

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética



**Papel del receptor de dioxina en la regulación de la adhesión y
la migración celular en fibroblastos: interacciones con
Integrina $\beta 1$ y Caveolina 1.**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por
D. Javier Rey Barroso.

Badajoz, Noviembre de 2013.



Universidad de Extremadura

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

Y BIOLOGIA MOLECULAR

Y GENETICA

Unidad de Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Ciencias

PEDRO M. FERNANDEZ SALGUERO, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura,

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral, titulada “Papel del receptor de dioxina en la regulación de la adhesión y migración celular en fibroblastos: interacciones con Integrina β 1 y Caveolina.”, de la que es autor D. Javier Rey Barroso ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética de la Universidad de Extremadura.

Que revisada la memoria presentada, el Director del trabajo considera que posee las condiciones requeridas para un trabajo de Tesis Doctoral. Por todo ello,

AUTORIZA:

Su presentación y defensa pública frente al tribunal designado al efecto de acuerdo con lo previsto en el Real Decreto 778/1998 de 30 de Abril.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, expido el presente certificado en Badajoz a 10 de Septiembre de 2013.

Fdo. Pedro M. Fernández Salguero

RECONOCIMIENTOS

Para la realización del presente trabajo de Tesis Doctoral hemos recibido la ayuda de diferentes personas e Instituciones. Por ello, deseamos expresar nuestro agradecimiento:

A los Dres. María Ángeles García Pardo y Joaquín Teixidó (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid), así como al personal de sus laboratorios, en especial los Dres Georgina Coló, Estefanía Ugalde y Javier Redondo, por su estrecha colaboración científica referente a la regulación de integrinas.

Al Dr. Alberto Álvarez, y a los demás miembros del Servicio de Técnicas Aplicadas a las Biociencias de la Universidad de Extremadura, por su asistencia en gran parte de la experimentación realizada.

Al Dr. Miguel Ángel Alonso (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid) y el personal de su laboratorio, por su colaboración e instrucción en la realización de gradientes de sacarosa.

Al Dr. Miguel Ángel del Pozo (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid), por su colaboración en la investigación referente a la regulación de Caveolina1.

Al Dr. Lisardo Boscá (Instituto de Investigaciones Biomédicas, Madrid), por cedernos los vectores de expresión pEGFP-Cav1 y pEGFP Cav1-Y14F.

Al Dr. Jose María Carvajal (Mount Sinai School of Medicine, New York, USA), por su asistencia en las primeras fases del presente trabajo

Al Doctor Ángel-Carlos Román (Instituto Cajal, Madrid) por realizar los análisis estadísticos en los estudios de endocitosis.

FINANCIACIÓN.

Este trabajo ha sido financiado con proyectos del Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2008-00462 y BFU2011-22678), de la Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer RTICC (RD06/0020/1016) y del Plan de Ayuda a grupos de la Junta de Extremadura (GR10008). Toda la financiación recibida está y co-financiada por el programa FEDER de la Unión Europea. Javier Rey Barroso ha sido beneficiario de mediante una beca de Formación del Profesorado Universitario (FPU, convocatoria de 2008) del Ministerio de Educación y Ciencia, y de una bolsa de viaje para estancias cortas de la RTICC (Convocatoria de 2009).



La realización de esta Tesis Doctoral no ha supuesto sólo un aprendizaje académico, sino también un capítulo clave en mi desarrollo personal. En esto, existen personas que han jugado un papel tan necesario como desinteresado, sin las cuales esta etapa de mi vida hubiera perdido gran parte de su valor.

A mi tutor, Pedro Fernández, un ejemplo combinado de constancia e ilusión por la ciencia, y un modelo personal de integridad y esfuerzo.

Al Dr. Jaime Merino, gran consejero y, quizá la cara más amable de la estructura universitaria.

A mis compañeros de laboratorio pasados y presentes, no sólo por su compañerismo profesional, sino por su ayuda personal en los malos momentos, y su paciencia en otros muchos.

Al Dr. Alberto Álvarez, por sus consejos, carácter e implicación personal en el desarrollo de este trabajo.

Al personal del STAB, por su simpatía y profesionalidad constantes.

A mis amigos, por su apoyo incondicional, su capacidad de relativizar mis altibajos, y por sembrar de anécdotas y recuerdos mi día a día.

A todo aquel al que haya hablado de ciencia en estos 5 años y haya decidido escucharme de forma altruista, gracias de veras.

A mis padres, por educarme y quererme sin descanso, y por hacerme sentir orgulloso de ellos.

A mi hermano, por estar ahí siempre y saber encontrar las palabras o silencios adecuados para cada ocasión.

A Elena: mi mayor apoyo, mi compañera. La persona que me ha enseñado la verdadera razón para disfrutar la vida: el amor. Es imposible añadir nada más simple ni más cierto.

Mil gracias a todos, espero que estas líneas compensen mínimamente todo lo que me habéis aportado.

Javier Rey Barroso.

Introducción	1.
El receptor de dioxina (AhR).....	1.
Estructura del receptor de dioxina.....	4.
Mecanismos de activación y localización celular de AhR.....	6.
Activación de AhR en ausencia de xenobióticos.....	10.
Implicación de AhR en la fisiología celular.....	12.
Fibroblastos, adhesión y migración celular e implicación del receptor de dioxina.....	16.
Adhesión celular.....	17.
Migración.....	19.
Implicación del receptor de dioxina en adhesión y migración celular.....	20.
Adhesión celular y rutas de señalización implicadas: integrinas.....	24.
La matriz extracelular.....	24.
Las integrinas.....	25.
Integrinas y transmisión de señales: La familia de quinasas Src.....	27.
Relación entre AhR y c-Src.....	30.
Caveolas y transducción de señales.....	31.
Caveolina 1 en migración direccional y en sus rutas de señalización asociadas.....	33.
Caveolina y AhR.....	37.
Objetivos.....	41.
Materiales y métodos.....	45.
1. Cultivo de líneas celulares.....	45.
1.1. Reactivos y Tratamientos.....	45.
2. PCR (Polymerase Chain Reaction).....	47.
2.1. PCR Convencional para inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	47.
2.2. PCR cuantitativa para la cuantificación de la expresión de ARN mensajero.....	47.

3. Transfección transiente de células en cultivo.....	48.
4. Microscopía confocal.....	49.
4.1. Realización de tinciones fluorescentes.....	49.
4.2. Análisis del contenido en fibronectina de los cultivos de fibroblastos.....	50.
4.3. Análisis de la morfología celular de los fibroblastos T-FGM.....	50.
4.4. Realización de inmunofluorescencia en heridas en placa.....	51.
4.5. Cuantificación de la orientación de las fibras de actina en heridas in vitro.....	51.
4.6. Ensayos de degradación de gelatina: detección de invadosomas.....	51.
4.7. Cuantificación de la endocitosis de BSA-FITC.....	53.
4.8. Seguimiento de vesículas de Cav1-GFP.....	54.
4.9. FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching).....	54.
5. Ensayo de migración in vivo empleando tracking celular.....	54.
6. Ensayo de herida en placa.....	55.
7. Ensayos de adhesión a matrices extracelulares.....	56.
8. Western Blot.....	57.
9. Inmunoprecipitación de proteínas y análisis del nivel de expresión y de actividad de los inmunoprecipitados.....	59.
10. Extracción y separación de proteínas nucleares y citoplásmicas.....	60.
11. Aislamiento de Rafts de membrana plasmática mediante gradiente discontinuo de sacarosa.....	60.
12. Ensayos de citometría.....	61.
12.1. Ensayo de activación y de presencia de integrina $\beta 1$	61.
12.2. Ensayo de unión a fibronectina soluble.....	62.
12.3. Cuantificación del nivel de colesterol celular.....	62.
13. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	63.
Tabla de anticuerpos.....	65.

Resultados, capítulo I.....69.

El receptor de dioxina modula migración direccional.....69.

Los fibroblastos AhR-/- presentan mayor adhesión a fibronectina a tiempos cortos.....70.

La integrina $\beta 1$ está sobreactivada en T-FGM en ausencia de AhR.....71.

La carencia de AhR en células T-FGM provoca la sobre-expresión de fibronectina y ésta es, en parte, responsable de la sobre-activación de la integrina $\beta 1$73.

La quinasa c-Src se encuentra inhibida en células T-FGM-AhR-/- por la sobre-activación de Csk.....76.

El receptor de dioxina regula transcripcionalmente la expresión de Cbp mediante la unión a su promotor.....78.

El silenciamiento de Cbp provoca la recuperación del fenotipo silvestre en células T-FGM- <i>AhR</i> ^{-/-}	79.
El control de la expresión de fibronectina por el receptor de dioxina es independiente de Cbp.....	82.
La proteína del complejo citosólico Xap2 previene la activación transcripcional del receptor de dioxina pero carece de un papel adicional en la ruta de activación de la integrina β 1.....	83.
El receptor de dioxina fomenta la reorganización y la invasión de la matriz extracelular.....	85.
Resultados, capítulo II.....	91.
El receptor de dioxina se localiza en subdominios <i>raft</i> de la membrana plasmática.....	91.
El receptor de dioxina se asocia a caveolina 1 y su ausencia provoca la deslocalización de ésta de la membrana.....	94.
La distribución de caveolina 1 entre dominios de membrana <i>raft</i> y de membrana general es dependiente de la expresión y de la localización de AhR.....	96.
El receptor de dioxina contribuye a la reorganización del citoesqueleto y a la localización intracelular de caveolina 1 durante la migración direccional.....	100.
El estado de fosforilación de la Y ¹⁴ de caveolina 1 no es responsable de su patrón de localización en fibroblastos <i>AhR</i> ^{-/-}	102.
La movilidad de caveolina 1 en la membrana plasmática es menor en fibroblastos T-FGM- <i>AhR</i> ^{-/-} pero no depende de la velocidad de transporte de vesículas.....	105.
La ausencia del receptor de dioxina provoca un aumento en la endocitosis dependiente de caveolas.....	109.
El exceso de colesterol presente en fibroblastos T-FGM- <i>AhR</i> ^{-/-} es, en parte, responsable del fenotipo mostrado por estas células.....	111.
Discusión.....	117.
Conclusiones.....	133.
Bibliografía.....	137

ABREVIATURAS MÁS UTILIZADAS.

AhR:	<i>Aryl Hydrocarbon Receptor</i> . Receptor de dioxina.
ARNT	<i>Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator</i> .
BSA:	<i>Bovine Serum Albumin</i> .
Cav1:	Caveolina 1.
Csk:	<i>C-terminal tyrosine Src Kinase</i> .
Cbp	<i>Csk Binding Protein</i>
c-Src:	<i>Cellular homologue of Rous Sarcoma Virus protein</i> .
CYP1A1	<i>Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1</i>
FAK:	<i>Focal Adhesion Kinase</i> .
FITC:	Isothiocianato de Fluoresceína.
FN:	Fibronectina.
M β CD:	Metil- β -ciclodextrina.
T-FGM:	Fibroblastos de Glándula Mamaria transformados.
<i>AhR</i> ^{+/+} :	Procedente de ratones silvestres.
<i>AhR</i> ^{-/-} :	Procedente de ratones <i>knock-out</i> para AhR.
HEPA:	Línea celular de hepatoma procedente de ratones C57/L
Pag1:	<i>Phosphoprotein Associated with Glycosphingolipid microdomains 1</i> , gen de Cbp
TCDD:	2,3,7,8-tetraclorodibenzo[<i>p</i>]dioxina.
XAP2	<i>Hepatitis B virus X-Associated Protein 2</i> .
XRE:	<i>Xenobiotic Response Elements</i> .

“¿El secreto?

*Saborear los días buenos
entre las semanas malas.”*

Proverbio científico.

INTRODUCCIÓN

o **El receptor de dioxina (AhR).**

El receptor de dioxina o AhR (“*Aryl hydrocarbon Receptor*”) fue identificado por primera vez por el laboratorio de Aland Poland en 1976 en el citoplasma de células de hígado de ratón, siendo descrito como una proteína implicada en la destoxificación de xenobióticos y, posteriormente, en el mecanismo de inducción de enzimas destoxicantes tales como el citocromo P450 CYP1A1 (Poland *et al.* 1976; Okey *et al.* 1979; Poland and Knutson 1982). Durante los años subsiguientes, se describió la translocación al núcleo del receptor dependiente de su unión a ligandos exógenos, generalmente hidrocarburos policíclicos aromáticos (Greenlee and Poland 1979; Okey *et al.* 1979). El hallazgo y descripción posteriores de la proteína ARNT (*Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) permitieron el trazado de un mecanismo básico de acción del receptor (Reyes *et al.* 1992).

Ya a mediados de los años 90, la producción de ratones deficientes en la expresión de AhR generados por técnicas de *gene knock-out* confirmó el papel toxicológico del receptor, ya que los ratones carentes del receptor (*AhR*^{-/-}) eran resistentes a los efectos tóxicos y carcinogénicos de xenobióticos como la dioxina (TCDD, 2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-*p*-dioxina) y el benzo- α -pireno (BP) (Fernandez-Salguero *et al.* 1996; Mimura *et al.* 1997; Shimizu *et al.* 2000). Estudios moleculares posteriores definieron a AhR como un factor de transcripción activado por unión a ligando mediador de los efectos tóxicos y carcinogénicos de gran número de compuestos xenobióticos, entre los que se incluyen hidrocarburos aromáticos halogenados (HAHs), compuestos policíclicos aromáticos (PAHs) y bifenilos policlorinados (PCBs). Muchos de estos compuestos son potentes tóxicos ambientales generados por la actividad humana y sus procesos tóxicos y carcinogénicos son en general consecuencia de la inducción de enzimas destoxicantes hepáticas de las fases I y II (Pohjanvirta and Tuomisto 1994; Fernandez-Salguero *et al.* 1996; Fernandez-Salguero *et al.* 1996; Shimizu *et al.* 2000).

La importancia toxicológica y oncológica de estos xenobióticos potenció una intensa investigación encaminada a determinar el mecanismo molecular de acción de AhR, a definir su ruta de señalización intracelular, a identificar los intermediarios que regulan su compartimentalización núcleo-citoplasmática y a comprender su función como regulador transcripcional de genes diana, clásicamente los miembros de la superfamilia de citocromos P450 (CYP450s) CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 y CYP1S1

(Fernandez-Salguero *et al.* 1997) (Mimura *et al.* 1997; Peters *et al.* 1999; Shimizu *et al.* 2000).

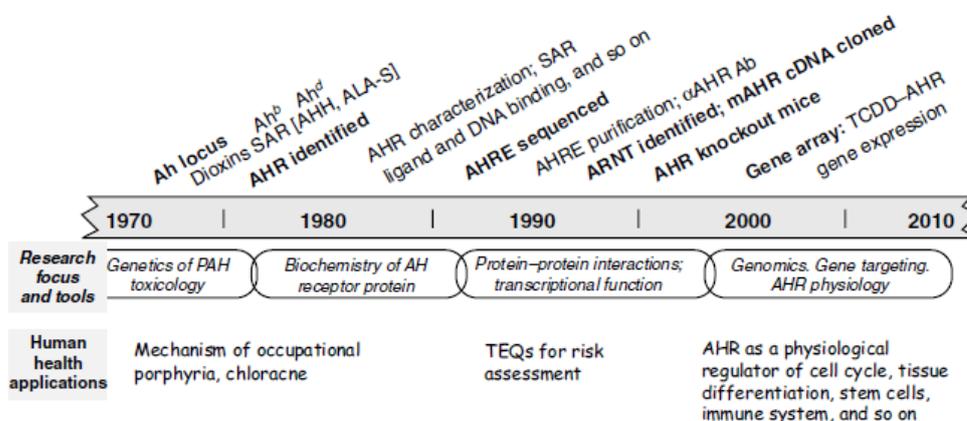


Figura 1.1. Principales avances en el estudio del receptor de dioxina a lo largo del tiempo (Pohjanvirta 2012).

Paralelo al estudio del papel de AhR en procesos de toxicidad, teratogénesis y carcinogénesis mediados por xenobióticos, un número creciente de resultados experimentales comienza a definir un papel fisiológico para el receptor de dioxina. Buena parte de estos datos procede del estudio de ratones *knock-out* para AhR, los cuales presentan *per se* múltiples cambios fenotípicos que incluyen alteraciones reproductoras, patologías hepáticas y cardíacas y defectos en los sistemas vascular e inmune (Lee *et al.* 1995; Fernandez-Salguero *et al.* 1997; Mimura *et al.* 1997; Abbott *et al.* 1999; Benedict *et al.* 2000).

El papel endógeno y homeostático de AhR tiene también un importante apoyo evolutivo ya que se encuentra altamente conservado entre especies (Hahn 2002), tiene un patrón de expresión constitutivo durante el desarrollo embrionario y en tejidos adultos (Abbott *et al.* 1995) y, además, el gen que lo codifica está presente en todo el rango de Metazoos, los cuales surgieron evolutivamente millones de años antes de la existencia de dioxinas en la Biosfera. Así, en estos momentos está ampliamente aceptado que AhR cumple una importante función en la biología, el desarrollo y la funciones fisiológicas de la célula (Lee *et al.* 1995; Elizondo *et al.* 2000; Puga *et al.* 2005; Barouki *et al.* 2007) (Baba *et al.* 2005) (añadir libro sobre AhR de Pohjanvirta, 2012). No obstante, a día de hoy aún se desconocen en gran medida las rutas y los mecanismos moleculares implicados, los intermediarios con los que interacciona y los genes diana regulados por AhR en ausencia de xenobióticos, quizás debido a que sus funciones endógenas quedaban enmascaradas por el uso de xenobióticos en los estudios clásicos.

Los nuevos avances permiten pensar que la modulación de procesos toxicológicos por AhR puede ser un mecanismo adaptativo a la aparición de xenobióticos en la Biosfera, de tal manera que su función toxicológica podría representar una versión exacerbada de su función fisiológica (Fujii-Kuriyama and Kawajiri 2010). Así, por ejemplo, la activación de AhR por ligandos como TCDD o BP provoca la parada del ciclo celular en G0/G1 y G2/M, la disminución de la replicación del DNA y la inhibición de la proliferación celular (Puga *et al.* 2002). En ausencia de estos compuestos, AhR promueve la progresión del ciclo celular en fibroblastos embrionarios, donde las células carentes de AhR presentan menor proliferación y mayor tasa apoptótica que las silvestres (Fernandez-Salguero *et al.* 1995; Elizondo *et al.* 2000). Estudios en *Drosophila melanogaster* también apoyan la función endógena de AhR ya que su ortólogo en esta especie, *Spineless* (*Ss*), tiene una distribución constitutivamente nuclear y es insensible al tratamiento con dioxinas (Kudo *et al.* 2009).

Teniendo en cuenta el papel del receptor de dioxina como factor de transcripción en respuesta a xenobióticos, la búsqueda de dianas transcripcionales fisiológicas ha sido la principal línea de investigación abordada en los últimos años. A este respecto, se ha demostrado que AhR participa bajo condiciones fisiológicas en el control transcripcional de genes que codifican para la DNA polimerasa kappa (Ogi *et al.* 2001), *N*-miristoiltransferasa 2 (Kolluri *et al.* 2001), *p27^{Kip1}* (Kolluri *et al.* 1999), Bax (Matikainen *et al.* 2001), T-Cadherina (Niermann *et al.* 2003), c-Myc (Yang *et al.* 2005), Slug/SNAI2 (Ikuta and Kawajiri 2006), Vav3 (Carvajal-Gonzalez *et al.* 2009), la proteína de unión a TGF β latente LTBP-1 (Gomez-Duran *et al.* 2008) y la proteína de maduración de linfocitos B (Ikuta *et al.* 2010), entre otros. Además, el análisis de *microarrays* de expresión en condiciones de presencia/ausencia de xenobióticos ha identificado un número relevante de genes potencialmente regulados por AhR, una fracción de los cuales está relacionada con funciones endógenas y con la homeostasis celular, pero no con el metabolismo de xenobióticos (Boverhof *et al.* 2005; Tijet *et al.* 2006; Frericks *et al.* 2007). Al margen de esto, otros estudios muestran que AhR también puede actuar como cofactor y modular la actividad de reguladores transcripcionales relevantes en la fisiología celular; entre los que se encuentran NF- κ B, que media reacciones inflamatorias y de estrés oxidativo (Tian *et al.* 1999), pRb (proteína del retinoblastoma) (Marlowe *et al.* 2004; Huang and Elferink 2005) o el receptor de estrógenos alfa (ER α) (Klinge *et al.* 1999; Wormke *et al.* 2000).

Independientemente de su función como factor de transcripción, pero dentro de su interacción con rutas de señalización que mantienen la fisiología celular, AhR parece

interaccionar directamente con rutas de señalización activadas por mitógenos (MAPK) (Tan *et al.* 2002) que implican a otros receptores como el de estrógenos (Ohtake *et al.* 2003; Wormke *et al.* 2003), mediadas por la proteína quinasa c-Src (Blankenship and Matsumura 1997; Vogel *et al.* 2004) o moduladas por factores de intercambio GTP/GDP como Vav3 (Carvajal-Gonzalez *et al.* 2009). Por último, se ha descrito a AhR como una E3 ubiquitina ligasa dependiente de ligando (Ohtake *et al.* 2007)

o **Estructura proteica del receptor de dioxina.**

La clonación y secuenciación del gen que codifica para AhR en 1992 (Burbach *et al.* 1992; Ema *et al.* 1992) permitió describir su pertenencia a la superfamilia de factores de transcripción con secuencias del tipo *basic-helix-loop-helix* (bHLH) cuya característica diferencial es su activación por unión de ligando exógeno. Esta familia de proteínas incluye también los reguladores de la transcripción con dominio PAS Per (*Period*), proteína implicada en el mantenimiento del ritmo circadiano en *Drosophila melanogaster*, ARNT (*Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*) y Sim (*Single Minded*), proteína reguladora del desarrollo del sistema nervioso central en *Drosophila melanogaster*. Por esta homología de dominios funcionales, a este grupo de factores de transcripción se le denomina bHLH/PAS (*Basic Helix-Loop-Helix/Period (Per)-Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)-Single minded (Sim)*) (Figura 1.2). Globalmente, estas proteínas están implicadas en el control de procesos fisiológicos diversos tales como embriogénesis, desarrollo neuronal, ritmo circadiano, angiogénesis, metabolismo y respuesta a hipoxia (Fernandez-Salguero *et al.* 1995; Hankinson 1995; Crews 1998; Gonzalez and Fernandez-Salguero 1998; Chan *et al.* 1999; Whitlock 1999).

Describiendo la proteína desde su extremo amino al carboxilo, encontramos en primer lugar el dominio bHLH. Su región básica media la unión al DNA y el dominio HLH es necesario para la heterodimerización con ARNT. Siguiendo hacia el extremo C-terminal, AhR tiene un segmento de homología, denominado PAS, también presente en ARNT, Per y Sim. El dominio PAS está formado por dos copias de una repetición degenerada de unos 50 aminoácidos denominados PAS-A y PAS-B, separadas entre sí por otros 110 aminoácidos. La región PAS-B contiene parte del dominio de unión al ligando y un dominio necesario para la interacción de AhR con el chaperón Hsp90 (Procopio *et al.* 2002). El extremo C-terminal de AhR, ARNT y Sim contiene una región rica en glutamina (Q), similar a los dominios de transactivación presentes en otros factores de transcripción. Consecuentemente, la pérdida del dominio C-terminal no afecta a la unión al DNA ni al ligando (Fukunaga *et al.* 1995) pero sí a la interacción con

diversos co-activadores, no caracterizados completamente, que determinarán la tasa final de transcripción.

Se ha mostrado que AhR, *per se*, presenta baja capacidad de unión al DNA, de modo que los homodímeros AhR/AhR son transcripcionalmente inactivos (Swanson *et al.* 1995). Clásicamente, se ha argumentado que la adquisición de capacidad transcripcional en respuesta a xenobióticos requiere de

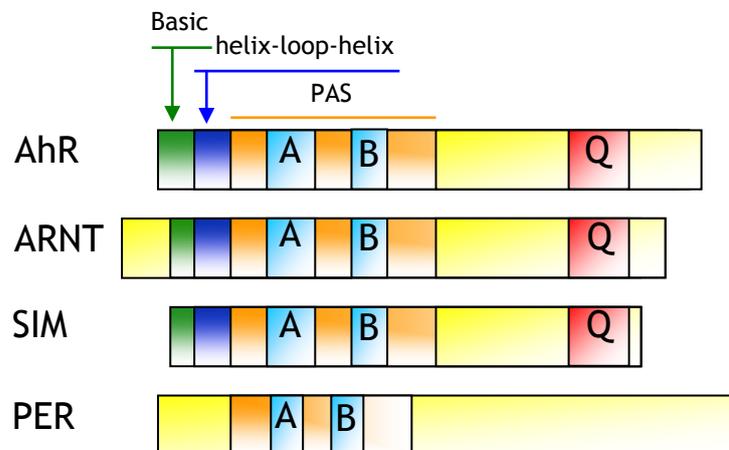


Figura I.2. Estructura esquemática de varios miembros de la familia bHLH/PAS. Se han destacado los principales dominios funcionales de cada proteína (Carvajal-González 2008).

su interacción y heterodimerización con ARNT. A pesar de ello, no se conoce si en ausencia de ligando exógeno AhR puede heterodimerizar con otros factores diferentes de ARNT o actuar de forma independiente a éste; de hecho, recientemente, se ha descrito a la proteína KLF6 (Kruppel-like factor 6) como formador de un heterodímero alternativo e independiente a ARNT, con capacidad de unión a ADN en secuencias XRE no consenso (Wilson *et al.* 2013). El dominio de transactivación de AhR es determinante en su localización celular y en sus propiedades de transporte núcleo-citoplasmático en ausencia de ligando exógeno. Aunque el mecanismo de translocación nuclear de AhR sólo ha sido descrito parcialmente, se ha identificado una señal de localización nuclear (NLS, *Nuclear Localization Signal*), situada en el extremo N-terminal de la proteína, que es reconocida por dos componentes del complejo que forman el poro nuclear. Adicionalmente, AhR presenta dos señales de exportación nuclear (NES, *Nuclear Export Signal*), una en el dominio bHLH y otra en el dominio PAS-A; ambas regiones son ricas en leucina y reconocidas por la proteína CRM1 (*Chromosome Region Maintenance 1*) (Ikuta *et al.* 1998; Berg and Pongratz 2001).

o Mecanismos de activación y localización celular de AhR.

Existen múltiples factores que pueden modificar la actividad transcripcional de AhR, y entre ellos, se incluyen tanto agentes químicos como factores biológicos. Sin embargo, la mayor parte de los estudios realizados se han centrado en el proceso de activación de AhR por la unión de ligandos exógenos y en el mecanismo de regulación transcripcional de genes diana implicados en el metabolismo de xenobióticos, clásicamente *Cyp1a1*, manteniendo la regulación de la actividad transcripcional de AhR en ausencia de xenobióticos como uno de los aspectos peor conocidos de su funcionalidad.

Según el modelo comúnmente aceptado (Figura 1.3), en ausencia de xenobióticos, la forma inactiva de AhR se encuentra predominantemente en el citosol asociada a un complejo de chaperones moleculares que al menos incluye dos moléculas de Hsp90, (*Heat Shock Protein 90*; que mantienen a AhR en una conformación proclive a la unión de ligando e impiden su unión prematura a ARNT) (Perdew 1988; Wilhelmsson *et al.* 1990), una molécula de la proteína p23 que promueve la liberación de las Hsp90 tras la unión del ligando (Kazlauskas *et al.* 1999) y una de la

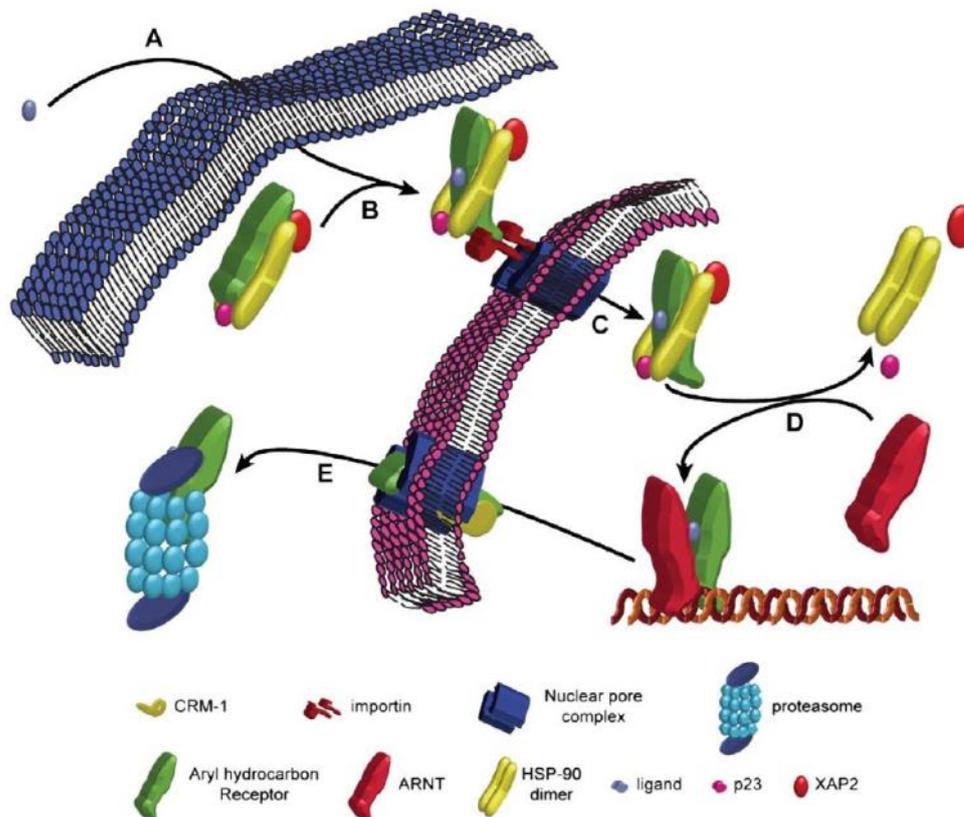


Figura 1.3. Mecanismo clásico de activación del receptor de dioxina. (A) Entrada en la célula del ligando exógeno. (B) unión del ligando a AhR y cambio conformacional del complejo citosólico en el que está integrado. (C) Internalización en el núcleo del complejo. (D) Liberación del complejo, heterodimerización con ARNT e interacción con las secuencias XRE del genoma. (E) inactivación, exportación al citoplasma y degradación por el proteosoma. (Furness and Whelan 2009).

inmunofilina XAP2 (*Hepatitis B virus X-Associated Protein 2*) (Meyer *et al.* 1998), también conocida como ARA9 (*AHR-Associated protein 9*) (Carver and Bradfield 1997) o AIP (*AHR-Interacting Protein*) (Ma and Whitlock 1997), la cual estabiliza la localización citoplásmica de AhR y evita la degradación temprana del mismo vía proteosoma en ausencia de ligando exógeno (Davarinos and Pollenz 1999; Roberts and Whitelaw 1999).

Cuando AhR es activado por la unión de xenobiótico, cambia su conformación y se transloca al núcleo, donde se liberan Hsp90 y el resto de chaperonas y el receptor forma heterodímeros activos AhR/ARNT con capacidad de unión a ADN (Kazlauskas *et al.* 1999; Lees and Whitelaw 1999; Kazlauskas *et al.* 2001), en concreto a secuencias consenso denominadas XREs o DREs (*Xenobiotic/Dioxin Response Elements*) situadas en regiones promotoras de genes diana, activando o reprimiendo su transcripción (Rowlands and Gustafsson 1997) (Niermann *et al.* 2003; Gomez-Duran *et al.* 2008).

Tras la transactivación de los genes diana, AhR se disocia de ARNT con lo que su región NES de exportación nuclear queda accesible y reconocible por CMR1. La formación del complejo AhR-CMR1 induce el transporte del receptor al citosol donde es ubiquitinado y degradado por el proteosoma 26S (Roberts and Whitelaw 1999; Ma and Baldwin 2000; Santiago-Josefat *et al.* 2001).

Se han descrito diversos co-factores que interaccionan con AhR o ARNT a lo largo de su mecanismo de acción, los cuales quedan reflejados en la tabla I.I.

Tabla I.I: Relación de los factores que interaccionan con AhR o con el heterodímero AhR/ARNT y su efecto sobre la actividad transcripcional de AhR.

Proteína	Acción
<u><i>Componentes del complejo AhR citosólico o nuclear</i></u>	
Hsp90	Mantiene AhR en conformación de unión a ligando e impide la dimerización con ARNT (Perdew 1988; Wilhelmsson <i>et al.</i> 1990)
AIP/ARA9/XAP2	Estabiliza AhR y favorece su localización citoplasmática (Meyer <i>et al.</i> 1998; Pollenz and Buggy 2006)

p23	Media la liberación de Hsp90 de AhR (Kazlauskas <i>et al.</i> 1999)
ARNT	Dimeriza con AhR para formar el complejo AhR/ARNT (Rowlands and Gustafsson 1997)

Factores involucrados en la represión de la señal de AhR

AHRR	Regula negativamente la función de AhR al dimerizar con ARNT y unirse al XRE (Mimura <i>et al.</i> 1999)
AIN1	Se une a ARNT y disminuye su localización nuclear (Sadek <i>et al.</i> 2000)
ADPF	Factor involucrado en la degradación proteosomal de AhR (Ma <i>et al.</i> 2000; Ma and Baldwin 2002)

Co-activadores, co-represores, factores remodeladores de la cromatina y factores de transcripción

SRC-1, NCoA-2, p300/CBP, p/CIP, TRIP230, CoCoA, GAC63	Coactivadores con actividad HAT que interaccionan con AhR y/o ARNT y facilitan la activación transcripcional (Beischlag <i>et al.</i> 2002; Kim and Stallcup 2004; Chen <i>et al.</i> 2006)
RIP140	Se une a AhR y aumenta la transcripción de genes con XRE (Kumar <i>et al.</i> 1999)
SMRT, SHP	Inhibe la actividad transcripcional del complejo AhR/ARNT (Nguyen <i>et al.</i> 1999)
Brg-1	Factor que modifica histonas dependiendo de actividad ATPasa y aumenta la transcripción mediada por el complejo AhR/ARNT (Wang and Hankinson 2002)
Med220, CDK8	Subunidades del complejo mediador involucrado en la activación transcripcional por AhR/ARNT (Wang <i>et al.</i> 2004)
BRCA1	Ejerce de coactivador por unión a ARNT (Kang <i>et al.</i> 2006)
PolIII, TBP, TFIIB, TFIIF	Componentes de la maquinaria general de transcripción que están directamente involucrados en la activación de genes diana de AhR.

Fosforilación

PKC	Aumenta la activación transcripcional de AhR/ARNT. El
-----	---

mecanismo es desconocido. (Minsavage *et al.* 2004)

c-Src	Tirosina quinasa asociada a AhR y que es activada por ligandos exógenos del receptor (Enan and Matsumura 1996)
AMPC	Produce la acumulación de AhR en el núcleo sin que éste interaccione con ARNT (Oesch-Bartlomowicz <i>et al.</i> 2005)

Interacción con otros factores de transcripción y de señalización

NF-1	Factor de transcripción involucrado en la inducción del <i>Cyp1a1</i> por AhR mediante su interacción con la caja CAAT (Ko <i>et al.</i> 1997)
Sp1	Aumenta la regulación de genes controlados por AhR/ARNT (Kobayashi <i>et al.</i> 1996)
ER α	Interacciona funcionalmente AhR y ARNT. Su papel aún es controvertido, se ha descrito como co-activador y como represor en diferentes modelos biológicos (Beischlag and Perdew 2005; Matthews <i>et al.</i> 2005; Wihlen <i>et al.</i> 2009)
NF- $\kappa\beta$	Interacción entre AhR y la subunidad p65 de NF- $\kappa\beta$. La activación de NF- $\kappa\beta$ suprime la expresión de <i>Cyp1a1</i> (Tian <i>et al.</i> 1999)
Rb	Interacción directa entre Rb y AhR necesaria para la máxima inducción de <i>Cyp1a1</i> , sugiriendo un papel de coactivador para Rb (Barnes-Ellerbe <i>et al.</i> 2004; Marlowe <i>et al.</i> 2004; Huang and Elferink 2005)
HIF-1 α	La hipoxia inhibe la actividad transcripcional de AhR por competición con ARNT (Park 1999)
Mybbp1a	Se asocia con AhR y favorece la transactivación (Jones <i>et al.</i> 2002)
Nedd8	Interacciona con AhR aumentando su acumulación nuclear y su actividad transcripcional (Antenos <i>et al.</i> 2002)

o Activación de AhR en ausencia de xenobióticos.

El modelo clásico contempla que el receptor de dioxina permanece citosólico e inactivo mientras no se produzca una unión a ligando exógeno que desencadene su papel como factor de transcripción. Sin embargo, algunos estudios han mostrado indirectamente que en ausencia de ligando, si bien la mayor parte de AhR se localiza en el citoplasma celular, una fracción apreciable de receptor es activamente transportada desde el citosol hasta el

núcleo en un flujo constante (Ikuta *et al.* 2000; Richter *et al.* 2001). Concretamente, en células HeLa se ha observado que el 15-20 % del total de AhR se encuentra localizado en el núcleo en ausencia de xenobióticos, y que

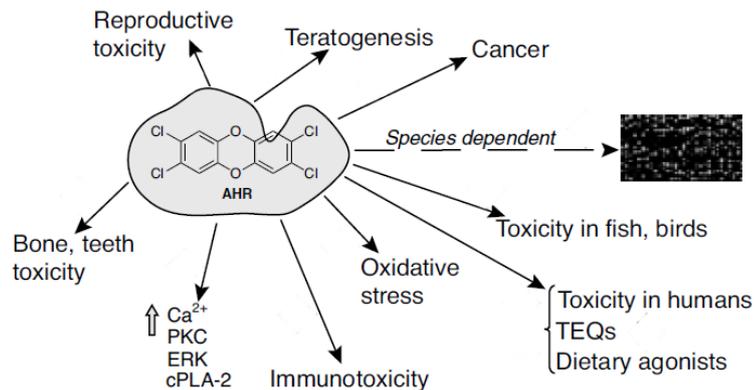


Figura 1.4. Efectos de la toxicidad de TCCD mediados por AhR. (Pohjanvirta 2012)

este AhR nuclear dimeriza con ARNT y es transcripcionalmente activo (Singh *et al.* 1996). A su vez, se ha puesto de manifiesto que en la línea de queratinocitos humanos inmortalizados HaCaT la localización de AhR depende de la densidad celular, siendo mayoritariamente nuclear a baja densidad y citoplasmática a confluencia (Ikuta *et al.* 2004). Así, parece existir un intercambio mantenido de AhR entre el citoplasma y el núcleo que es independiente de la presencia de xenobiótico en la célula, el cual afectaría al equilibrio desplazándolo hacia la acumulación nuclear.

