelulares; VCAM: moléculas de adhesión vasculares.

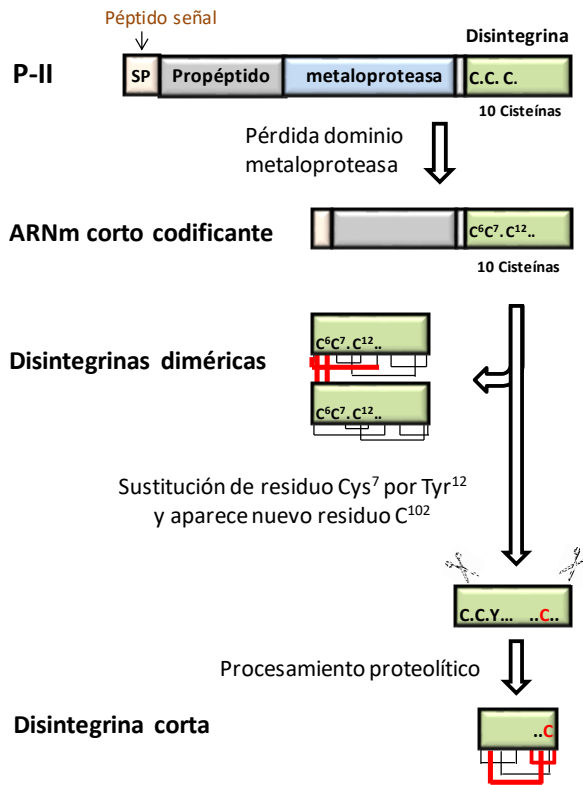
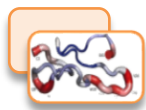


### 3.2. Disintegrinas cortas con motivo (R/K)TS

Determinados venenos de serpientes de la subfamilia *Viperinae* (víboras) contienen disintegrinas monoméricas cortas con el tripéptido (Arg/Lys)-Thr-Ser [(R/K)TS] en el bucle de unión a integrinas. Estas disintegrinas contienen 8 cisteínas en su cadena polipeptídica involucradas en la formación de 4 puentes disulfuro intramoleculares. Las disintegrinas (R/K)TS se caracterizan porque bloquean de forma selectiva y exclusiva la interacción de la integrina  $\alpha_1\beta_1$  a los colágenos tipo I y IV (Marcinkiewicz et al., 2003).

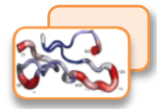
Las disintegrinas monoméricas cortas (R/K)TS encontradas hasta la fecha, son sintetizadas a partir de ARNm cortos. Estos ARNm codificantes contienen tres dominios bien definidos: un péptido señal, un prodomino o propéptido y un dominio disintegrina. El péptido señal localizado en la región N-terminal, es necesario para el transporte del péptido precursor al retículo endoplasmático y para la exocitosis de la toxina madura. En la glándula, tanto el péptido señal, el propéptido y el dipéptido C-terminal (NG) se procesan durante la formación de la proteína madura (Fox and Serrano, 2008).

A partir de la homología estructural observada entre los ARNm cortos que codifican para los dominios de las disintegrinas diméricas y las cortas, se propuso un modelo evolutivo en la emergencia de las disintegrinas monoméricas cortas basado en la sustitución de residuos aminoacídicos y en la ingeniería de enlaces disulfuro (Sanz et al., 2005) (Figura 16).



**Figura 16. Modelo evolutivo de las disintegrinas cortas propuesto a partir del mensajero precursor codificante.** Los eventos claves en la aparición de las disintegrinas cortas son: la eliminación del dominio metaloproteasa, la sustitución de un residuo de Cys por Tyr en la disintegrina dimérica precursora, impidiendo la dimerización, junto con la aparición de un nuevo residuo de cisteína que permite la formación un nuevo enlace disulfuro (en rojo) y el procesamiento proteolítico de regiones N- y C-terminal. Adaptado de Juárez et al., 2006.

La distribución en diferentes especies de serpiente de estos ARNm cortos codificantes parece ser más amplia de lo que se pensaba, sin embargo, no todos estos mensajeros se expresan para dar lugar a la proteína madura, sugiriendo la existencia de una regulación post-transcripcional, cuyo mecanismo es actualmente desconocido (Sanz et al., 2006; Sanz-Soler et al., 2016).



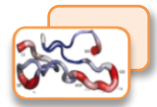
Las disintegrinas cortas encontradas en los venenos hasta la fecha con motivo KTS son: obtustatina presente en *Macrovipera lebetina obtusa* [P83469] (Marcinkiewicz et al., 2003), viperistatina presente en *Daboia palestinae* [P0C6E2] (Kisiel et al., 2004), lebestatina presente en *Daboia mauritana* [Q3BK14] (Bazaa et al., 2005) y con motivo RTS, russellistatina presente en *Daboia russelli* (Sanz-Soler et al., 2012). Perteneciente a este último grupo, la disintegrina corta jerdostatina, con motivo RTS, fue expresada de forma recombinante a partir de una librería de ADNc de la glándula de veneno de *Protobothrops jerdonii* [AY262730] (Sanz et al., 2005).

Estudios comparativos por RMN de disintegrinas con motivo RGD y (R/K)TS mostraron que el bucle de reconocimiento de las integrinas (R/K)TS es más corto (9 residuos) que el bucle de unión RGD (11-12 residuos) y el tripéptido presenta una posición lateral en comparación con el motivo RGD (Figura 17) (Moreno-Murciano et al., 2003; Calvete et al., 2005).

Por otro lado, estudios por mutagénesis dirigida, RMN y dinámica molecular de las disintegrinas cortas (R/K)TS determinaron que la forma y el tamaño del bucle de unión a integrina, junto con su composición, flexibilidad, y la orientación distinta (lateral) del tripéptido, es la base estructural de su selectividad, potencia y especificidad para unir la integrina  $\alpha_1\beta_1$  (Calvete et al., 2007a; Carbajo et al., 2011; Daidone et al., 2013).





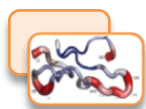


<b>M I Q V L L V T I C L A V F P Y Q V</b>	<b>18</b>
ATG ATC CAG GTT CTC TTG GTA ACT ATA TGC TTA GCA GTT TTC CCA TAT CAA GTC	54
<b>S S K T L K S G S V N E Y E V V N P</b>	<b>36</b>
AGC TCT AAA ACC CTG AAA TCT GGG AGT GTT AAT GAG TAT GAA GTA GTA AAT CCA	108
<b>G T V T G L P K G A V K Q P E K K H</b>	<b>54</b>
GGA ACA GTC ACT GGA TTG CCC AAA GGA GCA GTT AAG CAG CCT GAG AAA AAG CAT	162
<b>E P M K G N T L Q K L P L C T T G P</b>	<b>72</b>
GAA CCC ATG AAA GGG AAC ACA TTG CAG AAA CTT CCC CTT TGT ACA ACT GGA CCA	216
<b>C C R Q C K L K P A G T T C W <u>R T S</u></b>	<b>90</b>
TGT TGT CGT CAG TGC AAA TTG AAG CCG GCA GGA ACA ACA TGC TGG AGA ACC AGT	270
<b>V S S H Y C T G R S C E C P S Y P G</b>	<b>108</b>
GTA TCA AGT CAT TAC TGC ACT GGC AGA TCT TGT GAA TGT CCC AGT TAT CCC GGG	324
<b>N G *</b>	<b>110</b>
AAT GGC TAA	333

**Figura 18. Secuencia de jerdostatina obtenida a partir del ADNc del veneno de la glándula de *Protobothrops jerdonii*.** El precursor de ADNc de jerdostatina (333pb) codifica para una región altamente hidrofóbica en el extremo amino terminal (20 residuos, en rojo) que es típica de una secuencia señal de secreción de la proteína (péptido señal), un propéptido (21-68) y un dominio disintegrina (en verde) de 43 aminoácidos (residuos 69-110) (GenBank código AY262730). El motivo de unión a integrina RTS se encuentra subrayado.

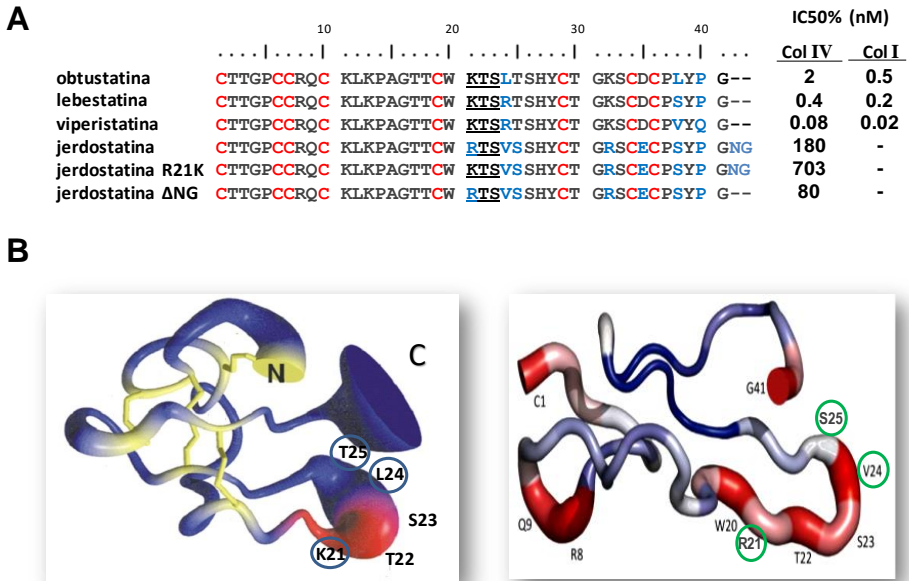
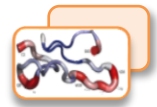
Jerdostatina, como el resto de disintegrinas cortas KTS, bloquea de forma selectiva la unión de la integrina  $\alpha_1\beta_1$  sobreexpresada en células K562 (células de leucemia mieloide crónica) al colágeno IV, sin que se observe actividad inhibitoria hacia otras integrinas, incluyendo  $\alpha_{11b}\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_{9b}\beta_1$  (Sanz et al., 2005).

La secuencia aminoacídica de jerdostatina posee un 80%-85% de identidad con las disintegrinas cortas con motivo KTS, donde las mayores diferencias se encuentran en los residuos del bucle de reconocimiento y en el extremo C-terminal. Jerdostatina presenta dos residuos C-terminales adicionales (N42, G43), que en todas las disintegrinas cortas KTS estudiadas sufren un procesamiento post-traducciona (Figura 19A).

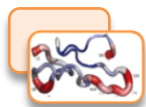


Estudios comparativos sobre la capacidad de inhibición de las disintegrinas (R/K)TS evidenciaron que jerdostatina es menos activa que las disintegrinas KTS. Estos estudios revelaron que los residuos aminoacídicos fuera del motivo de unión a integrina y el extremo C-terminal son los responsables de la disminución de la actividad inhibidora de jerdostatina, sin afectar a su selectividad hacia la integrina  $\alpha_1\beta_1$ , respaldando la existencia de una superficie de unión distinta dentro de esta subfamilia (R/K)TS (Sanz et al., 2005; Sanz-Soler et al., 2012).

Además, estudios por mutagénesis realizados por Sanz y colaboradores (2005) revelaron que el mutante jerdostatina R21K es un inhibidor más débil que el homólogo silvestre, sugiriendo que el motivo KTS es un antagonista menos potente que RTS (Figura 19A). Las características estructurales y dinámicas de jerdostatina (silvestre y mutante R21K) estudiadas por RMN mostraron que existe un comportamiento dinámico diferente para los residuos R21 (silvestre) y K21 (mutante) que explicaría la reducción de la actividad inhibidora del mutante respecto al silvestre, donde la base estructural de la potencia inhibidora radica en un movimiento concertado tipo bisagra entre el bucle de unión y la cola C-terminal (residuos R21 y Y28). Así, la flexibilidad del bucle es mayor en el silvestre porque la cadena lateral de la arginina es capaz de establecer diferentes interacciones con el residuo Y28, favoreciendo la unión del ligando (Carbajo et al., 2011, Calvanese et al., 2014).



**Figura 19. Diferencias entre jerdostatina y disintegrinas con motivo KTS. A)** Alineamiento de las secuencias de disintegrinas con motivo KTS, jerdostatina y mutantes (rJerR21K, y rJerΔNG). A la derecha se muestra el impacto de la supresión del extremo C-terminal (rJerΔNG) y la mutación puntual R21K en la actividad inhibitora (medida como IC<sub>50</sub>) de jerdostatina sobre la adhesión de células α<sub>1</sub>-K562 al colágeno IV. Los residuos de cisteína se han marcado en color rojo, en azul los aminoácidos que difieren entre las disintegrinas y se ha subrayado el motivo de unión a integrinas. **B)** A la izquierda se muestran la estructura por RMN de obtustatina (PDB 1MPZ, Moreno-Murciano et al., 2003), a la derecha la representación de la estructura promedio de rJerd (PDB 2W9O), rJerdR21ΔNG (PDB 2W9V), rJerR21K (PDB 2W9U), y rJerK21ΔNG (PDB 2W9W). En ambas representaciones se han marcado los aminoácidos que son distintos en el bucle de unión entre ambas disintegrinas. Adaptado de Sanz et al, 2005 y Carbajo et al., 2011.



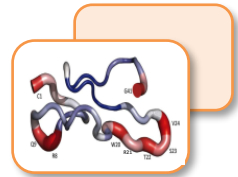
### 3.2.2. Las disintegrinas cortas KTS: agentes antiangiogénicos y antitumorales específicos de la integrina $\alpha_1\beta_1$

Las disintegrinas cortas con motivo KTS, obtustatina, lebestatina y viperistatina, específicas de las integrinas  $\alpha_1\beta_1$ , inhiben la angiogénesis y la progresión tumoral. Concretamente, obtustatina inhibe el desarrollo de angiogénesis en modelos CAM (membrana corioalantoidea) (Marcinkiewicz et al., 2003), bloquea el crecimiento de células MV3 (melanoma humano) en ratones, reduce la progresión del carcinoma pulmonar de Lewis (Brown et al., 2008), e inhibe parcialmente el crecimiento de sarcoma en ratones (Ghazaryan et al., 2015). Lebestatina, impide la angiogénesis inducida por VEGF evitando la adhesión y migración de las líneas celulares CHO- $\alpha_1$ , PC12 y HUVEC al colágeno tipo I y IV (Olfa et al., 2005). Viperistatina inhibe parcialmente la adhesión y migración de células MV3 *in vitro* y la proliferación y el crecimiento tumoral *in vivo* (Staniszewska et al., 2009).

Estos descubrimientos han permitido la generación de péptidos sintéticos cíclicos (con motivo KTS) análogos a las disintegrinas cortas viperistatina y obtustatina, antagonistas no solamente de  $\alpha_1\beta_1$ , también de  $\alpha_2\beta_1$  con propiedades antiangiogénicas (Momic et al., 2014).

---

## Objetivos



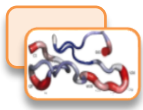




Las toxinas presentes en el veneno de serpiente, letales en determinadas circunstancias, pueden llegar a ser herramientas moleculares útiles para el diseño de drogas de relevancia en el diagnóstico y la terapia de enfermedades. Determinadas serpientes de la familia *Viperidae*, cuyo veneno es generalmente hemorrágico, contienen antagonistas específicos de integrinas llamados disintegrinas que inhiben la agregación plaquetaria y promueven la hemorragia. En esta familia encontramos las disintegrinas cortas que contienen un motivo (R/K)TS en su bucle de unión a integrinas y que bloquean selectivamente la interacción de la integrina  $\alpha_1\beta_1$  con colágenos tipo I y IV. La integrina  $\alpha_1\beta_1$  se encuentra altamente expresada en células endoteliales y del músculo liso vascular, relacionadas con la vascularización y angiogénesis. La interacción entre integrinas de la superficie celular y componentes de la matriz extracelular constituye un mecanismo fundamental de control de diferentes procesos celulares como la adhesión, supervivencia, proliferación y migración celular. El uso de antagonistas específicos de estos receptores permite evaluar no sólo la actividad del inhibidor si no, también, la importancia de dicho receptor en las células donde se expresan. Además, la posibilidad de frenar la expansión de las células tumorales bloqueando el flujo sanguíneo que necesitan para desarrollarse, se ha revelado como una de las estrategias más prometedoras en la lucha contra determinados tumores sólidos.

En base a este contexto, el objetivo principal de este primer capítulo de la presente Tesis Doctoral es el estudio de la actividad





## Objetivos

---

biológica de la disintegrina RTS recombinante jerdostatina antagonista de la integrina  $\alpha_1\beta_1$ . Este objetivo general se subdivide en varios objetivos:

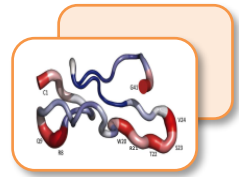
**1)** Con el objetivo de desarrollar inhibidores específicos de la integrina  $\alpha_1\beta_1$ , se pretende clonar, expresar y purificar en forma recombinante, soluble y activa la disintegrina jerdostatina, que expresa el motivo RTS, en bacterias *E. coli*.

**2)** Estudio *in vitro* de la actividad inhibidora de jerdostatina recombinante sobre la unión del ectodominio  $\alpha_1\beta_1$  al colágeno tipo IV, con el objetivo de profundizar en el mecanismo por el que la disintegrina jerdostatina bloquea de forma selectiva esta integrina.

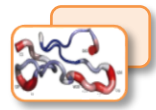
**3)** El estudio de la actividad de jerdostatina recombinante en la adhesión, migración y proliferación de células del músculo liso vascular sobre colágeno, para evaluar su capacidad inhibidora e indirectamente, determinar el papel de la integrina  $\alpha_1\beta_1$  en este tipo celular vascular.

**4)** Evaluación de la actividad antiangiogénica, mediada por factores de crecimiento (VEGF), de jerdostatina recombinante en células endoteliales HUVEC sobre colágeno.

# Material y Métodos







### 1. Reactivos

Todos los reactivos de biología molecular y celular fueron proporcionados por Roche, Sigma-Aldrich, Promega, Life technology (Invitrogen/GIBCO), Lonza, EMD Millipore (Novagen), PromoCell, GE Healthcare Life Sciences y Merck.

### 2. Líneas celulares

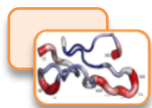
#### 2.1. Bacterias

En este trabajo se utilizaron las siguientes cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*): DH5 $\alpha$ , BL21(DE3) (Novagen, USA) y BL21 (DE3-RIL) cedida por el Dr. Alberto Marina (Instituto de Biomedicina de Valencia IBV-CSIC). La cepa DH5 $\alpha$  se utilizó para la clonación y amplificación de los plásmidos, mientras que BL21 para la expresión y posterior purificación de proteínas recombinantes. BL21 contiene el lisógeno DE3 del fago  $\lambda$  que permite la inducción de la ARN polimerasa T7 en respuesta a isopropyl-D-tiogalactosidasa, IPTG (Studier and Moffatt, 1986).

Las bacterias se prepararon para ser electro-competentes siguiendo el protocolo descrito por Sambrook y Russell (2001).

#### 2.2. Cultivos de células de insecto

El trabajo de manipulación de los cultivos celulares se realizó en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar de bioseguridad nivel II-A.



## Material y Métodos

---

Se utilizaron células Schneider S2 de *Drosophyla melanogaster* cedidas por el Dr. Johannes Eble (Centro de Medicina Molecular, Universitätsklinikum Frankfurt-am-Main, Alemania). Las células se crecieron en suspensión con agitación en medio Sf900™ (Invitrogen, Life Technologies) suplementado con 10% de SFB (Suero Fetal Bovino, GE Healthcare) a 25° C.

### 2.3. Cultivos celulares de mamíferos

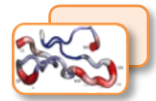
El material de plástico utilizado fue proporcionado por Nunc™ (Thermo Scientific). El crecimiento de las líneas celulares se llevó a cabo en condiciones constantes de temperatura a 37° C, concentración de CO<sub>2</sub> al 5% y en atmósfera húmeda. Las líneas celulares continuas y primarias utilizadas en el trabajo Doctoral son:

➤ *Líneas celulares continuas.*

- HT1080: Células derivadas de fibrosarcoma humano. Cedidas por el Dr. Johannes Eble (Centro de Medicina Molecular, Universitätsklinikum Frankfurt-am-Main, Alemania).

➤ *Líneas celulares primarias* (Se utilizaron entre los pases 3 y 6 para todos los experimentos).

- RASMC: Línea celular del músculo liso de aorta de rata A7r5 ("Rat Aorta Smooth Muscle Cell"). Derivada de la aorta torácica embrionaria de ratas BD1X de 14-17 días de edad. Procedentes de ATCC (Manassas, VA, USA).



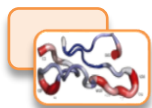
- HASMC: Línea celular procedente del músculo liso de aorta humana ("Human Aorta Smooth Muscle Cells"). Procedentes de PromoCell (Heidelberg, Alemania).
- HUVEC: Células endoteliales humanas del cordón umbilical ("Human Umbilical Vein Endothelial Cells"). Fueron cedidas por la Dra. Herminia González (Fundación Hospital Clínico, Valencia).

### 2.3.1. Condiciones de crecimiento celular

Las líneas de células adherentes HT1080 se crecieron en medio DMEM ("Dulbecco's modified Eagle's medium", GIBCO) con alta concentración de glucosa (4.5 g/l), suplementado con 100 unidades/ml de penicilina/estreptomicina (Lonza), 2 mM de L-glutamina (Lonza) y 10% de SFB (GIBCO) inactivado durante 30 minutos a 56° C.

Las células de músculo liso vascular (RASMC, HASMC) se cultivaron en medio de crecimiento para células musculares, suplementado con factores de crecimiento ("Smooth muscle cell Growth medium supplemented", PromoCell), 5% de SFB inactivado, 100 unidades/ml de penicilina y 0.1 mg/ml de estreptomicina.

Las HUVEC se crecieron en medio de crecimiento endotelial que contiene 10% SFB, 5 µg/ml del factor de crecimiento endotelial (EGF), 1.5 µg/ml del factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF), 0.1 mg/ml de gentamicina/anfotericina B y 1 mg/ml de hidrocortisona (GIBCO, Life technologies).



## Material y Métodos

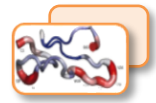
---

Los pasos necesarios para el mantenimiento de los cultivos celulares se realizaron con tripsina-EDTA. Para la conservación de las células, éstas se resuspendieron en un 50% (v/v) del correspondiente medio de cultivo completado con un 20% de SFB y 10% (v/v) de DMSO y se pasaron a un criotubo donde se congelaron a  $-80^{\circ}$  C. Posteriormente se almacenaron en contenedores de nitrógeno líquido. Todas las líneas celulares se testaron con el kit de detección MycoAlert™ (LONZA) para descartar posibles contaminaciones por micoplasma.

### 3. Plásmidos utilizados

#### 3.1. Vectores de expresión en bacterias

- pMD18-T: El precursor de ADNc de jerdostatina se encuentra clonado en este vector (Sanz et al., 2005).
- pGEM®-T: El plásmido pGEM®-T (Promega) es un vector lineal (3 Kb), digerido con el enzima de restricción EcoRV (genera extremos romos), al que se ha añadido a su extremo 3' un residuo de timina. Estas extensiones favorecen la eficiencia de ligación de productos de la reacción PCR ("Polimerase Chain Reaction") que poseen adenina en su extremo, añadida por la polimerasa. Incorpora una resistencia a ampicilina, lo que permite su selección por antibiótico. Este vector se ha utilizado para la clonación directa de productos obtenidos mediante PCR.



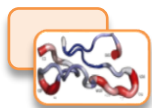
➤ pET-32a (+) (Novagen): Vector de 5.9 kb que permite la clonación y expresión de secuencias peptídicas fusionadas con la proteína tiorredoxina (109 aminoácidos) y una cola de histidinas en el extremo N-terminal (His-6x). Esta proteína de fusión aumenta la solubilidad de la proteína con la que se coexpresa facilitando su detección y purificación.

➤ pGEX/  $\alpha_1$ -A Domain: Cedido por el Dr. Johannes Eble (Centro de Medicina Molecular, Universitätsklinikums Frankfurt-am-Main, Alemania). Contiene el dominio  $\alpha_1$ -A fusionado a una etiqueta -GST (Glutathion S-Transferase) y con resistencia a ampicilina.

### 3.2. Vectores de expresión en células de insecto

➤ pUC-HygMT- $\alpha_1$  fos y pUC-HygMT- $\beta_1$  jun. Cedidos por el Dr. Johannes Eble. Vectores que expresan el ectodominio de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de la integrina  $\alpha_1\beta_1$ , en las que los dominios transmembrana y citoplasmático han sido reemplazados por una secuencia espaciadora (GGSTGGG) y los motivos de dimerización Fos y Jun. El ectodominio de  $\alpha_1$ -Fos contiene el dominio  $\alpha_1$ -A y el dominio con siete repeticiones (I-VII) a los que se unen cationes divalentes. El ectodominio de  $\beta_1$ -jun también contiene el dominio  $\beta$ -A de unión de cationes divalentes y cuatro regiones ricas en cisteína (Eble et al., 2001).



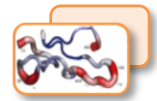


### 4. Diseño de cebadores

Los cebadores fueron diseñados mediante el programa GeneRunner y su aplicación de análisis de oligonucleótidos (Tabla 3).

**Tabla 3.** Oligonucleótidos utilizados como cebadores para la amplificación por PCR.

Nombre	Secuencia (5'--- 3')	Comentarios
1 5'SP_Sfi	GGCCATGGAGGCCATGATCCCAGGTTCTCTTG	pMD18-T
2 5'XhoI-SpRPTLN	CTCGAGTTATGATCCAGGTTCTCTTG	pMD18-T
3 5'XhoI-MatRPTLN	CTCGAGTTTGTACAACCTGGACCATGTTGTCG	pMD18-T
4 3'HindIII_RPTLN	CGAAGCTTTGCCATTCCCGGGATAACTGGG	pMD18-T
5 5'NheI-MatRPTLN	GTACGCTAGCGTGTACAACCTGGACCATGT	pMD18-T
6 5'NheI-SpRPTLN	GTACGCTAGCGATGATCCAGGTTCTCTTG	pMD18-T
7 3'XhoI-RPTLN	GTACCTCGAGGCCATTCCCGGGATAACTGGG	pMD18-T
8 5'NheI_ATG	GTACGCTAGCGATGAGGGCCTGGATCTTT	pET-32a
9 3'XhoI_RPTLN	ACCTCGAGCTAGCCATTCCCGGGATAACT	pET-32a
10 JerdXhoI-3'	GCCTCGAGTATTAGCCATTCCCGGGATAAC	pET-32a
11 KpnI_TEV_FlagJerd fw	ATGGTACCGAGAATCTTTACTTCCAAGGAGCCCC ACTAGCCGAC	pET-32a
12 SP6	GATTTAGGTGACACTATAGAATAC	Secuenciar
13 T7 Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG	Secuenciar
14 T7 Terminador	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Secuenciar
15 M13 fw (-20)	TGTA AACGACGGCCAGT	Secuenciar
16 M13 rv (-24)	GGAAACAGCTATGACCATG	Secuenciar



## 5. Anticuerpos y péptidos inmunogénicos

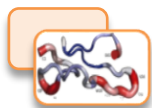
**Tabla 4.** Anticuerpos primarios utilizados para la inmunodetección de proteínas.

Anticuerpos Primarios				
Nombre	Antígeno	Dilución	Comentario	Referencia
Anti-Flag-HRP	Epitopo Flag	1:1000	Monoclonal de ratón	Sigma-Aldrich
Anti-PEP160	<sup>1</sup> PEP160	1:500	Policlonal de conejo	Abyntek
MAB1973	$\alpha$ 1humana	1:200	Monoclonal de ratón	Millipore
MAB2513	$\alpha$ 1 $\beta$ 1 de rata	1:200	Monoclonal de ratón	Millipore
JA218	$\alpha$ 2 humana	1:200	Monoclonal de ratón	Tuckwell et al; 2000
Anti- $\beta$ 1	$\beta$ 1 humana	1:2000	Policlonal de conejo	Eble, 1993
Anti-ratón	IgG de ratón	1:1000	Control para FACS	Sigma
Anti-GST	Glutathione - S-transferase	1:1000	Policlonal de conejo	Invitrogen
Anti-BrdU	Bromodeoxy-uridina	1:2000	Monoclonal de ratón	Calbiochem

<sup>1</sup>-El anticuerpo anti-PEP160 se purificó por cromatografía de afinidad con el péptido del extremo carboxilo terminal de la jerdostatina (CKPSYPGNG), conjugado con KLH ("Keyhole Limpet Hemocyanin"), a partir de sueros de sangrado de dos conejos inmunizados con este péptido.

**Tabla 5.** Anticuerpos secundarios utilizados para la inmunodetección de proteínas.

Anticuerpos Secundarios				
Nombre	Antígeno	Dilución	Comentario	Referencia
Anti-conejo-HRP	IgG conejo	1:10000	Producido en cabra. Conjugado a peroxidasa	Sigma-aldrich
Anti-conejo-AP	IgG conejo	1:2000	Producido en cabra. Conjugado a fosfatasa alcalina	Sigma-aldrich
Anti-ratón-R	IgG ratón	1:2000	Fragmento F(ab') <sub>2</sub> de cabra Conjugado a R-phycoerythrin	Invitrogen
Anti-ratón-HRP	IgG ratón	1:10000	Producido en cabra. Conjugado a peroxidasa	Santa Cruz



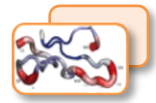
### 6. Diseño, amplificación y clonaje

Utilizando como molde ADNc de la glándula del veneno de *Protobothrops jerdonii* se amplificó por PCR los dominios péptido señal (vSP), propéptido y jerdostatina. Las secuencias se insertaron en el plásmido pMD18-T (Sanz et al., 2005). A partir de este vector, se diseñaron una serie de cebadores (1-7, Tabla 3) para amplificar por PCR los dominios: vSP-Propéptido-Jerdostatina (333 pb) y jerdostatina (149pb).

El programa de PCR (PCRJerd) consistía en un paso inicial de desnaturalización de 5 minutos a 94° C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización (30 segundos a 94° C), hibridación (30 segundos a 65° C) y extensión (30 segundos a 72° C); como paso final una extensión de 7 minutos a 72° C. La temperatura de hibridación se varió en función del par de cebadores empleados para la amplificación

**Tabla 6.** Componentes necesarios para la PCR.

Componentes	volumen (µl)	Concentración final
Tampón 10X con MgCl <sub>2</sub>	2	750 mM Tris HCl (pH 9.0), 500 mM KCl, 200 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO, 20mM MgCl <sub>2</sub>
dNTPs 10 mM	0.4	0.2 mM
cebador 5' 10 µM	0.4	0.2 µM
cebador 3' 10 µM	0.4	0.2 µM
ADN molde		50-100ng
Polimerasa Taq	0.4	5U/µl
Agua estéril Milli-Q	hasta 20	



Como control negativo se utilizó la mezcla de reacción de PCR sin ADN molde. El análisis de los productos amplificados se realizó por electroforesis en geles de agarosa del 1 o 2% según el tamaño de los fragmentos. Las muestras se mezclaron con tampón de carga 6X (0.25% colorante Orange, 30% glicerol) en TBE (90 mM Tris, 90 mM ácido bórico, 2mM EDTA, pH8).

### **6.1. Purificación de fragmentos de PCR**

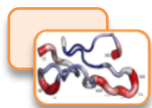
Los fragmentos amplificados se purificaron, bien directamente a partir de la mezcla de PCR si el amplificado era único, eliminando el resto de componentes de la mezcla mediante el producto enzimático ExoSAP-IT® de Affimetrix o bien, cuando se observaron varias bandas en el gel de agarosa tras la electroforesis, mediante escisión de la banda de interés. En ambos casos, para la purificación se utilizó un kit comercial (Illustra GFX PCR ADN and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare). Los fragmentos pequeños, se purificaron utilizando el kit comercial QIAEX II Gel extraction (Qiagen).

### **6.2. Clonación**

#### **6.2.1. Vectores**

- pGEM-T/Jerdostatina y pGEM-T/vSP-Propéptido-Jerdostatina

Los fragmentos purificados (vSP-Propéptido-Jerdostatina y jerdostatina) se ligaron directamente al vector de alto número de copias pGEM-T mediante la enzima T4 ADN ligasa (Promega). La ligación se realizó



durante toda la noche a 4° C y se transformaron bacterias *E. coli* (cepa DH5α) por electroporación.

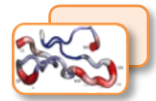
- pET-32a/Jerdostatina: vector de expresión de jerdostatina en bacterias. La secuencia del dominio de jerdostatina (149 pb) se amplificó por PCR (PCRJerd) utilizando el vector pGEM-T/Jerdostatina como molde, mediante los cebadores 8, 11 (Tabla 3) que introducen los sitios de restricción KpnI, XhoI y la secuencia de reconocimiento de la proteasa TEV. El fragmento amplificado y purificado se ligó al vector pET-32a, previamente digerido con los enzimas KpnI/XhoI a 37°C. El resultado de la ligación se utilizó para transformar bacterias BL21.

### 6.2.2. Introducción de ADN exógeno

#### 6.2.2.1. En bacterias

Las bacterias electrocompetentes de *E. coli* (cepas DH5α y BL21) se crecieron en medio LB a 37° C en agitación. Las bacterias se transformaron por electroporación a 1700 V. Este método de transformación permite la internalización del ADN exógeno al someter a las células a una diferencia de potencial que perfora temporalmente la pared celular. Para ello se utilizaron cubetas de 1 mm de ancho (Eppendorf) y el electroporador Eppendorf 2510.

Tras recuperarse durante 1 h en LB a 37° C, las bacterias fueron sembradas en placas de LB-agar con los antibióticos necesarios para su selección (100 µg/ml de ampicilina).



### 6.2.2.2. En las células de insecto

Las células Schneider S2 se cotransfectaron con pUC-HygMT- $\alpha_1$  fos y pUC-HygMT- $\beta_1$  jun, utilizando el reactivo TransFast™ Transfection Reagents (Promega, Madison, WI) y se seleccionaron con 0.1 mg/ml de higromicina B.

### 6.2.3. Selección de clones positivos

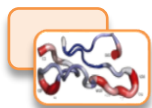
Los clones positivos fueron seleccionados por su resistencia a los antibióticos. La presencia de los diferentes insertos en los clones fue corroborada por PCR. El resultado se observó en una electroforesis en gel de agarosa al 1-2%. Posteriormente, se procedió a la extracción del ADN plasmídico (Wizard Plus SV Minipreps, PureYield™ Plasmid Midiprep y Maxiprep, Promega).

## 6.3. Cuantificación del ADN

El ADN se cuantificó por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 260 nm mediante el espectrofotómetro NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (Thermo scientific). La pureza se estableció mediante la relación de absorbancia  $A_{260/280}$  nm.

## 6.4. Secuenciación y análisis de secuencias

La secuenciación se realizó a través del servicio de Secuenciación del Instituto de Biomedina (IBV-CSIC) utilizando el secuenciador automático de ADN ABI PRISM-3130XL Genetic Analyzer de la casa Applied Biosystems. Las secuencias obtenidas se analizaron con el



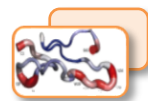
paquete de programas Staden Package y se buscó correspondencia por homología con la secuencia de la base de datos del NCBI mediante BLAST.

### **7.-Expresión y purificación de proteínas recombinantes**

#### **7.1. En bacterias**

##### **7.1.1. Expresión y purificación de jerdostatina recombinante**

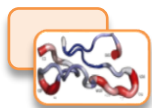
El clon de *E. coli* BL21 seleccionado, tras comprobar la presencia del plásmido de interés (PCR, digestión, secuenciación), se creció durante toda la noche a 37° C en medio LB con 100 µg/ml de ampicilina. Cuando la densidad óptica medida en el espectrofotómetro a 600 nm ( $OD_{600}$ ) alcanzó un valor comprendido entre 0.8-1, se añadió 1 mM de IPTG para inducir la expresión, a continuación, la suspensión celular se incubó durante 4 horas a 37° C en agitación. Transcurrido este tiempo, la suspensión celular se centrifugó a 6000 rpm durante 30 min, el precipitado celular se resuspendió en el mismo volumen en el tampón de equilibrado PBS (20 mM fosfato de sodio, 150 mM NaCl, pH 7.4). Posteriormente, se lavó 3 veces en el mismo tampón, se centrifugó y el precipitado se resuspendió en 50 ml de tampón de equilibrado. Las células se lisaron por sonicación (15 ciclos de 15 segundos con 1 minuto de descanso entre los pulsos) en hielo. Las células lisadas se centrifugaron a 10000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Las fracciones solubles e insolubles se analizaron por electroforesis en gel de acrilamida-SDS 15% en condiciones reducidas para comprobar la sobreexpresión de la proteína de fusión tiorredoxina-His(6x)-jerdostatina de forma soluble.



Esta proteína de fusión se purificó a partir de la fracción soluble del lisado celular por cromatografía de afinidad mediante el cromatógrafo ÄKTA Basic FPLC equipado con una columna de afinidad de níquel de 5 ml de (HisTrap HP, Amersham Biosciences). La proteína de fusión se eluyó aplicando un gradiente lineal creciente de 50–500 mM de imidazol. Las diferentes fracciones eluidas se analizaron por electroforesis en condiciones reducidas en un gel de acrilamida-SDS 12%. Aquellas fracciones que contenían la proteína de fusión se dializaron frente a PBS y se digirieron, durante toda la noche a 4° C, con la proteasa TEV-His(6x) (1:20 m/m) previamente purificada siguiendo el protocolo descrito por Tropea y colaboradores (2009).

La proteína recombinante jerdostatina (r-jerdostatina), tras la digestión, se separó de la proteína de fusión tioredoxina-His(6x) y de la proteasa TEV-His(6x) por cromatografía de afinidad en una columna quelante de níquel HisTrap HP. La fracción no unida a la columna (r-jerdostatina) se concentró por filtración en membranas de tamaño de poro de 3 kDa (Millipore, MA, USA). El concentrado se analizó por cromatografía líquida (HPLC) en una columna de fase reversa C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm, Waters, MA) equilibrada con 0.05% ácido trifluoroacético (TFA) y 5% acetonitrilo. Las fracciones retenidas se eluyeron con un gradiente lineal creciente de acetonitrilo del 5–70% durante 45 min. La concentración de proteína purificada se determinó mediante el método de ácido bicinonínico siguiendo el protocolo indicado por el fabricante (BCA kit, Pierce).

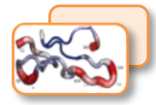




La pureza de la proteína se analizó por SDS-PAGE en condiciones reducidas.

### 7.1.2. Expresión y purificación del dominio $\alpha_1$ -A.

El dominio  $\alpha_1$ -A cedido por el Dr. Eble y producido de forma recombinante de acuerdo con Calderwood y colaboradores (1997), se encuentra clonado en el vector pGEX en bacterias *E. coli* (DH5 $\alpha$ ). Brevemente, las bacterias *E.coli* se crecieron durante toda la noche a 37° C en medio LB con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina. Cuando la densidad óptica OD<sub>600nm</sub> alcanzó un valor de 0.6, se añadió 0.4 mM de IPTG para inducir la expresión, a continuación, la suspensión celular se incubó durante 4 horas a 37° C en agitación. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 6000 rpm durante 30 min, el precipitado celular se lavó 3 veces en el tampón de equilibrado TBS (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5). Posteriormente se centrifugó y el precipitado se resuspendió en 50 ml de tampón de equilibrado con inhibidores de proteasas. Las células se lisaron por sonicación (5 ciclos de 30 segundos con 1 minuto de descanso entre los pulsos) en hielo. Las células lisadas se centrifugaron a 20000 rpm durante 15 minutos a 4°C. La proteína de fusión  $\alpha_1$ -A-GST se purificó a partir de la fracción soluble del lisado celular por cromatografía de afinidad en una columna de glutatión -agarosa (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante. La proteína de fusión  $\alpha_1$ -A-GST se eluyó con glutatión 5 mM en 50 mM Tris-HCl, pH 8.0. La proteína de fusión se dializó posteriormente frente a TBS para eliminar el glutatión.

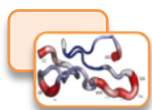


## 7.2. En células de insecto

La expresión y purificación del ectodominio de la integrina  $\alpha_1\beta_1$  se realizó siguiendo el protocolo descrito por De Santana Evangelista y colaboradores (2009). Brevemente, el clon de células Schneider S2 seleccionado se creció en agitación, una vez alcanzada una densidad aproximada de  $12 \times 10^6$  células/ml se indujo la expresión con la adición de 0.1% de glucosa, 0.8 mM de glutamina y 0.6 mM de sulfato de cobre en medio con SFB. La suspensión celular se recogió 5 días después de la inducción.

Las células se centrifugaron a 9000 rpm durante 30 minutos a 4° C. El sobrenadante se filtró con papel Whatman N°1 (GE Healthcare) y se añadió 0.5 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) en DMSO. La muestra se concentró por ultrafiltración en una membrana de tamaño de poro de 30 kDa (Amicon, Millipore). Se realizaron una serie de lavados con TBS-HCl pH7.4 para, poco a poco, ir cambiando el medio que posee sulfato de cobre, se añadió EDTA y se comprobó el pH. A la fracción retenida, mantenida a 4° C, se le añadieron inhibidores de proteasas (1mg/ml), 2 mM  $MgCl_2$ , 1 mM  $MnCl_2$ , 20% de azida, 0.5 mM PMSF y 1mg/ml de pepstatina. La muestra se centrifugó a 10,000 rpm, durante 30 minutos a 4° C y se recuperó el sobrenadante.

Las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad. El sobrenadante se transfirió a una columna de Sepharosa 4B CL que contiene el fragmento del colágeno tipo IV (CB3) unido covalentemente (Amersham Pharmacia Biotech). La columna cargada con CB3 se lavó 3



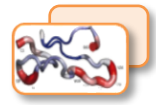
## Material y Métodos

---

veces con el tampón de lavado TBS/Mg/Mn/azida (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM MnCl<sub>2</sub>, azida). La adición de los metales divalentes Mg<sup>2+</sup> y Mn<sup>2+</sup> al tampón es necesaria y fundamental ya que aumentan la afinidad de la integrina por su ligando. La muestra se pasó por la columna toda la noche a 4° C. Al día siguiente se realizó un lavado con 0.5 M NaCl<sub>2</sub> en TBS/Mg/Mn/azida durante 30 minutos. Posteriormente, se lavó con 0.3 M NaCl<sub>2</sub> en TBS/Mg/Mn/azida otros 30 minutos y se realizó un último lavado con TBS/Mg/Mn/azida antes de eluir la muestra con 20 mM EDTA en TBS/azida. Inmediatamente, tras la elución, se añadió a los tubos 120 µl 1M MgCl<sub>2</sub> y 80 µl 2M Tris-HCl, pH 8. Las fracciones recogidas se concentraron por ultrafiltración (Amicon 30 YM) y se realizaron lavados con TBS/Mg/azida para eliminar el EDTA. La concentración de proteína se determinó mediante el método de ácido bicinonínico y las fracciones se analizaron por electroforesis en un gel de acrilamida-SDS.

### **8. Purificación de lebestatina a partir del veneno de serpiente**

La disintegrina corta KTS, lebestatina [Q3BK14], se purificó a partir del veneno de la serpiente *Daboia mauritanica*. 2 mg del veneno se separaron por HPLC de fase reversa usando una columna C18. El flujo se ajustó a 1 ml/min y la separación se desarrolló con un gradiente lineal de 0,1% de TFA en agua (solución A) y 5% acetonitrilo (solución B) durante 10 min, seguido por 5- 25% de B durante 20 min, 25- 45% de B durante 120 min, y 40 min al 45- 70% (Makran et al., 2012). Las fracciones fueron



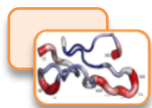
analizadas en condiciones nativas por SDS-PAGE y espectrometría de masas para su identificación.

## 9. Análisis de proteínas

### 9.1. Electroforesis, transferencia e inmunodetección

➤ *Western blot* (Coligan, 2003)

Las proteínas se analizaron por SDS-PAGE, Tris-Tricina-SDS, en condiciones reducidas utilizando, tanto geles de diferentes porcentajes de poliacrilamida (12%, 15%) como en gradiente (7.5% - 15%). Generalmente, se cargaron entre 15-40  $\mu\text{g}$  de los extractos celulares y entre 1  $\mu\text{g}$ -500 ng de las fracciones obtenidas durante la purificación. Antes de realizar la carga, se añadió a las muestras tampón de carga 6X con beta mercaptoetanol (375 mM Tris-HCl pH 6.8, glicerol 60%, SDS 12%, azul de bromofenol 0.024%, 2- mercaptoetanol 30%) y se hirvieron durante 5 minutos. La electroforesis se realizó en un sistema "protein Electrophoresis System" (Bio-Rad) a un voltaje de 85 V y tras pasar el gel de apilamiento a 120 V. El tampón electroforético para SDS-PAGE se compone de 0.2 M glicina, 250 mM Tris, 0.1% SDS. En el caso de Tris-Tricina-SDS se utilizaron dos tampones, el del ánodo que contiene 0.2 M Tris pH 8.9 y el del cátodo compuesto por 0.1 M Tris, 0.1 M Tricina, 0.1% SDS. El gel se tiñó con azul Coomassie para poder visualizar las proteínas presentes. La transferencia se realizó a una membrana de PVDF (Hybond-P PVDF Membrane, GE Healthcare) empleando un sistema "Semidry" durante dos horas a amperaje constante de 200 mA. El tampón de transferencia se compone



## Material y Métodos

---

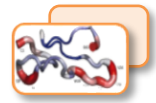
de 0.1 M glicina, 12.5 mM Tris y 20% metanol (v/v). Posteriormente se visualizó la transferencia tiñendo la membrana con rojo Ponceau (0.1% Rojo Ponceau, 5% ácido acético) y destiñendo con agua. El bloqueo de la membrana se realizó con leche desnatada al 5% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación o a 4° C toda la noche.

La inmunodetección se realizó con el anticuerpo especificado en cada caso (Tabla 4 y 5). Los anticuerpos se diluyeron en leche desnatada al 5% en PBS, en las condiciones que se indican en la tabla. Tras la incubación con el anticuerpo, la membrana se lavó con PBS-T [20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7.4, 0.1% Tween-20 (v/v)], tres veces, 5 minutos cada una. La reacción quimioluminiscente se detectó utilizando el reactivo comercial ECL Plus (Amersham Biosciences). El revelado y análisis de la señal luminiscente se realizó mediante el sistema LAS 3000 (Fujifilm).

### 9.2- Identificación por espectrometría de masas

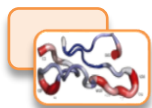
Aquellas fracciones purificadas y analizadas por HPLC se caracterizaron por espectrometría de masas de ionización por electroespray (ESI/MS) mediante el espectrómetro de masas QTrap 2000 (Applied Biosystems) equipado con un nanoespray (Proxeon, Denmark). Los espectros se analizaron manualmente, teniendo en cuenta que  $M = (m/z) z - zH^+$ , donde M se refiere a la masa del péptido, m/z: relación masa/carga; z: carga; H<sup>+</sup>: masa del protón (1.00794u).

Las masas teóricas monoisotópicas de las proteínas recombinantes se calcularon mediante el software informático Paws®.



### 9.3. Citometría de flujo (FAC)

Para caracterizar el perfil de expresión de las integrinas  $\alpha_1\beta_1$  y  $\alpha_2\beta_1$  en las líneas celulares RASMC y HASMC, se realizaron análisis de citofluorometría de flujo mediante anticuerpos anti-integrinas etiquetados fluorescentemente. Se utilizaron  $5 \times 10^5$  células/ml por condición. Las células se bloquearon con 1% de BSA (albúmina de suero bovino) y 1% de suero de caballo en PBS durante una hora en hielo. La suspensión celular se incubó con los anticuerpos monoclonales generados en ratón frente a las diferentes integrinas (MAB2513, MAB1973 y JA-218) (Tabla 4) a una concentración de  $5 \mu\text{g/ml}$  en el mismo medio de bloqueo. Las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con una dilución 1:2000 (v/v) del anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con R-phycoerythrina (Invitrogen) durante una hora en hielo. Las IgG del suero de ratón diluidas 1:1000 (v/v) (Sigma) se utilizaron como isotopo control. La fluorescencia se detectó mediante el dispositivo CyFlow® (Partec, Görlitz, Germany). El análisis de los datos e histogramas se obtuvieron con el programa Windows Multiple Document Interface (WinMDI) 2.9 (Miscellaneous software, The Scripps Research Institute, CA, USA). Los datos adquiridos se transformaron en histogramas mediante el programa Microsoft Excel.



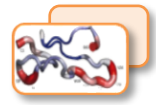
### 10. Ensayos de actividad de las proteínas recombinantes

#### 10.1. Ensayos de unión de las proteínas recombinantes

El análisis de la unión del ectodominio de la integrina  $\alpha_1\beta_1$  y el dominio A de la subunidad  $\alpha_1$  (cedida por el Dr. Eble) al colágeno (CB3, cedido por el Dr. Eble) y a la disintegrina jerdostatina recombinante, se llevó a cabo siguiendo un protocolo tipo ELISA ("*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*").

##### 10.1.1. Unión de la integrina soluble $\alpha_1\beta_1$ a CB3

El fragmento de colágeno tipo IV, CB3 se inmovilizó en una placa de 96 pocillos durante toda la noche a 4° C en TBS/Mg<sup>2+</sup> (Tris 50 mM/HCl pH 7,4, NaCl 150 mM, 2 mM MgCl<sub>2</sub>) a una concentración de 5 µg/ml. La placa se lavó tres veces con TBS/Mg<sup>2+</sup> y se bloqueó con 1% BSA en TBS/Mg<sup>2+</sup> a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras el bloqueo se añadieron por duplicado, partiendo de 30 µg/ml, diluciones seriadas 1:3 de la integrina soluble  $\alpha_1\beta_1$  disuelta en el tampón de bloqueo. A una columna de la placa se le añadió 1 mM MnCl<sub>2</sub>, compuesto metálico necesario para la unión del ligando; a la otra columna, se le añadió 10 mM EDTA (agente quelante). La incubación se realizó durante 2 horas a temperatura ambiente. La placa se lavó dos veces con 50 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub> y 1 mM MnCl<sub>2</sub>, la integrina unida se fijó con 2.5% (v/v) glutaraldehído (Sigma). Para la detección de  $\alpha_1\beta_1$  por inmunodetección, se lavó la placa tres veces con TBS/ Mg<sup>2+</sup> y se añadió una dilución 1:2000 del anticuerpo anti- $\beta_1$  de conejo en TBS/ Mg<sup>2+</sup>, 1% de



BSA durante 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó 3 veces y se añadió el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (AP) (1:2000) durante 2 horas. Tras lavar para eliminar las uniones inespecíficas, se añadió el sustrato p-nitrofenil fosfato (pNpp, Sigma) en un tampón con 0.1 M glicina pH 10.4, 1 mM  $MgCl_2$  y 1 M de acetato de zinc. La fosfatasa alcalina hidroliza a pNpp para formar p-nitrofenol el cual tiene una fuerte absorbancia a 405 nm. La reacción se detuvo al añadir 1.5 M NaOH y la absorbancia se midió en un lector de microplacas (BioTek, Bad Friedrichshall, Alemania).

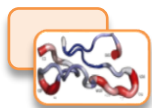
### 10.1.2. Unión de jerdostatina recombinante a $\alpha_1\beta_1$

El análisis de la capacidad de unión de la proteína r-jerdostatina a la integrina  $\alpha_1\beta_1$  soluble fue descrito por Juárez y colaboradores (2010). En este ensayo, 10  $\mu g/ml$  de jerdostatina recombinante se inmovilizaron a 4°C durante la noche en una placa de 96 pocillos. La disintegrina se incubó con diferentes concentraciones de la integrina soluble  $\alpha_1\beta_1$  (a partir de 30  $\mu g/ml$ ) durante 2 h. Como en el apartado anterior, la unión disintegrina-integrina se analizó por inmunodetección de la subunidad  $\beta_1$ .

### 10.1.3. Ensayo de inhibición de r-jerdostatina

Siguiendo el procedimiento descrito por Eble y Tuckwell (2003), se inmovilizaron 5  $\mu g/ml$  del fragmento CB3 en una placa durante toda la noche a 4° C en tampón TBS/ $Mg^{2+}$ . Una vez bloqueada la placa, 3.5  $\mu g/ml$  de la integrina soluble  $\alpha_1\beta_1$  o 30  $\mu g/ml$  del dominio  $\alpha_1$ -A unida a una etiqueta -GST (Glutathione S-Transferase) cedida por el Dr. Eble y producida





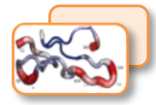
## Material y Métodos

---

de forma recombinante de acuerdo con Calderwood y colaboradores (1997), se mezclaron con concentraciones decrecientes (1:10) de r-jerdostatina (a partir de 50  $\mu\text{g/ml}$ ) y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras lavar y fijar durante 10 minutos con 2.5% glutaraldehído en tampón HEPES, la integrina  $\alpha_1\beta_1$  unida a CB3 se inmunodetectó con el anticuerpo policlonal anti- $\beta_1$  de conejo, mientras que el dominio  $\alpha_1$ -A se detectó con el anticuerpo anti-GST diluido 1:1000, durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez realizados los lavados correspondientes, se añadió el anticuerpo secundario (1:2000) anti IgG de conejo-AP. Finalmente la conversión del sustrato p-nitrofenil fosfato catalizado por AP se midió a 405 nm.

### 10.2. Análisis de la adhesión celular *in vitro*

El estudio *in vitro* de la actividad de r-jerdostatina se realizó utilizando las líneas celulares RASMC, HASMC y HT1080. En este ensayo, el fragmento CB3 (1  $\mu\text{g/ml}$ ) y el colágeno tipo I (10  $\mu\text{g/ml}$ ) fueron disueltos en tampón PBS/ $\text{Mg}^{2+}$  y se incubaron durante toda la noche a 4° C en una placa de 96 pocillos cada uno. Los pocillos se lavaron tres veces con PBS y se bloquearon durante 1 hora con 0.1% BSA en PBS. Las células de las diferentes líneas se sembraron a una densidad de  $0.2 \times 10^6$  células/ml durante 45 minutos a 37° C, en una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$ , en presencia de diferentes concentraciones de r-jerdostatina y rhodocetina (cedida por el Dr. Eble). Las células no adheridas se lavaron con PBS, las adheridas se marcaron con 0.5  $\mu\text{g/ml}$  de 2N,7N-bis-2-carboxyethyl-5-(and-6)-carboxy fluorescein (BCECF, Invitrogen), indicador fluorescente de pH intracelular,

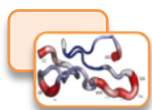


disuelto en DMEM (GIBCO) durante 15 minutos a 37° C en oscuridad (de Santana Evangelista et al., 2009). Parte de las células se fijaron con 4% formaldehído en PBS durante 10 minutos y se analizaron bajo el microscopio. Las imágenes se adquirieron a 20X aumentos con un microscopio Olympus IX71 y se analizaron con el programa Metamorph (version 7.7.4.0, Molecular Devices, Inc. Downingtown, PA, USA). El resto de células se lisaron durante 10 minutos con 30 mM Tris-HCl, pH 8.8 y 0.1% SDS, para cuantificar la fluorescencia incorporada por BCECF. La señal de fluorescencia se detectó a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 535 nm con un lector de placas de ELISA (BioTek, Bad Friedrichshall, Alemania). Se realizaron controles de adhesión sin inhibidores (control positivo) y con 10 mM de EDTA (control negativo).

### **10.3. Estudio de la adhesión y migración en tiempo real**

El sistema electrónico, sensor celular en tiempo real, xCELLigence RT-CES® (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) se utilizó para verificar la respuesta dinámica de las células en presencia de diferentes cantidades de r-jerdostatina, midiendo el índice celular. Éste parámetro indica la impedancia electrónica, la cual responde al número de células unidas a los pocillos. La placa contiene un microelectrodo, el cual permite monitorizar todo el proceso celular en tiempo real. De esta forma, el valor de índice celular se incrementa con la cantidad de células que permanecen adheridas en el fondo del pocillo a lo largo del tiempo.

Los ensayos de adhesión y migración celular en tiempo real se realizaron con células del musculo liso, RASMC. Siguiendo el protocolo



## Material y Métodos

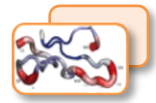
---

descrito por el fabricante, las placas E y CIM se cubrieron con 1  $\mu\text{g/ml}$  de CB3 y se dejaron durante toda la noche a 4° C. Posteriormente se lavaron con PBS y se bloquearon con 0.1% de BSA durante 1 hora. Se sembraron 0.2  $\times 10^6$  células/ml incubadas con diferentes concentraciones de r-jerdostatina y rhodocetina. Para el ensayo de migración, al medio de crecimiento se le añadió un 10% de SFB (sin fibronectina) como atrayente celular en la placa CIM.

Las células tratadas con 10 mM de EDTA sirvieron como control negativo. Los valores de impedancia electrónica se midieron cada 3 minutos durante 24 horas en las placas E y CIM, representando los procesos de adhesión y migración celular que están teniendo lugar a tiempo real. Antes de sembrar las células se realiza una primera mediada con el medio celular que correspondería a la señal de ruido de fondo. Los valores de la impedancia se corrigen con esta medida de ruido para obtener el índice celular,  $\Delta\text{Cell}$ . Los ensayos se realizaron por duplicado y los datos obtenidos se analizaron mediante el programa RTCA software 1.2 (Roche Diagnostics).

### 10.4. Análisis de la proliferación celular

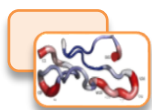
Para medir la tasa de proliferación celular se realizó un ensayo de incorporación de Bromodeoxiuridina (BrdU), empleando un inmunoensayo tipo ELISA (Calbiochem®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este análogo de la timidina, se utiliza como marcador de proliferación ya que se incorpora al ADN de nueva síntesis de aquellas células que se están dividiendo y, por lo tanto, proliferando.



Las células RASMC se sembraron en placas de 96 pocillos, previamente cubiertos con 1  $\mu\text{g/ml}$  de CB3, a una densidad óptima de 10,000 células/pocillo en medio suplementado con SFB y se añadieron cantidades crecientes de r-jerdostatina. Después de 1 hora de incubación, las células se marcaron con una solución de BrdU (1:2000) y se incubaron durante 24 horas adicionales a 37° C y 5% CO<sub>2</sub>. El medio marcado se retiró y las células fueron secadas, fijadas y permeabilizadas. El ADN se desnaturalizó con una solución incluida en el kit durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó un anticuerpo monoclonal de ratón anti-BrdU a cada pocillo y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras los lavados, las placas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón IgG-HRP durante 30 minutos. A continuación, se añadió a la solución un sustrato fluorogénico que es catalizado por la peroxidasa. El complejo inmune se cuantificó midiendo la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 320 nm y de emisión de 460 nm. Las unidades relativas de fluorescencia se correlacionan directamente con la cantidad de ADN sintetizado y el número de células proliferantes. El ensayo se realizó por cuadruplicado.

### **10.5. Ensayos de inhibición de angiogénesis**

Durante la angiogénesis, las células endoteliales se reorganizan para formar una red tubular de vasos sanguíneos. La formación de tubos puede ser estudiada *in vitro* mediante ensayos de morfogénesis que utilizan componentes de la matriz extracelular como el colágeno tipo I o



Matrigel (BD Bioscience), sobre los que se siembran las células endoteliales formando estructuras esferoides o tubulares.

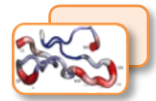
### 10.5.1. Formación *in vitro* de esferoides

#### ➤ *Purificación de colágeno tipo I a partir de colas de rata*

El colágeno tipo I fue obtenido de tendones de cola de rata de acuerdo al método de Rajan y colaboradores (2006). Los filamentos se lavaron en una placa de 100 mm conteniendo etanol al 70% durante 10 minutos y se trocearon hasta obtener una masa uniforme. Los fragmentos se pasaron a una solución de 0,1% de ácido acético y se incubaron durante 48 horas a 4°C en agitación. La solución se centrifugó a 24000 rpm durante 1 hora y se recogió el sobrenadante. Tras medir la absorbancia a 280 nm, se diluyó la muestra hasta alcanzar una concentración ideal de 0.250 mg/ml.