Otros mecanismos de activación han sido descritos, y así:

- La expresión del co-activador RIP140 aumenta la actividad de promotores regulados por AhR, tanto en presencia como en ausencia de ligando (Kumar *et al.* 1999).
- La suspensión de queratinocitos (Sadek and Allen-Hoffmann 1994), células de hepatoma de ratón (Sadek and Allen-Hoffmann 1994) y fibroblastos C3H10T1/2 (Cho *et al.* 2004) vuelve a AhR activo transcripcionalmente.
- El estado de fosforilación de AhR influye en su distribución celular entre núcleo y citoplasma (Ikuta *et al.* 2004), y se ha encontrado que la proteína quinasa C (PKC) potencia la activación transcripcional de P450s inducida por TCDD (Carrier *et al.*, Mol Cell Biol, 1992; Berghard *et al.*, Mol Cell Biol,

1993; Chen y Tukey J Biol Chem. 1996)

- XAP2 previene la translocación de AhR al núcleo (Pollenz and Buggy 2006) por reclutamiento de la fosfodiesterasa 2A (PDE2A) y la reducción de los niveles locales de cAMP (de Oliveira *et al.* 2007), los cuales no sólo alteran el nivel de expresión de genes diana sino que también incrementan notablemente la localización nuclear del receptor (Oesch-Bartlomowicz *et al.* 2005; Oesch-Bartlomowicz and Oesch 2005).
- La actividad transcripcional de AhR es regulada por la inhibición del proteosoma en fibroblastos embrionarios (MEF) y en células de hepatoma de ratón Hepa-1 (Santiago-Josefat *et al.* 2001; Song *et al.* 2002) por un mecanismo que implica la activación de PKC dependiente del regulador transcripcional ubicuo Sp1 (Santiago-Josefat and Fernandez-Salguero 2003).

Por otra parte, quizás el mecanismo de inactivación del receptor mejor definido sea el que tiene como efector a AhRR (*AhR Repressor*). Esta proteína comparte estructura bHLH con AhR, al cual sustituye en la generación de heterodímeros con ARNT, generando complejos AhRR/ARNT transcripcionalmente inactivos. Su expresión es regulada positivamente por AhR tanto en presencia de TCDD (Mimura, Ema *et al.* 1999) como basalmente (Bernshausen, Jux *et al.* 2006), lo que constituye un mecanismo de retroalimentación negativa que regula la actividad del receptor de dioxina.

Así pues, actualmente se acepta que el receptor está sujeto a una fuerte regulación de su localización y actividad en un entorno fisiológico carente de ligandos exógenos.

En relación con ARNT, estudios inmunohistoquímicos han mostrado que esta proteína reside mayoritariamente en el núcleo y que la exposición de las células a TCDD no modifica su distribución celular ni su nivel de expresión (Pollenz 1996). Además, al contrario de lo que se pensó inicialmente, y por lo que se le dio nombre, ARNT no interviene en el proceso de translocación nuclear de AhR (Pollenz *et al.* 1994).

o **Implicación de AhR en la fisiología celular.**

La búsqueda de un papel homeostático del receptor de dioxina nace tras la constatación de que AhR surgió en la escala evolutiva mucho antes de la presencia de compuestos policíclicos aromáticos en el medio ambiente. Su expresión constitutiva en la mayoría de los tipos celulares, así como su grado de conservación proteica entre diversos grupos de vertebrados (Hahn *et al.* 1997), apoyan la existencia de un papel relevante para este receptor en la fisiología celular.

Sin embargo, el desconocimiento de parte de la biología de esta proteína lleva a considerar a AhR como un receptor “huérfano”, carente de un ligando endógeno y de función fisiológica definida. A este respecto, y adicionalmente a la activación mediada por la inhibición del proteosoma (Santiago-Josefat *et al.* 2001; Santiago-Josefat and Fernandez-Salguero 2003), varias evidencias experimentales sugieren que AhR podría activarse por un mecanismo que implicaría su interacción con moléculas endógenas (Ma and Whitlock 1996; Weiss *et al.* 1996; Chang and Puga 1998). En este sentido, diversos laboratorios han propuesto al triptófano y a otros compuestos con grupos indol (Chen *et al.* 1995; Wei *et al.* 1998), a metabolitos del ácido araquidónico como la lipoxina A₄ (Ciolino *et al.* 1998; Schaldach *et al.* 1999), ala bilirrubina (Sinal and Bend 1997), al 7-ceto-colesterol (Savouret *et al.* 2001), a algunos flavonoides (Cunningham *et al.* 1996) y a ciertas moléculas presentes en la orina (Adachi *et al.* 2001) como posibles ligandos del receptor, ya que interaccionan con él induciendo la transcripción del gen diana *Cyp1A1*. Sin embargo, sus bajos niveles, la poca potencia inductora y la distribución restringida de estos compuestos los hacen candidatos poco probables a ser reguladores endógenos de AhR en la mayoría de los tejidos.

Dentro de este contexto, se ha propuesto que AhR pudiera haber evolucionado como parte de un sistema inducible encargado de metabolizar sustancias lipofílicas presentes en la dieta, y que las dioxinas podrían estar de hecho mimetizando la unión de esas moléculas al receptor. TCDD también induce cambios en proliferación y diferenciación en gran variedad de tipos celulares (Knutson and Poland 1980; Blankenship *et al.* 1993) por lo que, alternativamente, se cree que quizá esta molécula sustituya o imite la unión de un ligando endógeno involucrado en la regulación de dichos procesos celulares, exacerbando o impidiendo la acción fisiológica del receptor.

El papel endógeno de AhR se encuentra apoyado por numerosas observaciones experimentales, entre las que cabe destacar:

- Las alteraciones patológicas que sufren los ratones AhR *knock-out* en el sistema vascular, hepático, reproductivo e inmune, entre otros (Fernandez-Salguero *et al.* 1995; Schmidt *et al.* 1996; Fernandez-Salguero *et al.* 1997; Gonzalez and Fernandez-Salguero 1998; Zaher *et al.* 1998; Abbott *et al.* 1999; Benedict *et al.* 2000; Lahvis *et al.* 2000; Thackaberry *et al.* 2002; Lund *et al.* 2003).
- La existencia de secuencias consenso DREs conservadas localizadas en regiones promotoras de genes que regulan procesos celulares clave (Safe *et al.* 1998; Klinge *et al.* 1999).
- Las alteraciones en la señalización mediada por TGF β y ácido retinoico observadas *in vitro* en cultivos de fibroblastos embrionarios y hepatocitos primarios e *in vivo* en hígado (Andreola *et al.* 1997; Elizondo *et al.* 2000; Andreola *et al.* 2004; Corchero *et al.* 2004; Santiago-Josefat *et al.* 2004; Gomez-Duran *et al.* 2006).
- La interacción directa o indirecta de AhR con el control del ciclo celular y con otras rutas moleculares de señalización (Weiss *et al.* 1996; Phelan *et al.* 1998; Nebert *et al.* 2000; Elferink *et al.* 2001; Puga *et al.* 2002).
- El control de la forma celular, la adhesión y la migración en fibroblastos murinos (Carvajal-Gonzalez *et al.* 2009), en queratinocitos sometidos a transición epitelio-mesénquima (EMT) por TGF β (Rico-Leo *et al.* 2013) y en migración epitelial en cierre de heridas (Carvajal-Gonzalez *et al.* 2009).
- La estimulación de la respuesta angiogénica favoreciendo la expresión de VEGF endotelial y la inhibición de la expresión de TGF β estromal (Roman *et al.* 2009).
- La regulación de la expresión génica en procesos de EMT a través del control de la nueva familia de retrotransposones B1 conjuntamente con proteínas de la familia Snail (Roman *et al.* 2008).

Este conjunto de observaciones ponen de manifiesto la existencia de un importante papel fisiológico del receptor.

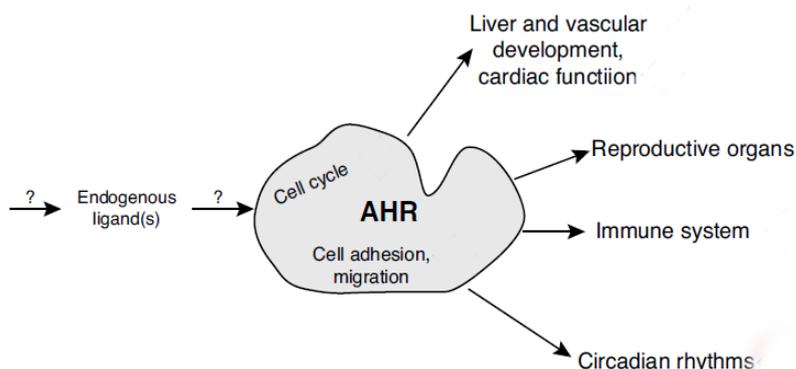


Figura I.4. Funciones de AhR independientes a xenobióticos. (Pohjanvirta 2012)

Entre los hallazgos descritos, uno de los fenotipos mejor caracterizados, y que más apoyo proporciona al papel de AhR en la homeostasis celular, es la aparición de una marcada patología hepática tras la inactivación génica del receptor. Este fenotipo consiste en una acumulación de colágeno en la matriz extracelular hepática que degenera en fibrosis y que está ligada a la sobreexpresión de Ltbp-1 (Latent TGF β -binding protein), la cual da lugar a una sobre-activación constitutiva del factor de crecimiento pro-fibrogénico TGF β (Corchero *et al.* 2004). La consecuencia patológica es que el hígado de los ratones *AhR*^{-/-} es de aproximadamente la mitad de tamaño que el de los ratones silvestres y muestra fibrosis en las regiones portales (Fernandez-Salguero *et al.* 1995; Lahvis *et al.* 2000; Corchero *et al.* 2004). Además, este fenotipo hepático aparece conjuntamente con una mayor proliferación de vasos sanguíneos en la zona portal y en algunas áreas del parénquima (Fernandez-Salguero *et al.* 1997) y con el bloqueo del sistema portal-sistémico (Lahvis *et al.* 2005; Harstad *et al.* 2006).

En cuanto a las rutas de señalización con las que AhR podría interactuar para regular alguna de estas funciones endógenas, se consideran como candidatas potenciales las dependientes del receptor de estrógenos alfa (ER α), proteína retinoblastoma (pRb) (Elferink *et al.* 2001), la quinasa c-Src, el factor de hipoxia HIF-1 α (Nie *et al.* 2001) y el complejo transcripcional implicado en supervivencia e inflamación NF κ B (Tian *et al.* 2002).

Entre las rutas destacadas, quizá la relación funcional entre las rutas de AhR y ER α es, posiblemente, una de las mejor caracterizadas. Así, existen evidencias, tanto *in vitro* como *in vivo*, de que AhR se une a secuencias XRE inhibitoras localizadas en genes regulados transcripcionalmente por el receptor de estrógenos (Safe *et al.* 1998; Safe *et al.* 2000; Pearce *et al.* 2004). Otros autores apuntan a que la inhibición de estos genes puede ser consecuencia de la interacción directa entre AhR y ER α , lo que provocaría la inhibición del receptor de estrógenos (Klinge *et al.* 1999; Klinge *et al.* 2000; Wormke *et al.* 2000).

En cuanto a la relación entre AhR y el ciclo celular, el papel de este receptor es complejo y sólo parcialmente esclarecido ya que AhR induce o reprime proliferación celular dependiendo del fenotipo de la célula diana.

Así, varios estudios apoyan la función de AhR como una proteína oncogénica:

- Células de hepatoma deficientes en la expresión de AhR (AhR-D) tienen un tiempo de replicación alargado por el bloqueo de la transición G₁/S (Ma and Whitlock 1996).
- Fibroblastos embrionarios de ratón (MEF; *Mouse Embryonic Fibroblasts*) aislados de ratones *AhR*^{-/-} tienen un mayor tiempo de duplicación (Elizondo *et al.* 2000), entran antes en fase de senescencia (Alexander *et al.* 1998) y tienen niveles más elevados de la citoquina TGFβ (Alexander *et al.* 1998; Santiago-Josefat *et al.* 2004; Gomez-Duran *et al.* 2006).
- AhR se encuentra sobre-activado en células T de leucemia adulta humana (Hayashibara *et al.* 2003).
- La activación constitutiva de AhR incrementa la frecuencia de hepatocarcinogénesis en ratones transgénicos B6C3F1 (Moennikes *et al.* 2004).

Por el contrario, otros estudios sugieren un papel de AhR como supresor tumoral:

- Células 5L de hepatoma de rata sufren arresto celular en la transición G₁/S tras la activación de AhR por xenobióticos (Ge and Elferink 1998; Kolluri *et al.* 1999; Puga *et al.* 2002). La expresión constitutiva de AhR induce apoptosis en células T Jurkat por bloqueo del ciclo celular en G₁ (Ito *et al.* 2004).
- Ligandos de AhR disminuyen proliferación de células de páncreas y de próstata (Koliopanos *et al.* 2002) (Jana *et al.* 1999).
- La expresión de AhR se encuentra reprimida epigenéticamente por hipermetilación de su promotor en células de leucemia linfoblástica aguda y de leucemia mieloide crónica (Mulero-Navarro *et al.* 2006).
- La expresión de AhR en células de melanoma suprime el crecimiento tumoral y los niveles de AhR se encuentran significativamente reducidos en melanomas humanos con respecto a nevi (Contador-Troca *et al.* 2013).

La dualidad de acción de AhR en el control de la proliferación en función del fenotipo celular se pone de manifiesto expresamente en el trabajo de Abdelrahim y colaboradores donde se muestra que la inhibición de la expresión de AhR por RNA interferente (siRNA) produce tanto un aumento de la proliferación de células de hepatoma humano HepG2 como una disminución del crecimiento de células tumorales de glándula mamaria humana MCF-7 (Abdelrahim *et al.* 2003).

Por último, y en cuanto a la posibilidad de una regulación postraduccional de la actividad de AhR, algunos autores han sugerido que para que AhR alcance su máximo nivel de actividad transcripcional deber encontrarse fosforilado en residuos de tirosina (Gradin *et al.* 1994). Sin embargo, otros estudios parecen atribuir al proceso de fosforilación un papel secundario como potenciador de la actividad transcripcional de AhR en presencia de ligando exógeno (Park *et al.* 2000). Otra de las modificaciones, recientemente descrita, es la SUMOilación de dos residuos de lisina (K3 y K510) situados en los dominios bHLH y de transactivación, respectivamente (Xing *et al.* 2012). La adición de grupos SUMO en estos puntos estabilizaría el receptor, impidiendo tanto su transactivación como su ubiquitinación y eliminación. TCDD actuaría antagonizando este efecto, provocando la eliminación de estos residuos y favoreciendo la activación del receptor. Cabe mencionar que la investigación sobre posibles modificaciones postraduccionales está aún en sus primeras fases y que la secuencia de AhR presenta motivos conservados susceptibles de farnesilación y palmitoilación, entre otros, lo que lleva a esperar nuevos hallazgos en el campo en los próximos años.

o **Fibroblastos, adhesión y migración celular e implicación del receptor de dioxina.**

Los fibroblastos son células fusiformes localizadas en los tejidos mesenquimales y son las principalmente implicadas en la síntesis y deposición de proteínas de matriz extracelular (colágeno, fibronectina, laminina y otras), en el control de la diferenciación epitelial, en la interacción tumor-estroma y en la regulación de la inflamación (Tomasek *et al.* 2002; Parsonage *et al.* 2005). Estas funciones los hacen cruciales en situaciones fisiológicas como el cierre de heridas o el remodelamiento del miocardio (Morley *et al.* 2007; Porter and Turner 2009) y en condiciones patológicas como la progresión de enfermedades fibróticas o la metastatización tumoral. En este último campo, se ha demostrado la importancia de los fibroblastos a lo largo de las diferentes fases tumorales. Así, en las primeras fases, conforman el llamado “estroma reactivo tumoral” (Ronnov-Jessen *et al.* 1996; Hanahan and Weinberg 2000), que favorece la vascularización del tumor vía VEGF (*vascular endothelial growth factor*), entre otros factores de crecimiento. Durante el desarrollo tumoral, los denominados CAFs (*Carcinoma Associated Fibroblasts*) participan en el proceso de diseminación focal mediante la liberación de factores de crecimiento como TGF β , así como en la regulación de la expresión de diferentes MMPs (*matrix metalloproteinases*) que dirigen el remodelado de la matriz extracelular (Kalluri and Zeisberg 2006). Ya en las fases de transformación metastática, los CAFs colaboran tanto en el cambio fenotípico de la EMT

que sufren las células tumorales por la secreción de TGF β , como en la estimulación de la invasividad por la secreción de metaloproteasas (Miyazono *et al.* 2012). En este contexto, el presente trabajo busca comprender la implicación de AhR en dos de los procesos determinantes en la funcionalidad de los fibroblastos: su capacidad adhesiva y su potencial migratorio.

o **Adhesión celular.**

La adhesión celular constituye uno de los principales medios de interacción de la célula con el entorno, y sus dinámicas son las principales responsables de la forma, la plasticidad y la capacidad de migración celular. Así, ya en procariotas se conocen complejas interacciones célula-sustrato y célula-célula (Burchard 1981). Es en organismos eucarióticos complejos donde la adhesión juega un papel principal en la arquitectura celular, sirviendo como ejemplos las fuertes uniones célula-célula, vitales en la migración en bloque del endodermo durante el proceso de gastrulación, así como las interacciones célula-matriz durante la generación de la cresta neural por migración de células individuales (Aman and Piotrowski 2010).

El control y el cambio en las dinámicas de adhesión celular juegan un importante papel en procesos tanto fisiológicos como patológicos. En el primer caso, los fibroblastos pueden pasar de establecer fuertes adhesiones a la matriz a desarrollar un fenotipo migratorio orientado en respuesta a un daño tisular o a quimioatrayentes (Shaw and Martin 2009); las células epiteliales, por su parte, pueden sufrir un proceso de EMT por el que pierden las uniones intercelulares y cambian su morfología durante la formación de la cresta neural o en respuesta a heridas en la piel (Ridley *et al.* 2003). Un proceso similar al de EMT es el que se produce durante el desarrollo tumoral, en el cual las células transformadas eliminan sus adhesiones intercelulares y adoptan una mayor capacidad de migración e invasión de los tejidos adyacentes, lo que permite su acceso al sistema circulatorio y posterior diseminación en nuevos tejidos, provocando finalmente la aparición de metástasis (Playford and Schaller 2004; Zavadil and Bottinger 2005).

• **Dinámicas de adhesión.**

El proceso de adhesión celular sobre el sustrato comienza con la generación de “adhesiones nacientes” en el frente de avance de la célula en las estructuras denominadas lamelipodios (Cramer *et al.* 1997; Zaidel-Bar *et al.* 2003). Estas adhesiones son pequeñas y transientes, formándose y disociándose a gran velocidad

(en torno a 60 segundos de vida media) e iniciando la interacción física célula-sustrato (Vicente-Manzanares and Horwitz 2011). Aquellas que se mantengan y se unan al citoesqueleto de actina, quedarán poco a poco situadas en la parte trasera del lamelipodio, debido al avance celular (Alexandrova *et al.* 2008). Allí crecerán y se convertirán, pasando por una etapa intermedia de complejo focal, en adhesiones focales.

Las adhesiones focales constituyen una unión estable al sustrato sobre la cual la célula genera el impulso contráctil necesario para el movimiento (Rottner *et al.* 1999). Estas estructuras van a verse desplazadas desde zonas cercanas al frente celular hasta zonas centrales de la célula como resultado del avance del cuerpo celular (Ballestrem *et al.* 2006). Es en esta última zona donde algunas de las adhesiones van a completar su proceso de maduración, convirtiéndose en adhesiones fibrilares, más grandes y de estructura más compleja, las cuales poseen una alta estabilidad (varias horas de vida media) y participan activamente en la reorganización de la matriz extracelular adyacente (Geiger and Yamada 2011).

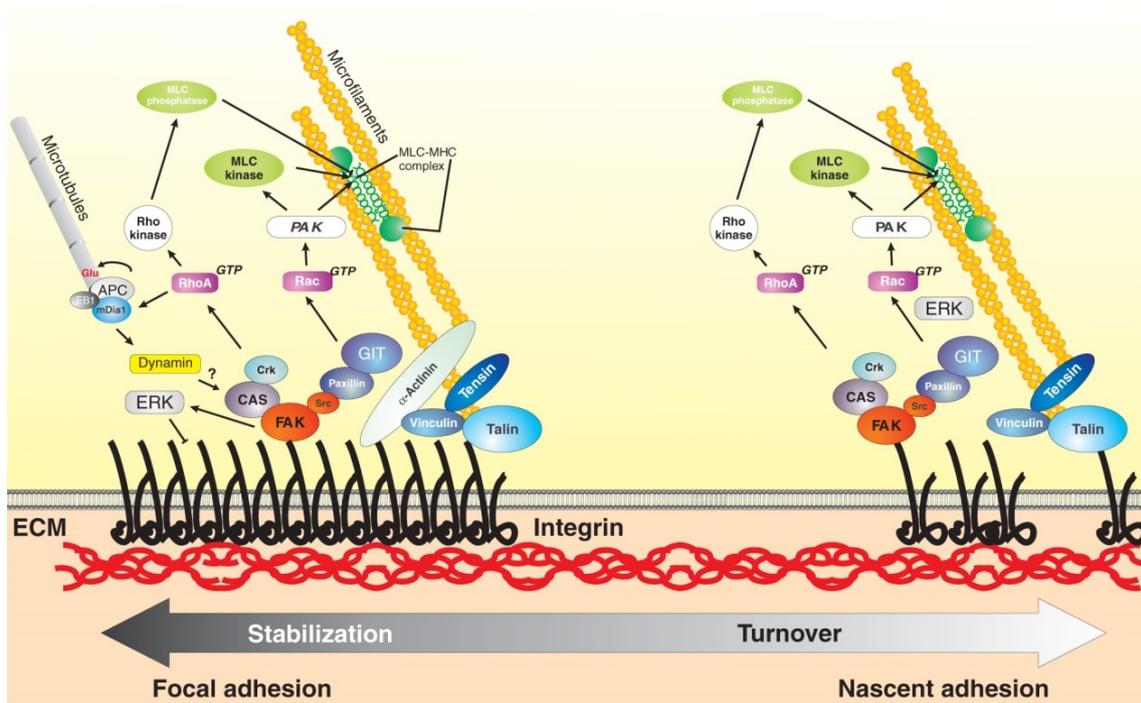


Figura 1.5. Dinámicas de adhesión. En el esquema se muestra un resumen de las rutas de señalización implicadas en la regulación de las adhesiones célula-matriz. (Vicente-Manzanares *et al.* 2005)

Por último, ya en la parte trasera de la célula, las adhesiones se desorganizarán, liberando la célula del sustrato y permitiendo la contracción del cuerpo celular (Vicente-Manzanares and Horwitz 2011).

o **Migración.**

Producto de la coordinación entre adhesión, extensión y contracción celulares, la migración es una de las funciones celulares más estudiadas en fibroblastos, incluyendo las rutas moleculares implicadas dada su importancia fisiológica y patológica (Vicente-Manzanares *et al.* 2005).

Mientras que la función principal de la migración en organismos sencillos es facilitar la reproducción y la búsqueda de alimentos (Manahan *et al.* 2004), en organismos complejos, cuyos diferentes tipos celulares están sometidos a procesos de especialización, la migración celular adquiere otras funciones, volviéndose esencial en la organización estructural de tejidos y órganos y en el mantenimiento de la homeostasis fisiológica (Ridley *et al.* 2003).

Se han descrito diferentes tipos de migración en función del tipo celular y de la composición del entorno. Así, las células epiteliales pueden migrar de forma individual

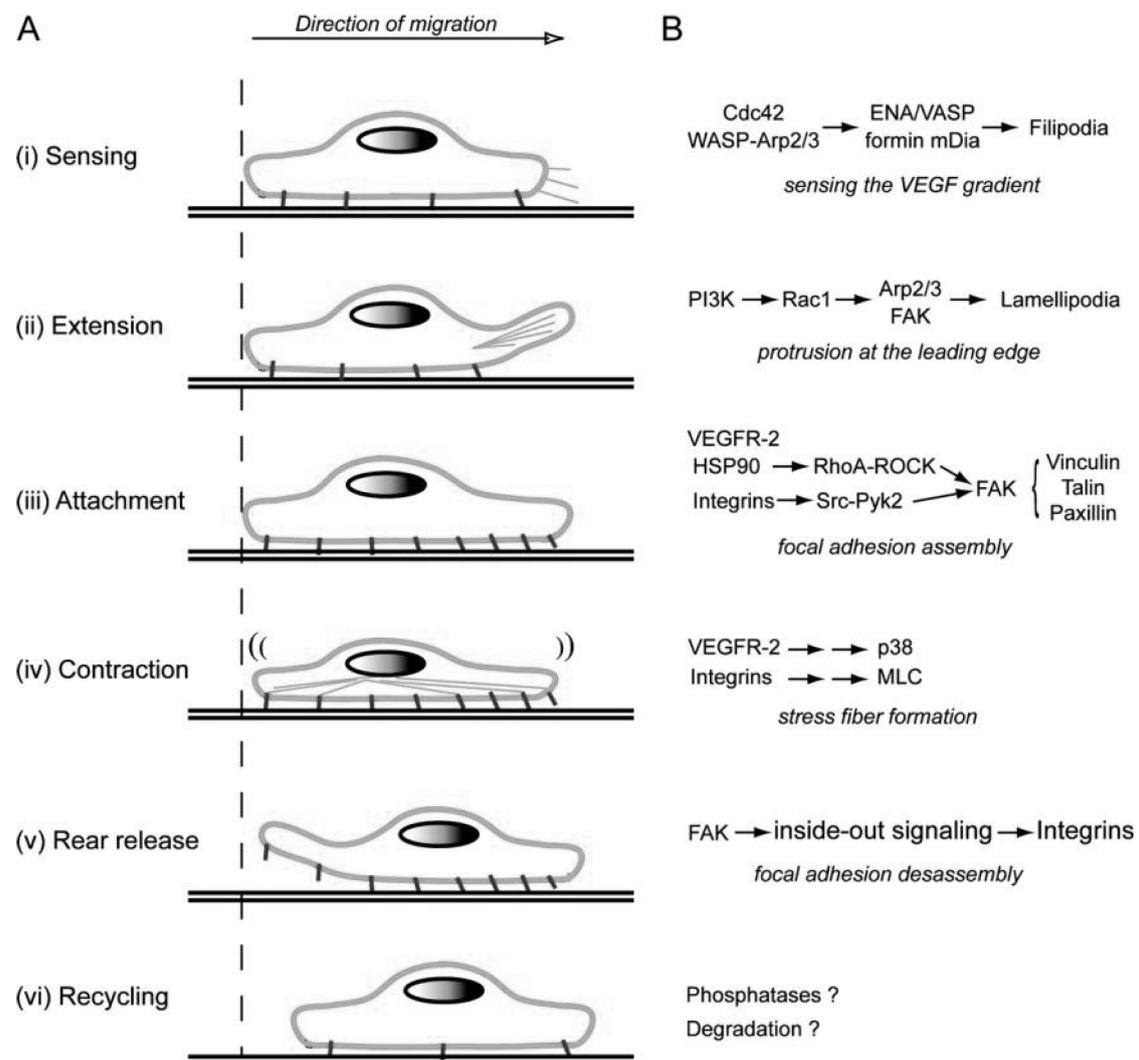


Figura I.5. Migración celular y rutas implicadas. En el apartado **A** se esquematizan las diferentes fases llevadas a cabo por la célula en el proceso de migración, mientras que en **B** se destaca la señalización celular asociada a cada etapa (Lamallice *et al.* 2007).

por deslizamiento (Ulrich and Heisenberg 2009), o de forma cooperativa en la que la monocapa migra sin perder los contactos célula-célula (Friedl and Gilmour 2009). La migración puede también subdividirse en proteolítica, donde la matriz extracelular es remodelada para permitir el avance celular, o ameboide, donde la célula consigue avanzar sin afectar la matriz gracias a deformaciones de su cuerpo celular. Por último, nuevos estudios basados en cultivos celulares 3-D comienzan a desentrañar el funcionamiento de la migración en entornos más fisiológicos, y aunque en la actualidad aún existe poca información a nivel molecular, parecen existir diferencias significativas en su regulación con respecto a la migración bidimensional 2-D (Gunzer *et al.* 2000; Gunzer *et al.* 2000; Knight *et al.* 2000; Beningo *et al.* 2004).

El presente trabajo se centra en la migración celular de tipo fibroblástico en cultivos 2-D, la cual es un proceso coordinado en el espacio y en el tiempo (Brakebusch and Fassler 2003). En dicho proceso deben llevarse a cabo de forma sincrónica una extensión de la zona de avance de la protusión o lamelipodio, el establecimiento de nuevas adhesiones focales en el frente de avance, la contracción de la célula y la disolución de viejas adhesiones focales en la parte posterior de la misma (DeMali and Burridge 2003; DeMali *et al.* 2003). En todo este proceso juegan un papel importante la polimerización y la contracción del citoesqueleto de actina, el establecimiento y la disolución de las adhesiones focales (FAs) y la movilización y reciclaje de la maquinaria de adhesión celular. Por todo ello, las proteínas de señalización celular que regulan dichos procesos son claves en el control final de la motilidad celular.

o Implicación del receptor de dioxina en adhesión y migración celular.

En los últimos años, el estudio del papel de AhR en adhesión y migración se ha intensificado, habiéndose comenzado a desvelar su importancia incluso en organismos sencillos como *C. elegans*, donde la eliminación del receptor provoca defectos en la diferenciación neuronal por fallos en la migración axonal (Qin and Powell-Coffman 2004). En vertebrados superiores, la activación de AhR por TCDD altera la plasticidad y la movilidad de células tumorales de mama humana MCF7, produciendo un incremento en la superficie celular, la aparición de lamelipodios y una mayor adherencia y movilidad, posiblemente asociadas a la activación de JNK quinasas (*c-Jun N-terminal kinases*) (Diry *et al.* 2006).

La importancia de AhR en la adhesión celular ha sido descrita en varios estudios que muestran que el levantamiento celular provoca una fuerte, aunque transiente, activación transcripcional del receptor en queratinocitos (Sadek and Allen-Hoffmann 1994), en células de hepatoma (Sadek and Allen-Hoffmann 1994) y en fibroblastos (Cho *et al.* 2004). Por otra parte, las uniones célula-célula parecen tener un papel importante en la adhesión mediada por AhR ya que se ha demostrado que la actividad transcripcional del mismo se inhibe gradualmente por el aumento de la confluencia celular (Ikuta *et al.* 2004) o por la agregación de células en suspensión (Cho *et al.* 2004).

Por otra parte, un proceso especialmente ilustrativo de la importancia de AhR en la migración celular en mamíferos, es el del cierre del paladar que tiene lugar durante el desarrollo embrionario y que es compartido por humanos y roedores. La sobreactivación de AhR por TCDD provoca la aparición de paladar hendido (*cleft-palate*) en ratones silvestres que expresan dicho receptor pero no así en sus homólogos carentes del receptor (Mimura *et al.* 1997).

Además, AhR también ha sido descrito como regulador de la matriz extracelular, mostrando los ratones *knock-out* para AhR defectos en la remodelación de la matriz extracelular del parénquima hepático (Fernandez-Salguero *et al.* 1995; Lahvis *et al.* 2000) y del sistema portal (Lahvis *et al.* 2000). Adicionalmente, AhR se ha propuesto como un regulador transcripcional de metaloproteasas de matriz tales como MMP-2. (Kohle *et al.* 2002).

Nuestro laboratorio también ha contribuido a determinar el papel de AhR en morfología, migración y adhesión celular, Así el receptor de dioxina muestra un fuerte papel fisiológico en el control de estos procesos, fomentándolos o inhibiéndolos de manera totalmente dependiente del fenotipo celular.

Los estudios se centraron principalmente en células mesenquimales, epiteliales y endoteliales:

Mesénquima:

- Los fibroblastos inmortalizados de glándula mamaria (T-FGM) de ratones *AhR*^{-/-} tienen disminuida su capacidad migratoria en cultivo 2-D con respecto a células T-FGM *AhR*^{+/+}, con un incremento en fibras de estrés y una menor capacidad para inducir la formación de lamelipodios (Mulero-Navarro *et al.* 2005).

- Las proteínas reguladoras de la migración celular como la quinasa de adhesión focal FAK, el regulador de supervivencia PKB/AKT (diana de PI3K) y la GTPasa pequeña Rac1 están inhibidas tanto en T-FGM *AhR*^{-/-} (Mulero-Navarro *et al.* 2005) como en fibroblastos embrionarios MEFs (Gomez-Duran *et al.* 2008).
- Los fibroblastos T-FGM deficientes en AhR muestran una morfología aberrante, con aumento y despolarización tanto de las adhesiones focales como de las fibras de estrés, lo que resulta en un exceso en su capacidad de adhesión y de *spreading*. Este fenotipo se debe, al menos en parte, a la desregulación del equilibrio entre las actividades Rac1 y RhoA, lo que a su vez resulta de la deficiente expresión del factor de intercambio GTP/GDP (GEF) específico para dichas GTPasas Vav3. Este proto-oncogén es diana transcripcional de AhR por unión directa a su promotor (Carvajal-Gonzalez *et al.* 2009).
- Las quinasas c-Src y FAK tienen niveles de fosforilación alterados en T-FGM-*AhR*^{-/-}. Tanto el nivel de fosforilación del residuo Y⁴¹⁷ de c-Src (responsable del estado activo del oncogén), como el de los residuos Y⁵⁷⁶ y Y⁵⁷⁷ de FAK (dianas de c-Src) son sensiblemente más bajos. Al mismo tiempo, la fosforilación del residuo Y⁵²⁷ de c-Src (responsable de la conformación inactiva de la quinasa) e Y⁹²⁵ en FAK se encuentran aumentadas (Rey-Barroso *et al.* 2013).

Epitelio:

- AhR ha demostrado tener un papel opuesto en queratinocitos con respecto al mesenquimal, dado que su ausencia provoca un cambio de morfología e incrementa la adhesión célula-célula y la capacidad de migración, fenómenos que provocan una respuesta más rápida en cierre de heridas *in vitro* e *in vivo*. En estos procesos juegan un papel importante las propiedades fibróticas y de secreción de TGFβ de los fibroblastos pertenecientes al estroma subyacente al epitelio (Carvajal-Gonzalez *et al.* 2009).
- El estudio de queratinocitos immortalizados y en cultivo primario mostró una relación directa entre la actividad de AhR y la presencia de marcadores

epiteliales como E-cadherina o β -catenina, y una relación inversa con la expresión de marcadores mesenquimales como Snail y Slug. Así, las células epiteliales carentes de AhR parecen encontrarse en un estado pre-EMT que fomenta su capacidad de migración y disminuye su adhesión (Rico-Leo *et al.* 2013).

Endotelio:

- Los problemas de vascularización observados en ratones *knock-out* para AhR son parcialmente debidos a la disminución de las capacidades de migración y angiogénesis de las células endoteliales. Así, en homeostasis, el papel del receptor es dual, fomentando la expresión y la señalización autocrina del VEGF-A sintetizado por la célula endotelial e inhibiendo la secreción paracrina de TGF β producido por los fibroblastos adyacentes (Roman *et al.* 2009).

En cuanto a los estudios con células transformadas, hemos descrito recientemente el papel de AhR como inhibidor de la capacidad tumorigénica y metastática de células de melanoma murinas. Además, hemos observado la existencia de una relación directa entre la desaparición de AhR y el incremento en la agresividad de las células tumorales de melanoma, las cuales perdieron las adhesiones célula-célula, aumentaron su velocidad de migración y se volvieron más invasivas, en un proceso en el que parecen participar la integrina β 1 y la caveolina 1. (Contador-Troca *et al.* 2013).

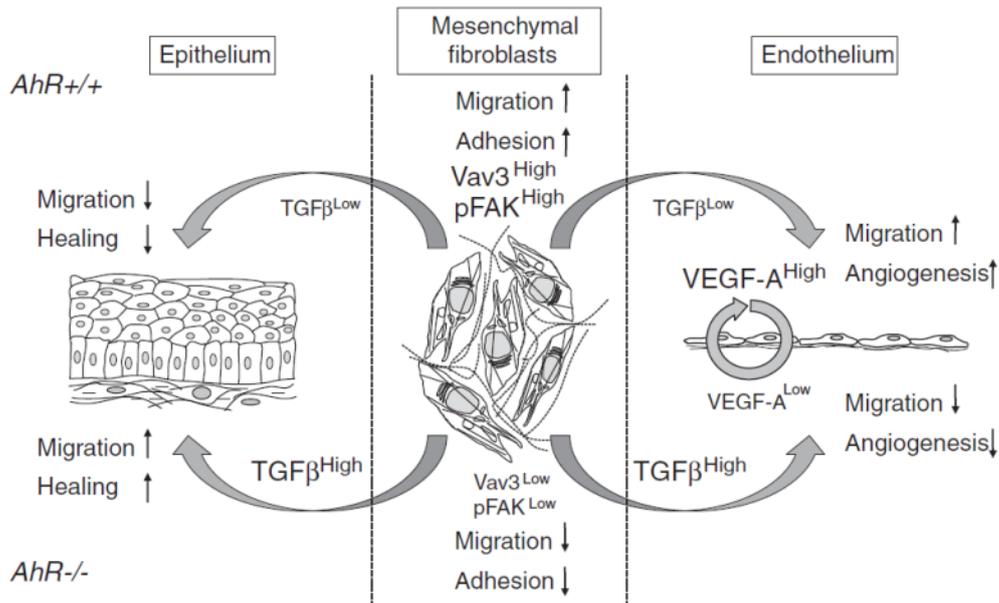


Figura I.6. Papel de AhR en migración en función del tipo celular. En el esquema se muestran las principales rutas relacionadas con la migración en las que participa el receptor de dioxina en epitelio, mesénquima y endotelio. Fernandez-Salguero *et al* en (Pohjanvirta 2012).

o Adhesión celular y rutas de señalización implicadas: integrinas.

o La matriz extracelular.

La generación y remodelación de la matriz extracelular constituye una de las principales funciones fisiológicas de los fibroblastos. Ésta no es sólo un soporte físico, sino un agente vital en morfogénesis tisular, homeostasis y diferenciación celular (Frantz *et al.* 2010). Estructuralmente, se compone principalmente de glucosaminoglucanos, proteoglucanos y glucoproteínas de adhesión como fibronectina, laminina, entactina o tenascina, y por fibras constituidas por diferentes tipo de colágeno, elastina o fibrilina (Labat-Robert *et al.* 1990). Se ha descrito en multitud de ocasiones la importancia tanto de la composición como de la complejidad de la matriz en transducción de señales y en migración celular. Así, la deficiencia en alguno de sus componentes puede provocar una extensa variedad de enfermedades (Jarvelainen *et al.* 2009).

Fibronectina es una de las proteínas implicadas en la organización de la matriz, así como en la adhesión y la funcionalidad celular. Así, las fibras de fibronectina pueden estirarse hasta varias veces su tamaño original producto de la fuerza de tracción celular. Es en este proceso donde la proteína expone sus sitios de unión para integrinas,

provocando cambios globales en la célula (Smith *et al.* 2007). La importancia de la fibronectina ha sido descrita tanto en desarrollo como en enfermedades cardiovasculares y en metástasis tumoral (Rozario and DeSimone 2010).

O Las Integrinas.

En las adhesiones célula-matriz, las integrinas representan el eje alrededor del cual se organiza la unión al sustrato y se desencadena la respuesta celular a la misma.

La familia de las integrinas comprende un grupo amplio de moléculas heterodiméricas constituidas por dos subunidades polipeptídicas transmembranales, denominadas cadenas α y β , enlazadas no covalentemente. Las diferentes subfamilias de integrinas se forman de acuerdo a la cadena β que poseen, la cual puede asociarse en una forma restringida con diferentes cadenas α . Hasta el momento, se han identificado 16 cadenas α y 8 cadenas β , las cuales dan lugar a al menos 25 heterodímeros diferentes (Hynes 2002).

Las cadenas α de las integrinas tienen un peso molecular de entre 120 y 180 kDa. En su extremo amino-terminal estas cadenas poseen 7 u 8 regiones homólogas (*dominios* tipo integrina), de las cuales 3 ó 4 pueden unir cationes divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}), siendo dicha unión clave en la función adherente de las integrinas (Oxvig and Springer 1998). A diferencia del dominio extramembranal, el dominio citoplásmico no está tan conservado y es responsable de la dimerización con la cadena β en la molécula final.

Las cadenas β son glicoproteínas transmembranales que poseen regiones muy conservadas en el dominio extracelular, los cuales parecen formar parte del sitio de interacción con el ligando. Es en el dominio $\beta 1$ de esta región donde se sitúa un sitio de unión a Ca^{2+} , cuya sustitución por Mn^{2+} provoca un cambio de conformación que da como resultado la adquisición de la forma activa de la integrina (Humphries *et al.* 2003). En esta subunidad cobra especial importancia el dominio citoplásmico (con un alto grado de conservación), y concretamente sus motivos NPX/Y, los cuales son sitios de unión para proteínas de señalización (Legate *et al.* 2009).

Así, actualmente se acepta que, a pesar de que el sitio de interacción con el ligando está formado por regiones de las dos cadenas polipeptídicas, la especificidad de la interacción con el ligando está determinada principalmente por la cadena α , mientras

que la cola citoplásmica de la subunidad β es la principal responsable de la conexión con el citoesqueleto y la transducción de señales (Barczyk *et al.* 2010).

Según el modelo generalmente aceptado, la unión entre la integrina y su sustrato provocará una tensión mecánica que se traducirá en un cambio conformacional de la proteína, el cual dará lugar al inicio de la cascada de señalización (Calderwood 2004).

Las integrinas tienen la capacidad de modificar de forma rápida y reversible su avidéz por su o sus ligandos. La fuerza de interacción de las integrinas con sus ligandos depende principalmente de dos factores: el estado conformacional del heterodímero α - β y su densidad y localización topográfica en la membrana celular (Calderwood, 2004; Takagi and Springer, 2002). Esta transición reversible permite que una célula pueda interactuar de forma dinámica con componentes de la matriz extracelular, lo cual es importante en los fenómenos de migración, diferenciando a las integrinas de otras familias de proteínas de adhesión como las de las cadherinas, menos plásticas en su acción.

Adicionalmente a su función como enlace mecánico a la matriz, las integrinas poseen un importante papel como proteínas de señalización celular, ejerciendo esta última de una manera dual. Actualmente se piensa que en las integrinas confluyen señalizaciones de fuera a dentro, así como de dentro a fuera de la célula. Por una parte, la unión al ligando inicia la cascada de señalización que provoca la adhesión celular y la reorganización del citoesqueleto. Por otra parte, existen múltiples proteínas capaces de promover o de impedir los cambios conformacionales que conducen a

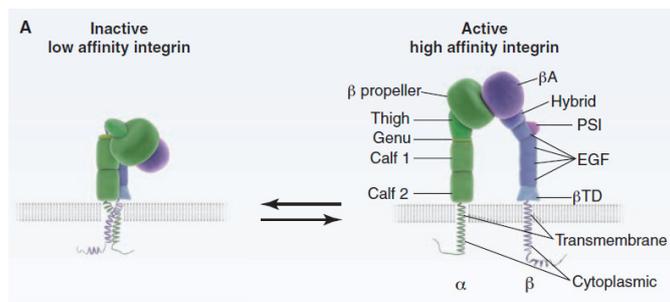


Figura 1.7. Equilibrio de activación-inactivación de las integrinas. (A) Dibujo esquemático de la conformación estructural de las integrinas en función de su estado de activación. **(B)** Detalle del dominio citoplásmico de ambas subunidades (Moser *et al.* 2009).

la activación de la integrina mediante su unión al dominio citoplásmico de la cadena β . Así, se ha descrito a las talinas (Calderwood 2004) y las kindlinas (Meves *et al.* 2009) como principales activadores y a la filamina A (Kim and McCulloch 2011) como el principal inhibidor. Por otro lado, quinasas participantes en la cascada de señalización

fuera-dentro, tales como FAK, ILK y Src (Barczyk *et al.* 2010), también parecen jugar un papel clave en el control de la activación de los heterodímeros de integrinas.

De interés es resaltar la interrelación entre integrinas y TGF β , el cuál no sólo es responsable de cambios en la expresión de diferentes integrinas, sino que también parece controlar la activación de la misma mediante una ruta dentro-fuera aún desconocida (Margadant and Sonnenberg 2010).

Existe una especificidad relativa entre el tipo celular, las integrinas que cada tipo expresa y la avidéz que muestran por los ligandos diana. Así, la integrina $\beta 1$ es expresada en la mayor parte de los tipos celulares y se considera el principal responsable de la unión a fibronectina. Esta subunidad puede formar heterodímeros con al menos 11 cadenas α distintas, expresadas de una manera dependiente del tipo celular. Cada uno de estos heterodímeros desarrollará una distinta capacidad de unión a los diferentes sustratos de la matriz extracelular sobre la que se asienta la célula (Harburger and Calderwood 2009).

Por todo ello, actualmente se considera que el equilibrio en el repertorio de integrinas expresadas, así como el estricto control de su capacidad de activación, permiten a la célula reconocer la composición, localización y densidad de la matriz extracelular circundante, guiando las respuestas celulares adecuadas durante procesos como, entre otros, la migración direccional.

o **Integrinas y transmisión de señales: La familia de quinasas Src.**

La interrelación entre la activación de integrinas y la transmisión de señales ha sido intensamente estudiada. De este modo, se ha demostrado no sólo que la unión de integrinas a fibronectina y la consecuente cascada de señalización vía Rho son imprescindibles para la fibrillogénesis, proceso clave para la generación de la matriz de fibronectina (Mao and Schwarzbauer 2005; Geiger and Yamada 2011), sino que además se ha identificado la integrina $\alpha 5 \beta 1$ como la responsable de la reorganización de las adhesiones focales en MEFs, generando la adquisición de la forma contráctil típica de los fibroblastos (Huveneers *et al.* 2008). Otras aproximaciones al tema han propuesto un mecanismo en células CHO (*Chinese Hamster Ovary*) por el cual c-Src es activado y estabilizado por autofosforilación en la Y⁴¹⁸ tras su interacción directa con el dominio citoplasmático de integrinas $\beta 3$ agrupadas (Arias-Salgado *et al.* 2003).

Como se ha descrito anteriormente, el control de la activación de integrinas es vital en los procesos de adhesión y migración celulares. Existen múltiples proteínas citoplásmicas implicadas en la estabilización o desestabilización de la unión entre ambas cadenas polipeptídicas α y β . Entre ellas destacan las quinasas de la familia de Src (SFK), las cuales podrían ser las responsables de la fosforilación del residuo de tirosina presente en el motivo NPX/Y de la cadena β (Tapley *et al.* 1989). Esta fosforilación provoca cambios estructurales, aumentando la afinidad de la cadena por proteínas inactivadoras o que compiten con talina como son DOK1 o ICAP-1 (Chiswell *et al.* 2008), impidiendo la activación de la integrina (Anthis *et al.* 2009).

La familia de quinasas Src, representadas en mamíferos principalmente por c-Src, Fyn, Lyn y Yes, son proteínas tirosin quinasa (sin función de receptor) implicadas en el control del ciclo celular, la organización del citoesqueleto y la adhesión y migración celulares (Huveneers and Danen 2009). Uno de los aspectos más interesantes de la funcionalidad de estas quinasas es que su actividad está fuertemente regulada por la fosforilación de dos de sus residuos tirosina (Ingley 2008). En el caso de c-Src de ratón la tirosina Y⁴¹⁶, que se localiza en el dominio quinasa, posee capacidad de autofosforilación que provocará la adquisición de una forma activa de la proteína (Superti-Furga *et al.* 1993). Adicionalmente, la tirosina Y⁵²⁷, localizada en el extremo C-terminal de la proteína, provocará tras ser fosforilada un cambio conformacional de la proteína que plegará su estructura impidiendo la autofosforilación de Y⁴¹⁶, y terminando con ello la activación de la quinasa (Ohsato *et al.* 1994).

Así, fisiológicamente, estas quinasas se encuentran en un equilibrio dinámico entre ambas conformaciones durante los procesos asociados a migración. Prueba de la importancia de la regulación de estas quinasas es el efecto que induce la expresión de formas transformadas de v-Src en el desarrollo del sarcoma de Rous (Brugge and Erikson 1977) o de formas hiperactivas, producto de la mutación en el residuo Y⁵²⁹, sobre la transformación celular (Frame 2002).

Una pieza clave en la regulación de la actividad de las quinasas de la familia SFK es la proteína Csk (*C-terminal Src Kinase*), la cual tiene como principal diana el residuo Y⁵²⁹ de c-Src (Nada *et al.* 1991; Nada *et al.* 1993). Csk guarda una alta similitud con c-Src, sin embargo, carece de señal de miristoilación, por lo que es incapaz de unirse a la membrana plasmática por sí misma. Tampoco posee residuos autofosforilables ni dominios de inhibición por fosforilación en su extremo C-terminal (Cloutier *et al.* 1995). No obstante, una muestra de la importancia de su función es la

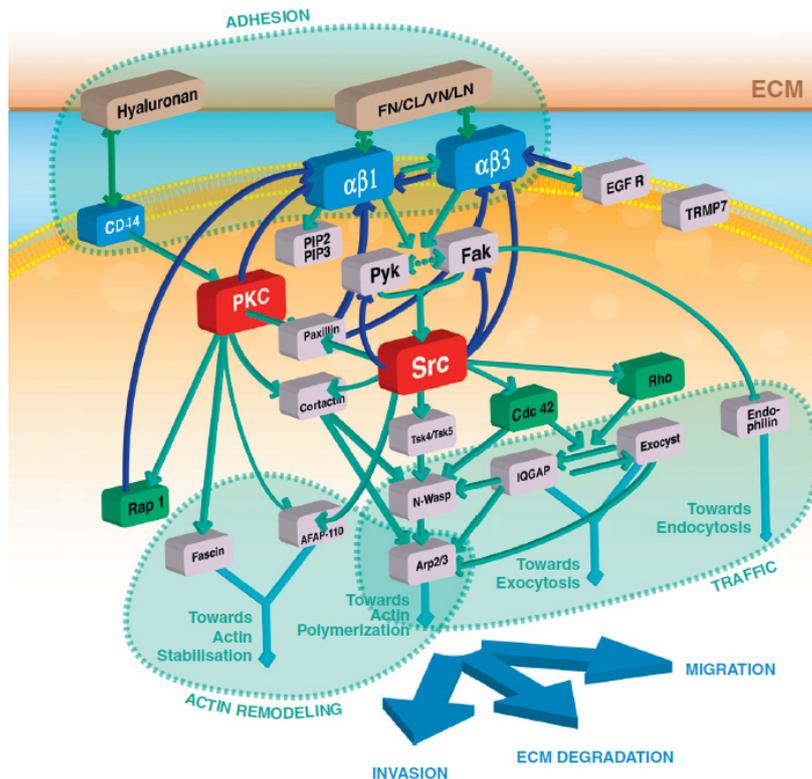


Figura I.8. Rutas de señalización asociadas a integrinas. Nótese el papel central de Src en las cascadas de señalización implicadas (Destaing *et al.* 2011).

letalidad embrionaria que presentan los ratones *knock-out* para el gen que la codifica, que desarrollan, entre otros fenotipos, defectos en la formación del tubo neural (Imamoto and Soriano 1993). A nivel celular, el silenciamiento de Csk provoca sobre-activación mantenida de las SFK (Nada *et al.* 1993).

Se ha descrito que Csk ejerce su función inhibitoria sobre las SFK en la membrana plasmática y, en concreto para c-Src, cuando esta se localiza en los dominios de membrana denominados balsas lipídicas o "*rafts*" (Otahal *et al.* 2011). De hecho, la localización insuficiente de Csk en la membrana podría ser responsable de los altos niveles de activación de c-Src detectados en células de cáncer de colon (Sirvent *et al.* 2010). La regulación de c-Src por Csk requiere la unión de Csk a complejos membranales tales como las adhesiones focales (Sabe *et al.* 1994), la proteína Cavelina1 (Cao *et al.* 2002) o el adaptador de membrana Cbp (*Csk binding*

protein) (Brdicka *et al.* 2000). Esta última proteína, conocida también como Pag1 (*Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains*), es considerada la principal responsable de la acción de Csk y se compone de un corto dominio extracelular, un dominio transmembrana y un largo dominio intracelular con residuos fosforilables y sitios de unión a otras proteínas. Cbp/Pag (en adelante Cbp) se localiza en lipid *rafts* tras supalmitoilación, aunque dicha ubicación no es exclusiva y también puede detectarse fuera de ellos (Brdicka *et al.* 2000; Kawabuchi *et al.* 2000).

Cbp ha sido objeto de un intenso estudio en los últimos años, describiéndose papeles independientes al de la regulación directa de Csk. Así, se ha descrito que inhibe c-Src mediante el secuestro de esta proteína en los dominios “*raft*”, impidiendo con ello el acceso a sus dianas de fosforilación (Oneyama *et al.* 2008). También se piensa que Cbp inhibe la activación de Ras monomérico al formar complejo con Fyn y un factor RasGAP (Smida *et al.* 2007).

En su relación con las SFK, se ha descrito que Cbp forma un bucle de retroalimentación negativo tanto con Fyn (Shima *et al.* 2003) como con Lyn (Ingley 2009), de manera que estas proteínas serían las responsables de la fosforilación de Cbp en algunos de sus residuos citoplásmicos, lo que provocaría su activación y el consiguiente reclutamiento de Csk al complejo de inactivación de c-Src .

o **Relación entre AhR y c-Src.**

Existen diferentes estudios que han descrito una relación funcional entre c-Src y AhR. La primera evidencia fue descrita por el grupo del Dr. Matsumura (Blankenship and Matsumura 1997), que describió la sobre-activación de c-Src en células MCF10A tras 15 minutos de tratamiento con TCDD, un tiempo demasiado corto para depender de la actividad transcripcional del receptor. Estudios posteriores han mostrado que dicho efecto parece desencadenarse inicialmente por la activación de cPLA2 (Fosfolipasa A2 citoplásmica), provocada por una liberación de Ca²⁺ al citoplasma inducido por la sobre-activación de AhR tras su interacción con TCDD (Dong and Matsumura 2008). La sobre-activación de c-Src provocaría a medio plazo la sobreexpresión de MMP2 y de CSF-1, factores relacionados con migración y con el reclutamiento de macrófagos, respectivamente (Matsumura 2011).

Por otro lado, AhR y c-Src podrían formar parte de un mismo complejo citosólico inactivo, el cual se disociaría ante la llegada de un ligando para el receptor,, provocando colateralmente la activación de c-Src. Estos resultados se basan en el uso de TCDD

como ligando exógeno, por lo que su relevancia en condiciones celulares basales está aún por determinar (Enan and Matsumura 1996) (Dong *et al.* 2011).

La interacción no genómica (extranuclear) entre el receptor de dioxina y c-Src ha demostrado tener un papel relevante en migración, ya que la adición de TCDD provoca la reorganización de las adhesiones focales y la agregación de integrinas en un proceso c-Src-dependiente que favorece la movilidad celular (Tomkiewicz *et al.* 2013).

Una de las funciones celulares donde la maquinaria de adhesión se interrelaciona tanto con la señalización celular como con el tráfico de proteínas es la generación de invadosomas. El término invadosoma incluye a los denominados invadopodios generados por células transformadas y a los podosomas, generados por células no transformadas (Linder 2009). Estas estructuras se definen como módulos de adhesión mecanosensores compuestos por un núcleo de F-actina rodeado de moléculas de adhesión con capacidad para movilizar grandes cantidades de metaloproteasas (como MT1-MMP), degradar la matriz circundante e infiltrarse en el entorno tisular (Destaing *et al.* 2011). Estas estructuras están reguladas a través de las integrinas, especialmente las que constan de subunidades $\beta 1$ (Destaing *et al.* 2010) o $\beta 3$, (Gimona *et al.* 2008) en un proceso que combina señalización dentro-fuera y fuera-dentro, siendo c-Src uno de los nodos centrales en dicha señalización (Cortesio *et al.* 2008; Oikawa *et al.* 2008). Se considera que la sobre-activación de estas estructuras puede ser la causante de la agresividad de muchas células transformadas metastáticas (Poincloux *et al.* 2009; Klemke 2012).

o **Caveolas y transducción de señales.**

Observadas por primera vez en los años '50, las caveolas fueron estudiadas intensamente tras la caracterización de la familia de proteínas de las caveolinas como las principales responsables de su formación (Fra *et al.* 1995; Razani *et al.* 2001). Las caveolas se definen como invaginaciones de la membrana plasmática de entre 60 y 80 nm con alto contenido en colesterol y esfingolípidos (Parton *et al.* 2006). A diferencia de las vesículas de clatrina, se engloban dentro del grupo de invaginaciones no revestidas, aunque existen múltiples proteínas que se asocian a estas estructuras. De entre ellas, las caveolinas están consideradas como las principales proteínas estructurales de estas invaginaciones, siendo imprescindibles para su formación (Drab *et al.* 2001; Razani *et al.* 2001) y cuyo silenciamiento en ratones provoca defectos pulmonares, musculares, vasculares, y lipídicos (Le Lay and Kurzchalia 2005). También son componentes

estructurales de las caveolas las recientemente descritas Cavinas, las cuales ejercen diferentes funciones relacionadas con su estabilización y endocitosis (Hill *et al.* 2008).

En mamíferos, la familia de las caveolinas (Cav) consta hasta el momento de tres miembros, dos de los cuales se expresan ubicuamente (caveolina 1 y caveolina 2), mientras que caveolina3 está presente exclusivamente en músculo esquelético y cardíaco (Williams and Lisanti 2005; Grande-Garcia and del Pozo 2008).

Caveolina 1 fue inicialmente descrita como una de las proteínas más fosforiladas por el oncogén v-Src (Glenney 1989), siendo posteriormente identificada como el marcador principal de caveolas (Rothberg *et al.* 1992). Estructuralmente, caveolina 1 guarda un alto grado de homología con el resto de proteínas de la familia, definiéndose como una proteína integral de membrana, con ambos extremos en la parte citoplásmica. Consta de dos dominios intramembranales, un dominio de oligomerización y el

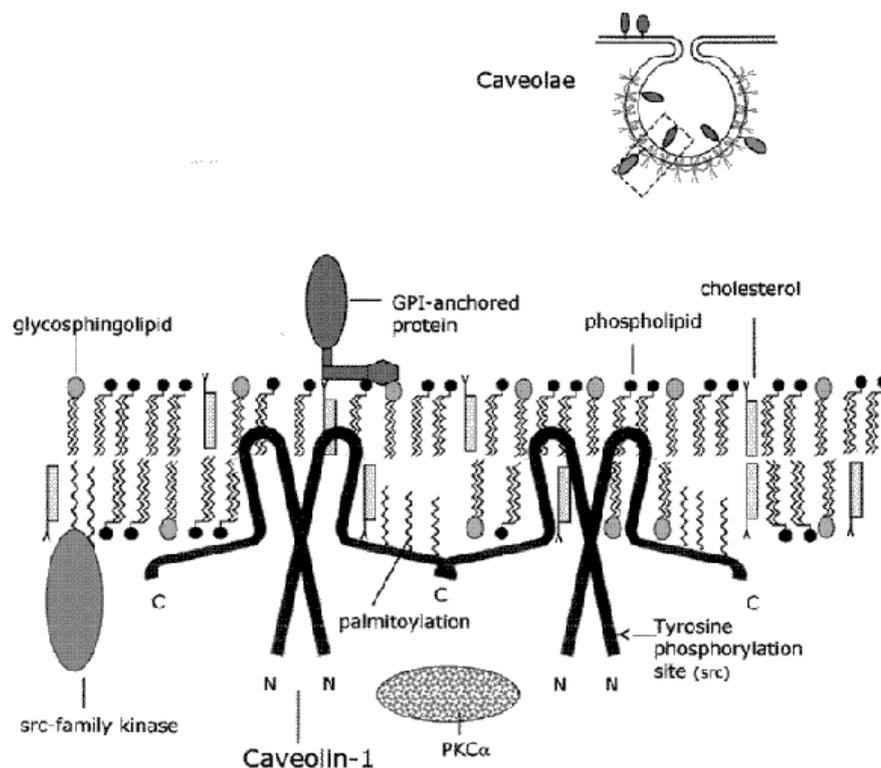


Figura 1.8. Esquema de caveola y estructura de caveolina 1 (Bender *et al.* 2002). El dibujo muestra esquematizada la estructura en oligómero de la proteína, sus principales sitios de modificación postraduccionales y varios componentes proteicos y lipídicos asociados a su funcionamiento.

denominado “*Caveolin-scaffolding-domain*” (CSD), el cual parece responsable de la interacción con otras proteínas (Stan 2005) si bien su relevancia funcional permanece aún en discusión (Collins *et al.* 2012)

A nivel celular, caveolina se ha visto implicada en diferentes procesos, entre los

que destacan endocitosis, control del metabolismo lipídico y del colesterol, funciones mecanosensoras y señalización celular (van Deurs *et al.* 2003). Estas funciones cobran especial importancia en procesos como la migración direccional, el cual está altamente controlado y donde las caveolas parecen ejercer de anclaje para múltiples rutas de señalización, permitiendo interacciones moleculares entre proteínas localizadas específicamente en la membrana (Isshiki *et al.* 2002). Entre ellas destacan factores clave en la orientación y el movimiento celular como los receptores de VEGF (*Vascular endothelial Growth Factor*), EGF (*Epithelial Growth Factor*) y PDGF (Platelet Derived Growth Factor), reguladores de la señalización de Ca^{2+} , la sintasa de óxido nítrico eNOS y los miembros de la familia de las Rho GTPasas Rac1, Cdc42 y RhoA, con los cuales se ha demostrado unión directa (Gingras *et al.* 1998; Navarro *et al.* 2004).

En cuanto a su interacción con proteínas estructurales, se ha observado que caveolina 1 se une a fibras de stress de F-actina vía Filamina (Stahlhut and van Deurs 2000), la cual podría ejercer denexo con las integrinas. De hecho, se han descrito interacciones directas con la integrina $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a estrés por presión (Radel *et al.* 2007).

o **Caveolina 1 en migración direccional y en sus rutas de señalización asociadas.**

Uno de los apoyos más destacados en la defensa de un papel de caveolina 1 en migración direccional es el fenotipo mostrado por fibroblastos embrionarios (MEF) de ratones caveolina 1 *knock-out*. Estos poseen una forma redondeada con pérdida de la polaridad celular y muestrandefectos en migración ante quimioatrayente. Estas células *Cav1^{-/-}*, cuyas fibras de estrés forman anillos corticales, generan de manera descontrolada protusiones de membrana, producto de la sobreactivación de Rac1. Adicionalmente, exhiben una mayor cantidad de adhesiones focales, que son más pequeñas e inmaduras como producto de la inhibición de la señalización por RhoA (Grande-Garcia *et al.* 2007).

Se ha descrito que durante la migración, caveolina 1 muestra una localización polarizada, quedando mayoritariamente concentrada en la parte trasera de la célula, donde también se ubica Cavina-1 (Cavin1) (Hill *et al.* 2012). En dicha localización, caveolina 1 es la responsable de la internalización y el reciclaje tanto de las estructuras de adhesión como de integrinas, lo que impide la formación de nuevos lamelipodios (Parat *et al.* 2003). Sin embargo, existen estudios que apuntan a que otra subpoblación de caveolina 1, fosforilada en el residuo Y¹⁴, viaja hasta la parte delantera de la célula, donde podría ser responsable del reclutamiento de Csk y de la regulación de las nuevas adhesiones focales (Beardsley *et al.* 2005). Estos estudios están apoyados por ensayos de migración 3-D y a través de poro, en los que una parte importante de la caveolina celular se localiza en la parte frontal de la célula (Parat *et al.* 2003). Estudios adicionales han descrito un dominio situado en el extremo N-terminal de la proteína que se cree responsable de estos cambios de localización (Sun *et al.* 2007; Hill *et al.* 2012).

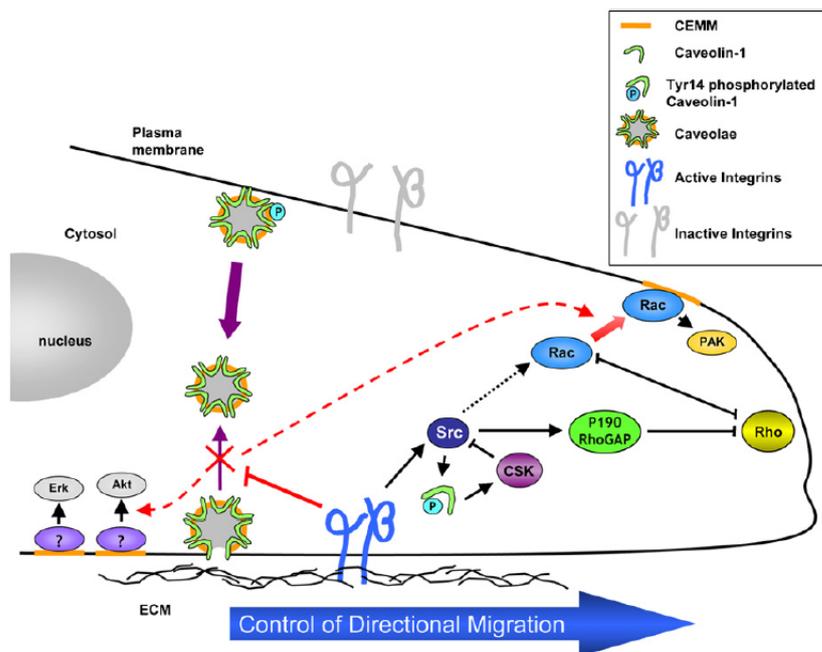


Figura I.8. Cav1 y su fosforilación en migración direccional. En el gráfico se observan las acciones indirectas en migración, endocitando integrinas inactivas en la parte trasera de la célula, así como las directas en señalización celular, interaccionando en el bucle Src-Csk-Cav1pY14 en el frente de migración (Grande-García and del Pozo 2008).

La relación entre caveolina 1 y las rutas de señalización implicadas en adhesión y migración ha sido intensamente estudiada. Se ha demostrado en las células metastáticas de mama humana MDA-MB-231 que la activación de la cascada de señalización Rho/ROCK promueve la fosforilación de Cav-1 en el residuo Y¹⁴, lo que a su vez activa Rho y estabiliza la asociación de FAK con las adhesiones focales, resultando todo ello en un incremento de migración y de invasión vía c-Src y ROCK (Joshi *et al.* 2008). También se ha descrito que la expresión de caveolina 1 en células de melanoma murino B16F10 limita su potencial metastático sin afectar a la proliferación, en un

proceso que implica la inactivación de c-Src y la inhibición de la expresión de integrina $\beta 3$ (Trimmer *et al.* 2010).

Especialmente estudiada ha sido la relación entre c-Src y caveolina 1 y su regulación. c-Src aparece sobre-activada en MEF *Cav1*^{-/-} (Grande-Garcia *et al.* 2007), por un proceso que parece tener lugar en paralelo a la inactivación de Csk. De hecho, Csk puede unirse de forma específica a la forma fosforilada de caveolina 1 (Cao *et al.* 2002), lo que establece un bucle de retroalimentación negativa que implica a las tres proteínas y que mantiene controlado el nivel de c-Src activo. Esta interacción se produciría preferentemente en zonas de adhesión mediadas por integrinas, ya que el silenciamiento de la integrina $\beta 1$ impide la asociación de caveolina 1 y de c-Src ante estrés por presión (Radel and Rizzo 2005). En cuanto a la relación de caveolina 1 con Cbp, se ha descrito que cada una de estas proteínas se veía sobre-activada ante la inhibición de la otra, de manera que un silenciamiento de Cbp provocaría una hiperfosforilación compensatoria de caveolina 1 en la Y¹⁴, lo que permitiría una localización suficiente de Csk en membrana y, con ello, el control de la activación de c-Src, ocurriendo un fenómeno similar en el caso de la inhibición de caveolina 1 (Place *et al.* 2011).

También ha sido estudiado el efecto de la endocitosis de caveolas, las cuales pueden internalizarse en respuesta a señales celulares tales como el virus SV40 o la presencia de glicoesfingolípidos y de colesterol (Pelkmans2001;Sharma 2004). Entre otras funciones, la internalización de caveolas está asociada a la regulación de la adhesión celular y al establecimiento de contactos focales en las interacciones célula-matriz (Pelkmans 2005), siendo clave en el reclutamiento de Dynamina y de quinasas como c-Src o PKC (Oh 1998; Pelkman 2002). Esta función endocítica de caveolas es particularmente importante para el funcionamiento de las integrinas, así como para el reciclaje de la matriz extracelular. De hecho, se ha descrito que la fibronectina presente en la matriz es reabsorbida por la célula que se encuentra ligada por la integrina $\alpha 5\beta 1$ activa, y que este proceso es dependiente de la internalización de la integrina por la endocitosis mediada por caveolina 1 (Shi and Sottile 2008). El silenciamiento de caveolina 1 también parece responsable de la sobre-expresión de integrina $\alpha 5\beta 1$, y con ello del aumento de la agresividad de células de glioblastoma (Martin *et al.* 2009).

Aquí también parece jugar un papel clave la fosforilación de su residuo Y¹⁴. Según los estudios de Del Pozo y colaboradores (Echarri and Del Pozo 2006; Salanueva *et al.* 2007), la caveolina fosforilada se localiza preferentemente en las adhesiones focales, lejos de las zonas asociadas a caveolas. Sin embargo, ante un estímulo de endocitosis, como la pérdida de adhesión, comienza la internalización de integrinas en regiones de caveolina 1 no fosforilable, lo que bloquea la progresión de dicho ciclo. Este proceso queda inhibido en células que expresan caveolina 1 no fosforilable en Y¹⁴, a pesar de que la formación de caveolas permanece inalterada (del Pozo *et al.* 2005). (Martin *et al.* 2009).

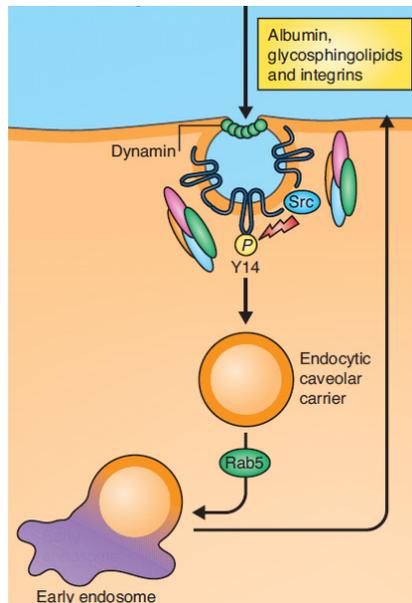


Figura I.9. Endocitosis mediada por caveolas. En este modelo, la fosforilación de Cav1 en su residuo de tirosina 14 es clave para la endocitosis. Nótese que las integrinas asociadas a las vesículas endocitadas pueden volver a la superficie celular completando el ciclo (Bastiani and Parton 2010).

En cuanto a la importancia de caveolina 1 en la organización de la matriz extracelular, parece que no sólo está implicada en su reciclaje, sino también en su organización espacial, ya que la carencia de esta proteína impide un alineamiento correcto de las fibras de colágeno y de fibronectina, inhibiendo la migración e invasión por parte de células metastásicas (Goetz *et al.* 2011). Así, tanto su sobre-expresión como una fosforilación constitutiva provocan la generación de un microentorno tumoral más permisivo para las células tumorales.

En cuanto a su participación en endocitosis, las caveolas fueron descritas inicialmente como reguladores negativos de este proceso mediante la estabilización de los *raft* lipídicos (Le *et al.* 2002). Sin embargo, existen múltiples pruebas que unen la internalización de estas vesículas con la adhesión y la reorganización del citoesqueleto (Pelkmans *et al.* 2005). Así, la adición de esfingolípidos o de colesterol, activadores de la endocitosis por caveolas (Sharma *et al.* 2004; Pelkmans *et al.* 2005), provoca la agregación e internalización de la integrina $\beta 1$ (Sharma *et al.* 2005).

- o **Caveolina y AhR.**

Hasta el momento, los únicos datos que unen estas proteínas proceden del laboratorio del doctor Henning, y se centran en la importancia de la integridad de las caveolas en la respuesta a xenobióticos vía AhR. Así, se ha observado que la disrupción de caveolas evita la inducción de la expresión de la proteína de adhesión ICAM-1 por acción de benzopireno (Oesterling *et al.* 2008) y del quimioatrayente MCP-1 por el compuesto PCB77 (Majkova *et al.* 2009). También se ha observado que la activación de AhR por PCBs es dependiente de la expresión de caveolina 1, y que ésta también aumenta por acción de estos xenobióticos (Lim *et al.* 2008).

OBJETIVOS

El objetivo global del estudio fue analizar el papel del receptor de dioxina en los procesos de adhesión y de migración celular en fibroblastos de ratón. Esta meta general se tradujo en los siguientes objetivos concretos:

- Estudio del efecto de la expresión de AhR en la capacidad de migración direccional y de invasión de fibroblastos inmortalizados de glándula mamaria..
- Análisis de la implicación de la integrina $\beta 1$ y su ruta de señalización en el fenotipo adhesivo y migratorio de fibroblastos inmortalizados de glándula mamaria *AhR*^{-/-}.
- Descripción de la interacción funcional entre AhR y caveolina 1 y de su relevancia en la fisiología de fibroblastos de ratón.
- Análisis de la existencia de una subpoblación del receptor de dioxina asociada funcionalmente a proteínas de membrana plasmática implicadas en adhesión y en migración celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. **Cultivo de líneas celulares.**

En el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se utilizaron principalmente las líneas celulares inmortalizadas, T-FGM *AhR*^{+/+} y T-FGM *AhR*^{-/-}, obtenidas y caracterizadas en nuestro laboratorio a partir de fibroblastos de glándula mamaria de ratones que expresan o que carecen del receptor de dioxina. Los cultivos primarios de fibroblastos de glándula mamaria T-FGM fueron inmortalizados mediante la co-transfección estable del antígeno T largo del virus SV-40 con AU5-c-H-Ras (Mulero-Navarro et al. 2005). Estas células se cultivaron en medio DMEM-F12 (Hyclone) conteniendo 10% suero fetal bovino (FBS) (Gibco), 50 µg/µl de gentamicina (Lonza) y 11 mM de D-Glucosa. También se usó la línea de hepatoma de ratón Hepa 1c1c7 que fue cultivada en medio Alpha-MEM (Lonza) suplementado con 10% FBS, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina (Gibco). Adicionalmente se utilizaron células de melanoma de ratón B16F10, las cuales fueron establemente transfectadas por infección retroviral con un *hairpin* silenciador del gen *AhR* (*sh-AhR*) o con una versión constitutivamente activa del receptor (*CA-AhR*); células B16F10 infectadas con el vector vacío fueron empleadas como línea control (Contador-Troca et al. 2013). Estas se cultivaron utilizando medio DMEM (Lonza) suplementado con 10% de FBS, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina (Gibco). Todos los cultivos se crecieron a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂.

1.1. **Reactivos y Tratamientos.**

Los reactivos químicos añadidos a los cultivos fueron preparados siguiendo las instrucciones del fabricante. Los principales tratamientos realizados se detallan a continuación:

- Vectores de expresión: pCDNA3.1-*AhR* (generado en nuestro laboratorio), pUC18-Ca-*AhR* (cedido por el Doctor Fujii-Kuriyama)- y sus correspondientes vectores vacíos. Estos fueron diluidos en agua libre de nucleasas. La comprobación de su expresión y su actividad se muestran en la Figura M.1A y 1B.
- siRNAs: si-*AhR* (Dharmacon), si-Cbp (Sigma) (la comprobación de su capacidad de silenciamiento se muestra en la Figura M.1B), si-XAP2 (Sigma) (la comprobación de su capacidad de silenciamiento se muestra en la Figura RI.12A) y si-scramble (Dharmacon), diluidos en agua libre de nucleasas.
- TCDD: diluido en DMSO, incubación de 90 minutos a 20 nM.

- Pervanadato sódico: procedente de ortovanadato sódico, activado por incubación con H₂O₂ 1:100 durante 30 min a temperatura ambiente previo a su uso. . Utilizado a 1 mM durante 1h.
- BSA-FITC(Sigma): diluido en medio de cultivo estéril y utilizado a 10 μM.
- Nystatina (Sigma): utilizada en suspensión a 50 μg/ml en medio de cultivo sin suero. Se trató durante 15 minutos antes de la incubación con BSA.
- Metil-β-ciclodextrina (Sigma): diluida en medio estérily utilizada a 10 μg/ml como inhibidor de endocitosis durante 1h antes de la incubación con BSA. Como catalizador de colesterol se empleó a 2,5 μg/ml. Colesterol (Sigma): diluido en una mezcla de cloroformo-metanol 1:1. Utilizado a 100 μM mezclado con MβCD a 2,5 mM durante 16h.

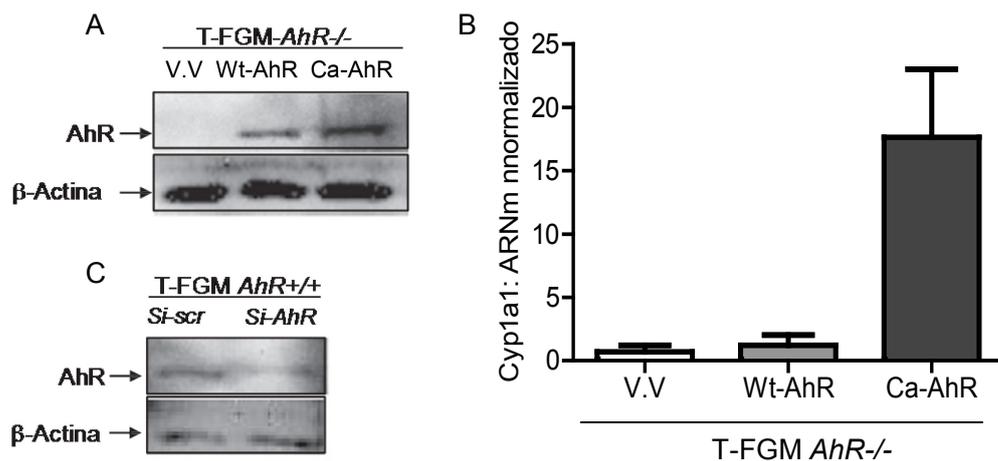


Figura M.1. Comprobación de transfecciones de vectores de expresión y de siRNAs. (A) Fibroblastos *AhR*^{-/-} fueron transfectados con vector vacío (V.V), pCDNA3.1-AhR (Wt) o pUC18-Ca-AhR y la expresión de AhR se cuantificó mediante Western-blot. (B) Para comprobar la sobre-activación de Ca-AhR, T-FGM *AhR*^{-/-} fueron transfectados y se realizó una extracción de ARN mensajero total. A continuación se calculó la cantidad relativa de mensajero para la diana de transcripción de AhR *Cyp1a1*. (C) T-FGM *AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} fueron transfectados respectivamente con si-AhR y si-Cbp. El resultado del silenciamiento se calculó respecto a la condición transfectada con si-scramble (si-scr) por Western-blot.