#### ➤ *Preparación de metocel (metilcelulosa)*

Se autoclavaron 6 g de metilcelulosa (Sigma, 4,000 centipoises) en una botella de 500 ml. La metilcelulosa se resuspendió en 250 ml de medio basal para células endoteliales a 60 °C. La mezcla se agitó durante 20 minutos y se añadieron 250 ml de medio de cultivo basal a temperatura ambiente. Tras agitar a 4 °C durante toda la noche se centrifugó a temperatura ambiente durante 2 horas a 10,000 rpm. El sobrenadante, que contiene la solución de metilcelulosa, se almacenó a 4°C hasta su uso.



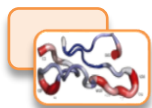
### ➤ *Formación de esferoides*

Las células HUVECs (entre 3-5 pases máximo) se cultivaron hasta alcanzar aproximadamente el 80% de confluencia. Tras tripsinizar, se centrifugaron a 900 rpm durante 5 minutos. El precipitado se resuspendió en 10 ml de medio de crecimiento para células endoteliales suplementado con 10% de SFB. Las células se contaron y se diluyeron para obtener aproximadamente 4,000 células/ml en medio de crecimiento para células endoteliales suplementado con 20% de metocel y 10% de SFB. Para la formación de esferoides se utilizaron 4 placas de 96 pocillos de fondo en forma de U, no adherentes. Las células se incubaron 24 horas a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### ➤ *Inclusión de esferoides en colágeno y tratamiento con factores de crecimiento*

Este ensayo se realizó en placas de 24 pocillos. A 4 ml de colágeno tipo I purificado se le añadió 0.5 ml de medio 199 10X (Sigma) y se mantuvo en hielo hasta el momento de la neutralización con NaOH 0.2 M. Los esferoides formados se recogieron y se centrifugaron a baja velocidad, 800 rpm, durante 5-10 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, el precipitado celular se resuspendió en 4.5 ml de una solución que contenía metocel, 20% de suero fetal bovino y 90 µl de HEPES 1 M (Sigma).

Una vez neutralizado el colágeno (aparece de color anaranjado indicativo de pH 7.5) se agregó inmediatamente a los esferoides y se mezcló cuidadosamente con una pipeta de 10 ml fría. Rápidamente se añadió 1 ml de la mezcla a cada pocillo. La placa se incubó 5 minutos a



## Material y Métodos

---

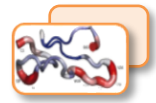
temperatura ambiente y transcurrido este tiempo, a 37 °C durante 30 min para que el colágeno gelificara. Una vez gelificado, a los pocillos se les añadió 40 ng/ml del factor de crecimiento endotelial vascular humano (hVEGF 165b, Cell Signaling Technology®) y diferentes concentraciones de r-jerdostatina y rhodocetina diluidos en medio basal sin suplementar y sin SFB. Como control negativo de angiogénesis a uno de los pocillos no se le añadió VEGF. La placa se incubó durante 24 horas a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### ➤ *Análisis de los esferoides*

Las esferas se fijaron en 4% paraformaldehído (PFA) y se procedió a captar imágenes en el microscopio óptico a 10X y 20X aumentos. Las imágenes se analizaron utilizando el programa Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>), en el que se calculó el número de ramificaciones y la longitud de las mismas.

### **10.5.2. Formación *in vitro* de túbulos capilares**

Ensayo que permite medir la formación de estructuras tubulares a partir de células endoteliales cuando éstas son cultivadas sobre un gel que contiene extracto de la membrana basal, Matrigel (Kubota et al., 1988). Este gel ha sido preparado a partir del sarcoma EHS ("Engelbreth-Holm-Swarm") producido en ratones, que contiene mayoritariamente laminina, colágeno IV, heparan sulfato, proteoglicano, entactina y otros componentes minoritarios optimizados para la formación de túbulos. Con este sistema, la formación de túbulos va ocurriendo en el transcurso de 6 a 24 horas, observándose los primeros signos de estructuras tubulares tras 3 ó 4 horas.



### ➤ *Polimerización del gel y formación de estructuras tubulares*

A una placa de 48 pocillos se le añadió 150  $\mu$ l de Matrigel por pocillo y Matrigel con 1 mg/ml de colágeno tipo IV humano. La mezcla se dejó polimerizar durante 30-60 minutos a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se sembró una dilución de  $3.5 \cdot 10^4$  células/ml en medio de crecimiento endotelial completo sobre la matriz de matrigel ó matrigel/colágeno IV polimerizada y se añadieron diferentes concentraciones de r-jerdostatina, rhodocetina y una mezcla de ambas. Las células se incubaron durante 16 horas a 37°C. Los ensayos se realizaron por duplicado.

### ➤ *Análisis de los túbulos*

Cada pocillo se dividió en 4 cuadrantes. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio óptico invertido Leica DM IRE2 que incorpora una cámara digital Leica DFC 280. El número de tubos y los puntos de ramificación se analizaron con el programa Image J.

## **11. Análisis estadístico**

Los datos se analizaron mediante el programa GraphPad Prism 5.0. Los datos obtenidos por ELISA fueron aproximados a una curva de regresión no lineal. Las diferencias en la adhesión, migración y angiogénesis se evaluaron mediante el modelo estadístico ANOVA y el test Bonferoni. Todos los datos se muestran como la media  $\pm$  el error estándar de al menos tres medidas independientes. Los valores con una  $P \leq 0.05$  se consideraron significativos.



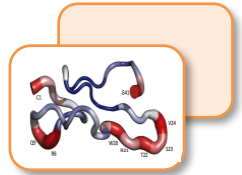


### 12. Modelado del complejo integrina-disintegrina

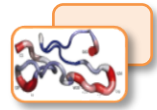
Como la estructura de la integrina  $\alpha_1\beta_1$  aún no ha sido resuelta, se han utilizado herramientas bioinformáticas para generar un modelo de predicción. Los servidores informáticos I-TASSER y SwissModel permiten predecir la estructura tridimensional de una proteína por homología con estructuras depositadas en el PDB, con un 85-90% de identidad con respecto a  $\alpha_1$ . El programa Coot permitió crear una integrina “quimera”  $\alpha_1\beta_1$  utilizando la estructura de  $\alpha_5\beta_1$  (PDB 4WJK) como molde.

El modelo de interacción de  $\alpha_1\beta_1$ -jerdostatina se realizó utilizando el programa de simulación de interacciones proteína-proteína o “docking”, HADDOCK (Vries et al., 2010). Para generar el modelo, se utilizó la interfaz fácil de HADDOCK y se indicaron los residuos pertenecientes a la interfaz de interacción del ectodominio  $\alpha_1$ -A (residuos 320-346) con los residuos que conforman el bucle de reconocimiento a integrinas de jerdostatina (residuos 23-24, PDB 2W9O). HADDOCK agrupó 100 estructuras en varios clústeres. Se seleccionaron los dos clústeres con mejor Z-Score. Este valor estadístico hace referencia a diferentes parámetros energéticos que determinan la calidad de la simulación. La representación y análisis de los clústeres se realizó mediante el visualizador molecular PyMol.

## — Resultados y discusión







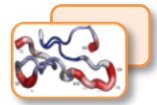
En los venenos de serpiente ha evolucionado un panel restringido, pero selectivo, de motivos de inhibición de casi todas las integrinas de las familias  $\beta_1$  y  $\beta_3$ . De entre este arsenal y a pesar de que existen 24 tipos diferentes de integrinas, las disintegrinas monoméricas cortas con motivo (R/K)TS solamente se unen a la integrina  $\alpha_1\beta_1$  (Sanz et al., 2005). Esta integrina de unión a colágeno, se caracteriza porque posee un dominio de inserción o dominio A en la subunidad  $\alpha$ . Las integrinas que contienen el dominio  $\alpha$ -A, parecen tener una historia reciente, ya que sólo se han encontrado en vertebrados (Hughes, 2001), por lo que las disintegrinas cortas (R/K)TS podrían representar el grupo más reciente en la evolución de la familia disintegrina. Actualmente, solamente se han encontrado en 4 especies de serpiente de la familia *Viperidae*, cuyo veneno es generalmente hemorrágico (Teng and Huang, 1991). Jerdostatina, objeto de estudio de esta Tesis, es una disintegrina RTS que se encontró a partir de una librería de ADNc (Sanz et al., 2005). El estudio de esta disintegrina permite evaluar no sólo la actividad de estos inhibidores (R/K)TS si no, también, el papel de la integrina  $\alpha_1\beta_1$  en los componentes de la red vascular.



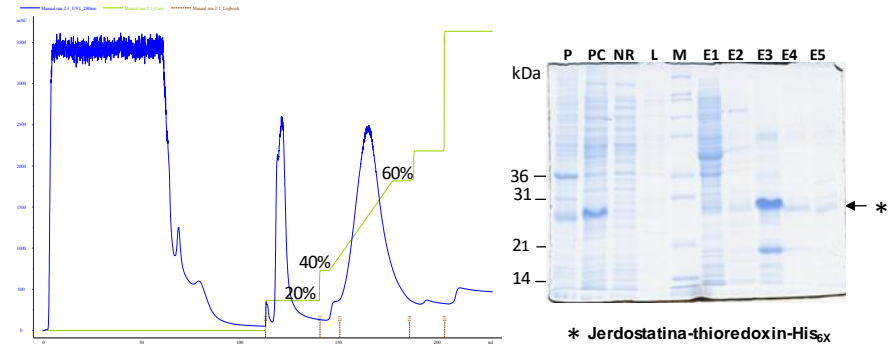
### 1. Expresión y purificación de r-jerdostatina en bacterias

El análisis de los componentes del veneno de la serpiente del género *Protobothrops jerdonii* mediante técnicas proteómicas, no reveló la presencia de la disintegrina corta, jerdostatina. Su descubrimiento fue a partir de la extracción del ARNm total de la glándula de veneno (Sanz et al., 2005). Se trata, por tanto, de un ARN que no se expresa en este género.

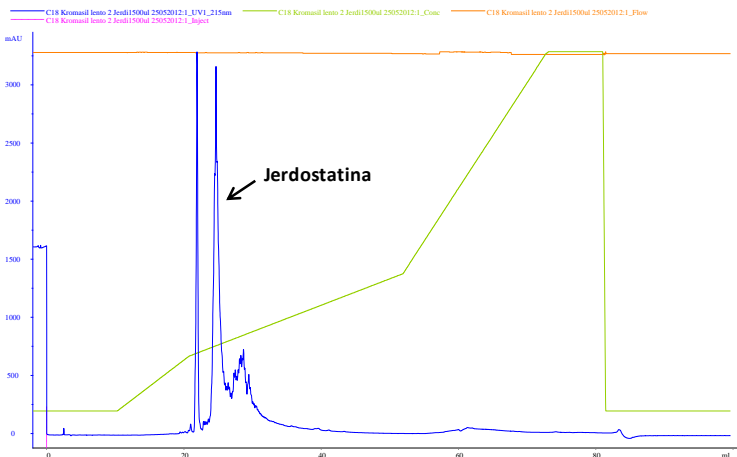
El precursor de ADNc de jerdostatina codifica para una región típica de un péptido señal, seguida de un prodominio o propéptido y un dominio disintegrina (Sanz et al., 2005). En los venenos, tanto el péptido señal como el propéptido se procesan para dar lugar a la proteína madura. Por este motivo, a partir de la secuencia del ADNc, se expresó de forma recombinante el dominio disintegrina (r-jerdostatina) en bacterias BL21, transformadas con el vector de expresión pET32a/TEVJerdostatina (Materiales y Métodos, apartado 6.2 y 7.1.1). La proteína recombinante soluble se purificó por cromatografía de afinidad (Figura 20). El análisis de transferencia por *Western blot* confirmó la presencia de r-jerdostatina en las diferentes etapas de purificación (Figura 21). El rendimiento de purificación final fue de 0.7 mg por litro de cultivo de células BL21 transformadas.



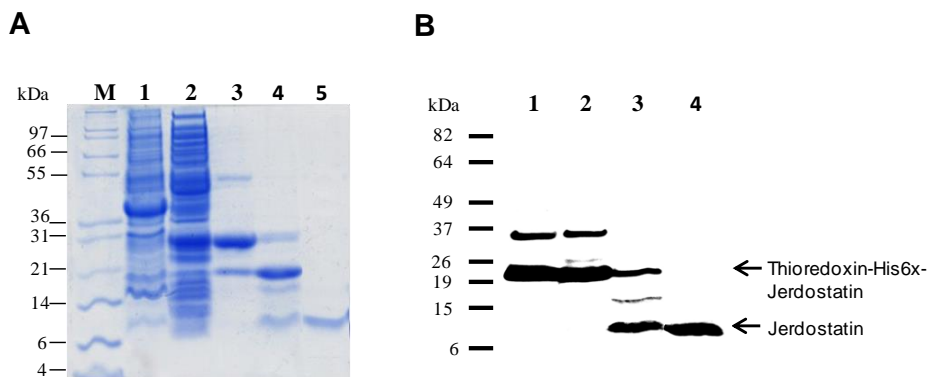
**A**



**B**

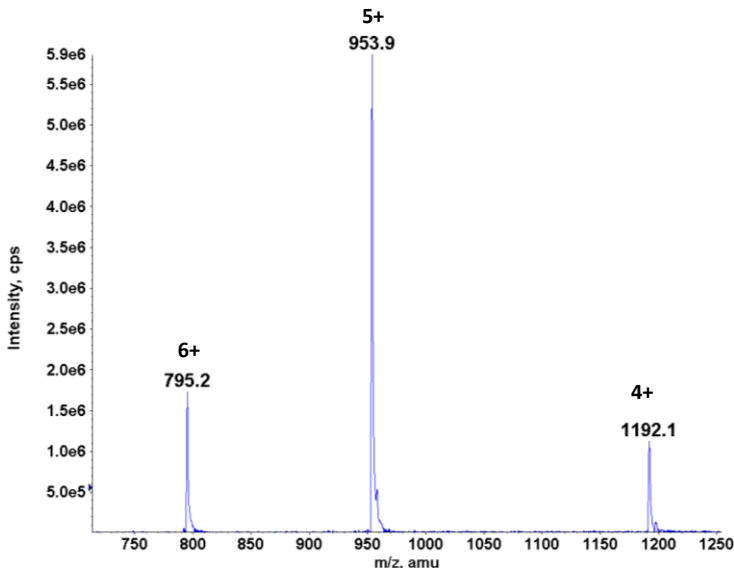
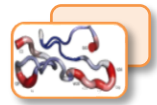


**Figura 20. Expresión y purificación de jerdostatina recombinante en bacterias. A)** Análisis SDS-PAGE al 12%, teñido con azul de Coomassie, de las diferentes fracciones obtenidas del proceso de purificación por cromatografía de afinidad HisTrap de las células BL21 de *E. coli* que expresan la proteína de fusión tiorredoxina-His<sub>6</sub>x-jerdostatina (24kDa). **P:** fracción insoluble (20 µg), **PC:** fracción soluble del lisado (20 µg); **NR:** fracción no retenida en la columna HisTrap **L:** lavado de columna; **E1-E5:** fracciones obtenidas tras la elución con un gradiente de 50–500 mM de imidazol. **M,** marcador de peso molecular (Mark12, Invitrogen). **B)** Fracción purificada por HPLC de fase reversa que contiene jerdostatina recombinante tras la escisión con la proteasa TEV.



**Figura 21. Expresión y purificación de jerdostatina recombinante en bacterias.** **A)** Análisis SDS-PAGE Tris-Tricina-10% del procedimiento de purificación. Carril **1 y 2** contienen 40  $\mu\text{g}$  de las fracciones insolubles y solubles, respectivamente, del lisado de las células BL21 que expresan la proteína de fusión tiorredoxina-His6x-jerdostatina (24kDa). Carril **3**, proteínas retenidas por cromatografía de afinidad HisTrap. Carril **4**, productos de digestión de la proteína de escisión TEV. Carril **5**, fracción purificada por HPLC de fase reversa. M, marcadores de peso molecular (Mark12TM, Invitrogen). **B)** Análisis por Western blot, utilizando el anticuerpo que reconoce jerdostatina anti-PEP160. Carril **1**, células BL21 que expresan la proteína de fusión tiorredoxina-His6x-jerdostatina en la fracción soluble del lisado. Carril **2** fracción retenida tras la cromatografía de afinidad HisTrap que contiene la proteína de fusión TEV-tioredoxina-His6x-Jerd. Carril **3** producto de escisión de TEV. Carril **4**, fracción purificada por HPLC. Las masas moleculares aparentes indicadas a la izquierda corresponden a marcadores de masa molecular BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder, (Invitrogen).

La funcionalidad de las disintegrinas cortas depende del correcto emparejamiento de los ocho residuos de cisteína que participan en la formación de cuatro enlaces disulfuro. Para asegurar la exactitud secuencial de jerdostatina, la masa molecular promedio de la proteína recombinante purificada por HPLC se midió por ESI/MS (Materiales y Métodos, apartado 9.2) (Figura 22).



**Figura 22. Identificación por espectrometría de masas.** La fracción purificada por HPLC se analizó por ESI-MS. La masa molecular promedio obtenida ( $4764.7 \pm 0.65$  Da) se correlaciona con la masa teórica (4SS) calculada con Paws® (4764.4 Da) para la secuencia de aminoácidos de jerdostatina derivada del ADNc.

Los resultados obtenidos por ESI-MS coinciden con el valor teórico calculado para la secuencia de aminoácidos de ADNc derivado de la disintegrina nativa (con todos los residuos de cisteína, 4SS). Estos resultados confirman la exactitud secuencial de la proteína recombinante.

## 2. Purificación del ectodominio de la integrina $\alpha_1\beta_1$

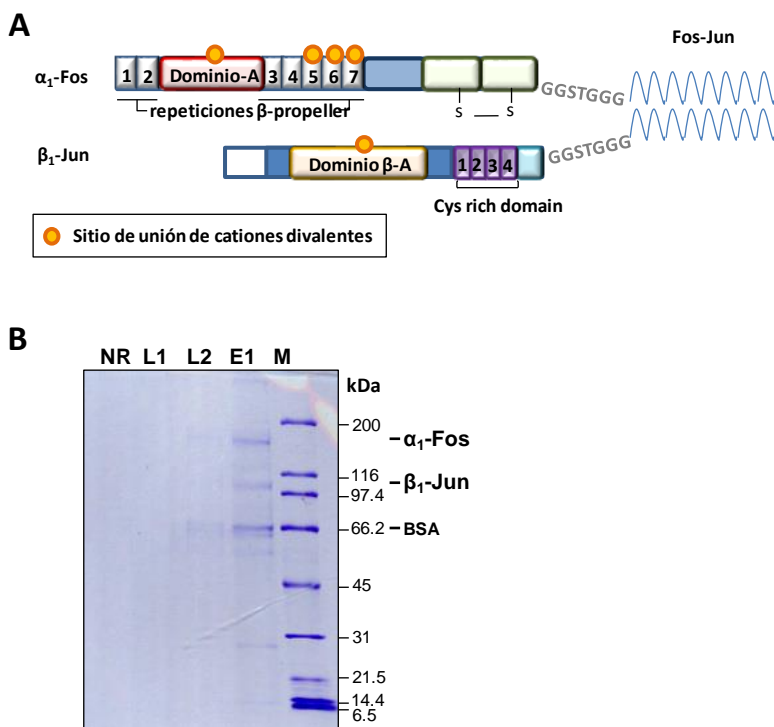
Las disintegrinas (R/K)TS son inhibidores específicos de la integrina  $\alpha_1\beta_1$  (Sanz et al., 2005). La purificación de estos receptores de membrana es muy compleja, debido a su gran tamaño y a que se encuentran altamente glicosiladas. Sin embargo, con el objetivo de estudiar la interacción molecular entre jerdostatina recombinante y la integrina  $\alpha_1\beta_1$  se utilizó un heterodímero soluble que consiste en los ectodominios de





## Resultados y discusión

las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  asociados no covalentemente por el motivo de dimerización de los factores de transcripción Fos y Jun, expresado en células de insecto (Materiales y Métodos, apartado 3.2). La purificación de las subunidades solubles se comprobó en un gel SDS-PAGE en condiciones reducidas (Materiales y Métodos, apartado 7.2) (Figura 23).



**Figura 23. Purificación del ectodominio soluble  $\alpha_1\beta_1$ .** **A)** Estructura del heterodímero soluble de la integrina  $\alpha_1\beta_1$  donde los dominios transmembrana y citosólico han sido substituidos por la secuencia espaciadora GGSTGGG y los motivos de dimerización Fos y Jun (se representan como estructuras helicoidales). **B)** Electroforesis SDS-PAGE en gradiente (7.5-15%). Se cargaron 1  $\mu$ g de las fracciones obtenidas por la columna de afinidad que contienen la integrina soluble humana  $\alpha_1\beta_1$ . En condiciones reducidas el heterodímero soluble  $\alpha_1\beta_1$  se separa, dando lugar al ectodominio  $\alpha_1$ -Fos y el ectodominio  $\beta_1$ -Jun, de 140 y 100 kDa, respectivamente. Tras la electroforesis, las proteínas se tiñeron con Coomassie. **NR:** No unido a columna, **L:** lavados, **E1:** eluido1, **M:** marcador Bio-Rad de 200 kDa).



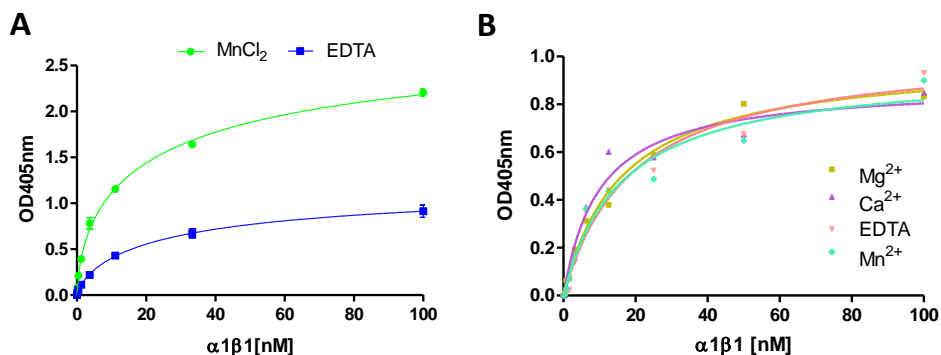
El rendimiento de purificación fue de 0.25 mg a partir de 500 ml de células BL21 transformadas.

### **3. Ensayos de interacción jerdostatina- $\alpha_1\beta_1$**

#### **3.1. Jerdostatina recombinante se une al ectodominio de $\alpha_1\beta_1$**

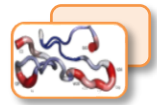
La presencia de cationes divalentes como  $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  en la región MIDAS es imprescindible para la unión integrina-ligando (Gotwals et al., 1999; Xiong et al., 2003). La interacción del ligando provoca un cambio en la coordinación del  $Mg^{2+}$  que, a su vez, produce una serie de cambios conformacionales, generando una superficie idónea para la unión del ligando (Emsley et al., 2000).

Con el objetivo de comprobar si r-jerdostatina y el ectodominio de  $\alpha_1\beta_1$  interaccionan, se realizaron ensayos de unión tipo ELISA en placas de 96 pocillos en presencia de cationes divalentes (Figura 24 B). Inicialmente, se comprobó la unión del ectodominio  $\alpha_1\beta_1$  purificado al fragmento de colágeno IV, CB3 (Eble et al., 1993) (Figura 24 A).



**Figura 24. Ensayos de interacción. A) El ectodominio de  $\alpha_1\beta_1$  recombinante se une a CB3.** El fragmento CB3 se inmovilizó frente a diferentes concentraciones de la integrina soluble  $\alpha_1\beta_1$ , partiendo de 30  $\mu\text{g/ml}$ . El ensayo se realizó en presencia de  $\text{MnCl}_2$  1 mM, o de EDTA 10 mM. **B) Unión de jerdostatina recombinante al ectodominio  $\alpha_1\beta_1$ .** En una placa de 96 pocillos se inmovilizó jerdostatina frente a diferentes concentraciones de la integrina soluble  $\alpha_1\beta_1$ , en presencia de iones divalentes (2 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , 1 mM  $\text{Mn}^{2+}$ , 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) o EDTA 10mM en un ensayo tipo ELISA. Los valores representan la media y desviación estándar calculada a partir de los experimentos realizados por duplicado.

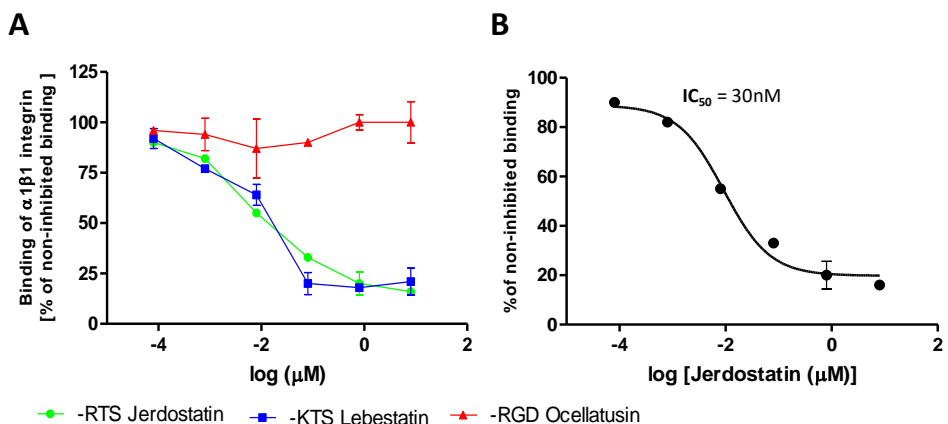
Los resultados muestran que el heterodímero soluble se une con alta afinidad al fragmento de colágeno tipo IV, de manera muy similar a como lo haría la integrina humana silvestre. El ectodominio  $\alpha_1\beta_1$  necesita de la presencia de iones divalentes para la unión del ligando (CB3) y esta unión se encuentra abolida en presencia de EDTA (Figura 24 A). Sin embargo, las curvas de valoración de la unión de jerdostatina recombinante a  $\alpha_1\beta_1$  realizadas en presencia de diferentes iones divalentes ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) y EDTA son totalmente idénticas (Figura 24 B), indicando que la interacción de r-jerdostatina, parece ser independiente de la presencia de cationes divalentes. Por lo tanto, estos resultados parecen indicar que jerdostatina y CB3 poseen diferentes sitios de unión a la integrina  $\alpha_1\beta_1$ .



Jerdostatina podría localizarse en otro sitio, alejado de la región MIDAS, de forma que su afinidad por el receptor integrina no se altera por la presencia/ausencia de cationes divalentes.

### 3.2. Jerdostatina inhibe la unión de $\alpha_1\beta_1$ a CB3

Para determinar el potencial inhibitor de r-jerdostatina, se realizó un ensayo de competición tipo ELISA. En este ensayo, se evaluó la capacidad de unión de la integrina a su ligando de alta afinidad, el fragmento de colágeno tipo IV, en presencia de r-jerdostatina (Figura 25).



**Figura 25. Ensayo de competición de jerdostaina recombinante. A)** La inhibición de la unión de la integrina  $\alpha_1\beta_1$  al fragmento CB3 del colágeno IV, se evaluó mediante la incubación de la integrina  $\alpha_1\beta_1$  soluble (3,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) con concentraciones decrecientes de r-jerdostatina (1:10 partiendo de 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), en placas de 96 pocillos recubiertas con 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de CB3. La unión residual de la integrina se inmunodetectó con el anticuerpo anti- $\beta_1$  de conejo. Las disintegrinas lebestatina (Material y Métodos, apartado 8) y r-ocellatusina (Sanz-Soler et al., 2012) se utilizaron como controles positivos y negativos, respectivamente. **B)** Representación gráfica de la respuesta dependiente de dosis de r-jerdostatina. Cálculo de la concentración inhibitoria (IC<sub>50</sub>).



## Resultados y discusión

---

Los resultados obtenidos muestran que la proteína recombinante r-jerdostatina, bloquea la unión de  $\alpha_1\beta_1$  a CB3 de una manera dependiente de dosis, con una  $IC_{50}$  de 30 nM (Figura 25 A, B). Este comportamiento sugiere que r-jerdostatina podría estar bloqueando estéricamente el acceso del sitio de unión del colágeno a  $\alpha_1\beta_1$  o que interactúa en un sitio distinto, alterando la afinidad de la integrina por el colágeno.

En este ensayo de inhibición (Figura 25 A) se utilizó como control negativo ocellatusina, una disintegrina corta con motivo RGD que no se une a  $\alpha_1\beta_1$ , y como control de inhibición se utilizó lebestatina, una disintegrina corta con motivo KTS (Olfa et al., 2005). Al analizar la capacidad inhibidora ( $IC_{50}$ ), observamos que jerdostatina recombinante se mostró menos activa que las disintegrina lebestatina ( $IC_{50}=19.2$  nM) aislada directamente del veneno. Jerdostatina se diferencia frente a otras disintegrinas cortas principalmente, por el tripéptido RTS presente en el bucle de unión a integrinas y los residuos de alrededor del motivo tripéptido. Estos resultados están en concordancia con los estudios realizados por Sanz y colaboradores (2005), donde se observó que los residuos de aminoácidos situados fuera del motivo de unión de jerdostatina, diferentes a los presentes en la estructura primaria de las disintegrinas KTS, podrían estar generando un ambiente químico distinto responsable del potencial inhibidor, afectando a su interacción con la integrina, existiendo una superficie de unión distinta dentro de esta subfamilia de disintegrinas (R/K)TS.



### 3.3. Jerdostatina no se une al dominio $\alpha_1$ -A

Como hemos observado en el apartado anterior, la interacción de r-jerdostatina con la integrina  $\alpha_1\beta_1$  es independiente de la presencia de cationes divalentes y podría localizarse en un sitio distinto al de su ligando natural, el colágeno. De entre las integrinas que unen colágeno,  $\alpha_1\beta_1$  está estrechamente relacionada con la integrina  $\alpha_2\beta_1$ , ambas unen colágeno tipo I y IV, aunque con diferente afinidad (Tulla et al., 2001; 2008). Estas integrinas, además, se caracterizan porque poseen un dominio de inserción o dominio A, localizado en la región N-terminal de la cadena  $\alpha$  (Xu et al., 2000), que conforma el dominio de unión de las integrinas que unen colágeno (Kern et al., 1993).

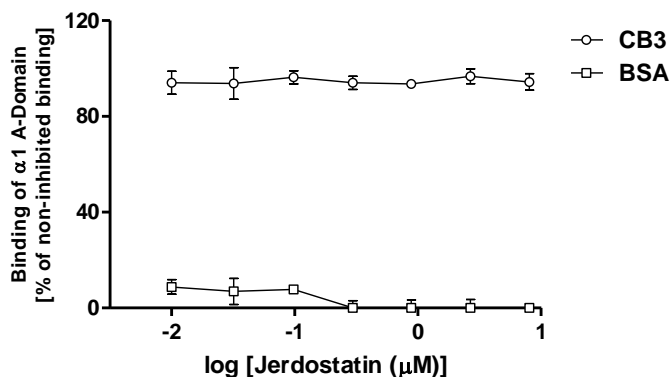
La estructura del dominio  $\alpha_2$ -A unido al péptido GFOGER de colágeno demostró la importancia de la presencia de iones metálicos como cofactores para la unión de colágeno (Emsley et al., 2000). Sin embargo, existen ligandos no colágenos y RGD-independientes para la integrina  $\alpha_2\beta_1$ , como rhodocetina, lectina de tipo C del veneno de serpiente (Eble and Tuckwell, 2003; Eble et al., 2009) que no requiere de iones divalentes para unirse al dominio  $\alpha_2$ -A.

Por lo tanto, para determinar si jerdostatina podría pertenecer a esta clase de inhibidores no colágenos que se unen al dominio  $\alpha$ -A y cuya afinidad es independiente de iones divalentes, se evaluó la capacidad de unión de r-jerdostatina al dominio  $\alpha_1$ -A producido de forma recombinante (Materiales y Métodos, apartado 7.1.2), mediante un ensayo de



## Resultados y discusión

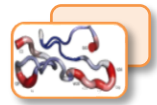
competición tipo ELISA (Figura 26). Como control se utilizó CB3 (Eble et al., 1993).



**Figura 26. Ensayo de unión al dominio A de la subunidad  $\alpha_1$ .** Se inmovilizaron 5  $\mu\text{g/ml}$  del fragmento CB3 durante toda la noche a 4° C en tampón TBS/Mg<sup>2+</sup>. Una vez bloqueada la placa de 96 pocillos, se incubaron 30  $\mu\text{g/ml}$  del dominio  $\alpha_1$ -A unida a una etiqueta -GST con concentraciones decrecientes (1:10) de r-jerdostatina (a partir de 50  $\mu\text{g/ml}$ ). El dominio  $\alpha_1$ -A unido a CB3 se detectó con el anticuerpo anti-GST (1:1000). Tras la incubación con el anticuerpo secundario (1:2000) anti IgG de conejo-AP, la conversión del sustrato pNpp catalizado por AP se midió a 405 nm. Como control negativo se utilizó BSA.

El dominio  $\alpha_1$ -A se une a CB3 con independencia de la presencia de r-jerdostatina, lo que indica que el dominio A de unión al colágeno, por sí solo, no contiene el sitio de reconocimiento de jerdostatina. Estos resultados concuerdan con los obtenidos con las disintegrinas KTS obtustatina y viperistatina incapaces de alterar la interacción del dominio  $\alpha_1$ -A al colágeno IV (Marcinkiewicz et al., 2003; Momic et al., 2014).

En resumen, las disintegrinas cortas (R/K)TS podrían pertenecer a una clase de ligandos no colágenos, que poseen una afinidad de unión independiente de la presencia de iones divalentes. Además, r-jerdostatina



no bloquea la unión del dominio  $\alpha_1$ -A a CB3, lo que sugiere que existe otro sitio de unión, aún no revelado, que altera la afinidad de la integrina por el colágeno.

#### **4. Caracterización de la actividad biológica de jerdostatina recombinante**

La integrina  $\alpha_1\beta_1$  se encuentra altamente expresada en células del endotelio vascular y en las células de músculo liso (CMLV) que rodean los vasos sanguíneos (Senger et al., 1997, 2002). Las células del músculo liso vascular están continuamente expuestas a señales mecánicas y, por tanto, están involucradas en todas las funciones fisiológicas y en los cambios patológicos que tienen lugar en la pared vascular. La reorganización del citoesqueleto, la migración y la proliferación celular, están regulados a través de diferentes vías de señalización dependientes de las integrinas (Pozzi et al., 1998), procesos necesarios para el desarrollo vascular y reparación arterial tras una lesión (Schapira et al., 2005).

La integrina  $\alpha_1\beta_1$  se encuentra sobreexpresada en las células endoteliales durante la angiogénesis, inducida por el factor de crecimiento vascular (VEGF) en los procesos tumorales (Chen et al., 2005). Estudios previos han demostrado que las disintegrinas KTS, lebestatina y obtustatina, inhiben la angiogénesis de células endoteliales mediante el bloqueo específico de la interacción de  $\alpha_1\beta_1$  con el colágeno IV (Olfa et al., 2005; Brown et al., 2008). Sin embargo, los efectos de estas disintegrinas en las células del músculo liso vascular aún no se han investigado. El uso



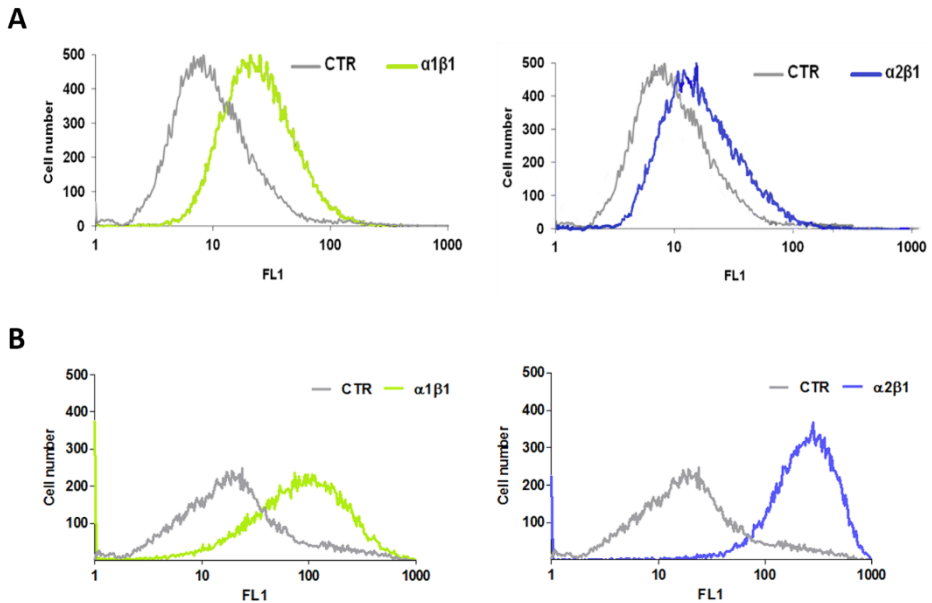
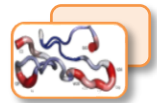


de antagonistas permite evaluar la importancia biológica y funcional de las dianas que bloquean. Así, con el fin de profundizar en el papel de las disintegrinas cortas (R/K)TS, concretamente r-jerdostatina, e indirectamente en el papel de la integrina  $\alpha_1\beta_1$ , se realizaron ensayos de adhesión, migración y proliferación de las células del músculo liso vascular y se evaluó su capacidad antiangiogénica en células endoteliales HUVEC.

### 4.1. Inhibición de la adhesión de CMLV a CB3

La adhesión celular está mediada por las integrinas expresadas en la superficie celular. Las subunidades de integrina principalmente expresadas en CMLV son  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_5$  y  $\beta_1$  (Moiseeva, 2001). Estudios mediante citometría de flujo de células del músculo liso recién aisladas de la aorta humana (HASMCM) mostraron una elevada expresión de la integrina  $\alpha_1\beta_1$  (Clyman et al., 1990), sin embargo, las HASMCM cultivadas tras varios pases, expresaban principalmente  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_5$  y  $\beta_1$  (Skinner et al., 1994; Belkin et al., 1990). Por otra parte, las CMLV de rata (RASMC) utilizan integrinas predominantemente  $\beta_1$  para adherirse a superficies recubiertas con fibronectina, laminina y colágeno tipos I y IV (Clyman et al., 1990).

Debido a que la expresión de la integrina  $\alpha_1\beta_1$  varía en cultivo, se analizó el perfil de expresión mediante citometría de flujo, principalmente para las subunidades  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , presentes en las células comerciales del músculo liso de aorta aisladas de humanos (Promocell) y ratas (A7r5, ATCC) (Figura 27).



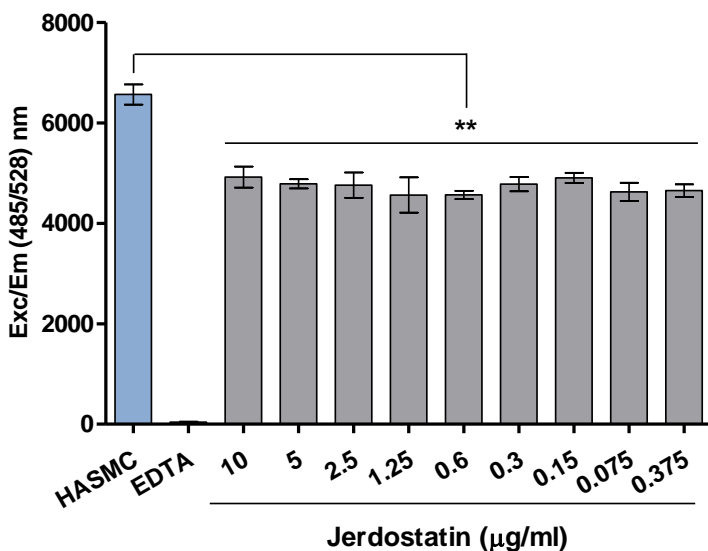
**Figura 27. Perfil de expresión de integrinas en CMLV.** La expresión en la superficie celular de  $\alpha_1\beta_1$  y  $\alpha_2\beta_1$  en células RASM (A) y HASM (B) fue determinada por citometría de flujo (CyFlow). La suspensión celular se incubó con los anticuerpos monoclonales MAB2513( $\alpha_1$  rata), MAB1973 ( $\alpha_1$  humana) y JA-218 ( $\alpha_2$  humana) (Tabla 4) a una concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$ . Las células se lavaron con PBS y se incubaron con una dilución 1:2000 del anticuerpo secundario de ratón anti-IgG conjugado con R-ficoeritrina.  $20 \times 10^3$  células por condición fueron contadas teniendo en cuenta los parámetros de tamaño relativo (FSC) y granularidad (SSC). La intensidad de fluorescencia (FL1) se determinó con el software WinMDI 2.9. Los histogramas representan el número de CMLV fluorescentes en comparación con el isotipo negativo control (CTR).

Aunque la citometría de flujo no es una técnica cuantitativa, los datos obtenidos sugieren que la línea celular RASM (A7r5) muestra una mayor expresión en la superficie celular de la subunidad  $\alpha_1$  (Figura 27 A). Por el contrario, el perfil de expresión de la integrina  $\alpha_2$  en las células HASM cultivadas está incrementado respecto al de  $\alpha_1$  (Figura 27 B), coincidiendo con los estudios anteriormente mencionados.



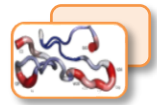
### 4.1.1. Inhibición de la adhesión de HASMC

La adhesión de las CMLV humanas al colágeno IV (CB3) en presencia de r-jerdostatina se examinó *in vitro* (Figura 28).

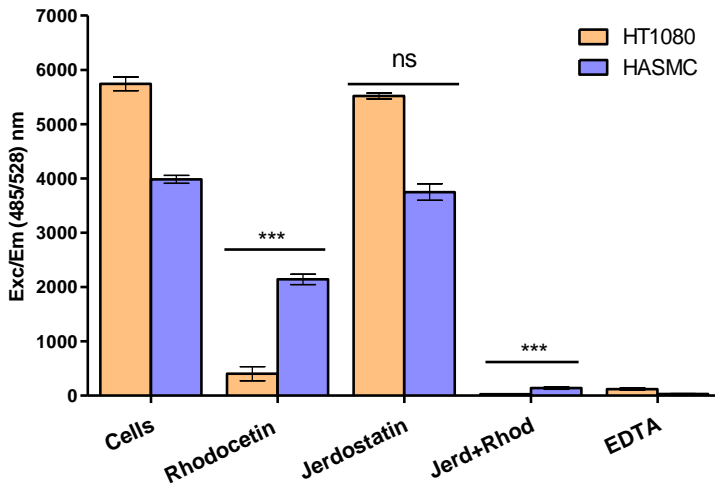


**Figura 28. Efecto de r-jerdostatina en la adhesión de HASMC.** En una placa de 96 pocillos recubierta con CB3 (1 µg/ml) se sembraron células HASMC en presencia de diluciones seriadas (1:2) de r-jerdostatina (partiendo de 10 µg/ml). Las células adheridas se marcaron con 0.5 µg/ml de BCECF, la señal fluorescente se detectó a una longitud de onda de excitación de 485 nm y 528 nm de emisión con un lector de placas de ELISA. La adición de 10 mM de EDTA fue utilizada como control negativo. Se realizaron 4 experimentos independientes para cada condición. Significado estadístico de las diferencias observadas respecto a las células control HASMC: \*\* P < 0.01.

Los resultados obtenidos muestran que r-jerdostatina no inhibe la adhesión de HASMC sobre CB3. Estudios previos sugieren que la elevada expresión de la integrina  $\alpha_2\beta_1$  podría compensar la inhibición producida sobre  $\alpha_1\beta_1$  (Skinner et al., 1994). Para comprobar la posibilidad de que  $\alpha_2\beta_1$



fuera la integrina implicada principalmente en la adhesión de HASMC a CB3, se utilizó rhodocetina, una lectina de tipo C del veneno de *Calloselasma rhodostoma*, toxina que bloquea selectivamente la unión de la integrina  $\alpha_2\beta_1$  a colágenos tipo I y IV (Eble et al., 2001; 2002; 2009). Para este ensayo se utilizaron, como control de inhibición de la adhesión, células derivadas de fibrosarcoma humano HT 1080 que expresan mayoritariamente  $\alpha_2\beta_1$  en su superficie.



**Figura 29. Efecto de r-jerdostatina en la adhesión de HASMC y HT 1080.** Las células HT1080 y HASMC se sembraron en una placa de 96 pocillos cubiertos de colágeno en presencia de rhodocetina (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), r-jerdostatina (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), y una mezcla de ambos. La fluorescencia de BCECF se determinó con un lector de placas ELISA. La adición de 10 mM de EDTA fue utilizada como control negativo. Significado estadístico de las diferencias observadas respecto a las células control HASMC y HT 1080: ns: no significativo; \*\*\*  $P < 0.001$ .

Rhodocetina bloquea de forma significativa la unión de las células HT 1080 al colágeno. Además, los resultados muestran que rhodocetina inhibe la adhesión (aproximadamente un 54%) de células HASM sobre



## Resultados y discusión

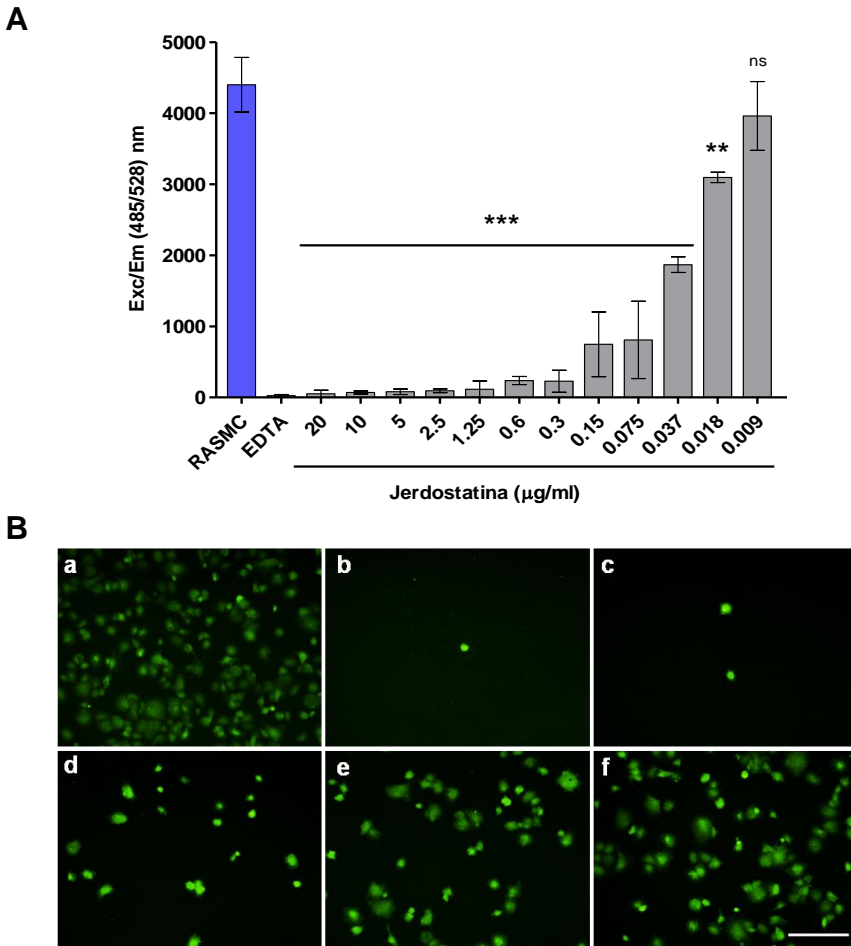
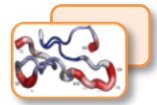
---

CB3. A pesar de que no se observa ningún efecto significativo en presencia de r-jerdostatina, la adición simultánea de jerdostatina y rhodocetina inhibe totalmente la adhesión (Figura 29).

Los datos obtenidos revelan que, para la completa inhibición de la adhesión de HASMC a CB3, es necesario el uso simultáneo de antagonistas específicos de integrinas  $\alpha_1\beta_1$  y  $\alpha_2\beta_1$ , corroborando a su vez la hipótesis de la complementariedad existente entre ambas integrinas. Este resultado es importante pues, en aquellas células donde  $\alpha_2\beta_1$  este sobreexpresada frente a  $\alpha_1\beta_1$ , no se observará ningún efecto de las disintegrinas (R/K)TS, antagonistas exclusivas de  $\alpha_1\beta_1$ . Por lo tanto, las HASMC cultivadas no serían las células idóneas para el estudio de la actividad de r-jerdostatina *in vitro*.

### 4.1.2. Inhibición de la adhesión de RASMC

Tras los resultados obtenidos en el apartado anterior y con el objetivo de caracterizar la actividad de r-jerdostatina sobre las células del músculo liso vascular *in vitro*, se utilizó la línea de rata RASMC (A7r5) que expresan mayoritariamente el receptor  $\alpha_1\beta_1$  en su superficie celular (Figura 27). Aplicando la misma metodología que en el apartado anterior, se evaluó la adhesión de RASMC al colágeno IV (CB3) en presencia de r-jerdostatina (Figura 30).



**Figura 30. Jerdostatina inhibe la adhesión de RASMC al fragmento CB3.** En una placa de 96 pocillos recubierta con CB3 (1 µg/ml) se sembraron  $0.2 \times 10^6$  células/ml en presencia de concentraciones decrecientes de r-jerdostatina (1:2) partiendo de 20 µg/ml. **A)** Las células adheridas se marcaron con 0.5 µg/ml de BCECF, la señal fluorescente se detectó a una longitud de onda de excitación de 485 nm y 528 nm de emisión. Los valores están expresados como la media  $\pm$  SEM de al menos cuatro experimentos independientes. El significado estadístico de los valores obtenidos se representa como: ns: no significativo; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$  indicado en cada caso respecto al control RASMC. **B)** Imágenes correspondientes a las concentraciones de r-jerdostatina: 10 µg/ml (c), 1.25 µg/ml (d), 0.075 µg/ml (e) y 0.009 µg/ml (f), los controles se realizaron en paralelo: sin jerdostatina (a) y con EDTA 10 mM (b). Escala 200 µm.

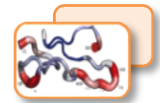


## Resultados y discusión

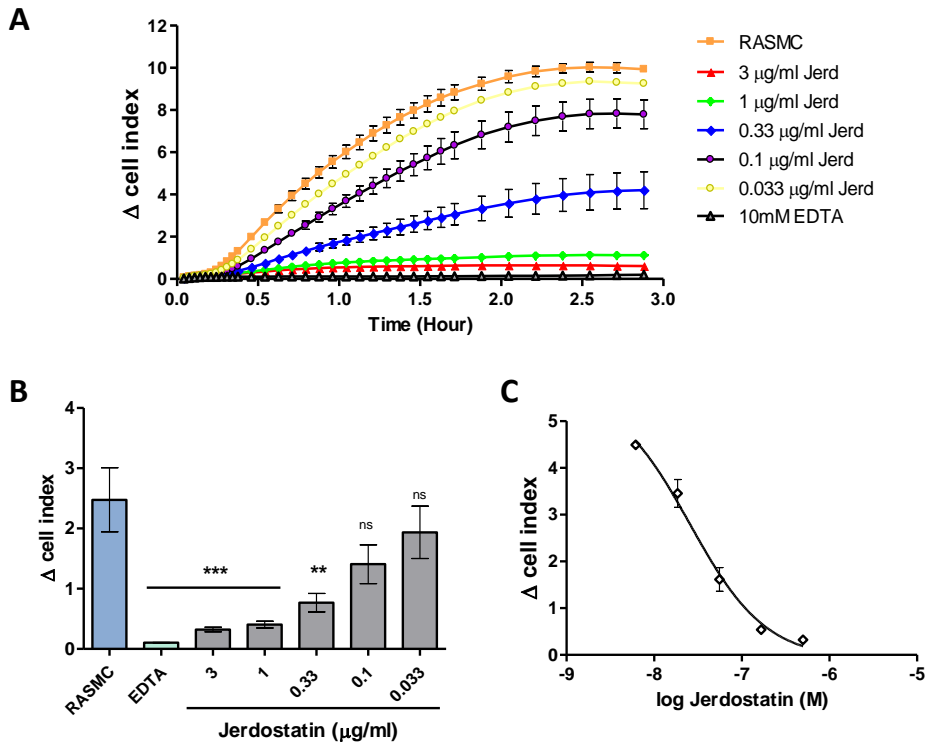
---

Los resultados de la adhesión celular muestran que r-jerdostatina inhibe la adhesión de RASMC al fragmento CB3 de una manera dependiente de dosis (Figura 30 A). Además, observamos que el tratamiento de RASMC con r-jerdostatina conlleva un cambio en la forma de las células, se hacen redondas, se retraen y finalmente se separan del colágeno, confirmando la capacidad inhibidora de r-jerdostatina (Figura 30 B, imagen c).

Giaever y Keese (1991) describieron por primera vez una técnica para medir las fluctuaciones en la impedancia cuando una población de células crece en una superficie de electrodos. El instrumento xCELLigence (Roche), utiliza una técnica similar para medir cambios en la impedancia eléctrica cuando las células se adhieren y propagan en una placa de cultivo cubierta con una matriz de microelectrodos. La impedancia se muestra como un parámetro denominado índice celular (adimensional), que es directamente proporcional a la superficie total que está cubierta por las células. Por lo tanto, el índice celular puede ser usado para monitorizar la adhesión celular, la difusión, la morfología, la densidad de las células y a su vez, permite evaluar el efecto de fármacos, anticuerpos, ligandos y proteínas como inhibidores o estimuladores. Este sistema es un método simple, no invasivo, en el que se obtienen datos en tiempo real y es fácilmente cuantificable lo cual, es una ventaja significativa sobre otras técnicas tradicionales que se basan en el análisis de punto final.



Para monitorizar el efecto de r-jerdostatina sobre la adhesión de células RASM sobre CB3 se realizó un ensayo en tiempo real durante toda la noche (Figura 31) utilizando el aparato comercial xCELLigence (Roche).



**Figura 31. Adhesión de RASMC a CB3 en tiempo real. A)** Representación de la respuesta dinámica de las células en tiempo real, en presencia de cantidades decrecientes (1:3) de r-jerdostatina durante las 3 primeras horas del ensayo, donde se alcanza la saturación. El valor del índice celular ( $\Delta$  cell index) se incrementa con el número de células que permanecen adheridas a lo largo del tiempo. **RASMC**: control positivo, **EDTA** 10 mM: control negativo. **B)** Representación gráfica de la adhesión de RASMC al fragmento CB3 después de la incubación con r-jerdostatina durante 1 h. **C)** Potencial inhibitor de r-jerdostatina tras una hora de tratamiento ( $IC_{50} = 25.6$  nM). Significado estadístico de las diferencias observadas respecto a las células control: ns (no significativo); \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .





El análisis en tiempo real corroboró que r-jerdostatina inhibe la adhesión de las células RASM proliferantes de manera dependiente de dosis, con un  $IC_{50}$  de 25.6 nM (Figura 31C), coincidiendo con el valor obtenido en los ensayos de inhibición de la unión del ectodominio soluble  $\alpha_1\beta_1$  a CB3 (Figura 25).

El estudio de la adhesión de células HASMC y RASMC en presencia de inhibidores de  $\alpha_1\beta_1$  y  $\alpha_2\beta_1$  corrobora la hipótesis de complementariedad funcional que existe entre los receptores de colágeno  $\alpha_1\beta_1$  y  $\alpha_2\beta_1$  (Senger, 2002; Perruzzi et al., 2003) y se postulan como los principales receptores que participan en la adhesión de CMLV sobre colágeno.

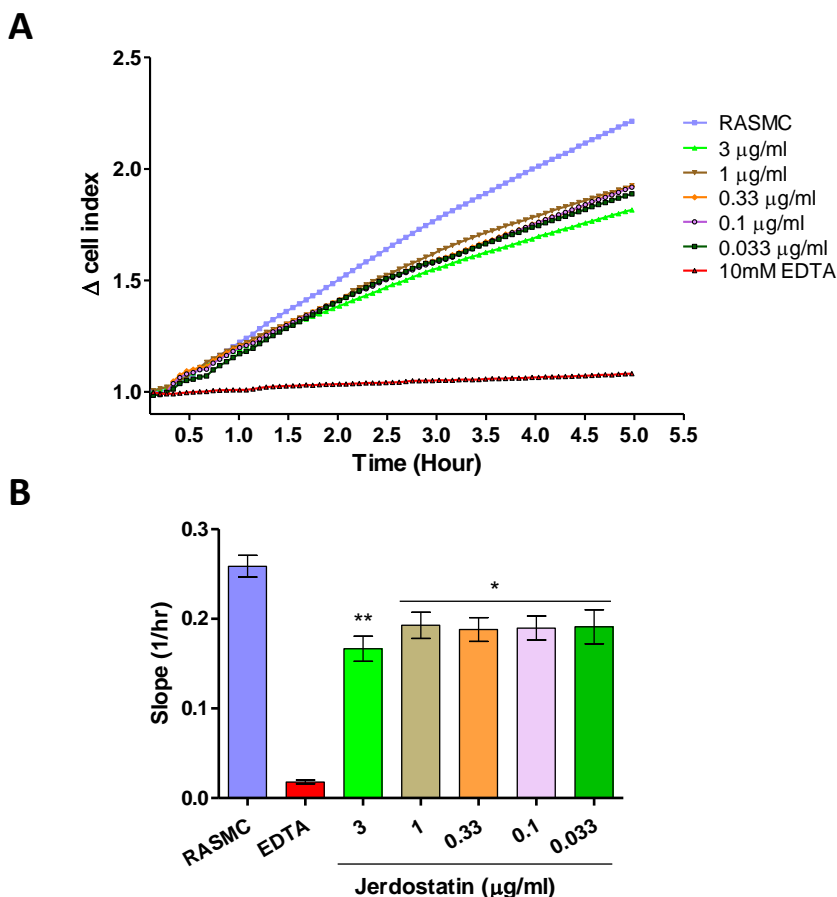
### **4.2. Inhibición de la migración de RASMC**

La capacidad de migración de las células está determinada por la fuerza de adhesión de una manera no lineal (Palecek et al., 1997). Si la adhesión es demasiado débil las células no pueden migrar sobre el sustrato, se resbalan, un efecto que se supera mediante un aumento en la fuerza de adhesión. Sin embargo, si la adhesión es demasiado fuerte, las células se adhieren firmemente a su sustrato, evitando de este modo el movimiento celular. Por lo tanto, existe una relación entre adhesión y migración celular, donde es necesaria una fuerza de adhesión óptima, mediada por integrinas, que permita una correcta migración celular (Louis and Zahradka, 2010).

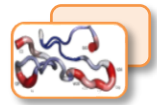


La migración de CMLV es necesaria para la remodelación de las paredes vasculares durante el crecimiento de nuevos vasos, arteriosclerosis y tras una lesión vascular. Los principales constituyentes de la matriz extracelular de la pared de los vasos, los colágenos tipo I y IV y laminina están involucrados en esta actividad pro-migratoria (Nelson et al., 1996; Willis et al., 2004; Gerthoffer, 2007; Sazonova et al., 2015). La migración celular puede monitorizarse en tiempo real, la interrupción de las uniones, la retracción y propagación de las células conduce a grandes cambios en la impedancia celular. Estos cambios, se correlacionan directamente con la capacidad migratoria de las células. Además, el análisis en tiempo real proporciona una ventaja sobre los métodos existentes como la cámara de Boyden ya que imita más estrechamente el proceso que sucede *in vivo*.

Para comprobar si r-jerdostatina inhibe la migración de RASMC e indirectamente el papel del receptor  $\alpha_1\beta_1$  durante la migración de estas células, monitorizamos la migración de RASMC a través de filtros recubiertos por CB3 en presencia de r-jerdostatina, midiendo la impedancia en tiempo real.