2. PCR (Polymerase Chain Reaction).

2.1. PCR Convencional para inmunoprecipitación de cromatina (ChIP):

La reacción de PCR fue utilizada en la detección de fragmentos procedentes de inmunoprecipitaciones de cromatina (ChIP). Cada PCR fue adaptada a las necesidades específicas de cada experimento si bien se emplearon las siguientes condiciones generales:

1. Enzima utilizada: EcoTaq Polymerase Kit (Ecogen).
2. Concentración de Magnesio: La concentración de $MgCl_2$ utilizada osciló entre 1,5 y 3 mM, partiendo de 2 mM como concentración base y aumentando o disminuyendo la cantidad de cofactor en función de la dificultad de la hibridación y/o de la polimerización. Temperatura de anillamiento: Los cebadores de PCR fueron diseñados para hibridar con el molde a una temperatura óptima de 59°C. Tomando esta como referencia, la temperatura utilizada se determinó de forma individualizada en función del molde y de las necesidades de cada experimento, en un rango entre 57 y 61°C.
3. Tiempo de polimerización: Partiendo de un tiempo mínimo de 30s, se determinó la duración del paso de extensión en función del tamaño del fragmento a amplificar.
4. Número de ciclos: Las repeticiones del ciclo de PCR variaron entre 35 y 50 en función de las necesidades experimentales.
5. Cantidad de Molde: El ADN utilizado para cada PCR varió entre los 50 y los 500 ng, no superando nunca 1/10 del volumen total de la reacción.

2.2. PCR cuantitativa para la cuantificación de la expresión de ARN mensajero.

Para la cuantificación de la expresión génica relativa de los genes de interés, se partió de al menos 10^6 células para cada condición, las cuales fueron sometidas a una extracción de ARN total siguiendo el protocolo de "High Pure RNA Isolation Kit" (Roche). Una vez cuantificada la concentración de ARN total obtenida, se utilizó como molde 1 mg para la reacción de retrotranscripción que se llevó a cabo empleando el kit "iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR" (BioRad). Tras la obtención del cDNA, se realizó una PCR cuantitativa (qPCR) utilizando el termociclador Step One (Applied Biosystems) y la master mix SYBR® Select Master Mix (Life Technologies). El protocolo empleado fue el siguiente:

Desnaturalización inicial: 5min a 95°C
 Desnaturalización: 30seg a 95°C
 Hibridación: 30seg a 59°C
 Extensión: 30seg a 72°C
 Extensión final: 5min a 72°C
 Mantenimiento a 4°C

} 50 repeticiones

Se utilizó como gen control el de la proteína Gapdh, cuya expresión no varía en ninguna de las condiciones experimentales utilizadas.

La especificidad de las reacciones de PCR fue comprobada utilizando los datos de una curva de desnaturalización (*melting curve*). En ciertos experimentos se llevó a cabo la comprobación de los fragmentos amplificados mediante electroforesis en geles de agarosa.

Tabla M.I. Cebadores utilizados en los experimentos que precisaron PCR

Gen	Hebra líder	Hebra retrasada
<i>Cyp1a1</i>	5'- ACAGACAGCCTCATTGAGCA-3'	5'-GGCTCCACGAGATA GCAGTT-3'
<i>Fn1</i>	5'-AAGCCGGGGTTTTAACTGCGAG-3'	5'-CCCCGTTTGAATTGCCACCATAAG-3'
<i>Gapdh</i>	5'-TGAAGCAGGCATCTGAGGG-3'	5'-CGAAGGTGCAAGACTCGGAG-3'
<i>pag1/Cbp</i>	5'-TACTGAGC AGTGGGCAGATG-3'	5'-GGAAGGCACATTCATCAGT-3'
<i>Xap2</i>	5' AAGCTGGTGGCTCAGGAGTA 3'	5' GCAGGGTCTAGCTCCAACAC 3'
XRE-3 pag1	5'-CCAAGAGAATGTGCTGGTTG-3'	5'-CATAGTGGATACGCCTTGGA-3'

3. Transfección transiente de células en cultivo.

Para la transfección de ARN pequeños interferentes (siRNAs) se utilizó el método de electroporación, mientras que las transfecciones de vectores para la expresión ectópica de proteínas fueron realizadas con el reactivo comercial Turbofect (Fermentas).

Las electroporaciones se realizaron utilizando el nucleoporador MicroPorator MP-100 (Digital-Bio). Las células fueron transferidas a medio completo sin antibiótico 24 h antes de la transfección. En el momento de la electroporación, las células se tripsinizaron con Tripsina-EDTA (Gibco), se lavaron con PBS, se contaron con un hematócrito y se resuspendieron en Neurobasal Medium (Life Technologies). A esta solución se le añadió el siRNA correspondiente una concentración final de 3 µg/10⁶ células. Las condiciones de electroporación fueron: dos pulsos de 1200 V durante 20 mseg. Transcurridas 24 h desde la transfección, las células se cambiaron a medio completo y se crecieron hasta 24 h adicionales antes de realizar cada experimento.

Como control de electroporación se utilizó un siRNA de secuencias aleatorias “*scramble*” (Dharmacon).

La transfección con Turbofect se realizó siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Brevemente, las células se sembraron a la confluencia conveniente para el desarrollo de cada experimento. Cada vector se diluyó en medio de cultivo sin suero y se mezcló con el polímero de transfección. Tras 20 minutos de incubación a temperatura ambiente, la mezcla se añadió a las células en cultivo. Las proporciones de referencia en la transfección fueron 100 μ l de medio, 2 μ l de polímero y 1 μ g de ADN para cada pocillo de una placa de 24 (Falcon). Para las transfecciones realizadas en otros formatos de placas de cultivo la mezcla fue escalada. Como control de transfección se utilizaron los vectores vacíos correspondientes a cada vector de expresión.

4. Microscopía confocal.

Las observaciones se realizaron principalmente en la unidad de microscopía del Servicio de Técnicas Aplicadas a las Biociencias (STAB) de la Universidad de Extremadura, utilizando un equipo Olympus FV1000. Las imágenes de localización de AhR en membrana y colocalización con proteínas de adhesión fueron tomadas en el servicio de microscopía del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB/CSIC) utilizando un equipo confocal espectral (CLSM) Leica TCS SP2.

4.1. Realización de las tinciones fluorescentes.

Los fibroblastos T-FGM *AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} se sembraron en cristales de 13 mm de diámetro. Tras un lavado con PBS, las células se fijaron en paraformaldehído al 3,5% durante 10-15min a temperatura ambiente. Tras lavar el exceso de paraformaldehído, se procedió a la permeabilización durante 10 min en PBS conteniendo Triton X-100 al 0,1% y BSA al 0,2%. Para las tinciones contra caveolina 1 se realizó un fijado con metanol a -20°C durante 10seg, no realizándose en este caso el proceso de permeabilización. Se lavó dos veces con PBS para eliminar el exceso de detergente y los epítomos inespecíficos se bloquearon durante 30 min en PBS+BSA al 2%. A continuación, se añadió el anticuerpo específico correspondiente diluido en solución de bloqueo durante al menos 2 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios empleados se indican en la tabla M.I.

Para los experimentos de co-localización de proteínas se realizaron incubaciones dobles sin alterar el protocolo. Tras tres lavados con PBS, se llevaron a cabo las

incubaciones con anticuerpos secundarios marcados con diferentes fluoróforos y utilizados a una dilución 1:500 (Tabla M.I). Las incubaciones se desarrollaron entre 45 min y 2 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Tras varios lavados adicionales con PBS, los cristales se incubaron con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (2 μ M disuelto en PBS) durante 5 min a temperatura ambiente. Tras eliminar el exceso de DAPI, se realizó el montaje de los cubreobjetos utilizando una solución 1:1 de PBS y glicerol. La observación de los cristales se realizó en el servicio de microscopía confocal de la UEx utilizando un equipo Olympus Fluoview FV1000.

Los anticuerpos utilizados para los experimentos que implican inmunofluorescencia se muestran en la tabla M.II, al final del apartado de materiales y métodos.

4.2. Análisis del contenido en fibronectina de los cultivos de fibroblastos.

Los fibroblastos T-FGM-*AhR*^{+/+} y T-FGM-*AhR*^{-/-} fueron sembrados sobre cristales estériles de 22 mm de lado previamente tapizados por tratamiento con 1 μ g/ml de fibronectina durante 16 h a 4°C y 2 h a 37°C.. Las células se mantuvieron creciendo en medio DMEM-F12 con FBS al 10% durante 48 o 72 h. Tras ello, los cristales fueron sometidos al mismo procesado que el empleado para el resto de inmunofluorescencias exceptuando que las células no fueron permeabilizadas con el fin de evitar la unión del anticuerpo a la fibronectina intracelular. El anticuerpo utilizado en estas determinaciones fue generado en conejo, reconoce el fragmento de 80 kDa de la fibronectina (donado por la Dra. M^a Ángeles García Pardo) y fue diluido 1:500. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio de fluorescencia Zeiss y se analizaron utilizando el software *Image J*. La intensidad de fluorescencia se normalizó por el número de células en 4 áreas del cultivo elegidas al azar y el tratamiento gráfico y estadístico fue realizado empleando el software *GraphPad Prism 6.0*.

4.3. Análisis de la morfología celular de los fibroblastos T-FGM.

Se partió de fibroblastos *AhR*^{-/-} transfectados con siRNA dirigido contra Cbp (Sigma) o de secuencia aleatoria *scramble* (Dharmacon). Se tomaron imágenes en contraste de fase (utilizando un microscopio Zeiss), de células sembradas 24 h antes a baja confluencia. El contorno celular de entre 20 y 40 células por condición experimental fue determinado manualmente utilizando la aplicación *Shape Descriptors Measurement* dentro del programa *Image J*. Dicha aplicación permite medir los diferentes parámetros de la forma celular de las células. Para la representación de los datos se seleccionaron los parámetros *Circularity* ($4\pi \cdot \text{área} / \text{perímetro}^2$), donde un círculo perfecto obtendría un

valor de 1 (por tanto el valor descende cuanto más acicular sea la forma), y *Aspect Ratio* (Eje mayor/eje menor), donde el valor aumenta cuanto más alargada sea la célula.

4.4 Realización de inmunofluorescencia en heridas en placa.

Las células T-FGM-*AhR*^{+/+} y T-FGM-*AhR*^{-/-} fueron sometidas a heridas in vitro tal como se indica detalladamente más abajo (punto 6). Tras ello, se llevaron a cabo inmunofluorescencias para cada proteína de interés y se procedió a su observación por microscopía confocal.

4.5 Cuantificación de la orientación de las fibras de actina en heridas in vitro.

Para la observación de las fibras de actina, se partió de células T-FGM-*AhR*^{+/+} y T-FGM-*AhR*^{-/-} que fueron teñidas con rodamina-faloidina 8 h después de la realización de la herida. Se seleccionaron imágenes representativas de uno y otro genotipo obtenidas por microscopía confocal y se procedió a su análisis. Las imágenes se orientaron de forma que la herida quedara completamente vertical y se procedió a su transformación utilizando la aplicación *Orientation J* del programa *Image J* desarrollada por Rezakhaniha y colaboradores (Rezakhaniha et al. 2012). Adicionalmente, se usó la aplicación *Distribution (Image J)* que nos permitió discriminar las diferentes fibras de actina en función de su orientación con respecto al eje horizontal. Para la representación de los datos obtenidos del procesado de las imágenes se utilizaron dos métodos:

El primero fue el coloreado digital de cada imagen original mostrando la orientación de cada fibra con un paleta de colores en la que los colores fríos señalaron las orientaciones más horizontales (acordes con la dirección a la migración) y los colores vivos las más verticales (perpendiculares a la dirección de la migración).

En cuanto al segundo, se construyó una gráfica de distribución de la fluorescencia de las fibras en función de su orientación con respecto al eje horizontal.

4.6 Ensayos de degradación de gelatina: detección de invadosomas.

Tapizado de cristales:

El protocolo utilizado fue una adaptación de dos métodos previamente descritos (Destaing et al. 2010) (Baldassarre et al. 2003). Cristales de 12 mm de diámetro fueron tratados con ácido nítrico al 20% para eliminar impurezas. Tras varios lavados con agua destilada, fueron esterilizados mediante inclusión en etanol y secados en condiciones

estériles. Se colocaron los cristales en placas de 24 pocillos, se añadieron 150 μ l de gelatina 2 mg/ml, teñida previamente con el fluoróforo FITC sobre cada cristal y se incubó 1 h a 37°C. Tras ello, se fijó la gelatina a 4°C toda la noche utilizando 300 μ l de paraformaldehído al 10%. Al día siguiente, se lavaron los cristales con PBS, y se incubaron con borohidrido sódico 5 mg/ml en PBS durante 3 min. Se realizaron 3 lavados con PBS y los cristales fueron transportados a otra placa de 24 pocillos. Allí se realizó un lavado más con PBS y una incubación con medio completo durante 1 h en incubador. Por último se cambió a medio fresco.

Periodo de degradación:

Entre 10^4 y 2×10^4 células fueron sembradas para cada condición experimental sobre los cristales tapizados estos se incubaron por un periodo de entre 2 y 16 horas. Tras ello se siguió el procesado normal de células para tinción con rodamina-faloidina.

Cuantificación de la degradación:

La cuantificación se realizó empleando el programa *Image J* con el que se observaron las zonas pericelulares de degradación y la señal proveniente del núcleo celular. Se procesaron imágenes en las que la capa subyacente de gelatina no tuviera imperfecciones o zonas oscuras que pudieran alterar las medidas.

- Gelatina: Se realizaron las siguientes acciones dentro del programa:
 - o *Adjust-Threshold*- de 0 a 0 (solo selecciona el color realmente negro, que muestra una superficie completamente degradada.)
 - o *Binary-Make Binary*.
 - o *Particle-Analyze particles* con la aplicación *Area fraction* activada. Seleccionar rango de partículas *4-infinite* para evitar las partículas debidas a fondo.
 - o Con esta herramienta se obtiene el número de partículas analizadas, su tamaño medio y el área total y relativa de gelatina que ha sido degradada.

- Núcleos: Se contabilizó el número de núcleos por imagen realizando lo siguiente:
 - o *Adjust-Threshold*- de 0 a 1-3, para conseguir observar núcleos separados sin fondo.

- *Binary-Make Binary*.
- *Particle-Analyze particles*. Seleccionar rango de partículas 40-*infinite* para seleccionar sólo núcleos.
- Aquí obtendremos el número total de núcleos por célula.

A continuación se normalizó el área degradada por el número de núcleos por imagen y los datos se representaron mediante *GraphPad Prism 6.0* utilizando al menos 3 imágenes representativas de diferentes cultivos.

4.7 Cuantificación de la endocitosis de BSA-FITC.

Se sembraron T-FGM-*AhR*^{+/+} en cristales de 13 mm de diámetro y se crecieron en condiciones normales en medio completo durante 24 h. Tras ello, se lavó tres veces con medio sin suero y se incubó con medio que lo contenía durante 2 h a 37°C. Los tratamientos con inhibidores se realizaron al final de este periodo de incubación. Posteriormente se incubó con BSA-FITC (Sigma) 1 μ M en medio sin suero entre 1 y 24 h. En los últimos 20 minutos de cada incubación se realizó la tinción con Hoechst 33342 para marcar núcleos. Por último, se realizaron dos lavados con medio sin suero y se realizó la observación de las células *in vivo* mediante microscopía confocal.

Cuantificación:

Se seleccionó el canal verde de las imágenes y la herramienta *Heat Map Histogram* del programa *Image J*, que permite cuantificar la superficie correspondiente a cada grado de intensidad de señal desde 0 (negro) hasta 255 (saturación), así como la extrapolación total de la fluorescencia presente en cada imagen. A continuación, se cuantificó el número de núcleos por imagen de manera similar al apartado anterior, y se normalizó cada resultado por el número de éstos.

Los resultados obtenidos de tres imágenes representativas por cada condición experimental fueron comparados en cuanto a su fluorescencia total por célula en un gráfico de barras y analizados estadísticamente mediante *GraphPad Prism 6.0*.

Por otra parte, los resultados relativos a la señal obtenida en al menos tres imágenes correspondientes a cada nivel de intensidad fueron agrupados por decenas y representados en un gráfico de línea de tendencia y analizados utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov.

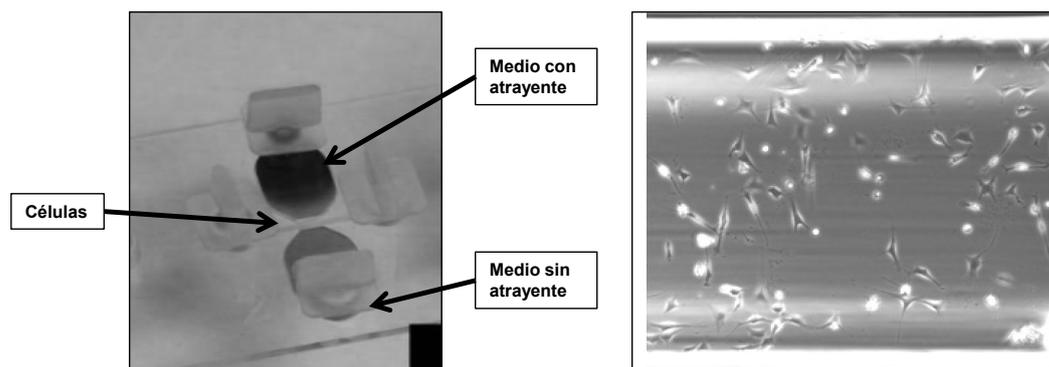
4.8 Seguimiento de vesículas de Cav1-GFP.

Los fibroblastos T-FGM-*AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} sembrados sobre cristales de 13 mm fueron transfectados con los vectores de expresión pEGFP-Cav1 o pEGFP-Cav1-Y14F y observados por microscopía confocal de célula viva en condiciones de temperatura y humedad controladas. La toma de imágenes se realizó cubriendo la totalidad del eje Z de la célula con imágenes espaciadas 1 μm , adquiriéndose la señal cada minuto durante al menos 15 minutos. Posteriormente se realizó un montaje de todos los planos en el eje Z obtenidos y se compuso la secuencia temporal de imágenes. El movimiento de hasta 20 vesículas positivas para Cav1-GFP fue seguido a lo largo del tiempo utilizando las aplicaciones *manual tracking* y *chemotaxis tool* del programa *Image J*. Se cuantificaron las distancias totales (D. Acumulada) y efectivas (D. Euclídea) recorridas por cada una de las células. El resultado de la cuantificación de 3 células de cada condición fue representado y comparado utilizando *GraphPad Prism 6.0*.

4.9 FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching)

Para el ensayo de recuperación de fluorescencia tras fotodesgaste inducido por láser se sembraron y transfectaron fibroblastos T-FGM-*AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} en condiciones similares a las del apartado anterior y se seleccionaron células representativas; al inicio del ensayo se tomó una imagen previa a la adición del estímulo. A continuación se procedió a la eliminación de la fluorescencia presente en un rectángulo definido de 10 μm mediante fotodesgaste. Las condiciones utilizadas fueron de 30 barridos con el láser de 488 nm al 50% de potencia. Tras el tratamiento, se tomó una imagen de la zona cada 2 min durante un periodo de hasta 30 minutos. El análisis de la recuperación de la fluorescencia tras el desgaste se realizó utilizando la herramienta *Plot profiles* de *Image J*. Se seleccionaron las imágenes más representativas y se procesaron junto a sus perfiles señalando en éstos los puntos en los que existía recuperación del nivel de fluorescencia.

5. Ensayo de migración in vivo empleando tracking celular.



54 **Figura M.2. Funcionamiento de la cámara μ -slide chemotaxis.** En la parte izquierda se destaca esquemáticamente la localización de los depósitos de medio y el canal para células. En la parte derecha se presenta una imagen representativa de los campos observados.

Para realizar estos ensayos se utilizaron cámaras μ -slide *chemotaxis* (IBIDI). Dichas cámaras permiten colocar células entre dos compartimentos, los cuales son rellenados con medios de diferente composición (normalmente se utilizó uno de ellos con FBS como estímulo migratorio y el otro sin FBS). Este sistema permite generar un gradiente de concentración a lo largo del espacio ocupado por las células. De este modo, la migración celular es direccionada, lo que permite analizar la capacidad de orientación, velocidad y comportamiento frente a un estímulo de células individuales. Cada placa fue tapizada con 5 μ g/ml de fibronectina y se mantuvo 16 h a 4°C y, al menos, 2 h a 37°C en cámara húmeda. Antes del sembrado, la fibronectina en exceso fue eliminada mediante lavado con medio sin suero.

Se utilizaron células T-FGM-*AhR*^{+/+} y T-FGM-*AhR*^{-/-} sin transfectar o transfectadas con un siRNA específico para AhR o con su vector vacío correspondiente. Las células se levantaron de las placas con PBS+ EDTA 2 mM, se centrifugaron y se resuspendieron en medio DMEM-F12 (Lonza) sin suero. A continuación, se procedió al montaje de la cámara de observación de la migración siguiendo las instrucciones del fabricante empleando un total de 10⁴ células por ensayo. En el compartimento superior se añadió medio DMEM-F12 con FBS al 10%, y en el inferior DMEM-F12 sin suero. El movimiento celular fue analizado en tiempo real en un microscopio de contraste de fases para célula viva manteniendo condiciones de incubación idóneas (37°C, humedad mantenida y 5% CO₂). Se tomó una imagen de cada posición seleccionada cada 5 min durante 16 h, o bien cada 3 min durante 7 h. El resultado fue editado en forma de video y analizado utilizando las aplicaciones *manual tracking* y *chemotaxis tool* del programa *Image J*. Tras analizar individualmente entre 30-40 células por condición experimental, se realizó el tratamiento estadístico (U de Mahn Withney) y la representación gráfica en el programa *GraphPad Prism 6.0*. El *índice de migración* se calculó dividiendo el avance en vertical de la célula por la distancia total recorrida y el *índice de direccionalidad* dividiendo la distancia euclídea o efectiva por la distancia acumulada total.

6. Ensayo de herida en placa.

Los fibroblastos T-FGM-*AhR*^{+/+} y T-FGM-*AhR*^{-/-} en condiciones basales o transfectados por electroporación con siRNA dirigido contra Cbp (Sigma) o con unasecuencia aleatoria “*scrambled*” (Dharmacon) fueron sembrados en placas de 6 pocillos a una confluencia del 70-80% tras lo cual se dejaron adherir durante 12 h. Se retiró el medio y con una punta de micropipeta de 200 μ l conectada a una bomba de vacío se realizaron dos heridas rectas perpendiculares por pocillo. Tras lavar los restos celulares con PBS, se añadieron 500 μ l de medio sin suero y las placas se incubaron

hasta 36 h a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO₂. Se evitó sembrar las células a una mayor confluencia debido a que en estas condiciones ambas líneas desarrollaban una monocapa con uniones célula-célula tan fuertes que provocaban el levantamiento del cultivo tras la realización de la herida. Las heridas fueron monitorizadas empleando un microscopio invertido asociado a una cámara *Motic*, con el que se tomaron imágenes a tiempos 0, 8, 16, 24 y 36 h. La migración se representó como la distancia recorrida por las células en cada punto temporal del experimento (migración = distancia entre fillos a 0 h - distancia entre fillos a "X" h). Para la cuantificación de cada ensayo se utilizaron dos fotografías por herida y se tomaron las mediciones de cuatro puntos representativos de cada imagen, obteniendo un total de 16 datos por pocillo. La medición de la distancia se realizó utilizando el programa *Image J* y se representó en unidades arbitrarias utilizando *GraphPad Prism 6.0*.

7. Ensayos de adhesión a matrices extracelulares.

Células T-FGM-*AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} fueron crecidas durante 48 h en placas de 100 mm de diámetro. En paralelo se trataron placas de ensayo de 96 pocillos con la concentración deseada de fibronectina (cedida por el laboratorio de M^a Ángeles García Pardo) disuelta en NaHCO₃ pH 8.8 durante 16 h a 4°C más 2 h adicionales a 37°C. El día del ensayo se procedió al lavado y tripsinización de las células con PBS-EDTA 2 mM (entre 10 y 20 min), tras lo cual se centrifugaron y se resuspendieron a una densidad de 3x10⁴ células/100 µl en medio RPMI (Gibco) conteniendo BSA al 0,5%. Estas células se marcaron con el fluoróforo BCECF-AM en oscuridad a 37°C durante 30 min. De esta suspensión celular se apartó una alícuota de 3x10⁴ células que se mantuvo a 37°C. Las placas de 96 pocillos se bloquearon durante 1,5 h a 37°C con 0,1M NaHCO₃ conteniendo BSA al 0,5%. A continuación, se pipetearon 100 µl de suspensión celular por pocillo (3x10⁴ células) y las placas se incubaron a 37°C por tiempos comprendidos entre 1 y 15 min para la curva adhesión/tiempo o durante 10 min en el ensayo a concentraciones variables de matriz. Las células no adheridas se eliminaron mediante 2-3 ciclos de volcado y lavado con RPMI+BSA al 0,5% y se comprobó que en el pocillo control (donde no hemos añadido ligando extracelular) no existían células pegadas. Las células adheridas fueron lisadas durante 30 min en oscuridad a 4°C por adición de 100 µl PBS conteniendo SDS al 0,1%. El mismo proceso de lisis se llevó a cabo con la alícuota separada inicialmente, que sirvió como *input*. Se realizaron controles negativos conteniendo solución de lisis en ausencia de células. Finalmente, se registró la fluorescencia emitida en un espectrofluorímetro multipocillo. El resultado se analizó con el programa *GraphPad Prism 6.0* normalizando la señal obtenida en cada punto

experimental con respecto al valor de señal del input. En la figura se representa la media \pm desviación estándar. Cada punto experimental fue realizado por triplicado.

8. Western Blot.

Preparación de extractos proteicos celulares totales:

Los extractos proteicos se obtuvieron a partir de células sembradas en placas de cultivo. Se retiró el medio de cultivo y la monocapa se lavó dos veces con PBS frío. Posteriormente, las células se lisaron con tampón de lisis para extractos proteicos totales durante 15 min a 4 °C. El lisado celular se centrifugó a 15000 g durante 15 min a 4 °C y el sobrenadante de esta centrifugación se recogió y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Medida de la concentración de proteína:

La concentración de proteína de los extractos celulares se determinó mediante el método colorimétrico de Bradford, utilizando el reactivo Coomassie plus protein assay reagent (Pierce) y albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. Tras realizar la reacción colorimétrica, se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 595 nm y los valores obtenidos se interpolaron en una recta patrón construida con cantidades conocidas de BSA.

Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y transferencia a membranas de nitrocelulosa:

Para la realización de electroforesis de proteínas en geles desnaturizantes de poliacrilamida se ha utilizado el sistema de tampón discontinuo descrito por Laemmli (Laemmli 1970). Alícuotas conteniendo entre 10 y 50 μ g de los correspondientes extractos proteicos se mezclaron con el volumen adecuado de tampón de carga para proteínas y se desnaturizaron por incubación a 95 °C durante 5 min. Las proteínas se separaron en función de su peso molecular sometiéndolas a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes por la presencia del detergente iónico SDS (SDS-PAGE). Se emplearon geles de poliacrilamida a concentraciones finales de entre 6 y 12%, dependiendo del peso molecular de la proteína en estudio.

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas presentes en el gel se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) por aplicación de un campo eléctrico en una solución de transferencia. La transferencia se realizó a 4 °C durante 16

h ó 4 h transfiriendo un total de 1200mA en ambos casos. Tras la transferencia, las membranas fueron teñidas con el colorante reversible Ponceau S para comprobar la eficacia de la transferencia y la homogeneidad de carga entre las diferentes muestras; tras ello, se eliminó el colorante lavando con TBS-T.

Marcaje con anticuerpos y revelado:

Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas durante al menos 1 h a temperatura ambiente en solución de bloqueo conteniendo 5% de leche desnatada e incubadas con el correspondiente anticuerpo primario al menos 2 h a temperatura ambiente o bien toda la noche a 4°C, dependiendo del anticuerpo utilizado y las condiciones de cada experimento. Tras 4 lavados de 10 min cada uno en TBS-T, las membranas se hibridaron durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP). Tras 4 lavados adicionales de 10 min cada uno en TBS-T y un lavado final de 5 min en TBS, se procedió al revelado. Para ello se añadió el sustrato quimioluminiscente *SuperSignal Chemiluminescent Substrate* (Pierce), en su sensibilidad Pico o Femto dependiendo de las necesidades de cada experimento, durante 5 min a temperatura ambiente. Las membranas se revelaron con películas Kodak *BioMax light film* (Sigma-Aldrich) que fueron después escaneadas para su análisis por densitometría. En ciertos experimentos las membranas se analizaron empleando el sistema quimioluminiscencia Image Quant 400 (General Electric).

Los anticuerpos utilizados se muestran en la tabla M.II, al final del apartado de materiales y métodos.

Lista de tampones usados:

- **Tampón de lisis para extractos proteicos totales:** 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 270 mM sacarosa, 10 mM β -glicerol-fosfato, 5 mM pirofosfato sódico, 50 mM fluoruro sódico, 1% (v/v) Tritón X-100, 0.1 mM ortovanadato sódico, 1 % (v/v) β -mercaptoetanol, 4 μ g/ μ l inhibidor de proteasas Complete.
- **5 x tampón de carga para proteínas:** 62.2 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% (p/v) SDS, glicerol, 0.025% (p/v) azul de bromofenol, 20% (v/v) β -ME.
- **Tampón de electroforesis:** 25 mM Tris, 190 mM glicina, 0.1% (p/v) SDS.
- **Tampón de transferencia:** 25 mM Tris, 190 mM glicina, 20% (v/v) metanol.
- **Ponceau S:** 0.5% (p/v) Ponceau S, 5% (v/v) ácido acético.
- **TBS-T:** 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 75 mM NaCl, 0.2% (v/v) Tween-20.
- **Solución de bloqueo para Western blot:** leche desnatada en polvo al 5% (p/v) disuelta en TBS-T.

- **TBS-T:** 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 75 mM NaCl, 0.2% (v/v) Tween-20.
- **TBS:** 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 75 mM NaCl.

9. Inmunoprecipitación de proteínas y análisis del nivel de expresión y de actividad de los inmunoprecipitados.

Se cultivaron 4×10^6 células T-FGM-*AhR*^{+/+} y T-FGM-*AhR*^{-/-}. Las placas de cultivo fueron lavadas dos veces en frío con PBS y lisadas y levantadas mecánicamente en 1 ml de tampón de lisis específico para cada experimento (listados al final del apartado). Tras una incubación de 30 min a 4°C con agitación, se centrifugó a 14000 g durante 15 min a 4°C. Se recogió el sobrenadante y se cuantificó la concentración de proteína como se ha indicado anteriormente. Alícuotas de entre 700 y 1000 µg de proteína total, en un volumen de 1 ml, se pre-incubaron con 25 µl de proteína A/G plus agarosa (Santa Cruz) por 2 h con agitación a 4°C. Tras centrifugar, el sobrenadante se incubó durante 16 h a 4°C con el anticuerpo primario frente a la proteína diana. Tras ello, se añadieron 25 µl adicionales de proteína A/G plus agarosa a cada mezcla de extracto y anticuerpo y la incubación continuó durante 2 h adicionales. Los inmunoprecipitados se centrifugaron durante 1 min a 14000 g y el sobrenadante fue guardado como control de proteína no unida. El precipitado de proteína A/G plus agarosa fue sometido a 4 lavados en tampón 50 mM Tris-HCl a pH 7.4, 150 mM NaCl. Las proteínas inmunoprecipitadas fueron finalmente analizadas por Western blotting. Como controles se emplearon extractos celulares totales de cada genotipo, así como los sobrenadantes de extracto no unidos.

Los anticuerpos utilizados para la precipitación están listados en la tabla M.II, al final del apartado de materiales y métodos.

Lista de tampones usados:

- **Co-inmunoprecipitación de caveolina 1 y AhR:** 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 125 mM NaCl, 2 mM DTT, 0.05 mM EGTA, 1 mM PMFS, 60 mM OG y 4 µg/ml del inhibidor de proteasas Complete
- **Co-inmunoprecipitación de de integrina β1 y talina:** Buffer RIPA: 50mM Tris HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS y 4 µg/ml de Complete.
- **Inmunoprecipitaciones de fosfoproteínas:** 10mM Tris-HCl pH 8, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 60 mM OG, 0.1mM Na₃VO₄, 50mM NaF, 30 mM Na₄P₂O₇ y 4 µg/ml de Complete.

10. Extracción y separación de proteínas nucleares y citoplásmicas

Al menos 10^6 células T-FGM-AhR+/+ fueron lavadas, levantadas en PBS a 4°C y centrifugadas a 14000 g durante 30 seg a 4 °C. Tras ello, se resuspendieron en 150 μ l de tampón A durante 10 min a 4 °C y se centrifugaron por segunda vez en las mismas condiciones. Este último sobrenadante fue centrifugado y resuspendido una vez más, y se almacenó como la fracción de proteínas citoplasmáticas. El precipitado de la segunda centrifugación fue resuspendido en tampón A y centrifugado dos ciclos más, para evitar contaminación por restos de citoplasma. Tras ello, se resuspendió en tampón B por 30 min a 4 °C. Durante este tiempo se sometió a la muestra a ciclos de 30 seg de sonicación interrumpidos por 2 minutos de incubación en hielo hasta la disolución total de la proteína precipitada. Por último, se realizó una centrifugación a 14000 g durante 30 min a 4 °C y se recogió el sobrenadante, considerado la fracción nuclear. A continuación se realizó un Western-blot para comprobar la presencia relativa de proteínas en cada fracción, utilizando un anticuerpo contra la subunidad catalítica de la RNA pol III (cedido por el laboratorio del Doctor Robert White) como control de fracción nuclear y otro contra Gapdh (Cell Signaling) como control de la fracción citoplásmica.

Tampones utilizados:

- **Tampón A:** Utilizando PBS como solvente, 0.5mM DTT, 0.2mM PMSF, 0.05% Igepal y 4 μ g/ml de Complete.
- **Tampón B:** Utilizando PBS como solvente, 150mM NaCl, 0.5mM DTT, 0.2mM PMSF, 0.2mM EDTA, glicerol al 25% y 4 μ g/ml de Complete.

11. Aislamiento de Rafts de membrana plasmática mediante gradiente discontinuo de sacarosa.

Fibroblastos T-FGM-AhR+/+ y AhR-/- y células de hepatoma Hepa 1c1c7 fueron crecidas durante 48 h en placas de 100 mm o de 150 mm dependiendo de las condiciones de cada experimento. Todo el protocolo se realizó sobre hielo o a 4°C. Las placas fueron lavadas dos veces con PBS frío y las células se levantaron con raspador en 1 o 2 ml de PBS. Tras centrifugación durante 5 min a 200 g y 4°C, el pellet fue resuspendido en 500 μ l de tampón de lisis TNE-Tritón (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 0.25% Tritón X-100 y 4 μ g/ml Complete). El lisado fue homogeneizado realizando 15 pases a través de una jeringa de 1 ml con aguja de 25G e incubado con

agitación leve a 4°C durante 30 min. Se separó una alícuota de 50 μ l como lisado total y el resto se mezcló con 500 μ l de sacarosa a una concentración de 85 g/100 ml en TNE. Tras una homogeneización suave de la mezcla, esta se depositó en un tubo de ultracentrífuga ultraclear 11 x 60 mm (Beckman). A continuación, se superpusieron 2,3 ml de sacarosa a una concentración de 35 g/100 ml y 0,7 ml de sacarosa a 16 g/100 ml. Los tubos fueron introducidos en un rotor vasculante SW-60 (Beckman) y centrifugados durante 16 h a 45000 rpm y 4°C. Se recogieron cuidadosamente 12 fracciones de 330 μ l cada una que fueron analizadas por Western-blotting.

12. Ensayos de citometría.

12.1 Ensayo de activación y de presencia de integrina β 1.

Las células fueron crecidas durante 48 h en medio completo.. Se realizaron dos prelavados con PBS-EDTA 2mM y se procedió a su levantamiento por incubación con PBS-EDTA durante 10-20 min. A continuación, las células se lavaron con medio de cultivo, se centrifugaron y se resuspendieron en PBS conteniendo BSA al 0,5% a razón 3×10^5 células por condición. En ciertos experimentos se incluyó $MnCl_2$ como estímulo activador de la integrina a concentraciones de entre 0.5 y 2 mM. Tras una incubación de 10 min en hielo con el fin de bloquear y de permitir la actuación del $MnCl_2$ en los casos necesarios, se añadió el anticuerpo frente a integrina β 1 activa antiCD29 (9EG7) (Pharmigen) diluido 1:100 en PBS+BSA al 0.5%. En muestras paralelas se adicionó el anticuerpo frente a integrina β 1 total anti β 1-FITC (Millipore) diluido 1:200 durante 30 min. Las células fueron lavadas dos veces con PBS o PBS con $MnCl_2$ 0.5 mM en las condiciones que incluían dicho estímulo. En el caso del ensayo de activación, se procedió al marcaje de las células durante 30 min en oscuridad con un anticuerpo antiRat- Alexa 488 (Sigma) a una dilución 1:200. Tras lavar el exceso de anticuerpo dos veces, las células fueron finalmente resuspendidas en 500 μ l de PBS y se les añadió yoduro de propidio a 1 mg/ml para discriminar las células muertas. El análisis se llevó a cabo en un citómetro FC500 (Beckman-Coulter). Se contabilizaron 10000 células por ensayo y se cuantificó la intensidad media de señal de cada población (X-mean). Los resultados fueron representados con el programa *GraphPad Prism 6.0*.

Los anticuerpos utilizados se muestran en la tabla M.II, al final del apartado de materiales y métodos.

12.2 Ensayo de unión a fibronectina soluble.

Las células fueron levantadas como en el ensayo anterior, resuspendidas en HBSS con FBS al 2% e incubadas con MnCl_2 1 mM en los casos necesarios. Tras ello, se realizó una incubación con el fragmento soluble de 80 KDa de fibronectina (cedido por el laboratorio de la Doctora M^a Angeles García Pardo) a 10 $\mu\text{g/ml}$ durante 5 min a 37°C. A continuación, se llevó a cabo un lavado del exceso de fibronectina y se añadió el anticuerpo anti-fragmento de 80 KDa de fibronectina (cedido por el laboratorio de la Doctora M^a Angeles García Pardo) durante 30 min a 4°C. Por último se utilizó un anticuerpo secundario Alexa 647 (Invitrogen) contra conejo y se realizó la tinción con Yoduro de propidio y el análisis en condiciones similares a las del apartado anterior.

12.3 Cuantificación del nivel de colesterol celular.

Los fibroblastos T-FGM-*AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} crecidos en medio completo fueron levantados con tripsina-EDTA, lavados con PBS y fijados con 3,5% paraformaldehído (PFA) durante 10 min a temperatura ambiente. Tras ello, se procedió a incubar con Filipin III (Sigma) a 5 $\mu\text{g/ml}$ durante 30 min a temperatura ambiente. Además, se realizó una tinción con yoduro de propidio para separar apropiadamente células del debris en el análisis citométrico. Éste se realizó en un equipo Mo-Flo XDP (Beckman-Coulter) equipado con láser UV de 355 nm, recogiendo la emisión de fluorescencia a 420 nm. Se analizaron 10^4 células por experimento y se obtuvieron los correspondientes perfiles de fluorescencia.

13. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

Se partió de células T-FGM-*AhR*^{+/+} crecidas en una placa de 100 mm y a una confluencia del 80%. Las células se lavaron con PBS y se incubaron con formaldehído al 1% en PBS durante 15 min a temperatura ambiente con agitación leve, lo que permite la estabilización de las uniones de las proteínas al DNA. La reacción de entrecruzamiento proteína-DNA se detuvo añadiendo 0.125 M glicina durante 5 min. A continuación, se retiró el medio de reacción y las células se lavaron 2 veces con PBS frío, tras lo cual se procedió al levantado mecánico de las mismas y a su recuperación en tubos de PBS conteniendo el inhibidor de proteasas Complete (4 $\mu\text{g/ml}$). Las suspensiones celulares se centrifugaron a 500 g durante 5 min a 4 °C para eliminar el

PBS. Las células se resuspendieron en tampón de lisis-SDS conteniendo inhibidores de proteasas (200 μ l por condición) y se incubaron durante 10 min a 4 °C.

Los lisados celulares resultantes fueron sonicados durante 30 minutos a 4 °C en un equipo Bioruptor (Diagenode) a máxima potencia con ciclos de 0.5 min sonicación/0.5 min reposo. Los fragmentos de DNA obtenidos (de un tamaño comprendido entre 200 y 1.000 bp) se centrifugaron durante 10 min a 13.000 *g* a 4°C. Se recogió el sobrenadante y se midió la concentración de DNA. Se tomaron alícuotas de 100-150 μ g de cromatina por inmunoprecipitación y su volumen se diluyó diez veces con tampón de dilución ChIP conteniendo inhibidores de proteasas. Las muestras se pre-incubaron durante 45 min a 4 °C con agitación suave en presencia de proteína A/G plus agarosa para reducir las uniones inespecíficas. Tras centrifugar durante 5 min a 2.000 *g*, se añadió a los sobrenadantes el anticuerpo específico contra AhR (Immunostep, 2-3 μ g) y se incubaron durante toda la noche a 4 °C con rotación suave. Como control negativo se realizaron incubaciones en ausencia de anticuerpo primario y como control positivo se utilizaron alícuotas de extractos previas a su incubación con anticuerpo primario (DNA total o DNA input).

Tras añadir una nueva alícuota de proteína A/G plus agarosa, se realizó una incubación adicional de 1 h a 4 °C con agitación. Las muestras se centrifugaron entonces a 2.000 *g* durante 1 min a 4 °C. Los precipitados conteniendo los complejos anticuerpo-DNA-proteína A/G plus agarosa se lavaron durante 5 min con los siguientes tampones: tampón de lavado de baja fuerza iónica, tampón de lavado de alta fuerza iónica, tampón de lavado conteniendo LiCl y tampón TE (2x). Tras estos lavados, los complejos DNA-proteína se liberaron de la proteína A/G plus agarosa con tampón de elución (200 μ l por condición) durante 15 min con agitación, y fueron posteriormente centrifugados a 2.000 *g* durante 1 min. El proceso se repitió una vez más y todos los eluidos se combinaron en un mismo tubo. A continuación se incubó durante 4 h a 65 °C en NaCl 200 mM para romper los entrecruzamientos DNA-proteína y liberar el DNA, incorporándose también en este paso los DNA inputs separados anteriormente. Para eliminar las proteínas, las muestras se incubaron durante 1 h a 45 °C en 40 mM Tris HCl pH 6.5, 10 mM EDTA y 40 μ g/ml de proteinasa K (Roche). Finalmente, el DNA fue purificado usando columnas NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel) y el tampón NTB (Macherey-Nagel), que está diseñado para la purificación de muestras que contengan SDS. El análisis de la unión se hizo mediante PCR convencional.

Se investigaron tres sitios XRE presentes en el promotor del gen murino *Cbp/Pag1*, los cuales fueron identificados analizando la secuencia consenso de unión

de AhR 5'-GCGTG- 3' en la región promotora de dicho gen. El identificado como XRE 1 localiza su secuencia en NCBIM37:3:9833602:9833606 (Ensembl). El identificado como XRE 2 se localiza en NCBIM37:3:9833663:9833667. El tercer XRE fue localizado en la posición NCBIM37:3:9834303:9834307. Éste último fue obtenido del análisis de los resultados del grupo de Zacharewski (Dere et al. 2011), donde se describe que la secuencia que contiene este XRE está enriquecida en ensayos CHIP on Chip realizados en hígado de ratón tras tratamiento con TCDD.

Lista de tampones utilizados:

- **Tampón de lisis-SDS:** 50 mM Tris-HCl pH 8.1, 1% SDS, 10 mM EDTA.
- **Tampón de dilución CHIP:** 6.7 mM Tris-HCl pH 8.1, 0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 167 mM NaCl.
- **Tampón de lavado de baja fuerza iónica:** 120 mM Tris-HCl pH 8, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl.
- **Tampón de lavado de alta fuerza iónica:** 120 mM Tris-HCl pH 8, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 500 mM NaCl
- **Tampón de lavado con LiCl:** 10 mM Tris-HCl pH 8.1, 0.25 M LiCl, 1% NP40, 1% deoxicolato sódico, 1 mM EDTA.
- **TE:** 10 mM Tris-HCl pH 8, 0, 1 mM EDTA.
- **Tampón de elución:** 1% SDS, 0.1 M NaHCO₃.

Tabla M.II. Listado y características de los anticuerpos utilizados en el estudio.

Anticuerpos primarios utilizados en <i>Western blot</i>			
Proteína	Marca	Dilución	Huésped
Actin	Sigma	1:2000	Conejo
AhR	Santa Cruz	1:600	Cabra
AhR	Immunostep	1:1000	Conejo
Cav1	BD	1:2000	Conejo
Cav1 Y14	BD	1:600	Conejo
c-Src	Santa Cruz	1:500	Ratón
c-Src Y416	Santa Cruz	1:250	Ratón
c-Src Y527	Santa Cruz	1:250	Ratón
c-Src Y527	Santa Cruz	1:250	Ratón
Csk	Santa Cruz	1:500	Ratón
Fibronectina 80KDa	Cedido por MAGP	1:2000	Conejo
Integrina β 1 clon MB1.2 (Rat, Millipore)	Millipore	1:1000	Rata
Talina	Sigma	1:1000	Ratón
Cbp/pag1	Exbio	1:600	Conejo
Anticuerpos primarios utilizados en inmunofluorescencia			
AhR	Biomol	1:50	Conejo
AhR	AbR	1:100	Ratón
Caveolina 1	BD	1:200	Conejo
FAK	BD	1:50	Conejo
Fibronectina 80KDa	Cedido por MAGP	1:500	Conejo
Talina	Millipore	1:100	Ratón
Anticuerpos primarios utilizados en citometría			
Integrina β 1-FITC	Biologend	1:200	Rata
Integrina β 1 (9EG7)	BD	1:100	Rata
Fibronectina 80KDa	Cedido por MAGP	1:200	Conejo
Anticuerpos primarios utilizados en inmunoprecipitación			
Proteína	Marca	Cantidad	Huésped
Caveolina 1	BD	2 μ g	Conejo
Integrina β 1 clon MB1.2 (Rat, Millipore)	Millipore	2 μ g	Rata
Cbp/pag1	Exbio	4 μ g	Conejo
c-Src	Santa Cruz	4 μ g	Ratón

RESULTADOS

CAPÍTULO I:

INTERACCIÓN CON INTEGRINA $\beta 1$

El receptor de dioxina modula migración direccional

Estudios anteriores de nuestro laboratorio habían puesto de manifiesto la inferior capacidad de migración de fibroblastos carentes de AhR (Mulero-Navarro et al. 2005; Carvajal-Gonzalez et al. 2009). Sin embargo, en dichos estudios no se analizó si el defecto era debido a problemas en la orientación celular que impidieran una migración dirigida. Así, decidimos comenzar nuestro estudio realizando un análisis individualizado de la migración direccional de fibroblastos T-FGM-*AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} utilizando cámaras de quimiotaxis tapizadas con una baja concentración de fibronectina y utilizando como atrayente suero fetal bovino (FBS). A fin de confirmar la implicación de AhR en el proceso, se añadió una tercera condición experimental en la que se llevó a cabo el silenciamiento transiente de la expresión de AhR en células silvestres utilizando un siRNA específico

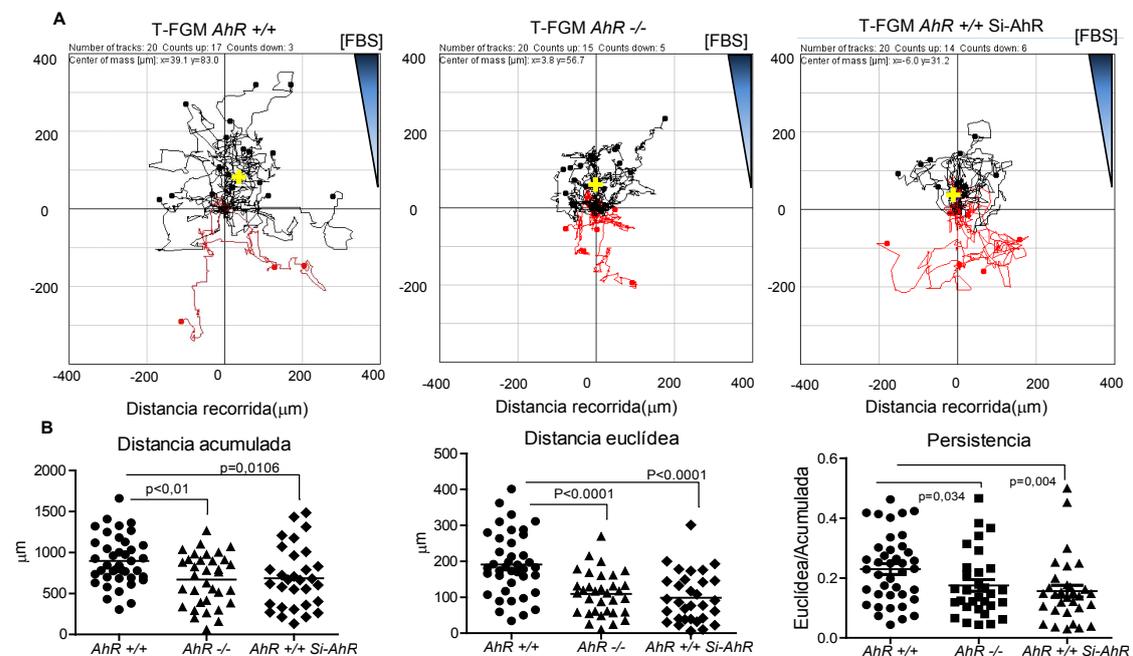


Figura RI.1. AhR regula la migración direccional de fibroblastos T-FGM. **(A)** Fibroblastos T-FGM-*AhR*^{+/+}, *AhR*^{-/-} o *AhR*^{+/+} fueron sembrados dentro de cámaras de quimiotaxis “ibidi μ-slide” tapizadas con FN 0,5 μg/ml y observadas en un microscopio de célula viva con el fin de determinar la migración direccionada de cada línea celular. Se utilizó como estímulo de migración FBS en la cámara superior (eje Y), frente a medio sin suero en la inferior. El movimiento de cada célula fue seguido y representado en un gráfico (ejes X e Y expresados en mm) en el que el punto central corresponde con el inicio de la migración de cada células analizadas. Se representaron en negro las células que migraron positivamente en el eje Y (hacia el estímulo) y en rojo las de tuvieron migración negativa (opuesta al estímulo). El centro de masa final está representado por una cruz azul. **(B)** Se analizó la distancia acumulada recorrida por cada célula, así como la distancia euclídea y la relación entre ambas para cada célula. Los datos experimentales así como las medias resultantes fueron representados y analizados estadísticamente utilizando *GraphPad Prism 6.0*.

Tras un seguimiento de 16 h en el microscopio de célula viva, los movimientos decada célula fueron registrados y cuantificados utilizando herramientas del programa *Image J* (Figura RI.1A). Se analizó la distancia total recorrida por cada célula (distancia acumulada) así como la distancia efectiva (distancia euclídea) (Figura RI.1B).

Los fibroblastos carentes de AhR mostraron una menor capacidad de migración tanto acumulada como euclídea con respecto a la de los fibroblastos *AhR*^{+/+}, con un centro de masa final del conjunto de células más alto en el eje vertical (cruz amarilla en 1A). Se calculó la relación distancia euclídea/acumulada a fin de comprobar la eficiencia o persistencia en el movimiento de cada genotipo, y los datos mostraron que la presencia de AhR favorece una migración más efectiva, consiguiendo índices mayores de persistencia que en el resto de condiciones (Figura RI.1B, derecha). En cuanto a la capacidad de respuesta al suero, se observó que la tendencia a migrar en la dirección del estímulo (trayectorias representadas en negro) fue ligeramente superior en las células silvestres que en las células carentes de AhR, aunque las diferencias encontradas no fueron realmente significativas. Coherentemente, la reducción de los niveles de AhR por transfección de un siRNA (Figura M.I) en fibroblastos T-FGM-*AhR*^{+/+} revertió el fenotipo migratorio de estas células hacia uno similar al mostrado por los fibroblastos *AhR*^{-/-}, lo que apoya el papel de este receptor en el mecanismo.

Los fibroblastos *AhR*^{-/-} presentan mayor adhesión a fibronectina a tiempos cortos.

Tras analizar el efecto de la expresión de AhR en migración direccional, quisimos

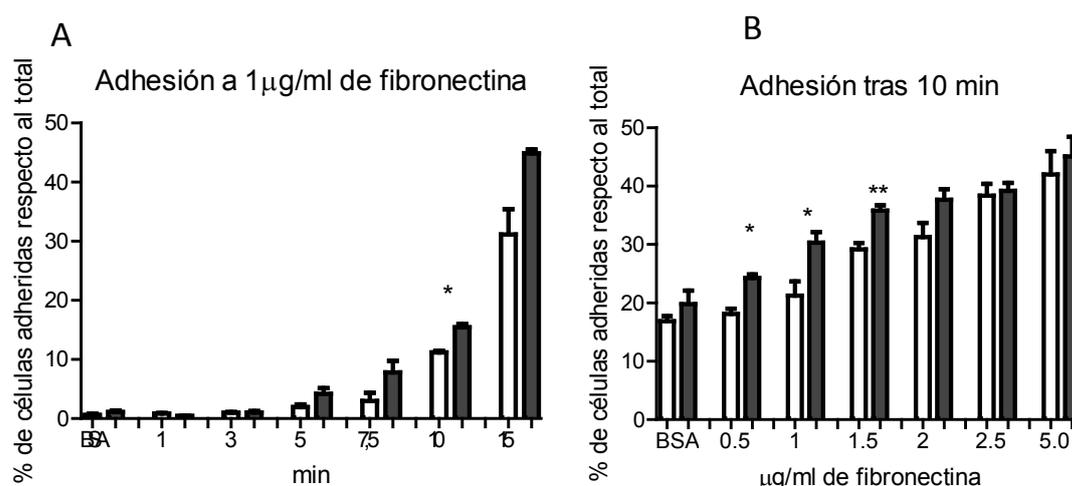


Figura RI.2. Los fibroblastos carentes de receptor de dioxina poseen mayor capacidad adhesiva a fibronectina a tiempos cortos. Células T-FGM-*AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} fueron sembradas sobre plástico tapizado con fibronectina y se comparó su capacidad de unión al ligando. El número de células adheridas por condición fue cuantificado en base a la emisión fluorescente de la sonda BCECF-AM ligado a las células. La media y la desviación estándar fueron representadas con *GraphPad Prism* 6.0 y se analizaron estadísticamente las diferencias entre genotipos. (A) Se observó la capacidad de unión en función del tiempo sobre matrices conteniendo 1mg/ml de fibronectina. (B) Se observó la unión a un tiempo definido de 10 minutos sobre matrices compuestas por fibronectina a concentraciones entre 0,5 y 5 µg/ml. Las barras blancas y negras corresponden a fibroblastos T-FGM-*AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-}, respectivamente.

comprobar qué papel juega la maquinaria de adhesión celular en dicho proceso y, en concreto, la relevancia de las integrinas dado que trabajos previos del laboratorio habían mostrado la mayor capacidad adhesiva de las células carentes del receptor de dioxina a matrices conteniendo fibronectina (Carvajal-Gonzalez *et al.* 2009), un ligando típico de ciertas familias de integrinas. Consideramos como parámetros más relevantes analizar el papel del receptor en adhesión temprana y a concentraciones más bajas de ligando, donde el estado de activación de las integrinas juega un importante papel en adhesión celular. Los resultados mostraron que los fibroblastos T-FGM-*AhR*^{-/-} tienen una mayor capacidad de adhesión a fibronectina, que es más acusada a tiempos cortos de entre 5 y 10 minutos (Figura RI.2A) y a bajas concentraciones de ligando de entre 0,5 y 2 $\mu\text{g/ml}$ ((Figura RI.2B).

La integrina $\beta 1$ está sobreactivada en T-FGM en ausencia de AhR.

Basándonos en estos resultados, y teniendo en cuenta que la integrina $\beta 1$ es conocida como el principal receptor de fibronectina en fibroblastos, nos decidimos a analizar la expresión (presencia en membrana) y el estado basal de activación de integrina $\beta 1$ en nuestras líneas de fibroblastos T-FGM. No se obtuvieron diferencias significativas entre ambos genotipos en los niveles de proteína total expresada tal como se observó por Western-blot (Figura RI.3B), ni tampoco en su presencia en la membrana determinada mediante citometría de célula viva utilizando el anticuerpo policlonal ligado a fluoróforo $\beta 1$ -FITC (Figura RI.3A, izquierda). Sin embargo, al analizar por citometría la exposición del dominio extracelular de activación de la integrina $\beta 1$, utilizando el anticuerpo monoclonal 9EG7, se observó una fuerte sobre-activación de la integrina en los fibroblastos T-FGM-*AhR*^{-/-} en estado basal (Figura RI.3A, centro), lo que aporta una posible causa al fenotipo adhesivo de las células *AhR*^{-/-}. También se analizó la capacidad total de activación de las integrinas en ambos genotipos utilizando como estímulo de activación MnCl_2 . Se observó que las integrinas $\beta 1$ de ambos genotipos poseen un potencial de activación similar (Figura RI.3A, centro). Para demostrar el papel causal del receptor en el control de la activación de la integrina $\beta 1$ se realizó un experimento de rescate del fenotipo silvestre transfectando un vector de expresión de AhR en células *AhR*^{-/-}. Con respecto a las células transfectadas con el vector vacío (V.V.), las células rescatadas disminuyeron su estado de activación de integrina $\beta 1$ basalmente, sin que se viera afectada la capacidad total de activación por MnCl_2 (Figura RI.3A, derecha).

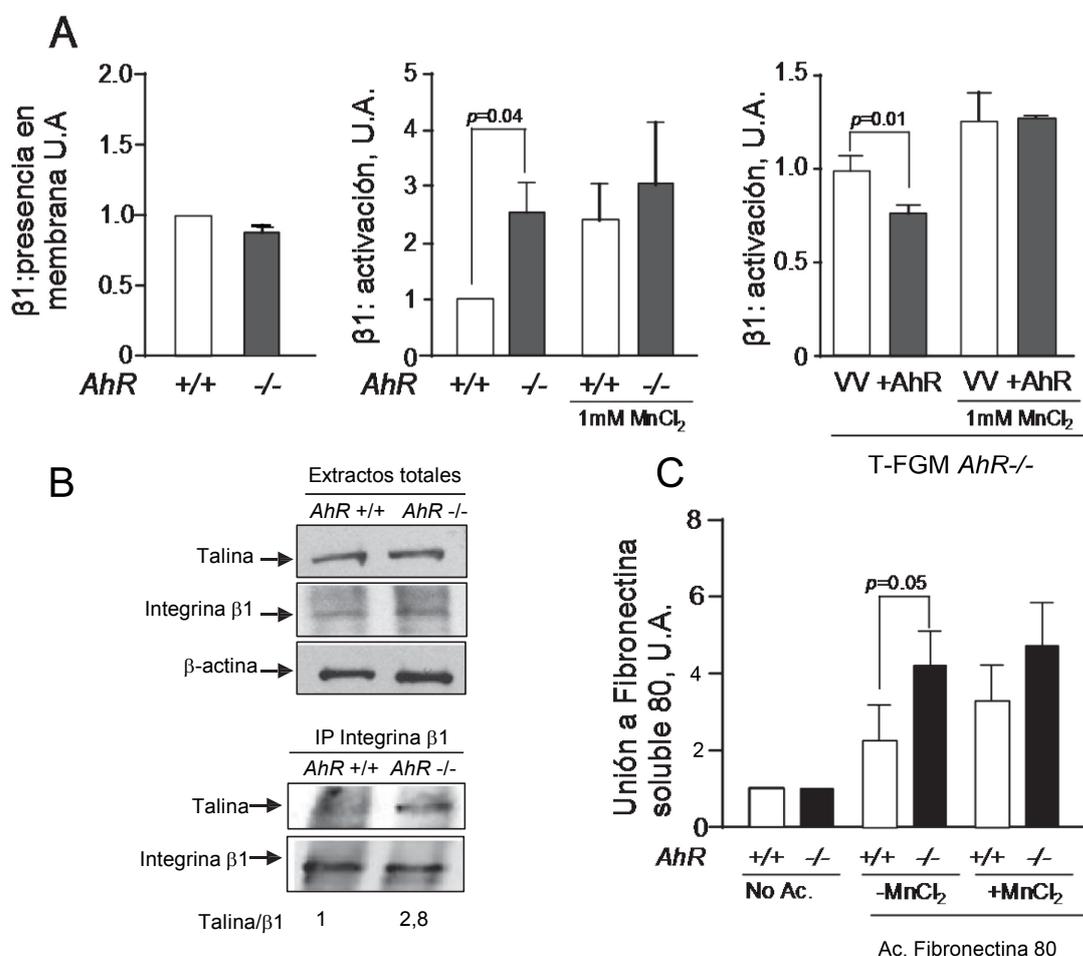


Figura RI.3. Las células T-FGM carentes de AhR tienen sobre-activación de la integrina β1. **(A)** Células T-FGM *AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} fueron levantadas e incubadas con un anticuerpo para observar la integrina β1 total presente en membrana (β1-FITC) (izquierda) o la conformación activa de la misma (9EG7), en ausencia o presencia de MnCl₂, (centro). Se analizaron 10⁴ células por condición y se calculó el valor medio de la intensidad de fluorescencia utilizando una condición sin anticuerpo primario como control negativo. (Derecha) La expresión de AhR fue rescatada mediante la transfección de un vector de expresión en fibroblastos T-FGM-*AhR*^{-/-} y se analizó el nivel de activación de integrina β1; la transfección del vector vacío se empleó como condición basal (derecha). **(B)** Se compararon los niveles de proteína de integrina β1 y de talina por Western-blot en células T-FGM-*AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-}, (izquierda). Además, se llevó a cabo una inmunoprecipitación de integrina β1 y se observó la co-inmunoprecipitación de talina por Western-blot, (centro). **(C)** Los fibroblastos T-*hR*^{+/+} y *AhR*^{-/-}, previamente levantados de la placa de cultivo, fueron incubados 5 minutos con 10 μg/ml de fragmento soluble fibronectina-80, lavados e incubados con anti-fibronectina-80 en ausencia y presencia de MnCl₂. Posteriormente se realizó el análisis citométrico de 10⁴ células y los valores medios de intensidad fueron representados y comparados, utilizando una condición sin anticuerpo primario como control negativo.

Con el fin de demostrar la funcionalidad del estado activado de la integrina observado por citometría, se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación entre integrina β1 y talina, ya que la unión entre estas proteínas está asociado al inicio y al mantenimiento de la cascada de señalización que da lugar a la unión de la integrina al ligando extracelular. Los experimentos realizados mostraron que integrina β1 y talina se encuentran más asociadas en células T-FGM-*AhR*^{-/-} de manera basal, y que esta asociación no se debe a una posible sobre-expresión de talina (Figura RI.3B). Por otra

parte, se realizó un ensayo de avidéz que cuantificó la predisposición de la célula a unir sustrato cuando se utiliza como ligando el fragmento soluble de 80 KDa de la fibronectina, el cual contiene el dominio RGD de unión a integrina $\beta 1$. En este ensayo, los fibroblastos carentes del receptor unieron más fibronectina soluble que sus homólogos *AhR*^{+/+} (Figura RI.3C), apoyando fuertemente los datos de sobre-activación obtenidos. Ante la estimulación química con $MnCl_2$ ambos genotipos mostraron una capacidad similar de unión (Figura RI.3C).

La carencia de AhR en células T-FGM provoca la sobre-expresión de fibronectina y ésta es, en parte, responsable de la sobre-activación de la integrina $\beta 1$.

Teniendo en cuenta el papel de la matriz extracelular como agente necesario en la adopción de un estado activado en las integrinas, junto con datos previos de nuestro laboratorio que indicaban un exceso de fibronectina en el cierre de heridas en la piel de ratones *AhR*^{-/-} (Carvajal-Gonzalez et al. 2009), decidimos comprobar si el fenotipo observado se debía a un exceso en la generación de este componente de la matriz extracelular. Así, analizamos los niveles de mRNA, los niveles de proteína intracelular en lisados totales y la generación de fibras de fibronectina en las matrices generadas por las células en cultivo (Figura RI.4). La cuantificación mediante PCR a tiempo real de la expresión del gen que codifica para *fibronectina1* mostró que los fibroblastos T-FGM-*AhR*^{-/-} sobre-expresaban el RNA mensajero para dicho gen (Figura RI.4A),

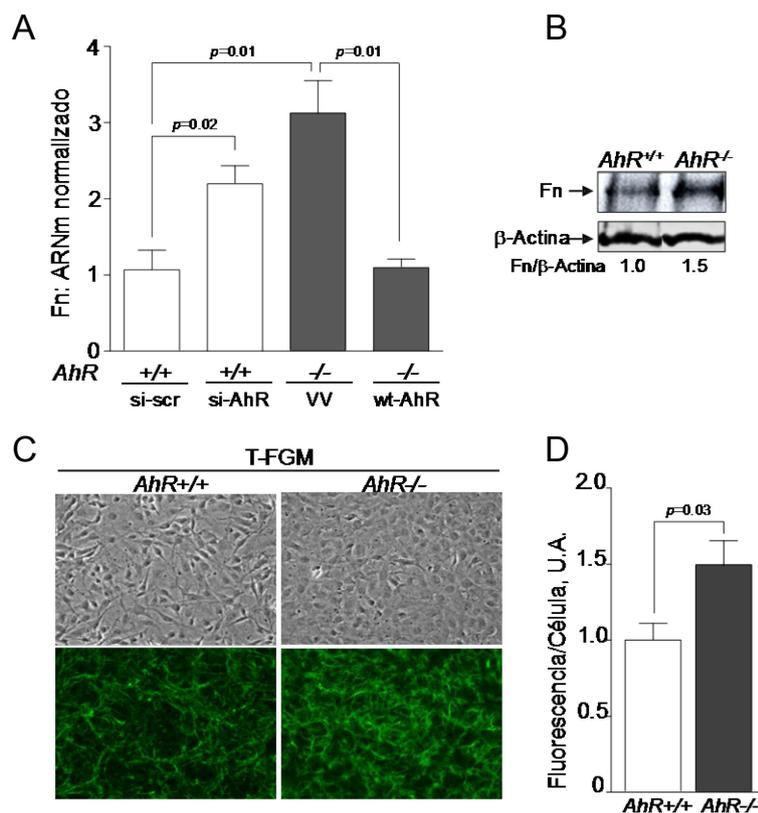


Figura RI.4. La ausencia de expresión de AhR provoca la sobre-expresión de fibronectina en células T-FGM. (A) Se analizó la expresión del mRNA de fibronectina por PCR a tiempo real en células T-FGM-*AhR*^{+/+} transfectadas con un siRNA aleatorio o "scramble" (si-scr) o uno específico para AhR (si-AhR), así como en células *AhR*^{-/-} transfectadas con un vector vacío (V.V) o uno de expresión de AhR (wt-AhR). Se utilizó *Gapdh* para normalizar la expresión de *fibronectina1*. **(B)** Los niveles proteicos de fibronectina fueron comparados en células *AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} mediante Western-blot utilizando como control β -actina. La cuantificación y normalización se realizó digitalmente. **(C)** Células T-FGM de ambos genotipos fueron crecidas sobre cristales durante 48 h y se realizó una tinción inmunofluorescente para detectar la fibronectina depositada extracelularmente. **(D)** Se realizó una cuantificación digital de la fluorescencia media y se normalizó al número de células por campo. Las diferencias se analizaron estadísticamente y representaron con GraphPad Prism 6.0..

Coherentemente, el silenciamiento de AhR por transfección con un siRNA específico en células T-FGM silvestres, provocó una subida significativa en la expresión del gen (Figura RI.4A). De manera opuesta, la expresión ectópica de AhR mediante un vector de expresión en células *AhR*^{-/-} provocó un descenso significativo en los niveles de mRNA de *fibronectina* hasta valores similares a los presentes en las células *AhR*^{+/+} (Figura RI.4A). Así, la expresión de *fibronectina1* parece estar controlada por AhR. Sin embargo, cabía la posibilidad de que esta sobre-expresión de mensajero no se tradujera en una mayor presencia de la proteína en la matriz extracelular. Para analizar esta posibilidad realizamos tanto ensayos de Western-blot como de inmunofluorescencia. Observamos que las células *AhR*^{-/-} presentaban niveles elevados de la proteína con respecto a fibroblastos *AhR*^{+/+} (Figura RI.4B). Adicionalmente, la fibronectina presente en las matrices generadas por células T-FGM-*AhR*^{-/-} mostraba una mayor densidad y una organización más compleja que la de los fibroblastos silvestres (Figura RI.4C), demostrando que la sobre-expresión de fibronectina probablemente afecta a la organización física de la matriz extracelular, y que el receptor de dioxina es importante en el mantenimiento de una composición apropiada de la misma. Los datos fueron cuantificados obteniéndose un aumento próximo al 50% en la intensidad de señal por célula (Figura RI.4D).

Una vez analizado el efecto de AhR sobre la expresión de fibronectina, quisimos comprobar la relevancia del mismo en el control de la activación de integrina $\beta 1$. Así, realizamos un ensayo de intercambio de matrices, el cual consiste en la observación del comportamiento celular de nuestros fibroblastos ante la interacción con la matriz extracelular generada por células de su mismo genotipo o del genotipo opuesto.

Así, crecimos durante 5 días células T-FGM-*AhR*^{+/+} o *AhR*^{-/-} en medio completo en presencia de ácido ascórbico, un inhibidor de la degradación de la matriz extracelular. Tras ello, extrajimos las células utilizando tritón a baja concentración, manteniendo, tras varios lavados, la matriz generada adherida al plástico. Se sembraron células provenientes de cultivos paralelos y se permitió su adhesión durante 2 horas. Cada línea de T-FGM fue sembrada en su misma matriz y en la generada por el genotipo opuesto y se analizaron cambios en el nivel de activación de integrina $\beta 1$.

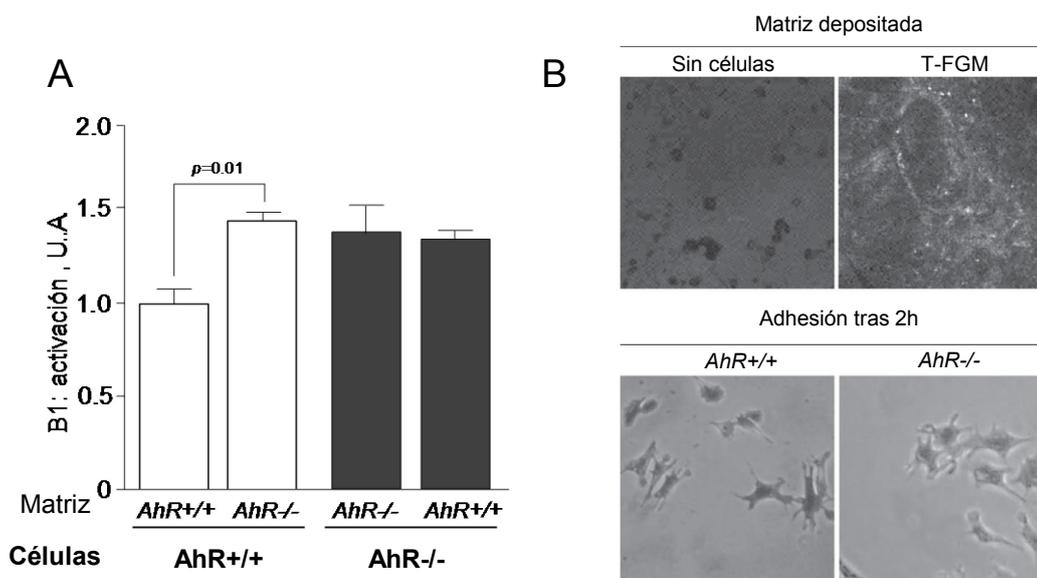


Figura RI.5. La matriz generada por los fibroblastos T-FGM-*AhR*^{-/-} provoca en parte la sobre-activación de integrina β 1. **(A)** Células T-FGM-*AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} fueron sembradas e incubadas durante 2 h sobre matrices generadas por células de su propio genotipo o del genotipo opuesto tras 5 días en cultivo. Tras la incubación, las células fueron procesadas para analizar la activación de integrina β 1 mediante un ensayo de citometría empleando el anticuerpo 9EG7. **(B)** Ensayos control del experimento: La parte superior muestra una inmunofluorescencia realizada en plástico tras el levantamiento de las células con TritónX-100 que permite apreciar la fibronectina depositada tras el proceso (panel derecho). La parte inferior de la figura muestra la adhesión realizada sobre plástico por fibroblastos T-FGM tras 2 h de incubación.

De manera previa se realizaron ensayos para elegir un intervalo de tiempo que permitiera la adhesión y la extensión de los fibroblastos T-FGM, sin que la generación de nueva matriz difuminara el efecto de la subyacente. El tiempo elegido fue de 2 h (Figura RI.5B). Otros controles realizados comprobaron la estabilidad de la matriz extracelular tras el tratamiento con detergente.

Los resultados mostraron que la siembra de fibroblastos *AhR*^{+/+} sobre matrices generadas por células *AhR*^{-/-} provocó una mayor activación de la integrina β 1 medida por citometría utilizando el anticuerpo monoclonal 9EG7 (Figura RI.5A). Este efecto apoya el papel de la composición de la matriz extracelular generada por células carentes de AhR en la sobre-activación de la integrina β 1. En cuanto al experimento opuesto, la exposición de células T-FGM *AhR*^{-/-} a matrices generadas por fibroblastos *AhR*^{+/+} no provocó un efecto significativo en el nivel de activación de la integrina β 1, indicando que quizás el efecto de la matriz no es suficiente para recuperar el fenotipo silvestre, y abriendo la posibilidad de que otras rutas de señalización puedan estar implicadas en el mismo.

La quinasa c-Src se encuentra inhibida en células T-FGM-AhR^{-/-} por la sobre-activación de Csk.

El proto-oncogén c-Src está relacionado con las integrinas en el control de la respuesta celular a procesos de adhesión y de migración. Trabajo previo realizado en nuestro laboratorio mostró que c-Src se encuentra inactivado en fibroblastos carentes de AhR posiblemente por la hiperfosforilación de su residuo inactivador Y⁵²⁷ y la hipofosforilación del residuo activador Y⁴¹⁶ (Carvajal-Gonzalez, J.M. Tesis Doctoral, 2008). Decidimos comprobar, en primer lugar, si la menor actividad c-Src descrita en células T-FGM-AhR^{-/-}

(en base a los resultados de fosfo Y⁴¹⁶/fosfo Y⁵²⁷) tenían consecuencia funcional. Para ello realizamos co-inmunoprecipitaciones de c-Src con una de sus dianas clásicas, la proteína de membrana caveolina 1 (Figura

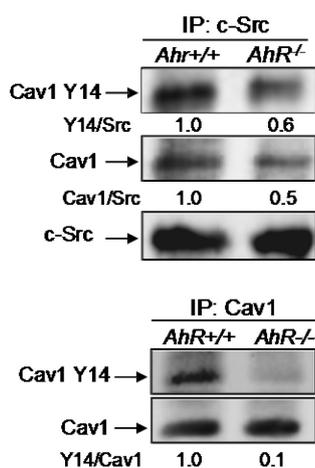


Figura RI.6. c-Src se asocia y fosforila menos a Cav1 en células T-FGM AhR^{-/-}. Se realizaron inmunoprecipitaciones en lisados celulares de fibroblastos T-FGM-AhR^{+/+} y AhR^{-/-} utilizando un anticuerpo contra c-Src y revelando para la propia c-Src, para Cav1 y para su forma fosforilada en la Y¹⁴. En la parte inferior, se inmunoprecipitó con un anticuerpo contra Cav1 total y se reveló para Cav1 total y para su forma Cav1 Y¹⁴. En ambos casos se cuantificaron las bandas y se normalizaron las intensidades con respecto a la proteína inmunoprecipitada.

RI.6). Observamos que la asociación entre ambas proteínas era inferior en fibroblastos AhR^{-/-} y que esto tenía lugar conjuntamente con un descenso significativo en la fosforilación de caveolina 1 en su residuo Y¹⁴, (Figura RI.6, debajo). Estos datos confirman que en ausencia de AhR, la menor actividad c-Src muy probablemente contribuya a una menor fosforilación de caveolina 1-Y¹⁴. Dada la relevancia de c-Src en el control de caveolina 1, y de ambas proteínas en la regulación de la activación de las integrinas durante adhesión celular, nos planteamos analizar los posibles mecanismos por los que AhR pudiera regular c-Src.

En primer lugar analizamos la expresión a nivel de mRNA y de proteína de la quinasa de extremo c-terminal (Csk), caracterizada como uno de los principales reguladores de la actividad c-Src. Observamos la existencia de niveles mayores de RNA mensajero en células AhR^{-/-} que en AhR^{+/+} (Figura RI.7A) que, sin embargo, no produjeron diferencias significativas en los niveles de proteína presentes en los lisados celulares (Figura RI.7B). Por tanto, la ausencia de sobre-expresión de proteína Csk no es probable que sea la causa de la inhibición de c-Src en células carentes de AhR.