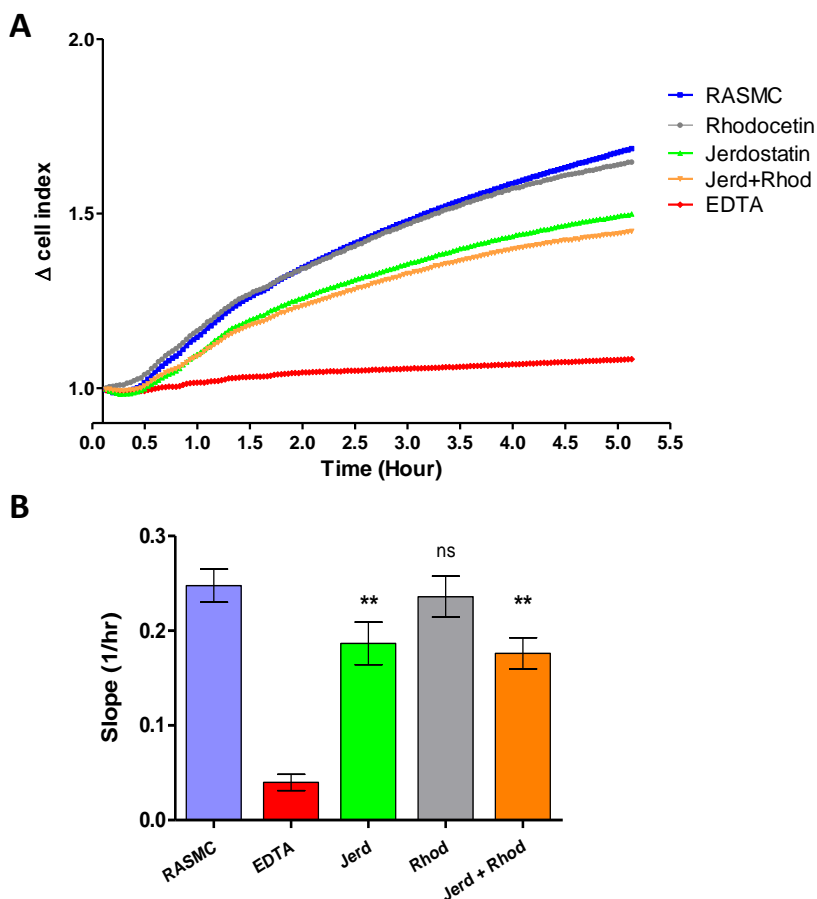
**Figura 32. Migración de RASMC sobre CB3 en tiempo real. A)** La migración de RASMC ( $0.2 \times 10^6$  células/ml) sobre CB3, en presencia de concentraciones decrecientes de r-jerdostatina (1:3, partiendo de 3  $\mu\text{g/ml}$ ) se evaluó durante más de 5 horas. La interrupción de las uniones, la retracción y propagación de las células conduce a grandes cambios en la impedancia celular ( $\Delta$  cell index). Estos cambios, se correlacionan directamente con la capacidad migratoria de las células. **B)** El efecto de r-jerdostatina sobre la migración de RASMC en CB3 tras una hora se representó de forma gráfica. La reducción de la pendiente "slope" (velocidad de migración) indica un aumento del potencial inhibitorio de los antagonistas. Significado estadístico entre los inhibidores y las células control: ns: no significativo; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .



Los resultados muestran que solamente a concentraciones elevadas de r-jerdostatina se produce una inhibición significativa de aproximadamente el 40% (Figura 32 B).

Entre las integrinas que unen colágeno también se encuentra  $\alpha_2\beta_1$ ; debido al fenómeno de complementariedad que sucede entre este receptor y  $\alpha_1\beta_1$ , comprobamos si la integrina  $\alpha_2\beta_1$  podría estar participando en la migración de las RASMC sobre CB3. La capacidad de migración celular se evaluó en un ensayo en tiempo real en presencia de r-jerdoatatina y la lectina de tipo C, rhodocetina, inhibidor de la integrina  $\alpha_2\beta_1$  (Figura 33).

El bloqueo de la integrina  $\alpha_2\beta_1$  por medio de rhodocetina no causó ningún efecto significativo sobre la migración de las células RASMC sobre CB3. Además, la acción combinada de las dos proteínas de veneno fue similar a la de r-jerdostatina sola (Figura 33 B). Los resultados obtenidos sugieren que la migración de RASMC sobre CB3 es, en parte, dependiente de la integrina  $\alpha_1\beta_1$ , pero no de  $\alpha_2\beta_1$ .

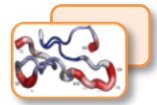


**Figura 33. Migración en tiempo real de RASMC en presencia de inhibidores.**

**A)** La migración de RASMC sobre CB3, se evaluó en presencia de r-jerdostatina (3 $\mu$ g/ml), rhodocetina (5 $\mu$ g/ml) y una mezcla de ambas. **B)** Representación gráfica del efecto de r-jerdostatina y rhodocetina sobre la migración de RASMC tras una hora de tratamiento. Significado estadístico entre los inhibidores y las células control: ns: no significativo; \*\* P <0.01.

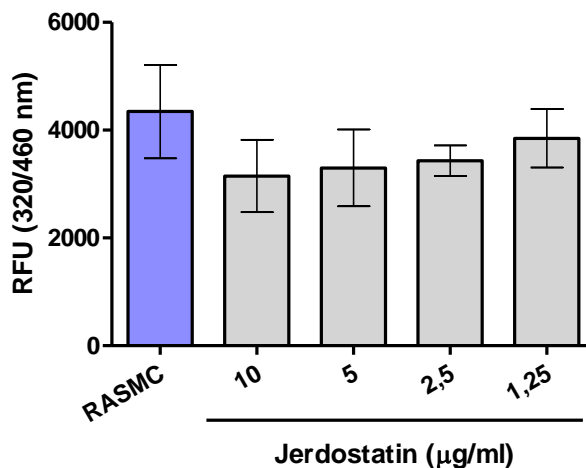
### 4.3. Efecto sobre la proliferación de RASMC

Las células VSMC proliferan como respuesta a una la lesión vascular. La proliferación y la supervivencia celular se encuentran reguladas por la unión de las integrinas a la matriz extracelular (Pozzi et



al., 1998; Colorado et al., 2000; Fournier et al., 2008). Hasta el momento, los estudios de la actividad antiproliferativa de las disintegrinas cortas se han realizado en células endoteliales, donde, esta actividad ha sido relacionada con una inducción de la apoptosis (Brown et al., 2008).

Para comprobar si r-jerdostatina es capaz de inhibir la proliferación de RASMC cultivadas sobre CB3, se realizó un inmunoensayo enzimático no isotópico (Figura 34) donde se analizó la incorporación de BrdU a células en proliferación tratadas con diferentes concentraciones de r-jerdostatina.



**Figura 34. Proliferación de RASMC sobre CB3.** Una placa de 96 pocillos se recubrió con CB3 (1 µg/ml). Tras el bloqueo, se sembraron 10,000 RASMCs/pocillo en presencia de concentraciones decrecientes de r-jerdostatina partiendo de (10 µg/ml). La incorporación de BrdU en células proliferantes se detectó por inmunofluorescencia a una longitud de onda de excitación de 320 nm y 460 nm de emisión. La fluorescencia relativa de la señal (RFU) se calculó como la relación de la señal obtenida a partir de una muestra marcada (+BrdU) respecto de una muestra sin marcar (-BrdU) teniendo en cuenta la fluorescencia endógena.

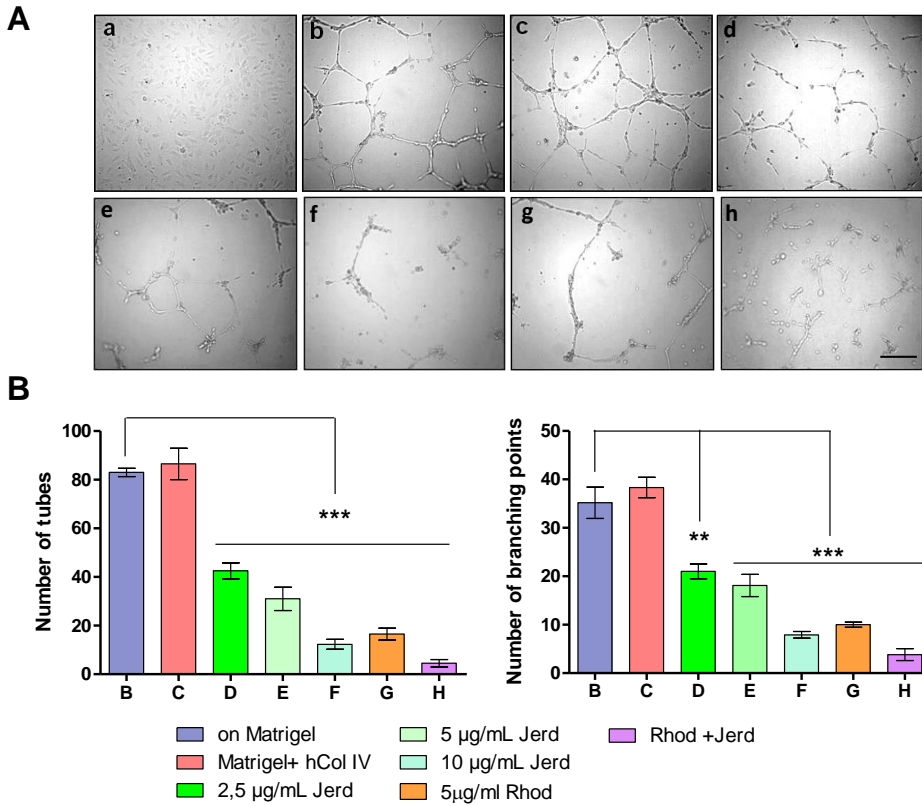
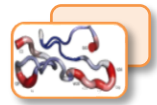


Nuestros resultados muestran que r-jerdostatina no inhibe de forma significativa la proliferación de RASMC cultivadas sobre CB3 (Figura 34). De acuerdo con estos resultados, el receptor  $\alpha_1\beta_1$  no participaría en la proliferación de CMLV sobre colágeno e indica que, posiblemente, otras subunidades de las integrinas podrían estar involucradas en este proceso.

#### 4.4. Inhibición de la angiogénesis

Angiogénesis, la formación de nuevos vasos a partir de la vasculatura existente, requiere de la migración y proliferación de células endoteliales que se reorganizan para formar una red tubular de vasos sanguíneos. La angiogénesis está regulada por la interacción de las células endoteliales con la matriz, a través de integrinas, la actividad de factores de crecimiento y citoquinas. La reducción de la vasculatura observada en ratones  $\alpha_1$ -KO (Pozzi et al., 2000; Chen et al., 2005), ha convertido a la integrina  $\alpha_1\beta_1$  en diana para la búsqueda de nuevos fármacos antiangiogénicos.

En este contexto, con el fin de investigar si r-jerdostatina tiene un efecto inhibitor sobre la angiogénesis se realizaron ensayos de formación del tubo endotelial (Figura 35) con células endoteliales humanas HUVEC crecidas sobre una matriz comercial de colágeno denominada Matrigel, que contiene principalmente colágeno tipo IV, laminina y factores de crecimiento. Para aumentar la cantidad de colágeno IV respecto al resto de componentes de la matriz, a la mezcla se le añadió 1 mg/ml de colágeno tipo IV humano (hColIV).



**Figura 35. Efecto de r-jerdostatina en la formación del tubo endotelial.** Se sembraron  $3.5 \times 10^4$  células HUVECs por ml en una placa de 48 pocillos recubierta con matriz de Matrigel. La formación de tubos endoteliales en presencia de diferentes concentraciones de jerdostatina y rhodocetina se evaluó a las 16 h. **A**) Imágenes tomadas con el microscopio óptico de células HUVEC (a) sin matrigel (b) en matrigel; (c) en matrigel + 1mg/ml de colágeno IV; en presencia de jerdostatina: (d) 2.5 µg/ml; (e) 5µg/ml, (f) 10 µg/ml; (g) en presencia de 5µg/ml de rhodocetina y (h) 5 µg/ml de rhodocetina + 10 µg/ml de jerdostatina. Escala 100 µm. **B**) Representación gráfica del número medio de tubos endoteliales formados y de las ramificaciones. Los valores corresponden a la media  $\pm$  SEM de 2 ensayos independientes para cada condición. Significado estadístico: \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001.

Los resultados muestran que jerdostatina recombinante inhibe, de forma dependiente de dosis, la formación de tubos sobre matrigel (Figura





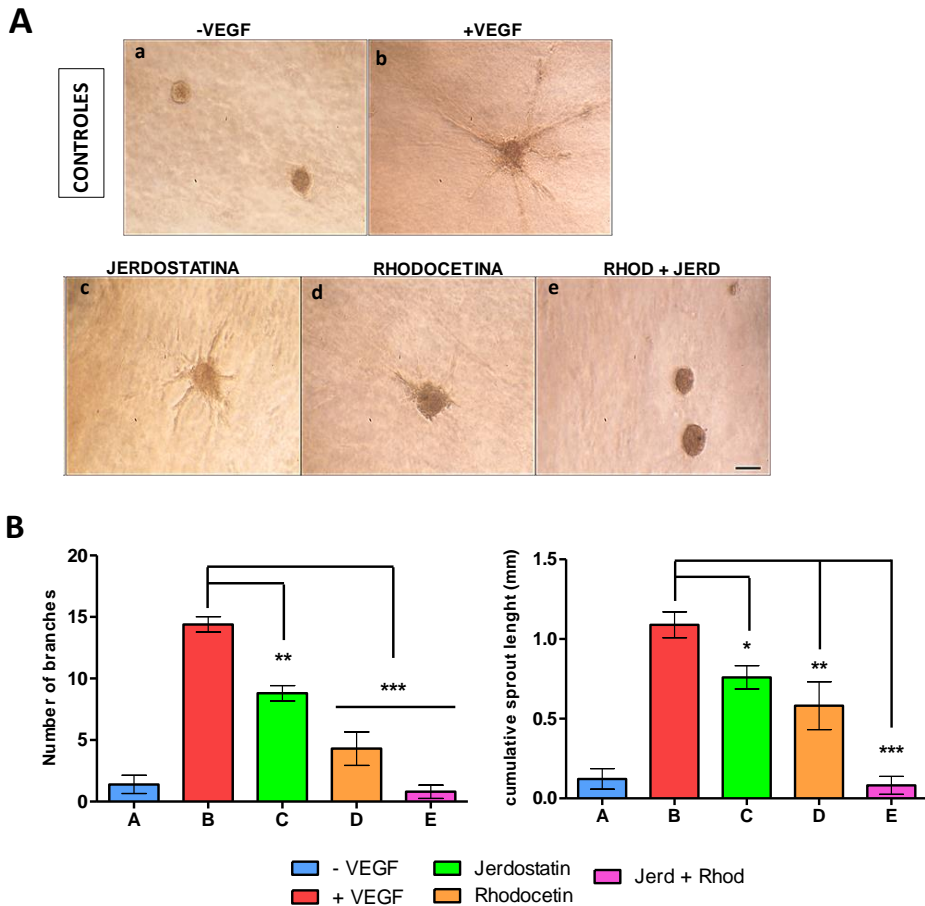
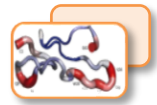
## Resultados y discusión

---

35 d, e, f). La adición de colágeno IV humano a matrigel no aumentó significativamente el número de tubos formados (Figura 35 c) por lo que los ensayos se realizaron con el matrigel comercial. A 2.5  $\mu\text{g/ml}$  de r-jerdostatina ya se observa una alteración de la formación del tubo endotelial (Figura 35 d) y a 10  $\mu\text{g/ml}$ , el número de puntos de ramificación disminuyó sustancialmente (Figura 35 f). La unión de la integrina  $\alpha_2\beta_1$  al colágeno se bloqueó específicamente con rhodocetina (Figura 35 g) y en presencia de ambos antagonistas de integrinas (Figura 35 h), la formación del tubo endotelial en el ensayo de matrigel fue prácticamente abolida.

La formación del tubo endotelial se inhibe completamente con la adición del antagonista de la integrina  $\alpha_2\beta_1$ , lo que sugiere que esta integrina también podría estar participando en la formación de tubos endoteliales. Estudios previos con antagonistas de  $\alpha_2\beta_1$ , como vixapatin, ya habían anticipado esta posibilidad (Momic et al., 2012).

A pesar de que  $\alpha_2\beta_1$  puede unir colágeno de tipo IV y laminina, interacciona con estas proteínas de la membrana basal con menor afinidad que con los colágenos tipos I y III (Tulla et al., 2001). Las disintegrinas cortas con motivo KTS también son capaces de bloquear la unión de la integrina  $\alpha_1\beta_1$ , sobreexpresada en células K562, al colágeno tipo I (Sanz et al., 2005). Con esta información, realizamos un ensayo de formación de esferoides endoteliales HUVEC embebidos en colágeno tipo I, favoreciendo así la unión de  $\alpha_2\beta_1$ , en presencia de r-jerdostatina y rhodocetina.



**Figura 37. Ensayo de angiogénesis de formación de esferoides endoteliales.**

**A)** En una placa de 24 pocillos se crecieron células HUVEC embebidas en 1.5 mg/ml de colágeno de rata tipo I. A los pocillos se les añadió 40 ng/ml del factor de crecimiento endotelial vascular humano (hVEGF) (b), 10 µg/ml r-jerdostatina (c), 5 µg/ml rhodocetina (d) y ambas (e). El control negativo de angiogénesis es en ausencia de VEGF (a). La placa se incubó durante 24 horas. Una vez fijadas las células se tomaron imágenes a 10X y 20X aumentos. Escala 0.1mm. **B)** Representación gráfica del número y longitud de las ramificaciones, calculadas como la media ± SEM observadas de 10 esferoides por condición. Significado estadístico entre los inhibidores y las células HUVEC +VEGF: ns: no significativo; \* p <0.05; \*\* P <0.01; \*\*\* P <0.001



## Resultados y discusión

---

En presencia de r-jerdostatina observamos una disminución del número y de la longitud de ramificaciones respecto al control, sin embargo, esta reducción no es tan significativa como en presencia de rhodocetina (Figuras 37 **c** y **d**). No obstante, la adición de ambos inhibidores reduce completamente la formación de nuevos vasos sobre colágeno tipo I (Figura 37 **e**).

Los resultados obtenidos en ambos estudios de angiogénesis en presencia de r-jerdostatina y rhodocetina muestran que tanto  $\alpha_1\beta_1$  como  $\alpha_2\beta_1$  participan en la angiogénesis de células HUVEC sobre colágeno y que, el uso de inhibidores de ambos receptores reduce significativamente la formación de nuevos vasos durante la angiogénesis.

### 5. Discusión

El veneno de las serpientes contiene toxinas cuyo cometido es interferir en los procesos naturales biológicos de la presa, para inmovilizarla y matarla. El veneno puede clasificarse según su efecto fisiopatológico como hemorrágico, neurotóxico o citotóxico (Fox and Serrano, 2007), esta clasificación está directamente relacionada con las moléculas que conforman el veneno. Determinadas serpientes de la familia *Viperidae* (hemorrágicas) contienen disintegrinas en sus venenos. Las disintegrinas pertenecen a una familia de péptidos no enzimáticos antagonistas de casi todas las integrinas de las familias  $\beta_1$  y  $\beta_3$ , exceptuando las integrinas linfocitarias ( $\alpha_L\beta_2$ ,  $\alpha_M\beta_2$  y  $\alpha_X\beta_2$ ) y la integrina  $\alpha_2\beta_1$ . De entre el conjunto de disintegrinas, destacan las disintegrinas cortas, antagonistas específicas de la unión de colágeno tipo I y IV a la



integrina  $\alpha_1\beta_1$ , que poseen un motivo tripéptido (R/K)TS localizado en el ápice de un bucle móvil, mantenido en la conformación activa por enlaces disulfuro y considerado el motivo de unión que confiere a estas disintegrinas la afinidad específica por  $\alpha_1$  (Calvete et al., 2007; Calvete et al., 2010; Brown et al., 2009; Walsh and Marcinkiewicz, 2011).

Tradicionalmente, los componentes del veneno se evalúan en la búsqueda de las toxinas que contribuyen al efecto fisiopatológico observado. Normalmente se hace mediante el aislamiento de la toxina del conjunto del veneno a través de procedimientos bioquímicos o mediante procedimientos moleculares. Tras la obtención de la toxina, se evalúa la función bioquímica y biológica, y en última instancia, se comprueba el efecto fisiopatológico en un modelo experimental celular o animal (Fox and Serrano, 2007; Pahari et al., 2007).

En este sentido, pretendemos caracterizar la disintegrina corta con motivo RTS, jerdostatina, expresada de forma recombinante a partir de una librería de ADNc de la glándula de veneno de *Protobothrops jerdonii* (Sanz-Soler, 2012).

### **5.1. Jerdostatina interacciona con la integrina $\alpha_1\beta_1$**

Las disintegrinas (R/K)TS de veneno de serpiente, estudiadas hasta la fecha, reconocen específicamente a la integrina  $\alpha_1\beta_1$  y bloquean su unión al colágeno tipo I y IV (Sanz et al., 2005), sin embargo, se conoce muy poco sobre el mecanismo de interacción. Se piensa que las disintegrinas cortas actúan mimetizando el mecanismo de unión del componente de la matriz extracelular a la integrina a través del motivo de



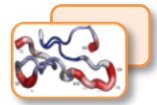
## Resultados y discusión

---

unión tripéptido (Monleon et al., 2005). Estudios por cristalografía de rayos X del dominio  $\alpha$ -A de unión a colágeno, permitieron determinar que la interacción se produce cerca del sitio MIDAS y que la presencia de cationes divalentes ( $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ ), genera una superficie idónea para la unión del ligando, favoreciendo la afinidad del receptor por el colágeno (Emsley et al., 2000).

Sin embargo, el estudio de la interacción de r-jerdostatina con el ectodominio de la integrina  $\alpha_1\beta_1$ , en un ensayo tipo ELISA, muestra que r-jerdostatina se unen al ectodominio de  $\alpha_1\beta_1$  con independencia de la presencia de cationes divalentes. Este tipo de comportamiento ya se había observado en el echovirus-1 humano EV1 (Jokinen et al., 2010), la metaloproteasa MMP-1 (Stricker et al., 2001) o rhodocetina (Eble and Tuckwell, 2003; Eble et al., 2009), que no requieren de iones divalentes para unirse al dominio  $\alpha_2$ -A. Por lo tanto, r-jerdostatina podría pertenecer a este tipo de antagonistas.

Estudios estructurales del dominio  $\alpha_1$ -A unido a un péptido en triple hélice GLOGEN, determinó que la interacción del colágeno cerca del sitio MIDAS, provoca una descoordinación del catión divalente, produciendo cambios conformacionales en las hélices  $\alpha C$ ,  $\alpha 6$  y  $\alpha 7$  (Chin et al., 2013). Especialmente, la hélice  $\alpha 7$  sufren un movimiento hacia abajo muy significativo, este movimiento produce cambios estructurales entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , promoviendo la señalización (Shimaoka et al., 2003; Nymalm et al., 2004; Yang et al., 2004; Lahti et al., 2011). No obstante, el estudio de la interacción del dominio  $\alpha_1$ -A y el fragmento de colágeno IV



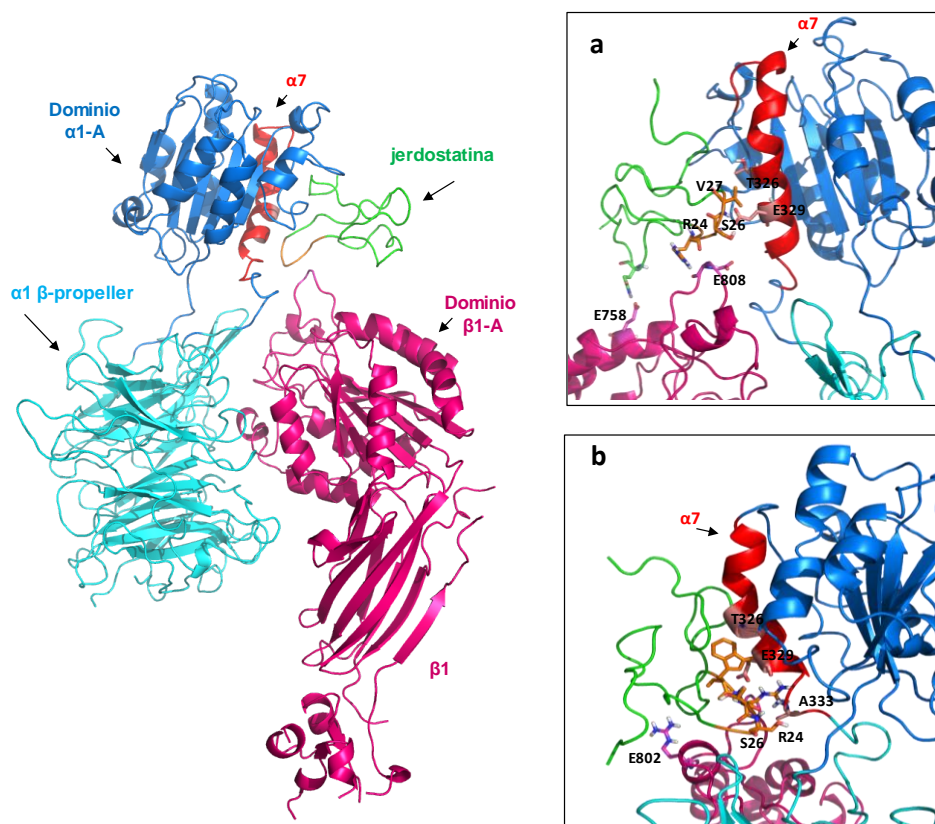
(CB3) en presencia de concentraciones crecientes de r-jerdostatina, muestra que el colágeno se une a  $\alpha_1$ -A con independencia de la presencia de r-jerdostatina. Por consiguiente, en las condiciones experimentales utilizadas, el dominio  $\alpha_1$ -A de unión al colágeno, por sí sólo, no contiene el sitio de reconocimiento de jerdostatina, coincidiendo con los resultados obtenidos posteriormente con las disintegrinas KTS, obtustatina, viperistatina y péptidos sintéticos KTS, incapaces de alterar la interacción del dominio  $\alpha_1$ -A al colágeno IV (Momic et al., 2014).

Las disintegrinas (R/K)TS bloquean la unión del colágeno a la integrina  $\alpha_1\beta_1$  de manera dependiente de dosis. Actualmente, se desconoce si las disintegrinas bloquean estéricamente el acceso del sitio de unión del colágeno a  $\alpha_1\beta_1$  o interactúan en un sitio distinto a CB3 alterando, de este modo, la afinidad de la integrina por el colágeno. Esta última hipótesis parece la más probable, ya que hemos observado que las disintegrinas no se unen exclusivamente al dominio  $\alpha_1$ -A, evidenciando la existencia de otro sitio de unión específico fuera de este dominio. La subunidad  $\alpha_1$ , contiene otros motivos como el "β-propeller", donde se encuentra insertado el dominio  $\alpha$ -A (Xiong et al., 2001), a los que las disintegrinas podrían unirse para impedir la unión del colágeno, interfiriendo en los cambios conformacionales necesarios para la unión del colágeno a nivel de las hélices  $\alpha C$ ,  $\alpha 6$  y  $\alpha 7$ , de forma que la integrina se mantendría en un estado "cerrado" o de baja afinidad al colágeno.

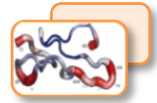
Para comprobar esta hipótesis hemos desarrollado un modelo de interacción integrina-jerdostatina mediante programas de modelado



molecular e interacción "docking". Como la estructura de la integrina  $\alpha_1\beta_1$  aún no está resuelta, realizamos un modelado a partir de estructuras depositadas en el PDB con una identidad del 85-90% con respecto a  $\alpha_1\beta_1$  y posteriormente realizamos un docking frente a jerdostatina (PDB 2W9O) (Figura 38).



**Figura 38. Modelo de interacción  $\alpha_1\beta_1$ -jerdostatina.** A la izquierda se muestra el modelo de interacción obtenido mediante el programa bioinformático HADDOCK. A la derecha se muestran los dos modelos con mejor valor estadístico (Z-Score) propuestos por el programa. Los residuos del bucle de unión de jerdostatina (en naranja) interactúan en ambos modelos con residuos de la hélice  $\alpha_7$  (en rojo) del dominio  $\alpha_1$ -A.



Nuestro modelo de interacción, sugiere que el sitio de unión de jerдостatina se sitúa entre la hélice  $\alpha_7$  del dominio  $\alpha_1$ -A y el dominio  $\beta_1$ -A de la subunidad  $\beta$ . Esta interacción impediría el movimiento de la hélice, alterando los cambios conformacionales necesarios para la unión del colágeno, disminuyendo su afinidad y, por tanto, mantendría la integrina en un estado inactivo. El estudio de interacción de la integrina  $\alpha_2\beta_1$ , nos dio como resultado un patrón de unión diferente, apoyando nuestras observaciones (Anexo I). No obstante, serían necesarios estudios estructurales para confirmar el modelo de interacción que proponemos.

En resumen, nuestros resultados sugieren que las disintegrinas (R/K)TS podrían pertenecer a una nueva clase de antagonistas, RGD-independientes, cuya afinidad de unión es independiente de la presencia de iones divalentes, e indican, claramente, la existencia de un nuevo sitio de unión que altera la afinidad de la integrina  $\alpha_1\beta_1$  por el colágeno tipo IV. Mediante métodos bioinformáticos de modelado, hemos obtenido un modelo teórico de interacción  $\alpha_1\beta_1$ -jerдостatina, que sugiere que jerдостatina podría alterar la afinidad del colágeno mediante su interacción con la hélice  $\alpha_7$  del dominio  $\alpha_1$ -A y la subunidad  $\beta_1$ .

### **5.2. Caracterización de la actividad biológica de las disintegrinas (R/K)TS**

Determinadas serpientes de la familia *Viperidae* (*Daboia* y *Macrovipera*) cuyo veneno es generalmente hemorrágico, contienen disintegrinas cortas R/K)TS que, una vez en el torrente sanguíneo, interaccionarán con las células endoteliales y del músculo liso vascular que





## Resultados y discusión

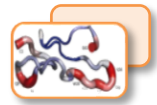
---

expresan la integrina  $\alpha_1\beta_1$  en su superficie (Senger et al., 1997, 2002). La reorganización del citoesqueleto, la migración y la proliferación celular, procesos necesarios para el desarrollo vascular y reparación arterial tras una lesión, están regulados a través de vías de señalización dependientes de las integrinas, así como las patologías asociadas como trombosis, aterosclerosis y restenosis (Pozzi et al., 1998; Schapira et al., 2005; Abraham et al., 2008; Liu and Leask, 2012).

Por lo tanto, el estudio de las disintegrinas (R/K)TS permite evaluar la importancia biológica y funcional de la integrina  $\alpha_1\beta_1$ . Las disintegrinas con motivo KTS, estudiadas hasta la fecha, inhiben la adhesión, migración y proliferación de células endoteliales vasculares mediante el bloqueo específico de la interacción de la integrina  $\alpha_1\beta_1$  con el colágeno tipo IV (Kisiel et al., 2004; Olfa et al., 2005; Brown et al., 2008). En este sentido, nos hemos centrado en estudiar los efectos r-jerdostatina, sobre la adhesión, migración y proliferación de las células del músculo liso vascular, con el fin de profundizar en el papel de las disintegrinas cortas (R/K)TS, e indirectamente en el papel de la integrina  $\alpha_1\beta_1$  en este componente vascular.

### **5.2.1. Actividad de r-jerdostatina en la adhesión de CMLV**

Tras la unión integrina-matriz, los receptores se agrupan formando clústers que conectan complejos de señalización y proteínas estructurales (citoesqueleto de actina) con la matriz (Burrige et al., 1996; Yamada et al., 1997). Estas estructuras que permiten la adhesión de la célula a la matriz, se denominan adhesiones focales. La integrina  $\alpha_1\beta_1$  es



uno de los principales receptores de unión al colágeno tipo IV, principal componente de la membrana basal (Tanjore and Kalluri, 2006; Alberts et al., 2007) que envuelve a las células del músculo liso vascular y está implicado en la formación de la placa ateromatosa (Katsuda et al., 1992).

En la presente Tesis Doctoral se ha comprobado como la disintegrina recombinante r-jerdostatina inhibe la adhesión de las células RASM proliferantes sobre CB3 de manera dependiente de dosis, con un  $IC_{50}$  de 25.6 nM, recalcando la importancia de esta integrina en la formación de adhesiones focales de las CMLV. Además, el bloqueo de este receptor en células endoteliales vasculares mediante inhibidores específicos como arresten (fragmento NC1 del colágeno tipo IV) o las disintegrinas KTS reveló que la integrina  $\alpha_1\beta_1$  actúa a través de la ruta FAK/c-Raf/MEK/p38/ERK1, implicada en la formación de adhesiones focales (Aikio et al., 2012, Olfa et al., 2005). Por la tanto, la integrina  $\alpha_1\beta_1$  participa en la formación de adhesiones focales de ambos componentes celulares vasculares.

De entre todas las integrinas,  $\alpha_1\beta_1$  está estrechamente relacionada con la integrina  $\alpha_2\beta_1$ , estructuralmente son muy similares y ambas unen el colágeno tipo I y IV, aunque con diferente afinidad (Nykvist et al., 2000; Tulla et al., 2008). El estudio de la adhesión de células ASMC humanas utilizando inhibidores de  $\alpha_1\beta_1$  y  $\alpha_2\beta_1$ , ha permitido corroborar la hipótesis de complementariedad funcional que existe entre los dos receptores de colágeno  $\alpha_1\beta_1$  y  $\alpha_2\beta_1$  (Senger, 2002; Perruzzi et al., 2003) y se postulan como los principales receptores que participan en la adhesión de CMLV



sobre colágeno tipo IV. En un contexto biomédico, esta observación puede ser relevante para la prevención de patologías vasculares donde intervengan tanto  $\alpha_1\beta_1$  como  $\alpha_2\beta_1$ .

### 5.2.2. Actividad de r-jerdostatina en la migración de CMLV

La capacidad de migración de las células está determinada por la fuerza de adhesión, la imposibilidad de bloquear totalmente la migración celular empleando antagonistas específicos de las integrinas  $\alpha_1\beta_1$  y  $\alpha_2\beta_1$  parece indicar que las células de rata ASMC utilizan un mecanismo migratorio alternativo. Algunos autores sugieren que el proceso migratorio podría estar mediado a través de la integrina  $\beta_3$ , concretamente  $\alpha_v\beta_3$  (Slepian et al., 1998; Smyth et al., 2001; Li et al., 2010). Estudios *in vitro* sobre la migración y proliferación de CMLV, utilizando anticuerpos frente a  $\alpha_v\beta_3$  y péptidos sintéticos Arg-Gly-Asp (RGD) demostraron que el bloqueo de esta integrina retrasa el engrosamiento de la capa íntima después de una lesión vascular, sugiriendo que  $\alpha_v\beta_3$  juega un papel importante en la regulación de la migración y proliferación de las células del músculo liso vascular (Bendeck et al., 2000; Varadarajulu et al., 2005).

### 5.2.3. Actividad de r-jerdostatina en la proliferación de CMLV

La adhesión, migración y proliferación de las CMLV son procesos regulados por las integrinas, necesarios para el desarrollo vascular y durante una lesión vascular. Debido a la capacidad de unirse selectivamente al colágeno, la integrina  $\alpha_1\beta_1$  contribuye a la proliferación



de las células del músculo liso vascular (Nguyen et al., 2005; Schapira et al., 2005; Louis et al., 2007).

A pesar de que la integrina  $\alpha_1\beta_1$  desempeña un papel regulador en la proliferación de células del endotelio vascular mediante la activación de la vía Ras-MAPK a través de la proteína adaptadora Shc (Colorado et al., 2000; Brown et al., 2008), r-jerdostatina fue incapaz de inhibir de forma significativa la proliferación de las células del músculo liso vascular de rata cultivadas sobre CB3.

El patrón de expresión de las integrinas está asociado a cambios fenotípicos en las CMLV (Bunni et al., 2010). A parte de la posibilidad de que otros receptores de membrana estén involucrados en la migración y proliferación de las CMLV, los resultados observados podrían estar relacionados con la modulación fenotípica. Las células del músculo liso vascular presentan diferentes fenotipos (contráctil y sintético) donde, el fenotipo sintético se asocia a un aumento de la migración y la proliferación (Gomez and Owens, 2012). La línea celular de rata A7r5 (Kimes and Brandt, 1976) utilizada en los ensayos, es un modelo de uso común de CMLV en cultivo, caracterizadas como sintéticas (Kennedy et al., 2014) se crecieron sobre plástico y se utilizaron a pases bajos (3 pases). Sin embargo, algunos estudios sugieren que el colágeno tipo IV promueve el fenotipo contráctil por medio de interacciones con integrinas y factores de crecimiento, limitando la migración y proliferación de las CMLV (Thyberg and Hultgardh-Nilsson, 1994; Koyama et al., 1996; Orr et al., 2009; Koohestani et al., 2013). Esta modulación fenotípica, explicaría la



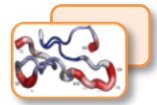
## Resultados y discusión

---

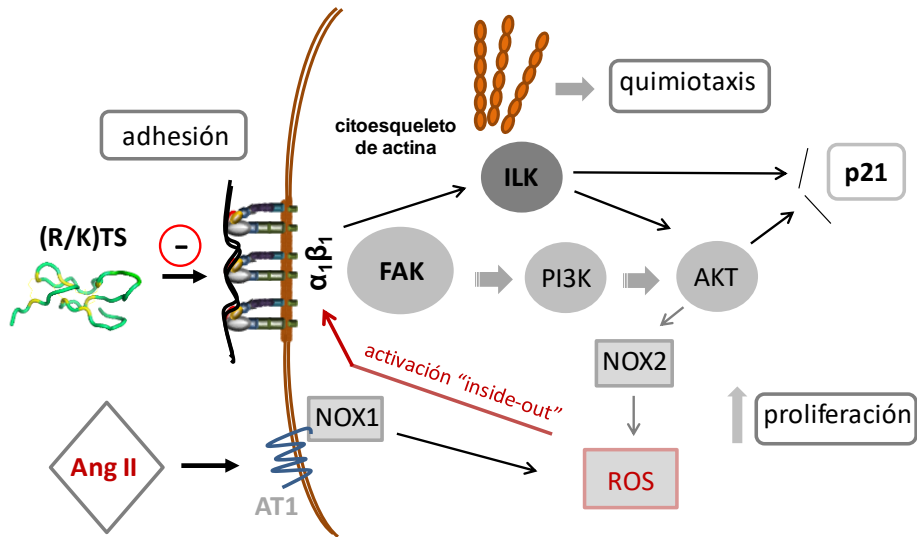
ausencia de inhibición de la migración y proliferación celular en presencia de r-jerdostatina sobre CB3. A pesar de que a simple vista no se observó ningún cambio fenotípico, se tendrían que haber analizado proteínas marcadoras, como la  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), la cadena pesada de la miosina del músculo liso (SM-MHC) o smoothelin A/B, involucradas en la contracción celular. Del mismo modo, para descartar que el colágeno IV influye en el fenotipo, se podrían haber realizado ensayos de migración y proliferación sobre el material plástico de cultivo, sin añadir el componente de matriz. Teniendo en cuenta esta hipótesis, posiblemente los resultados obtenidos *in vitro* sobre la inhibición de la migración y proliferación de las CMLV sobre colágeno en presencia de r-jerdostatina no se correspondan con lo que podría suceder *in vivo*.

Recientemente, el uso de antagonistas específicos de la integrina  $\alpha_1\beta_1$  en células del músculo liso vascular, permitió demostrar que la integrina  $\alpha_1\beta_1$  modula el efecto de la angiotensina II, un vasoconstrictor relacionado con aterosclerosis que induce la migración y proliferación de las CMLV. En estos estudios, en condiciones normales, la disintegrina KTS obtustatina fue incapaz de inhibir la migración y proliferación de las CML de aorta de rata, sin embargo, en presencia de niveles elevados de angiotensina II, se observó una reducción significativa de estos procesos celulares (Moraes et al., 2015).

Nuestros resultados, junto con los obtenidos por Moraes y colaboradores (2015), sugieren que existe una regulación de la expresión de las integrinas en las células del músculo liso. Las células del músculo



liso vascular, en condiciones normales, estarían utilizando otras subunidades de integrinas para migrar y proliferar, pero, cuando se inducen estos procesos (durante una lesión o patología arterial), podrían ser dependientes de la integrina  $\alpha_1\beta_1$  (Figura39).



**Figura 39. La integrina  $\alpha_1\beta_1$  modula el efecto de Ang II en las CMLV.** La angiotensina II induce la producción de ROS dependiente de NOX1. Esta respuesta activa a la integrina  $\alpha_1\beta_1$  que, a través de rutas de señalización mediadas por AKT e ILK, activa a NOX2. NOX1 y NOX2 mantienen la producción de ROS, responsable del aumento de la migración y proliferación de CMLV mediada por Ang II. Las disintegrinas cortas (R/K)TS actúan como inhibidores de la ruta mediada por  $\alpha_1\beta_1$ , disminuyendo el efecto producido por Ang II sobre las CMLV. Modelo adaptado de Moraes et al., 2015.

En resumen, los resultados obtenidos sobre la adhesión, migración y proliferación de las RASMC sobre colágeno indican que la integrina  $\alpha_1\beta_1$  participa, principalmente, en la formación de adhesiones focales. Las células del músculo liso vascular, en condiciones normales, parecen regirse por mecanismos mediados por distintas integrinas que, junto a los

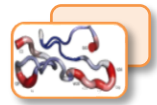


componentes de la matriz extracelular, modulan su fenotipo. Sin embargo, niveles elevados de angiotensina II, regulan la activación de  $\alpha_1\beta_1$  promoviendo la migración y proliferación de estas células. Los niveles elevados de angiotensina II están relacionados con la aparición y progresión de enfermedades cardiovasculares como aterosclerosis (Montezano et al., 2014), por lo tanto, las disintegrinas cortas (R/K)TS podrían servir como herramientas moleculares para el tratamiento terapéutico de estas enfermedades.

### 5.2.4. Jerдостatina como agente antiangiogénico

Gracias a la generación de ratones "*knock-out*" para las integrinas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\beta_1$ , se descubrió la importancia de estos receptores de unión a colágeno en la angiogénesis tumoral (Pozzi et al., 2000; Zhang et al., 2008), así como su papel en el cáncer y procesos metastásicos (Chen et al, 2005; Yoshimura et al, 2009; Ibaragi et al, 2011). Estos hallazgos han convertido a las integrinas,  $\alpha_1\beta_1$  y  $\alpha_2\beta_1$  en objetivo para el desarrollo de fármacos anticancerígenos.

Las proteínas del veneno de serpiente son consideradas de interés biomédico porque pueden ser utilizadas como herramientas moleculares para el diseño de drogas de relevancia en el diagnóstico y en la terapia de diferentes patologías como inflamación, cáncer o enfermedades autoinmunes (Koh et al., 2006; Fox and Serrano, 2007; Georgieva et al., 2008). Concretamente, las lectinas de tipo C (Arlinghaus and Eble, 2012) y las disintegrinas son importantes herramientas farmacológicas, ya que inhiben de forma muy selectiva a las integrinas y poseen propiedades



antiagregantes y anticancerígenas (Swenson et al., 2007; Goswami, 2013; Marcinkiewicz, 2013; Ley et al., 2016).

Del conjunto de disintegrinas, las disintegrinas cortas con motivo KTS, obtustatina, lebestatina y viperistatina, inhiben la angiogénesis y la progresión tumoral. (Marcinkiewicz et al., 2003; Olf et al., 2005; Staniszewska et al., 2009; Brown et al., 2008; Ghazaryan et al., 2015). El estudio realizado *in vitro* de la actividad antiangiogénica de r-jerdostatina, muestra que esta disintegrina con motivo RTS también es capaz de inhibir la angiogénesis. Además, hemos observado que tanto  $\alpha_1\beta_1$  como  $\alpha_2\beta_1$  participan en la angiogénesis de células HUVEC sobre colágeno y que el uso de inhibidores de ambos receptores reduce totalmente la formación de nuevos vasos. Nuestros hallazgos apuntan, por tanto, a la participación de las integrinas  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  en la angiogénesis, en concordancia con el fenotipo de reducción de la vascularización observada en los ratones  $\alpha_1/\alpha_2$ -KO (Pozzi et al., 2000; Zhang et al., 2008). Recientemente se están desarrollando péptidos sintéticos lineales y cíclicos, diseñados a partir de estos componentes del veneno, antagonistas duales de  $\alpha_1\beta_1$  y  $\alpha_2\beta_1$ , para el desarrollo de fármacos en el tratamiento de la angiogénesis y cáncer (Momic et al., 2014).

Finalmente, el estudio realizado en este capítulo de la Tesis Doctoral sobre la actividad de la disintegrina recombinante jerdostatina sugiere que la integrina  $\alpha_1\beta_1$  tiene diferentes funciones dentro de la pared vascular, dependiendo del tipo celular que expresa este receptor de integrina. Las células del músculo liso vascular parecen regirse por





## Resultados y discusión

---

mecanismos mediados por distintas integrinas que, junto a los componentes de la matriz extracelular, modulan su fenotipo. Las integrinas  $\alpha_2\beta_1$  y  $\alpha_1\beta_1$  están estrechamente relacionadas (unen colágeno de forma RGD-independiente) aunque su afinidad por el colágeno es distinta y todo parece indicar que ambas integrinas están involucradas, en mayor o menor grado, en las funciones fisiológicas de los componentes celulares del sistema vascular. Nuestro estudio sobre los efectos de r-jerdostatina sobre la integrina  $\alpha_1\beta_1$  destaca su relevancia funcional en las adhesiones focales y en procesos asociados a la angiotensina II, y hace hincapié en la utilidad de inhibidores específicos de la integrina  $\alpha_1\beta_1$  y  $\alpha_2\beta_1$  como herramientas antiangiogénicas.

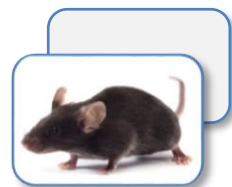
## **Capítulo II**

# **Generación de un modelo transgénico animal**



---

# Introducción







## 1. El ratón como modelo experimental

El gran éxito de los ratones comunes (*Mus musculus*) en el campo de la ciencia comenzó a principios del siglo XX cuando el ratón desempeñó un papel fundamental en los estudios genéticos. El genetista francés Lucien Cuénot realizó los primeros estudios sobre la herencia de varios fenotipos del color del pelaje de los ratones aplicando las leyes de Mendel a mamíferos (Cuénot, 1902). Sin embargo, los descubrimientos más significativos los realizó el genetista estadounidense William Ernest Castle. Castle comenzó un análisis sistemático de la herencia y variación genética en esta especie, determinando su importancia como modelo experimental (Castle, 1906). Más tarde, Clarence Cook Little, desarrolló la primera cepa de ratones endogámicos (Castle and Little, 1910) y en el año 1921 obtuvo la cepa C57BL que actualmente se ha convertido en el modelo animal más utilizado en biomedicina.

Además de estos descubrimientos, existen otras ventajas para utilizar ratones en investigación, tales como: el corto ciclo reproductivo, una vida útil acelerada (1 año de ratón = ~30 años en humanos), pequeño tamaño, numerosas camadas, y por su facilidad de crianza en cautividad.

El ratón y la especie humana tuvieron un ancestro común hace aproximadamente  $75 \pm 15$  millones de años, debido a esta divergencia evolutiva relativamente "reciente", alrededor del 99% de los genes del ratón tiene un homólogo en el genoma humano, estas características convierten al ratón en un modelo animal idóneo para comprender la biología y patologías de la especie humana (Waterson et al., 2002).



### 2. Ratones modificados genéticamente (RMG)

Un organismo modificado genéticamente (OMG) es un organismo cuyo material genético ha sido modificado mediante técnicas de ingeniería genética.

Los animales transgénicos son aquellos que portan un fragmento de ADN exógeno (transgén) integrado en su genoma de manera estable. Es decir, todo gen añadido al repertorio genético de un organismo, con la consecuente ganancia o pérdida de función otorgada por este nuevo gen, que se transmite en la línea germinal recibe el término de animal transgénico (Capecchi, 1980; Gordon and Ruddle, 1981; Costantini, 1981).

Para la introducción del nuevo material genético se utilizan vectores portadores de ADN recombinante como plásmidos, bacteriófagos, cósmidos, YACs (cromosoma artificial de levadura), BACs (cromosoma artificial de bacteria) (Costantini and Lacy, 1981; Taylor et al., 1992; Antoch et al., 1997; Giraldo and Montoliu, 2001; Moreira et al., 2007; Van Keuren et al., 2009). Los métodos más frecuentes utilizados para generar animales transgénicos son la microinyección de ADN en pronúcleos de embriones fertilizados en estadio de una célula (Gordon et al., 1980), la manipulación *in vitro* de células embrionarias pluripotentes (ES) (Gossler et al., 1986) o la transferencia nuclear (Perry et al., 1999).

Los ratones modificados genéticamente son utilizados como modelo para el estudio de las bases genéticas de múltiples enfermedades, sobre la regulación de genes específicos de tejidos o durante el desarrollo. En el ratón podemos diferenciar dos tipos de modelos transgénicos: los



convencionales y los modelos de modificación dirigida del genoma (Voncken, 2011).

Los ratones transgénicos convencionales son RMG portadores de un transgén integrado al azar en su genoma. Son generalmente modelos de ganancia de función que, conducen a la expresión de un nuevo gen o a la sobreexpresión de una proteína ya existente. Este modelo permite controlar la estructura, pero no la posición donde se integra el transgén o el número de copias. Además, la integración al azar en el genoma, a veces, conduce a la interrupción de la estructura del ADN cromosómico en el sitio de integración y genera mutaciones, por lo general recesivas, llamadas "insercionales" con una amplia variedad de efectos (Meisler, 1992; Woychik and Alagramam, 1998).

La creación de RMG de forma dirigida tiene su origen en los años 80 gracias al avance de la tecnología del ADN recombinante. El desarrollo de metodologías celulares y moleculares permitieron la modificación dirigida de un gen en particular o "*gene targeting*" convirtiéndose en uno de los métodos más poderosos para conocer, particularmente, la importancia fisiológica y patológica de determinadas secuencias génicas (Thomas et al., 1986; van Deursen, 2003; Capecchi, 2005). En general se puede hablar de dos tipos de modelos generados mediante "*gene targeting*":

- Ratones "knock-out" (KO): Son ratones en los que se inactiva un gen determinado en el genoma, generalmente por supresión de toda o parte





de su secuencia codificante, o por la integración de una secuencia de ADN que interrumpe la secuencia codificante (Capecchi, 2001).

- Ratones "knock-in" (KI): Son ratones en los que se introducen mutaciones dirigidas en la secuencia de un determinado gen, o ratones donde se introduce un gen en un locus conocido del cromosoma del organismo (Doyle et al., 2012).

### **2.1 Mutagénesis dirigida. Integración específica mediante recombinación homóloga**

El modelo de "gene targeting" se basa en la utilización de las células madre embrionarias (células ES) como vehículo para introducir modificaciones genéticas en la línea germinal del ratón de forma estable. Las células madre embrionarias son células derivadas de la masa celular interna de un embrión de 4-5 días de edad, pluripotentes. Una característica fundamental de las células madre embrionarias es que pueden mantenerse en un estado indiferenciado, formando, al dividirse, una célula idéntica a ellas mismas y manteniendo una población estable de células madre. El vector que se utiliza para integrar el transgén generalmente contiene dos fragmentos de ADN genómico, llamados brazos de homología (5' y 3', respectivamente), que dirigen de forma específica la integración del vector a cualquier posición del genoma del ratón de interés mediante recombinación homóloga.

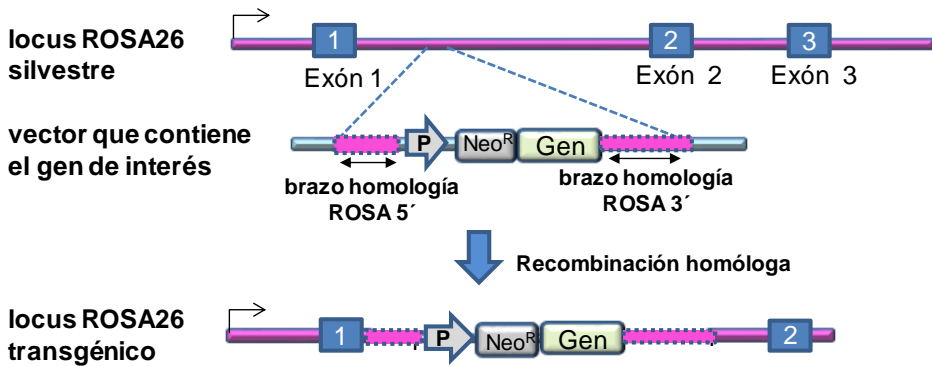


La probabilidad de recombinación aumenta proporcionalmente con la longitud de la secuencia homóloga del vector (Smithies et al., 1985; Thomas and Capecchi, 1987; Doetschman et al., 1987). La recombinación puede ocurrir por reemplazamiento (el procedimiento más utilizado en la construcción de animales KO) (Thompson et al., 1989) o por inserción (aproximación empleada en animales KI) (Zou et al., 1994).

El locus más utilizado para la inserción de transgenes es el locus *ROSA26* [Gt (ROSA) 26Sor] (Gene ID: 14910), este locus situado en el cromosoma 6 del ratón se extiende 9 kb y consta de tres exones. Fue aislado por primera vez en 1991 (Friedrich and Soriano) mediante un sistema de captura de genes ("*gene trapping*") de células madre embrionarias. El locus de ratón *ROSA26* es particularmente útil para la modificación genética, ya que permite la inserción del transgén en el primer intrón mediante recombinación homóloga con gran eficiencia, se expresa en la mayoría de tejidos (embrionarios y adultos) de forma estable (ubicua) y no está sujeto a silenciamiento (Soriano, 1999) (Figura 40). No se han observado variaciones fenotípicas tras la inserción en este locus, por lo que parece un sistema seguro que se sigue utilizando en la actualidad para producir una gran variedad de líneas. En la base de datos informática del genoma del ratón (MGI, [www.informatics.jax.org](http://www.informatics.jax.org)) encontramos unas 600 cepas "knock- in" de ratón *ROSA26* que se han generado para estudiar los efectos de proteínas mutantes expresadas constitutivamente o de forma condicional.



## Introducción



**Figura 40. Representación de "gene targeting" en el locus *ROSA26* de ratón.** *ROSA26* es un locus ampliamente utilizado para la expresión de genes constitutivos, de forma ubicua en ratones. El gen de interés se inserta en el primer intrón del locus por recombinación homóloga. La expresión del gen puede ser conducida por el promotor endógeno Rosa26.

Como se mencionó anteriormente, el modelo de "gene targeting" utiliza células madre embrionarias como vehículo para introducir modificaciones genéticas en la línea germinal. Las células madre embrionarias derivan de un blastocisto de ratón y se pueden mantener de forma indefinida *in vitro* como una población homogénea de células indiferenciadas (Evans and Kaufman, 1981). La mayoría de las líneas celulares ES han sido aisladas de embriones de la cepa consanguínea 129 y derivadas (Simpson et al., 1997). Las células ES pluripotentes, una vez modificadas, se incorporan a un blastocisto receptor para generar todos los linajes celulares embrionarios. Los animales que nacen se denominan quimeras porque derivan tanto de las células del hospedador como de las introducidas (Bradley et al., 1984).



## 2.2. Sistema de recombinación Cre/LoxP

La expresión de las modificaciones genéticas introducidas puede regularse espacial y temporalmente mediante la recombinación específica de sitio "*site-specific recombination*" (SSR). En este sistema, las recombinasas (Cre y Flp) catalizan la recombinación entre dos sitios de reconocimiento específicos (loxP y frt respectivamente) produciendo la activación/inactivación de los genes situados entre estos sitios loxP/frt (Meyers et al., 1998).

La tecnología Cre/LoxP fue introducida en la década de los 80 (Sternberg and Hamilton, 1981; Sauer and Henderson, 1988) y se aplicó en levaduras, plantas, cultivos de células de mamíferos y en ratones (Araki et al., 1997). Este sistema emergió como una importante herramienta para crear un modelo "knock-out" condicional pues permite la supresión específica del gen de interés en la célula donde la recombinasa se está expresando.

El sistema Cre/LoxP utiliza la recombinasa Cre, enzima específica de sitio del bacteriófago P1 que reconoce las secuencias específicas loxP y cataliza la recombinación en círculo ("Cyclization REcombination") de los genes localizados entre estas secuencias loxP (Hamilton and Abremski, 1984). Los sitios loxP, de 34 pares de bases (pb), están compuestos por dos secuencias palindrómicas de 13 pb que flanquean una región espaciadora de 8 pb, la cual, establece la orientación del sitio loxP. La orientación y la ubicación de los sitios loxP es importante, pues determina





### 2.2.1- Control espacio-temporal de la expresión.

La recombinación entre los sitios loxP está condicionada por la presencia de la recombinasa Cre. La colocación y orientación de los sitios loxP determinan la secuencia genómica a escindir, mientras que la disponibilidad, en el tiempo y/o el espacio, de la recombinasa, dictará cuándo y dónde se produce la recombinación.

La expresión de Cre puede controlarse espacialmente mediante el uso de promotores ubicuos o específicos de tejido. Así, la generación de un animal modificado condicional requiere el uso de dos líneas de ratones transgénicos: un ratón que porte el gen de interés con los sitios loxP ("floxed", <sup>flox/flox</sup>) y ratones transgénicos para Cre (con promotor ubicuo o tejido específico). El cruce del ratón "floxed" con el transgénico para Cre originará un animal doblemente transgénico cuyo genoma porta tanto el transgén Cre como el gen "floxed". La expresión de Cre inducirá la recombinación de las secuencias loxP, de forma que se inactivará/activará el gen diana en aquellos tejidos en los que exista la expresión de Cre.

Además, existen varios métodos moleculares para controlar temporalmente la expresión de la recombinasas mediante sistemas de ratones condicionales inducibles (Lewandoski, 2001). En estos sistemas inducibles, la expresión del gen se regula mediante la administración de un compuesto químico (agente inductor), como la tetraciclina en los sistemas de tet-on y tet-off (Gossen and Bujard, 1992; St-Onge et al., 1996) o el tamoxifeno en sistemas donde el receptor de estrógeno está modificado (Brocard et al., 1998).

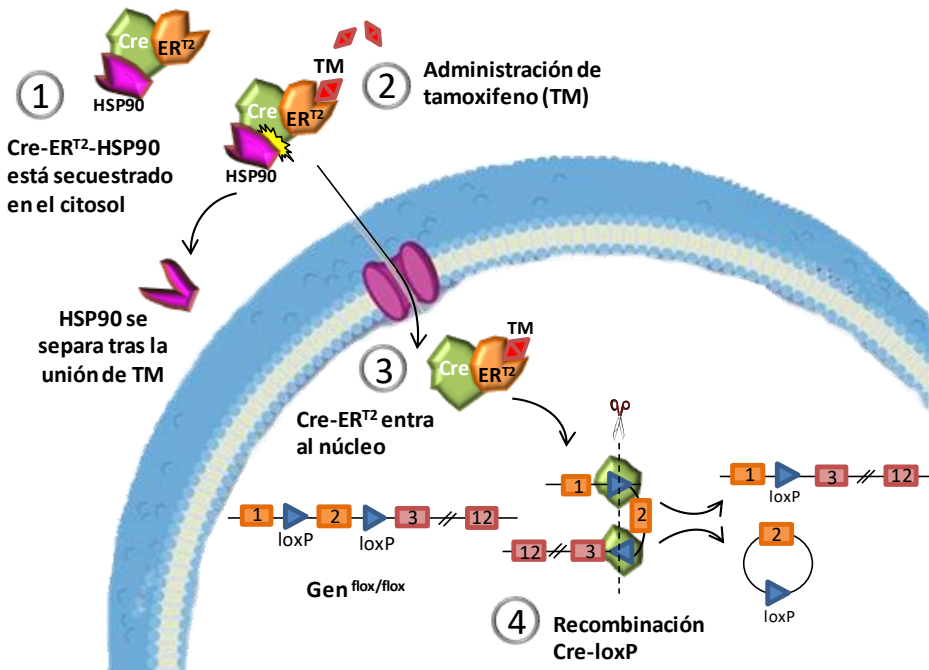


## Introducción

---

Uno de los sistemas inducibles basado en receptores hormonales es Cre-ER<sup>T2</sup>. Para evitar la interferencia con hormonas endógenas del ratón, se generó un sistema transgénico basado en el receptor recombinante de estrógeno humano (ER<sup>T2</sup>). En este sistema, la recombinasa se encuentra fusionada al dominio de unión del receptor de estrógeno triplemente mutado (G400V/M543A/L544A). Este receptor no reconoce su ligando endógeno (estradiol), pero tiene la capacidad de unirse al antagonista sintético del receptor, el 4-hidroxi-tamoxifeno (4-OHT). La fusión de la recombinasa Cre con el receptor ER<sup>T2</sup> da lugar a que se queden secuestrados en el citoplasma por la chaperona Hsp90 impidiendo que suceda la recombinación mediada por Cre en el núcleo. El tamoxifeno actúa como el inductor del sistema, rompe la interacción con Hsp90, permitiendo la liberación de Cre, que se dirige al núcleo e inicia así la recombinación de los sitios loxP (Littlewood et al., 1995; Hayashi and McMahon, 2002) (Figura 42).