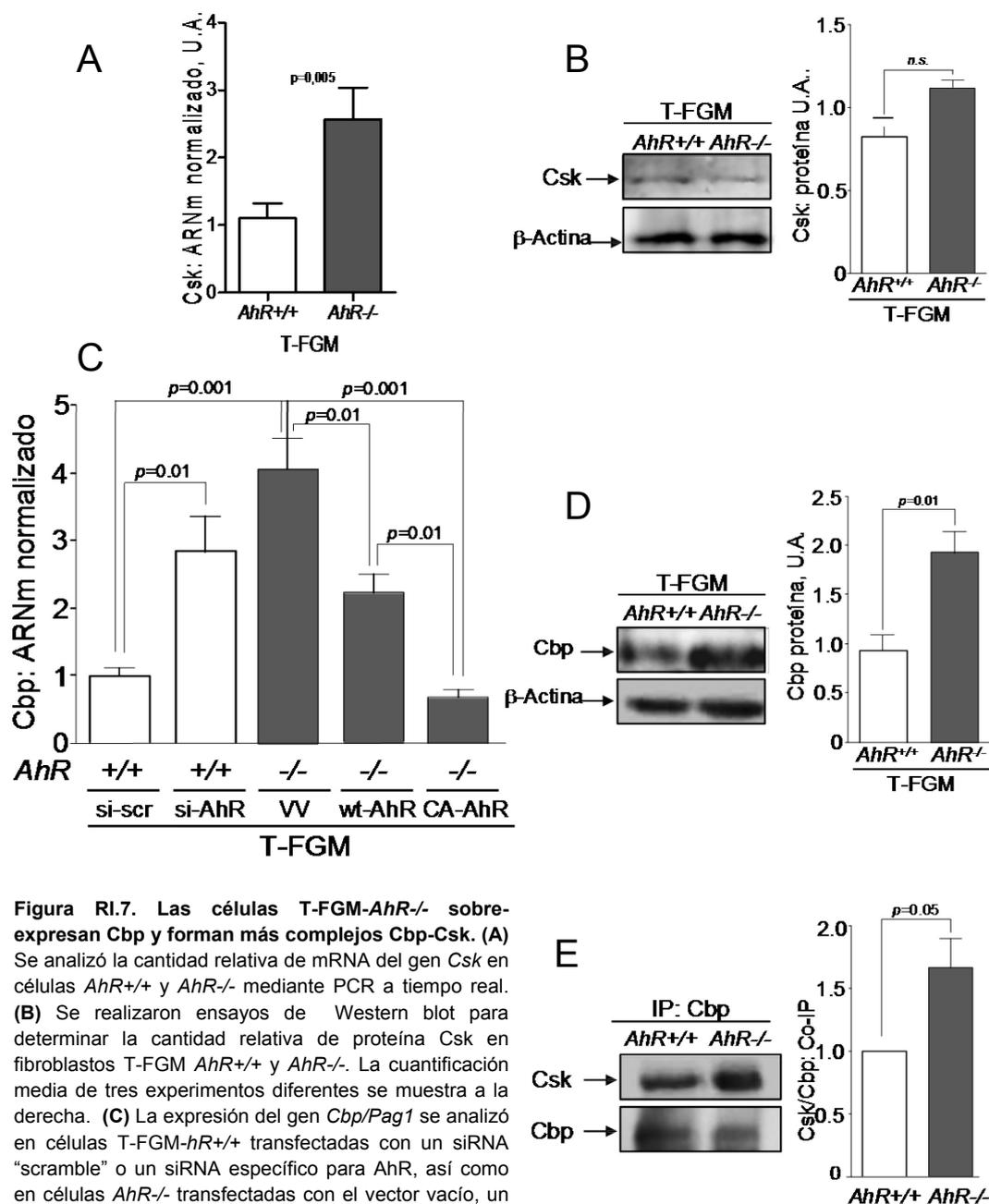


Figura RI.7. Las células T-FGM-AhR^{-/-} sobre-expresan Cbp y forman más complejos Cbp-Csk. **(A)** Se analizó la cantidad relativa de mRNA del gen *Csk* en células AhR^{+/+} y AhR^{-/-} mediante PCR a tiempo real. **(B)** Se realizaron ensayos de Western blot para determinar la cantidad relativa de proteína Csk en fibroblastos T-FGM AhR^{+/+} y AhR^{-/-}. La cuantificación media de tres experimentos diferentes se muestra a la derecha. **(C)** La expresión del gen *Cbp/Pag1* se analizó en células T-FGM-AhR^{+/+} transfectadas con un siRNA "scramble" o un siRNA específico para AhR, así como en células AhR^{-/-} transfectadas con el vector vacío, un vector de expresión de la forma silvestre de AhR (wt-AhR) o de su forma constitutivamente activa (CA-AhR).

(D) Se analizó la expresión proteica de Cbp en lisados totales mediante Western-blot y la cuantificación de 3 experimentos independientes se muestra a la derecha. **(E)** Se realizó una inmunoprecipitación para Cbp y se analizó la cantidad de Csk co-inmunoprecipitado mediante Western-blot. A la derecha de la gráfica se muestra la cuantificación de tres experimentos diferentes. Las representaciones y cálculos estadísticos se realizaron con GraphPad Prism 6.0.

Csk, a diferencia de otras SFK, es una proteína citoplásmica que sólo inhibe a c-Src cuando se encuentra asociada a la membrana plasmática, concretamente en los dominios de membrana de tipo *raft*. Debido a ello, para la realización de sus funciones, Csk necesita adaptadores de membrana, entre los cuales destaca Cbp (Csk binding

protein), una proteína membranal con una fuerte interacción con las proteínas SFK. Analizamos por ello los niveles de expresión de Cbp tanto a nivel de mRNA como de proteína. El resultado mostró una clara relación negativa entre la actividad del receptor de dioxina y la expresión de *Cbp*, de manera que tanto el silenciamiento parcial por siRNA en células T-FGM-*AhR*^{+/+} como su ausencia total en fibroblastos *AhR*^{-/-} provocó la sobre-expresión de Cbp (Figura RI.7C). Coherentemente, el rescate de la expresión de la forma silvestre de AhR en células *AhR*^{-/-} provocó un descenso en la cantidad de mensajero de *Cbp*, descenso aún más acusado al utilizar la forma constitutivamente nuclear del receptor (Figura RI.7C). La diferencia de expresión en mRNA entre estas líneas también se tradujo en una mayor cantidad de proteína Cbp en las células *AhR*^{-/-} (Figura RI.7D).

Para confirmar que la sobre-expresión de Cbp podría provocar un mayor reclutamiento de la quinasa Csk en células *AhR*^{-/-}, realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación, observándose que la asociación Cbp-Csk era mayor en células carentes del receptor que en sus equivalentes silvestres (Figura RI.7E). Por tanto, era bastante probable que la inhibición de c-Src observada en fibroblastos T-FGM-*AhR*^{-/-} fuera producto, al menos parcialmente, de una actividad excesiva de Csk.

El receptor de dioxina regula transcripcionalmente la expresión de *Cbp* mediante la unión a su promotor.

Los resultados anteriores sugieren una función represora para AhR en el control de la expresión de Cbp. Por ello, decidimos estudiar si dicha represión tiene lugar por una acción transcripcional directa de AhR que requiera su interacción directa con regiones promotoras de *Cbp*. El análisis del promotor de *Cbp* empleando la plataforma *Ensembl* identificó dos secuencias XRE (*Xenobiotic Response Element*, 5'GCGTG3') de unión de AhR en las coordenadas 9833602-9833606 y 9833653-9833657 del locus *Cbp/Pag1* (Figura RI.8A). Se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para ambas regiones, pero no se pudo demostrar unión de AhR a ninguno de

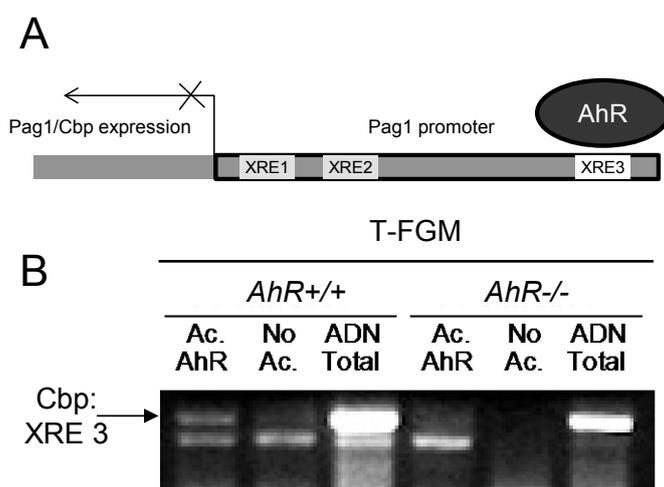


Figura RI.8. AhR se une al promotor de Cbp en condiciones fisiológicas. (A) Esquema de la situación de las secuencias XRE comprobadas en el promotor del gen *Pag1* y de la unión del receptor detectada.. (B). T-FGM *AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} fueron procesadas para inmunoprecipitación de AhR y la cromatina unida a la proteína precipitada fue aislada y amplificada por pcr. Se utilizó como control negativo una condición sin anticuerpo y, como positivo, un extracto de ADN total previo a la precipitación.

dichos XRE.

Sin embargo, el análisis de un trabajo de “CHIP on chip” para AhR realizado en hígado de ratón tratado con TCDD (Dere et al. 2011) mostró que, tras 2 h horas de exposición a este xenobiótico, una de las secuencias que resultaron enriquecidas respecto a la unión de AhR se localizaba en una región que podría formar parte del promotor de *Cbp* y que era distal a la que contenía los XRE previamente analizados.. Analizamos la presencia de sitios XRE dentro de esta nueva secuencia y detectamos un único sitio, denominado XRE3, que mapea entre las bases 9834302 y 9834306. Los ensayos de CHIP para el XRE3 en condiciones basales en células T-FGM-*AhR*^{+/+}, usando como control de especificidad los fibroblastos *AhR*^{-/-}, permitieron detectar la unión de este receptor a dicha secuencia (Figura RI.8B). Este resultado aporta un fuerte argumento a favor de un papel regulador transcripcional para AhR en el control de la expresión de *Cbp* en fibroblastos.

El silenciamiento de *Cbp* provoca la recuperación del fenotipo silvestre en células T-FGM-*AhR*^{-/-}

Tras el análisis del control que ejerce AhR sobre la expresión de *Cbp*, el siguiente objetivo fue determinar la relevancia de dicha regulación en la activación de la integrina $\beta 1$. Así, se procedió a realizar un conjunto de experimentos de rescate en los que la expresión de *Cbp* fue silenciada en fibroblastos *AhR*^{-/-} evaluándose su efecto sobre el fenotipo de adhesión objeto de estudio.

En primer lugar, decidimos comprobar si la inhibición de *Cbp* propiciaba una mayor activación de c-Src y, para ello, analizamos el estado de fosforilación en la Y¹⁴ de su proteína diana caveolina 1 empleando ensayos de inmunoprecipitación (Figura RI.9A). El experimento mostró que el silenciamiento de *Cbp* por siRNA incrementa significativamente en células T-FGM-*AhR*^{-/-} los niveles de caveolina 1 Y¹⁴, lo que está en consonancia con los resultados obtenidos por otros grupos (Place et al. 2011). A continuación, quisimos comprobar si el silenciamiento de *Cbp* provocaba un efecto en el estado de activación de la integrina $\beta 1$, presumiblemente a través de c-Src. Así, se realizaron análisis citométricos de unión de integrina $\beta 1$ activa al anticuerpo específico 9EG7 en células *AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} creciendo en condiciones basales y en presencia de un si-*Cbp*. En estos experimentos también se analizó por citometría el posible efecto del si-*Cbp* sobre la presencia de la integrina en la membrana. Se observó que la reducción de los niveles de *Cbp* en células *AhR*^{-/-} disminuyó la activación de la integrina $\beta 1$ hasta

niveles similares a los presentes en células *AhR*^{+/+}, las cuales se vieron afectadas levemente por el silenciamiento de Cbp (Figura RI.9B, derecha). En cuanto al efecto sobre la presencia en membrana de la integrina, ninguno de los genotipos se vió afectado significativamente por el descenso en la cantidad de Cbp celular (Figura RI.9B, izquierda). Estos resultados sugieren indirectamente un efecto negativo de la actividad c-Src en la adquisición de una conformación activada por parte de la integrina β 1, y permiten proponer que la ruta Cbp-Csk-Src regulada por AhR tiene un papel relevante en la señalización dentro-fuera que contribuye al control de la activación de la integrina β 1.

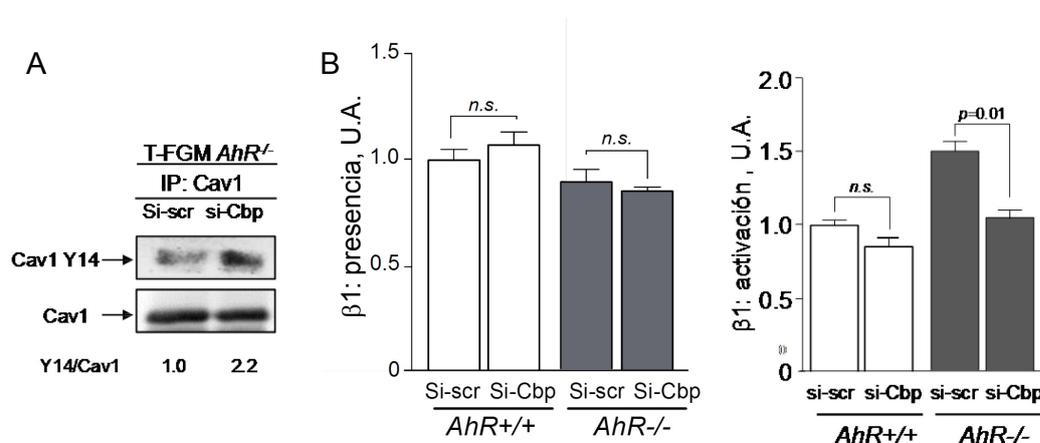


Figura RI.9. El silenciamiento de Cbp en células T-FGM-*AhR*^{-/-} incrementa los niveles de caveolina 1 fosforilada y reduce la activación de integrina β 1. **(A)** Se realizaron experimentos de inmunoprecipitación de Cav1 en células *AhR*^{-/-} transfectadas con siRNA scramble o específico contra Cbp y los niveles de Caveolina 1 total y fosforilada en la Y¹⁴ fueron determinados por Western-blot. El resultado fue cuantificado y normalizado. **(B)** Los fibroblastos T-FGM-*AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} fueron levantados de las placas de cultivo e incubados con el anticuerpo para proteína total β 1-FITC (izquierda) o con el que detecta su forma activada 9EG7 (derecha). Se analizaron 10⁴ células por condición y se representó el valor medio de la intensidad de fluorescencia para cada condición experimental.

Basándonos en estos resultados, decidimos determinar hasta que punto la sobre-expresión de Cbp puede ser responsable de los defectos morfológicos y de migración observados en los fibroblastos *AhR*^{-/-}. Para ello seleccionamos dos de los ensayos en los que la ausencia de receptor genera un fenotipo fácilmente analizable: la forma celular (con una mayor superficie celular y una menor polaridad) y la menor capacidad de migración en ensayos de herida *in vitro* (Carvajal-Gonzalez *et al.* 2009) (Mulero-Navarro *et al.* 2005). Para abordar la primera parte, realizamos la cuantificación de la forma celular de los fibroblastos T-FGM-*AhR*^{-/-} transfectados con un siRNA aleatorio o dirigido contra Cbp utilizando el programa *Image J*. Tras la medición de al menos 40 células, analizamos los descriptores relativos a la forma celular “Circularidad” y “Eje mayor/Eje menor” (Figura RI.10A). El parámetro “circularidad” oscila entre 0 y 1 correspondiendo el valor de 1 a una célula totalmente circular. La relación “eje mayor/eje

menor”, por su parte, aumenta con la polaridad celular. Para ambas mediciones, las células *AhR*^{-/-} silenciadas frente a Cbp mostraron una forma más alargada y acicular, con valores de circularidad inferiores y relaciones entre ejes mayores que las de los fibroblastos T-FGM-*AhR*^{-/-} no silenciados (Figura RI.10A). En definitiva, la reducción de la expresión de Cbp en fibroblastos carentes de receptor de dioxina restaura la forma celular hacia aquella que presentan los fibroblastos T-FGM silvestres.

La posesión de una forma celular elongada suele corresponderse con una mayor capacidad de migración. Para comprobar si el silenciamiento de Cbp mejoraba la capacidad de migración de células carentes de AhR, se realizaron ensayos de cierre de herida in vitro, empleando células T-FGM-*AhR*^{-/-} trasfectadas o no con si-RNA frente a Cbp (Figura RI.10B). Los resultados obtenidos mostraron que los fibroblastos *AhR*^{-/-} silenciados para Cbp recuperaron e incrementaron su capacidad de migración de

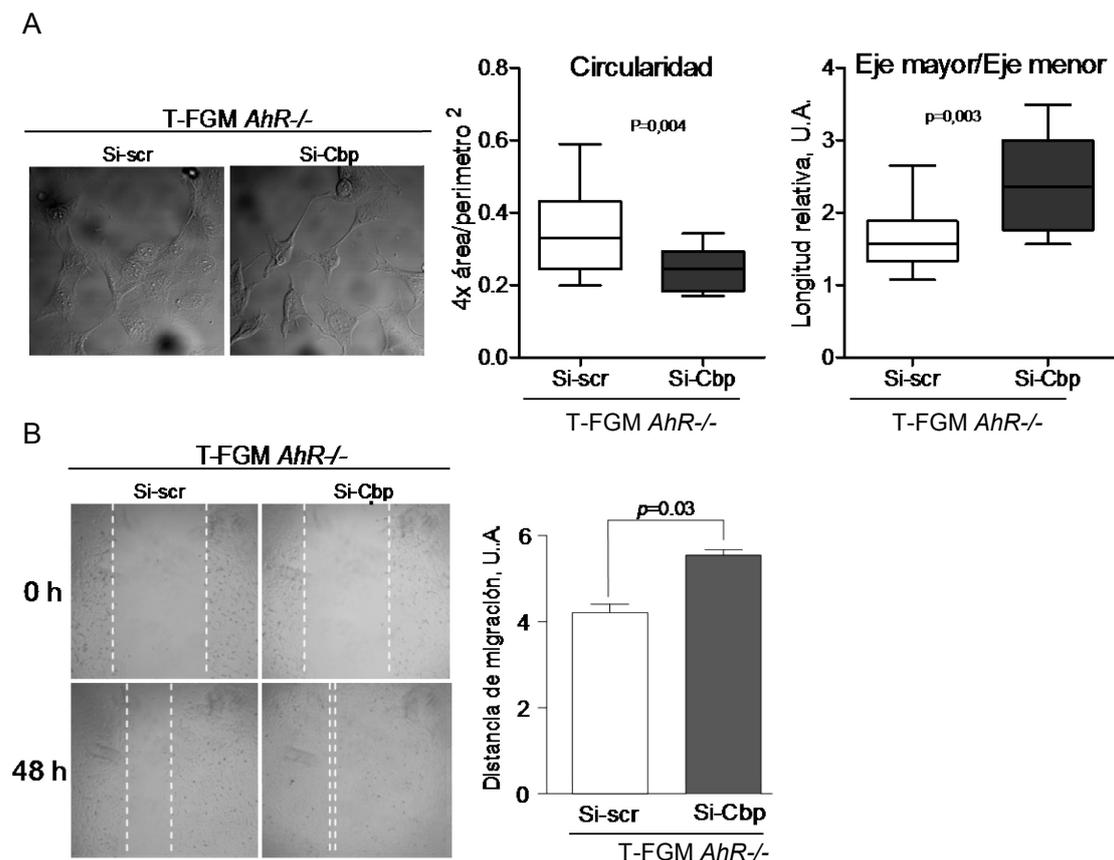


Figura RI.10. Los fibroblastos T-FGM-*AhR*^{-/-} recuperan un fenotipo similar al silvestre tras el silenciamiento de Cbp. (A) Las células T-FGM-*AhR*^{-/-} fueron transfectedas con un siRNA scramble o dirigido contra Cbp. Tras ser crecidas y fijadas se analizaron en cuanto a su morfología por microscopía de contraste de fases. Las imágenes fueron tratadas con *Image J* y se realizó un dibujo manual del contorno celular de, al menos, 25 células representativas de cada condición. A continuación, se utilizó la herramienta *Shape descriptors* y los datos resultantes referentes a “Circularidad” y “Eje mayor/eje menor) fueron comparados estadísticamente y representados utilizando *GraphPad Prism 6.0*. (B) Partiendo de células T-FGM-*AhR*^{-/-} transfectedas con un siRNA scramble o dirigido contra Cbp y cultivadas a subconfluencia, se realizó una herida in vitro utilizando una punta de pipeta conectada a un aspirador. Se añadió medio de cultivo sin suero y el proceso de cierre de herida fue fotografiado a las 0 h y a las 48 h. Las imágenes fueron empleadas para calcular la longitud inicial y final de la herida realizada. El avance de la línea de células en migración fue representado y comparado con *GraphPad Prism 6.0*.

manera significativa. Por tanto, los niveles de Cbp son relevantes en el mantenimiento del fenotipo migratorio en fibroblastos que carecen de la expresión del receptor de dioxina. Dado que los fibroblastos parecen contribuir a procesos de migración celular tanto en estado fisiológico (Aman and Piotrowski 2010) como en la adquisición de un fenotipo metastático en células tumorales (Friedl and Wolf 2003) la relación funcional entre AhR y Cbp pudiera ser relevante en el control de la motilidad celular durante el desarrollo y en ciertas patologías.

El control de la expresión de fibronectina por el receptor de dioxina es independiente de Cbp.

Nuestros datos indican que la señalización fuera-dentro mediada por fibronectina y la dentro-fuera que implica a Cbp parecen cooperar en la sobre-activación de la integrina $\beta 1$ en fibroblastos T-FGM-AhR^{-/-}. Por otro lado, la ruta Cbp-Csk-Src modula el fenotipo celular de estos fibroblastos confluendo tanto sobre integrina $\beta 1$ como sobre caveolina 1. Decidimos entonces investigar si la sobre-expresión de Cbp podría contribuir también al aumento en la cantidad de fibronectina celular.

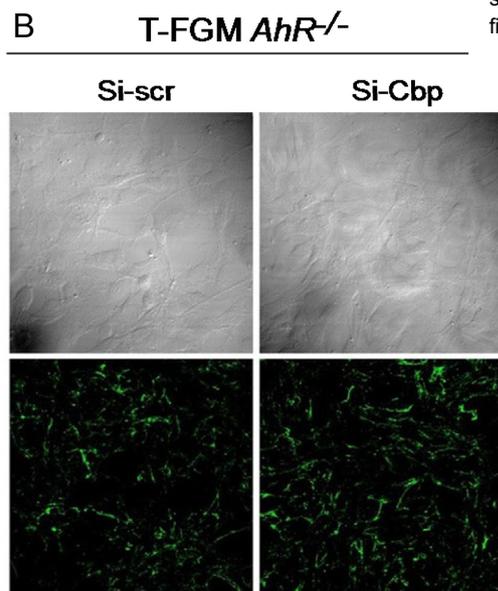
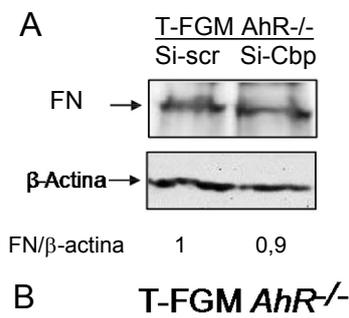
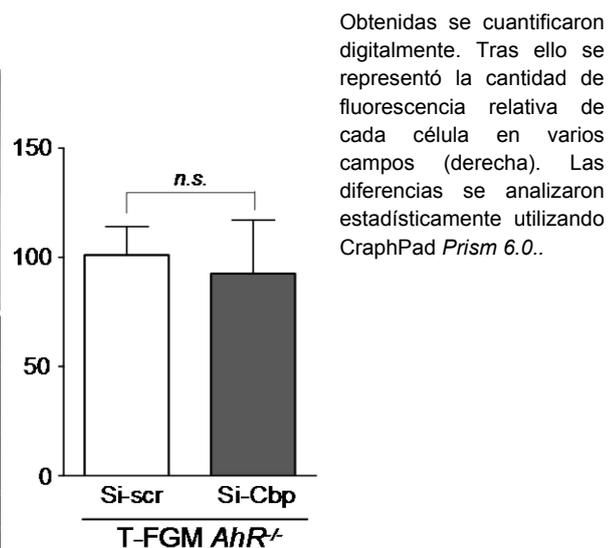


Figura RI.11. La expresión de fibronectina en células T-FGM AhR^{-/-} es independiente del silenciamiento de Cbp. (A) Los fibroblastos T-FGM-AhR^{-/-} fueron transfectados con un siRNA scramble o dirigido contra Cbp. Tras 24 h se realizaron lisados totales proteicos y el nivel de fibronectina se determinó por Western-blot utilizando β -actina como control de carga. Los resultados se cuantificaron digitalmente. (B) Células T-FGM-AhR^{-/-} transfectadas con un siRNA scramble o dirigido contra Cbp fueron crecidas sobre cristal durante 48 h. A continuación se realizó una tinción inmunofluorescente para detectar la fibronectina depositada en el espacio extracelular. Las imágenes



Para ello, realizamos experimentos de rescate de fenotipo utilizando células T-FGM-*AhR*^{-/-} transfectadas con un siRNA scramble o específico para Cbp, en las que observamos no sólo la cantidad de fibronectina intracelular (Figura RI.11A) sino también la densidad de la matriz de fibronectina generada por dichas células (Figura RI.11B). En el primer caso, los niveles de fibronectina celular detectados por Western-blot no variaron significativamente con la reducción de los niveles de Cbp (Figura RI.11A).. En cuanto a la proteína extracelular, la observación mediante inmunofluorescencia de la fibronectina generada por células *AhR*^{-/-} mostró que la densidad e intensidad de la matriz era independiente del nivel de Cbp presente en la célula (Figura RI.11B).

Todo ello nos hace concluir que el control de la expresión de fibronectina es independiente a la ruta de señalización de Cbp. Adicionalmente, el receptor de dioxina ejerce un control sobre la activación de integrina $\beta 1$ mediante la combinación de dos rutas de señalización:, una intracelular vía Cbp y la otra extracelular a través de fibronectina.

La proteína del complejo citosólico Xap2 previene la activación transcripcional del receptor de dioxina pero carece de un papel adicional en la ruta de activación de la integrina $\beta 1$.

La translocación nuclear del receptor de dioxina es un proceso imprescindible para su función como factor de transcripción. Unos de los principales componentes del complejo proteico que retiene a AhR en el citosol celular es la proteína (AIP), también conocida como Ara9 (*AhR-associated protein 9*) y Xap2 (*hepatitis B virus X-activating protein 2*). Xap2 parece poseer papeles independientes al de la simple estabilización del receptor dada la mortalidad durante el desarrollo que presentan los ratones *Xap2*^{-/-} como consecuencia de desarrollar graves defectos cardíacos (Lin et al. 2007). De hecho, Xap2 también parece regular la actividad de la fosfodiesterasa 2A (de Oliveira et al. 2007), la cual tiene una función relevante tanto en el control de los niveles de AMPc como en los procesos de adhesión y migración direccional (Fleming et al. 2004; Howe 2011).

Por todo ello, decidimos comprobar si Xap2, a través del control de AhR, tendría un papel importante en la regulación de la actividad de la integrina $\beta 1$. Realizamos experimentos de silenciamiento de Xap2 por siRNA en células T-FGM-AhR+/+ y analizamos varios intermediarios clave de la ruta de señalización. El análisis por PCR a

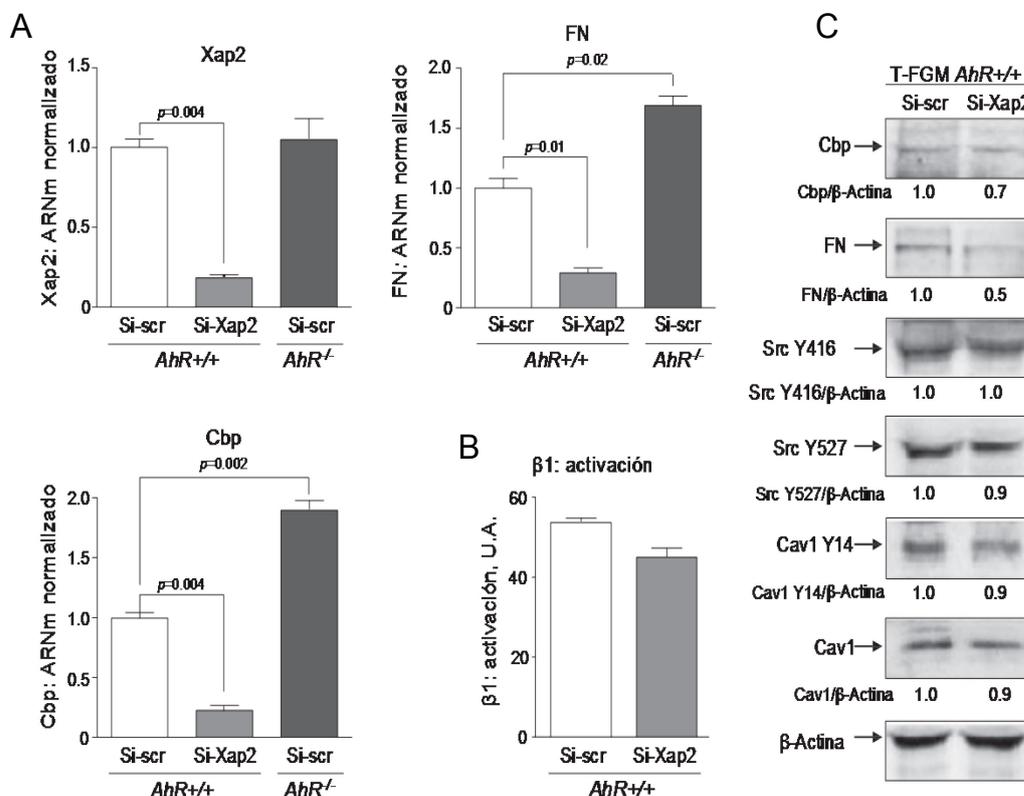


Figura RI.12. El silenciamiento de Xap2 en fibroblastos T-FGM-AhR+/+ reduce los niveles de fibronectina y de Cbp pero no afecta a la activación de c-Src ni de integrina $\beta 1$ (A) Los niveles de mRNA de *Xap2*, *fibronectina* y *Cbp* en células T-FGM-AhR+/+ transfectados con un siRNA específico para Xap2 fueron comparados con los existentes en AhR+/+ y AhR^{-/-} transfectados con un siRNA scramble. El análisis de la expresión de los genes *Xap2*, *fibronectina* y *Cbp* se realizó por PCR a tiempo real y la cantidad relativa de mensajero fue representada y analizada estadísticamente utilizando *GraphPad Prism 6.0*. (B) Células T-FGM AhR+/+ transfectadas con un siRNA aleatorio o específico para Xap2 fueron levantadas y el nivel de activación de integrina $\beta 1$ medida por citometría empleando el anticuerpo 9EG7. Se analizaron 10^4 células y se representó la intensidad media de fluorescencia. (C) La cantidad proteica relativa de Cbp, fibronectina, caveolina 1, β -actina, y de las formas fosfoespecificas Src Y⁴¹⁶, Src Y⁵²⁷ y Cav1 Y¹⁴ fueron analizadas por Western-blot en lisados celulares totales de células T-FGM-AhR+/+ transfectadas con siRNA contra Xap2 o siRNA scramble. La intensidad de las bandas fue analizada digitalmente y se normalizó a la cantidad de β -actina

tiempo real de la cantidad de mensajero nos mostró, en primer lugar, que no existían diferencias significativas en la expresión de la chaperona entre las líneas de fibroblastos AhR+/+ y AhR^{-/-} (Figura RI.12A, izquierda). La reducción de los niveles de Xap2 sí provocó descensos significativos en los niveles de mRNA de *fibronectina* (derecha) y de *Cbp* (debajo), así como de las cantidades de proteína presentes en lisados totales (Figura RI.12C), muy probablemente debido a una mayor translocación nuclear y activación transcripcional del receptor de dioxina. Estos resultados sugieren que AhR

ejerce una regulación negativa sobre fibronectina y sobre Cbp, lo que es coherente con el incremento de expresión observado para ambos genes en células T-FGM-*AhR*^{-/-}.

Sin embargo, al realizar ensayos citométricos para cuantificar el estado de activación de la integrina $\beta 1$ en las células T-FGM-*AhR*^{+/+} interferidas para Xap2, sólo se observó un ligero descenso en la unión del anticuerpo 9EG7 con respecto a las células transfectadas con el si-RNA inespecífico (Figura RI.12B). De hecho, el análisis mediante anticuerpos fosfoespecíficos de los estados de fosforilación de c-Src mostraron que el equilibrio entre la fosforilación del residuo de activación Y⁴¹⁶ y el de inhibición Y⁵²⁷, no se vio afectado por la eliminación de Xap2, indicando que el estado de activación de la quinasa permaneció inalterado (Figura RI.12C). La prueba funcional del estado de activación de c-Src en condiciones de depleción de Xap2 se realizó mediante el análisis del estado de fosforilación de caveolina 1 en su residuo Y¹⁴, que, de nuevo, permaneció básicamente insensible a la reducción de los niveles de Xap2. Por tanto, podemos concluir que, a pesar de su importancia como estabilizador de AhR en el citoplasma, Xap2 no tiene un papel relevante en la ruta de señalización descrita para el control de la actividad de la integrina $\beta 1$.

El receptor de dioxina fomenta la reorganización y la invasión de la matriz extracelular.

Tras la descripción de los cambios en la composición de la matriz extracelular provocados por la ausencia del receptor de dioxina decidimos estudiar funcionalmente el comportamiento de las células T-FGM en una matriz circundante 3-D en ensayos de contractilidad de colágeno. El ensayo se realizó embebiendo células T-FGM-*AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} en una solución de colágeno que se dejó solidificar dentro de un anillo de 10 mm colocado en una placa de cultivo. Tras la gelificación, la placa se llenó de medio de cultivo sin suero y se retiró el anillo, quedando un gel circular flotando sobre el medio. Finalmente, se realizó el seguimiento fotográfico de la contracción del gel de colágeno promovido por las células embebidas en su interior y se cuantificó la reducción de tamaño desde el original. El análisis de los resultados permitió comprobar que los fibroblastos carentes del receptor de dioxina compactaban con más dificultad el colágeno del gel, ya que el área remanente detectada, especialmente en torno a las 24 h de ensayo, era sensiblemente mayor a la presente en geles conteniendo células T-FGM-*AhR*^{+/+} (Figura RI.13).

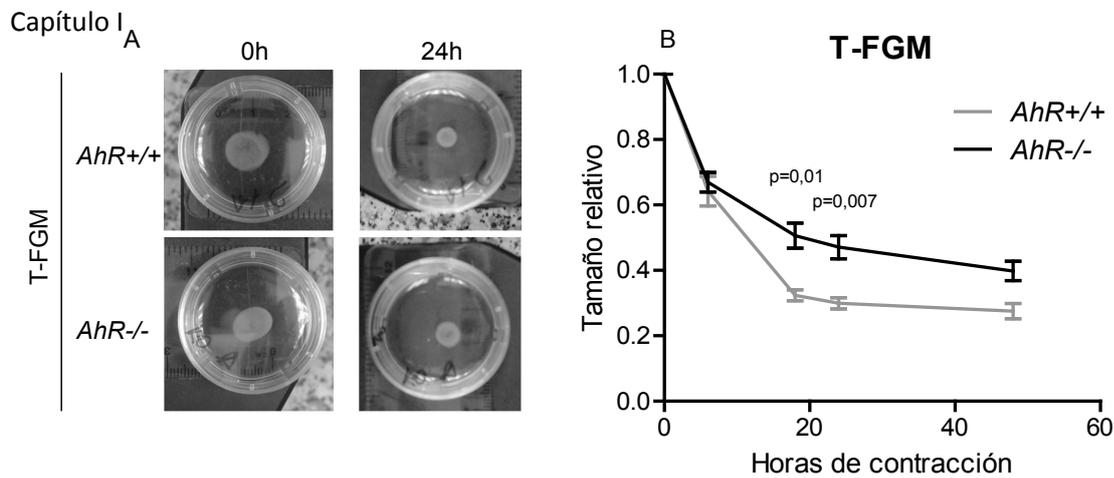


Figura RI.13. Los fibroblastos T-FGM-*AhR*^{-/-} tienen menor capacidad contráctil en geles de colágeno. (A) $1,4 \times 10^6$ T-FGM-*AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} fueron resuspendidos en medio de cultivo sin suero y posteriormente mezclados en proporción 1:1 con una solución de colágeno I de cola de rata previamente ajustada a pH fisiológico. La mezcla se depositó en el interior de un anillo de plástico estéril de 10 mm dentro de una placa de cultivo y se incubó 1 h a 37°C. Tras el periodo de polimerización del gel, se añadió cuidadosamente 1 ml de medio a la placa y se extrajo cuidadosamente el molde de plástico con pinzas estériles, permitiendo la liberación del gel y su flotación en el medio. A continuación se realizó un seguimiento de su contracción desde un punto fijo a 0, 8, 16, 24 y 48 horas. En las imágenes se observa la reducción de los geles en ambos genotipos tras 24 h. (B) El tamaño de cada gel fue medido digitalmente y normalizado con respecto al tamaño original. A continuación se representó la tendencia de contracción de 3 geles de cada genotipo y las diferencias se analizaron estadísticamente.

Este resultado está en aparente contradicción con la sobre-activación de Rho descrita en células T-FGM-*AhR*^{-/-}. Sin embargo, el nivel de fosforilación de FAK y la deslocalización de las adhesiones focales que presentan estas células (Carvajal-Gonzalez *et al.* 2009), nos hacen pensar que su menor capacidad de contracción pueda ser debida a defectos en el reciclaje de las adhesiones focales y/o a problemas en las cascadas de señalización que regulan la contracción de actina-miosina.

Por otra parte, se ha relacionado a las integrinas con la capacidad invasiva de la célula y, concretamente, con la capacidad de formar las estructuras denominadas invadosomas (Destaing *et al.* 2011). La integrina $\beta 1$ ha sido descrita como clave en la formación de estas protrusiones basadas en anillos de actina (Destaing *et al.* 2010), las cuales se encargan de comenzar la degradación de la matriz extracelular circundante permitiendo la invasión de la misma (Caldieri *et al.* 2009). Por ello, decidimos comprobar si el receptor de dioxina tiene algún papel en la generación de estas estructuras, ya que se ha descrito una mayor capacidad migratoria en líneas celulares (Mulero-Navarro *et al.* 2005) y en MEFs que expresan AhR (Barouki *et al.* 2007).

Para ello, realizamos ensayos de degradación de gelatina marcada con fluorescencia. Los fibroblastos T-FGM-*AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} crecieron sobre cristales tapizados con una matriz de gelatina mezclada con el fluoróforo FITC (isotiocianato de fluoresceína) y se observó el patrón de degradación de cada tipo celular a lo largo del tiempo. Para mejorar la visualización de las fibras de estrés, las células se tiñeron también con rodamina-faloidina (Figura RI.14).