Este sistema permite, efectivamente, expresar Cre espacialmente (expresión constitutiva o tejido específica) y en el momento deseado, ya sea durante el desarrollo embrionario o la vida adulta del ratón y así, controlar la actividad de un gen en todos los tejidos, abriendo nuevos caminos para estudiar la función génica y establecer modelos animales concretos de enfermedades humanas (Feil et al., 2009).



**Figura 42. Expresión mediada por Cre y regulada por tamoxifeno.** En este sistema inducible, la recombinasa se encuentra fusionada al receptor de estrógeno modificado (ER<sup>T2</sup>), ambos se encuentran reclutados en el citoplasma por la chaperona Hsp90. Tras la administración de tamoxifeno (TM) se libera la proteína de fusión que entra al núcleo. En el núcleo, Cre reconoce los sitios loxP, los recombina e induce la escisión del gen de interés. Imagen adaptada de [www.elkenzie.com](http://www.elkenzie.com).

Hoy en día, existen cientos de líneas Cre transgénicas, muchas de ellas se enumeran en la base de datos de ratones Cre ([http://nagy.mshri.on.ca/cre\\_new/](http://nagy.mshri.on.ca/cre_new/)) y se pueden comprar en el Jackson Laboratory (<http://jaxmice.jax.org/>).

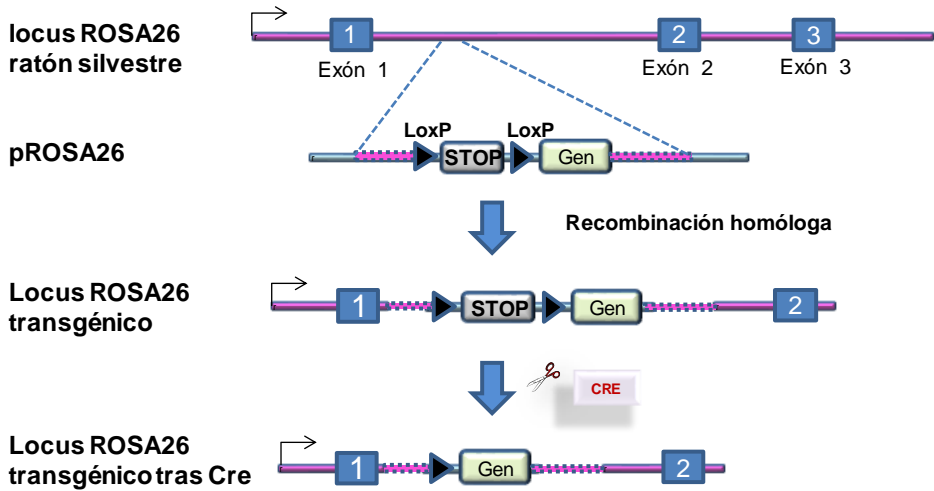




### 3. Generación de ratones transgénicos condicionales

La combinación de las técnicas de recombinación homóloga y de los sistemas Cre/LoxP permiten introducir cualquier tipo de mutación o secuencia génica en el genoma de forma dirigida y, además, controlar el momento y el lugar dónde ésta se expresa (modelos KO y KI condicionales y tejido específicos).

El primer modelo de ratón KI que contenía ambos sistemas fue generado por Soriano (1999). La cepa *Gt(ROSA)<sup>26sor</sup> lacZ* contiene el gen lacZ, precedido por una secuencia de terminación de la transcripción (tpA) flanqueada por los sitios loxP, en el locus de expresión ubicua *ROSA26*. De esta forma, la transcripción finaliza antes de tiempo, pero cuando los ratones se cruzan con ratones Cre transgénicos, la escisión mediada por Cre de la secuencia de terminación conduce a la expresión constitutiva de lacZ. De esta forma, la expresión de lacZ en estos animales doblemente transgénicos solamente se produce en las células que han expresado Cre, así como en todas sus células hijas. A partir de este modelo han surgido cientos de cepas (ratones KO o KI) condicionales que permiten controlar la expresión de genes. Recientemente el modelo Cre/LoxP se está utilizado con el sistema de editado genómico CRISPR-Cas9 para una nueva generación de ratones transgénicos (Platt et al., 2014; Chu et al., 2016).



**Figura 43. Diseño de un modelo transgénico (KI) para la expresión condicional de un gen.** El vector pRosa26 contiene los brazos de homología (5' y 3'), que dirigen de forma específica la integración del vector en el locus de ratón *ROSA26* y el gen de interés precedido por una secuencia de terminación (STOP) flanqueada por los sitios loxP. El cruce de un ratón portador del alelo transgénico con un ratón transgénico para Cre conduce a la escisión mediada por Cre de la secuencia de terminación y a la expresión constitutiva del gen bajo el dominio del promotor Rosa26.



---

## Objetivos







Como se ha descrito en el capítulo anterior, jerdostatina es una disintegrina corta con un motivo RTS, antagonista específica de la integrina  $\alpha_1\beta_1$ . Esta integrina se expresa en células del endotelio vascular y participa en la neovascularización (angiogénesis) regulada por el factor de crecimiento vascular VEGF. Así, el bloqueo de la actividad de la integrina  $\alpha_1\beta_1$  en células endoteliales HUVEC por jerdostatina *in vitro* redujo significativamente la formación de nuevos vasos.

La posibilidad de frenar la angiogénesis, se postuló en los años 70 (Folkman, 1971) como una estrategia prometedora para bloquear el crecimiento de determinados tumores. Así, el desarrollo de un modelo transgénico para jerdostatina, en animales portador de tumores dependiente de angiogénesis, permitiría evaluar *in vivo* los resultados obtenidos *in vitro*. Además, la expresión en este modelo de jerdostatina transgénica de forma sistémica o específicamente en el órgano portador del tumor, permitirá caracterizar más en profundidad su actividad en la detención de la progresión tumoral y determinar su papel fisiológico.

Mediante el trabajo descrito en este segundo capítulo, se pretende generar una línea transgénica de ratones que expresen, de forma condicional, jerdostatina y evaluar la actividad de la proteína transgénica sobre el crecimiento de tumores dependientes de angiogénesis en los ratones transgénicos. Este objetivo general se subdividió en varios objetivos:



## Objetivos

---

- 1) Diseño de una construcción para la expresión eficiente de jerdostatina de forma soluble y activa en mamíferos.
- 2) Expresión de jerdostatina recombinante en células de mamífero y evaluación de su actividad *in vitro*.
- 3) Producción de ratones transgénicos condicionales para el gen de la disintegrina jerdostatina.

---

## Material y Métodos









### 1. Reactivos

Todos los reactivos de Biología molecular y celular fueron proporcionados por Roche, Sigma-Aldrich, Promega, Life technology (Invitrogen/GIBCO), Lonza, EMD Millipore (Novagen), PromoCell, GE Healthcare Life Sciences y Merck.

### 2. Líneas celulares

#### 2.1 Cultivos celulares de mamíferos

El crecimiento de las líneas celulares se llevó a cabo en condiciones constantes de temperatura a 37° C, concentración de CO<sub>2</sub> al 5% y en atmósfera húmeda. Las líneas celulares continuas y primarias utilizadas en el trabajo doctoral son:

➤ *Líneas celulares continuas.*

- COS7: Línea celular procedente de fibroblastos del riñón del mono. Fue cedida por el Dr. Pascual Sanz (Instituto de Biomedicina de Valencia, IBV-CSIC).
- HEK 293T: Línea celular procedente de células embrionarias de riñón humano ("Human Embrionic Kidney 293 cells"). Fueron cedidas por la Dra. Marta Casado del IBV-CSIC.
- HEK 293GnT I: Células HEK 293 deficientes en la proteína GnT I (N-acetylglucosaminyl-transferase I). Crecen en suspensión. Cedidas por el Dr. Santiago Ramón del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO).



## Material y Métodos

---

- RuGli: Línea celular procedente de glioblastoma de rata. Fueron cedidas por el Dr. F. Ruggiero (Institute de Biologie et Chimie des Proteines, Lyon, France).

➤ *Líneas celulares primarias* (Se utilizaron entre los pases 3 y 6 para todos los experimentos).

- MEF: Fibroblastos embrionarios de ratón ("Mouse Embryonic Fibroblasts"). Cultivo primario obtenido de embriones de ratón de la cepa C57BL/6J-Tg (pPGKneobpA)3Ems/J de 12.5-13.5 dpc (días post-coito) de edad utilizados para el crecimiento y expansión de células madre embrionarias indiferenciadas pluripotentes. Estos ratones expresan un casete con resistencia a neomicina (neo<sup>R</sup>). También se aislaron MEF a partir de embriones de ratón de la cepa B6; 129P2-Tg(ROSA)26Sor<sup>tm1(EGFP,Jerostatina)</sup>Upme de 12.5-13.5 dpc de edad para el estudio de la recombinación *in vitro*.

- ES CK35: Células madre embrionarias de ratón ("Mouse Embryonic Stem Cells", Kress et al., 1998). Cedidas por la Dra. Francina Langa (Instituto Pasteur, Paris). Las células ES CK35 de ratón son células madre embrionarias, derivadas de la masa celular interna de un blastocisto de la cepa de ratón 129/Sv, capaces de originar células de cualquier tejido de ratón, incluso de los tejidos germinales. Estas capacidades de mantenerse en un estado indiferenciado y de pluripotencialidad se conservan gracias a las señales inhibitorias provenientes de los fibroblastos embrionarios (MEF) inactivados mitóticamente (conocidos



con el término inglés de "feeders") sobre los que se cultivan (Thomson et al., 1998).

## **2.2. Condiciones de crecimiento celular**

Las líneas de células adherentes COS7, HEK 293T, RuGli y MEF se crecieron en medio DMEM con alta concentración de glucosa (4.5 g/l), suplementado con 100 unidades/ml de penicilina/estreptomicina, 2 mM de L-glutamina y 10% de SFB inactivado.

Las células HEK 293 GnT I fueron crecidas en suspensión a 180 rpm (agitador New Brunswick Scientific INNOVA Modelo 2300) en medio Freestyle 293 (Invitrogen/GIBCO, Carlsbad, CA) con 1% de SFB inactivado, a una densidad entre  $0.1 \times 10^6$  y  $3.0 \times 10^6$  células/ml en frascos de cultivo desechables Erlenmeyer con tapas de ventilación (Corning, NY) a 37° C, 5% CO<sub>2</sub>.

Los fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) se obtuvieron a partir de embriones de 12.5 a 13.5 dpc de edad de una hembra preñada siguiendo el protocolo descrito por Nagy y colaboradores (2006). Los embriones se depositaron en una placa de 100 mm con PBS (tampón fosfato salino, pH7.4). Posteriormente se abrieron los sacos embrionarios vitelinos, dejando los embriones al descubierto. Después de lavar con PBS, se eliminaron la cabeza, patas y vísceras de cada embrión y se lavaron con PBS. Los fragmentos se pasaron a una placa de 60 mm con 5 ml de tripsina-EDTA y se trocearon. Se volvió a añadir 10 ml de tripsina y se incubó a 37° C durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se pasó la solución digerida por una pipeta de 5 ml para disgregar bien la mezcla y



## Material y Métodos

---

se añadió 10 ml de tripsina-EDTA. La digestión se incubó durante 15 minutos agitando cada 5 minutos. Posteriormente se añadió 50 ml de medio (DMEM con glucosa, 2 mM de L-glutamina, 10% SFB y 100 unidades/ml de penicilina/estreptomicina) y se dejó reposar 2-5 minutos para que se depositaran los restos no disgregados. El sobrenadante se centrifugó a 800 rpm durante 5 minutos. El precipitado se resuspendió en medio de crecimiento DMEM a una densidad de  $2.1 \times 10^6$  células/10 cm. Parte de las células se crecieron y otras se congelaron para su almacenamiento en nitrógeno líquido.

La inactivación de las células MEFs se realizó cuando estas alcanzaron un 90% de confluencia. Tras eliminar el medio de crecimiento, se lavaron con PBS y se añadió mitomicina C (1 mg/ml) en medio DMEM con 10% de SFB. Las células se incubaron a 37° C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 2-3 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron 3 lavados con PBS, se tripsinizaron, se transfirieron a nuevas placas y se incubaron a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> hasta su uso como "*feeders*" de las ES de ratón.

Las células madre embrionarias de ratón se cultivaron siguiendo el protocolo descrito por Torres y Kühn (1997). Las ES se crecieron sobre una monocapa de MEFs inactivadas en medio DMEM con 4.5 g/l glucosa, 50 unidades/ml de penicilina/estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, 0.1 mM de amino ácidos no esenciales (NEAA, Invitrogen), 0.1 mM de 2-mercaptoetanol (2-ME, Sigma), 15% de SFB inactivo (SFB ES qualified, LONZA) y suplementado con 1000 U/ml de inhibidores de crecimiento, LIF ("Leukaemia Inhibitory Factor") (ESGRO<sup>®</sup>, Millipore).



Los pases necesarios para el mantenimiento de los cultivos celulares se realizaron con tripsina-EDTA. Para la conservación de las células, éstas se resuspendieron en un 50% (v/v) del correspondiente medio de cultivo completado con un 20% de SFB y 10% (v/v) de DMSO y se pasaron a un criotubo donde se congelaron a  $-80^{\circ}$  C. Posteriormente se almacenaron en contenedores de nitrógeno líquido.

Todas las líneas celulares se testaron con el kit de detección MycoAlert™ (LONZA) para descartar posibles contaminaciones por micoplasma.

### 3. Animales de experimentación

La experimentación animal tiene como finalidad la obtención de un ratón transgénico condicional para la expresión de jerdostatina. El trabajo se desarrolló en el estabulario del Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV-CSIC).

- Para la generación de la línea germinal transgénica B6; 129P2-Tg(ROSA)26Sor<sup>tm1(EGFP,Jerdostatina)</sup>Upme se utilizaron blastocistos procedentes de hembras C57Bl/6J Ola Hsd. Como hembras pseudo-gestante se utilizaron hembras IC-R (CD-I) y en los cruces se utilizaron ratones de la cepa C57Bl/6J Ola Hsd. Estos ratones comerciales provienen de los laboratorios Harlan.

- La línea transgénica, B6. Cg-Tg(Nes-cre)1Kln/J proceden de los laboratorios Jackson (<https://www.jax.org/>). Estos ratones expresan Cre



bajo el control del promotor de la nestina, principalmente en el sistema nervioso central.

- La línea transgénica para la expresión de la recombinasa Cre de forma condicional, ATZ-Tg(hUBC-CreER<sup>T2</sup>) fue cedida por la Dra. Sagrario Ortega (CNIO).

#### 4. Vectores de expresión en células de mamífero

Con el objetivo de expresar jerdostatina de forma soluble en células de mamíferos se utilizaron varios vectores con diferentes etiquetas y péptidos señal:

- pEGFP-N1 (4.7 kb, Clontech): Vector de expresión que permite la expresión en células de mamífero de la proteína de interés fusionada con la proteína verde fluorescente GFP ("Green Fluorescent Protein") en su extremo carboxi-terminal.
- pcDNA3.1(+) (Invitrogen): Vector que procede del pcDNA3 de 5.4 kb y diseñado para expresar proteínas de forma estable y transitoria en células de mamífero.
- pRc\_CMV: Cedido por el Dr. F. Revert (Fibrostatin S.L., Valencia, España).
- pBigT: Cedido por la Dra. Marta Casado (IBV-CSIC). Vector de expresión en mamíferos que incluye un casete que codifica para la expresión de la proteína EGFP, una resistencia a la neomicina (PGK-Neo, gen de resistencia a la neomicina bajo el dominio del promotor PGK



("Phosphoglycerate kinase 1") que permiten la selección de los clones positivos y una señal triple de poliadenilación SV40 (tpA) de terminación de la transcripción. El casete EGFP-Neo-tpA se encuentra flanqueado por los sitios loxP. Tras el casete, se insertó un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) fusionado con la secuencia que codifica para la proteína amarilla fluorescente YFP.

➤ pROSA26PA: Cedido por la Dra. Marta Casado (IBV-CSIC). Este vector deriva del plásmido pROSA26.1, al que se le introdujeron los sitios de corte de las enzimas Pacl y Ascl (Srinivas et al., 2001). Se caracteriza porque posee parte de la secuencia genómica del locus *ROSA26* (brazos homólogos 3' y 5'), presente en el genoma del ratón (cromosoma 6).

➤ pCre-IRES-PuroR (9.2 kb, Addgene): plásmido que permite la expresión de la recombinasa Cre en células de mamífero. La expresión de Cre se encuentra bajo el dominio del promotor humano EF1a ("Elongation Factor 1 alpha"). Este vector también posee el sitio IRES que permite la expresión del antibiótico puromicina y, por tanto, la selección de los clones con este antibiótico.

### 5. Diseño de cebadores

Los cebadores fueron diseñados mediante el programa GeneRunner y su aplicación de análisis de oligonucleótidos (Tabla 7).





**Tabla 7.** Listado de cebadores

Oligonucleótidos utilizados en las diferentes construcciones			
	Nombre	Secuencia (5' --- 3') (nt)	Comentarios
1	5'NheI-SpRPTLN	GTACGCTAGCGATGATCCAGGTTCTCTTG (29)	pEGFP-N1
2	3'XhoI-RPTLN	GTACCTCGAGGCCATTCCCGGGATAACTGGG (31)	pEGFP-N1
3	5'NheI-SEAP	TAATTAGCTAGCCCACCATGCTGCTGCTGCTG (32)	pcDNA3.1
4	3'SEAP-HindIII	ATTATGAAGCTTGCCAGGGAGAGCTGTAG (30)	pcDNA3.1
5	5'HindIII-Flag	GGTAGAAAGCTTGACTACAAGGACGACGATG (31)	pcDNA3.1
6	5'BamHI-Flag	ATGACAGGATCCGACTACAAGGACGACGATG (31)	pcDNA3.1
7	3'Flag-EcoRI	GAGGAGGAATTCCTTGTTCATCGTCGCCTTG (31)	pcDNA3.1
8	5'HindIII-Prodom	GGTGCCAAGCTTAAACCTGAAATCTGGGAG (32)	pcDNA3.1
9	3'Prodom-BamHI	ACTCTGGGATCCAAGGGGAAGTTTCTGCAATG (32)	pcDNA3.1
10	5'EcoRI-JerdM	CCGGTGAATCTGTACAACCTGGACCATGTTG (32)	pcDNA3.1
11	3'Apal/XhoI_RPTLN	ACGGGCCCTCGAGCTAGCCATTCCCGGGATAACT	pRC_CMV
12	5'NheI_ATG	GTACGCTAGCGATGAGGGCCTGGATCTTT (29)	pRC_CMV
13	3'XhoI_RPTLN	ACCTCGAGCTAGCCATTCCCGGGATAACT (29)	pRC_CMV
14	GFP fw	TAAGCCATGGTGAGCAAGGGCGAG (24)	pEGFP-N1
15	GFP rv2	TGAAGCTTCTGTACAGCTCGTCCATGC (28)	pEGFP-N1
16	SP6	GATTTAGGTGACACTATAGAATAC (24)	Secuenciar
17	T7 Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG (20)	Secuenciar
18	T7 Terminador	GCTAGTTATTGCTCAGCGG (19)	Secuenciar
19	M13 fw (-20)	TGAAAACGACGGCCAGT (18)	Secuenciar
20	M13 rv (-24)	GGAACAGCTATGACCATG (19)	Secuenciar

Oligonucleótidos utilizados en la generación del transgénico			
	Nombre	Secuencia (nt)	Comentarios
21	IRESseq_rev	AAGACGGCAATATGGTGG (18)	IRES
22	R26R1	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT (21)	Genotipado
23	R26R2	GCGAAGAGTTTGTCTCAACC (21)	Genotipado
24	R26R3	GGAGCGGGAGAAATGGATATG (21)	Genotipado
25	ROSA26-5'_fw	CCTAAAGAAGAGGCTGTGCTTTGG (24)	síntesis sonda
26	ROSA26-5'_rev	ACGGCTCCACCACGCTCGGAG (21)	síntesis sonda
27	transgen_rv	CATCAAGGAAACCTGGACTACTG (24)	genotipado
28	EGFP fw	GCGGCCTCCGGAGTGAGCAAGGGCGAGGAG (30)	GFP/YFP
29	EGFP rv	CTTGACAGCTCGTCCAT (18)	GFP/YFP
30	GFP1_rv	AGGGCACGGGCAGCTTGC (18)	GFP/YFP
31	Neo fw	GGGCAGGATCTCTGTTCATCTCACCTTGCTCCTG (34)	síntesis sonda



32	Neo rv	CGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTT (30)	síntesis sonda
33	3'Jerd-like	TAGCCATTCCCGGGATAACTG (21)	jerdostatina
34	JerdXhol-3'	GCCTCGAGTATTAGCCATTCCCGGGATAAC (30)	jerdostatina
35	5'NheI_ATG	GTACGCTAGCGATGAGGGCCTGGATCTTT (29)	jerdostatina
36	S_ROSA fw	GTCCAACAGAAAAGAGACACCGAACCAC (28)	síntesis sonda
37	S_ROSA rv	AGTATGTGTATTTTGAGAGCAGGGTTG (27)	síntesis sonda
38	JerdRibo fw	ATGAGGGCCTGGATCTTCTTTC (22)	síntesis ribosonda
39	JerdRibo rv	CTATAGTGTCACCTAAATCGCTTAGCCATTCC (32)	síntesis ribosonda
40	Actina A	TTGGCCTTAACGCAGCTCATTG (22)	$\beta$ -actina
41	Actina B	TGGTGCTAGGGCGGCCAC (20)	$\beta$ -actina
42	Cre fw	ACCAGTTTCGTTCACTCATGG (21)	Genotipado
43	Cre rv	TTGCATGATCTCCGGTATTG (20)	Genotipado
44	Cre-F2	GGCTGGACCAATGTAATATTG (22)	Genotipado
45	Cre-R4	CATCATCGAAGCTTCACTG (19)	Genotipado

## 6. Anticuerpos y péptidos inmunogénicos

**Tabla 8.** Anticuerpos primarios utilizados para la inmunodetección de proteínas.

Anticuerpos Primarios				
Nombre	Antígeno	Referencia	Dilución	Comentario
Anti-GFP	GFP, EGFP	AMS Biotechnology	1:1000	Policlonal de conejo
Anti-Flag- HRP	Epítipo Flag	Sigma-Aldrich	1:1000	Monoclonal de ratón. Conjugado a peroxidasa
Anti-Flag	Epítipo Flag	Sigma-Aldrich	1:1000	Monoclonal de ratón
Anti-PEP160	<sup>1</sup> PEP160	Abyntek Biopharma	1:500	Policlonal de conejo
Anti- $\beta$ 1	Subunidad $\beta$ 1 humana	Eble, 1993	1:2000	Policlonal de conejo
Anti-DIG-AP	digoxigenina	Roche	1:10000 1:3500	Fragmento Fab de oveja Conjugado a fosfatasa alcalina
Anti Tuj 1	Beta-III tubulina	Covance	1:400	monoclonal de ratón

<sup>1</sup>-El anticuerpo anti-PEP160 se purificó por cromatografía de afinidad con el péptido del extremo carboxilo terminal de la jerdostatina (CKPSYPGNG), conjugado con KLH ("Keyhole Limpet Hemocyanin"), a partir de sueros de sangrado de dos conejos inmunizados con este péptido.



**Tabla 9.** Anticuerpos secundarios utilizados para la inmunodetección de proteínas.

Anticuerpos Secundarios				
Nombre	Antígeno	Referencia	Dilución	Comentario
Anti-conejo-HRP	IgG de conejo	Sigma-aldrich	1:10.000	Producido en cabra. Conjugado a peroxidasa
Anti-conejo-AP	IgG de conejo	Sigma-aldrich	1:2000	Producido en cabra. Conjugado a fosfatasa alcalina
Anti-ratón-HRP	IgG de ratón	Santa Cruz	1:10.000	Producido en cabra. Conjugado a peroxidasa
Anti-ratón	IgG de ratón	Molecular Probes	1:650	Producido en cabra Conjugado Alexa Fluor® 555

## 7. Diseño de vectores de expresión

### 7.1. Vectores de expresión en células de mamífero

- pEGFP-N1/ vSP-Jerdostatina

El fragmento vSP-Propéptido-Jerdostatina (333 pb) se amplificó por PCR mediante los cebadores 1 y 2 (tabla 7) utilizando como molde el vector pGEM-T/vSP-Propéptido-Jerdostatina (Capítulo I, material y métodos apartado 6.2.1). El fragmento se ligó al vector pEGFP-N1 previamente digerido con los enzimas NheI/XhoI. Esta construcción se utilizó para transfectar células HEK 293T.



- pcDNA 3.1/SP<sub>SEAP</sub>-Propéptido-Flag-Jerdostatina

Utilizando el vector pcDNA 3.1 se diseñó una construcción en la que se insertó la secuencia correspondiente al péptido señal de SEAP ("human Secreted Alkaline Phosphatase"), una etiqueta corta Flag (DYKDDDDK) y la secuencia que codifica para el propéptido y la proteína madura.

El péptido señal de SEAP (50 pb) se amplificó a partir del vector pSEAP2-Basic (Clontech) con el par de cebadores 3 y 4 (tabla 7). La etiqueta Flag se amplificó a partir del plásmido pFlag-CMV™ (Sigmaaldrich) mediante los oligonucleótidos 5, 6 y 7 (tabla 7). El propéptido y jerdostatina se amplificaron a partir de pGEM-T/vSP-Propéptido-Jerdostatina (Capítulo I, material y métodos apartado 6.2.1), mediante los cebadores 8, 9, 10 (tabla 7). Los fragmentos se ligaron al vector pcDNA 3.1 y, con este vector, se transfectaron células HEK 293T y COS7.

- pRC\_CMV/SP<sub>BM40</sub>-Flag-Jerdostatina

El fragmento SP-Flag-Jerdostatina, amplificado mediante los cebadores 11, 12 y 13 (tabla 7), se insertó en el MCS del vector pRC\_CMV utilizando los sitios de corte NheI y XhoI. En este caso, el vector contiene el péptido señal de la proteína de secreción osteonectina o BM40 (Sp<sub>BM40</sub>), la etiqueta Flag y el dominio jerdostatina. Las líneas celulares HEK 293T, COS7 y HEK 293GnT I fueron transfectadas con esta construcción.

En todos los casos se transformaron bacterias *E. coli*, se procedió a la extracción del ADN plasmídico (Wizard Plus SV Minipreps, PureYield™ Plasmid Midiprep y Maxiprep, Promega) a la cuantificación en el



espectrofotómetro ( $A_{260/280}$  nm). Aquellos clones de secuencia correcta se almacenaron en presencia de glicerol al 15%, a  $-80^{\circ}$  C.

### **8. Introducción de ADN exógeno en las células de mamífero**

Según las líneas celulares se usaron diferentes métodos de transfección. Las líneas COS7 y HEK 293T se transfectaron por lipofección mediante Lipofectamina 2000™ (Invitrogen) siguiendo el protocolo comercial. La transfección se realizó en células que hubieran alcanzado una confluencia del 70-80%, en placas de 100 mm. La mezcla consistió en 15  $\mu$ g de ADN por placa y 30  $\mu$ l/placa de lipofectamina en 1500  $\mu$ l de medio OPTI-MEM (GIBCO). Tras incubar la mezcla durante 20 minutos a temperatura ambiente se añadió a las células. Pasadas 4 horas se cambió el medio de cultivo a DMEM. Las células y el medio se recogieron a las 24 horas.

Las células MEF se transfectaron por lipofección utilizando el producto comercial o Xfect™ (Clontech). Para la transfección se mezclaron 30  $\mu$ g del vector pCre-IRES-Puro<sup>R</sup> con 0.3  $\mu$ l/  $\mu$ g del polímero Xfect. Tras incubar la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente se añadió a las células. Pasadas 4 horas se cambió el medio de cultivo a DMEM. Las células se trataron con 1.5  $\mu$ g/ml de puomicina a las 48 horas, durante 4 días.

Las células en suspensión, HEK 293GnT I, se transfectaron utilizando el polímero PEI (Polyethylenimina, Invitrogen). La mezcla de transfección consistió en 10  $\mu$ g/ml de ADN y 40  $\mu$ g/ml de PEI en medio



Hybridoma SFM (Invitrogen). Tras alcanzar una densidad celular de  $1.5 \times 10^6$  células/ml se añadió la mezcla a la suspensión celular. El medio se recogió a los 2 días post transfección.

### **9. Purificación de jerdostatina recombinante**

La obtención de homogeneizados a partir de células de mamífero adherentes se llevó a cabo añadiendo, a placas de 100 mm mantenidas en hielo, tampón de lisis [10 mM Tris-HCl pH 7.5, 15 mM EDTA pH 8, 0.6 M de sacarosa, 50 mM NaF, 5 mM  $\text{Na}_2 \text{P}_2\text{O}_7$ , 1 mM PMSF, 15 mM de 2-mercaptoetanol e inhibidores de proteasas (complete EDTA-free, Roche)]. Los lisados se retiraron con un rascador y se homogeneizaron con una jeringuilla de 25G-0.5 x16 mm. Tras centrifugar 30 minutos a 13000 rpm, se recogió el sobrenadante. Los medios recogidos se concentraron por ultrafiltración en membranas de tamaño de poro de 10 kDa a 4° C.

Por otro lado, tres días después de la transfección, las células crecidas en suspensión se centrifugaron durante 5 minutos a 800 rpm. Posteriormente, al sobrenadante se le añadió una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete EDTA free, Roche) y se concentró por ultrafiltración en membranas de celulosa de tamaño de poro de 3 kDa (Millipore) a 4° C. La cuantificación de proteínas se realizó midiendo la absorbancia a 280, tomando como coeficiente de extinción 1.4 (absorbancia de un mg/ml).



Jerdostatina unida a Flag (N-terminal) se purificó mediante cromatografía de afinidad, utilizando la resina ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel (Sigma-aldrich). Esta resina consiste en un anticuerpo monoclonal IgG (Anti-Flag) covalentemente unido a agarosa. El método de unión entre la resina y la muestra es por absorción. Siguiendo las indicaciones de la casa comercial, muestra y resina se dejaron uniendo durante toda la noche en la noria a 4° C. La elución se produjo en condiciones de pH ácido (0.1 M Glicina- HCl, pH 3.5). Las fracciones eluidas se neutralizaron inmediatamente con Tris 1 M pH 8.0.

## 10. Análisis de proteínas

### 10.1. Western blot y dot blot

- *Western blot* (Capítulo I material y métodos, apartado 9.1)

Las proteínas se analizaron por SDS-PAGE, Tris-Tricina, en condiciones reducidas utilizando geles de poliacrilamida al 12%. Generalmente, se cargaron entre 15-40 µg de los extractos celulares y entre 1 µg-500 ng de las fracciones obtenidas durante la purificación. La transferencia se realizó a una membrana de PVDF empleando un sistema "Semidry" durante dos horas a 200 mA. El bloqueo de la membrana se realizó en leche desnatada al 5% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación o a 4° C toda la noche.

La inmunodetección se realizó con el anticuerpo especificado en cada caso (Tabla 8 y 9). Los anticuerpos se diluyeron en leche desnatada



al 5% en PBS, en las condiciones que se indican en la tabla. Tras la incubación con el anticuerpo, la membrana se lavó con PBS-T tres veces, 5 minutos cada una. La reacción quimioluminiscente se detectó utilizando el reactivo comercial ECL Plus (Amersham Biosciences). El revelado y análisis de la señal luminiscente se realizó mediante el sistema LAS 3000 (Fujifilm).

➤ *Dot blot*

Este método permite determinar de forma sencilla la presencia/ausencia de la proteína recombinante de interés, tanto en el medio como en el homogeneizado celular. Una gota de 5-10  $\mu\text{l}$  ( $\sim 1 \mu\text{g}$ ) de muestra se aplicó directamente sobre la membrana de PVDF. Posteriormente, se bloqueó la membrana en leche desnatada al 5% en PBS durante 1 hora. La presencia de las proteínas recombinantes se realizó por inmunodetección siguiendo el mismo protocolo que para un *Western Blot*.

### **10.2. Identificación por espectrometría de masas**

Tras la separación electroforética SDS-PAGE y tinción con Coomassie, se recortaron las bandas de interés y se digirieron con tripsina pancreática porcina (Promega). El digerido obtenido se mezcló con la matriz alfa-ciano 4-hidroxicinámico y se procedió al análisis de los péptidos trípticos por espectrometría de masas MALDI-TOF (Applied Biosystems Voyager-DE Pro™). Los iones doblemente o triplemente cargados de los péptidos seleccionados a partir de la huella peptídica





fueron analizados por disociación inducida por colisión, CID-MS/MS mediante el analizador de masas de triple cuadrupolo y trampa iónica lineal QTrap 2000 (Applied Biosystems). Los espectros se interpretaron manualmente o mediante el programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) frente a la base de datos SwissProt/TrEMBL.

### **11. Ensayo de actividad de jerdostatina recombinante**

Siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (Capítulo I material y métodos, apartado 10.1) se estudió la unión de la proteína recombinante jerdostatina a la integrina  $\alpha_1\beta_1$  soluble en un ensayo tipo ELISA y se analizó la capacidad de inhibición de r-jerdostatina en la unión  $\alpha_1\beta_1$  a CB3.

También se realizó un estudio *in vitro* de la adhesión celular en presencia de r-jerdostatina utilizando células RuGli, línea celular procedente de glioblastoma de rata, siguiendo el protocolo descrito en el capítulo I (material y métodos, apartado 10.2).



## 12. Generación de la línea transgénica B6; 129P2-Tg(ROSA) 26Sor<sup>tm1(EGFP,Jerdostatina)</sup>Upme.

### 12.1. Diseño y clonación

Para la generación de un ratón modificado genéticamente de tipo "knock-in" es necesario un vector que permita la introducción dirigida del gen de interés por recombinación homóloga en el locus *ROSA26*, un marcador de selección positiva que permita identificar y seleccionar aquellas células que han incorporado el vector en su genoma (expresión de GFP y resistencia a neomicina) y un sistema para la expresión condicional de la proteína transgénica (sistema Cre/LoxP). Con este propósito se utilizaron los vectores pBIGT y pROSA26PA.

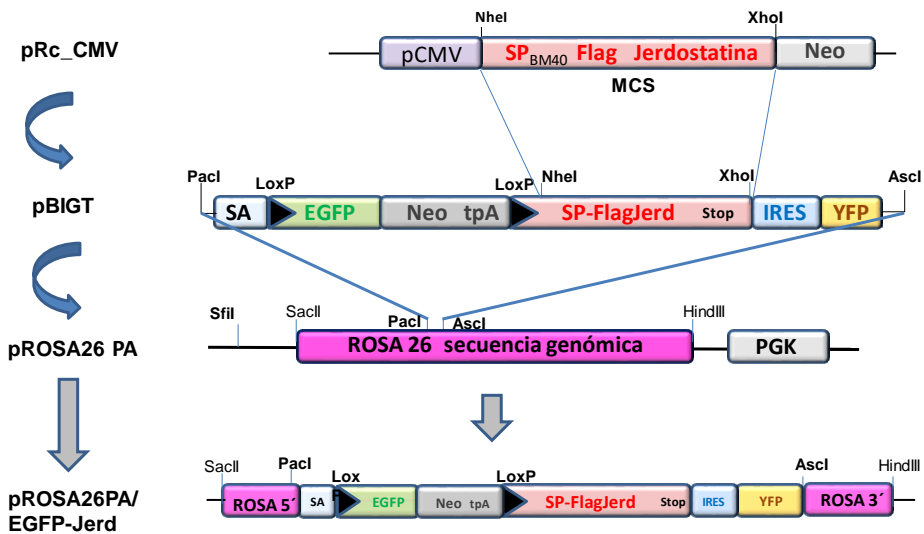
Una vez probada la capacidad de expresión *in vitro* en células de mamífero de jerdostatina recombinante, el sitio de clonaje múltiple del vector pRC\_CMV/SP<sub>BM40</sub>-Flag-Jerdostatina se subclonó en el vector pBIGT tras la escisión con los enzimas NheI y XhoI. El vector pBIGT contiene una región flanqueada por los sitios loxP que codifica para EGFP, neomicina y una secuencia de parada transcripcional (TpA), tras este casete se encuentra insertada la secuencia que codifica para SP<sub>BM40</sub>-FLAG-Jerdostatina (Anexo II).

El vector pROSA26PA contiene fragmentos de las secuencias homólogas (brazos 5' y 3') del locus *ROSA26* del ratón. Tras la escisión con los enzimas de digestión PacI y AscI, el vector pBIGT resultante anterior, se subclonó en el vector pROSA26PA (Anexo III). El vector



## Material y Métodos

resultante pROSA26PA/EGFP-Jerd posee la capacidad de insertarse en el locus *ROSA26* de ratón por recombinación homóloga y, por lo tanto, una vez insertado el transgén, todos los clones, embriones y ratones con este alelo transgénico mostrarán fluorescencia verde en todas sus células, sin embargo, hasta que no se produzca la escisión del casete flanqueado por los sitios LoxP, no se expresará jerdostatina (Figura 44).



**Figura 44.** Representación esquemática de las subclonaciones realizadas para obtener el vector pROSA26PA/EGFP-Jerd.

### 12.2. Introducción de ADN exógeno y selección

La introducción del ADN plasmídico en las células madre embrionarias de ratón de la cepa 129/Sv agutí (ES CK35) se realizó por electroporación.



Las células ES CK35 se crecieron sobre MEFs inactivadas con mitomicina C. Tres horas antes de proceder a la electroporación se cambió el medio de crecimiento de las células ES. Las células se lavaron con un tampón hipoosmolar (Hypoosmolar Electroporation Buffer, Eppendorf) y se centrifugaron a 800 rpm durante 5 minutos. El precipitado celular se resuspendió en tampón hipoosmolar, a una concentración de  $1 \times 10^7$  células/ml. El ADN plasmídico ( $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), previamente digerido con el enzima de restricción Sfil, purificado y precipitado, se resuspendió en tampón isoosmolar (Isoosmolar Electroporation Buffer, Eppendorf) y se mezcló con la suspensión celular. La mezcla se transfirió a las cubetas (4mm, Eppendorf) para su electroporación. Se realizó un pulso a 300 V, 500  $\mu\text{s}$ , en el electroporador para células eucariotas (Multiporator®, Eppendorf) seguido de 5-10 minutos en reposo. Las células electroporadas se cultivaron en placas de 100 mm, a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/placa, sobre una capa de MEFs inactivadas y resistentes a neomicina.

La recombinación homóloga es menos frecuente que la no homóloga. Por esta razón, se requieren métodos de escrutinio que permitan seleccionar las células en cuyos genomas la construcción génica se ha integrado correctamente. El vector de expresión contiene en su secuencia el gen de resistencia a neomicina ( $\text{neo}^R$ ) y el gen que codifica para la proteína verde fluorescente (EGFP) para la selección de aquellas células ES que han integrado el inserto por medio de recombinación homóloga y no al azar.



Así, al día siguiente de la electroporación se comenzó la selección por antibiótico, en este caso 400  $\mu\text{g/ml}$  de G418 (Neomicina, Sigma) durante 7 días. Las células que sobrevivieron, formando colonias individuales, se recogieron bajo el microscopio óptico y se crecieron de forma individual en placas de 96 pocillos sobre gelatina 0.1%. Estas colonias se analizaron para observar la expresión de la proteína verde fluorescente en cultivo bajo el microscopio invertido Leica DM IRE2 con equipo de epi-iluminación EL6000, acoplado a una cámara digital leica DFC 280, utilizando un filtro de excitación BP 470/40. Aquellos clones resistentes a neomicina y que expresaban GFP, se amplificaron de forma individual y se almacenaron en nitrógeno líquido.

### 12.3. Análisis del ADN transgénico

#### 12.3.1. Extracción de ADN

➤ *A partir de células ES*

Las células se crecieron hasta confluencia en placas recubiertas de gelatina (0.1%) y se tripsinizaron. Para disgregar las células, se pipeteó varias veces hasta obtener una suspensión homogénea. Las células se lavaron con PBS, se centrifugaron durante 5 minutos a 800 rpm y se eliminó el sobrenadante. Al precipitado celular se le añadió tampón de lisis (100 mM de Tris pH 8.5, 5 mM EDTA pH8, 0.2% de SDS, 200 mM NaCl) y 100  $\mu\text{g/ml}$  de proteinasa K (Roche) y se incubó toda la noche a 55° C. Posteriormente se precipitó el ADN con fenol/cloroformo para evitar la presencia de proteínas contaminantes. El lisado se agitó mecánicamente



durante 5 minutos y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos. Tras separar el sobrenadante se le añadió 1 volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). La mezcla se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min y se recuperó la fase acuosa. A continuación, se agregó 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), tras mezclar y centrifugar se recuperó la fase acuosa. Finalmente, se precipitó el ADN con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M, pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol absoluto, se centrifugó a máxima velocidad durante 15 minutos y se aspiró el sobrenadante. El exceso de sales se eliminó añadiendo 1 volumen de etanol al 70% al ADN precipitado. La mezcla se centrifugó a máxima velocidad durante 5 minutos, se dejó secar al aire y se resuspendió en TE (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA). El ADN precipitado se conservó a 4° C previo a su uso.

➤ *A partir de las colas de ratón*

Las muestras de ADN fueron obtenidas a partir de biopsias de cola de aproximadamente 2-3 mm de las crías (8-10 días de edad). A este fragmento se le añadió tampón de lisis y se incubó durante toda la noche a 55° C. Al día siguiente, se añadieron 0.7 volúmenes de isopropanol y 1/10 de acetato de sodio 3M, pH 5.2. Se agitó durante 5 minutos por volteo y se centrifugó a 13,000 rpm 5 minutos. El sobrenadante se aspiró por vacío y el precipitado se lavó 2 veces con 70% de etanol. Tras el último lavado se aspiró el sobrenadante por vacío y el precipitado se dejó secar al aire. El ADN precipitado se resuspendió en tampón TE. Finalmente se guardó a 4° C para su conservación.



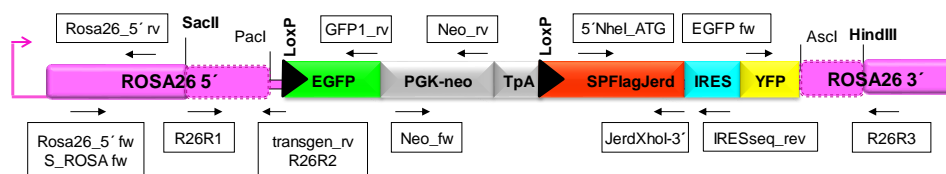
## Material y Métodos

### ➤ *A partir de tejido*

Los tejidos de ratón fueron congelados en nitrógeno líquido. Se seccionó una parte que se incubó con tampón de lisis toda la noche a 55° C. Posteriormente se precipitó el ADN con fenol/cloroformo. El ADN precipitado se resuspendió en TE y se cuantificó.

### 12.3.2. PCR

A partir del ADN extraído se llevaron a cabo una serie de PCRs para comprobar la presencia de las secuencias génicas insertadas, utilizando una combinación de cebadores específicos (21-35) (tabla 7) (Figura 45).



**Figura 45.** Localización de los cebadores utilizados en las reacciones de PCR. En el alelo transgénico, la zona del locus homóloga perteneciente al vector pROSA26PA se encuentra indicada en cursiva.

Para amplificar los fragmentos de ADN se realizó una PCR convencional (Capítulo I, metodología apartado 6). También se utilizaron algunas variantes, como la PCR- “touch down” (PCR-TD) o la PCR “hot start” (PCR-HS). La PCR-TD aumenta la especificidad de la reacción utilizando temperaturas más altas en los primeros ciclos y aumenta la eficiencia mediante la reducción de la temperatura de hibridación a lo largo del proceso. Para esta reacción se utilizó la polimerasa comercial GO



Taq Flexi (Promega). La reacción de PCR-HS consiste en la inactivación de la polimerasa hasta el ciclo inicial de desnaturalización. Esta PCR elimina los productos de amplificación inespecíficos generados durante la configuración de la reacción y la iniciación, y aumenta la eficacia de la reacción global. Para esta reacción se utilizó la polimerasa comercial KAPA HiFi HotStart (KAPABiosystems).

**Tabla 10.** Componentes de la reacción de PCR

PCR-TD			PCR-HS		
Componentes	( $\mu$ l)	Concentración final	Componentes	( $\mu$ l)	Concentración final
Tampón 5X GC	4	1X	Tampón 5X GC	4	1X
MgCl <sub>2</sub> 25mM	1.2	1.5mM			
dNTPs 10 mM	0.4	0.2 mM	dNTPs, 10 mM	0.6	0.3 mM
cebador3' 10 $\mu$ M	0.4	0.2 $\mu$ M	cebador 3' 10 $\mu$ M	0.6	0.3 $\mu$ M
cebador5' 10 $\mu$ M	0.4	0.2 $\mu$ M	cebador 5' 10 $\mu$ M	0.6	0.3 $\mu$ M
ADN molde	-	50-500ng	ADN molde	-	50-500ng
DMSO	1	5%	DMSO	1	5%
ADN Polimerasa (5U/ $\mu$ l)	0.3	1.5 U	ADN Polimerasa (1U/ $\mu$ l)	0.4	0.4 U
Agua estéril MilliQ	hasta 20 $\mu$ l				





**Tabla 11.** Proceso de amplificación de ADN por PCR-TD

<b>Pasos</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización inicial	4 min	95° C	1
Desnaturalización	30 s	95° C	
Alineamiento	30s	más alta	5
Elongación	1min/kb	72° C	
Desnaturalización	30 s	95° C	
Alineamiento	30s	más alta (-0. 5° C)	20
Elongación	1min/kb	72° C	
Desnaturalización	30 s	95° C	
Alineamiento	30s	más baja	10
Elongación	1min/kb	72° C	
Elongación final	7 min	72° C	1
Conservación		4° C	

**Tabla 12.** Proceso de amplificación de ADN por PCR-HS

<b>Pasos</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización inicial	3 min	95° C	1
Desnaturalización	20s	98° C	
Alineamiento	15s	65° C	30
Elongación	15sec/kb	72° C	
Elongación final	5min	72° C	1
Conservación		4° C	



### 12.3.3. Southern blot

Esta técnica permite la identificación de secuencias concretas de ADN, utilizando sondas de ADN específicas.

➤ Diseño de la sonda de ADN

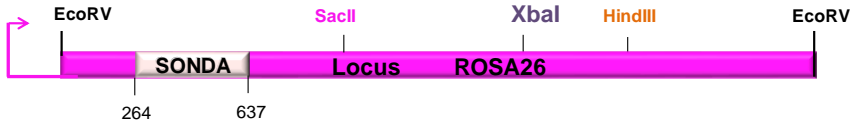
La sonda debe permitir, tras la escisión con endonucleasas del ADN genómico, determinar la correcta inserción del transgén. Para poder distinguir entre un genotipo silvestre, otro donde no se ha producido una correcta recombinación y el genotipo transgénico, esta sonda de ADN ha de ser complementaria a la secuencia del locus *ROSA26* (cromosoma 6) del genoma del ratón y a la vez, situarse fuera del inserto transgénico.

Con este fin se diseñó una sonda externa en el extremo 5' del locus *ROSA26*, de 373 nucleótidos. La sonda se amplificó por PCR a partir del ADN genómico de ratón, utilizando los pares de oligonucleótidos S\_Rosa fw (36) y S\_Rosa rv (37), siguiendo un programa de PCR convencional. Posteriormente se clonó en el vector pGEM-T.

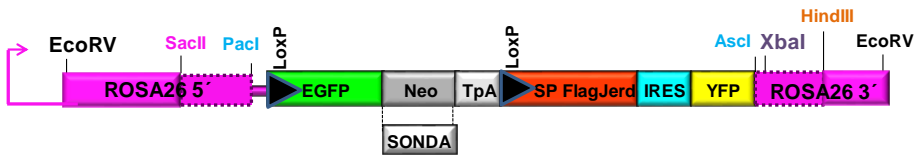
Por otra parte, se diseñó una sonda interna correspondiente a la secuencia de Neomicina (497 nucleótidos) perteneciente al vector pROSA26, mediante los oligonucleótidos 31 y 32 (tabla 7). Esta sonda nos permitió diferenciar entre genotipos transgénico y silvestre en ratón.



### Sonda externa



### Sonda interna



**Figura 46.** Localización de las sondas de ADN. En el alelo transgénico, la zona de homología perteneciente al vector pROSA26PA se encuentra indicada en cursiva.

#### ➤ Digestión y purificación del ADN

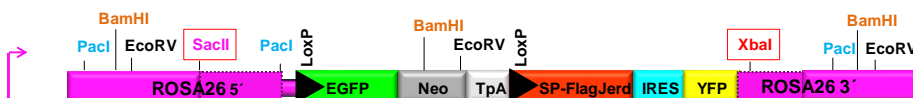
A partir de las secuencias conocidas de los vectores y de la secuencia del locus *ROSA26* del genoma de ratón depositado en el GenBank, (NCBI GenelD:14910) se seleccionaron aquellos enzimas de restricción que, mediante las sondas de ADN, permitiesen comprobar la correcta recombinación en el locus y diferenciar entre el genotipo silvestre y transgénico (Figura 47 y tabla 13).



ratón silvestre locus Rosa26



ratón transgénico locus Rosa26



**Figura 47.** Localización de los enzimas de restricción Pacl, BamHI, EcoRV, SacII y XbaI, tanto en el genoma del ratón silvestre como en el transgénico.

**Tabla 13.** Listado de los enzimas de restricción seleccionados del locus Rosa26 para la sonda externa.

ENZIMA	ratón silvestre			ratón transgénico		
	Nº de cortes	Localización (pb)	Fragmento reconocido por la sonda (pb)	Nº de cortes	Localización (pb)	Fragmento reconocido por la sonda (pb)
<b>EcoRV</b> (gat/atc)	2	3691, 15208	11517	3	3691,8486, 20628	4795
<b>Pacl</b> (ttaat/taa)	2	2609, 10530	7921	3	2609,5981, 15958	3372
<b>BamHI</b> (g/gatcc)	2	845, 6671	6671	3	6020,12074, 15681	6054

En cada caso, se digirieron 10 µg de ADN genómico en 200 µl de mezcla de reacción de digestión durante toda la noche a la temperatura recomendada por la casa comercial (Fermentas, Promega).



## Material y Métodos

---

A la mezcla de digestión se le añadió 2.5 volúmenes de etanol absoluto o 0.7 volúmenes de isopropanol y 1/10 v/v de acetato de sodio 3M pH 5.2 y se centrifugó a 10,000 rpm. El precipitado se lavó 2 veces con etanol al 70% a temperatura ambiente. Tras dejar secar el precipitado a temperatura ambiente, se resuspendió el ADN en agua, en el volumen suficiente para ser directamente cargado en los pocillos del gel de agarosa.

- Electroforesis y transferencia (Brown, 2001).

Con el fin de separar los fragmentos de ADN genómico de acuerdo a su tamaño tras la digestión, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio, a 70V durante 160 minutos en tampón TBE. Tras la electroforesis se tomó una foto bajo la luz U.V. El gel de agarosa fue tratado durante 15 min con 0.2 M de HCl en un proceso denominado depurinización necesario para la transferencia de fragmentos de ADN de un tamaño superior a 5 Kb.

Posteriormente se procedió a la desnaturalización empapando el gel de agarosa en una solución que contiene 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl durante 30 minutos, seguida de una solución de neutralización (0.5 M Tris pH 7.2, 3 M NaCl) durante 30 minutos. El gel se lavó con SCC 20X (300mM Citrato tri-sódico 2H<sub>2</sub>O, 3M NaCl, pH7-8) previo a su transferencia a membrana.

Se realizó una transferencia alcalina inversa en tampón SCC 20X durante toda la noche a una membrana de nylon cargada (Amersham Hybond-N+).



Tras la transferencia, la membrana se lavó en 2X SSC y se dejó secar al aire sobre papel de filtro Whatman.

➤ Fijación e hibridación

El ADN transferido se fijó a la membrana de nylon bajo una fuente de U.V. de 70mJ durante 1-2 minutos (Biolink DNA Crosslinker, Biometra.). Posteriormente se efectuó la pre-hibridación incubando la membrana con la solución de hibridación o tampón de Church (0.5M de tampón fosfato, pH 7.2; 10 mM EDTA, pH 8.0; 7% SDS) previamente calentada a 68° C en un horno con rotor (ProBlot™ 12 Hybridization Oven, Labnet) entre 1-2 horas.

Las sondas se marcaron con digoxigenina mediante el kit de Roche "PCR DIG synthesis" siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Este método de marcaje permite generar sondas altamente sensitivas marcadas con DIG-dUTP en una reacción de PCR y detectar secuencias diana que se encuentran en bajo número de copias dentro del genoma e incluso una sola copia de un gen. Los fragmentos marcados sufren un retroceso en su movilidad electroforética respecto a los no marcados, para comprobar el marcaje se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Una vez comprobado, el producto de PCR se utilizó directamente como sonda de hibridación.

La hibridación se realizó a 68° C durante toda la noche en un horno con rotación. Se añadió 0.2 ml de solución de hibridación Church por cm<sup>2</sup> de membrana y 2 µl de sonda marcada por ml de solución de hibridación.



## Material y Métodos

---

La sonda marcada se desnaturalizó calentándola durante 5 minutos a 100° C, se diluyó en TE, y tras enfriar rápidamente en hielo se añadió a la solución de hibridación previamente calentada a 68° C.

➤ *Lavados post-hibridación y detección de la sonda*

Se realizaron dos lavados de 5 minutos a temperatura ambiente con 2xSSC, 0.1% SDS, seguidos de 2 lavados de 20 minutos con 0.1xSSC, 0.1%SDS a 68° C en el horno.

Para la detección, la membrana hibridada con la sonda marcada con digoxigenina se lavó en el tampón de lavado [0.3% (v/v) de Tween 20 en tampón maleico (0.1M ácido maleico, 0.15M de NaCl), pH 7.5], durante 2 minutos a temperatura ambiente. La membrana se bloqueó durante 1 hora en la solución de bloqueo que contiene 10 gramos del agente bloqueante comercial del Kit "DIG-luminescent detection for nucleic acids" (Roche) disueltos en 100 ml de tampón maleico. Tras el bloqueo se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo policlonal de oveja anti-digoxigenina-AP (Fragmento Fab conjugado con fosfatasa alcalina) diluido 1/10.000 en la solución de bloqueo. Posteriormente se realizaron dos lavados en tampón de lavado de 15 minutos cada uno y se equilibró en tampón de detección (0.1 M Tris-Cl, 0.1 M NaCl, pH 9.5) durante 2-5 minutos a temperatura ambiente. La membrana se colocó sobre un plástico y se añadieron 20 gotas de CDP (Roche), sustrato quimioluminiscente (C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>2</sub>P) para la fosfatasa alcalina que genera una señal luminiscente. La membrana se incubó con el sustrato quimioluminiscente CDP durante 5 min a temperatura



ambiente y en oscuridad. Se eliminó el exceso de líquido y se procedió a su revelado.

➤ *Revelado y análisis de imágenes*

El revelado fotográfico de la señal luminiscente se realizó mediante dos sistemas: el sistema LAS 3000 (Fujifilm) que permite la detección, captura y análisis de imágenes quimioluminiscentes y mediante el sistema tradicional de auto-radiografía, en el que la membrana se expuso a diferentes tiempos: 30 minutos, 1 hora, 2 horas, bajo una placa fotográfica (Amersham® Hyperfilm® ECL™, GE Healthcare) en oscuridad. La placa se reveló en el procesador-revelador fotográfico Curix 60 (AGFA) y sobre ella se procedió a la identificación de las diferentes bandas.

### **12.4. Recuento de cromosomas**

Las células madre pueden sufrir alteraciones cromosómicas al multiplicarse en cultivo. Las células aneuploides pueden dar lugar a quimeras, pero su material genético rara vez se transmite a través de la línea germinal. Por lo tanto, solamente serán inyectados aquellos clones con el 75% de células euploides ( $2n=40$  cromosomas).

Para comprobar que no se han producido dichas anomalías, los clones de células ES transgénicas fueron analizadas contando el número de cromosomas, y sólo aquellas con el número correcto se microinyectaron en los blastocistos. Para el recuento de cromosomas se realizaron los siguientes pasos:





## Material y Métodos

---

### ➤ *Tratamiento de las células*

El día anterior al contaje, se diluyó (1:2) una placa de 35 mm con células ES al 70% de confluencia. 3- 4 horas antes de empezar, se cambió el medio para que las células estuvieran creciendo activamente. Las células se disgregaron con tripsina y se centrifugaron a 800 rpm durante 5 minutos. El sedimento celular se resuspendió y se añadieron, primero, 3 ml y después 2 ml de KCl 75 mM, poco a poco y agitando lentamente. La mezcla se incubó a 37° C durante 15 minutos.

### ➤ *Fijación y extensión*

Se añadieron 3 gotas de metanol:ácido acético glacial (3:1). Tras centrifugar a 800 rpm durante 5 min se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió con 3 ml de fijador y se guardó toda la noche a 4° C. Al día siguiente las células se centrifugaron en las mismas condiciones descritas anteriormente y se realizaron 3 lavados añadiendo 5 ml de fijador por cada lavado.

Se extendieron aproximadamente 20-30  $\mu$ l de muestra por el portaobjetos longitudinalmente. Tras esperar unos segundos se colocaron sobre vapor de agua hirviendo durante 30-40 segundos y se dejaron secar al aire. Las células se observaron bajo el microscopio de contraste de fases y a pocos aumentos para comprobar si la densidad celular era la correcta y se encontraban en metafase.



### ➤ *Tinción Giemsa y recuento*

El tampón de tinción contiene 3 ml del tinte Giemsa (GIBCO), 48,5 ml de tampón Gurr's 6.8 (GIBCO) y 1ml de acetona. Los portaobjetos se dejaron 5 minutos tiñendo, se lavaron con el tampón de Gurr's y se dejaron secando al aire.

Se contaron aproximadamente entre 30 y 50 células en metafase. Aquellos clones en los que el 75% de metafases tenía 40 cromosomas, se consideraron como clones euploides y se conservaron en nitrógeno líquido.

## **12.5. Microinyección e implantación**

Una vez identificados los clones de ES que portan el gen insertado correctamente, el siguiente paso es la producción de embriones quiméricos por medio de la inyección de las células ES seleccionadas (entre 10 y 20 células) en la cavidad de un blastocisto de la cepa C57Bl/6J01a Hsd.

El clon seleccionado (c18) se creció en una placa de 35 mm con MEFs inactivadas. El medio de cultivo se cambió 2-3 horas previas a la microinyección para favorecer el crecimiento activo celular. Tras tripsinizar, las células se centrifugaron y se resuspendieron en 2 ml de medio ES; luego, se pasaron a una nueva placa donde se incubaron durante 20 minutos a 37° C y 5% CO<sub>2</sub>. Este paso permitió que las células MEFs se adhiriesen de nuevo. De esta forma, tras la incubación se recogió el sobrenadante que contenía principalmente células ES, se centrifugó a



## Material y Métodos

---

900 rpm durante 5 minutos y el precipitado celular se resuspendió en 350  $\mu$ l de medio de inyección (medio ES que contiene 20 mM Hepes) en hielo.

Los blastocistos se obtuvieron del útero de una hembra de 3.5 dpc. Este proceso implica la superovulación de la hembra donante de blastocisto con una inyección intraperitoneal de 7.5 UI de gonadotropina sérica equina y 7.5 UI de gonadotropina coriónica humana, inmediatamente, esta hembra se cruzó con un macho de la misma línea (C57Bl/6J01a Hsd), pues las líneas consanguíneas favorecen el crecimiento de las células ES inyectadas.