Los resultados obtenidos mostraron que ambas líneas celulares tienen

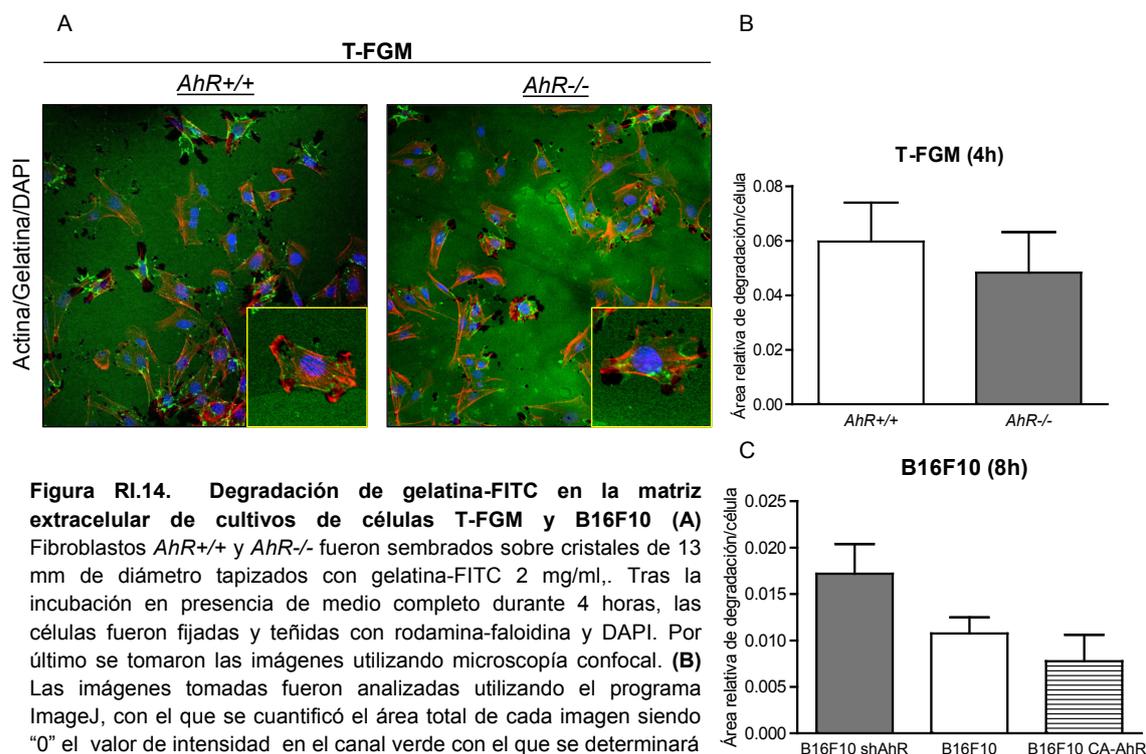


Figura RI.14. Degradación de gelatina-FITC en la matriz extracelular de cultivos de células T-FGM y B16F10 (A) Fibroblastos *AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} fueron sembrados sobre cristales de 13 mm de diámetro tapizados con gelatina-FITC 2 mg/ml. Tras la incubación en presencia de medio completo durante 4 horas, las células fueron fijadas y teñidas con rodamina-faloïdina y DAPI. Por último se tomaron las imágenes utilizando microscopía confocal. **(B)** Las imágenes tomadas fueron analizadas utilizando el programa ImageJ, con el que se cuantificó el área total de cada imagen siendo "0" el valor de intensidad en el canal verde con el que se determinará

el área que presenta la gelatina-FITC completamente degradada. A continuación, se contabilizaron los núcleos celulares y se normalizó el primer valor frente al segundo. Los resultados de 3 imágenes fueron representados con *GraphPad Prism 6.0.* **(C)** Se realizó el mismo ensayo de degradación anterior, utilizando en este caso células de melanoma murino B16F10 silvestres, B16F10 ShAhR (interferidas establemente para AhR) y B16F10 CA-AhR (expresan establemente una forma constitutivamente activada del receptor). El resultado de los análisis de degradación por célula se realizó en condiciones similares a las descritas en el apartado B.

capacidad de generar invadopodios, los cuales se visualizan como puntos intensos de actina (rojo) que se localizan en zonas de degradación de matriz (negro) (Figura RI.14A, ampliación). Tras el análisis *de visu* de las imágenes, llevamos a cabo una observación detallada de las zonas de degradación, cuantificando digitalmente el área degradada por cada célula. Así, pudimos comprobar que no existían diferencias significativas entre ambos genotipos en cuanto a su capacidad de degradar matriz extracelular por un proceso asociado a la formación de invadopodios. (Figura RI.14B). Sin embargo, los fibroblastos T-FGM tienen una capacidad de degradación de matriz muy elevada, por lo cabía la posibilidad de que en condiciones de alta degradación las diferencias entre genotipos no fueran apreciables.

Para responder a esta cuestión realizamos los mismos experimentos en células de melanoma murino B16F10 en las que en un caso hemos silenciado establemente AhR (B16F10 ShAhR) y en otro hemos expresado una forma constitutivamente sobre-activada de la proteína (B16F10 CA-AhR), generadas previamente en nuestro laboratorio (Contador-Troca *et al.* 2013) (Figura RI.14C). Observamos una correlación

inversa entre el nivel de AhR y la degradación de la matriz, de modo que las células B16F10 ShAhR eran las más degradativas y las B16F10 CA-AhR las que menos, mostrando la línea silverstre una capacidad degradativa intermedia entre ambas. Estos resultados concuerdan con el papel inhibitor de metástasis descrito para AhR en modelos de melanoma murino (Contador-Troca et al. 2013) y apoyan la implicación de este receptor en el control de la degradación de la matriz extracelular si bien siguiendo un patrón dependiente del tipo celular.

RESULTADOS

CAPÍTULO II:

INTERACCIÓN CON CAVEOLINA 1

El receptor de dioxina se localiza en subdominios *raft* de la membrana plasmática.

El presente capítulo parte del interés por esclarecer el denominado papel “no nuclear” del receptor de dioxina, el cual, a pesar de haber sido intensamente discutido en los últimos años (Blankenship and Matsumura 1997; Matsumura 2011; Tomkiewicz et al. 2013), aún permanece con escaso apoyo experimental y en un estado bastante indefinido.

Estudios iniciales realizados por nuestro grupo de investigación (Carvajal-Gonzalez, J. Tesis Doctoral) sugerían un posible papel no nuclear de AhR ya que la observación por microscopía confocal de fibroblastos T-FGM transfectados con la proteína de fusión EYFP-AhR mostró la presencia de una fracción de AhR en protrusiones de la membrana plasmática. Esta localización, inicialmente inesperada en el caso de AhR, es usual en proteínas oncogénicas tales como las de la familia c-Src (de Diesbach et al. 2008) o Ras (Rocks et al. 2006; Casar et al. 2009).

Con el fin de validar estas observaciones, nos propusimos detectar por inmunofluorescencia la presencia de AhR endógeno en la membrana plasmática de fibroblastos T-FGM *AHR*^{+/+} creciendo en condiciones basales. Como se observa en la Figura RII.1 existe una cierta cantidad de receptor que se localiza en extensiones de membrana de tipo lamelipodio.

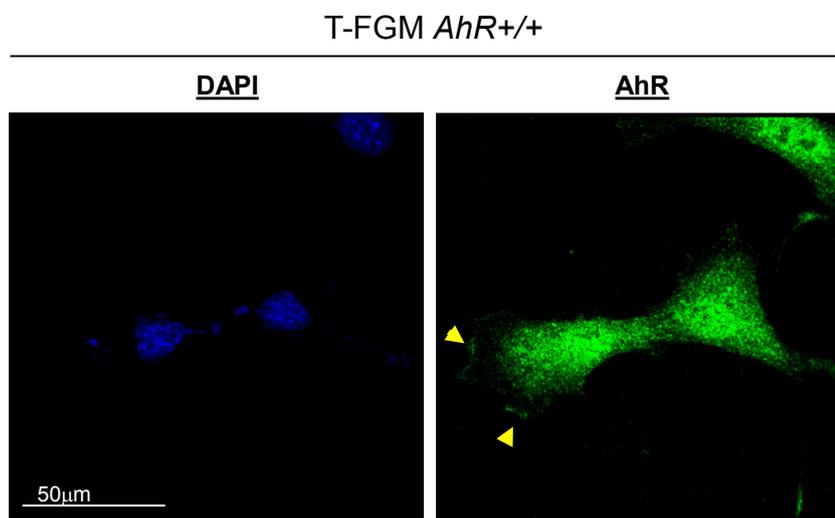


Figura RII.1. El receptor de dioxina se localiza parcialmente en membrana plasmática en células T-FGM-*AhR*^{+/+}. Las células fueron sembradas sobre cristales e incubadas durante 16 horas. Tras ello, se procedió al fijado y marcaje con anticuerpo anti-AhR (Biomol) y, posteriormente, al marcaje fluorescente con anticuerpo secundario ligado a alexa 488. Por último se realizó la tinción con DAPI. La observación se realizó en microscopio confocal.

La ubicación de AhR en regiones de membrana implicadas en migración celular sugería la posible asociación de este receptor con zonas de adhesión y con las rutas de

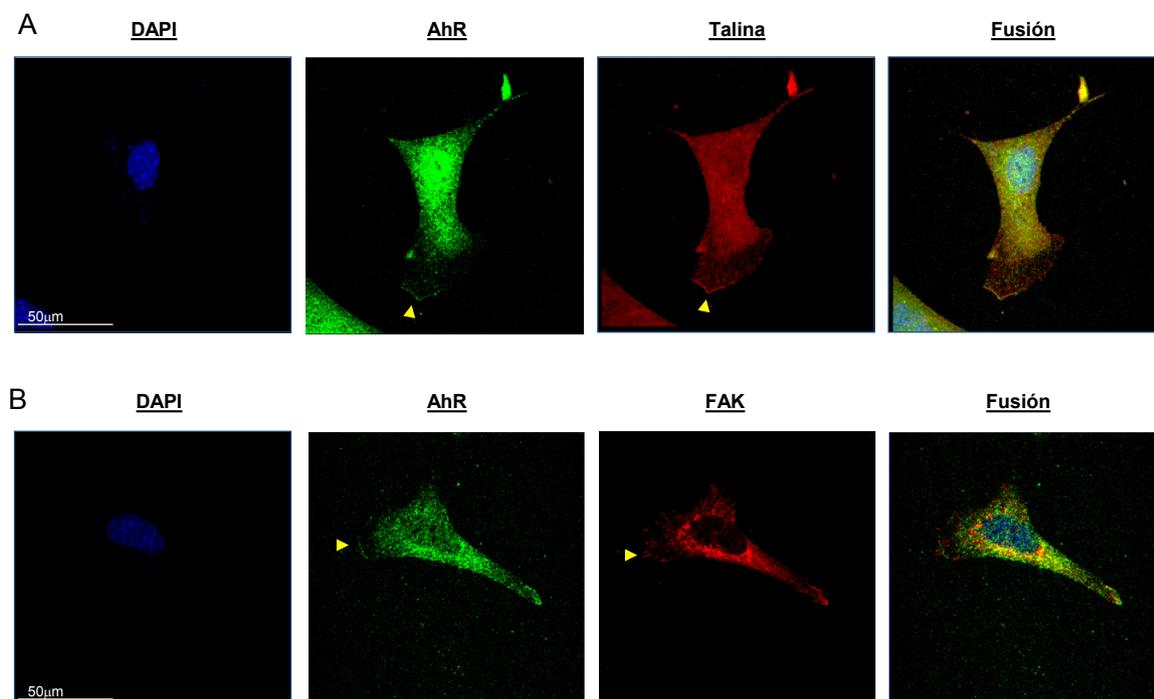


Figura RII.2. El receptor de dioxina colocaliza en la membrana plasmática con talina pero no con FAK. Las células T-FGM-*AhR*^{+/+} fueron cultivadas durante 16 h y procesadas para inmunofluorescencia. **(A)** Se realizó un doble marcaje para AhR (Biomol) y para talina con detección fluorescente empleando alexa 488 (AhR) y alexa 647 (talina). **(B)** Se realizó un doble marcaje para AhR (AbR) y para FAK con detección fluorescente empleando alexa 488 y Alexa 647, respectivamente. Por último se marcaron los núcleos celulares con DAPI en ambos ensayos.

señalización que las regulan, especialmente las mediadas por integrinas. De este modo, realizamos dobles tinciones para AhR y para talina en células T-FGM-*AhR*^{+/+}, y observamos una aparente co-localización de ambas en el borde de avance de la membrana celular (Figura RII.2A). Así, cabe la posibilidad de que una fracción de AhR “membranal” interaccione directamente con la señalización por integrinas. Dado que los fibroblastos *AhR*^{-/-} tienen alteraciones en la distribución y estabilidad de las adhesiones focales (Carvajal-Gonzalez *et al.* 2009), decidimos determinar si AhR podía estar asociado con las zonas de adhesiones focales. Para ello, realizamos una tinción conjunta de AhR con la quinasa FAK, cuya localización característica en forma de espigas en la parte de la célula en contacto con el sustrato marca la presencia de las adhesiones focales. Los resultados obtenidos indican que AhR no se asocia a dichas estructuras ya que no se detectó en las mismas un nivel significativo de colocalización de AhR (Figura RII.2B).

La detección de una fracción de AhR que se asocia a regiones específicas de la membrana (lamelipodios), nos indujo a analizar si ello implicaba a dominios especializados del tipo balsas lipídicas o “rafts”. Estas regiones de membrana

enriquecidas en colesterol y ciertos esfingolípidos (Lajoie and Nabi 2010) se caracterizan por servir de anclaje para proteínas de múltiples rutas de señalización, entre las que destacan las de c-Src, Ras o MAPK (Magee *et al.* 2002; Resh 2004).

Realizamos experimentos de ultracentrifugación en gradientes discontinuos de sacarosa en células T-FGM-*AhR*^{+/+} para aislar *rafts* de membrana en los que

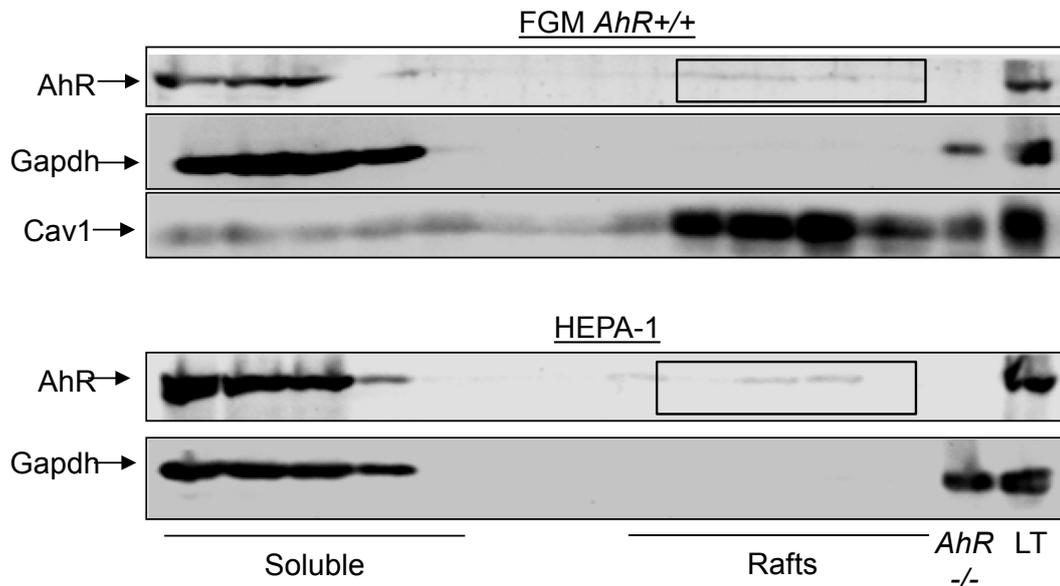


Figura RII.3. El receptor de dioxina se localiza en dominios *rafts* de membrana en fibroblastos T-FGM *AhR*^{+/+} y en células Hepa-1. Los cultivos de fibroblastos y de hepatocitos fueron crecidos en placas p150 hasta una confluencia del 70%. Tras ello se procedió a su levantamiento y lisado con tritón al 0,25%. El extracto resultante se mezcló en proporción 1:1 con sacarosa al 85% en TNE y se depositó en el fondo de un tubo de ultracentrifuga. El gradiente se completó añadiendo una capa intermedia de sacarosa al 35% y una superior de sacarosa al 16%. Las muestras se centrifugaron a 45000 rpm durante 16 h. El resultado del gradiente se analizó por Western-blot contra AhR, Gapdh y caveolina 1, los cuales se utilizaron como controles de citoplasma y membrana plasmática, respectivamente. Se añadió un control negativo de fibroblastos T-FGM-*AhR*^{-/-} y otro positivo del lisado total de células *AhR*^{+/+}. En estos experimentos, la baja densidad de los *rafts*, unida a su resistencia a la solubilización por detergente a baja temperatura, permite la separación del resto de estructuras de la célula, manteniendo las proteínas asociadas a los mismos.

determinar la presencia de AhR. Analizamos también la localización de la proteína asociada a *rafts* y relacionada funcionalmente con AhR caveolina 1. Los resultados mostraron que la mayor parte de AhR se localizaba en las fracciones más bajas del gradiente correspondientes a proteína citosólica, pero que, sin embargo, una pequeña, pero constante cantidad de receptor se localizaba en las fracciones conteniendo *rafts* de membrana. El análisis de la proteína citosólica Gapdh (presente únicamente en las fracciones bajas) y de la proteína asociada a *rafts* caveolina 1 (principalmente en fracciones altas) apoya la distribución encontrada para AhR (Figura RII.3). Para comprobar si lo observado en fibroblastos se podía hacer extensivo a otros tipos celulares, se realizó el mismo ensayo para la línea de hepatoma Hepa-1, la cual se emplea habitualmente en estudios sobre este receptor. En células Hepa-1 también se detectó una fracción del receptor de dioxina en las fracciones *raft* (Figura RII.3). Nótese

que caveolina 1 no pudo ser analizada en células Hepa-1 dado que tienen reprimida la expresión del gen que la codifica (Woudenberg et al. 2010).

El receptor de dioxina se asocia a caveolina 1 y su ausencia provoca la deslocalización de ésta de la membrana.

Un estudio previo ha mostrado que AhR inmunoprecipita con caveolina 1 en células endoteliales (Lim et al. 2008). Dado que AhR se ubica en *rafts* de membrana, y teniendo en cuenta que caveolina 1 es un componente esencial del tipo de *rafts* denominado caveolas (Lajoie and Nabi 2010), nos decidimos a estudiar la interacción entre AhR y caveolina 1. En primer lugar realizamos experimentos de inmunoprecipitación para determinar si dicha asociación se daba en nuestras líneas celulares. Los resultados mostraron que AhR inmunoprecipita con caveolina 1 en células T-FGM-*AhR*^{+/+} (Figura RII.4), lo que apoya la existencia de complejos conteniendo ambas proteínas en *rafts* de membrana. La ausencia de inmunoprecipitación en extractos de fibroblastos T-FGM-*AhR*^{-/-} confirma el resultado obtenido (Figura RII.4).

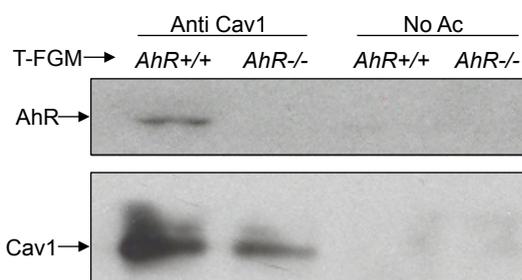


Figura RII.4. AhR co-inmunoprecipita con caveolina 1. 5×10^6 células T-FGM-*AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} fueron lisadas utilizando el detergente OG. Alícuotas de 1 mg de proteína total fueron incubadas con anticuerpo anti-caveolina 1. En ambos genotipos se realizó un control de IP con muestras no incubadas con dicho anticuerpo. El resultado de la inmunoprecipitación fue revelado mediante Western-blot contra AhR y contra caveolina 1.

Tras comprobar la asociación entre AhR y caveolina 1, nos propusimos investigar si el receptor de dioxina afecta la funcionalidad de caveolina 1.

Para ello, en primer lugar, comparamos la distribución de caveolina 1 en función de la expresión de AhR en células T-FGM-*AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-}. El análisis de caveolina 1 por microscopía confocal mostró que su localización en fibroblastos T-FGM-*AhR*^{-/-} estaba alterada, ya que su acumulación en zonas periféricas de la membrana plasmática era sensiblemente mayor que la encontrada en células *AhR*^{+/+}, (Figura RII.5A). Un análisis más detallado de los perfiles de fluorescencia para caveolina 1 (Figura RII.5B) empleando el programa FluoView, que analiza la intensidad de señal para cada píxel a lo largo de una región de interés (ROI) (Figura RII.5A), mostró que los picos de intensidad a lo largo de la célula se localizaban diferencialmente entre genotipos. Así estos eran más intensos y estrechos en la periferia de los fibroblastos *AhR*^{-/-} mientras que en los fibroblastos *AhR*^{+/+} los picos más intensos se ubicaban en las zonas internas de la célula cercanas al núcleo (teñido en azul), zonas en donde

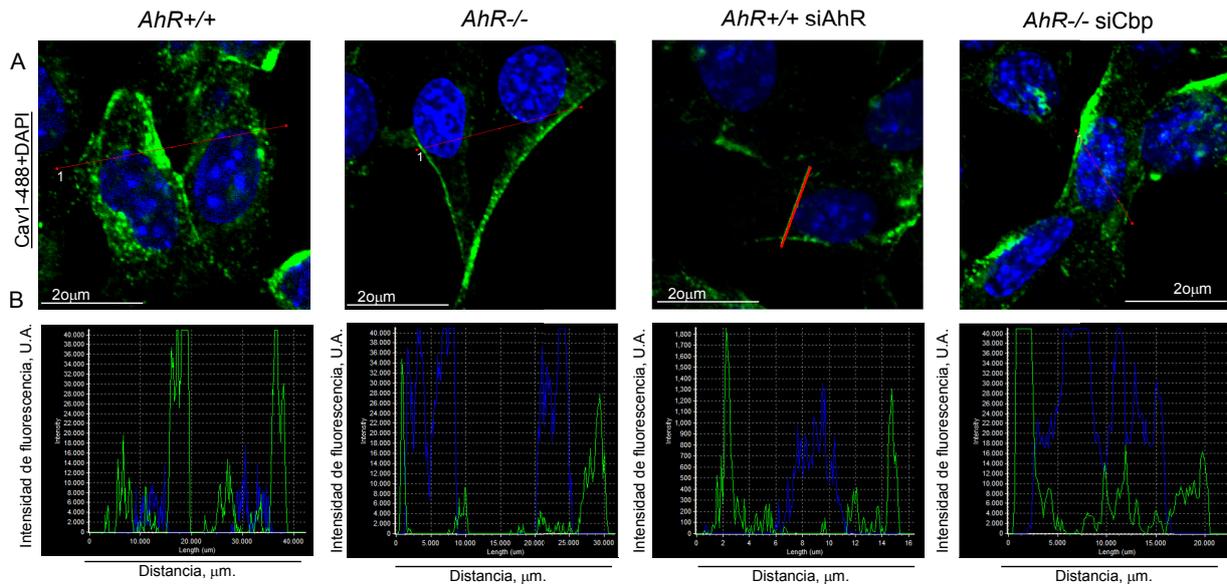
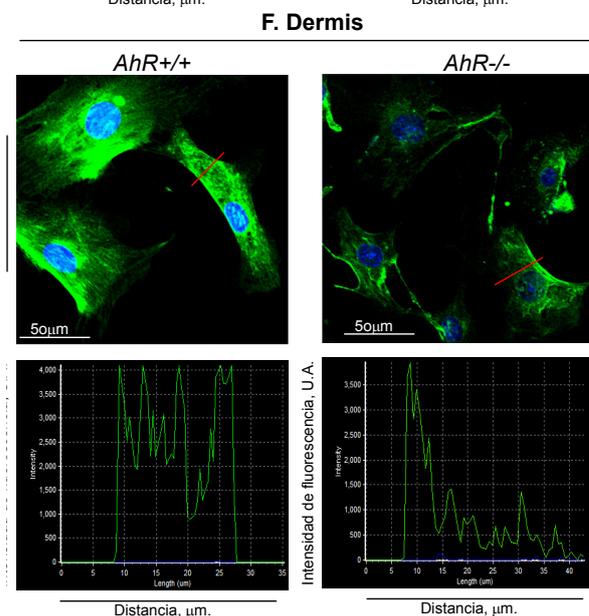


Figura RII.5. Caveolina 1 se localiza aberrantemente en membranas de fibroblastos carentes de AhR en un proceso dependiente, al menos en parte, de la expresión de Cbp. (A) Células T-FGM-*AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} control, *AhR*^{+/+} transfectadas con un siRNA frente a AhR, *AhR*^{-/-} transfectadas con un siRNA frente a Cbp, y fibroblastos primarios de la dermis de ratones *AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} fueron cultivados en cristales, fijados con metanol e incubados con anti-caveolina 1 y un secundario marcado con alexa 488. Por último se realizó una tinción con DAPI y las muestras fueron observadas utilizando microscopía confocal. (B) Las imágenes fueron analizadas utilizando la herramienta "ROI profiles" dentro del programa FluoVie. Se obtuvo la intensidad de fluorescencia detectada para cada pixel a lo largo de una línea trazada desde el exterior celular hacia el interior, (marcada en rojo en) (A). La longitud de la línea trazada osciló entre las 20 y las 40 µm. La intensidad se representó en el eje Y en unidades arbitrarias. El color verde corresponde a la señal de caveolina 1 y el azul a la señal de DAPI.



prácticamente no quedaba caveolina 1 en las células T-FGM-*AhR*^{-/-} (Figura RII.5B). Este comportamiento alterado de la caveolina 1 pudo ser replicado en células T-FGM-*AhR*^{+/+} transfectadas con un ARN interferente para AhR (Figura RII.5), apoyando un papel causal de la ausencia del receptor en el fenotipo observado.

Nuestros resultados descritos anteriormente muestran que AhR modula la ruta de señalización de Cbp-Csk-c-Src y, con ello, posiblemente, el estado de fosforilación de caveolina 1. Por ello, decidimos comprobar la relevancia de dicha ruta en la localización celular de caveolina 1. Realizamos el silenciamiento de Cbp mediante siRNA en fibroblastos T-FGM-*AhR*^{-/-}, y observamos que las células silenciadas mostraban una mayor cantidad de caveolina 1 en las membranas de la célula, si bien mantenían parte de la proteína en regiones periféricas de la membrana plasmática (Figura RII.5). Por lo tanto, este rescate parcial del fenotipo silvestre sugiere

que la ruta dependiente del adaptador Cbp también contribuye a la distribución celular de caveolina 1 en fibroblastos.

Por último, quisimos determinar si el fenotipo observado era reproducible en fibroblastos no immortalizadas. Para ello, realizamos el mismo ensayo anterior utilizando fibroblastos aislados de la dermis de ratones *AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} de 3 días posnatales (Figura RII.5, inferior). El resultado obtenido con estas células fue similar al observado en los fibroblastos T-FGM, con una distribución más asimétrica entre membranas externas e internas en los fibroblastos dermales de ratones *AhR*^{-/-}. Resulta, por tanto, que la distribución celular de caveolina 1 es dependiente de AhR también en cultivos primarios.

La distribución de caveolina 1 entre dominios de membrana *raft* y de membrana general es dependiente de la expresión y de la localización de AhR.

Teniendo en cuenta la asociación existente entre AhR y caveolina 1, y ya que ambas proteínas muestran localización en fracciones *raft* de membrana, decidimos comprobar si AhR ejercía algún papel regulador en la distribución de caveolina 1 entre membrana general y dominios *raft*, ya que estudios previos han mostrado que dicha distribución varía durante la migración de la célula (Grande-Garcia and del Pozo 2008).

Para ello, realizamos gradientes de sacarosa con lisados celulares de fibroblastos T-FGM-*AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} y analizamos la distribución de caveolina 1 (Figura RII.6). Pudimos comprobar que la caveolina 1 queda parcialmente desplazada de los dominios de tipo *raft* en ausencia del receptor de dioxina (Figura RII.6A), rasgo que se hizo más evidente tras la determinación del parámetro de la presencia relativa entre dominios *raft*/*membrana general* (Figura RII.6B). Una vez más, la implicación del receptor de dioxina en el cambio de localización de caveolina 1 fue comprobada realizando el mismo experimento en células *AhR*^{+/+} interferidas para AhR. En este caso, también se observó un cambio en la distribución de caveolina 1 entre membrana general y balsas lipídicas.

Considerando que Cbp altera la localización celular de caveolina 1 (Figura RII-5A-B), llevamos a cabo gradientes empleando extractos de células T-FGM-*AhR*^{-/-} interferidos para Cbp. Se observó una recuperación parcial de los niveles de caveolina 1 en dominios *raft*, lo que proporciona apoyo adicional a que Cbp participa en la distribución de caveolina 1 en la membrana (Figura RII.6A, inferior).

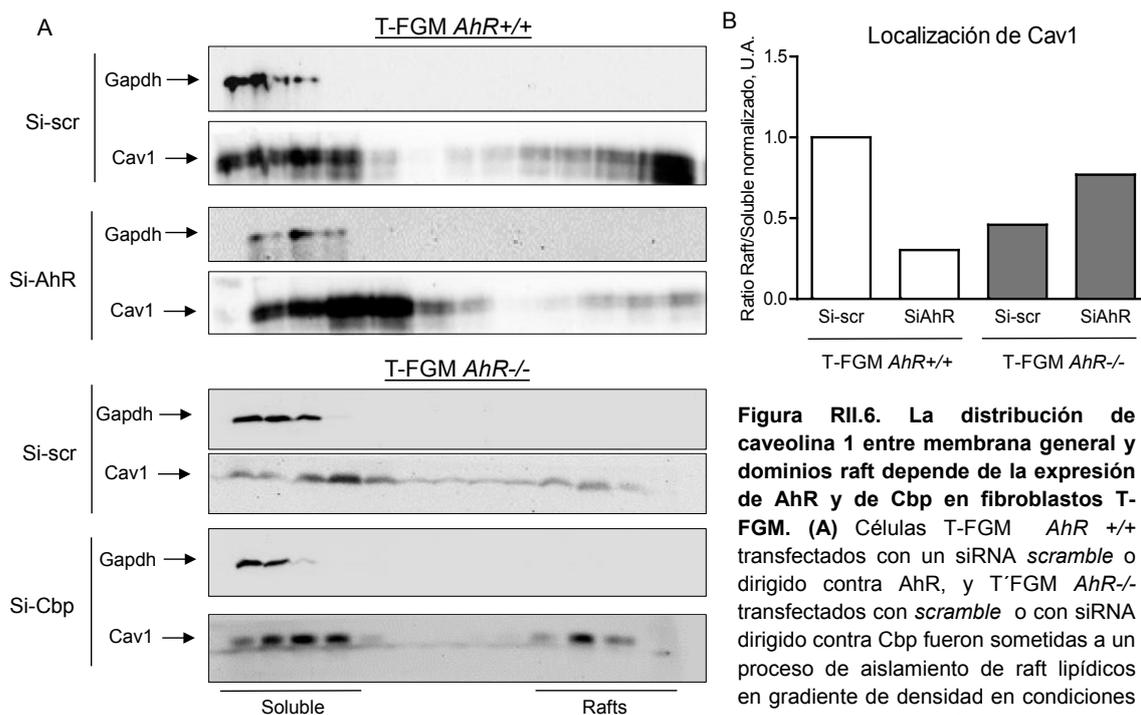


Figura RII.6. La distribución de caveolina 1 entre membrana general y dominios raft depende de la expresión de AhR y de Cbp en fibroblastos T-FGM. (A) Células T-FGM *AhR*^{+/+} transfectadas con un siRNA *scramble* o dirigido contra AhR, y T-FGM *AhR*^{-/-} transfectadas con *scramble* o con siRNA dirigido contra Cbp fueron sometidas a un proceso de aislamiento de raft lipídicos en gradiente de densidad en condiciones similares a ensayos anteriores. Tras ello,

se analizó mediante *western-blot* la presencia de caveolina 1 en las diferentes fracciones recogidas. **(B)** La cantidad de caveolina 1 presente en las fracciones raft fue cuantificada y relativizada a la presente en membrana soluble en todas las condiciones. Tras ello se representaron los datos obtenidos en relación al valor obtenido en la condición T-FGM *AhR*^{+/+} transfectada con *scramble* utilizando *Graphpad*.

A continuación nos planteamos profundizar en cómo AhR podría modular la localización y la distribución de caveolina 1 en situaciones fisiológicas celulares. Para ello, nos basamos en varios estudios que han descrito que en células epiteliales, la actividad y la localización intracelular del receptor de dioxina es dependiente de la densidad celular (Ikuta et al. 2009), teniendo una localización nuclear a baja confluencia y una localización citosólica a alta confluencia. En primer lugar, preparamos extractos citosólicos y nucleares de células T-FGM-*AhR*^{+/+} crecidas a baja (20-30%), media (60-80%) y alta confluencia (90-100%) con el fin de comprobar si el aumento de las interacciones célula-célula afectaba la distribución celular de AhR (Figura RII.7A). Los extractos fueron analizados mediante Western-blot para AhR, utilizando como control citosólico Gapdh y como marcador nuclear la subunidad catalítica de la RNA Pol III. Los resultados obtenidos mostraron que, en concordancia con el estudio anteriormente descrito, el aumento de la confluencia del cultivo provocó un descenso en la presencia de AhR en núcleo.

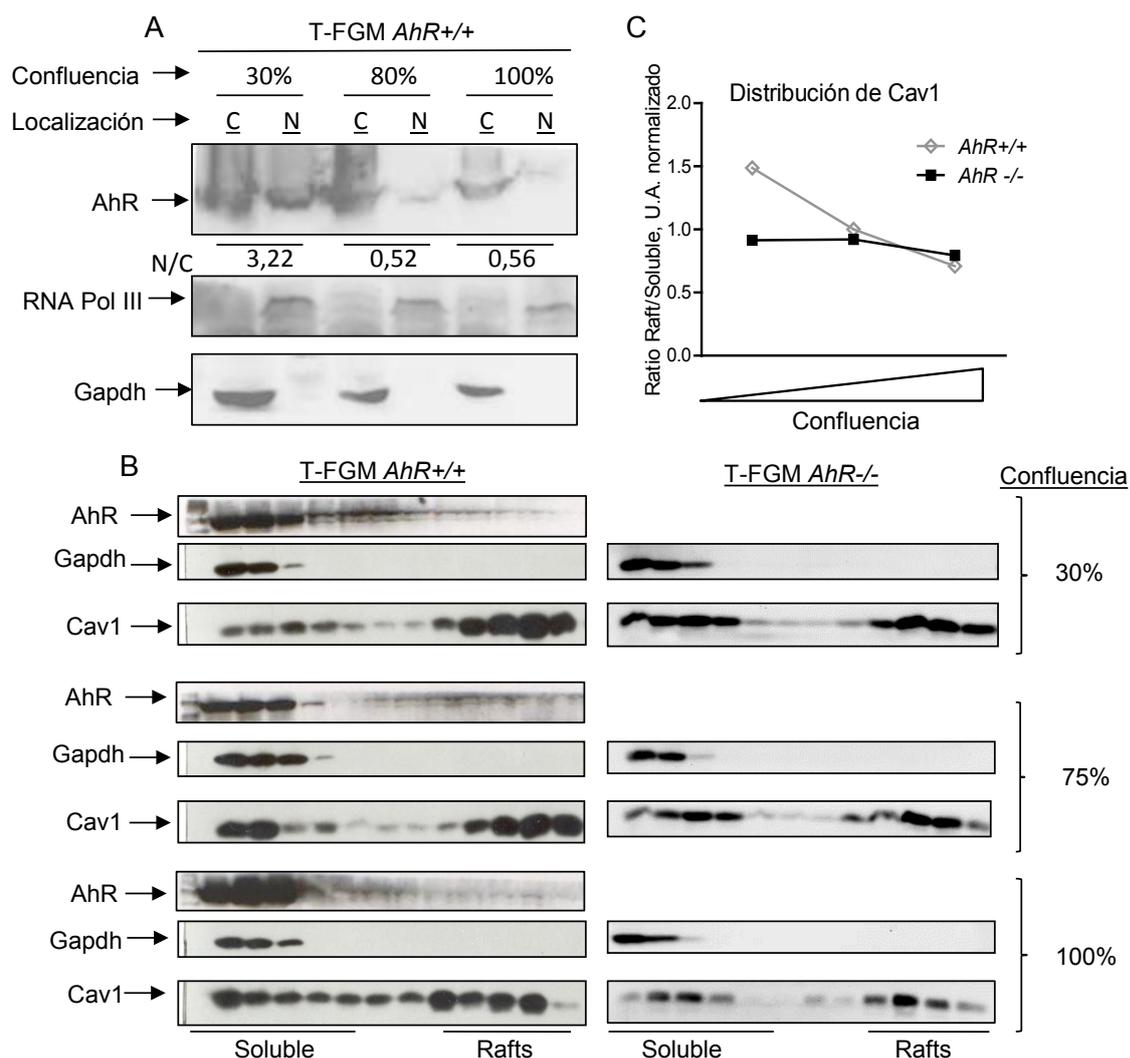


Figura RII.7. La densidad celular del cultivo modula la distribución de caveolina 1 en dominios *raft* en células T-FGM de una manera AhR dependiente. (A) 5×10^6 células T-FGM-*AhR*^{+/+} crecidas a baja (30%), media (70%) y alta confluencia (100%) fueron sometidos a un proceso de extracción de proteínas citosólicas y nucleares. Tras ello, se cargaron 30 mg de proteína total en cada calle de un gel de acrilamida, alternando las fracciones citosólicas y nucleares de cada condición, y se realizó un Western-blot para AhR y para las proteínas Gapdh (citosol) y RNA Pol III (núcleo). La proporción entre el AhR nuclear y el citosólico fue comparada para cada condición y el resultado se muestra bajo las bandas. (B) Los fibroblastos T-FGM-*AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} fueron lisados y sometidos a ultracentrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa. Tras la centrifugación, las fracciones recogidas fueron analizadas mediante Western-blot para AhR, Gapdh y caveolina 1 en el caso de las células silvestres y para Gapdh y Cav1 en el caso de las células carentes del receptor. (C) El contenido de caveolina 1 fue cuantificado digitalmente en las fracciones 1 a 4 (soluble) y 9 a 11 (*rafts*) del gradiente para cada condición del apartado B. A continuación, se normalizó la cantidad de caveolina 1 presente en la fracción *raft* con respecto a la presente en membranas solubles y los resultados fueron normalizados a la condición de confluencia media en células *AhR*^{+/+}.

A continuación, abordamos los experimentos de ultracentrifugación en gradientes de sacarosa, utilizando extractos de células T-FGM-*AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} crecidas a baja, media y alta confluencia (Figura RII.7B). Tras analizar el resultado de los gradientes mediante Western-blot, pudimos comprobar que la confluencia afecta a la distribución de caveolina 1 entre membrana general y dominios *raft*, de manera que una baja confluencia favorece una mayor concentración de caveolina 1 en balsas lipídicas,

descendiendo sus niveles en estos dominios y enriqueciéndose en membrana general (soluble) a medida que la densidad celular aumenta (Figura RII.7B). Interesantemente, el efecto de la confluencia celular sobre la distribución de caveolina 1 es dependiente de la expresión de AhR, en la medida en que los cambios de confluencia no provocaron ningún efecto significativo en la distribución de caveolina 1 en células T-FGM-*AhR*^{-/-}, que permaneció prácticamente constante para todas las densidades del cultivo. La cuantificación de estos resultados (Figura RII.7C) mostró, además, que a alta confluencia, la distribución de caveolina 1 se normaliza entre ambos genotipos, haciéndose entonces independiente de la presencia de AhR.

Resulta interesante destacar que el cambio en la distribución de caveolina 1 que se produce al aumentar la densidad celular, posiblemente refleje una función nuclear del receptor dado que éste se moviliza hacia dicho compartimento celular a altas densidades. No obstante, no podemos descartar la influencia de un papel no genómico de AhR, que podría venir dado por una acción directa o indirecta del receptor localizado en los dominios *raft*.