Los blastocistos recolectados se incubaron en medio M2 (Millipore), a temperatura ambiente hasta su microinyección. Se realizaron 4 sesiones de microinyección de células ES en blastocistos. Para cada sesión se emplearon aproximadamente 10-20 blastocistos, en los que se inyectaron 8-15 células a cada uno. Los embriones manipulados se implantaron en el útero de una hembra receptora pseudogestante CD-1. La microinyección e implantación lo llevó a cabo el Servicio de transgénesis y biología reproductiva del Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV-CSIC).

### **12.6. Identificación de ratones transgénicos**

Como consecuencia de la introducción de las células ES en estadios multicelulares del embrión (blastocisto) se obtienen quimeras (o animal fundador) en las cuales sólo una parte de sus células (las procedentes del cultivo ES) portarán el transgén. El ratón fundador es



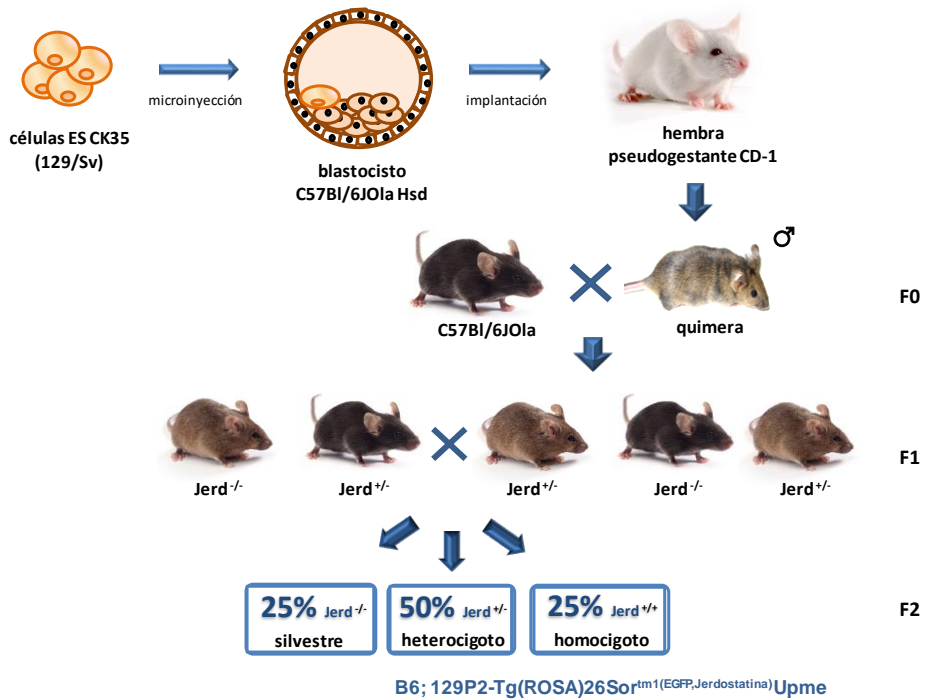
heterocigoto para el locus transgénico, tan solo posee una copia de dicho gen. Estos animales quiméricos se distinguen del resto porque tienen dos colores en su pelaje, las células que provienen de la línea de ES CK35 (deriva de ratones 129/Sv) son de color agutí y las que resultan del blastocisto (línea C57Bl/6J Ola Hsd) serán negras.

Solamente en el caso de que las células transgénicas hayan colonizado las gónadas se consigue la transmisión a la descendencia y por tanto, todos los animales que descendan de un mismo fundador compartirán el mismo transgén (o locus transgénico), generando la línea transgénica B6; 129P2-Tg(ROSA) 26Sor<sup>tm1(EGFP,Jerodostatina)</sup>Upme, llamada Tg Jerd.

Para comprobar que el alelo transgénico se transmite a la línea germinal, los machos quimera (F0) que expresan un color quimérico mayor al 25% (agutí /C57Bl), se cruzaron con hembras de la cepa C57Bl/6JOla Hsd. Tras el éxito de la introducción en la línea germinal, entre la descendencia (F1) se encontraron individuos heterocigotos. Posteriormente, estos animales heterocigotos fueron cruzados entre sí en busca de una progenie homocigótica (Figura 48).



## Material y Métodos



**Figura 48.** Esquema para la obtención de la línea germinal transgénica B6; 129P2-Tg(ROSA)26Sor<sup>tm1</sup>(EGFP,Jerdostatina)Upme.

La presencia del transgén en la línea germinal se analizó por medio de diferentes técnicas:

- Southern blot

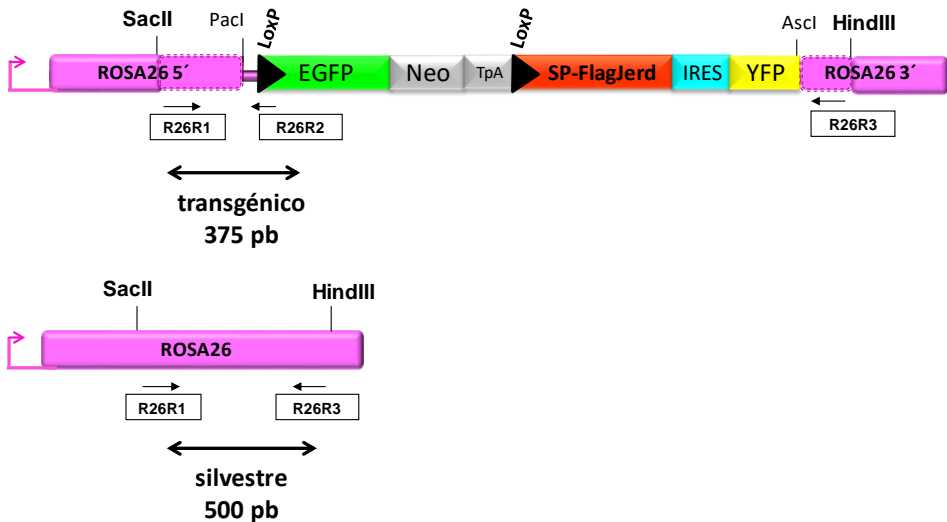
En este caso a partir de las sondas interna y externa que nos permitió distinguir entre ratones silvestres y los portadores del transgén.

- PCR: genotipado

Se evalúa la presencia o ausencia del locus transgénico en el ADN de los ratones. Como se ha comentado previamente, la técnica por



excelencia es la PCR. El genotipado se realizó a partir de ADN obtenido de la punta de la cola del ratón utilizando los cebadores específicos R26R1, R26R2, R26R3 (tabla 7) que permiten discernir entre un ratón transgénico y silvestre.



**Figura 49.** Esquema de la localización de los cebadores y el tamaño del amplicón resultante tras la PCR.

### ➤ Expresión de GFP

Se extrajeron embriones E12.5 a partir del cruce de hembras y machos heterocigotos. Los embriones se lavaron con PBS y el saco vitelino se conservó para el genotipado por PCR. Tras el lavado se fijaron en PFA 4% durante 3h y se observaron bajo una lupa binocular estereoscópica AxioZoom V16 de Zeiss.

También se analizó la expresión de EGFP a partir de tejidos de embriones de 10 días que por PCR y Southern blot, habían demostrado la



## Material y Métodos

---

presencia del locus transgénico. Una parte del tejido se homogeneizó mediante un embolo en tampón de lisis que contiene: 0.5% CHAPs, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ , 1 mM EDTA, 10% glicerol, 5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 0.1 mM PMSF y un coctel de inhibidores de proteasas (Complete-EDTA free, Roche). El lisado se incubó en hielo durante 30 minutos, agitando 10-15 segundos cada 10 minutos. Después de centrifugar 20 minutos a 13000 rpm a 4° C, se recogió el sobrenadante y se analizó la presencia de GFP mediante Western blot.

Otra parte del tejido se congeló por inmersión directa en el líquido crioprotector O.C.T. (*Optimal Cutting Temperature*). Las muestras congeladas se cortaron con el criostato, realizando cortes de 0.2  $\mu\text{m}$  y se fijaron en un portaobjetos para su visualización en el microscopio vertical Leica DM RXA2 con cámara Leica DFC300 FX a color indicada para microscopía de fluorescencia, se utilizó el programa Leica IM50 para la toma y gestión de imágenes.

Del mismo modo, se sacrificaron dos ratones (silvestre y heterocigoto). Los animales fueron fijados por perfusión con 4% PFA a través del ápice del corazón. Rápidamente se extrajo el corazón, riñón, hígado y músculo esquelético, que se conservaron en 4% PFA durante toda la noche. Al día siguiente se pasaron por concentraciones crecientes de sacarosa (10, 20 y 30%) y se congelaron en isopentano/ $\text{N}_2$ . Se realizaron cortes de 10 micras en criostato sobre porta no gelatinizado y se observaron bajo el microscopio confocal (objetivo 20X, 3.6 mseg de exposición).



## **13. Recombinación Cre/loxP**

### **13.1. Recombinación y expresión *in vitro* de células MEF**

#### **13.1.1. Análisis de la recombinación**

Para comprobar que el sistema Cre/loxP funciona correctamente, se realizó la recombinación mediada por Cre de células ES y células MEF de ratón *in vitro*. Se cultivó el clon ES18 transgénico (comprobado por PCR y Southern blot) sobre células MEFs inactivadas. Las células se transfectaron por electroporación con 1 µg/µl del vector pCre-IRES-PuroR que expresa la recombinasa Cre y posee resistencia a puromicina. Las células electroporadas se cultivaron en placas de 100 mm y a las 24 horas se comenzó la selección con puromicina a 0.8 µg/ml, durante 4 días.

Del mismo modo, se extrajeron células MEF de embriones resultantes del cruce de ratones homocigoto TgJerd<sup>+/+</sup>, siguiendo el protocolo ya descrito (apartado 2.2). La transfección con el vector pCre-IRES-PuroR se realizó utilizando el producto Xfect™. Las células se trataron a las 48 horas con 1.5 µg/ml puromicina, durante 4 días.

Se extrajo ADN de las células resultantes de la selección con el antibiótico y se analizó la recombinación por PCR mediante los cebadores 25 y 34 (tabla 7).

#### **13.1.2. Análisis de la transcripción**

Para la extracción de ARN total a partir de células de mamíferos, se utilizó el kit comercial miRNeasy Mini Kit (Quiagen). Se crecieron células





## Material y Métodos

MEF transfectadas en 3 placas de 100 mm, tras la selección con puromicina, se lisaron en 700µl de QIAzol Lysis Reagent (Quiagen). La extracción y purificación del ARN se realizó siguiendo las indicaciones del kit. El ARN precipitado se resuspendió en 20 µl de agua DEPC y se cuantificó. Para comprobar la integridad del ARN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA) de 1µg de ARN.

La generación de ADNc a partir de ARN se realizó mediante la técnica de RT-PCR ("Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction"). Previamente a la transcripción inversa las muestras de ARN (1-2µg) se trataron con ADNasa. Tras el tratamiento, se realizó la RT-PCR (Tabla 14).

**Tabla 14.** Reacción RT-PCR

RT-PCR	
ARN molde	2µg (hasta 4 µg)
Primer oligo (dT) <sub>18</sub> 100µM	1 µl
Agua DEPC	hasta 12 µl
Incubar a 65° C durante 5 minutos. Dejar en hielo.	
5X Buffer	4 µl
Inhibidor Ribolock RNasa (20U/ µl)	1 µl
10mM dNTP	2 µl
Transcriptasa reversa (200U/µl)	1 µl
Volumen final: 20 µl	

La reacción se incubó a 42° C durante 60 minutos. Posteriormente se calentó a 85° C durante 5 minutos. El ADNc se conservó a -80° C.



El ADNc resultante de la reacción se utilizó como molde para amplificar jerdostatina en una reacción de PCR convencional (capítulo I, material y métodos apartado 6) mediante los cebadores 34 y 35 (tabla 7). Como control de la reacción de PCR, se amplificó un fragmento de actina de 350 pb utilizando los cebadores 40 y 41 (tabla7).

### **13.1.3. Análisis de la expresión**

La presencia de Flag-jerdostatina en las células MEF se analizó por cromatografía de afinidad y Western blot. Las células se recogieron en 300  $\mu$ l de tampón de extracción de proteínas y se homogeneizaron (apartado 9). Tras centrifugar 30 minutos a 13000 rpm, se recogió el sobrenadante y el precipitado. Al medio celular se le añadió una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete EDTA free, Roche) y se concentró por ultrafiltración en membranas de celulosa de tamaño de poro de 3 kDa a 4° C. El medio se incubó junto a la resina ANTI-FLAG® M2 toda la noche a 4° C. El homogeneizado celular y las diferentes fracciones fueron analizadas mediante electroforesis Tris-Tricina-SDS seguida de Western blot.

## **13.2. Recombinación en los ratones transgénicos**

### **13.2.1. Modelo de expresión constitutiva**

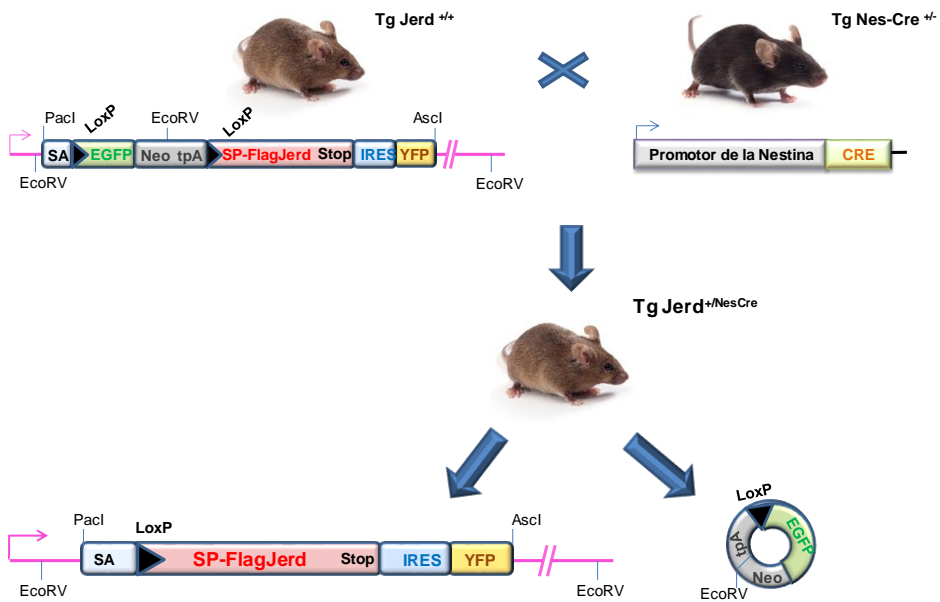
Para el modelo no condicional (constitutiva) de expresión de jerdostatina, se cruzaron ratones homocigotos para jerdostatina (Tg Jerd<sup>+/+</sup>) con ratones heterocigotos de la cepa B6. Cg-Tg(Nes-Cre), que expresan la recombinasa bajo el dominio del promotor de la nestina de forma constitutiva.



## Material y Métodos

La descendencia se genotipó a partir del ADN extraído del saco vitelino, por PCR, utilizando los cebadores específicos 22, 23, 24, 42 y 43 (tabla 7) y se seleccionaron los embriones que contenían ambos transgenes (Tg Jerd<sup>+/NesCre</sup>).

En este modelo constitutivo, durante el desarrollo, se produce la liberación de la recombinasa Cre en el sistema nervioso, que reconocerá específicamente los sitios loxP e iniciará la recombinación (Figura 50).



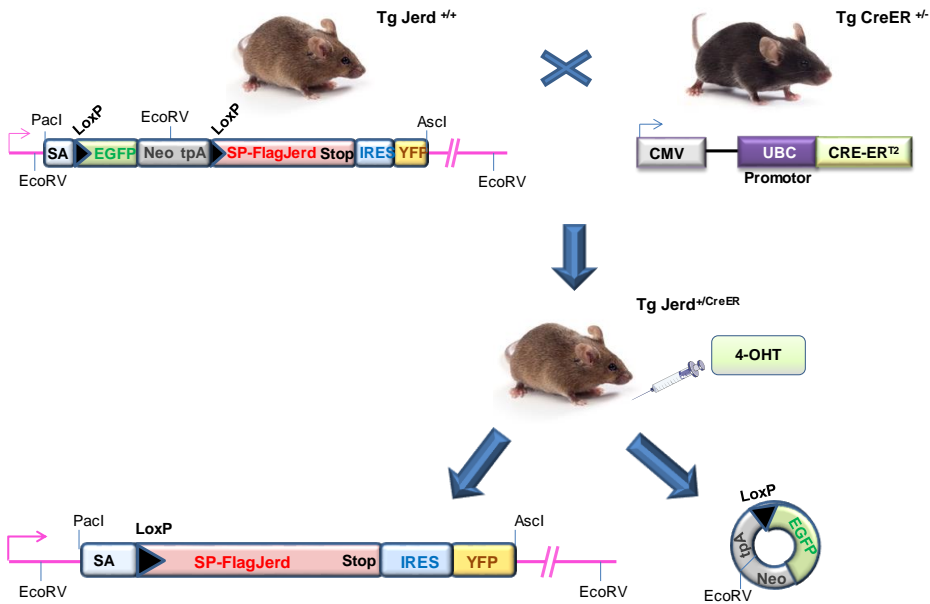
**Figura 50.** Esquema del modelo de expresión constitutiva mediada por Cre.



### 13.2.2. Modelo de expresión condicional

La expresión controlada de jerдостatina se realizó utilizando la cepa de ratón Cre Tg hUBC-CreER<sup>T2</sup>, llamado Tg CreER<sup>T2</sup>, cuya inducción de la actividad específica Cre temporal implica la fusión de la enzima con el receptor de estrógeno humano mutado (ER<sup>T2</sup>). Tras la administración de tamoxifeno se produce la liberación de la recombinasa Cre, que irá al núcleo, reconocerá específicamente los sitios loxP e iniciará la recombinación.

En este modelo, se cruzaron ratones transgénicos homocigotos para jerдостatina (Tg Jerd<sup>+/+</sup>) con ratones heterocigotos transgénicos para Cre (Tg CreER<sup>+/-</sup>). La descendencia se genotipó a partir del ADN extraído de la cola, por PCR, utilizando los cebadores específicos 22, 23, 24, 44 y 45 (tabla 7) y se seleccionaron los ratones que contenían ambos transgenes (Tg Jerd<sup>+/-CreER</sup>). Posteriormente, a las 8-10 semanas de edad, 4 machos y 8 hembras Tg Jerd<sup>+/-CreER</sup> fueron tratados una vez al día, durante 5 días, con 2 mg de tamoxifeno (Sigma-Aldrich, T5648) en aceite de maíz (Sigma) inyectado vía intraperitoneal (grupo PCT). Como grupos control se utilizaron 3 machos y 4 hembras Tg Jerd<sup>+/-CreER</sup> tratados con aceite de maíz (grupo PCC) y 3 machos y 3 hembras Tg Jerd<sup>+/+</sup> con tamoxifeno (grupo PHT). Los animales se sacrificaron al sexto día y de cada animal se obtuvo: riñones, hígado, pulmón, musculo esquelético y piel. Los tejidos fueron pulverizados y conservados a -80° C.



**Figura 51.** Esquema del modelo de expresión condicional mediada por Cre.

### 13.3. Análisis de la recombinación, transcripción y expresión

#### 13.3.1. Análisis de la recombinación

Mediante PCR se comprobó si se había producido la recombinación mediada por Cre utilizando los cebadores 25 y 34 (tabla 7) a partir del ADN genómico extraído de los embriones y de los órganos de los ratones adultos.

#### 13.3.2. Análisis de la transcripción

- PCR

Se extrajo ARN total a partir del cerebro de los embriones y de los órganos pulverizados de los ratones. El método empleado fue el del



Tioisocianato de guanidina (Trizol) (Chomczynski et al., 1987). Aproximadamente 15 mg de las muestras se homogeneizaron utilizando un Ultra Turrax, en 2 ml de TRI-Reagent (Sigma) y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió 200  $\mu$ l de Cloroformo y se agitó durante 15 minutos. Tras incubar 2-3 min a temperatura ambiente las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 minutos a 4° C. Después de recuperar la fase acuosa se añadió 1 volumen de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 minutos a 4° C. El precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 75%, se centrifugó a 13000 rpm, 5 minutos a 4° C y se dejó secar. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 50  $\mu$ l de agua DEPC y se cuantificó en un nanodrop. La integridad del ARN, se comprobó en una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE. Aproximadamente 2  $\mu$ g de las muestras se trataron con ADNasa. La generación de ADNc a partir de ARN se realizó mediante la técnica de RT-PCR. El ADNc resultante se utilizó de molde para amplificar por PCR la secuencia de jerdostatina utilizando los cebadores 41 y 42 (tabla 7)

- Hibridación *in situ* (FISH)
- *Síntesis de la sonda de ARN*

La síntesis de la sonda se realizó por PCR mediante los cebadores 38, 39 (Tabla 7) utilizando como ADN molde el vector pROSA/EGFP/Jerd.



## Material y Métodos

---

Estos cebadores permiten incorporar la secuencia del promotor de la ARN polimerasa del fago SP6. El ADN resultante purificado y lineal, se utilizó como molde para la transcripción de la ARN polimerasa mediante el kit comercial DIG RNA Labeling (Roche), que permite la síntesis de copias monocatenarias de ARN marcadas con digoxigenina

La sonda de ARN marcada se purificó con el kit comercial RNA Cleanup (Qiagen). Como control se utilizó una sonda de la Triptófano hidroxilasa 2 (Tph2) cedida por la Dra. Nuria Flames (IBV-CSIC)

- *Fijación y corte de los tejidos*

Se utilizaron embriones E15 dpc, fijados en PFA 4%. Posteriormente se crioprotegieron en sacarosa al 15% y 30%. Los embriones se embebieron en medio crioprotector OCT y se congelaron en nitrógeno líquido. Se realizaron cortes transversales en el criostato a 15  $\mu\text{m}$  que se montaron sobre portaobjetos.

- *Prehibridación e Hibridación*

Las secciones se fijaron en PFA 4% después, se digirieron con proteinasa K (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 5 minutos y se volvieron a fijar con PFA. Para reducir las uniones no específicas de la ribosonda, los cortes se acetilaron durante 10 minutos.

La hibridación se realizó a 62° C en una cámara húmeda (5X SSC, 50% formamida). El tampón de hibridación contiene 50% fomamida, 10% sulfato dextrano, 0.2% tRNA, 1X solución Denhart, 1X solución salina (0.2



M NaCl, 10 mM Tris, 5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 5 mM EDTA, pH 7.5) y 200-400 ng/ml de la sonda marcada.

- *Lavados e inmunohistoquímica*

Los cortes se lavaron con 0.5X SSC, 50% formamida, 0.1% Tween a 62° C, seguidos de 3 lavados con MABT (ácido maleico 0.1 M, NaOH 0.2 M, NaCl 0.2 M, Tween 0.01%, ph 7.4). Las muestras se bloquearon durante una hora con la solución de bloqueo (10% solución bloqueo Roche, 10% suero de oveja en MABT). La inmunodetección se realizó incubando las secciones con el anticuerpo anti-DIG-AP (1:3500) en solución de bloqueo (1% solución bloqueo Roche, 1% suero de oveja en MABT) en la cámara húmeda a 4° C durante toda la noche. Al día siguiente, tras los lavados los cortes se tiñeron con HNPP/Fast Red (Roche) durante 2 horas en oscuridad. Posteriormente se paró la reacción con 0.1 M Tris-HCl, pH 8.2 y se incubaron con DAPI (1:5000).

### **13.3.3. Análisis de la expresión**

La presencia de Flag-jerdostatina en los embriones se analizó por inmunohistoquímica.

- *Fijación y corte de los tejidos*

Se utilizaron embriones E15 dpc, fijados en PFA 4%. Los embriones se embebieron en medio OCT y se congelaron en nitrógeno líquido. Se realizaron cortes transversales en el criostato a 15  $\mu\text{m}$  que se montaron sobre portaobjetos.





## Material y Métodos

---

- *Bloqueo e Inmunodetección*

Las secciones se bloquearon en 0.2% Triton X-100, 1% BSA en PBS durante 1 hora. Posteriormente, se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario: anti-Flag (1:250) y anti-Tuj1 (1:400) en tampón de bloqueo a 4°C. Al día siguiente los cortes se lavaron cuatro veces durante 10 minutos cada uno en PBS. La inmunodetección se realizó incubando las secciones con el anticuerpo anti-ratón conjugado a Alexa Fluor 555 (1:650) en solución de bloqueo durante una hora. Los cortes se lavaron 3 veces cada 10 minutos en PBS y se tiñeron con DAPI (1:5000) durante 5 minutos.

## — Resultados y Discusión







Las disintegrinas cortas (K/R)TS han demostrado tener un enorme potencial biomédico *in vitro*, por su actividad antiangiogénica. En este capítulo se pretende generar un modelo de ratón transgénico condicional que permita investigar el efecto de la expresión sistémica de jerdostatina en el desarrollo de tumores dependientes de angiogénesis.

### **1- Generación de un modelo animal para el estudio de jerdostatina**

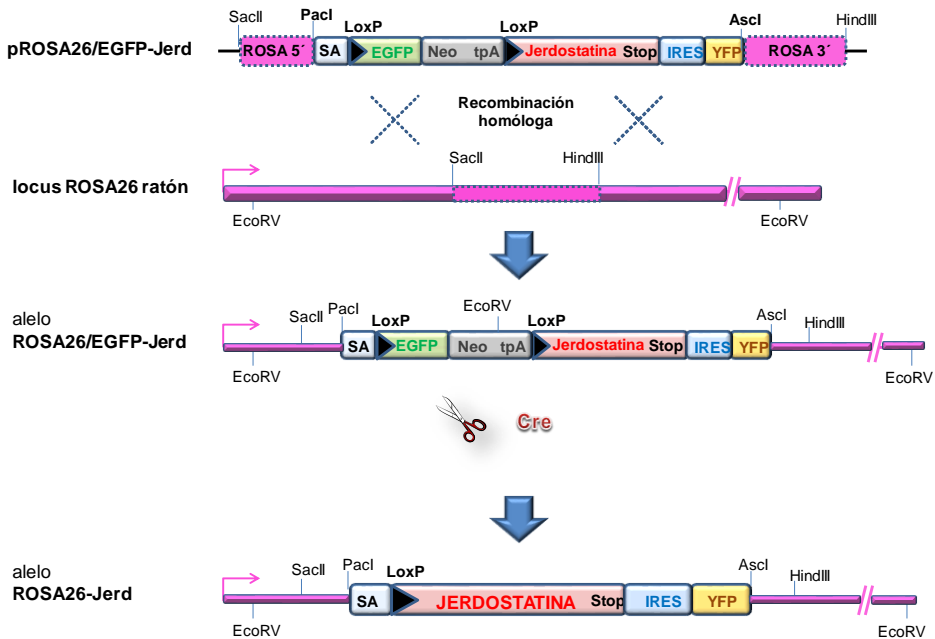
#### **1.1. Diseño línea transgénica**

Para llevar a cabo este objetivo, se ha desarrollado un sistema que utiliza el promotor endógeno y ubicuo de mamíferos, situado en el locus *ROSA26* del cromosoma 6 de ratón (Introducción, apartado 2.1). Basándonos en el sistema Cre/LoxP (Introducción, apartado 2.2) se utilizó un vector que contiene el gen que codifica para la disintegrina del veneno de serpiente jerdostatina, cuya transcripción está impedida por la presencia de una región de ADN flanqueada por los sitios loxP. Para introducir este casete de forma dirigida en el genoma, se utilizó el proceso conocido como recombinación homóloga. El vector de expresión posee parte de la secuencia genómica de *ROSA26* (fragmentos 5' y 3') que se introducirá por recombinación en la zona homóloga del locus *ROSA26* (primer intrón) de las células madre embrionarias de ratón. La ventaja de este sistema es que únicamente se producirá la expresión de jerdostatina tras la escisión de los sitios LoxP por la recombinasa Cre (Figura 52), generando así, un



## Resultados y Discusión

modelo animal transgénico para la expresión condicional (espacial y temporal) de jerdostatina.



**Figura 52.** Esquema de la estrategia diseñada para obtener el modelo transgénico de ratón que exprese jerdostatina, basado en el sistema Cre/LoxP y en la recombinación homóloga. (SA: "Adenovirus Splice Acceptor"; EGFP: "Enhanced Green Fluorescent Protein"; Neo: Neomicina; tpA: señal triple de poliadenilación; IRES: "Internal Ribosome Entry Site"; YFP: "Yellow Fluorescent Protein").

Las disintegrinas cortas estudiadas hasta la fecha, se han purificado directamente del veneno o se han expresado de forma recombinante en bacterias (Sanz et al., 2005; Olfa et al., 2005; Brown et al., 2008; Staniszewska et al., 2009). Por lo tanto, un paso previo a la generación del ratón transgénico es comprobar la expresión recombinante de jerdostatina soluble y activa, en un sistema de células de mamífero.



### **2. Expresión y purificación de jerdostatina recombinante en células de mamífero**

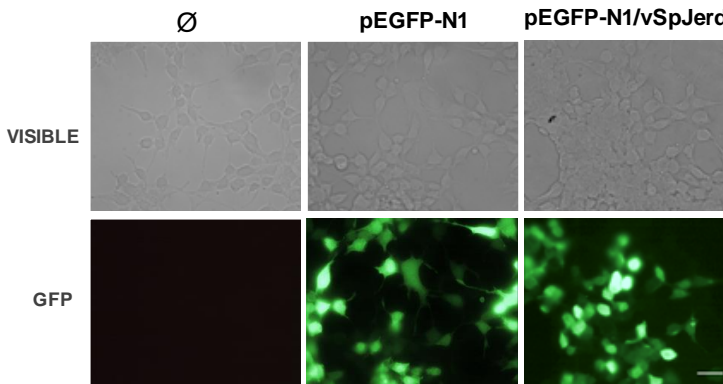
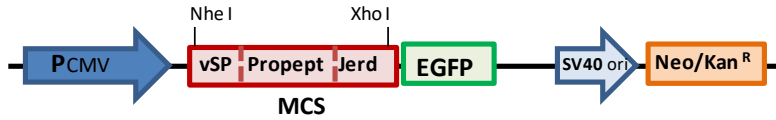
La secuencia deducida del ADNc amplificado a partir del ARNm obtenido de la glándula de veneno de *Protobothrops jerdonii*, codifica para 3 dominios bien definidos: un péptido señal (vSP), un propéptido y el dominio disintegrina que codifica para la proteína madura de 4.9 kDa jerdostatina. En la glándula de las serpientes, el vSP y el propéptido sufren un procesamiento proteolítico, cuyo mecanismo se desconoce, dando lugar a la proteína madura (dominio disintegrina) que encontramos en los venenos. Para la producción de jerdostatina recombinante, estos dominios fueron insertados en vectores de expresión de mamífero junto con una etiqueta (GFP, FLAG) para facilitar su aislamiento y para la detección de la proteína una vez en el sistema animal.

#### **2.1. Expresión de Jerdostatina-EGFP**

Las células HEK 293T fueron transfectadas con el vector pEGFP-N1/vSP-propéptido-jerdostatina (vSP-Jerd) por lipofección (Materiales y Métodos, apartado 7.1). Para comprobar la eficiencia de transfección se utilizó el plásmido pEGFP-N1 vacío (Figura 53).

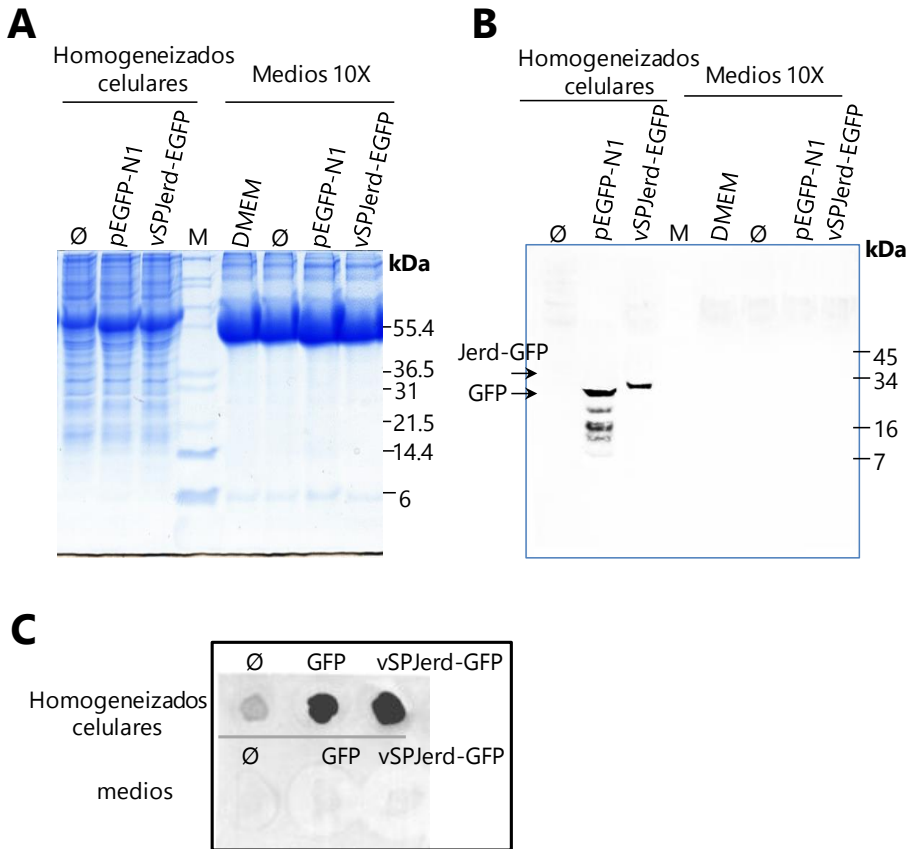


pEGFP-N1/vSpJerd



**Figura 53. Imágenes de células HEK 293T transfectadas.** La transfección se realizó en células que hubieran alcanzado una confluencia del 70-80%, en placas de 100 mm. Se añadieron 15 µg de pEGFP-N1 y pEGFP-N1/vSpJerd por placa y 30 µl/placa de lipofectamina. Las células transfectadas muestran fluorescencia por toda la célula producida por la proteína EGFP. ∅: no transfectado. Escala 40 µm.

Tras la transfección se recogieron el medio y las células. La presencia de jerdostatina-EGFP (32 kDa) se comprobó en los homogeneizados celulares y en el medio mediante una electroforesis SDS-PAGE al 15% en condiciones reductoras que posteriormente se tiñó con azul de Coomassie (Figura 54 A) y por inmunoblot (Western blot y dot blot) (Figura 54 B y C)



**Figura 54. Análisis de la expresión de Jerdostatina-GFP.** **A)** 40  $\mu$ g del homogeneizado de células HEK 293T transfectadas con pGFP-N1 y pGFP-N1/vSPJerd y del medio concentrado por filtración, fueron analizados mediante electroforesis SDS-PAGE. **B)** y **C)** El Análisis por Western blot y dot blot muestra la expresión de EGFP (27kDa, algo degradada) y Jerd-EGFP (32 kDa) en los extractos celulares. Para los ensayos de inmunoblot la membrana se incubó con anti-GFP y se reveló con el anticuerpo secundario de conejo unido a peroxidasa. ∅: células no transfectadas. Marcador electroforesis: Mark12™ Standard (Invitrogen, 2,5-200kDa). Marcador Western blot: See Blue Plus (Invitrogen) (Juarez et al., 2010).





El análisis por inmunoblot reveló que la proteína se sintetizó, pero fue retenida dentro de las células transfectadas, probablemente debido al péptido señal de reptil (vSP) que no permite la secreción de la proteína de fusión recombinante en mamíferos. No obstante, en el modelo transgénico animal, interesa que jerdostatina salga al torrente sanguíneo para poder ejercer su función como disintegrina, por lo tanto, es necesario buscar un método apropiado de secreción de proteínas en células de mamífero.

### **2.2. Expresión de SP<sub>SEAP</sub>-Flag-Jerdostatina**

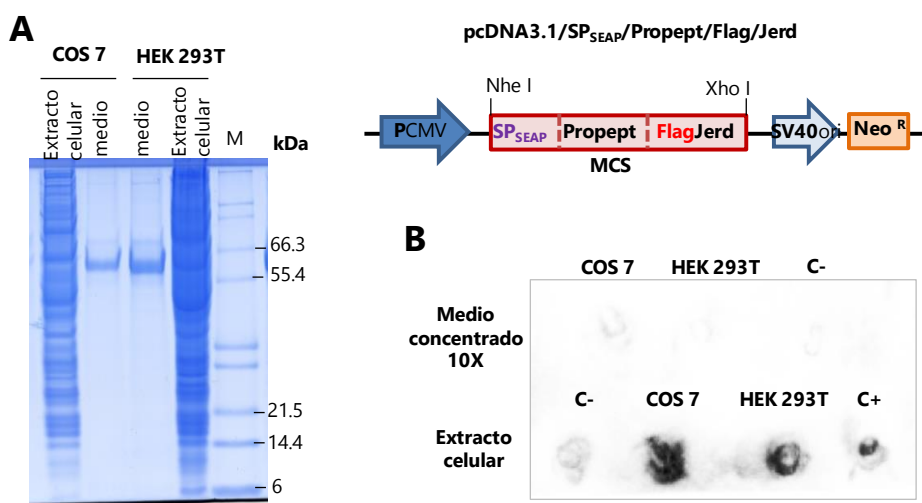
El gen SEAP codifica para una forma truncada de la fosfatasa alcalina placentaria humana (PLAP) que carece del dominio de anclaje a membrana y que es secretada al medio de cultivo. Esta característica ha permitido su comercialización como gen reportero de la expresión génica en células de mamífero. Teniendo en cuenta la alta eficiencia de secreción que presenta esta fosfatasa, se utilizó el péptido señal de SEAP (50 pb) (materiales y métodos 7.1) para secretar jerdostatina al medio.

Además, estudios posteriores por RMN de las disintegrinas cortas pusieron de manifiesto que el bucle y la cola C-terminal de jerdostatina participan en la interacción con el receptor integrina (Carbajo et al., 2011). Teniendo en cuenta estos datos estructurales la fusión de GFP en la región C-terminal de jerdostatina impediría el correcto plegamiento de la proteína, afectando a su funcionalidad. Con el fin de minimizar la interferencia estérica con su función biológica, se colocó una etiqueta



corta (-FLAG) fusionada al extremo amino terminal de jerdostatina (~6kDa).

Como resultado de la subclonación de los diferentes elementos en el plásmido pcDNA 3.1 (material y métodos 7.1), se obtuvo el vector de expresión pcDNA 3.1/ SP<sub>SEAP</sub>/Propéptido/FLAG/Jerdostatina con el que se transfectaron por lipofección células COS7 y HEK 293T. Como control de transfección se utilizaron células cotransfectadas con el vector pEGFP-N1. El extracto celular y medios se analizaron por SDS-PAGE y dot blot (Figura 55).



**Figura 55. Análisis de la expresión de Flag-Jerdostatina** **A)** Electroforesis SDS-PAGE Tris-Tricina al 10% en condiciones reducidas del extracto (40  $\mu$ g) y medio celular concentrado por ultrafiltración (20  $\mu$ g) de células COS7 y HEK 293T transfectadas con el vector pcDNA 3.1/ SP<sub>SEAP</sub>/Propept/FLAG/Jerd. **B)** Análisis por dot blot de los extractos celulares y del medio (10 $\mu$ l) utilizando como anticuerpo anti-flag conjugado a peroxidasa. Como controles se utilizaron el extracto celular y el medio concentrado de células COS7 transfectadas con pcDNA3.1 (C-) y como control positivo una proteína con etiqueta Flag (50ng). Marcador electroforesis: Mark12™ Standard.

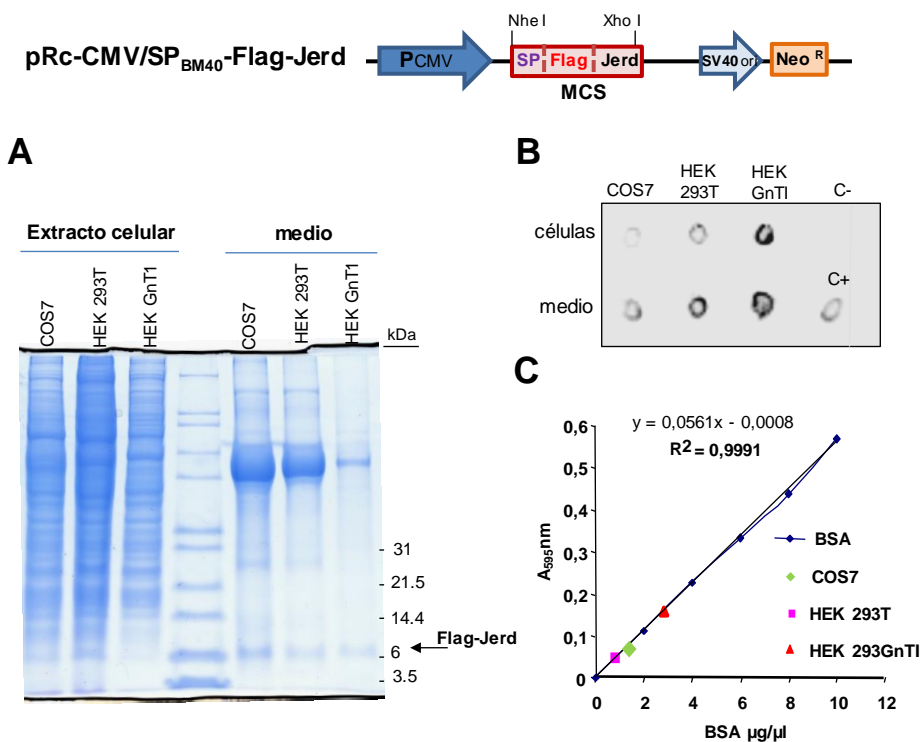


Tras el análisis por inmunoblot de las líneas celulares COS7 y HEK 293T, solamente se detectó la presencia de la proteína en los extractos celulares.

### 2.3. Expresión de SP<sub>BM40</sub>-Flag-Jerdostatina

Muchas proteínas de mamíferos se sintetizan como precursores inactivos (propéptidos) que necesitan ser procesados (proteólisis) para su activación. En el caso de las disintegrinas del veneno de serpiente, se desconoce la función e importancia del prodominio durante la activación de la proteína. Algunos autores sugieren que el procesamiento proteolítico de las proformas de las disintegrinas se produce antes de la liberación del contenido de las vesículas en el lumen de la glándula de veneno, en un ambiente idóneo para la activación (Fox and Serrano, 2008).

El ambiente necesario para el procesamiento del propéptido en las células de mamífero podría no ser el adecuado para la activación de la proteína madura. Ante los problemas para secretar jerdostatina al medio, se decidió cambiar de péptido señal y eliminar el propéptido. En este caso, se utilizó el péptido señal de BM- 40 derivado de la osteonectina. Tras el péptido señal (SP<sub>BM40</sub>), la etiqueta -FLAG se localiza en el extremo amino terminal de jerdostatina. Este plásmido, pRc-CMV/SP<sub>BM40</sub>-Flag-Jerd (Figura 56), se transfectó transitoriamente en células de mamíferos COS7, HEK 293T y HEK 293GnTI. La presencia de la proteína soluble Flag-Jerdostatina (~6 kDa) en el medio celular se analizó por SDS-PAGE Tris-tricina 10%, y Dot blot (Figura 56).



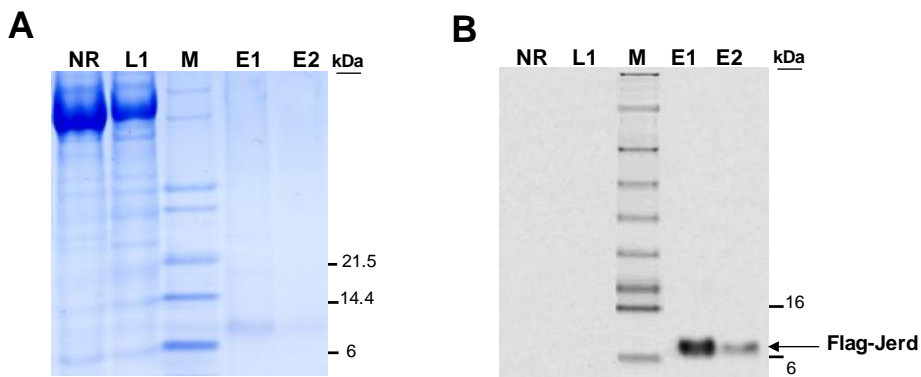
**Figura 56. Expresión de Flag-Jerdostatina.** **A)** Electroforesis SDS-PAGE Tris-Tricina del extracto (40  $\mu\text{g}$ ) y de los medios, concentrados por ultrafiltración de tamaño de poro de 3 KDa, de células COS7, HEK 293T y HEK 293GnTI transfectadas. Marcador Mark12™. **B)** Dot blot de los extractos celulares y medios de las tres líneas celulares transfectadas. Para el análisis por dot blot se colocaron 5  $\mu\text{l}$  de cada muestra sobre la membrana, la presencia de Flag-jerdostatina se detectó con el anticuerpo anti-Flag conjugado a peroxidasa. Como control negativo se utilizó el medio celular no transfectado (C-) y como positivo (C+) una proteína que contiene la etiqueta Flag (50 ng). **C)** Representación gráfica de los valores obtenidos por el método de Bradford en el medio celular.

El rendimiento de expresión en el medio celular de jerdostatina fue mayor en el caso de las células HEK 293GnTI transfectadas (Figura 56 C). Por lo tanto, se utilizaron estas células en suspensión para expresar y purificar Flag-Jerdostatina del medio (Figura 57).



## Resultados y Discusión

Se transfectaron  $1.5 \cdot 2 \times 10^6$  células HEK 293GnT I por ml, con 10  $\mu\text{g/ml}$  del ADN plasmídico pRc-CMV/SP<sub>BM40</sub>-Flag-Jerd, utilizando el polímero PEI. El medio se recogió a los 2 días post-transfección. La proteína soluble Flag-jerdostatina fue purificada del medio celular por cromatografía de afinidad y analizada por SDS PAGE y Western blot.



**Figura 57. Análisis de la purificación de Flag-Jerdostatina por cromatografía de afinidad.** Electroforesis SDS-PAGE Tris-Tricina al 10% (A) y Western blot (B) de las diferentes fracciones obtenidas por cromatografía de afinidad mediante la columna ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel del medio de células HEK 293GnTI transfectadas. NR: no retenido por la columna, L: lavado, E: eluido, M: marcador Mark12™. En el análisis por Western blot se utilizó como anticuerpo primario anti-PEP160 y como secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa (Juarez et al., 2010).

El rendimiento de purificación fue de aproximadamente 0.25 mg a partir de un litro de cultivo celular.

La proteína recombinante purificada del medio se identificó a partir de la banda del gel, mediante huella peptídica (Figura 58) y MS/MS (material y métodos, apartado 10.2). Mediante el programa bioinformático PeptideMass (<http://www.expasy.org/>) se calculó las masas de los



péptidos generados tras la digestión (Figura 56 A). Los péptidos trípticos TSVSSHYCTGR, LKPAGTTCWR y LACTTGPCR correspondientes a la secuencia aminoacídica de jerdostatina fueron identificados mediante espectrometría de masas (Figura 58B).

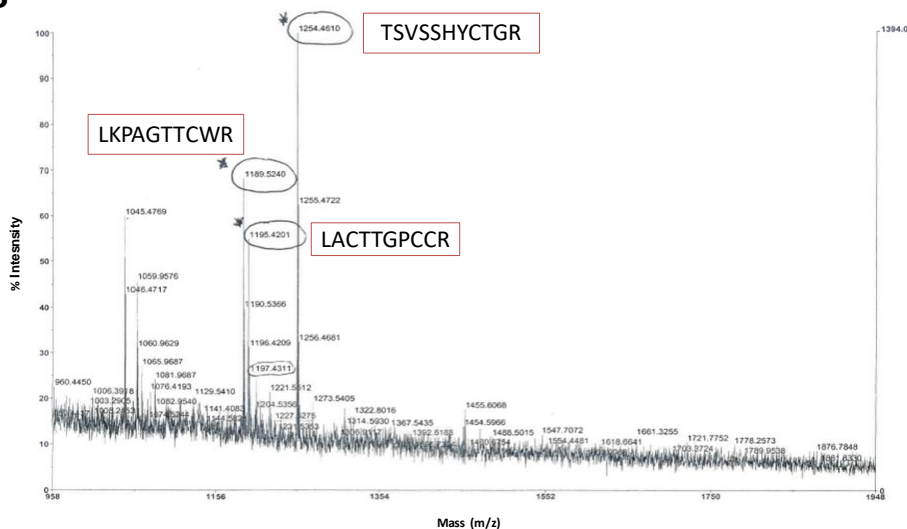
**A**

rJerdostatina: MAPLADYKDD DDKLACTTGP CCRQCKLKPA GTTCWRTSVS SHYCTGRSCB CPSYPNG

[Theoretical pI: 7.50 / Mw (average mass): 6251.04 / Mw (monoisotopic mass): 6246.70]

MASS	POSITION	ARTIF.MODIFICATION	MODIFICATIONS	PEPTIDE SEQUENCE
1197.5317	37-47	Cys_CM: 44	1255.5372	TSVSSHYCTGR
1132.5931	27-36	Cys_CM: 34	1190.5986	LKPAGTTCWR
1113.3976	48-58	Cys_CM: 49, 51	1229.4085	SCECPSYPNGG
1024.4373	14-23	Cys_CM: 16, 21, 22	1198.4537	LACTTGPCR
908.4546	1-8			MAPLADYK
607.2205	9-13			DDDDK

**B**



**Figura 58.** Identificación por espectrometría de masas (MALDI TOF) de los péptidos trípticos correspondientes a jerdostatina.



Posteriormente, los iones doble o triplemente cargados de péptidos seleccionados de la huella peptídica fueron secuenciados por CID-MS/MS.

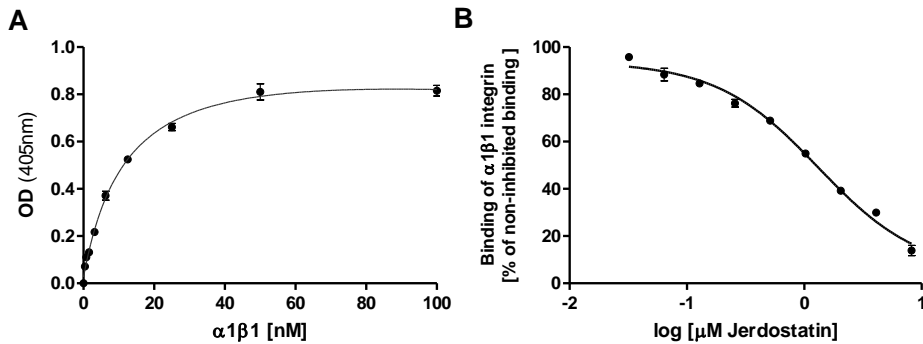
Los resultados obtenidos muestran que la construcción Sp<sub>BM40</sub>-Flag-Jerdostatina insertada en el vector pRC\_CMV y expresada en células HEK 293GnTI permite secretar de forma soluble Flag-Jerdostatina al medio celular.

### 3. Actividad *in vitro* de Flag-Jerdostatina recombinante

#### 3.1. Flag-Jerdostatina recombinante se une al ectodominio $\alpha_1\beta_1$ .

Una vez purificada, la interacción entre jerdostatina recombinante y la integrina  $\alpha_1\beta_1$  se investigó utilizando el heterodímero soluble de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  (Figura 59 A). La capacidad de bloqueo de Flag-Jerdostatina a la unión de  $\alpha_1\beta_1$  al fragmento del colágeno tipo IV (CB3) se comprobó en un ensayo de inhibición tipo ELISA (Figura 59 B).

Flag-Jerdostatina recombinante bloquea la unión de  $\alpha_1\beta_1$  a CB3 de forma dosis-dependiente con una IC<sub>50</sub> de 570 nM (Figura 59 B), un valor muy superior al obtenido para r-jerdostatina producida en bacterias (Capítulo I, resultados 3.2). Estos datos sugieren que la introducción de la etiqueta -FLAG en el extremo amino-terminal ha generado un impedimento estérico cuyo resultado es una disminución de su capacidad inhibitoria, pero sin afectar a la unión a  $\alpha_1\beta_1$ .

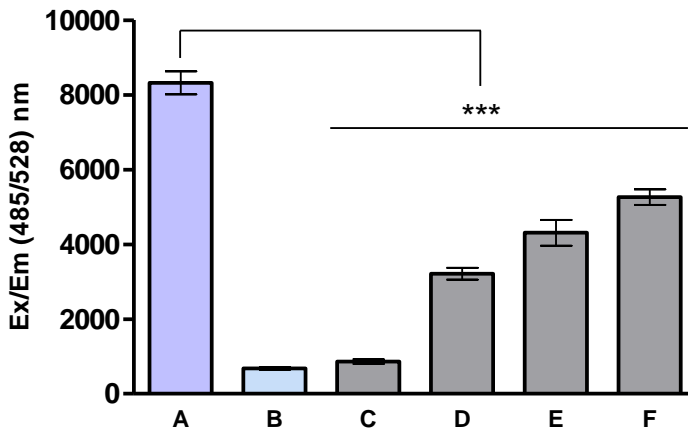
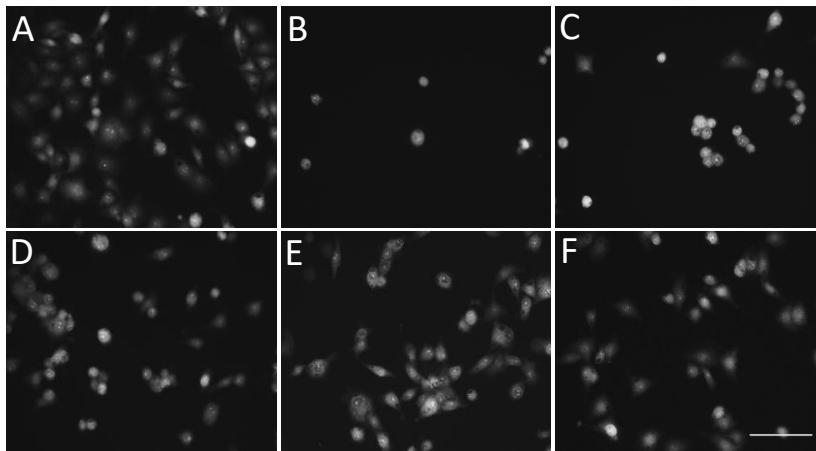


**Figura 59. Unión de Flag-Jerdostatina recombinante a  $\alpha 1\beta 1$ .** **A)** Flag-jerdostatina se inmovilizó en una placa de 96 pocillos frente a diferentes concentraciones de la integrina soluble  $\alpha 1\beta 1$ , en un ensayo tipo ELISA. La integrina  $\alpha 1\beta 1$  unida se detectó con anti-  $\beta 1$  de conejo unida a PA. **B) Ensayo de inhibición de la unión de  $\alpha 1\beta 1$  a CB3.** 5  $\mu$ g/ml de CB3 se inmovilizaron en una placa de 96 pocillos durante la noche y se incubaron con diversas concentraciones de Flag-Jerdostatina y 15  $\mu$ g/ml de  $\alpha 1\beta 1$  en 1% de BSA-TBS/Mg. El valor de  $IC_{50}$  calculada a partir de la curva de inhibición es de 570 nM (Juarez et al., 2010).

### 3.2. Flag-Jerdostatina recombinante inhibe la adhesión de células RuGLi al colágeno.

La actividad de Flag-Jerdostatina recombinante se comprobó *in vitro* en células tumorales. Se realizaron ensayos de inhibición de la adhesión celular en células de glioma de rata, RuGLi, que expresan las integrinas  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 7\beta 1$  y  $\alpha v\beta 3$  en su superficie (Grenz et al., 1993) (Figura 60).





**Figura 60. Imagen y representación gráfica de la adhesión de células RuGLi a CB3 (IV) en presencia de Flag-Jerdostatina.** A una placa de 96 pocillos recubierta con CB3 (2 µg/ml), se le añadieron 100 µl de células RuGLi ( $0.5 \times 10^6$  células/ml) por pocillo en presencia de 10 µg/ml de Flag-Jerdostatina (C), 5 µg/ml (D), 2,5 µg/ml (E) y 1,25 µg/ml (F). Control positivo sin jerdostatina (A) y negativo EDTA 10 mM (B). Escala 100 µm. Los valores corresponden a la media  $\pm$  SEM de 4 ensayos independientes para cada condición. Significado estadístico de las diferencias observadas \*\*\*  $p < 0,001$ . (Juarez et al., 2010)



Los resultados muestran que la proteína recombinante generada en células de mamífero fue capaz de inhibir la adhesión de células tumorales RuGli a colágeno IV (CB3). En las imágenes (Figura 60) se observa como las células, en presencia de Flag-jerdostatina, pierden su forma, se redondean y finalmente se separan del sustrato (CB3).

En este apartado hemos demostrado que las células de mamíferos son capaces de sintetizar y secretar de forma soluble y funcionalmente activa la disintegrina corta con motivo RTS jerdostatina. Esta construcción es el primer paso en la creación de un sistema de expresión que permita generar ratones transgénicos condicionales para investigar el efecto de la expresión sistémica de jerdostatina durante el desarrollo de tumores dependientes de angiogénesis.

#### **4. Generación de un ratón transgénico para jerdostatina**

Con el objetivo de generar un modelo transgénico animal que permita evaluar *in vivo* la actividad antiangiogénica de la proteína jerdostatina, se ha utilizado un sistema de recombinación homóloga, que permite la introducción del transgén de forma dirigida en el locus *ROSA26* de células madre de ratón, y un sistema de expresión condicional Cre/LoxP. Basándonos en ambos sistemas se diseñó el vector pROSA26PA/pBIGT que contiene el gen que codifica para la disintegrina del veneno de serpiente jerdostatina, cuya transcripción está impedida por la presencia de una región de ADN flanqueada por los sitios loxP: EGFP-Neo-tpA. Para introducir el transgén de forma dirigida (recombinación homóloga) en el locus *ROSA26*, el vector posee parte de la secuencia de

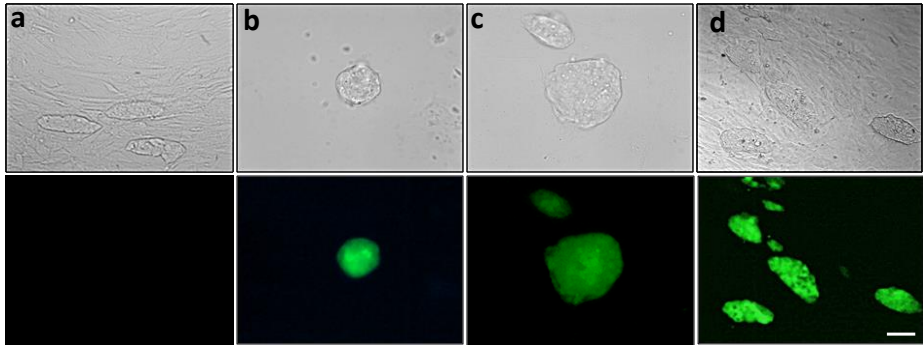


*ROSA26* (brazos 3' y 5') de las células madre embrionarias de ratón. De esta forma, una vez insertado correctamente el transgén, solamente tras la escisión de los sitios loxP por la recombinasa Cre se producirá la expresión de jerdostatina bajo el dominio del promotor endógeno y ubicuo de ratón (embriones y adultos) *Rosa26*, generando así, un modelo animal transgénico para la expresión condicional (espacial y temporal) de jerdostatina.

Una vez probada *in vitro* la expresión y secreción en células de mamífero de Flag-jerdostatina recombinante, soluble y activa, el vector pRc\_CMV/SP<sub>BM40</sub>-FlagJerdostatina se subclonó en el vector pBIGT. El vector resultante se subclonó en el vector pROSA26PA (Material y Métodos, apartado 12.1, Figura 42) y posteriormente, se transfectaron por electroporación células madre de ratón ES CK35 (Material y métodos 12.2).

### 4.1. Identificación de células ES transgénicas

El vector pROSA26PA resultante incluye el casete LoxP-EGFP-NeoptA-LoxP, que codifica para la expresión de la proteína EGFP y una resistencia a neomicina (PGK-Neo) que permite seleccionar aquellas células que hayan incluido el transgén. La proteína fluorescente EGFP no contiene promotor propio, por lo tanto, su expresión depende del promotor endógeno *Rosa26*. De esta forma, para determinar si se ha producido la inserción del transgén por recombinación homóloga, se seleccionaron aquellas células ES resistentes a neomicina y verde fluorescente (Figura 61).

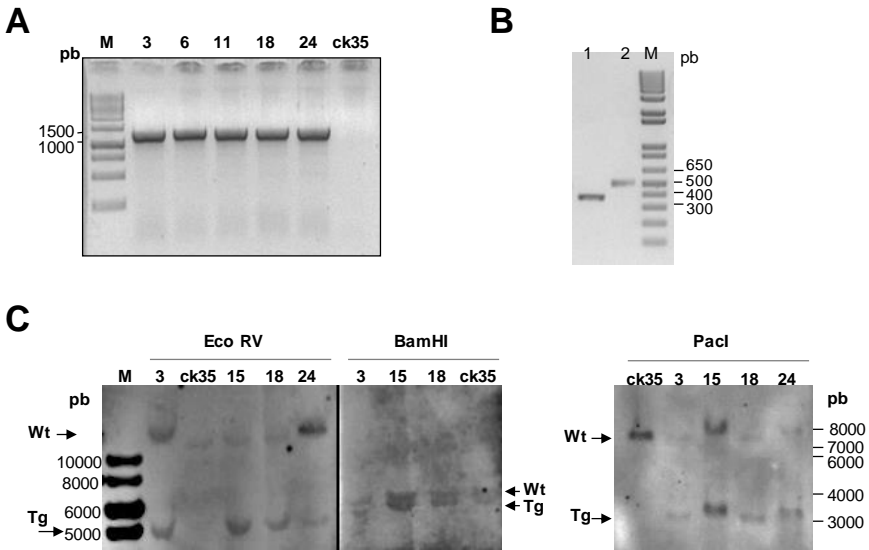
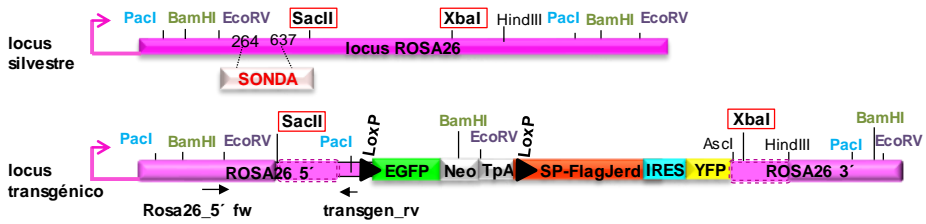


**Figura 61. Imágenes de células ES CK35.** Las células madre de ratón se crecieron sobre una capa de MEF inactivadas (a) y se transfectaron con el vector pROSA26PA. Tras seleccionar con neomicina, se sembraron individualmente sobre gelatina aquellas células que presentaban fluorescencia verde (Figura b y c) y posteriormente, se crecieron sobre MEFs (d) amplificando así la colonia. Escala 25  $\mu\text{m}$ .

La selección por neomicina y EGFP confirma que las células han incorporado el transgén, pero esta selección no implica que la inserción sea correcta. El análisis de la inserción del transgén en el locus *ROSA26* de las células madre de ratón se realizó por PCR (Figura 62 A) y Southern blot (Figura 62 B, C) a partir del ADN celular (Material y Métodos apartado 12.3).



## Resultados y Discusión



**Figura 62. Esquema del locus *ROSA26* silvestre y transgénico** donde se muestra la localización de las enzimas de restricción (Pacl, BamHI y EcoRV) utilizadas en el Southern blot, de la sonda de ADN y de los cebadores utilizados para el análisis de la inserción del transgén. En el alelo transgénico, la zona del locus homóloga perteneciente al vector pROSA26PA se encuentra indicada en cursiva. **A) PCR** de las células ES seleccionadas (clones 3,6,11,18 y 24). Los cebadores *Rosa26\_5' fw* y *transgén\_rv* amplifican un fragmento de 1200 pb que permite identificar aquellas células que han incorporado el transgén en el locus *ROSA26*. **B) Electroforesis en gel de agarosa al 1%** de la sonda de ADN de 373 pb marcada con digoxigenina (1: sonda no marcada; 2: sonda marcada). **C) Southern blot** del ADN extraído de las células ES seleccionadas (clones 3,15,18,24), digeridas con los enzimas de restricción Pacl, BamHI y EcoRV. Como control se ha utilizado células ES CK35 no transfectadas. M: marcador 1Kb DNA ladder (Invitrogen).



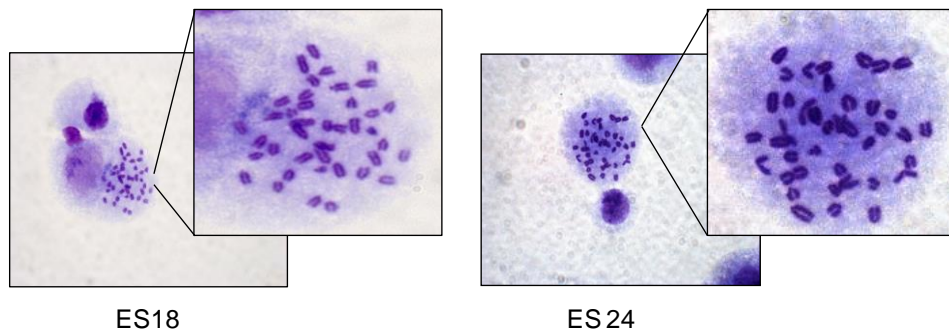
La incorporación del fragmento transgénico genera nuevos sitios de corte, así, el cambio del patrón de digestión de las enzimas seleccionadas permite identificar mediante una sonda de ADN la correcta introducción del transgén (Figura 60 C).

Los fragmentos reconocidos por la sonda se corresponden a los teóricos calculados con el programa Webcutter (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>) (Tabla 15).

**Tabla 15. Fragmentos obtenidos por Southern blot**

Enzima	Fragmentos reconocidos por la sonda (pb)		
	locus ROSA 26 silvestre	locus ROSA 26 transgénico	
<b>EcoRV</b> (gat/atc)	11517	11517	4795
<b>PacI</b> (ttaat/taa)	7921	7921	3372
<b>BamHI</b> (g/gatcc)	6671	6671	6054

El análisis por PCR y Southern blot nos permitió seleccionar aquellas células ES que incorporaron correctamente el transgén en el locus *ROSA26*. Sin embargo, las células ES pueden sufrir alteraciones cromosómicas al multiplicarse en cultivo. Las células aneuploides pueden dar lugar a quimeras, pero su material genético rara vez se transmite a través de la línea germinal. Para comprobar que no se han producido dichas anomalías, se contó el número de cromosomas de los clones de células ES transgénicas (Material y Métodos apartado 12.4) que posteriormente se van a inyectar en un blastocisto (Figura 63).



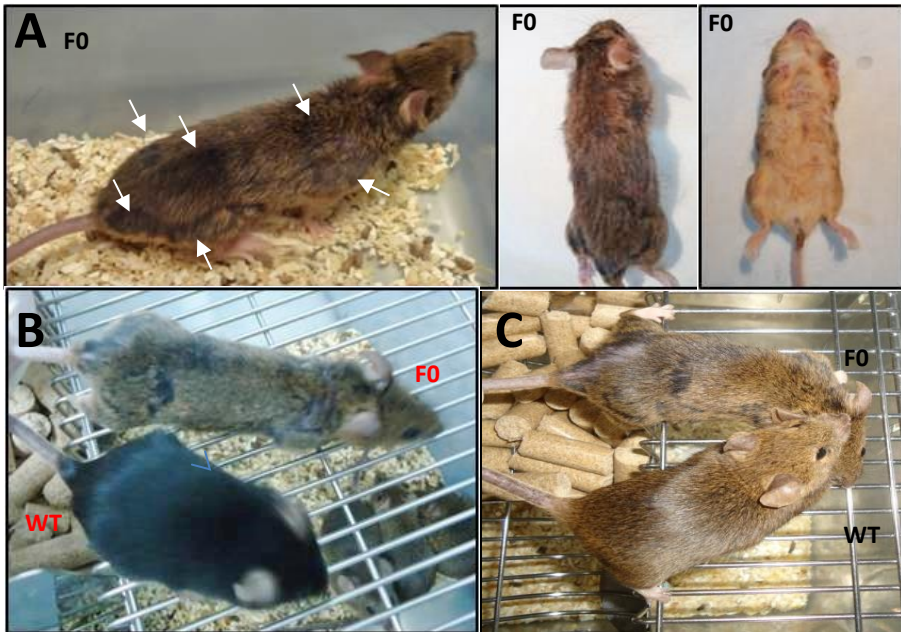
**Figura 63. Recuento de cromosomas.** Mediante la técnica convencional de tinción de Giemsa, los cromosomas de células en metafase se tiñen intensamente y de forma homogénea, lo que permite fotografiar y contar los cromosomas. Se contaron entre 30 y 50 células en metafase de cada clon ES transgénico previamente comprobado por PCR y Southern blot. Se consideraron como clones euploides aquellos en los que el 75% de metafases contenía 40 cromosomas.

De entre las células ES transgénicas que cumplen los requisitos anteriores, se seleccionó el clon ES18 para su microinyección (entre 10 y 20 células) en la cavidad del blastocisto de la cepa C57Bl/6JOla Hsd.

Los embriones manipulados se implantaron en el útero de una hembra receptora pseudogestante CD-1. La microinyección e implantación lo llevó a cabo el Servicio de transgénesis y biología reproductiva del Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV-CSIC).

### 4.2. Identificación de ratones transgénicos

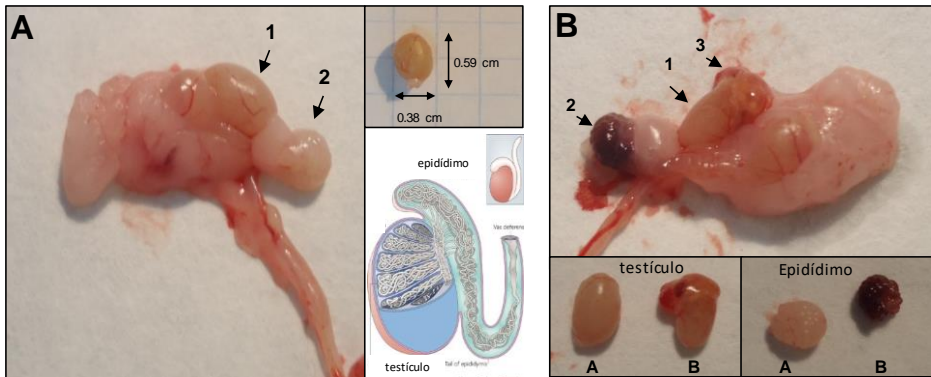
Tras la implantación en una hembra CD-1 se obtuvieron 4 crías, de las cuales 2 eran quimeras o fundadores machos: F0.2, F0.3 (Figura 64).



**Imagen 64. Imagen de un ratón quimera. A)** En las imágenes observamos los colores característicos del ratón quimera en su pelaje: agutí (células provienen de la línea de ES CK35, 129/Sv) y negro (células provienen del blastocisto C57Bl/6J0la Hsd; indicado con flechas), lo que permite diferenciarlo de un ratón silvestre. **B)** y **C)** En las imágenes se muestra un ratón quimera (F0) junto a individuos silvestres (wt) para cada línea: C57Bl/6J0la Hsd (negro) y 129/Sv (agutí), respectivamente.

Para comprobar que el alelo transgénico se transmite a la línea germinal, los machos quimera, que expresan un color quimérico mayor al 75% (Figura 64), se cruzaron con hembras de la cepa C57Bl/6J0la Hsd. Sin embargo, solamente uno de los machos quimera fue capaz de dar descendencia. Tras el sacrificio de los machos fundadores observamos anomalías en los órganos reproductores que explicarían su incapacidad reproductora (Figura 65).





**Figura 65. Testículos de los ratones macho quimera F0.2 y F0.3. A)** El individuo quimera F0.2 tiene un testículo de un tamaño menor de lo habitual (1) aunque el epidídimo es de tamaño correcto (2). **B)** El individuo quimera F0.3 tiene un testículo (1) con una zona vacuolada (tumor acuoso) (3), el epidídimo caudal de tamaño correcto pero necrosado (2). En las fotos inferiores se comparan los testículos (izquierda) y los epidídimos caudales (derecha) de ambos fundadores.

Las anomalías que encontramos en los órganos reproductores no son infrecuentes en la generación de ratones transgénicos. A pesar de estos defectos, el ratón quimera (F0.2) fue capaz de reproducirse y transmitir la modificación génica a su descendencia (F1).

Tras los defectos encontrados en los órganos reproductores de los ratones fundadores, para comprobar que la descendencia obtenida en la F1 es fértil, se cruzaron hembras y machos heterocigotos de la F1 con ratones silvestres C57Bl/6J Ola Hsd. Posteriormente, los descendientes heterocigotos fueron cruzados entre sí en busca de una progenie homocigota (F2) generando la línea transgénica B6; 129P2-Tg(ROSA)26Sor<sup>tm1(EGFP,Jerдостatina)</sup>Upme, llamada **Tg Jerd** (Tabla 16).



**Tabla 16. Primeras aproximaciones en la generación de la línea transgénica Tg Jerd.**

Generación	Número de individuos		Sexo		Observaciones
	silvestre	Tg	silvestre	Tg	
<b>F0</b>	2	2	1♀, 1♂	2♂	Se obtuvieron 2 individuos quimeras, de los que solo uno fue capaz de dar descendencia
<b>F1</b>	5	4	2 ♀, 3♂	2♀, 2♂	Descendencia de ratón quimera F0 cruzado con 2♀ C57Bl/Ola Hsd
<b>F1</b>	3	7	1 ♀, 2♂	3♀, 4♂	Descendencia de ♀ F1 transgénica cruzada con ♂ C57Bl/Ola Hsd
<b>F1</b>	10	7	4 ♀, 6♂	3♀, 4♂	Descendencia de ♂ F1 transgénica cruzada con ♀ C57Bl/Ola Hsd
<b>F2</b>	10	15+/- 12 +/+	5 ♀, 5♂	5♀, 1♂ +/- 5♀, 7♂ +/+	Descendencia de ♂ y ♀ transgénicos F1 heterocigotos (+/-)

Las distribuciones de los genotipos obtenidos se corresponden con la segregación esperada para animales adultos fértiles (Tabla 17). El cruce de hembras y machos heterocigotos Jerd<sup>+/-</sup> entre sí, da lugar a una descendencia donde los genotipos se distribuyen aproximadamente en 25% silvestres, 25% homocigotos y 50% heterocigotos.

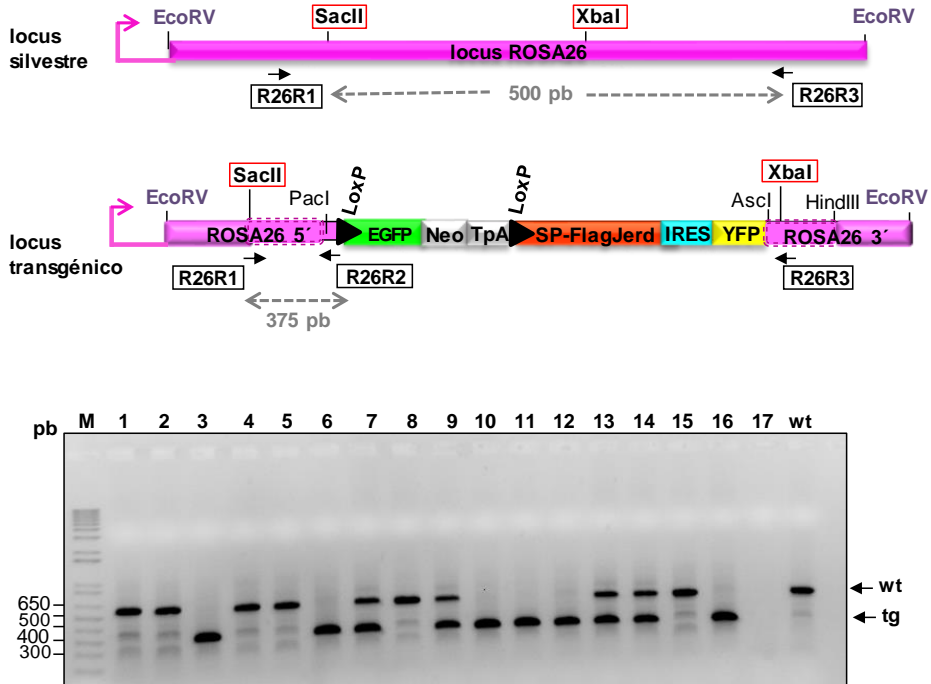
**Tabla 17. Distribución de los genotipos en cada generación (%).**

Generación	Distribución genotipos			TOTAL
	Silvestre	Heterocigoto (+/-)	Homocigoto (+/+)	
F1	18 (50%)	18 (50%)	0	36
F2	10 (27%)	15 (40,5%)	12 (32,5%)	37



## Resultados y Discusión

El análisis del genotipo (material y métodos apartado 12.6) se realizó a partir del ADN obtenido de la cola del ratón por PCR, utilizando los cebadores específicos R26R1, R26R2 y R26R3 (Figura 66).



**Figura 66. Análisis del genotipo por PCR.** En la reacción de polimerización se añaden los 3 cebadores, de forma que en la electroforesis en gel de agarosa observamos bandas de diferentes tamaños que permiten discernir entre ratones homocigotos, de 375 pb (carriles: 3,6,10,11,12 y 16), silvestres de 500 pb (carriles: 1,2,4,5,8,15 y 18) o heterocigotos de 375 pb y 500 pb (carriles: 7, 9,13 y 14). M: marcador 1Kb DNA ladder (Invitrogen).



La presencia o ausencia del locus transgénico en el ADN de los ratones fundadores y en la línea germinal se analizó por PCR, Southern blot y expresión de EGFP (Material y Métodos apartado 12.6). Los amplicones obtenidos por PCR (Figura 67) se purificaron a partir del gel, se clonaron en el vector pGEMT y secuenciaron para comprobar la exactitud de la secuencia transgénica introducida.

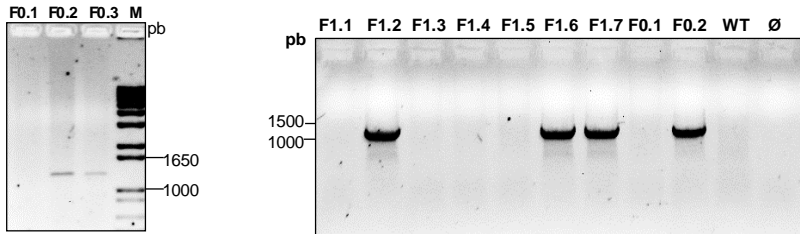
La presencia del locus transgénico en la línea germinal también se analizó por Southern blot. Al igual que con las células ES, la sonda externa permitió certificar la correcta introducción del transgén en el locus *ROSA26*. La sonda interna permitió distinguir entre ratones silvestres y los transgénicos (Figura 68).



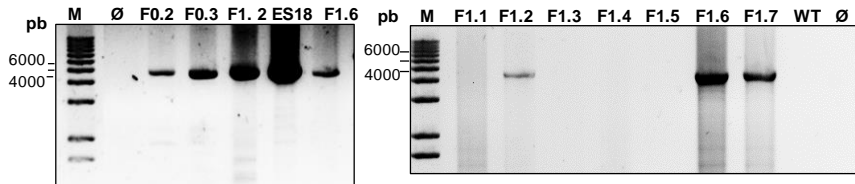
## Resultados y Discusión



### A PCR Rosa26\_5'fw / transgén\_rv



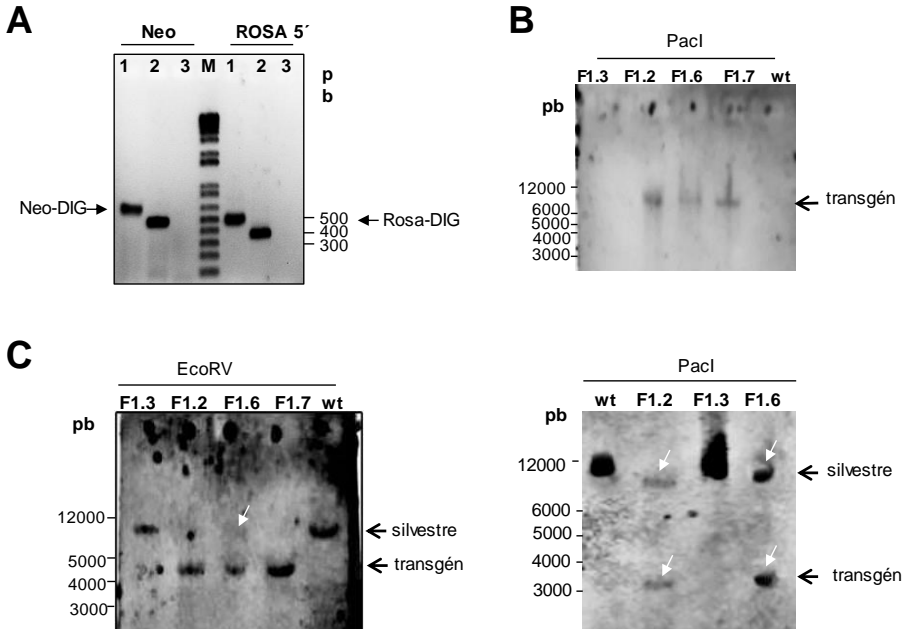
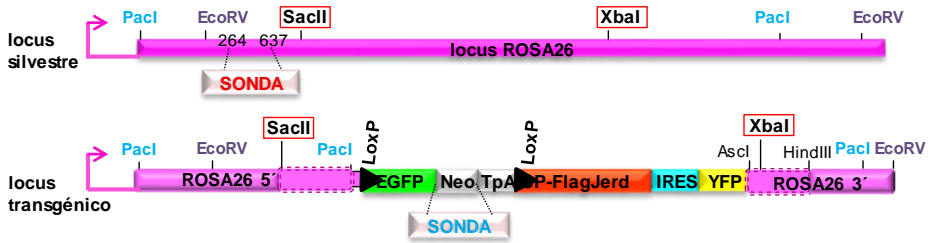
### B PCR R26R1/ IRESseq\_rev



### C PCR 5'NheI\_ATG/JerdXhol3'



**Figura 67. Identificación de animales transgénicos por PCR.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR obtenidos utilizando diferentes cebadores a partir del ADN extraído de las colas de los ratones. **A)** Los cebadores Rosa26\_5'fw y transgén\_rv amplifican un fragmento de aproximadamente 1200 pb, que sitúa el transgén en el locus Rosa26 (carriles: F0.2, F0.3, F1.2, F1.6, F1.7). **B)** Los cebadores R26R1 e IRESseq\_rev amplifican un fragmento de aproximadamente 5000 pb correspondiente al transgén (carriles F0.2, F0.3, F1.2, ES18, F1.6, F1.7). **C)** Los cebadores 5'NheI-ATG y JerdXhol-3' amplifican la secuencia de jerdostatina de 250 pb (carriles F0.2, F0.3, F1.2, F1.6, F1.7). **F0:** ratón fundador, **F1:** ratones primera generación, **wt:** ratón silvestre C57Bl/6JOLA Hsd, **ES18:** clon de células madre transgénicas, **Ø:** sin ADN **M:** marcador 1Kb DNA ladder (Invitrogen).



**Figura 68. Identificación del locus transgénico en ratones por Southern blot.**

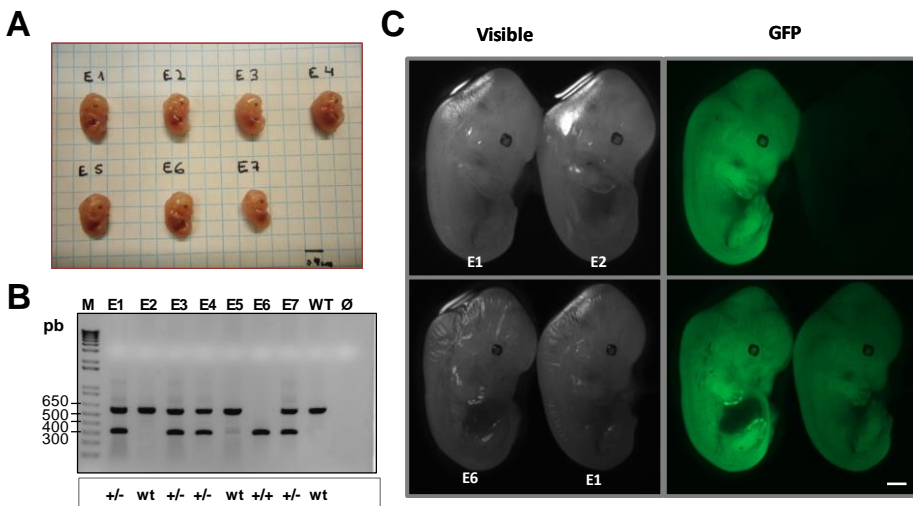
**A)** Electroforesis en gel de agarosa de las sondas marcadas con digoxigenina (1: sonda marcada; 2: sonda no marcada; 3: agua). **B)** Southern blot a partir del ADN extraído de las colas de ratón, digerido con Pacl, utilizando la sonda Neomicina. El fragmento detectado por la sonda en los animales transgénicos es de 9977 pb (carriles F1.2, F1.6, F1.7). **C)** Southern blot utilizando la sonda externa en Rosa 5' del ADN digerido con EcoRV y Pacl. Los fragmentos de 4795 pb (EcoRV) y 3372 pb (Pacl) detectados por la sonda, identifican el locus transgénico (carriles F1.2, F1.6, F1.7). Como control negativo (wt) se utilizó ADN de un ratón silvestre C57Bl/6JOla Hsd. **M:** marcador 1Kb DNA ladder (Invitrogen).



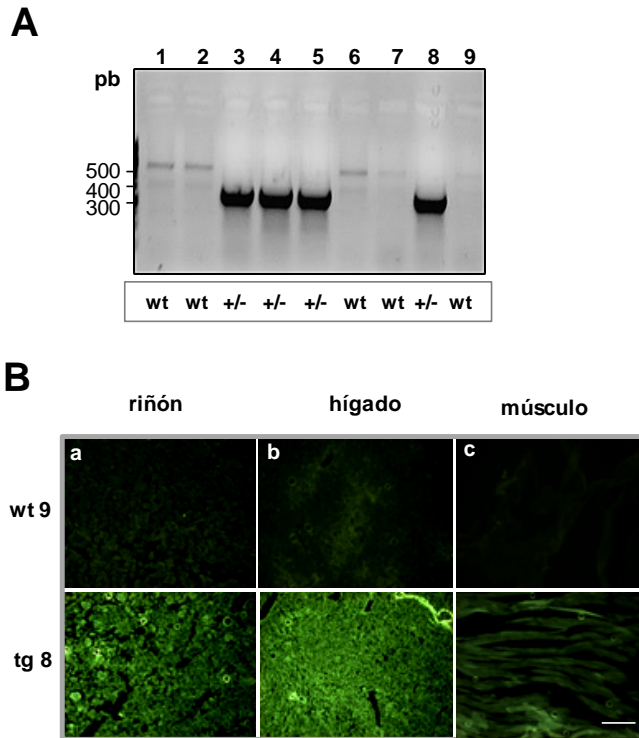
## Resultados y Discusión

El análisis por Southern blot del ADN digerido corrobora los resultados obtenidos por PCR. Estos resultados, junto con la secuenciación, permiten certificar que los ratones contienen el transgén correctamente insertado en el locus *ROSA26*. Sin embargo, no proporcionan información acerca de la expresión mediada por el promotor endógeno *Rosa26*.

El sistema transgénico diseñado implica que si la inserción es correcta se expresaría EGFP bajo el dominio del promotor *Rosa26*, ya que no tiene promotor propio. Por lo tanto, una forma de comprobar que el sistema utilizado es funcional, es mediante la observación directa de fluorescencia verde en embriones (Figura 69) y adultos (Figura 70).



**Figura 69. Expresión de EGFP en embriones.** **A)** Se extrajeron embriones E12.5 a partir de hembras heterocigotas cruzadas con machos heterocigotos. **B)** El genotipado de los embriones se realizó por PCR a partir del ADN extraído del saco vitelino. M: marcador 1Kb DNA ladder (Invitrogen). **C)** Los embriones se fijaron en PFA 4% durante 3h y se observó la fluorescencia verde bajo la lupa. Escala 1mm.



**Figura 70. Expresión de EGFP en tejidos de ratones adultos. A)** Los animales se genotiparon por PCR a partir del ADN extraído de la cola. Carriles 3,4,5,8: animales heterocigotos. Carriles 1,2,6,7,9: ratones silvestres. **B)** Los ratones 9 (silvestre) y 8 (transgénico) fueron fijados por perfusión con 4% PFA a través del ápice del corazón. Se extrajo el riñón (a), el hígado (b) y el músculo esquelético (c) y se realizaron cortes en el criostato. Los tejidos se observaron bajo el microscopio para ver fluorescencia producida por la EGFP. Escala 100µm.

## 5. Expresión de Flag-jerdostatina

La transcripción de Flag-jerdostatina está impedida por la presencia de la región de ADN flanqueada por los sitios loxP, que contiene una secuencia de parada transcripcional (tpA). De esta forma, solamente tras la recombinación de los sitios loxP, mediada por la recombinasa Cre, se





producirá la expresión de jerdostatina bajo el dominio del promotor endógeno Rosa26.

Como el trabajo con los ratones conlleva tiempo, se realizaron en paralelo estudios *in vitro*, con fibroblastos embrionarios (MEF) homocigotos para jerdostatina.

### **5.1. Recombinación Cre/loxP *in vitro***

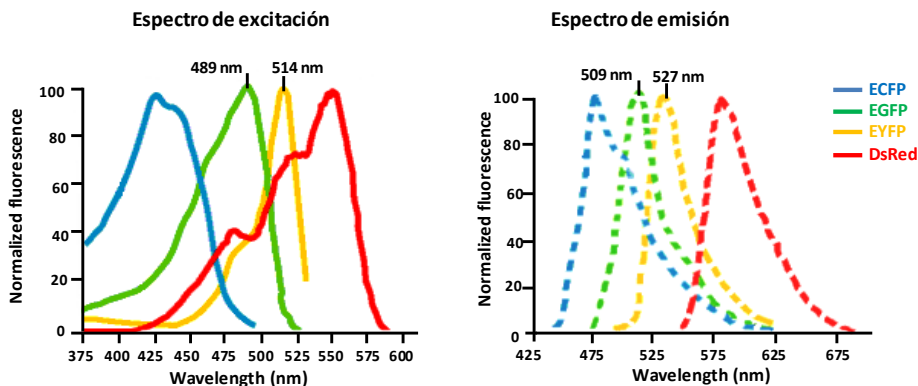
#### **5.1.1. Recombinación *in vitro* en MEFs aislados de ratones TgJerd.**

Con el fin de comprobar que la secuencia introducida se expresa tras la recombinación, se analizaron fibroblastos extraídos de embriones procedentes de cruces de hembras y machos transgénicos homocigotos para jerdostatina (Tg Jerd<sup>+/+</sup>), transfectados con el vector pCre-IRES-PuroR (Material y Métodos apartado 4 y 13.1.1) y seleccionados con puromicina.

En el sistema diseñado, la recombinasa Cre, expresada en las células transfectadas, reconoce y recombina los sitios LoxP, de forma que el casete que contiene GFP-Neo-TpA se escinde, dando lugar a un episoma. Tras la escisión, se expresa de forma independiente jerdostatina y YFP (bajo el dominio de un sitio IRES). En un principio, se podría observar el fenómeno de recombinación mediante un cambio de fluorescencia de verde (GFP) a amarillo (YFP). Estas dos proteínas fluorescentes se diferencian en los picos de excitación y emisión. GFP posee un pico de excitación a una longitud de onda de 489 nm, y un pico de emisión a 509



nm, sin embargo, YFP posee un pico de emisión a 527nm y de excitación a 514 nm (Figura 71).



**Figura 71.** Espectros de excitación y emisión de los fluoróforos más comunes.

A pesar de que ambos espectros se solapan, es posible distinguir la señal procedente de GFP de la de YFP gracias a que presentan perfiles de emisión diferentes. En un principio, para estudiar si la señal obtenida en las muestras procedía de YFP, se utilizó el microscopio vertical Leica DM RXA2 (Leica Microsystems, Nannheim, Alemania) equipado con filtros para microscopia de fluorescencia (GFP: BP 470/40; YFP: BP 500/20). Sin embargo, con los filtros de fluorescencia disponibles, no fuimos capaces de distinguir entre fluorescencia producida por GFP o YFP.

Posteriormente, se estudió el perfil de emisión utilizando un microscopio confocal Leica TCS SP8 con un objetivo HC PL APO CS2 63x/1.40 y el programa LAS X. Se tomaron imágenes sucesivas, según coordenadas xy, cada 5 nm, con un ancho de banda de 10 nm, haciendo un barrido desde 520 nm hasta 600 nm y excitando la muestra con un láser 514 nm. De este modo, se obtuvo un perfil que no correspondía a

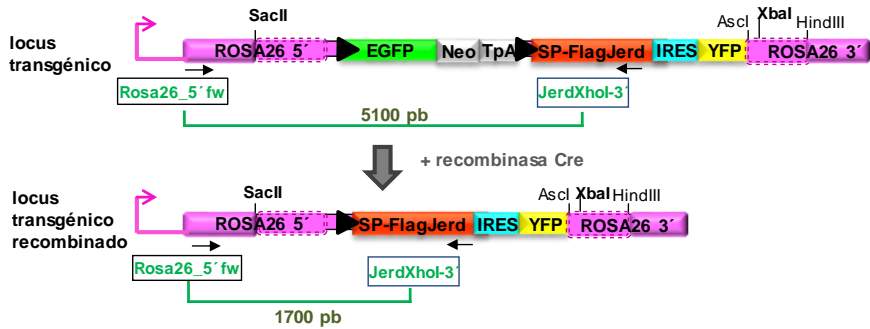


## Resultados y Discusión

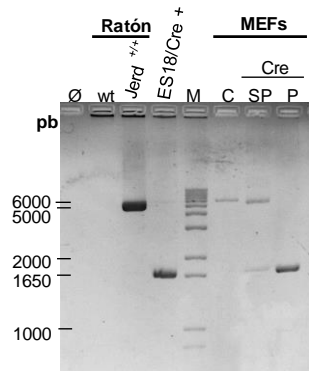
---

YFP sino a la autofluorescencia de la muestra. Estos resultados parecen indicar que la secuencia IRES introducida no es funcional pero no se podría asegurar, mediante microscopia de fluorescencia, que no se ha producido recombinación y, por lo tanto, expresión de jerdostatina.

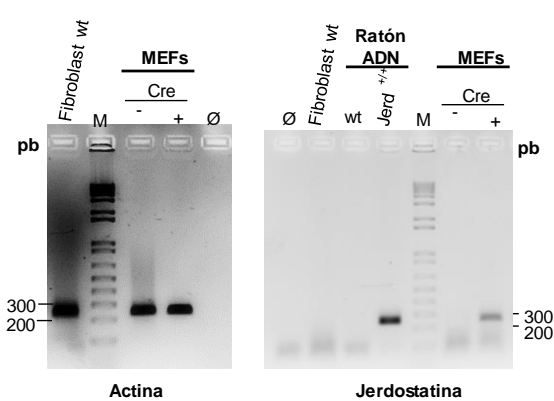
Tras esta contrariedad, decidimos abordar el problema desde una perspectiva molecular. Tras la escisión, se pierde el casete que codifica para GFP-Neo-TpA, produciéndose un cambio en el tamaño del inserto (Figura 72), que puede ser observable en una electroforesis en gel de agarosa. Así, mediante PCR, a partir del ADN extraído de las células transfectadas y diseñando cebadores específicos, fuimos capaces de comprobar el fenómeno de recombinación mediado por Cre (Figura 72 A). Del mismo modo, se estudió la expresión de jerdostatina a partir del ARN total extraído de las células por RT-PCR (Figura 72 B).



## A PCR



## B RT-PCR

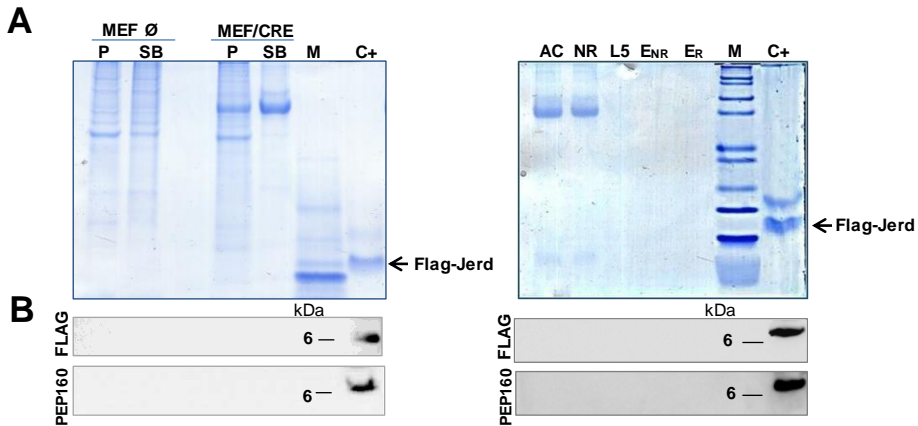


**Figura 72. Análisis de la recombinación *in vitro* de MEFs aisladas de embriones TgJerd<sup>+/+</sup>.** Cuatro placas de 10 cm se transfectaron con 30µg del vector pCre-IRES-Puro<sup>R</sup>. Las células se trataron con 1.5 µg/ml de puromicina durante 4 días. La recombinación y transcripción de las células se analizó a partir del ADN y ARN extraídos de las células. **A) Análisis de la recombinación por PCR.** Electroforesis del producto de amplificación del ADN utilizando los cebadores Rosa26 fw y JerdXhol-3'. Los tamaños de los fragmentos esperados son de 5114 pb para el locus no recombinado y de 1700 pb del recombinado. **wt:** ADN ratón silvestre; **Jerd<sup>+/+</sup>:** ADN ratón TgJerd homocigoto; **ES18:** ADN células madre ES18 recombinadas; **C:** ADN células MEF no transfectadas; **SP:** células MEF transfectadas sin puromicina; **P:** células MEF transfectadas y tratadas con puromicina. **B) Análisis de la transcripción.** El ARN total de las células se retrotranscribió a ADN complementario. El ADNc resultante se utilizó como molde para amplificar por PCR la secuencia codificante de jerdostatina. Como control se amplificó un fragmento de actina de 250 pb. Control negativo: ADNc de fibroblastos silvestres. Control de PCR: ADN de ratón TgJerd<sup>+/+</sup> (50ng), Ø: sin ADN; **M:** marcador 1Kb DNA ladder (Invitrogen).



## Resultados y Discusión

Una vez comprobado que se produce recombinación y transcripción, analizamos la expresión de Flag-jerdostatina en las células y en el medio celular por SDS PAGE y Western blot (Figura 73).



**Figura 73. Análisis de la expresión *in vitro* de MEFs aisladas de ratones TgJerd<sup>+/+</sup>.** **A)** Las células MEF aisladas de los embriones transgénicos Jerd<sup>+/+</sup> se transfectaron con el vector pCre-IRES-PuroR. Tras la selección con 1.5 µg/ml de puomicina durante 4 días, se analizó la expresión de jerdostatina en el extracto celular y en el medio. Las células se recogieron en tampón de lisis y tras centrifugar se realizó una electroforesis SDS-PAGE (gel izquierdo) en condiciones reducidas del precipitado (**P**) y del sobrenadante (**SB**) de células no transfectadas (**∅**) y transfectadas (**MEF/Cre**). Se cargaron 20 µg de cada uno. El medio de las MEF transfectadas se concentró y se analizó por cromatografía de afinidad mediante la columna ANTI-FLAG® M2 Affinity. **AC**: medio previo a la columna; **NR**: no retenido por la columna, **L**: lavado, **ENR**: eluido no retenido en filtros de tamaño de poro de 3Kda, **ER**: eluido concentrado. **B)** El análisis de la presencia de jerdostatina en las células y el medio, se realizó por Western blot utilizando los anticuerpos anti-Flag y el anticuerpo primario anti-PEP160. Como control se utilizó Flag-Jerdostatina recombinante de 6KDa (250 ng) que forma un agregado (~14 KDa). Marcador Western blot: See Blue Plus (Invitrogen).



El estudio *in vitro* de la expresión en células MEF extraídas del ratón transgénico revela que el ADN insertado se transcribe, pero, contrariamente a lo esperado, no llega a expresarse en forma de proteína. Sin embargo, al tratarse de un experimento *in vitro* donde influyen factores como la cantidad de ADN, la tasa de transfección o el número (reducido) de células resultantes tras la selección con puromicina, entre otros factores, estos resultados representarían una aproximación a lo que podría estar sucediendo *in vivo*. Por lo tanto, el estudio de la recombinación en los ratones transgénicos podría arrojar otros resultados más positivos.

## 5.2. Recombinación en los ratones transgénicos.

### 5.2.1. Expresión condicional de Cre.

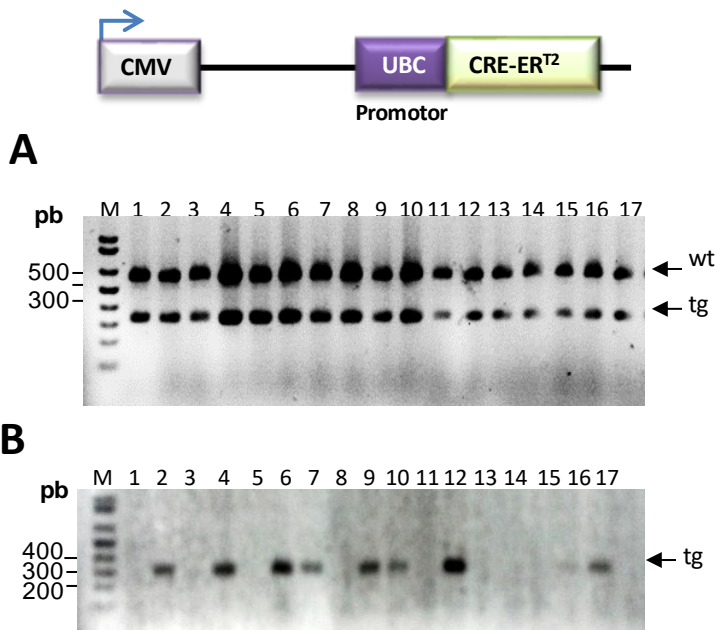
Puesto que el objetivo es controlar la expresión de jerdostatina, se diseñó un modelo experimental animal que permitiese la expresión condicional de jerdostatina. Con esta finalidad, se cruzaron ratones transgénicos homocigotos para jerdostatina (Tg Jerd<sup>+/+</sup>) con ratones heterocigotos transgénicos condicionales para Cre (Tg Cre-ER<sup>T2/+</sup>). La cepa de ratón Tg CreER<sup>T2</sup> expresa la recombinasa Cre fusionada con el receptor de estrógeno humano mutado (ER<sup>T2</sup>) que solamente reconoce y une tamoxifeno. El tamoxifeno actúa como el inductor del sistema, tras su administración, se une a ER<sup>T2</sup> y produce la liberación de Cre. Una vez liberada, la recombinasa se dirige al núcleo donde reconocerá



## Resultados y Discusión

específicamente las secuencias loxP e iniciará la recombinación y, por tanto, la expresión de jerdostatina (Introducción, apartado 2.2.1).

Tras el cruce de los animales se genotipó la descendencia (Figura 74) y se seleccionaron los ratones que contenían ambos transgenes (Tg  $Jerd^{+/CreER}$ ).

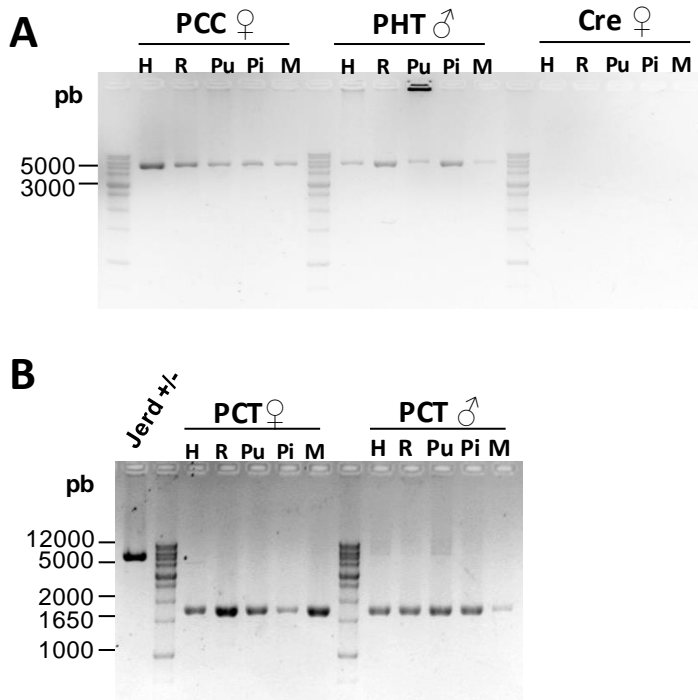


**Figura 74. Genotipado de ratones Tg  $Jerd^{+/CreER}$ .** **A**) Electroforesis de la amplificación por PCR del locus transgénico *ROSA26* utilizando los cebadores R26R1, R26R2, R26R3. Líneas 1-17: ratones Tg  $Jerd^{+/-}$  **B**) Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR del transgén *Cre-ER<sup>T2</sup>* utilizando los cebadores Cre F2 y Cre R4, que amplifican un fragmento de 350 pb correspondiente a la recombinasa Cre. Carriles: 1,3,5,8,11,13-15: ratones Tg  $Jerd^{+/-}$ ; carriles: 2,4,6,7,9,10,12,16,17: ratones Tg  $Jerd^{+/CreER}$ .

Tras la administración de tamoxifeno se produce la liberación de Cre, que inicia la recombinación de los sitios loxP, permitiendo la expresión de Flag-Jerdostatina de forma ubicua. La recombinación se



comprobó por PCR a partir del ADN extraído de los órganos y tejidos pulverizados de los ratones tratados (PCT) y ratones control (PHT y PCC).



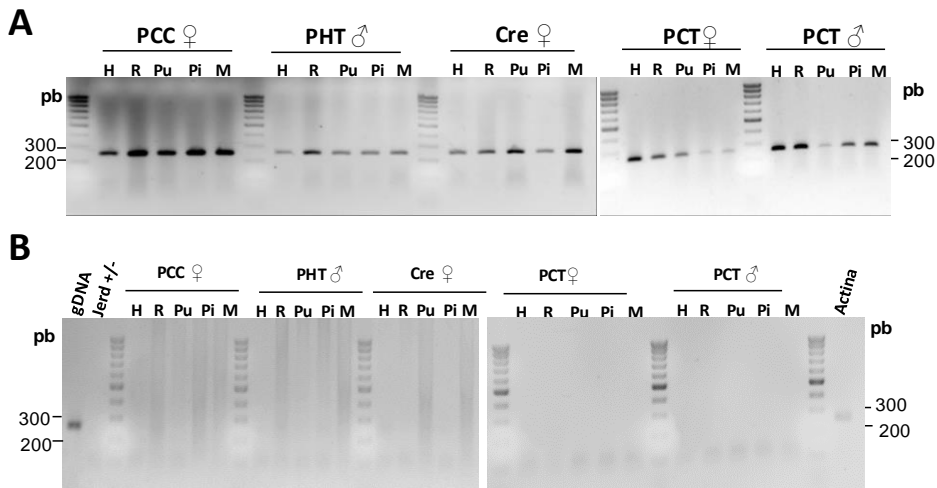
**Figura 75. Recombinación mediada por Cre.** En la Figura se muestra la electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR amplificados utilizando los cebadores Rosa26 fw y JerdXhoI-3' de los órganos de un individuo por grupo experimental. Los tamaños de los fragmentos esperados son de 5114 pb para el locus no recombinado **(A)** y de 1700 pb del recombinado **(B)**. **PHT**: ratones Tg Jerd<sup>+/-</sup> tratados con tamoxifeno; **PCC**: ratones Tg Jerd<sup>+/-</sup>CreER tratados con aceite de maiz; **PCT**: ratones Tg Jerd<sup>+/-</sup>CreER tratados con tamoxifeno. **H**: hígado, **R**: riñón, **Pu**: pulmón, **Pi**: piel, **M**: músculo esquelético.





## Resultados y Discusión

La presencia del ARNm de jerdostatina se analizó también, a partir de los ratones transgénicos tratados con tamoxifeno (PCT) y ratones control (PHT, PCC) (Figura 76).



**Figura 76. Análisis de la transcripción de jerdostatina mediante RT-PCR.** El ARN extraído de los órganos de los ratones transgénicos se retrotranscribió a ADN de cadena sencilla. En la Figura se muestra la electroforesis del producto de PCR utilizando el ADNc como molde, con los cebadores específicos para actina **(A)** y jerdostatina **(B)**. Ambos amplicones tienen un tamaño aproximado de 250 pb. **PHT**: ratones Tg *Jerd*<sup>+/-</sup> tratados con tamoxifeno; **PCC**: ratones Tg *Jerd*<sup>+/-</sup>/CreER tratados con aceite de maíz; **PCT**: ratones Tg *Jerd*<sup>+/-</sup>/CreER tratados con tamoxifeno. **H**: hígado, **R**: riñón, **Pu**: pulmón, **Pi**: piel, **M**: músculo esquelético.

El análisis por RT-PCR indica que no existe transcrito en ninguno de los órganos estudiados de todos los ratones analizados (Figura 76). Así como, en las células MEF observamos transcripción, en el caso del ratón condicional dependiente de tamoxifeno no hay transcrito, a pesar de observar recombinación por PCR.



El problema de la PCR es que es una técnica no cuantitativa, por lo que no podemos saber con seguridad si todas las células han recombinado y, por lo tanto, no sabemos el porcentaje de éxito del tratamiento con tamoxifeno. En la bibliografía no existe una única metodología de tratamiento, hay muchas variables a tener en cuenta como son: la dosis de tamoxifeno, la forma de suministrarlo (oral, inyectado, en la comida), la edad de los ratones, el tiempo de tratamiento y el momento del sacrificio. En este caso, se inyectaron 2 mg de tamoxifeno vía intraperitoneal a ratones de 8-10 semanas de edad, durante 5 días y se sacrificaron al sexto día. Ante los resultados obtenidos, se tendrían que hacer diferentes grupos experimentales que abarcasen todas las variables. Sin embargo, debido al tiempo que tardaríamos en tener todos los grupos de estudio, se decidió estudiar la expresión de jerdostatina utilizando un animal que exprese Cre de forma constitutiva.

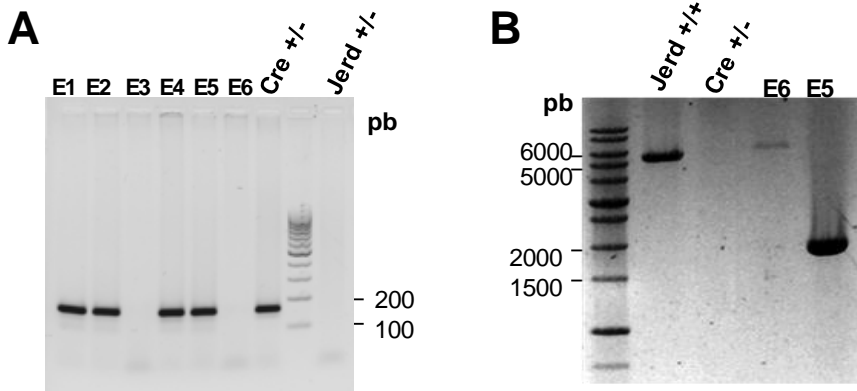
### **5.2.1. Expresión constitutiva de Cre.**

Con el fin de comprobar que la secuencia introducida se expresa tras la recombinación, se cruzaron ratones transgénicos homocigotos para jerdostatina (Tg Jerd<sup>+/+</sup>) con ratones heterocigotos modificados genéticamente que expresan de forma constitutiva la recombinasa Cre bajo el promotor de la Nestina (Tg NES-Cre<sup>+/+</sup>). La nestina es una proteína de los filamentos intermedios que se expresa durante las primeras etapas del desarrollo en células que se están dividiendo principalmente del sistema nervioso central. De esta forma, se estudió la recombinación mediada por la expresión constitutiva de Cre en el cerebro de embriones



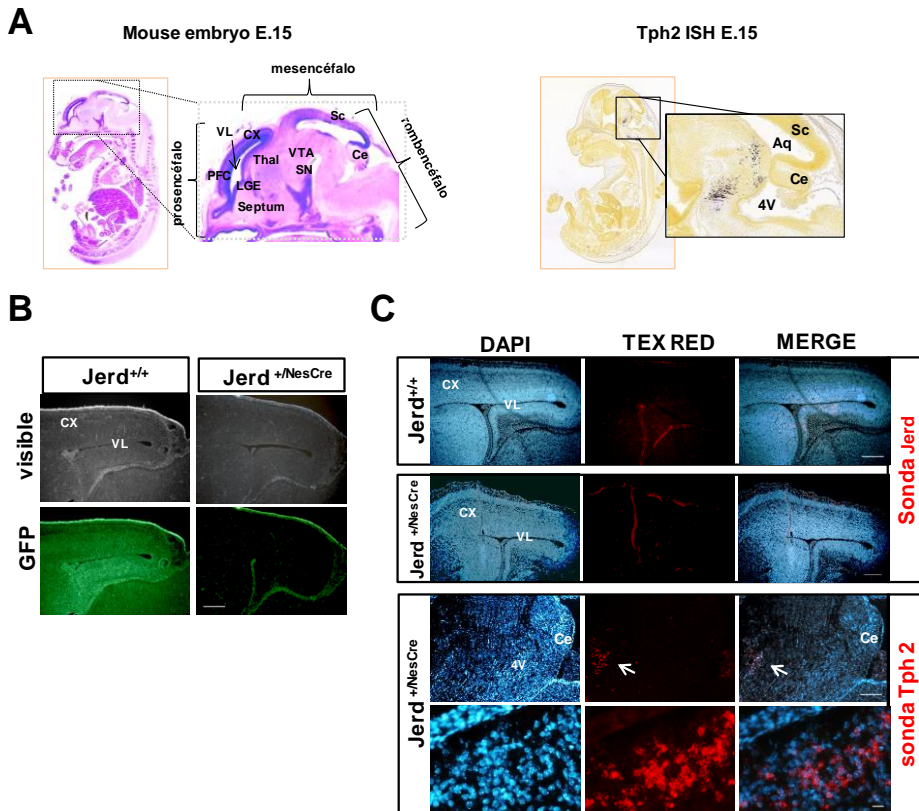
## Resultados y Discusión

E.15 d.p.c de edad, Tg Jerd<sup>+/<sup>NesCre</sup>. Los embriones obtenidos tras el cruce se genotiparon (Figura 77 A) y se analizó la recombinación por PCR (Figura 77 B).</sup>



**Figura 77. Análisis por PCR de embriones. A) Genotipado.** Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR amplificado utilizando los cebadores Cre fw y Cre rv, que amplifican un fragmento de 150 pb correspondiente a la recombinasa Cre. **B) Recombinación mediada por Cre en el cerebro.** Electroforesis de los productos amplificados por PCR utilizando los cebadores Rosa26 fw y JerdXhoI-3' a partir del ADN extraído de los cerebros de embriones. Los tamaños de los fragmentos esperados son de 5114 pb para el locus no recombinado y de 1700 pb del recombinado. Ratones control: ratones homo/heterocigotos TgJerd (TgJerd<sup>+/<sup>+/+</sup></sup>) y heterocigotos Tg NES-Cre (Cre<sup>+/<sup>-</sup></sup>). Embriones **E1-6**: embriones resultantes del cruce.

Los resultados obtenidos, indican que sí que se ha producido la recombinación de los sitios loxP (Figura 77 B). Por lo tanto, el siguiente paso es examinar la expresión de jerdostatina en el cerebro. A partir de embriones previamente fijados (material y métodos 13.3.2) se realizó un análisis de la transcripción mediante la técnica de hibridación *in situ* (ISH), utilizando una sonda de ARN marcada con digoxigenina (Figura 78). Como control se utilizó una sonda del triptófano hidroxilasa 2 (Tph2), presente en el tronco encefálico.



**Figura 78. Análisis de la transcripción en el estadio embrionario E15. A)** En la parte superior se muestra una imagen del cerebro de un embrión E15, indicando la localización del Prosencéfalo, Mesencéfalo y Rombencéfalo (modificada a partir de Park et al., 2006). Abajo, se muestra la expresión de Tph2 en el rombencéfalo tomada del Allen Brain Atlas (<http://www.brain-map.org>). **B)** Imágenes amplificadas (20X) del prosencéfalo, zona de estudio de la expresión génica, de cortes de embriones E.15. Escala 100  $\mu$ m. **C) Hibridación *in situ*.** Se utilizó una sonda de ARN marcada con digoxigenina que corresponde a la secuencia SP<sub>BM40</sub>-Flag-Jerdostatina de 250 pb. La inmunodetección se realizó incubando las secciones con el anticuerpo anti-DIG (1:3500). Las secciones se tiñeron con fast red durante 2 horas en oscuridad. Posteriormente se incubaron con DAPI. Como control de procedimiento de hibridación se utilizó una sonda marcada con digoxigenina para la detección de Tph 2. Escalas 100  $\mu$ m y 10  $\mu$ m. **Aq:** acueducto cerebral; **LGE:** eminencia ganglionar lateral; **Lv:** ventrículo lateral; **CX:** corteza; **PFC:** corteza prefrontal; **Sc:** colículo superior; **Thal:** tálamo; **4V:** cuarto ventrículo; **Ce:** cerebelo; **VTA:** área tegmental ventral; **SN:** sustancia negra.



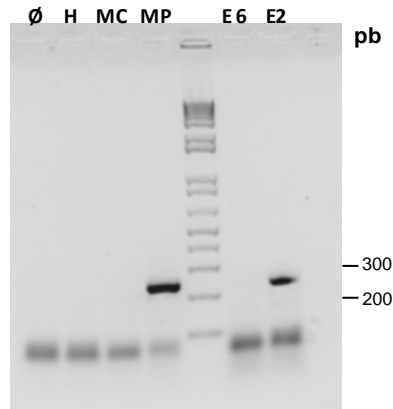
## Resultados y Discusión

---

La observación directa de los cortes, muestra una pérdida de fluorescencia (GFP) en las zonas donde se expresa nestina y, por consiguiente, en las zonas donde se ha producido recombinación (Figura 78 B). Estos resultados están en concordancia con lo observado en el apartado 4.1.1, donde no observamos fluorescencia debida a YFP mediante microscopía de fluorescencia, indicando que la secuencia IRES insertada no funciona.

Una vez se produce la recombinación, se debería transcribir jerdostatina de forma independiente a la expresión de YFP. Sin embargo, el estudio de la transcripción por hibridación *in situ* no arrojó un resultado positivo (Figura 78 C). No obstante, estamos trabajando con un gen que no se encuentra en mamíferos y no tenemos ningún tejido o glándula de reptil que se pudiera utilizar como control de hibridación de la sonda.

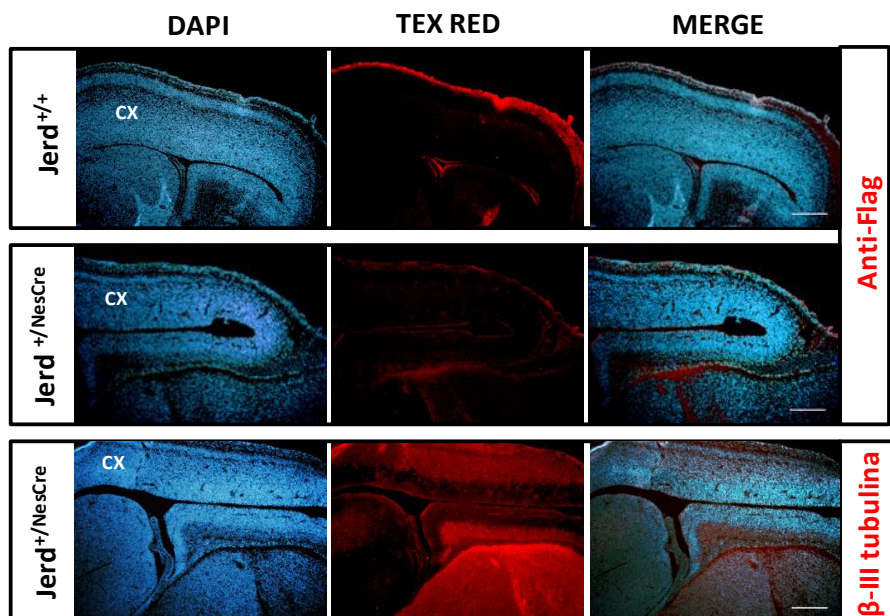
Tras los resultados obtenidos y con la incertidumbre de saber si la sonda de ARN ha funcionado y realmente no hay transcrito o no ha hibridado, se decidió extraer ARN de los cerebros y analizar la presencia de ARNm por RT-PCR (Figura 79).



**Figura 79. Análisis de la transcripción en el estadio embrionario E15 por PCR.**

Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de PCR utilizando los cebadores específicos para amplificar jerdostatina. El ARN total extraído del cerebro de embriones E15 se retrotranscribió a ADNc que se utilizó como molde de la PCR. **H**: ADNc de hígado de ratón silvestre; **MC**: ADNc de células MEF no transfectadas; **MP**: ADNc células MEF transfectadas; **E6**: cDNA de cerebro de ratón *Jerd<sup>+/-</sup>*; **E2**: cDNA de cerebro de ratón *Jerd<sup>+/-NesCre</sup>*. **M**: marcador 1Kb DNA ladder (Invitrogen).

El análisis por PCR del ADNc extraído del cerebro indica que si hay transcripción. Tras este resultado se estudió la expresión de Flag-jerdostatina por inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo monoclonal de ratón anti-Flag.



**Figura 80. Análisis inmunohistoquímico de la expresión en el estadio embrionario E15.** Para el estudio inmunohistoquímico, los cortes fijados se incubaron con anti-Flag (1:250) y se revelaron con un anticuerpo secundario de ratón conjugado a Alexa Fluor 555 (1:650). Posteriormente los cortes se tiñeron con DAPI. Como control de procedimiento de hibridación se utilizó tubulina  $\beta$ -III (componente de los microtúbulos presentes en todas las neuronas). Escala 100 $\mu$ m.

La ausencia de proteína observada por inmunofluorescencia (Figura 80) coincide con los resultados obtenidos por Western blot de los ensayos *in vitro* en las células MEF extraídas de los ratones transgénicos, donde tampoco se observaba la presencia de jerdostatina (Figura 73).

## 6. Discusión

Los resultados obtenidos por PCR parecen indicar que sí se produce recombinación, tanto en las células como en los dos modelos animales transgénicos. La ausencia de proteína tras la recombinación,



podría suscitar la duda de si el sistema Cre/LoxP funciona correctamente o si se está produciendo algún tipo de fallo al recombinar que impide la correcta expresión de jerdostatina. Para descartar esta hipótesis, se purificó, clonó y secuenció el fragmento de 1700 pb, correspondiente a la recombinación, obtenido por PCR y se comparó la secuencia obtenida con la secuencia teórica esperada (Anexo IV).

Una vez comprobada que la recombinación se produce correctamente y que, por tanto, el sistema Cre/LoxP es funcional, nos planteamos que pudiera existir un cambio en la pauta de lectura que diese lugar a una proteína truncada no reconocible por los anticuerpos utilizados. De nuevo, clonamos y secuenciamos el fragmento de 250 pb obtenido de la amplificación del ADNc por PCR utilizando los cebadores específicos para jerdostatina 5´NheI-ATG y JerdXhoI-3´ (Anexo V).

La secuencia del ADNc se corresponde a la insertada y la pauta de lectura es la correcta, sin embargo, nuestros resultados indican que no hay traducción. Teniendo en cuenta que solamente por PCR hemos visto transcrito, cabría pensar que los niveles de ARNm sean tan bajos, que la expresión no es detectada por hibridación *in situ* e inmunohistoquímica. A su vez, esta teoría explicaría que en el modelo animal de expresión condicional Tg Jerd<sup>+ / CreER</sup>, donde seguramente el tratamiento con tamoxifeno no ha sido totalmente efectivo, no se observara transcripción. En este sentido, se podría realizar una PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR) y así, conocer los niveles de expresión del ARNm; no obstante, la finalidad de este modelo animal es la producción de jerdostatina y esta técnica no aportaría ninguna solución a la falta de expresión.





## Resultados y Discusión

---

Finalmente, podemos concluir que no hemos sido capaces de expresar jerdostatina en el modelo transgénico animal. Los resultados, tanto en el modelo celular como animal, indican que, tras la recombinación, se inicia la transcripción a ARNm, pero este debe de sufrir algún tipo de regulación, procesamiento o degradación que impide que se produzca la traducción.

Sin embargo, ¿cómo es posible que se produzca expresión de Flag-Jerdostatina en las células de mamífero (Juarez et al., 2010) y no en los ratones? La respuesta podría radicar en los diferentes elementos moleculares utilizados para producir la expresión de la proteína. Para la generación de jerdostatina recombinante en células de mamífero se utilizó el vector pRc-CMV, este vector contiene un promotor fuerte de la región reguladora del citomegalovirus humano (CMV) que aumenta los niveles de expresión de proteínas que, junto al origen de replicación SV40 consiguen altos niveles de replicación del ADN. Además, se utilizaron células HEK 293T, estas células derivan de células 293, pero expresan de manera estable el antígeno T de SV40 que puede unirse al origen de replicación del SV40 del vector de expresión, amplificar el plásmido transfectado y aumentar así la producción de proteínas de forma eficiente y estable. Aún con todo, la cantidad de Flag-jerdostatina purificada fue muy baja (0.1-0.5 mg/ml).

Para generar un ratón modificado genéticamente de forma dirigida se utilizó un sistema que difiere bastante del anterior. Las tecnologías "gene targeting" en células madre embrionarias permiten la inserción de construcciones transgénicas dentro de sitios genómicos bien



definidos. El vector utilizado, pROSA26PA (Srinivas et al., 2001) contiene dos fragmentos de ADN genómico del locus *ROSA26* (brazos de homología en 5' y 3' respectivamente) que dirigen de forma específica la integración del vector al locus mediante recombinación homóloga. La actividad transcripcional del locus *ROSA26* (Gt (*ROSA*) 26Sor) sugiere que esta región genómica no se ve afectada por las configuraciones de la cromatina que podrían conducir a la represión transcripcional de transgénos insertados, además, la interrupción no manifiesta ningún fenotipo, en consecuencia, es uno de los loci de inserción más fiables y utilizados en la transgénesis dirigida (Friedrich and Soriano, 1991). Una vez integrado en el genoma su expresión se encuentra bajo el dominio del promotor endógeno del locus *ROSA26*. Este promotor Rosa26 es constitutivo y ubicuo, sin embargo, la expresión de transgénos bajo este promotor resulta sólo en una expresión basal, moderada y no es adecuado para altos niveles de expresión (Mao et al., 1999; Nyabi et al., 2009). Además, mediante el uso de sitios loxP flanqueando la secuencia génica insertada, se controla la expresión del transgén, tanto espacial como temporalmente, por la actividad de la recombinasa Cre (Soriano, 1999).

De este modo, parece que el nivel de expresión del transgén en el modelo animal, está determinado por la elección del promotor y los niveles de expresión de la recombinasa Cre. En nuestro caso, todo parece indicar que la falta de expresión podría deberse al promotor Rosa26, que no es lo suficientemente fuerte para permitir un nivel de expresión fisiológico elevado y estable de r-jerdostatina. Hasta ahora, la literatura



## Resultados y Discusión

---

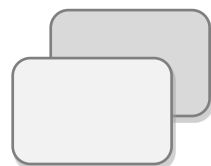
sobre los diferentes promotores es limitada. En los últimos años se han estudiado promotores exógenos posicionados en el locus *ROSA26* como CAG, EF1a y CMV (Madisen et al., 2010; Chen et al., 2011; Tchorz et al., 2012) así como diferentes metodologías para conseguir una expresión eficiente del transgén (Sandhu et al., 2010; Haenebalcke et al., 2013) e incluso para la expresión de miARNs (Hohenstein et al., 2008; Piovan et al., 2014).

En este sentido, para expresar jerdostatina de forma eficiente serían necesarias una serie de modificaciones en el sistema de expresión diseñado: **(1)** la eliminación de la secuencia IRES-YFP por otro gen reportero (dsRed, lacZ, etc.,) en el vector pBIGT, que nos permita identificar la expresión de jerdostatina directamente en las células y tejidos, sin necesidad de recurrir a técnicas moleculares laboriosas y **(2)** la inserción de un promotor exógeno fuerte en el locus *ROSA26*, a fin de facilitar un elevado nivel de expresión del transgén.

Dentro de los avances más importantes en la investigación biomédica, podemos mencionar, sin lugar a dudas, la creación y el desarrollo de animales modificados genéticamente. Este proyecto de ingeniería genética animal ha significado todo un reto para nuestro laboratorio, novatos en biología celular y animal, así con todo, estos resultados nos han aportado nuevos conocimientos y experimentación sobre los animales genéticamente modificados, para en un futuro, generar un ratón transgénico que exprese cualquier disintegrina del veneno de serpiente.

---

## **Discusión general**



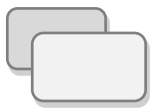




## Las disintegrinas cortas (R/K)TS del veneno de serpiente

Los estudios realizados hasta el momento permiten comprender el papel de las toxinas individualmente, pero no proporcionan una descripción completa de la función real de la toxina en el contexto de todo el veneno (Gutierrez et al., 2009). Existen familias de toxinas, presentes en la mayoría de serpientes venenosas, implicadas en las alteraciones del sistema hemostático, en la necrosis de los tejidos y en la respuesta inflamatoria inducida (Fox and Serrano, 2007; Mackessy, 2010). De las toxinas estudiadas, destacan dos familias de enzimas proteolíticas; las serín proteasas (SVSP) (Serrano, 2013) y metaloproteasas dependientes de  $Zn^{2+}$  (SVMP) (Gutierrez et al., 2010), que actúan principalmente sobre los componentes de la coagulación sanguínea (SVSP) e hidrolizan los componentes de la membrana basal de los capilares (SVMP), causando un desequilibrio del sistema hemostático. Otra familia de toxinas son las fosfolipasas  $A_2$ , que actúan como neurotoxinas presinápticas, miotoxinas, cardiotoxinas e inhibidores de la agregación de plaquetas (Kini, 2005). Además, dentro de los componentes que causan miotoxicidad, encontramos a las CRISPs, proteínas ricas en cisteínas que bloquean la actividad de los canales de  $Ca^{2+}$  y/o K, evitando de este modo la contracción de las células del músculo liso de las arterias (Adade et al., 2014).

A lo largo del presente trabajo de Tesis Doctoral hemos comprobado como la disintegrina corta RTS jerdostatina, junto con las disintegrinas KTS (obtustatina, lebestatina, viperistatina), antagonistas



específicas de la integrina  $\alpha_1\beta_1$ , inhiben la adhesión de las células endoteliales y células del músculo liso vascular y actúan, principalmente, como agentes antiangiogénicos. En este sentido, teniendo en cuenta que el veneno de las serpientes de la familia *Viperidae* se caracteriza por ser hemorrágico, producir daño tisular (necrosis del tejido) e inflamación, la presencia de las disintegrinas cortas (R/K)TS, no parece ser fundamental para la actividad nociva del veneno.

Sin embargo, los venenos son mezclas de moléculas farmacológicamente activas, cuyos efectos biológicos son complejos debido a que los distintos componentes pueden actuar sinérgicamente. Esta observación se apoya en la coexistencia, en los venenos, de disintegrinas con diferentes motivos de reconocimiento que abarcan distintos receptores de integrinas expresados en diferentes tipos celulares (Calvete et al., 2005). De esta forma, las disintegrinas y lectinas de tipo C (Arlinghaus and Eble, 2012) actuarían principalmente sobre las integrinas, modulando la agregación plaquetaria, alterando la composición de la pared vascular y participando en procesos inflamatorios.

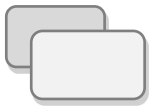
Uno de los objetivos del Laboratorio de Venómica Estructural y Funcional (IBV-CSIC) es conocer el origen, evolución y función de las disintegrinas cortas (R/K)TS. Estas disintegrinas solamente se han encontrado en un número reducido de especies euroasiáticas de origen evolutivo reciente (Lenk et al. 2001), incluidas en los géneros *Macrovipera* y *Daboia*: *M. lebetina obtusa* (Marcinkiewicz et al., 2003; Moreno-Murciano et al., 2003; Monleon et al., 2003; Sanz et al., 2008), *D.*



*mauritanica* (Olfa et al. 2005; Sanz et al., 2006; Makrán et al., 2012), *D. palestinae* (Kisiel et al., 2004) y *D. russelii* (Sanz-Soler et al., 2012). Desde una perspectiva de filogenia molecular, las disintegrinas cortas (R/K)TS se agrupan en un clado diferente del resto de disintegrinas (Sanz-Soler et al. 2012), lo que sugiere un origen evolutivo independiente del de las disintegrinas canónicas (Juárez et al. 2008). En aquellas especies donde la existencia de disintegrinas cortas (R/K)TS ha sido probada, estas proteínas comprenden el 7.8% (lebestatina), 2.8% (obtustatina) y 2% (russelistatina) de las proteínas totales del veneno. Por otra parte, jerdostatina no se encontró entre los componentes del veneno, si no que se obtuvo a partir de una librería de ADNc de la glándula de veneno de *Protobothrops jerdonii* (Sanz et al., 2005).

Recientemente, mediante estudios genómicos realizados en el laboratorio, se amplificó la secuencia de ADN que codifica para el gen RPTLN (gen sin intrones que codifica para jerdostatina) en diferentes subclases de Sauropsidos (reptiles) como Anapsidos (tortugas), Diapsidos (serpientes), y Archosaurios (cocodrilos), pero los intentos para amplificar este gen en anfibios, aves y mamíferos fueron infructuosos. Estos resultados sugieren que el gen RPTLN exhibe una amplia distribución en reptiles (Reptilia), desde hace más de 250 Ma (Sanz-Soler et al., 2016) y que solo recientemente, hace 23-16 Ma, el gen RPTLN ha sido traducido y neofuncionalizado en la glándula del veneno de las especies de un clado específico de serpientes euroasiáticas.



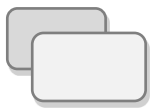


Asimismo, se han descrito niveles muy bajos de expresión de ARNm de RPTLN en los órganos de determinadas especies de reptiles analizadas, pero ninguna evidencia de proteína (Sanz-Soler et al., 2016). En este mismo trabajo, el análisis estructural del ARN de RPTLN reveló que podría tratarse de un mensajero estable, cuyos bajos niveles de expresión, podrían deberse al promotor que regula la expresión de RPTLN, del que nada se conoce. Una de las hipótesis que plantean los autores sugiere que el gen RPTLN codifica para un ARN no codificante largo (lncARN), que tendría una función ancestral reguladora. En los genomas eucariotas existen miles de ARN largos no codificantes de los que actualmente, se desconoce su mecanismo de regulación (Wilusz et al., 2009; Wilusz, 2016). No obstante, la expresión de las disintegrinas (R/K)TS en varios géneros de serpientes y la expresión recombinante en bacterias y células de mamífero de jerdostatina funcionalmente activa, demuestra claramente que RPTLN puede ser transcrito y traducido funcionalmente a proteína en diferentes tipos celulares. En este sentido, los autores postulan que más recientemente, hace 23-16 Ma, una copia del gen RPTLN adquirió una nueva función dentro de la glándula del veneno de las serpientes de los géneros *Macrovipera* y *Daboia* marcando el comienzo de la historia evolutiva de una nueva familia de disintegrinas, antagonistas de la unión de la integrina  $\alpha_1\beta_1$  al colágeno. El mecanismo subyacente que regula que el gen RPTLN sea traducido a proteína, o que se mantenga como ARN no codificante largo, sigue siendo desconocido hasta el momento.



La existencia de ARN, pero no de proteína, en las especies de serpiente estudiadas en el trabajo de Sanz-Soler y colaboradores (2016), se asemeja a lo que hemos observado en los ratones transgénicos (Tg  $Jerd^{+/CreER}$ , Tg  $Jerd^{+/NesCre}$ ). La ausencia de proteína, podrían deberse a la existencia de un mecanismo que regula que el gen sea traducido, posiblemente a nivel del promotor. Por lo tanto, podríamos especular que el gen en condiciones favorables (promotor fuerte, origen de replicación SV40, etc.) se expresa en forma de proteína, como hemos observado en las células HEK293 GnT1, sin embargo, en condiciones de expresión basal (promotor Rosa26) daría lugar a un ARN no transcrito.

Además, las disintegrinas se sintetizan como precursores inactivos (propéptidos) que necesitan ser procesados (proteólisis) para su activación. En el caso de las disintegrinas del veneno de serpiente, el procesamiento proteolítico de las proformas se produce antes de la liberación del contenido de las vesículas en el lumen de la glándula de veneno (Fox and Serrano, 2008). En la presente Tesis Doctoral, el estudio de expresión de jerdostatina en células de mamífero transfectadas con un vector que contenía la secuencia íntegra de RPTLN (vSP, propéptido y dominio disintegrina), no dio lugar a la secreción de jerdostatina al medio de cultivo. Como consecuencia, se descartaron estos pre-prodominios. No obstante, si como se sugiere existe una regulación a nivel del ARN, cuya estabilidad podría depender de su plegamiento o de otros factores, la eliminación de los pre-prodominios podría haber afectado a su regulación y por tanto a su expresión en el mamífero transgénico.



Finalmente, a lo largo del presente trabajo de Tesis Doctoral hemos estudiado las características biológicas y funcionales de la disintegrina corta jerdostatina, antagonista de la unión de la integrina  $\alpha_1\beta_1$  al colágeno, destacando su actividad como agente inhibidor de la adhesión y resaltando la posibilidad de utilizar las disintegrinas cortas como herramientas moleculares en la terapia de diferentes patologías asociadas a  $\alpha_1\beta_1$ , como son las enfermedades cardiovasculares y determinados tipos de cáncer. En este sentido, se intentó desarrollar un modelo transgénico condicional para evaluar la actividad de jerdostatina transgénica sobre el crecimiento de tumores dependientes de angiogénesis.

Los estudios genómicos recientemente realizados en el laboratorio sobre el origen, evolución y función de estas disintegrinas cortas (R/K)TS aportan una nueva hipótesis sobre la falta de expresión de jerdostatina observada en los animales transgénicos generados, resaltando la existencia de una regulación del gen RPTLN en reptiles. Sin embargo, la comprensión del mecanismo implicado en esta regulación requiere de más estudios moleculares, en particular, de la búsqueda, análisis y comparación en los genes RPTLN codificantes y no codificantes, de regiones o motivos que contribuyen a regular esta expresión dual InARN vs proteína, del gen RPTLN. La investigación científica resulta del trabajo acumulativo en el tiempo de diversos grupos. La comprensión y aplicación del conocimiento desvelado en esta Tesis requieren estudios detallados que justifican la realización de otra(s) Tesis Doctoral(es) que continúen las investigaciones detalladas en este trabajo de Doctorado.

---

# Conclusiones







## Capítulo I

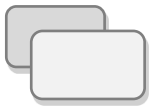
1. Contrariamente a lo que ocurre en la unión de la integrina  $\alpha_1\beta_1$  al colágeno en condiciones naturales, la interacción del ectodominio de esta integrina con r-jerdostatina es independiente de la presencia de cationes divalentes  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ .

2. Jerdostatina recombinante previene la unión del ectodominio de la integrina  $\alpha_1\beta_1$  al fragmento CB3 del colágeno tipo IV con una  $IC_{50}$  de 30 nM.

3. El dominio  $\alpha_1$ -A de unión a colágeno, no contiene el sitio de reconocimiento de alta afinidad de jerdostatina. La interacción de CB3 al dominio  $\alpha_1$ -A se produce con independencia de la presencia de r-jerdostatina, indicando que jerdostatina y CB3 utilizan diferentes lugares de unión en la integrina.

4. El modelo de interacción o "docking" de  $\alpha_1\beta_1$  y jerdostatina sugiere que el bucle de reconocimiento de jerdostatina interacciona con la hélice  $\alpha_7$  del dominio  $\alpha_1$ -A y la subunidad  $\beta_1$ . En este modelo, la unión de jerdostatina impediría el movimiento de la hélice, alterando los cambios conformacionales que permiten la unión del colágeno, manteniendo a la integrina en un estado de baja afinidad.

5. R-jerdostatina inhibe la adhesión de las células del músculo liso de aorta de rata sobre CB3 de manera dependiente de dosis. En presencia de este antagonista, las células pierden sus adhesiones, se hacen redondas y finalmente se sueltan de su sustrato.



**6.** El estudio de la adhesión de células del músculo liso de aorta humana sobre CB3 en presencia de inhibidores de  $\alpha_1\beta_1$  y  $\alpha_2\beta_1$  corrobora la hipótesis de complementariedad funcional que existe entre estos dos receptores de colágeno y destaca su papel como las principales integrinas involucradas en las adhesiones focales de las células del músculo liso vascular.

**7.** La migración de las células del músculo liso de rata sobre CB3 es, en parte, dependiente de la integrina  $\alpha_1\beta_1$ , pero no de  $\alpha_2\beta_1$ . Las células, utilizan un mecanismo migratorio y proliferativo alternativo, mediado a través de otros receptores integrinas.

**8.** El descubrimiento de la regulación de los efectos de la angiotensina II a través de la integrina  $\alpha_1\beta_1$ , promoviendo la migración y proliferación de las células del músculo liso vascular, sugiere que las disintegrinas cortas podrían actuar como herramientas moleculares para el tratamiento terapéutico de ciertas enfermedades cardiovasculares.

**9.** Jerdostatina recombinante inhibe significativamente la formación de nuevos vasos, actuando como un agente antiangiogénico. La evaluación de la actividad de antagonistas frente a  $\alpha_1\beta_1$  y  $\alpha_2\beta_1$  indica que ambos receptores participan en la angiogénesis de células HUVEC sobre colágeno, mediada por el factor de crecimiento del endotelio vascular.



## Capítulo II

**10.** La imposibilidad de secretar al medio extracelular r-jerdostatina, clonada como pre-pro-proteína en un plásmido de expresión en células de mamífero, sugiere que el ambiente celular ofrecido no es el adecuado para la traducción y/o procesamiento de la proteína madura. Esta conclusión está avalada por el hecho de que la inserción de un péptido señal de mamíferos (SP<sub>BM40</sub>), la supresión del propéptido y la inserción de una etiqueta Flag en el extremo N-terminal, si permitió la expresión y secreción de la proteína recombinante al medio celular.

**11.** La disintegrina recombinante FlagJerdostatina, purificada del medio celular, inhibe la unión del ectodominio de la integrina  $\alpha_1\beta_1$  al fragmento CB3 del colágeno tipo IV, con una IC<sub>50</sub> de 180 nM y bloquea la adhesión de células RuGli a CB3, convirtiéndose en la primera disintegrina corta expresada en células de mamífero y secretada al medio de forma soluble y activa.

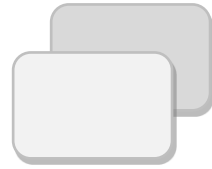
**12.** El modelo animal transgénico generado no expresa cantidades detectables de jerdostatina. La observación de ARNm por PCR en las células MEF y en tejido de los ratones transgénicos indican que existe algún tipo de regulación, procesamiento o degradación que impide la traducción de jerdostatina. El reciente descubrimiento de la existencia de un mecanismo regulador del gen RPTLN en reptiles explicaría, en cierta manera, los resultados observados en el ratón transgénico. Sin embargo, la comprensión del mecanismo implicado en esta regulación requiere futuros estudios moleculares.





---

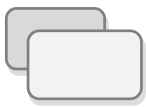
## **Bibliografía**







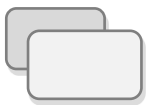
- Abair, T. D., Sundaramoorthy, M., Chen, D., Heino, J., Ivaska, J., Hudson, B. G., Sanders, C. R., Pozzi, A., and Zent, R. (2008). Cross-talk between integrins alpha1beta1 and alpha2beta1 in renal epithelial cells. *Exp Cell Res* **314**, 3593-3604
- Abraham, S., Kogata, N., Fassler, R., and Adams, R. H. (2008). Integrin beta1 subunit controls mural cell adhesion, spreading, and blood vessel wall stability. *Circ Res* **102**, 562-570
- Adade, C. M., Carvalho, A. L., Tomaz, M. A., Costa, T. F., Godinho, J. L., Melo, P. A., Lima, A. P., Rodrigues, J. C., Zingali, R. B., Souto-Pradón, T. (2014). Crovirin, a snake venom cysteine-rich secretory protein (CRISP) with promising activity against Trypanosomes and Leishmania. *PLoS Negl Trop Dis.* **8**(10):e3252
- Aikio, M., Alahuhta, I., Nurmenniemi, S., Suojanen, J., Palovuori, R., Teppo, S., Sorsa, T., Lopez-Otin, C., Pihlajaniemi, T., Salo, T., Heljasvaara, R., and Nyberg, P. (2012). Arresten, a collagen-derived angiogenesis inhibitor, suppresses invasion of squamous cell carcinoma. *PLoS One* **7**, e51044
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2007). *Molecular Biology of the Cell*. 5th edition. Garland Science.
- Antoch, M. P., Song, E. J., Chang, A. M., Vitaterna, M. H., Zhao, Y., Wilsbacher, L. D., Sangoram, A. M., King, D. P., Pinto, L. H., and Takahashi, J. S. (1997). Functional identification of the mouse circadian Clock gene by transgenic BAC rescue. *Cell* **89**, 655-667
- Araki, K., Imaizumi, T., Okuyama, K., Oike, Y., and Yamamura, K. (1997). Efficiency of recombination by Cre transient expression in embryonic stem cells: comparison of various promoters. *J Biochem* **122**, 977-982
- Arlinghaus, F. T., Eble, J. A. (2012). C-type lectin-like proteins from snake venoms. *Toxicol.* **60**(4):512-9
- Arnaout, M. A., Mahalingam, B., and Xiong, J. P. (2005). Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 381-410
- Artoni, A., Li, J., Mitchell, B., Ruan, J., Takagi, J., Springer, T. A., French, D. L., and Collier, B. S. (2004). Integrin beta3 regions controlling binding of murine mAb 7E3: implications for the mechanism of integrin alphaIIb beta3 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13114-13120
- Askari, J. A., Buckley, P. A., Mould, A. P., and Humphries, M. J. (2009). Linking integrin conformation to function. *J Cell Sci* **122**, 165-170
- Aumailley, M., and Timpl, R. (1986). Attachment of cells to basement membrane collagen type IV. *J Cell Biol* **103**, 1569-1575
- Avraamides, C. J., Garmy-Susini, B., and Varnier, J. A. (2008). Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature reviews. Cancer* **8**, 604-617
- Barczyk, M., Carracedo, S., and Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell Tissue Res* **339**, 269-280



- Bazaa, A., Marrakchi, N., El Ayeb, M., Sanz, L., and Calvete, J. J. (2005). Snake venomomics: comparative analysis of the venom proteomes of the Tunisian snakes *Cerastes cerastes*, *Cerastes vipera* and *Macrovipera lebetina*. *Proteomics* **5**, 4223-4235
- Belkin, V. M., Belkin, A. M., and Koteliensky, V. E. (1990). Human smooth muscle VLA-1 integrin: purification, substrate specificity, localization in aorta, and expression during development. *J Cell Biol* **111**, 2159-2170
- Bendeck, M. P., Irvin, C., Reidy, M., Smith, L., Mulholland, D., Horton, M., and Giachelli, C. M. (2000). Smooth muscle cell matrix metalloproteinase production is stimulated via alpha(v)beta(3) integrin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 1467-1472
- Benjamin, D. K., Schelonka, R., White, R., Holley, H. P., Bifano, E., Cummings, J., Adcock, K., Kaufman, D., Puppala, B., Riedel, P., Hall, B., White, J., Cotton, C. M., and investigators, S. a. p. (2006). A blinded, randomized, multicenter study of an intravenous *Staphylococcus aureus* immune globulin. *J Perinatol* **26**, 290-295
- Bennett, J. S. (2005). Structure and function of the platelet integrin alphaIIb beta3. *J Clin Invest* **115**, 3363-3369
- Bishop, G. G., McPherson, J. A., Sanders, J. M., Hesselbacher, S. E., Feldman, M. J., McNamara, C. A., Gimple, L. W., Powers, E. R., Mousa, S. A., and Sarembock, I. J. (2001). Selective alpha(v)beta(3)-receptor blockade reduces macrophage infiltration and restenosis after balloon angioplasty in the atherosclerotic rabbit. *Circulation* **103**, 1906-1911
- Bouaouina, M., Lad, Y., and Calderwood, D. A. (2008). The N-terminal domains of talin cooperate with the phosphotyrosine binding-like domain to activate beta1 and beta3 integrins. *J Biol Chem* **283**, 6118-6125
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. H., and Robertson, E. (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* **309**, 255-256
- Brakebusch, C., and Fassler, R. (2003). The integrin-actin connection, an eternal love affair. *Embo J* **22**, 2324-2333
- Brocard, J., Feil, R., Chambon, P., and Metzger, D. (1998). A chimeric Cre recombinase inducible by synthetic, but not by natural ligands of the glucocorticoid receptor. *Nucleic Acids Res* **26**, 4086-4090
- Brown, M. C., Staniszewska, I., Del Valle, L., Tuszynski, G. P., and Marcinkiewicz, C. (2008). Angiostatic activity of obtustatin as alpha1beta1 integrin inhibitor in experimental melanoma growth. *Int J Cancer* **123**, 2195-2203
- Brown, M. C., Eble, J. A., Calvete, J. J., and Marcinkiewicz, C. (2009). Structural requirements of KTS-disintegrins for inhibition of alpha(1)beta(1) integrin. *Biochem J* **417**, 95-101



- Brown, T. (2001). Southern blotting. *Curr Protoc Immunol* **Chapter 10**, Unit 10 16A
- Brust, A., Sunagar, K., Undheim, E. A., Vetter, I., Yang, D. C., Casewell, N. R., Jackson, T. N., Koludarov, I., Alewood, P. F., Hodgson, W. C., Lewis, R. J., King, G. F., Antunes, A., Hendriks, I., and Fry, B. G. (2013). Differential evolution and neofunctionalization of snake venom metalloprotease domains. *Mol Cell Proteomics* **12**, 651-663
- Bunni, M. A., Kramarenko, I., Walker, L., Raymond, J. R., and Garnovskaya, M. N. (2010). Role of integrins in angiotensin II-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **300**, C647-656
- Calderwood, D. A., Tuckwell, D. S., Eble, J., Kuhn, K., and Humphries, M. J. (1997). The integrin alpha1 A-domain is a ligand binding site for collagens and laminin. *J Biol Chem* **272**, 12311-12317
- Calderwood, D. A., Yan, B., de Pereda, J. M., Alvarez, B. G., Fujioka, Y., Liddington, R. C., and Ginsberg, M. H. (2002). The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins. *J Biol Chem* **277**, 21749-21758
- Calderwood, D. A., Campbell, I. D., and Critchley, D. R. (2013). Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 503-517
- Calvanese, L., Falcigno, L., and D'Auria, G. (2015). Essential dynamics analysis captures the concerted motion of the integrin-binding site in jerdostatin, an RTS disintegrin. *Biopolymers* **103**, 158-166
- Calvete, J. J., Schafer, W., Soszka, T., Lu, W. Q., Cook, J. J., Jameson, B. A., and Niewiarowski, S. (1991). Identification of the disulfide bond pattern in albolabrin, an RGD-containing peptide from the venom of *Trimeresurus albolabris*: significance for the expression of platelet aggregation inhibitory activity. *Biochemistry* **30**, 5225-5229
- Calvete, J. J., Moreno-Murciano, M. P., Theakston, R. D., Kisiel, D. G., and Marcinkiewicz, C. (2003). Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. *Biochem J* **372**, 725-734
- Calvete, J. J. (2005). Structure-function correlations of snake venom disintegrins. *Curr Pharm Des* **11**, 829-835
- Calvete, J. J., Marcinkiewicz, C., Monleon, D., Esteve, V., Celda, B., Juarez, P., and Sanz, L. (2005). Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. *Toxicon* **45**, 1063-1074
- Calvete, J. J., Marcinkiewicz, C., and Sanz, L. (2007a). KTS and RTS-disintegrins: anti-angiogenic viper venom peptides specifically targeting the alpha 1 beta 1 integrin. *Curr Pharm Des* **13**, 2853-2859
- Calvete, J. J., Juarez, P., and Sanz, L. (2007b). Snake venomomics. Strategy and applications. *J Mass Spectrom* **42**, 1405-1414

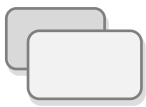


- Calvete, J. J., Juárez, P., and Sanz, L. (2009). Snake venomomics and disintegrins. Portrait and evolution of a family of snake venom integrin antagonists. *In: Mackessy, S.P. (Ed.), Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles. CRC Press, Taylor & Francis, Boca Ratón*, 337-357 (Chapter 317)
- Calvete, J. J. (2010). Brief history and molecular determinants of snake venom disintegrin evolution. *Toxins and Hemostasis: From Bench to Bedside*. Kini, R.M., Markland, F., McLane, M. A., Morita, T. (Eds.). Springer, Amsterdam, (Chapter 218)285-300
- Calvete, J. J. (2011). Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming. *Expert Rev Proteomics* **8**, 739-758
- Calvete, J. J. (2013). The continuing saga of snake venom disintegrins. *Toxicon* **62**, 40-49
- Capecchi, M. R. (1980). High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell* **22**, 479-488
- Capecchi, M. R. (2001). Generating mice with targeted mutations. *Nat Med* **7**, 1086-1090
- Capecchi, M. R. (2005). Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genet* **6**, 507-512
- Carbajo, R. J., Sanz, L., Mosulen, S., Perez, A., Marcinkiewicz, C., Pineda-Lucena, A., and Calvete, J. J. (2011). NMR structure and dynamics of recombinant wild type and mutated jerdostatin, a selective inhibitor of integrin alpha1beta1. *Proteins* **79**, 2530-2542
- Carbajo, R. J., Sanz, L., Perez, A., and Calvete, J. J. (2015). NMR structure of bitistatin a missing piece in the evolutionary pathway of snake venom disintegrins. *FEBS J* **282**, 341-360
- Carlson, T. R., Hu, H., Braren, R., Kim, Y. H., and Wang, R. A. (2008). Cell-autonomous requirement for beta1 integrin in endothelial cell adhesion, migration and survival during angiogenesis in mice. *Development* **135**, 2193-2202
- Casewell, N. R. (2012). On the ancestral recruitment of metalloproteinases into the venom of snakes. *Toxicon* **60**, 449-454
- Casewell, N. R., Wagstaff, S. C., Wuster, W., Cook, D. A., Bolton, F. M., King, S. I., Pla, D., Sanz, L., Calvete, J. J., and Harrison, R. A. (2014). Medically important differences in snake venom composition are dictated by distinct postgenomic mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 9205-9210
- Castle, W. E. (1906). Yellow Mice and Gametic Purity. *Science* **24**, 275-281
- Castle, W. E., and Little, C. C. (1910). On a Modified Mendelian Ratio among Yellow Mice. *Science* **32**, 868-870
- Chen, C. M., Krohn, J., Bhattacharya, S., and Davies, B. (2011). A comparison of exogenous promoter activity at the ROSA26 locus using a PhiC31 integrase mediated cassette exchange approach in mouse ES cells. *PLoS One* **6**, e23376



- Chen, X., Su, Y., Fingleton, B., Acuff, H., Matrisian, L. M., Zent, R., and Pozzi, A. (2005). Increased plasma MMP9 in integrin alpha1-null mice enhances lung metastasis of colon carcinoma cells. *Int J Cancer* **116**, 52-61
- Chin, Y. K., Headey, S. J., Mohanty, B., Patil, R., McEwan, P. A., Swarbrick, J. D., Mulhern, T. D., Emsley, J., Simpson, J. S., and Scanlon, M. J. (2013). The structure of integrin alpha1I domain in complex with a collagen-mimetic peptide. *J Biol Chem* **288**, 36796-36809
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-159
- Chouhan, B. S., Kapyla, J., Denessiouk, K., Denesyuk, A., Heino, J., and Johnson, M. S. (2014). Early chordate origin of the vertebrate integrin alpha domains. *PLoS One* **9**, e112064
- Chu, V. T., Weber, T., Graf, R., Sommermann, T., Petsch, K., Sack, U., Volchkov, P., Rajewsky, K., and Kuhn, R. (2016). Efficient generation of Rosa26 knock-in mice using CRISPR/Cas9 in C57BL/6 zygotes. *BMC Biotechnol* **16**, 4
- Cines, D. B., Pollak, E. S., Buck, C. A., Loscalzo, J., Zimmerman, G. A., McEver, R. P., Pober, J. S., Wick, T. M., Konkle, B. A., Schwartz, B. S., Barnathan, E. S., McCrae, K. R., Hug, B. A., Schmidt, A. M., and Stern, D. M. (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* **91**, 3527-3561
- Clark, E. A., and Brugge, J. S. (1995). Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* **268**, 233-239
- Cluzel, C., Saltel, F., Lussi, J., Paulhe, F., Imhof, B. A., and Wehrle-Haller, B. (2005). The mechanisms and dynamics of (alpha)v(beta)3 integrin clustering in living cells. *J Cell Biol* **171**, 383-392
- Clyman, R. I., McDonald, K. A., and Kramer, R. H. (1990). Integrin receptors on aortic smooth muscle cells mediate adhesion to fibronectin, laminin, and collagen. *Circ Res* **67**, 175-186
- Clyman, R. I., Mauray, F., and Kramer, R. H. (1992). Beta 1 and beta 3 integrins have different roles in the adhesion and migration of vascular smooth muscle cells on extracellular matrix. *Exp Cell Res* **200**, 272-284
- Coligan, J. E. (2003). *Short protocols in protein science: a compendium of methods from Current protocols in protein science*, Wiley, Hoboken
- Colorado, P. C., Torre, A., Kamphaus, G., Maeshima, Y., Hopfer, H., Takahashi, K., Volk, R., Zamborsky, E. D., Herman, S., Sarkar, P. K., Ericksen, M. B., Dhanabal, M., Simons, M., Post, M., Kufe, D. W., Weichselbaum, R. R., Sukhatme, V. P., and Kalluri, R. (2000). Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen. *Cancer Res* **60**, 2520-2526
- Costantini, F., and Lacy, E. (1981). Introduction of a rabbit beta-globin gene into the mouse germ line. *Nature* **294**, 92-94

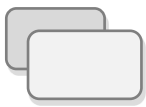




- Crognier, E., Baali, A., Hilali, M. K., Villena, M., and Vargas, E. (2006). Preference for sons and sex ratio in two non-Western societies. *Am J Hum Biol* **18**, 325-334
- Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D. R., and Yamada, K. M. (2001). Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* **294**, 1708-1712
- Daidone, I., Aschi, M., Patamia, M., Bozzi, A., and Petruzzelli, R. (2013). Structural and dynamical properties of KTS-disintegrins: A comparison between Obtustatin and Lebestatin. *Biopolymers* **99**, 47-54
- De Santana Evangelista, K., Andrich, F., Figueiredo de Rezende, F., Niland, S., Cordeiro, M. N., Horlacher, T., Castelli, R., Schmidt-Hederich, A., Seeberger, P. H., Sanchez, E. F., Richardson, M., Gomes de Figueiredo, S., and Eble, J. A. (2009). Plumieribetin, a fish lectin homologous to mannose-binding B-type lectins, inhibits the collagen-binding alpha1beta1 integrin. *J Biol Chem* **284**, 34747-34759
- Defilippi, P., van Hinsbergh, V., Bertolotto, A., Rossino, P., Silengo, L., and Tarone, G. (1991). Differential distribution and modulation of expression of alpha 1/beta 1 integrin on human endothelial cells. *J Cell Biol* **114**, 855-863
- Dickeson, S. K., Walsh, J. J., and Santoro, S. A. (1997). Contributions of the I and EF hand domains to the divalent cation-dependent collagen binding activity of the alpha2beta1 integrin. *J Biol Chem* **272**, 7661-7668
- Dickeson, S. K., and Santoro, S. A. (1998). Ligand recognition by the I domain-containing integrins. *Cell Mol Life Sci* **54**, 556-566
- Doetschman, T., Gregg, R. G., Maeda, N., Hooper, M. L., Melton, D. W., Thompson, S., and Smithies, O. (1987). Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* **330**, 576-578
- Doran, A. C., Meller, N., and McNamara, C. A. (2008). Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**, 812-819
- Doyle, A., McGarry, M. P., Lee, N. A., and Lee, J. J. (2012). The construction of transgenic and gene knockout/knockin mouse models of human disease. *Transgenic Res* **21**, 327-349
- Durand, M. J., and Gutterman, D. D. (2013). Diversity in mechanisms of endothelium-dependent vasodilation in health and disease. *Microcirculation* **20**, 239-247
- Eble, B. E., Busch, M. P., Gultinan, A. M., Khayam-Bashi, H., and Murphy, E. L. (1993). Determination of human T lymphotropic virus type by polymerase chain reaction and correlation with risk factors in northern California blood donors. *J Infect Dis* **167**, 954-957
- Eble, J. A., Beermann, B., Hinz, H. J., and Schmidt-Hederich, A. (2001). alpha 2beta 1 integrin is not recognized by rhodocytin but is the specific, high affinity target of rhodocetin, an RGD-independent disintegrin and potent inhibitor of cell adhesion to collagen. *J Biol Chem* **276**, 12274-12284



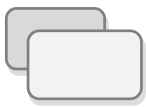
- Eble, J. A., Niland, S., Dennes, A., Schmidt-Hederich, A., Bruckner, P., and Brunner, G. (2002). Rhodocetin antagonizes stromal tumor invasion in vitro and other alpha2beta1 integrin-mediated cell functions. *Matrix Biol* **21**, 547-558
- Eble, J. A., and Tuckwell, D. S. (2003). The alpha2beta1 integrin inhibitor rhodocetin binds to the A-domain of the integrin alpha2 subunit proximal to the collagen-binding site. *Biochem J* **376**, 77-85
- Eble, J. A. (2005). Collagen-binding integrins as pharmaceutical targets. *Curr Pharm Des* **11**, 867-880
- Eble, J. A., Niland, S., Bracht, T., Mormann, M., Peter-Katalinic, J., Pohlentz, G., and Stetefeld, J. (2009). The alpha2beta1 integrin-specific antagonist rhodocetin is a cruciform, heterotetrameric molecule. *FASEB J* **23**, 2917-2927
- Ekhholm, E., Hankenson, K. D., Uusitalo, H., Hiltunen, A., Gardner, H., Heino, J., and Penttinen, R. (2002). Diminished callus size and cartilage synthesis in alpha 1 beta 1 integrin-deficient mice during bone fracture healing. *Am J Pathol* **160**, 1779-1785
- Emsley, J., Knight, C. G., Farndale, R. W., Barnes, M. J., and Liddington, R. C. (2000). Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1. *Cell* **101**, 47-56
- Evans, M. J., and Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154-156
- Fassler, R., and Meyer, M. (1995). Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice. *Genes Dev* **9**, 1896-1908
- Feil, S., Valtcheva, N., and Feil, R. (2009). Inducible Cre mice. *Methods Mol Biol* **530**, 343-363
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* **285**(21):1182-6
- Folkman, J., and Shing, Y. (1992). Angiogenesis. *J Biol Chem* **267**, 10931-10934
- Fournier, A. K., Campbell, L. E., Castagnino, P., Liu, W. F., Chung, B. M., Weaver, V. M., Chen, C. S., and Assoian, R. K. (2008). Rac-dependent cyclin D1 gene expression regulated by cadherin- and integrin-mediated adhesion. *J Cell Sci* **121**, 226-233
- Fox, J. W., and Serrano, S. M. (2005). Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 repolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* **45**, 969-985
- Fox, J. W., and Serrano, S. M. (2007). Approaching the golden age of natural product pharmaceuticals from venom libraries: an overview of toxins and toxin-derivatives currently involved in therapeutic or diagnostic applications. *Curr Pharm Des* **13**, 2927-2934
- Fox, J. W., and Serrano, S. M. (2008). Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *FEBS J* **275**, 3016-3030



- Friedrich, G., and Soriano, P. (1991). Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev* **5**, 1513-1523
- Fry, B. G., Scheib H., van der Weerd L., Young B., McNaughtan J., Ryan Ramjan S. F., Vidal N., Poelmann R. E., Norman J. A. (2008). Evolution of an arsenal: Structural and functional diversification of the venom system in the advanced snakes (Caenophidia). *Mol. Cell. Proteomics* **7**, 215–246
- Gabriel, H. M., and Oliveira, E. I. (2006). Role of abciximab in the treatment of coronary artery disease. *Expert Opin Biol Ther* **6**, 935-942
- Gan, Z. R., Gould, R. J., Jacobs, J. W., Friedman, P. A., and Polokoff, M. A. (1988). Echistatin. A potent platelet aggregation inhibitor from the venom of the viper, *Echis carinatus*. *J Biol Chem* **263**, 19827-19832
- Gardner, H., Kreidberg, J., Kotliansky, V., and Jaenisch, R. (1996). Deletion of integrin alpha 1 by homologous recombination permits normal murine development but gives rise to a specific deficit in cell adhesion. *Dev Biol* **175**, 301-313
- Gardner, H., Broberg, A., Pozzi, A., Laato, M., and Heino, J. (1999). Absence of integrin alpha1beta1 in the mouse causes loss of feedback regulation of collagen synthesis in normal and wounded dermis. *J. Cell Sci.* **112**, 263-272
- Gardner, H. (2003). Integrin alpha1beta1 in *I domains in integrins* (Gullberg, D. ed.), Landes Bioscience, Georgetown, Texas, USA. pp 25-39
- Georgieva, D., Arni, R. K., and Betzel, C. (2008). Proteome analysis of snake venom toxins: pharmacological insights. *Expert Rev Proteomics* **5**, 787-797
- Gerthoffer, W. T. (2007). Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration. *Circ Res* **100**, 607-621
- Ghazaryan, N. A., Ghulikyan, L. A., Kishmiryan, A. V., Kirakosyan, G. R., Nazaryan, O. H., Ghevondyan, T. H., Zakaryan, N. A., and Ayzazyan, N. M. (2015). Anti-tumor effect investigation of obtustatin and crude *Macrovipera lebetina obtusa* venom in S-180 sarcoma bearing mice. *Eur J Pharmacol* **764**, 340-345
- Giaever, I., and Keese, C. R. (1991). Micromotion of mammalian cells measured electrically. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7896-7900
- Giancotti, F. G., and Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. *Science* **285**, 1028-1032
- Ginsberg, M. H. (2014). Integrin activation. *BMB Rep* **47**, 655-659
- Giraldo, P., and Montoliu, L. (2001). Size matters: use of YACs, BACs and PACs in transgenic animals. *Transgenic Res* **10**, 83-103
- Glukhova, M. A., Frid, M. G., and Kotliansky, V. E. (1991). Phenotypic changes of human aortic smooth muscle cells during development and in the adult vessel. *Am J Physiol* **261**, 78-80
- Goldschmidt, R. (1951). L. Cuenot: 1866-1951. *Science* **113**, 309-310



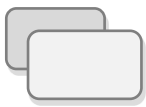
- Gomez, D., and Owens, G. K. (2012). Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* **95**, 156-164
- Goodman, S. L., and Picard, M. (2012). Integrins as therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci* **33**, 405-412
- Gordon, J. W., Scangos, G. A., Plotkin, D. J., Barbosa, J. A., and Ruddle, F. H. (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 7380-7384
- Gordon, J. W., and Ruddle, F. H. (1981). Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science* **214**, 1244-1246
- Gordon, M.K., and Hahn, R.A. (2010). Collagens. *Cell Tissue Res*. **339**, 247-57
- Gossen, M., and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5547-5551
- Gossler, A., Doetschman, T., Korn, R., Serfling, E., and Kemler, R. (1986). Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 9065-9069
- Gotwals, P. J., Chi-Rosso, G., Lindner, V., Yang, J., Ling, L., Fawell, S. E., and Koteliansky, V. E. (1996). The alpha1 beta1 integrin is expressed during neointima formation in rat arteries and mediates collagen matrix reorganization. *J. Clin. Invest.* **97**, 2469-2477
- Gotwals, P. J., Chi-Rosso, G., Ryan, S. T., Sizing, I., Zafari, M., Benjamin, C., Singh, J., Venyaminov, S. Y., Pepinsky, R. B., and Koteliansky, V. (1999). Divalent cations stabilize the alpha 1 beta 1 integrin I domain. *Biochemistry* **38**, 8280-8288
- Grenz, H., Carbonetto, S., and Goodman, S. L. (1993). Alpha 3 beta 1 integrin is moved into focal contacts in kidney mesangial cells. *J Cell Sci* **105** (Pt 3), 739-751
- Gupta, S. K., Oommen, S., Aubry, M. C., Williams, B. P., and Vlahakis, N. E. (2013). Integrin alpha9beta1 promotes malignant tumor growth and metastasis by potentiating epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* **32**, 141-150
- Gutierrez, J. M., and Rucavado, A. (2000). Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* **82**, 841-850
- Gutierrez, J. M., Rucavado, A., Escalante, T., and Diaz, C. (2005). Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon* **45**, 997-1011
- Gutierrez, J. M., Rucavado, A., Escalante, T., Lomonte, B., Angulo, Y., Fox, J. W. (2009). Tissue pathology induced by snake venoms: how to understand a complex pattern of alterations from a systems biology perspective. *Toxicon* **55**, 166-170
- Gutierrez, J. M., Rucavado, A., and Escalante, T. (2010). Snake venom metalloproteinases. Biological roles and participation in the pathophysiology



- of envenomation. *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*. Mackessy, S.P. (Ed.).
- Haenebalcke, L., Goossens, S., Naessens, M., Kruse, N., Farhang Ghahremani, M., Bartunkova, S., Haigh, K., Pieters, T., Dierickx, P., Drogat, B., Nyabi, O., Wirth, D., and Haigh, J. J. (2013). Efficient ROSA26-based conditional and/or inducible transgenesis using RMCE-compatible F1 hybrid mouse embryonic stem cells. *Stem Cell Rev* **9**, 774-785
- Hailey, S., Adams, E., Penn, R., Wong, A., and McLane, M. A. (2013). Effect of the disintegrin eristostatin on melanoma-natural killer cell interactions. *Toxicon* **61**, 83-93
- Halayko, A. J., and Solway, J. (2001). Molecular mechanisms of phenotypic plasticity in smooth muscle cells. *J Appl Physiol* **90**, 358-368
- Hamaia, S. W., Pugh, N., Raynal, N., Némóz, B., Stone, R., Gullberg, D., Bihan, D., Farndale, R. W. (2012). Mapping of potent and specific binding motifs, GLOGEN and GVOGEA, for integrin  $\alpha 1\beta 1$  using collagen toolkits II and III. *J Biol Chem* **287**, 26019-28
- Hamilton, D. L., and Abremski, K. (1984). Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites. *J Mol Biol* **178**, 481-486
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674
- Hao, H., Gabbiani, G., and Bochaton-Piallat, M. L. (2003). Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 1510-1520
- Hayashi, S., and McMahon, A. P. (2002). Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Dev Biol* **244**, 305-318
- Hedin, U., Bottger, B. A., Forsberg, E., Johansson, S., and Thyberg, J. (1988). Diverse effects of fibronectin and laminin on phenotypic properties of cultured arterial smooth muscle cells. *J Cell Biol* **107**, 307-319
- Heino, J. (2000). The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions. *Matrix Biol* **19**, 319-323
- Hemler, M. E., Glass, D., Coblyn, J. S., and Jacobson, J. G. (1986). Very late activation antigens on rheumatoid synovial fluid T lymphocytes. Association with stages of T cell activation. *J Clin Invest* **78**, 696-702
- Hohenstein, P., Slight, J., Ozdemir, D. D., Burn, S. F., Berry, R., and Hastie, N. D. (2008). High-efficiency Rosa26 knock-in vector construction for Cre-regulated overexpression and RNAi. *Pathogenetics* **1**, 3
- Hong, S. Y., Lee, H., You, W. K., Chung, K. H., Kim, D. S., and Song, K. (2003). The snake venom disintegrin salmosin induces apoptosis by disassembly of focal



- adhesions in bovine capillary endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **302**, 502-508
- Hu, K., Ji, L., Applegate, K. T., Danuser, G., and Waterman-Storer, C. M. (2007). Differential transmission of actin motion within focal adhesions. *Science* **315**, 111-115
- Huang, T. F., Holt, J. C., Lukasiewicz, H., Niewiarowski, S. (1987). Trigramin. A low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoprotein IIb-IIIabcomplex. *J Biol Chem* **262**, 16157-63
- Hughes, A. L. (2001). Evolution of the integrin alpha and beta protein families. *J Mol Evol* **52**, 63-72
- Humphries, J. D., Byron, A., and Humphries, M. J. (2006). Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci* **119**, 3901-3903
- Huveneers, S., and Danen, E. H. (2009). Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci* **122**, 1059-1069
- Hynes, R. O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11-25
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673-687
- Hynes, R. O. (2009). The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* **326**, 1216-1219
- Ibaragi, S., Shimo, T., Hassan, N. M., Isowa, S., Kurio, N., Mandai, H., Kodama, S., and Sasaki, A. (2011). Induction of MMP-13 expression in bone-metastasizing cancer cells by type I collagen through integrin alpha1beta1 and alpha2beta1-p38 MAPK signaling. *Anticancer Res* **31**, 1307-1313
- Jang, Y. J., Kim, D. S., Jeon, O. H., and Kim, D. S. (2007). Saxatilin suppresses tumor-induced angiogenesis by regulating VEGF expression in NCI-H460 human lung cancer cells. *J Biochem Mol Biol* **40**, 439-443
- Jin, H., and Varner, J. (2004). Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *Br J Cancer* **90**, 561-565
- Jokinen, J., White, D. J., Salmela, M., Huhtala, M., Kapyla, J., Sipila, K., Puranen, J. S., Nissinen, L., Kankaanpaa, P., Marjomaki, V., Hyypia, T., Johnson, M. S., and Heino, J. (2010). Molecular mechanism of alpha2beta1 integrin interaction with human echovirus 1. *EMBO J* **29**, 196-208
- Juarez, P., Wagstaff, S. C., Oliver, J., Sanz, L., Harrison, R. A., and Calvete, J. J. (2006). Molecular cloning of disintegrin-like transcript BA-5A from a Bitis arietans venom gland cDNA library: a putative intermediate in the evolution of the long-chain disintegrin bitistatin. *J Mol Evol* **63**, 142-152
- Juarez, P., Comas, I., Gonzalez-Candelas, F., and Calvete, J. J. (2008). Evolution of snake venom disintegrins by positive Darwinian selection. *Mol Biol Evol* **25**, 2391-2407

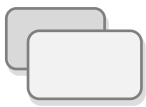


- Juarez, P., Bolas, G., de Rezende, F. F., Calvete, J. J., and Eble, J. A. (2010). Recombinant expression in human cells of active integrin alpha 1 beta 1-blocking RTS-disintegrin jerdostatin. *Toxicon* **56**, 1052-1058
- Kalluri, R. (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature reviews. Cancer* **3**, 422-433
- Kappert, K., Furundzija, V., Fritzsche, J., Margeta, C., Kruger, J., Meyborg, H., Fleck, E., and Stawowy, P. (2010). Integrin cleavage regulates bidirectional signalling in vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost* **103**, 556-563
- Kapyla, J., Ivaska, J., Riikonen, R., Nykvist, P., Pentikainen, O., Johnson, M., and Heino, J. (2000). Integrin alpha(2)I domain recognizes type I and type IV collagens by different mechanisms. *J Biol Chem* **275**, 3348-3354
- Karp, G., and Patton, J. G. (2013). *Cell and molecular biology: concepts and experiments*, 7th ed., John Wiley, Hoboken, NJ
- Karpusas, M., Ferrant, J., Weinreb, P. H., Carmillo, A., Taylor, F. R., and Garber, E. A. (2003). Crystal structure of the alpha1beta1 integrin I domain in complex with an antibody Fab fragment. *J Mol Biol* **327**, 1031-1041
- Katyal, P., Puthenveetil, R., and Vinogradova, O. (2013). Structural insights into the recognition of beta3 integrin cytoplasmic tail by the SH3 domain of Src kinase. *Protein Sci* **22**, 1358-1365
- Kennedy, E., Hakimjavadi, R., Greene, C., Mooney, C. J., Fitzpatrick, E., Collins, L. E., Loscher, C. E., Guha, S., Morrow, D., Redmond, E. M., and Cahill, P. A. (2014). Embryonic rat vascular smooth muscle cells revisited - a model for neonatal, neointimal SMC or differentiated vascular stem cells? *Vasc Cell* **6**, 6
- Kern, A., Eble, J., Golbik, R., and Kuhn, K. (1993). Interaction of type IV collagen with the isolated integrins alpha 1 beta 1 and alpha2 beta1. *Eur J Biochem* **215**, 151-159
- Khoshnoodi, J., Pedchenko, V., and Hudson, B. G. (2008). Mammalian collagen IV. *Microsc Res Tech* **71**, 357-370
- Kim, H. R., Gallant, C., Leavis, P. C., Gunst, S. J., and Morgan, K. G. (2008). Cytoskeletal remodeling in differentiated vascular smooth muscle is actin isoform dependent and stimulus dependent. *Am J Physiol Cell Physiol* **295**, C768-778
- Kim, J. K., Xu, Y., Xu, X., Keene, D. R., Gurusiddappa, S., Liang, X., Wary, K. K., and Hook, M. (2005). A novel binding site in collagen type III for integrins alpha1beta1 and alpha2beta1. *J Biol Chem* **280**, 32512-32520
- Kim, M., Carman, C. V., and Springer, T. A. (2003). Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science* **301**, 1720-1725
- Kim, S. I., Kim, K. S., Kim, H. S., Choi, M. M., Kim, D. S., Chung, K. H., and Park, Y. S. (2004). Inhibition of angiogenesis by salmosin expressed in vitro. *Oncol Res* **14**, 227-233



- Kimes, B. W., and Brandt, B. L. (1976). Characterization of two putative smooth muscle cell lines from rat thoracic aorta. *Exp Cell Res* **98**, 349-366
- Kini, R. M., and Evans, H. J. (1992). Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. *Toxicon* **30**, 265-293
- Kini, R. M. (2004). Platelet aggregation and exogenous factors from animal sources. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* **4**:301-25
- Kini, R. M. (2005). Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A2 enzymes from snake venoms. *Toxicon* **45**:1147-61
- Kisiel, D. G., Calvete, J. J., Katzhendler, J., Fertala, A., Lazarovici, P., and Marcinkiewicz, C. (2004). Structural determinants of the selectivity of KTS-disintegrins for the alpha1beta1 integrin. *FEBS Lett* **577**, 478-482
- Knight, C. G., Morton, L. F., Peachey, A. R., Tuckwell, D. S., Farndale, R. W., and Barnes, M. J. (2000). The collagen-binding A-domains of integrins alpha (1) beta (1) and alpha(2)beta(1) recognize the same specific amino acid sequence, GFOGER, in native (triple-helical) collagens. *J Biol Chem* **275**, 35-40
- Koh, D. C., Armugam, A., and Jeyaseelan, K. (2006). Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell Mol Life Sci* **63**, 3030-3041
- Koh, C. Y., and Kini, R. M. (2012). From snake venom toxins to therapeutics--cardiovascular examples. *Toxicon* **59**, 497-506
- Khoshnoodi, J., Pedchenko, V., Hudson, B.G. (2008). Mammalian collagen IV. *Microsc Res Tech* **71**(5):357-70
- Koohestani, F., Braundmeier, A. G., Mahdian, A., Seo, J., Bi, J., Nowak, R. A. (2013). Extracellular matrix collagen alters cell proliferation and cell cycle progression of human uterine leiomyoma smooth muscle cells. *PLoS One* **8**, e75-84
- Koyama, H., Raines, E. W., Bornfeldt, K. E., Roberts, J. M., and Ross, R. (1996). Fibrillar collagen inhibits arterial smooth muscle proliferation through regulation of Cdk2 inhibitors. *Cell* **87**, 1069-1078
- Kress, C., Vandormael-Pournin, S., Baldacci, P., Cohen-Tannoudji, M., and Babinet, C. (1998). Nonpermissiveness for mouse embryonic stem (ES) cell derivation circumvented by a single backcross to 129/Sv strain: establishment of ES cell lines bearing the Omd conditional lethal mutation. *Mamm Genome* **9**, 998-1001
- Kubota, Y., Kleinman, H. K., Martin, G. R., and Lawley, T. J. (1988). Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J Cell Biol* **107**, 1589-1598
- Lambert, L. J., Bobkov, A. A., Smith, J. W., and Marassi, F. M. (2008). Competitive interactions of collagen and a jararhagin-derived disintegrin peptide with the integrin alpha2-I domain. *J Biol Chem* **283**, 16665-16672

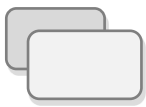




- Lee, J. O., Rieu, P., Arnaout, M. A., and Liddington, R. (1995). Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell* **80**, 631-638
- Lee, J. S., Ettinger, B., Stanczyk, F. Z., Vittinghoff, E., Hanes, V., Cauley, J. A., Chandler, W., Settlage, J., Beattie, M. S., Folkerd, E., Dowsett, M., Grady, D., and Cummings, S. R. (2006). Comparison of methods to measure low serum estradiol levels in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* **91**, 3791-3797
- Lei, L., Liu, D., Huang, Y., Jovin, I., Shai, S. Y., Kyriakides, T., Ross, R. S., and Giordano, F. J. (2008). Endothelial expression of beta1 integrin is required for embryonic vascular patterning and postnatal vascular remodeling. *Mol Cell Biol* **28**, 794-802
- Lenk, P., Kalyabina, S., Wink, M., Joger, U., 2001. Evolutionary relationships among the true vipers (Reptilia: Viperidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* **19**, 94-104
- Lewandoski, M. (2001). Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet* **2**, 743-755
- Ley, K., Rivera-Nieves, J., Sandborn, W. J., and Shattil, S. (2016). Integrin-based therapeutics: biological basis, clinical use and new drugs. *Nat Rev Drug Discov* **15**, 173-183
- Li, G., Jin, R., Norris, R. A., Zhang, L., Yu, S., Wu, F., Markwald, R. R., Nanda, A., Conway, S. J., Smyth, S. S., and Granger, D. N. (2010). Periostin mediates vascular smooth muscle cell migration through the integrins alphavbeta3 and alphavbeta5 and focal adhesion kinase (FAK) pathway. *Atherosclerosis* **208**, 358-365
- Libby, P., Ridker, P. M., and Hansson, G. K. (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* **473**, 317-325
- Lin, E., Wang, Q., Swenson, S., Jadvar, H., Groshen, S., Ye, W., Markland, F. S., and Pinski, J. (2010). The disintegrin contortrostatin in combination with docetaxel is a potent inhibitor of prostate cancer in vitro and in vivo. *Prostate* **70**, 1359-1370
- Ling, K., Doughman, R. L., Firestone, A. J., Bunce, M. W., and Anderson, R. A. (2002). Type I gamma phosphatidylinositol phosphate kinase targets and regulates focal adhesions. *Nature* **420**, 89-93
- Littlewood, T. D., Hancock, D. C., Danielian, P. S., Parker, M. G., and Evan, G. I. (1995). A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res* **23**, 1686-1690
- Liu, S., and Leask, A. (2012). Integrin beta1 is required for maintenance of vascular tone in postnatal mice. *J Cell Commun Signal* **6**, 175-180



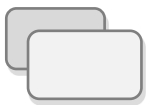
- Loeser, R. F., Carlson, C. S., and McGee, M. P. (1995). Expression of beta 1 integrins by cultured articular chondrocytes and in osteoarthritic cartilage. *Exp Cell Res* **217**, 248-257
- Louis, H., Kakou, A., Regnault, V., Labat, C., Bressenot, A., Gao-Li, J., Gardner, H., Thornton, S. N., Challande, P., Li, Z., and Lacolley, P. (2007). Role of alpha1beta1-integrin in arterial stiffness and angiotensin-induced arterial wall hypertrophy in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**, H2597-2604
- Louis, S. F., and Zahradka, P. (2010). Vascular smooth muscle cell motility: From migration to invasion. *Exp Clin Cardiol* **15**, e75-85
- Mackay, D. J., and Hall, A. (1998). Rho GTPases. *J Biol Chem* **273**, 20685-20688
- Mackessy, S. P. (2010.) *Handbook of venoms and toxins of reptiles*, Taylor & Francis, Boca Raton
- Madisen, L., Zwingman, T. A., Sunkin, S. M., Oh, S. W., Zariwala, H. A., Gu, H., Ng, L. L., Palmiter, R. D., Hawrylycz, M. J., Jones, A. R., Lein, E. S., and Zeng, H. (2010). A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci* **13**, 133-140
- Magnon, C., Galaup, A., Mullan, B., Rouffiac, V., Bouquet, C., Bidart, J. M., Griscelli, F., Opolon, P., and Perricaudet, M. (2005). Canstatin acts on endothelial and tumor cells via mitochondrial damage initiated through interaction with alphavbeta3 and alphavbeta5 integrins. *Cancer Res* **65**, 4353-4361
- Makran, B., Fahmi, L., Pla, D., Sanz, L., Oukkache, N., Lkhider, M., Ghalim, N., and Calvete, J. J. (2012). Snake venomomics of *Macrovipera mauritanica* from Morocco, and assessment of the para-specific immunoreactivity of an experimental monospecific and a commercial antivenoms. *J Proteomics* **75**, 2431-2441
- Malan, D., Wenzel, D., Schmidt, A., Geisen, C., Raible, A., Bolck, B., Fleischmann, B. K., and Bloch, W. (2010.) Endothelial beta1 integrins regulate sprouting and network formation during vascular development. *Development* **137**, 993-1002
- Mao, X., Fujiwara, Y., and Orkin, S. H. (1999). Improved reporter strain for monitoring Cre recombinase-mediated DNA excisions in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5037-5042
- Marcinkiewicz, C., Weinreb, P. H., Calvete, J. J., Kisiel, D. G., Mousa, S. A., Tuszyński, G. P., and Lobb, R. R. (2003). Obtustatin: a potent selective inhibitor of alpha1beta1 integrin in vitro and angiogenesis in vivo. *Cancer Res* **63**, 2020-2023
- Marcinkiewicz, C. (2013). Applications of snake venom components to modulate integrin activities in cell-matrix interactions. *Int J Biochem Cell Biol* **45**, 1974-1986
- Margadant, C., Kreft, M., Zambruno, G., and Sonnenberg, A. (2013). Kindlin-1 regulates integrin dynamics and adhesion turnover. *PLoS One* **8**, e65341



- Marieb, E. N. (2012). *Essentials of human anatomy & physiology*, 10th ed., Benjamin Cummings, San Francisco, CA
- Markland, F. S., Jr., and Swenson, S. (2013). Snake venom metalloproteinases. *Toxicon* **62**, 3-18
- Martinez-Lemus, L. A., Wu, X., Wilson, E., Hill, M. A., Davis, G. E., Davis, M. J., and Meininger, G. A. (2003). Integrins as unique receptors for vascular control. *J Vasc Res* **40**, 211-233
- McLane, M. A., Joerger, T., and Mahmoud, A. (2008). Disintegrins in health and disease. *Front Biosci* **13**, 6617-6637
- Meisler, M. H. (1992). Insertional mutation of 'classical' and novel genes in transgenic mice. *Trends Genet* **8**, 341-344
- Meyer, A., Auernheimer, J., Modlinger, A., and Kessler, H. (2006). Targeting RGD recognizing integrins: drug development, biomaterial research, tumor imaging and targeting. *Curr Pharm Des* **12**, 2723-2747
- Meyers, E. N., Lewandoski, M., and Martin, G. R. (1998). An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat Genet* **18**, 136-141
- Min, J., Reznichenko, M., Poythress, R. H., Gallant, C. M., Vetterkind, S., Li, Y., and Morgan, K. G. (2012). Src modulates contractile vascular smooth muscle function via regulation of focal adhesions. *J Cell Physiol* **227**, 3585-3592
- Moiseeva, E. P. (2001). Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions. *Cardiovasc Res* **52**, 372-386
- Momic, T., Katzehandler, J., Benny, O., Lahiani, A., Cohen, G., Noy, E., Senderowitz, H., Eble, J. A., Marcinkiewicz, C., and Lazarovici, P. (2014). Vimocin and vidapin, cyclic KTS peptides, are dual antagonists of alpha1beta1/alpha2beta1 integrins with antiangiogenic activity. *J Pharmacol Exp Ther* **350**, 506-519
- Monleon, D., Esteve, V., Kovacs, H., Calvete, J. J., and Celda, B. (2005). Conformation and concerted dynamics of the integrin-binding site and the C-terminal region of echistatin revealed by homonuclear NMR. *Biochem J* **387**, 57-66
- Montenegro, C. F., Salla-Pontes, C. L., Ribeiro, J. U., Machado, A. Z., Ramos, R. F., Figueiredo, C. C., Morandi, V., and Selistre-de-Araujo, H. S. (2012). Blocking alphavbeta3 integrin by a recombinant RGD disintegrin impairs VEGF signaling in endothelial cells. *Biochimie* **94**, 1812-1820
- Moraes, J. A., Frony, A. C., Dias, A. M., Renovato-Martins, M., Rodrigues, G., Marcinkiewicz, C., Assreuy, J., Barja-Fidalgo, C. (2015) Alpha1beta1 and integrin-linked kinase interact and modulate angiotensin II effects in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. **243**, 477-85
- Moreira, P. N., Pozueta, J., Perez-Crespo, M., Valdivieso, F., Gutierrez-Adan, A., and Montoliu, L. (2007). Improving the generation of genomic-type transgenic mice by ICSI. *Transgenic Res* **16**, 163-168



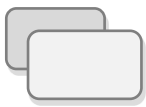
- Moser, M., Legate, K. R., Zent, R., and Fassler, R. (2009). The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science* **324**, 895-899
- Mouse Genome Sequencing Consortium (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**, 520-562
- Nagy, A. (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* **26**, 99-109
- Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K., and Behringer, R. (2006). Preparing Feeder Cell Layers from STO or Mouse Embryo Fibroblast (MEF) Cells: Treatment with gamma-Irradiation. *CSH Protoc*
- Nemeno-Guanzon, J. G., Lee, S., Berg, J. R., Jo, Y. H., Yeo, J. E., Nam, B. M., Koh, Y. G., and Lee, J. I. (2012). Trends in tissue engineering for blood vessels. *J Biomed Biotechnol*
- Nguyen, T. T., Ward, J. P., Hirst, S. J. (2005). Beta1-Integrins mediate enhancement of airway smooth muscle proliferation by collagen and fibronectin. *Am J Respir Crit Care Med* **171**, 217-23
- Niewiarowski, S., McLane, M. A., Kloczewiak, M., Stewart, G. J. (1994). Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. *Semin Hematol* **31**, 289-300
- Niu, G., and Chen, X. (2012). Why integrin as a primary target for imaging and therapy. *Theranostics* **1**, 30-47
- Niu, H., Chen, X., Gruppo, R. A., Li, D., Wang, Y., Zhang, L., Wang, K., Chai, W., Sun, Y., Ding, Z., Gartner, T. K., and Liu, J. (2012). Integrin alphaIIb-mediated PI3K/Akt activation in platelets. *PLoS One* **7**, e47356
- Nyabi, O., Naessens, M., Haigh, K., Gembarska, A., Goossens, S., Maetens, M., De Clercq, S., Drogat, B., Haenebalcke, L., Bartunkova, S., De Vos, I., De Craene, B., Karimi, M., Berx, G., Nagy, A., Hilson, P., Marine, J. C., and Haigh, J. J. (2009). Efficient mouse transgenesis using Gateway-compatible ROSA26 locus targeting vectors and F1 hybrid ES cells. *Nucleic Acids Res* **37**, e55
- Nykvist, P., Tu, H., Ivaska, J., Kapyla, J., Pihlajaniemi, T., and Heino, J. (2000). Distinct recognition of collagen subtypes by alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) integrins. Alpha(1) beta(1) mediates cell adhesion to type XIII collagen. *J Biol Chem* **275**, 8255-8261
- Nymalm, Y., Puranen, J. S., Nyholm, T. K., Kapyla, J., Kidron, H., Pentikainen, O. T., Airene, T. T., Heino, J., Slotte, J. P., Johnson, M. S., and Salminen, T. A. (2004). Jararhagin-derived RKKH peptides induce structural changes in alpha1I domain of human integrin alpha1beta1. *J Biol Chem* **279**, 7962-7970
- O'Connor, P. (2007). Natalizumab and the role of alpha 4-integrin antagonism in the treatment of multiple sclerosis. *Expert Opin Biol Ther* **7**, 123-136
- Ogawa, T., Chijiwa, T., Oda-Ueda, N., and Ohno, M. (2005). Molecular diversity and accelerated evolution of C-type lectin-like proteins from snake venom. *Toxicon* **45**, 1-14



- Okuda, D., Koike, H., and Morita, T. (2002). A new gene structure of the disintegrin family: a subunit of dimeric disintegrin has a short coding region. *Biochemistry* **41**, 14248-14254
- Olfa, K. Z., Jose, L., Salma, D., Amine, B., Najet, S. A., Nicolas, A., Maxime, L., Raoudha, Z., Kamel, M., Jacques, M., Jean-Marc, S., Mohamed el, A., and Naziha, M. (2005). Lebestatin, a disintegrin from *Macrovipera* venom, inhibits integrin-mediated cell adhesion, migration and angiogenesis. *Lab Invest* **85**, 1507-1516
- Oliva, I. B., Coelho, R. M., Barcellos, G. G., Saldanha-Gama, R., Wermelinger, L. S., Marcinkiewicz, C., Benedeta Zingali, R., and Barja-Fidalgo, C. (2007). Effect of RGD-disintegrins on melanoma cell growth and metastasis: involvement of the actin cytoskeleton, FAK and c-Fos. *Toxicon* **50**, 1053-1063
- Orr, A. W., Lee, M. Y., Lemmon, J. A., Yurdagul, A., Jr., Gomez, M. F., Bortz, P. D., and Wamhoff, B. R. (2009). Molecular mechanisms of collagen isotype-specific modulation of smooth muscle cell phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 225-231
- Osidak, M. S., Osidak, E. O., Akhmanova, M. A., Domogatsky, S. P., and Domogatskaya, A. S. (2015). Fibrillar, fibril-associated and basement membrane collagens of the arterial wall: architecture, elasticity and remodeling under stress. *Curr Pharm Des* **21**, 1124-1133
- Pahari, S., Mackessy, S. P., Kini, R. M. (2007). The venom gland transcriptome of the Desert Massasauga rattlesnake (*Sistrurus catenatus edwardsii*) towards an understanding of venom composition among advanced snakes (Superfamily Colubroidea). *BMC Mol. Biol.* **8**, 115-121
- Palecek, S. P., Loftus, J. C., Ginsberg, M. H., Lauffenburger, D. A., and Horwitz, A. F. (1997). Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature* **385**, 537-540
- Park, T. J., Boyd, K., and Curran, T. (2006). Cardiovascular and craniofacial defects in Crk-null mice. *Mol Cell Biol.* **26**, 6272-82
- Paz Moreno-Murciano, M., Monleon, D., Marcinkiewicz, C., Calvete, J. J., and Celda, B. (2003). NMR solution structure of the non-RGD disintegrin obtustatin. *J Mol Biol* **329**, 135-145
- Perales, J., Neves-Ferreira, A. G., Valente, R. H., and Domont, G. B. (2005). Natural inhibitors of snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *Toxicon* **45**, 1013-1020
- Perruzzi, C. A., de Fougerolles, A. R., Koteliansky, V. E., Whelan, M. C., Westlin, W. F., and Senger, D. R. (2003). Functional overlap and cooperativity among alphav and beta1 integrin subfamilies during skin angiogenesis. *J Invest Dermatol* **120**, 1100-1109



- Perry, A. C., Wakayama, T., Kishikawa, H., Kasai, T., Okabe, M., Toyoda, Y., and Yanagimachi, R. (1999). Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science* **284**, 1180-1183
- Petitclerc, E., Boutaud, A., Prestayko, A., Xu, J., Sado, Y., Ninomiya, Y., Sarras, M. P., Jr., Hudson, B. G., and Brooks, P. C. (2000). New functions for non-collagenous domains of human collagen type IV. Novel integrin ligands inhibiting angiogenesis and tumor growth in vivo. *J Biol Chem* **275**, 8051-8061
- Piovan, C., Amari, F., Lovat, F., Chen, Q., and Coppola, V. (2014). Generation of mouse lines conditionally over-expressing microRNA using the Rosa26-Lox-Stop-Lox system. *Methods Mol Biol* **1194**, 203-224
- Platt, R. J., Chen, S., Zhou, Y., Yim, M. J., Swiech, L., Kempton, H. R., Dahlman, J. E., Parnas, O., Eisenhaure, T. M., Jovanovic, M., Graham, D. B., Jhunjhunwala, S., Heidenreich, M., Xavier, R. J., Langer, R., Anderson, D. G., Hacohen, N., Regev, A., Feng, G., Sharp, P. A., and Zhang, F. (2014). CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell* **159**, 440-455
- Plow, E. F., Meller, J., and Byzova, T. V. (2014). Integrin function in vascular biology: a view from 2013. *Curr Opin Hematol* **21**, 241-247
- Pozzi, A., Wary, K. K., Giancotti, F. G., and Gardner, H. (1998). Integrin  $\alpha\beta 1$  mediates a unique collagen-dependent proliferation pathway in vivo. *J Cell Biol* **142**, 587-594
- Pozzi, A., Moberg, P. E., Miles, L. A., Wagner, S., Soloway, P., and Gardner, H. A. (2000). Elevated matrix metalloprotease and angiostatin levels in integrin  $\alpha 1$  knockout mice cause reduced tumor vascularization. *Proc. Natl. Acad. Science USA* **97**, 2202-2207
- Rajan, N., Habermehl, J., Cote, M. F., Doillon, C. J., and Mantovani, D. (2006). Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications. *Nat Protoc* **1**, 2753-2758
- Rathinam, R., and Alahari, S. K. (2010). Important role of integrins in the cancer biology. *Cancer Metastasis Rev* **29**, 223-237
- Raynal, N., Hamaia, S. W., Siljander, P. R., Maddox, B., Peachey, A. R., Fernandez, R., Foley, L. J., Slatter, D. A., Jarvis, G. E., and Farndale, R. W. (2006). Use of synthetic peptides to locate novel integrin  $\alpha 2\beta 1$ -binding motifs in human collagen III. *J Biol Chem* **281**, 3821-3831
- Renner, C., Sacca, B., and Moroder, L. (2004). Synthetic heterotrimeric collagen peptides as mimics of cell adhesion sites of the basement membrane. *Biopolymers* **76**, 34-47
- Rensen, S. S., Doevendans, P. A., and van Eys, G. J. (2007). Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J* **15**, 100-108
- Ross, R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**, 801-809

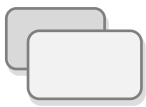


- Rupp, P. A., and Little, C. D. (2001). Integrins in vascular development. *Circ Res* **89**, 566-572
- Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sandhu, U., Cebula, M., Behme, S., Riemer, P., Wodarczyk, C., Metzger, D., Reimann, J., Schirmbeck, R., Hauser, H., and Wirth, D. (2011). Strict control of transgene expression in a mouse model for sensitive biological applications based on RMCE compatible ES cells. *Nucleic Acids Res* **39**, e1
- Sandoo, A., van Zanten, J. J., Metsios, G. S., Carroll, D., and Kitas, G. D. (2010). The endothelium and its role in regulating vascular tone. *Open Cardiovasc Med J* **4**, 302-312
- Sanz, L., Chen, R. Q., Perez, A., Hilario, R., Juarez, P., Marcinkiewicz, C., Monleon, D., Celda, B., Xiong, Y. L., Perez-Paya, E., and Calvete, J. J. (2005). cDNA cloning and functional expression of jerdostatin, a novel RTS-disintegrin from *Trimeresurus jerdonii* and a specific antagonist of the alpha1beta1 integrin. *J Biol Chem* **280**, 40714-40722
- Sanz, L., Bazaa, A., Marrakchi, N., Perez, A., Chenik, M., Bel Lasfer, Z., El Ayeb, M., and Calvete, J. J. (2006). Molecular cloning of disintegrins from *Cerastes vipera* and *Macrovipera lebetina transmediterranea* venom gland cDNA libraries: insight into the evolution of the snake venom integrin-inhibition system. *Biochem J* **395**, 385-392
- Sanz-Soler, R., Lorente, C., Company, B., Sanz, L., Juarez, P., Perez, A., Zhang, Y., Jin, Y., Chen, R., Eble, J. A., Calvete, J. J., and Bolas, G. (2012). Recombinant expression of mutants of the Frankenstein disintegrin, RTS-ocellatusin. Evidence for the independent origin of RGD and KTS/RTS disintegrins. *Toxicon* **60**, 665-675
- Sanz-Soler, R., Sanz, L., Calvete, J. J. (2016). Distribution of RPTLN Genes Across Reptilia: Hypothesized Role for RPTLN in the Evolution of SVMs. *Integr Comp Biol*. pii: icw031. [Epub ahead of print]
- Saphirstein, R. J., Gao, Y. Z., Jensen, M. H., Gallant, C. M., Vetterkind, S., Moore, J. R., and Morgan, K. G. (2013). The focal adhesion: a regulated component of aortic stiffness. *PLoS One* **8**, e62461
- Sauer, B., and Henderson, N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 5166-5170
- Sazonova, O. V., Isenberg, B. C., Herrmann, J., Lee, K. L., Purwada, A., Valentine, A. D., Buczek-Thomas, J. A., Wong, J. Y., and Nugent, M. A. (2015). Extracellular matrix presentation modulates vascular smooth muscle cell mechanotransduction. *Matrix Biol* **41**, 36-43
- Schapira, K., Lutgens, E., de Fougères, A., Sprague, A., Roemen, A., Gardner, H., Koteliansky, V., Daemen, M., and Heeneman, S. (2005). Genetic deletion or



- antibody blockade of alpha1beta1 integrin induces a stable plaque phenotype in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 1917-1924
- Schwartz, M. A., and Ginsberg, M. H. (2002). Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nat Cell Biol* **4**, E65-68
- Schwartz, M. A. (2010). Integrins and extracellular matrix in mechanotransduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a005066
- Senger, D. R., Claffey, K. P., Benes, J. E., Perruzzi, C. A., Sergiou, A. P., and Detmar, M. (1997). Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13612-13617
- Senger, D. R., Perruzzi, C. A., Streit, M., Koteliansky, V. E., de Fougères, A. R., and Detmar, M. (2002). The alpha1 beta1 and alpha2 beta1 integrins provide critical support for vascular endothelial growth factor signaling, endothelial cell migration, and tumor angiogenesis. *Am. J. Pathol.* **160**, 195-204
- Serrano, S. M. (2013). The long road of research on snake venom serine proteinases. *Toxicon* **62**, 19-26.
- Shah, P. P., Fong, M. Y., and Kakar, S. S. (2012). PTTG induces EMT through integrin alphaVbeta3-focal adhesion kinase signaling in lung cancer cells. *Oncogene* **31**, 3124-3135
- Sheu, J. R., Yen, M. H., Kan, Y. C., Hung, W. C., Chang, P. T., and Luk, H. N. (1997). Inhibition of angiogenesis in vitro and in vivo: comparison of the relative activities of triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide and anti-alpha(v)beta3 integrin monoclonal antibody. *Biochim Biophys Acta* **1336**, 445-454
- Shimaoka, M., and Springer, T. A. (2003). Therapeutic antagonists and conformational regulation of integrin function. *Nat Rev Drug Discov* **2**, 703-716
- Shimaoka, M., Xiao, T., Liu, J. H., Yang, Y., Dong, Y., Jun, C. D., McCormack, A., Zhang, R., Joachimiak, A., Takagi, J., Wang, J. H., and Springer, T. A. (2003.) Structures of the alpha L I domain and its complex with ICAM-1 reveal a shape-shifting pathway for integrin regulation. *Cell* **112**, 99-111
- Simpson, E. M., Linder, C. C., Sargent, E. E., Davisson, M. T., Mobraaten, L. E., and Sharp, J. J. (1997). Genetic variation among 129 substrains and its importance for targeted mutagenesis in mice. *Nat Genet* **16**, 19-27
- Skinner, M. P., Raines, E. W., and Ross, R. (1994). Dynamic expression of alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrin receptors by human vascular smooth muscle cells. Alpha 2 beta 1 integrin is required for chemotaxis across type I collagen-coated membranes. *Am J Pathol* **145**, 1070-1081
- Slepian, M. J., Massia, S. P., Dehdashti, B., Fritz, A., and Whitesell, L. (1998). Beta3-integrins rather than beta1-integrins dominate integrin-matrix interactions involved in postinjury smooth muscle cell migration. *Circulation* **97**, 1818-1827

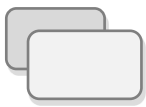




- Smithies, O., Gregg, R. G., Boggs, S. S., Koralewski, M. A., and Kucherlapati, R. S. (1985). Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature* **317**, 230-234
- Smyth, S. S., Reis, E. D., Vaananen, H., Zhang, W., and Collier, B. S. (2001). Variable protection of beta 3-integrin--deficient mice from thrombosis initiated by different mechanisms. *Blood* **98**, 1055-1062
- Soligo, D., Schiro, R., Luksch, R., Manara, G., Quirici, N., Parravicini, C., and Lambertenghi Delilieri, G. (1990). Expression of integrins in human bone marrow. *Br J Haematol* **76**, 323-332
- Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* **21**, 70-71
- Srinivas, S., Watanabe, T., Lin, C. S., William, C. M., Tanabe, Y., Jessell, T. M., and Costantini, F. (2001). Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol* **1**, 4
- Staniszewska, I., Walsh, E. M., Rothman, V. L., Gaathon, A., Tuszyński, G. P., Calvete, J. J., Lazarovici, P., and Marcinkiewicz, C. (2009). Effect of VP12 and viperistatin on inhibition of collagen-receptor-dependent melanoma metastasis. *Cancer Biol Ther* **8**, 1507-1516
- Stefanidakis, M., and Koivunen, E. (2006). Cell-surface association between matrix metalloproteinases and integrins: role of the complexes in leukocyte migration and cancer progression. *Blood* **108**, 1441-1450
- Stephens, L. E., Sutherland, A. E., Klimanskaya, I. V., Andrieux, A., Meneses, J., Pedersen, R. A., and Damsky, C. H. (1995). Deletion of beta 1 integrins in mice results in inner cell mass failure and peri-implantation lethality. *Genes Dev* **9**, 1883-1895
- Sternberg, N., and Hamilton, D. (1981.) Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol* **150**, 467-486
- St-Onge, L., Furth, P. A., and Gruss, P. (1996). Temporal control of the Cre recombinase in transgenic mice by a tetracycline responsive promoter. *Nucleic Acids Res* **24**, 3875-3877
- Stricker, T. P., Dumin, J. A., Dickeson, S. K., Chung, L., Nagase, H., Parks, W. C., and Santoro, S. A. (2001). Structural analysis of the alpha(2) integrin I domain/procollagenase-1 (matrix metalloproteinase-1) interaction. *J Biol Chem* **276**, 29375-29381
- Studier, F. W., and Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**, 113-130
- Stupack, D. G., and Cheresch, D. A. (2002). Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J Cell Sci* **115**, 3729-3738



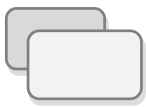
- Su, Y., Xia, W., Li, J., Walz, T., Humphries, M.J., Vestweber, D., Cabañas, C., Lu, C., Springer, T.A. (2016). Relating conformation to function in integrin  $\alpha 5\beta 1$ . *Proc Natl Acad Sci* **113**, 3872-3881
- Sudhakar, A., Nyberg, P., Keshamouni, V.G., Mannam, A.P., Li, J., Sugimoto, H., Cosgrove, D., Kalluri, R. (2005). Human alpha1 type IV collagen NC1 domain exhibits distinct antiangiogenic activity mediated by alpha1beta1 integrin. *J Clin Invest.* **115**(10):2801-10
- Sudhakar, A., and Boosani, C. S. (2008). Inhibition of tumor angiogenesis by tumstatin: insights into signaling mechanisms and implications in cancer regression. *Pharm Res* **25**, 2731-2739
- Sweeney, S. M., DiLullo, G., Slater, S. J., Martinez, J., Iozzo, R. V., Lauer-Fields, J. L., Fields, G. B., and San Antonio, J. D. (2003). Angiogenesis in collagen I requires alpha2beta1 ligation of a GFP\*GER sequence and possibly p38 MAPK activation and focal adhesion disassembly. *J Biol Chem* **278**, 30516-30524
- Swenson, S., Ramu, S., and Markland, F. S. (2007). Anti-angiogenesis and RGD-containing snake venom disintegrins. *Curr Pharm Des* **13**, 2860-2871
- Syfrig, J., Mann, K., and Paulsson, M. (1991). An abundant chick gizzard integrin is the avian alpha 1 beta 1 integrin heterodimer and functions as a divalent cation-dependent collagen IV receptor. *Exp Cell Res* **194**, 165-173
- Szulgit, G., Rudolph, R., Wandel, A., Tenenhaus, M., Panos, R., and Gardner, H. (2002). Alterations in fibroblast alpha1beta1 integrin collagen receptor expression in keloids and hypertrophic scars. *J Invest Dermatol* **118**, 409-415
- Tabas, I., Garcia-Cardena, G., and Owens, G. K. (2015). Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J Cell Biol* **209**, 13-22
- Tadokoro, S., Shattil, S. J., Eto, K., Tai, V., Liddington, R. C., de Pereda, J. M., Ginsberg, M. H., and Calderwood, D. A. (2003). Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science* **302**, 103-106
- Tanjore, H., and Kalluri, R. (2006). The role of type IV collagen and basement membranes in cancer progression and metastasis. *Am J Pathol* **168**, 715-717
- Tanjore, H., Zeisberg, E. M., Gerami-Naini, B., and Kalluri, R. (2008). Beta1 integrin expression on endothelial cells is required for angiogenesis but not for vasculogenesis. *Dev Dyn* **237**, 75-82
- Taverna, D., Crowley, D., Connolly, M., Bronson, R. T., and Hynes, R. O. (2005). A direct test of potential roles for beta3 and beta5 integrins in growth and metastasis of murine mammary carcinomas. *Cancer Res* **65**, 10324-10329
- Taylor, L. D., Carmack, C. E., Schramm, S. R., Mashayekh, R., Higgins, K. M., Kuo, C. C., Woodhouse, C., Kay, R. M., and Lonberg, N. (1992). A transgenic mouse that expresses a diversity of human sequence heavy and light chain immunoglobulins. *Nucleic Acids Res* **20**, 6287-6295
- Tchorz, J. S., Suply, T., Ksiazek, I., Giachino, C., Cloetta, D., Danzer, C. P., Doll, T., Isken, A., Lemaistre, M., Taylor, V., Bettler, B., Kinzel, B., and Mueller, M. (2012).



- A modified RMCE-compatible Rosa26 locus for the expression of transgenes from exogenous promoters. *PLoS One* **7**, e30011
- Teng, C. M., Huang, T.F., (1991). Snake venom constituents that affect platelet function. *Platelets* **2**, 77–87
- Thomas, K. R., Folger, K. R., and Capecchi, M. R. (1986). High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell* **44**, 419-428
- Thomas, K. R., and Capecchi, M. R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* **51**, 503-512
- Thompson, S., Clarke, A. R., Pow, A. M., Hooper, M. L., and Melton, D. W. (1989). Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. *Cell* **56**, 313-321
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145-1147
- Thyberg, J., and Hultgårdh-Nilsson, A. (1994). Fibronectin and the basement membrane components laminin and collagen type IV influence the phenotypic properties of subcultured rat aortic smooth muscle cells differently. *Cell Tissue Res.* **276**, 263-71
- Tomaselli, K. J., Doherty, P., Emmett, C. J., Damsky, C. H., Walsh, F. S., and Reichardt, L. F. (1993). Expression of beta 1 integrins in sensory neurons of the dorsal root ganglion and their functions in neurite outgrowth on two laminin isoforms. *J Neurosci* **13**, 4880-4888
- Torres, R. M., and Kühn, R. (1997). *Laboratory protocols for conditional gene targeting*, Oxford University Press, Oxford; New York
- Tropea, J. E., Cherry, S., and Waugh, D. S. (2009). Expression and purification of soluble His(6)-tagged TEV protease. *Methods Mol Biol* **498**, 297-307
- Tulla, M., Pentikainen, O. T., Viitasalo, T., Kapyla, J., Impola, U., Nykvist, P., Nissinen, L., Johnson, M. S., and Heino, J. (2001). Selective binding of collagen subtypes by integrin alpha 1I, alpha 2I, and alpha 10I domains. *J Biol Chem* **276**, 48206-48212
- Tulla, M., Lahti, M., Puranen, J. S., Brandt, A. M., Kapyla, J., Domogatskaya, A., Salminen, T. A., Tryggvason, K., Johnson, M. S., and Heino, J. (2008). Effects of conformational activation of integrin alpha 1I and alpha 2I domains on selective recognition of laminin and collagen subtypes. *Exp Cell Res* **314**, 1734-1743
- Turlo, K. A., Scapa, J., Bagher, P., Jones, A. W., Feil, R., Korthuis, R. J., Segal, S. S., and Iruela-Arispe, M. L. (2013). beta1-Integrin Is Essential for Vasoregulation and Smooth Muscle Survival In Vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**, 2325-2335
- Van Deursen, J. (2003). Gene targeting in mouse embryonic stem cells. *Methods Mol Biol* **209**, 145-158



- Van Duyne, G. D. (2001). A structural view of cre-loxp site-specific recombination. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **30**, 87-104
- Van Keuren, M. L., Gavrilina, G. B., Filipiak, W. E., Zeidler, M. G., and Saunders, T. L. (2009). Generating transgenic mice from bacterial artificial chromosomes: transgenesis efficiency, integration and expression outcomes. *Transgenic Res* **18**, 769-785
- Vandenberg, P., Kern, A., Ries, A., Luckenbill-Edds, L., Mann, K., and Kuhn, K. (1991). Characterization of a type IV collagen major cell binding site with affinity to the alpha 1 beta 1 and the alpha 2 beta 1 integrins. *J Cell Biol* **113**, 1475-1483
- Varadarajulu, J., Laser, M., Hupp, M., Wu, R., Hauck, C. R. (2005). Targeting of alpha(v) integrins interferes with FAK activation and smooth muscle cell migration and invasion. *Biochem Biophys Res Commun* **331**, 404-12
- Vija, H., Samel, M., Siigur, E., Aaspollu, A., Tonismagi, K., Trummal, K., Subbi, J., and Siigur, J. (2009). VGD and MLD-motifs containing heterodimeric disintegrin viplebedin-2 from *Vipera lebetina* snake venom. Purification and cDNA cloning. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **153**, 253-260
- Vries, S. J., van Dijk, M. and Bonvin A.M.J.J. (2010). The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking. *Nature Protocols* **5**, 883-897
- Voncken, J. W. (2011). Genetic modification of the mouse: general technology - pronuclear and blastocyst injection. *Methods Mol Biol* **693**, 11-36
- Voziyanov, Y., Pathania, S., and Jayaram, M. (1999). A general model for site-specific recombination by the integrase family recombinases. *Nucleic Acids Res* **27**, 930-941
- Wegener, K. L., Partridge, A. W., Han, J., Pickford, A. R., Liddington, R. C., Ginsberg, M. H., and Campbell, I. D. (2007). Structural basis of integrin activation by talin. *Cell* **128**, 171-182
- Weinreb collagen and metal ion binding to the integrin alpha1 I domain. *J Biol Chem* **287**, 32897-32912
- White, J. M. (2003). ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. *Curr Opin Cell Biol* **15**:598-606
- Willis, A. I., Pierre-Paul, D., Sumpio, B. E., and Gahtan, V. (2004). Vascular smooth muscle cell migration: current research and clinical implications. *Vasc Endovascular Surg* **38**, 11-23
- Wilusz, J. E., Sunwoo, H., Spector, D. L. (2009). Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes Dev* **23**:1494-504
- Wilusz, J. E. (2016). Long noncoding RNAs: Re-writing dogmas of RNA processing and stability. *Biochim Biophys Acta*, **1859**(1):128-38
- Wolfsberg, T. G., Straight, P. D., Gerena, R. L., Huovila, A. P., Primakoff, P., Myles, D. G., and White, J. M. (1995). ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain. *Dev Biol* **169**, 378-383



- Woychik, R. P., and P. H., Li, S., Gao, S. X., Liu, T., Pepinsky, R. B., Caravella, J. A., Lee, J. H., and Woods, V. L., Jr. (2012). Dynamic structural changes are observed upon
- Alagramam, K. (1998). Insertional mutagenesis in transgenic mice generated by the pronuclear microinjection procedure. *Int J Dev Biol* **42**, 1009-1017
- Wu, C., and Dedhar, S. (2001). Integrin-linked kinase (ILK) and its interactors: a new paradigm for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signaling complexes. *J Cell Biol* **155**, 505-510
- Xiao, T., Takagi, J., Collier, B. S., Wang, J. H., and Springer, T. A. (2004). Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature* **432**, 59-67
- Xie, C., Zhu, J., Chen, X., Mi, L., Nishida, N., and Springer, T. A. (2010). Structure of an integrin with an alpha domain, complement receptor type 4. *EMBO J* **29**, 666-679
- Xiong, J. P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., Scott, D. L., Joachimiak, A., Goodman, S. L., and Arnaout, M. A. (2001). Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science* **294**, 339-345
- Xiong, J. P., Stehle, T., Zhang, R., Joachimiak, A., Frech, M., Goodman, S. L., and Arnaout, M. A. (2002). Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* **296**, 151-155
- Xiong, J. P., Stehle, T., Goodman, S. L., and Arnaout, M. A. (2003). Integrins, cations and ligands: making the connection. *J Thromb Haemost* **1**, 1642-1654
- Xu, Y., Gurusiddappa, S., Rich, R. L., Owens, R. T., Keene, D. R., Mayne, R., Hook, A., and Hook, M. (2000). Multiple binding sites in collagen type I for the integrins alpha1beta1 and alpha2beta1. *J Biol Chem* **275**, 38981-38989
- Ye, F., Kim, C., Ginsberg, M.H. (2011). Molecular mechanism of inside-out integrin regulation. *J Thromb Haemost* **1**, 20-5
- Yeh, C. H., Peng, H. C., and Huang, T. F. (1998). Accutin, a new disintegrin, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo by acting as integrin alphavbeta3 antagonist and inducing apoptosis. *Blood* **92**, 3268-3276
- Yeh, C. H., Peng, H. C., Yang, R. S., and Huang, T. F. (2001) Rhodostomin, a snake venom disintegrin, inhibits angiogenesis elicited by basic fibroblast growth factor and suppresses tumor growth by a selective alpha(v)beta(3) blockade of endothelial cells. *Mol Pharmacol* **59**, 1333-1342
- Yoshimura, K., Meckel, K. F., Laird, L. S., Chia, C. Y., Park, J. J., Olino, K. L., Tsunedomi, R., Harada, T., Iizuka, N., Hazama, S., Kato, Y., Keller, J. W., Thompson, J. M., Chang, F., Romer, L. H., Jain, A., Iacobuzio-Donahue, C., Oka, M., Pardoll, D. M., and Schlick, R. D. (2009). Integrin alpha2 mediates selective metastasis to the liver. *Cancer Res* **69**, 7320-7328
- Zamir, E., and Geiger, B. (2001). Components of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* **114**, 3577-3579

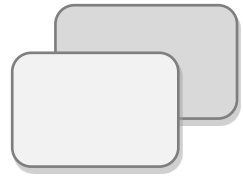


- Zhang, Z., Ramirez, N. E., Yankeelov, T. E., Li, Z., Ford, L. E., Qi, Y., Pozzi, A., and Zutter, M. M. (2008). alpha2beta1 integrin expression in the tumor microenvironment enhances tumor angiogenesis in a tumor cell-specific manner. *Blood* **111**, 1980-1988
- Zhu, J., Luo, B. H., Xiao, T., Zhang, C., Nishida, N., and Springer, T. A. (2008). Structure of a complete integrin ectodomain in a physiologic resting state and activation and deactivation by applied forces. *Mol Cell* **32**, 849-861
- Zhu, J., Zhu, J., Springer, T. A. (2013). Complete integrin headpiece opening in eight steps. *The Journal of Cell Biology*, **201**(7), 1053-1068
- Zou, Y. R., Muller, W., Gu, H., and Rajewsky, K. (1994). Cre-loxP-mediated gene replacement: a mouse strain producing humanized antibodies. *Curr Biol* **4**, 1099-1103



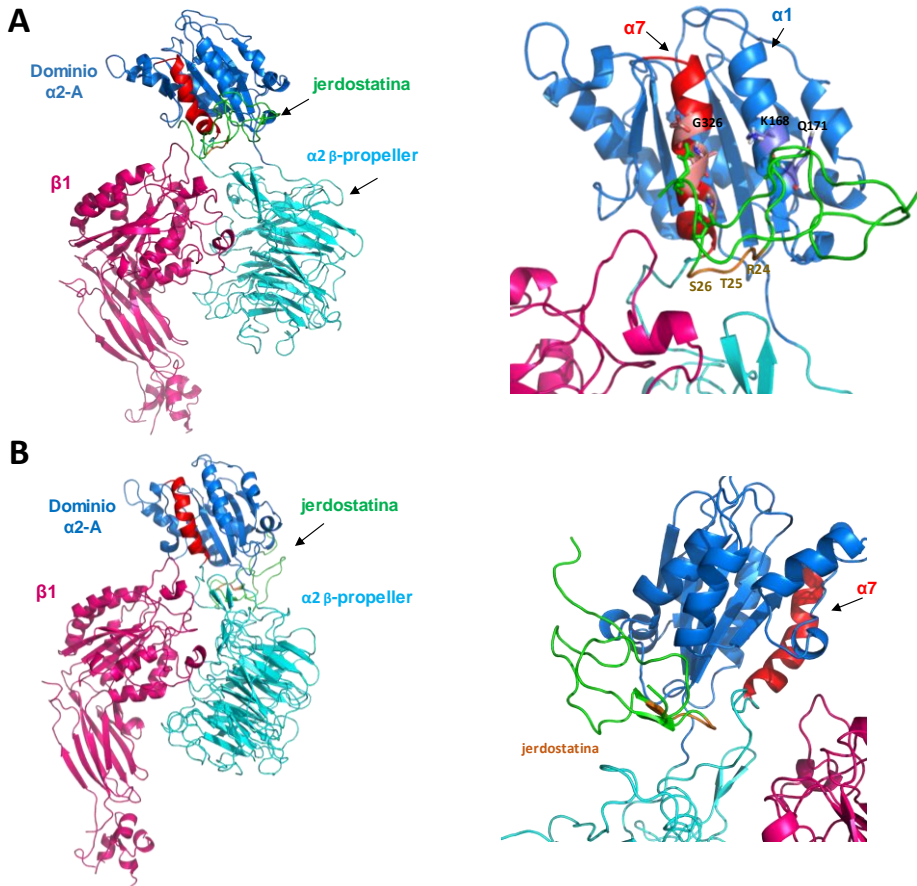
---

## **Anexos**

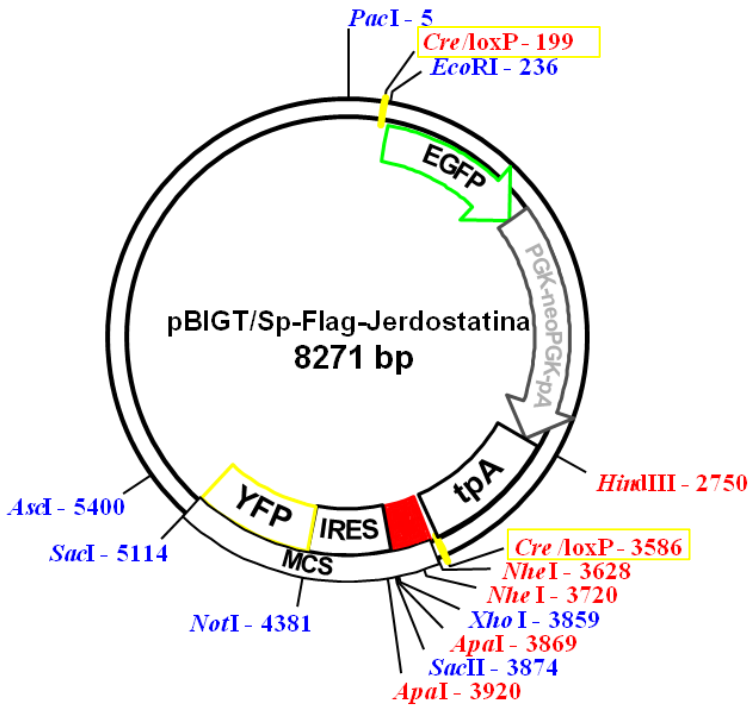




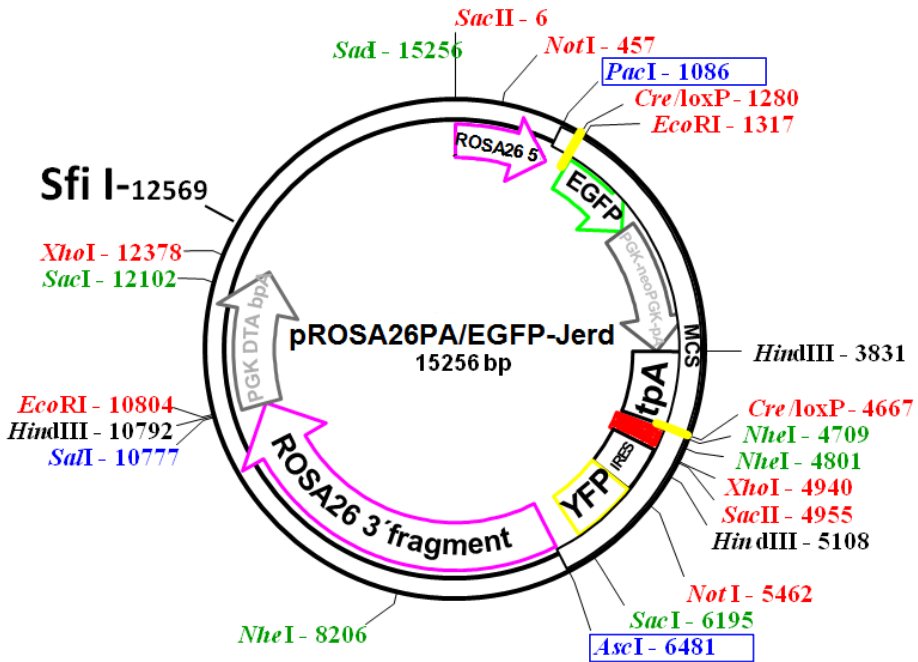




**Anexo I. Modelos de interacción  $\alpha_2\beta_1$ -jerdostatina.** Mediante el programa bioinformático HADDOCK se obtuvieron dos modelos de interacción **A)** y **B)**. En el primer modelo, los residuos N-terminal y C-terminal de jerdostatina interaccionan con la hélice 1 y la hélice 7 del dominio  $\alpha_2$ -A, mientras que el bucle de unión de jerdostatina no interacciona con la integrina. En el segundo modelo jerdostatina interacciona con el dominio  $\alpha_2$   $\beta$ -propeller.



**Anexo II. Plásmido pBIGT/Jerd.** El vector pBIGT de expresión en mamíferos se utilizó para generar ratones transgénicos que contienen la secuencia que codifica para jerdostatina (Jerd). El plásmido incluye un casete que codifica para la expresión de la proteína EGFP, una resistencia a neomicina bajo el dominio del promotor PGK (PGK-Neo) y una señal triple de poliadenilación SV40 (tpA) de terminación de la transcripción. El casete EGFP-Neo-tpA se encuentra flanqueando por los sitios loxP. Tras el casete, se insertó un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) fusionado con la secuencia que codifica para la proteína amarilla fluorescente YFP. La secuencia de SP<sub>BM40</sub>-Flag-Jerdostatina se insertó en el sitio de clonaje múltiple (MCS) del plásmido, entre los sitios de corte NheI y XhoI (3628-3859 pb) (en rojo).



**Anexo III. Plásmido pROSA26PA/EGFP-Jerd.** Este vector deriva del plásmido pROSA26.1, al que se le introdujeron los sitios de corte de las enzimas *PacI* y *AscI* para subclonar el plásmido pBIGT (Srinivas et al., 2001) y el sitio de corte de la enzima *SfiI* para linealizar el vector previamente a su transfección en las células madre de ratón. Este plásmido se caracteriza porque posee parte de la secuencia genómica del locus *ROSA26* (brazos homólogos 3' y 5'), presente en el genoma del ratón (cromosoma 6).





```

      10      20      30      40      50
SP-FlagJerd G T A C G C T A G C G A T G A G G G C C T G G A T C T T T C T T T C T C C T T T G C C T G G C C G G G A G G G
Clon 12      G T A C G C T A G C G A T G A G G G C C T G G A T C T T T T T T C T C C T T T G C C T G G C C G G G A G G G
Clon 25      G T A C G C T A G C G A T G A G G G C C T G G A T C T T T T T T C T C C T T T G C C T G G C C G G G A G G G

      70      80      90      100     110
SP-FlagJerd C A G C C C C A C T A G C C G A C T A C A A G G A C G A C G A T G A C A A G C T A G C G T G T A C A A C T G
Clon 12      C A G C C C C A C T A G C C G A C T A C A A G G A C G A C G A T G A C A A G C T A G C G T G T A C A A C T G
Clon 25      C A G C C C C A C T A G C C G A C T A C A A G G A C G A C G A T G A C A A G C T A G C G T G T A C A A C T G

      130     140     150     160     170
SP-FlagJerd G T T G T C G T C A G T G C A A A T T G A A G C C G G C A G G A A C A A C A T G C T G G A G A A C C A G T G
Clon 12      G T T G T C G T C A G T G C A A A T T G A A G C C G G C A G G A A C A A C A T G C T G G A G A A C C A G T G
Clon 25      G T T G T C G T C A G T G C A A A T T G A A G C C G G C A G G A A C A A C A T G C T G G A G A A C C A G T G

      190     200     210     220     230
SP-FlagJerd G T C A T T A C T G C A C T G G C A G A T C T T G T G A A T G T C C C A G T T A T C C C G G G A A T G G C T
Clon 12      G T C A T T A C T G C A C T G G C A G A T C T T G T G A A T G T C C C A G T T A T C C C G G G A A T G G C T
Clon 25      G T C A T T A C T G C A C T G G C A G A T C T T G T G A A T G T C C C A G T T A T C C C G G G A A T G G C T

SP-FlagJerd  C G A G G C  246
Clon 12      C G A G G C  246
Clon 25      C G A G G C  246

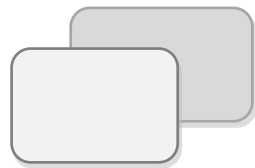
```

**Anexo V. Secuenciación del ADNc tras la recombinación.** El ARN extraído de las células MEF de ratones Tg Jerd<sup>+/+</sup> recombinadas *in vitro* y de embriones (E15) Tg Jerd<sup>+/NesCre</sup>, se retrotranscribió a ADN de cadena sencilla. Utilizando este ADNc se amplificó un fragmento de 250 pb correspondiente a jerdostatina que posteriormente se purificó, clonó y se secuenció. En la figura se muestra un alineamiento de las secuencias obtenidas de dos clones (12 y 25) respecto a la secuencia de SP-Flag-Jerdostatina. A pesar de que observamos un cambio nucleotídico (C29 → T29) este cambio no repercute en la secuencia aminoacídica.



\_\_\_\_\_

## **Abrebiaturas**









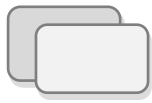
<b>Å</b>	Angström, unidad de distancias moleculares, atómicas y de longitud de onda
<b>ADAM</b>	Proteína disintegrina y metaloproteinasas
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>Akt</b>	Proteína serina/treonina quinasa
<b>Ang II</b>	Angiotensina II
<b>AP</b>	Fosfatasa alcalina
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>BCA</b>	Ácido bicinónico
<b>BCECF</b>	Indicador fluorescente, 2N,7N-bis-2-carboxietil-5-(y-6)-carboxi-fluoresceína
<b>bFGF</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
<b>BrdU</b>	Bromodeoxiuridina
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>CB3</b>	Fragmento del colágeno tipo IV derivado del bromuro de cianógeno
<b>CHO</b>	Células derivadas de ovario de hámster chino
<b>CID</b>	Disociación inducida por colisión
<b>CIM</b>	Placa para invasión y migración celular
<b>Col</b>	Colágeno
<b>Cos7</b>	Línea celular procedente de fibroblastos del riñón del mono
<b>CML</b>	Células músculo liso
<b>CMLV</b>	Células músculo liso vascular
<b>CMV</b>	Promotor de la región reguladora del citomegalovirus humano
<b>CRE</b>	Enzima tirosina recombinasa derivada del bacteriófago P1
<b>CRISPs</b>	Proteínas secretoras ricas en cisteína
<b>CTLs</b>	Lectinas de tipo C
<b>DAPI</b>	(4,6-diamino-2-fenilindol) marcador fluorescente que se une fuertemente al ADN
<b>DIG</b>	Digoxigenina
<b>DISs</b>	Disintegrinas
<b>DMEM</b>	Medio para cultivo de células de mamífero



	<i>(Dulbecco's modified Eagle's médium)</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>dNTP</b>	desoxirribonucleótidos trifosfato
<b>dpc</b>	días post-coito
<b>DTT</b>	DL-Ditiotreitol
<b>E-plate</b>	Placa para adhesión celular
<b>EDTA</b>	Ácido Etilendiaminotetraacético
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento endotelial
<b>EGFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>ES</b>	Célula madre embrionaria
<b>ESI</b>	Ionización por electrospray
<b>ER<sup>T2</sup></b>	receptor recombinante de estrógeno humano
<b>FAC</b>	Citometría de flujo
<b>FAK</b>	Quinasa de adhesión focal
<b>FG</b>	Fibrinógeno
<b>FN</b>	Fibronectina
<b>GST</b>	Glutation-S-Transferasa
<b>HASMC</b>	Línea celular procedente del músculo liso de aorta humana
<b>HEK</b>	Células embrionarias de riñón humano
<b>HEPES</b>	Ácido 4-(2-hidroxietil)-piperazina-etano sulfónico
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano
<b>HT1080</b>	Células humanas de fibrosarcoma
<b>HUVEC</b>	Células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano
<b>IC50</b>	Medida de la concentración media máxima necesaria para inhibir
<b>ICAM-1</b>	Molécula de adhesión intracelular
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>ILK</b>	Quinasa ligada a integrinas
<b>IPTG</b>	Isopropyl-D-tiogalactosidasa
<b>IRES</b>	Sitio interno de entrada al ribosoma
<b>ISH</b>	Hibridación in situ
<b>ITG</b>	Familia génica de integrinas
<b>Jerd</b>	Jerdostatina



<b>KDa</b>	kiloDalton
<b>KI</b>	Organismo genéticamente modificado que contiene un gen exógeno
<b>KO</b>	Organismo genéticamente modificado que carece de la expresión de un gen en particular
<b>lacZ</b>	Gen que codifica para la enzima galactosidasa
<b>LAOs</b>	L-aminoácido oxidasas
<b>LB</b>	Medio de cultivo para bacterias <i>Luria-Bertani</i>
<b>LIF</b>	Factor Inhibidor de la Leucemia
<b>LN</b>	Laminina
<b>MALDI-TOF</b>	Desorción/ionización mediante láser asistida por matriz, acoplada a un analizador TOF (tiempo de vuelo)
<b>MAPK</b>	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>MEF</b>	Fibroblastos embrionarios de ratón
<b>MIDAS</b>	Sitio de adhesión dependiente de iones metálicos
<b>MS</b>	Espectrometría de masas
<b>MV3</b>	Línea celular de melanoma humano
<b>NC1</b>	Dominio globular no colagenoso
<b>Neo</b>	Neomicina
<b>Nes</b>	Nestina
<b>NOX</b>	NADPH oxidasa
<b>O.D.</b>	Densidad óptica
<b>OMG</b>	Organismo modificado genéticamente
<b>OTC</b>	Medio crioprotector que permite el corte en criostato
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Tampón fosfato
<b>PC12</b>	Línea celular derivada a partir de un feocromocitoma de la medula suprarrenal de la rata
<b>PCC</b>	Ratones Tg Jerd <sup>+/CreER</sup> tratados con aceite de maíz
<b>PCT</b>	Ratones Tg Jerd <sup>+/CreER</sup> tratados con tamoxifeno
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PEI</b>	Polietilenimina
<b>PFA</b>	Paraformaldehído



## Abrebiaturas

---

<b>PGK</b>	Promotor fosfoglicerato kinasa 1
<b>PHT</b>	Ratones Tg Jerd <sup>+/-</sup> tratados con tamoxifeno
<b>PI3K</b>	fosfoinositol 3-quinasa
<b>PIP2</b>	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
<b>PLA2</b>	Fosfolipasas tipo A <sub>2</sub>
<b>PMSF</b>	Fenilmetilsulfonil fluoruro
<b>pNpp</b>	p-nitrofenil fosfato
<b>Puro</b>	Puromicina
<b>PVDF</b>	Fluoruro de polivinilideno
<b>r-</b>	Recombinante
<b>RASMC</b>	Línea celular del músculo liso de aorta de rata
<b>RBE</b>	Fragmentos de reconocimiento de la recombinasa Cre
<b>Rho GTPasa</b>	Enzima transmisora de señales que hidroliza la molécula guanósín trifosfato (GTP)
<b>RMG</b>	Ratones modificados genéticamente
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>r.p.m</b>	Revoluciones por minuto
<b>RPTLN</b>	Gen que codifica para las disintegrinas cortas con motivo RTS
<b>RT-PCR</b>	Reacción de transcripción inversa
<b>RuGli</b>	Línea celular procedente de glioblastoma de rata
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SEAP</b>	Fosfatasa alcalina humana de secreción
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SP</b>	Péptido señal
<b>Src</b>	Proteína oncogénica tirosina quinasa
<b>SS</b>	Enlace disulfuro
<b>SVMP</b>	Metaloproteínasa del veneno de serpiente
<b>SVSPs</b>	Serín proteinasas del veneno de serpiente
<b>TAE</b>	Disolución tampón formada por Tris, acetato y EDTA
<b>TBE</b>	Disolución tampón formada por Tris, borato y EDTA
<b>TBS</b>	Tampón salino Tris
<b>TEV</b>	Proteasa del virus del grabado del tabaco
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético



<b>Tg</b>	Transgénico
<b>Tg CreER<sup>T2</sup></b>	Ratón transgénico que contiene la secuencia de la enzima Cre fusionada con el receptor de estrógeno humano (ER <sup>T2</sup> )
<b>TgJerd</b>	Ratón transgénico que contiene la secuencia que codifica para jerdostatina
<b>TN</b>	Tenascín
<b>tpA</b>	Señal triple de poliadenilación de terminación de la transcripción
<b>Tween-20</b>	Polioxyetileno sorbitan monolaurato
<b>U</b>	Unidad de actividad enzimática
<b>u.a</b>	Unidades arbitrarias
<b>UV</b>	Radiación Ultra Violeta
<b>VCAM</b>	Moléculas de adhesión vasculares.
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular
<b>VN</b>	Vitronectina
<b>vSP</b>	Péptido señal del veneno de serpiente
<b>YFP</b>	Proteína amarilla fluorescente

### Aminoácidos

<b>A</b> (Ala)	Alanina	<b>Q</b> (Gln)	Glutamina
<b>C</b> (Cys)	Cisteína	<b>R</b> (Arg)	Arginina
<b>D</b> (Asp)	Ácido aspártico	<b>T</b> (Thr)	Treonina
<b>E</b> (Glu)	Ácido glutámico	<b>V</b> (Val)	Valina
<b>F</b> (Phe)	Fenilalanina	<b>W</b> (Trp)	Triptófano
<b>G</b> (Gly)	Glicina	<b>Y</b> (Tyr)	Tirosina
<b>H</b> (His)	Histidina		
<b>I</b> (Ile)	Isoleucina		
<b>K</b> (Lys)	Lisina		
<b>L</b> (Leu)	Leucina		
<b>M</b> (Met)	Metionina		
<b>N</b> (Asn)	Asparragina		
<b>P</b> (Pro)	Prolina		

### Bases nitrogenadas

<b>A</b>	Adenina
<b>C</b>	Citosina
<b>G</b>	Guanina
<b>T</b>	Timina
<b>U</b>	Uracilo