Una vez analizado el efecto de la confluencia sobre la distribución de caveolina 1, quisimos estudiar si la confluencia también afectaba a la localización celular de

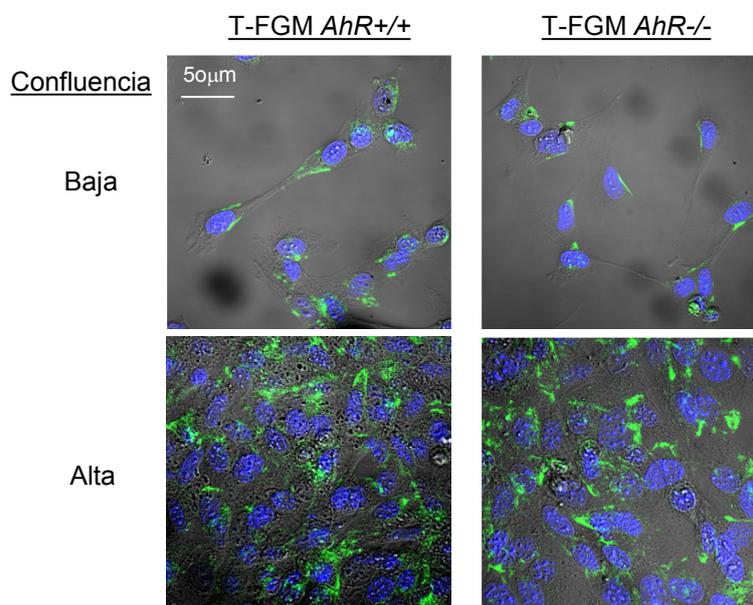


Figura RII.8. La localización de caveolina 1 cambia en fibroblastos *AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} en función de la densidad celular. Las células T-FGM *AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} fueron sembradas sobre cristales e incubados durante 24 h a diferentes densidades celulares. Tras ello, los cultivos fueron fijados y se realizó un ensayo de inmunofluorescencia dirigido a la detección de caveolina 1 por el canal verde. Por último se realizó la tinción con DAPI y se capturaron las imágenes.

caveolina 1. Para ello, se realizaron tinciones inmunofluorescentes en fibroblastos T-FGM-*AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} cultivados sobre cristal a baja y alta confluencia (Figura RII.8). Pudimos comprobar que el crecimiento a alta densidad celular provocó cambios en la distribución de caveolina 1 que igualó parcialmente ambos genotipos, si bien no detectamos la desaparición de la caveolina de las membranas internas en las células

AhR^{+/+} y la existencia de múltiples uniones célula-célula nos impidió realizar un análisis más detallado.

El receptor de dioxina contribuye a la reorganización del citoesqueleto y a la localización intracelular de caveolina 1 durante la migración direccional.

La alteración en la localización de caveolina 1 en fibroblastos carentes del receptor de dioxina, sería previsible que afectara aspectos funcionales tales como la migración direccional. Decidimos por tanto analizar el comportamiento de la célula ante migración direccional. Para ello seleccionamos el ensayo de cierre de herida en placa, ya que, además del defecto en migración direccional descrito en el capítulo I, estudios previos realizados en nuestro laboratorio mostraron que las células T-FGM-*AhR*^{-/-} poseen una capacidad de cierre de herida inferior a la de sus homólogos silvestres (Mulero-Navarro *et al.* 2005). Por otra parte, trabajos realizados en otros modelos han identificado a caveolina 1 como una proteína con distribución polarizada en células sometidas a migración direccional. En dichos trabajos, gran parte de la caveolina 1 aparecía situada en la parte trasera de la célula, mientras que otra fracción de la proteína, generalmente asociada al estado fosforilado en la Y¹⁴, se localizaba en la parte frontal, (Grande-García and del Pozo 2008).

Por todo ello, nos planteamos estudiar el comportamiento de las células ante herida en placa, así como la localización de caveolina 1 en las mismas. Decidimos, en primer lugar, analizar el estado del citoesqueleto de actina en células localizadas en el borde de la herida. A este respecto, estudios anteriores de nuestro laboratorio habían mostrado que los fibroblastos T-FGM-*AhR*^{-/-} desarrollan más fibras de estrés que sus homólogos *AhR*^{+/+} (Carvajal-González *et al.* 2009). La tinción con rodamina-faloidina de células T-FGM de ambos genotipos mostró un cambio significativo en fibroblastos T-FGM-*AhR*^{-/-} no sólo de la intensidad de las fibras de actina sino también de su orientación respecto a la dirección de avance de la célula (Figura RII.9 A).

Este resultado nos llevó a realizar un análisis más exhaustivo de la orientación de las fibras de estrés y para ello utilizamos la herramienta *Orientation J distribution* incluida en el programa *Image J*, adaptando ligeramente el protocolo previamente descrito (Rezakhaniha *et al.* 2012). Del análisis se extrajo, en primer lugar, una representación de la orientación de cada fibra detectada en base al eje X (Figura RII.9 B), de forma que las fibras más próximas a 0°, horizontales y orientadas en la dirección de migración, se marcan en colores “fríos” (azul y verde), mientras que las más próximas a ±90°, verticales y perpendiculares a la dirección de migración, se marcan en colores cálidos (rojo y amarillo). En segundo lugar, se realizó una cuantificación de la

intensidad de señal fluorescente en función de la orientación de las fibras a lo largo del eje X (Figura RII.9, C). De este análisis pudimos comprobar que las intensidades en los fibroblastos T-FGM-*AhR*^{+/+} eran mayores en las zonas correspondientes a valores

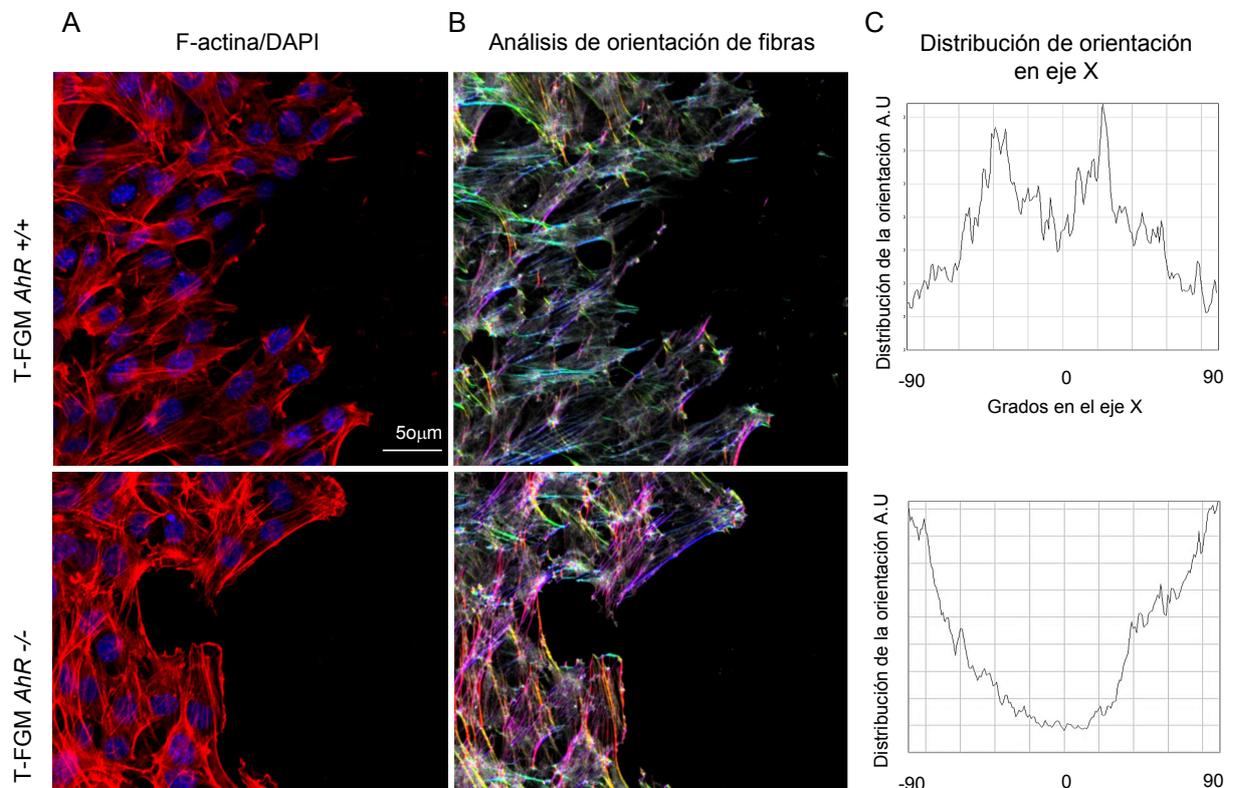


Figura RII.9. La expresión de AhR determina la velocidad de reorientación de las fibras de actina ante herida *in vitro*. (A) Los fibroblastos T-FGM-*AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} fueron sembrados sobre cristales y crecidos durante 24 h hasta alcanzar una confluencia adecuada. Tras ello, se realizó una herida en el cultivo y las células se incubaron durante 8 h adicionales, periodo tras el que se fijaron y procesaron por tinción con rodamina-faloïdina para observar las fibras de F-actina. También se realizó una tinción con DAPI para marcar los núcleos celulares. Las imágenes fueron tomadas mediante microscopía confocal. (B) Se seleccionó el canal rojo y las imágenes tomadas se procesaron digitalmente para la medición de la orientación de las fibras mediante la herramienta *Orientation J* en el programa ImageJ. Se seleccionaron como variables la orientación en el eje X de las fibras (colores marcados en la barra inferior) y la intensidad de señal de las mismas (intensidad de color asociado). La imagen resultante fue posteriormente analizada. (C). Las imágenes generadas en el apartado anterior fueron analizadas y la intensidad de fluorescencia total obtenida representada por grado en el eje X (desde -90 hasta 90) mediante el correspondiente diagrama.

cercanos a 0°, mientras que en los fibroblastos *AhR*^{-/-} los picos de intensidad aparecían cerca de las zonas perpendiculares al eje X ($\pm 90^\circ$). Globalmente, estos datos sugieren que las células T-FGM carentes del receptor de dioxina presentan un retardo en la reorientación de su citoesqueleto de actina ante un estímulo de migración direccional, lo que puede ser responsable de su menor tasa de migración direccional. Debe indicarse, no obstante, que ambos genotipos igualan la orientación de sus filamentos de actina a tiempos largos tras 16 h de migración.

Tras el estudio del comportamiento diferencial de las fibras de estrés entre fibroblastos que expresan o que carecen de AhR, nos propusimos analizar el comportamiento de la

caveolina 1 ante migración direccional. Llevamos a cabo el mismo ensayo de herida in vitro descrito anteriormente, pero realizando una tinción inmunofluorescente frente a caveolina 1 (Figura RII.10). Pudimos comprobar que mientras que caveolina 1 se localizaba tanto en la parte trasera como en la parte delantera en células T-FGM *AhR*^{+/+} en proceso migración, esta proteína quedaba relegada en su práctica totalidad a la parte trasera del eje de migración en los fibroblastos T-FGM-*AhR*^{-/-}. Para comprobar si estos efectos tienen también lugar en células en cultivo primario, realizamos el mismo ensayo utilizando fibroblastos de la dermis procedentes de ratones *AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-}.

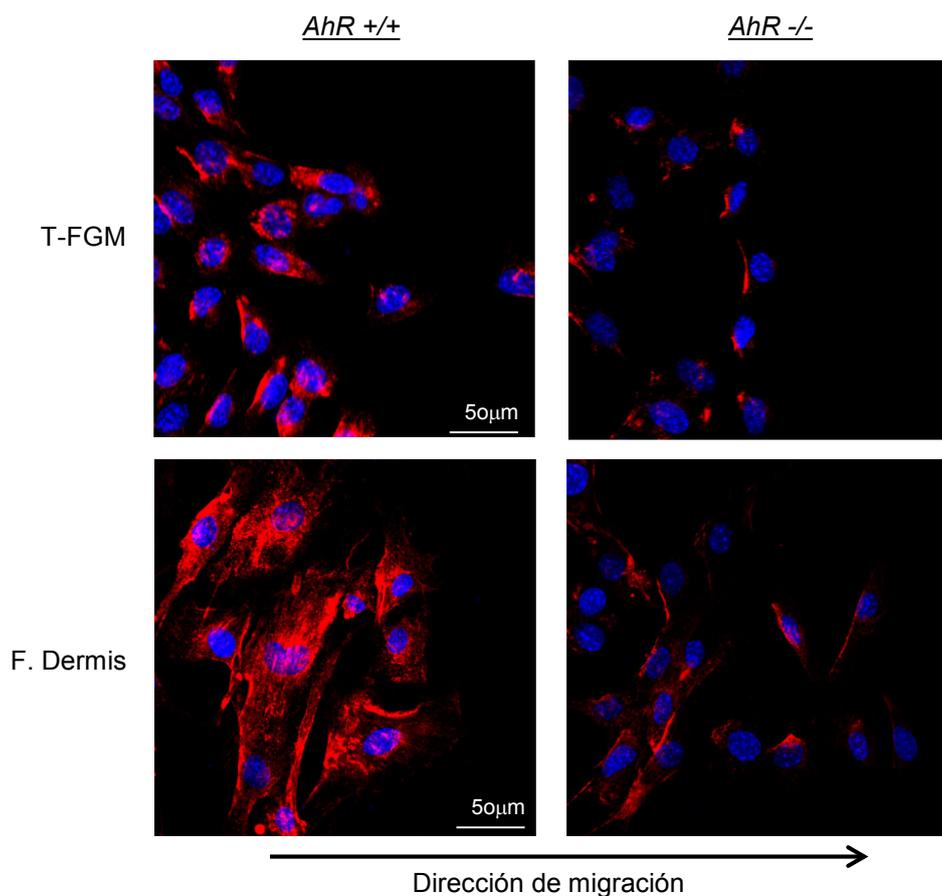


Figura RII.10. Los fibroblastos carentes de AhR no localizan caveolina 1 en la parte delantera de las células en migración. Los fibroblastos inmortalizados T-FGM y los fibroblastos primarios de la dermis de ratones *AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} fueron crecidos hasta subconfluencia y se realizó una herida con una punta de pipeta. Tras 8 h de recuperación del cultivo, las células fueron fijadas, y teñidas para la detección inmunofluorescente de caveolina 1. Las células se teñieron también con DAPI. El resultado fue observado mediante microscopía confocal.

Observamos un patrón de localización entre las zonas anterior y posterior de la célula similar a la presente en los fibroblastos (Figura RII-10), lo que apoya el papel de AhR en la distribución de caveolina 1 en células sometidas a migración.

El estado de fosforilación de la Y¹⁴ de caveolina 1 no es responsable de su patrón de localización en fibroblastos *AhR*^{-/-}.

Ante la reproducibilidad del fenotipo mostrado por ambas líneas de fibroblastos *AhR*^{-/-} en la localización de caveolina 1, decidimos estudiar sus posibles causas moleculares. Comenzamos el estudio analizando el papel de la fosforilación en el residuo Y¹⁴, ya que como se describió en el capítulo I, ésta está sensiblemente

disminuída en fibroblastos T-FGM-*AhR*^{-/-}. Además, varios estudios han descrito que en células migrando en 2-D y en 3-D, la caveolina 1 fosforilada se libera de las caveolas y se desplaza al frente de migración, donde es responsable de la estabilización de FAK (Parat et al. 2003; Beardsley et al. 2005; Hill et al. 2012). Por otro lado, los hepatocitos de hígados sometidos a hepatectomía parcial mostraron que la fosforilación de AhR es necesaria para la internalización de caveolina 1 (Mayoral et al. 2007). En base a todo ello, hipotetizamos que el fenotipo de distribución de caveolina 1 presente en células *AhR*^{-/-} podría deberse a un estado hipofosforilado de su tirosina 14.

Para investigar dicha posibilidad, transfectamos caveolina 1 silvestre fusionada a GFP (Cav1-GFP) así como una forma mutada no fosforilable (Cav1 Y14F-GFP) (ambas construcciones cedidas por el doctor Lisardo Boscá) en células T-FGM-*AhR*^{+/+} con el objetivo de comprobar si la no fosforilación de caveolina 1 inducía un fenotipo *AhR*^{-/-} en los fibroblastos *AhR*^{+/+}. De acuerdo con nuestros resultados previos, la Cav1-GFP ectópica también localizaba diferencialmente en fibroblastos *AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} (Figura

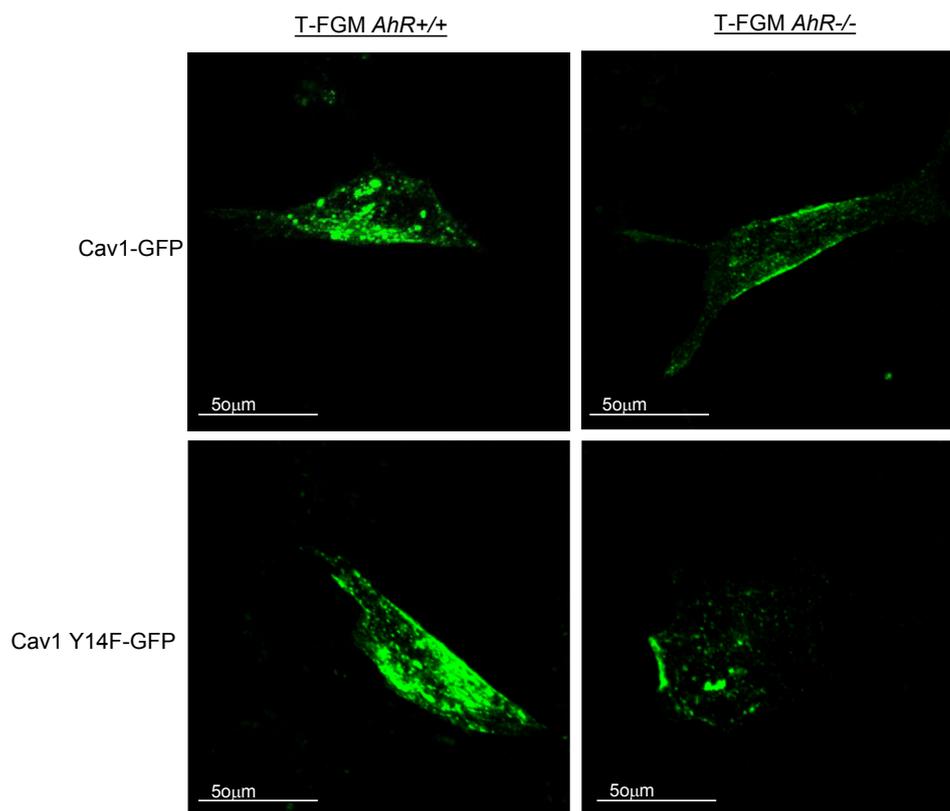


Figura RII.11. Cav1-GFP se localiza diferencialmente en células T-FGM-*AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} y es independientemente de su capacidad de fosforilación en la Y14. Células T-FGM de ambos genotipos fueron crecidas a baja confluencia sobre cristales y transfectados con la proteína de fusión Cav1-GFP y su versión no fosforilable Cav1 Y14F-GFP. Tras 24 h de incubación las células fueron observadas por microscopía confocal de célula viva en condiciones de temperatura controlada.

RII.11) mientras que la expresión de la forma no fosforilable Y14F-GFP no produjo un cambio significativo en su localización con respecto al de la proteína silvestre Cav1-

GFP, sugiriendo que el patrón observado es independiente de su fosforilación en el residuo Y14 (Figura RII.11). Adicionalmente, la construcción mutada Y14F-GFP fue detectada en células *AhR*^{+/+} tanto en membrana plasmática como en membranas internas, sin que se pudiese observar un cambio fenotípico hacia fibroblastos *AhR*^{-/-} (Figura RII.11). Por tanto, podemos concluir que el estado hipofosforilado de caveolina 1 no es responsable de su localización en fibroblastos *AhR*^{-/-}.

En segundo lugar, quisimos comprobar si el estado de fosforilación de caveolina 1 tiene algún papel en los cambios de distribución entre dominios *raft* y dominios de membrana general descritos en células *AhR*^{-/-} (Figura RII.12). Realizamos ensayos de inducción de la fosforilación de caveolina 1 mediante incubación con pervanadato sódico (Na₃O₄V). En estos experimentos, comparamos mediante Western-blot el incremento en la cantidad de caveolina 1-Y¹⁴ con respecto a su contenido celular (Figura RII.12A). Tanto los fibroblastos T-FGM-*AhR*^{+/+} como los *AhR*^{-/-} mostraron una un significativo

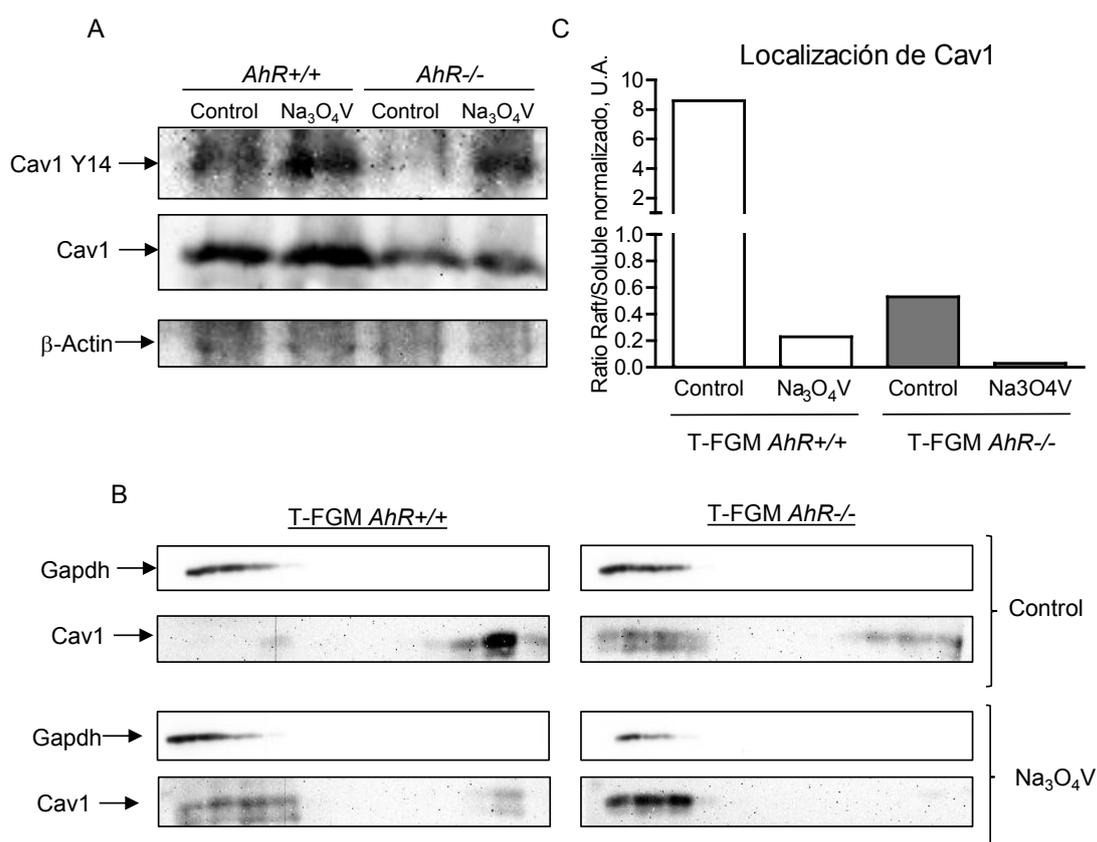


Figura RII.12. La fosforilación de caveolina 1 en la Y14 disminuye sus niveles en dominios *raft* en células T-FGM de ambos genotipos. (A) Los fibroblastos T-FGM-*AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} tratados o sin tratar con Na₃O₄V fueron procesados para obtener extractos proteicos totales, los cuales fueron analizados mediante Western-blot para detectar la forma fosforilada de Cav1-Y¹⁴ y de Cav1 total. β -actina fue empleada como control de carga. (B) Las células T-FGM de ambos genotipos fueron tratados o no con Na₃O₄V y procesados para su análisis en gradientes discontinuos de sacarosa. Las alícuotas recogidas del gradiente fueron analizadas por Western-blot contra Cav1; Gapdh se empleó como control de las fracciones citoplásmicas.

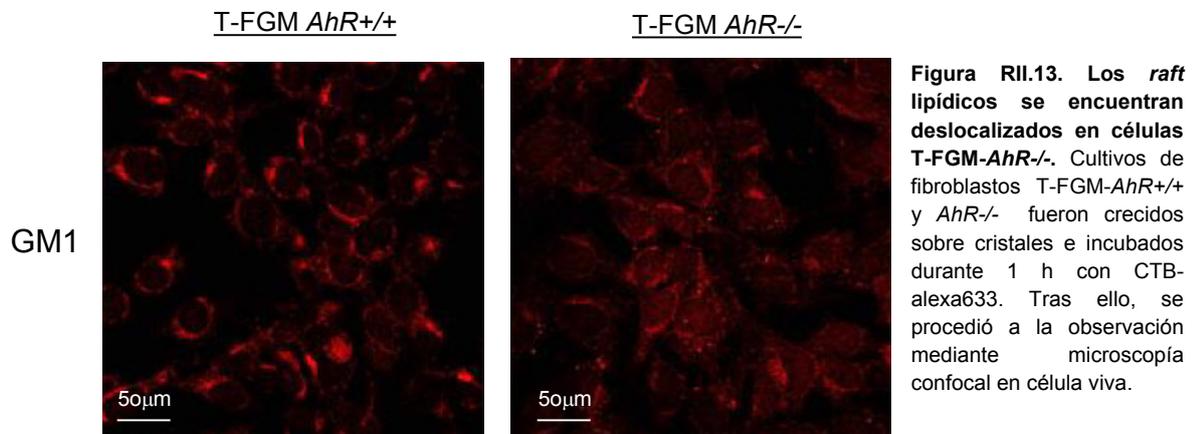
incremento en los niveles de fosfo-Y¹⁴ en presencia de Na₃O₄V, indicando que las células *AhR*^{-/-} no tienen alterado su potencial para fosforilar dicho residuo en la caveolina 1. A continuación, analizamos la distribución de caveolina 1 en gradientes de densidad tras tratamiento con Na₃O₄V por si su estado de fosforilación afecta su distribución entre dominios de membrana (Figura RII-12B). El resultado mostró que en ambos genotipos la adición de Na₃O₄V provocó una disminución similar en los niveles de caveolina 1 en las fracciones *raft*, lo que concuerda con los datos obtenidos por otros autores en experimentos de hepatectomía parcial (Mayoral *et al.* 2007). Por tanto, la presencia de una menor cantidad de caveolina 1 en fracciones *raft* detectada en fibroblastos T-FGM-*AhR*^{-/-} no es probable que sea debida a su bajo estado de fosforilación, lo que sugiere que el proceso por el que la expresión de AhR modula la distribución de caveolina 1 en membrana es independiente de la fosforilación de ésta última.

La movilidad de caveolina 1 en la membrana plasmática es menor en fibroblastos T-FGM-*AhR*^{-/-} pero no depende de la velocidad de transporte de vesículas.

Una vez descartada la fosforilación en Y¹⁴ como responsable de la distribución alterada de caveolina 1 en los fibroblastos carentes del receptor de dioxina, decidimos abordar el problema desde una segunda hipótesis en la que planteamos que los problemas de localización de caveolina 1 podían ser debidos a defectos en su movilidad.

Así, en primer lugar decidimos comprobar el estado de los dominios *raft* en presencia y ausencia del receptor de dioxina, ya que existe una fuerte interrelación entre la funcionalidad de caveolina 1 y la estabilidad y conformación de estos dominios de membrana. De hecho, caveolina 1 ha sido implicada en el transporte intracelular de colesterol, componente esencial de los *rafts* (Bastiani and Parton 2010) y en la internalización del gangliósido GM1 (Pelkmans *et al.* 2002). Por otra parte, las caveolas, en las que caveolina 1 tiene una función relevante, se consideran unas de las principales estructuras asociadas a balsas lipídicas (Parton and Richards 2003). Para nuestros experimentos, seleccionamos GM1 como marcador de estos dominios y lo detectamos por su unión a la subunidad β de la toxina colérica unida al fluoróforo (CTB-alexa633) mediante microscopía confocal en célula viva (Figura RII.13).

Los resultados mostraron una deslocalización generalizada de los *rafts* en los fibroblastos carentes del receptor, con una mayor presencia en las membranas internas y una menor intensidad en los acúmulos de membrana plasmática.



Esta mayor deslocalización de los *rafts* en ausencia de AhR apoyaba el posible papel de la composición de membrana en la distribución de caveolina 1. Por ello, realizamos ensayos de recuperación de fluorescencia tras fotodesgaste o FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*), que permite observar la velocidad de difusión de moléculas fluorescentes hacia una zona de la que han sido eliminadas. Empleamos fibroblastos T-FGM-*AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} transfectados con Cav1-GFP en los que se adquirieron imágenes cada 2 minutos tras el photobleaching; estas imágenes fueron empleadas para establecer los perfiles de fluorescencia y para observar los cambios producidos en función del tiempo (Figura RII.14A).

Los resultados mostraron que las células T-FGM-*AhR*^{+/+} recuperan la señal de Cav1-GFP en la zona de interés en un tiempo inferior al que emplean las células *AhR*^{-/-}. Así, tras 10 minutos de ensayo, los fibroblastos *AhR*^{+/+} ya habían iniciado la movilización, observándose la migración de vesículas desde zonas próximas de la membrana. En cambio, los fibroblastos *AhR*^{-/-} mostraron una recuperación más lenta, con un movimiento de vesículas Cav1-GFP de una intensidad relativa menor y sólo apreciable a tiempos más largos cercanos a los 20 minutos (Figura RII.14A-B). Estos resultados indican que la movilidad en membrana de caveolina 1 está afectada en células T-FGM-*AhR*^{-/-}, lo que podría contribuir a los cambios de localización observados tanto basalmente como ante migración direccional.

Teniendo en cuenta estos resultados y los defectos en la reorientación de los filamentos de actina observados en ensayos de herida in vitro (Figura RII.9), decidimos analizar el transporte intracelular de vesículas caveolina 1 en condiciones celulares basales. Para

ello, realizamos seguimientos in vivo del comportamiento de vesículas Cav1-GFP en células T-FGM-*AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} (Figura RII.15) tomando imágenes a lo largo del eje Z de la célula (en intervalos de 1 μm) durante 20 minutos. Tras hacer la proyección de las imágenes en el eje Z y un seguimiento manual del movimiento de cada vesícula (utilizando la herramienta *Manual Tracking* del programa *Image J*) se cuantificaron la distancia total y la distancia efectiva de hasta un total de 15 vesículas por célula.

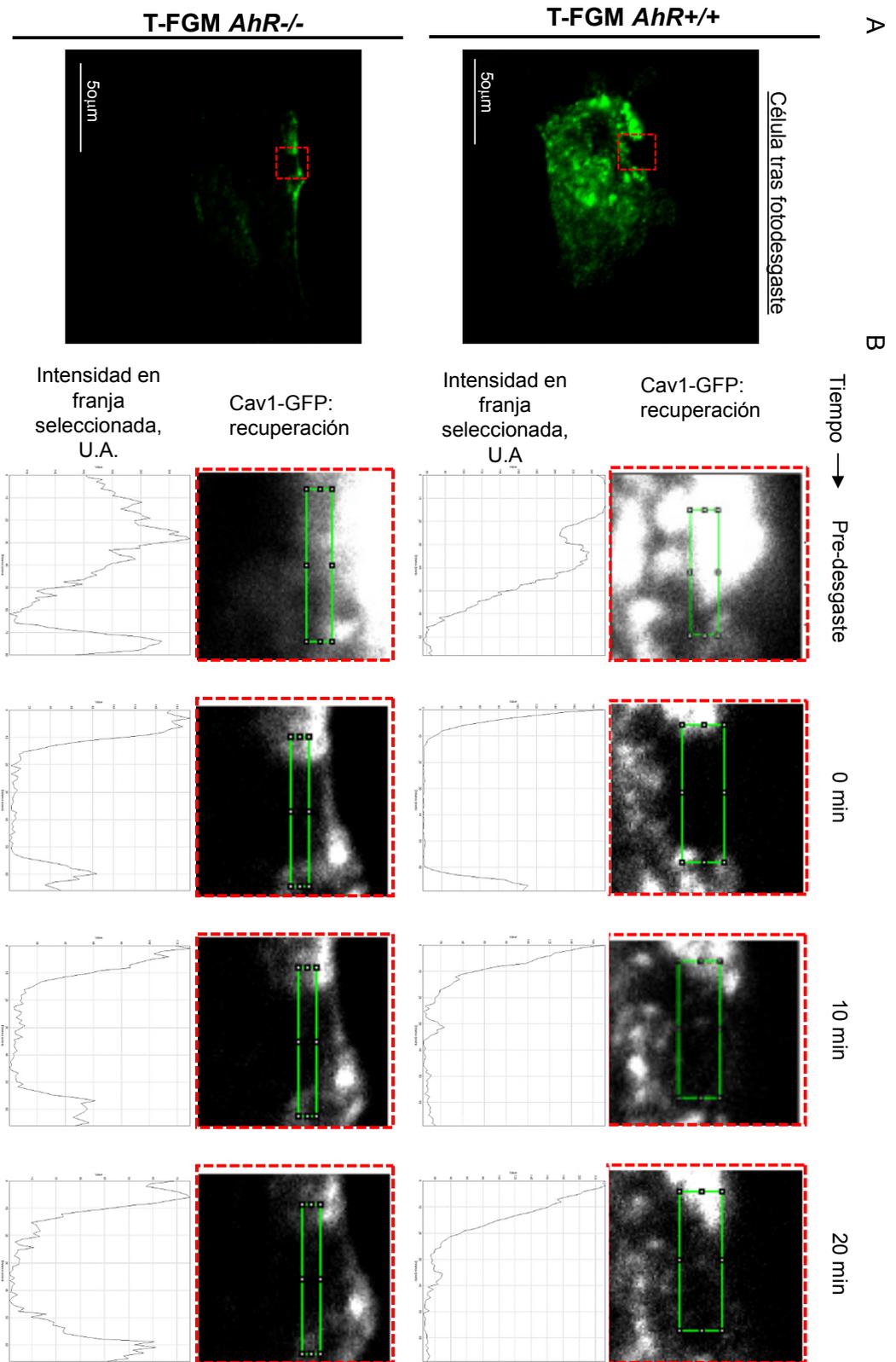
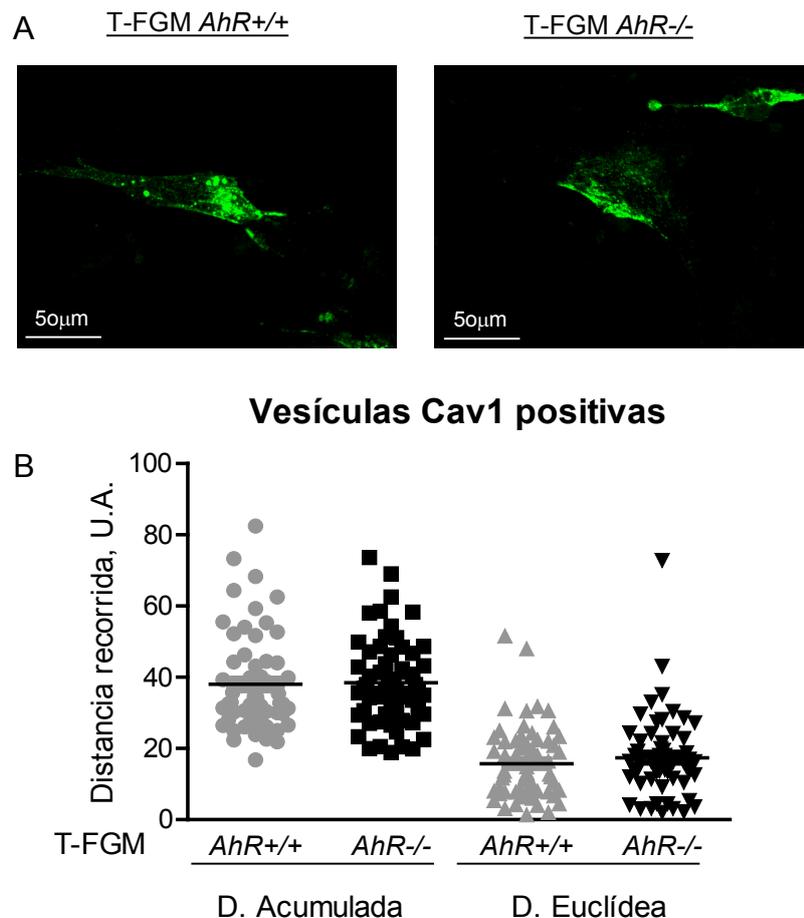


Figura RII.14. Los fibroblastos T-FGM-*AhR*^{-/-} recuperan más lentamente la señal de Cav1-GFP tras FRAP. (A) Las células T-FGM-*AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} transfectadas con Cav1-GFP fueron analizadas por microscopía confocal de fluorescencia en condiciones de temperatura y humedad estables. A continuación se seleccionó una zona cuadrada de unas 10 µm de lado cuya fluorescencia fue eliminada tras sucesivos pulsos de blanqueamiento por láser a 488 nm. Las imágenes mostradas corresponden a la primera captura tras el quemado I. (B) Se realizó una captura de imágenes cada 2 minutos tras la acción del láser hasta un total de 30 minutos de seguimiento. Tras ello, se seleccionó la zona de interés recuadrada en rojo discontinuo, la cual está compuesta por el área quemada y las zonas adyacentes, y se realizó una medida de la intensidad de fluorescencia en la zona señalizada por un rectángulo verde. Los gráficos correspondientes a la situación previa al fotodesgaste y a 0, 10 y 20 minutos tras el mismo.

Los resultados obtenidos mostraron que los fibroblastos T-FGM de ambos genotipos poseían una capacidad similar de transporte intracelular de vesículas Cav1-GFP positivas ya que tanto la distancia acumulada media, como la distancia euclídea media fueron muy similares entre ellos. Esto nos hizo concluir que el receptor de dioxina no parece regular el transporte intracelular de vesículas, por lo que este proceso no debe estar implicado en la localización alterada de caveolina 1 en ausencia de AhR.

Figura RII.15. Las vesículas Cav1-GFP son movilizadas de manera similar en células T-FGM-AhR+/+ y AhR-/-. (A)

Células de ambos genotipos fueron transfectadas con Cav1-GFP y crecidas en cristales para su observación por microscopía confocal en condiciones de temperatura y humedad controladas. El movimiento de la fluorescencia fue seguido tomando una imagen cada μm a lo largo del eje Z durante 20 min. Las imágenes mostradas son proyecciones conjuntas del eje Z a uno de los tiempos del experimento. (B) Se realizó un seguimiento manual del movimiento de cada vesícula a lo largo del tiempo y se calcularon las distancias acumulada y euclídea recorridas por cada una de ellas. Al menos 15 vesículas de al menos 3 células por cada condición están representadas en la gráfica.



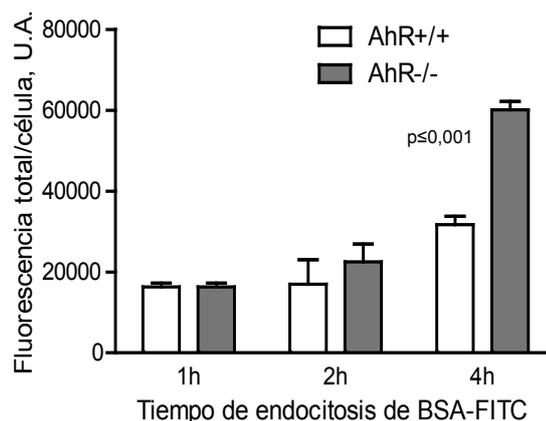
La ausencia del receptor de dioxina provoca un aumento en la endocitosis dependiente de caveolas.

El hecho de que la carencia de expresión de AhR produjera la deslocalización de los dominios *rafts* y una distribución alterada de caveolina 1 en células en migración, nos llevó a comprobar si dicho fenotipo afecta a uno de los procesos en los que caveolina 1 tiene un papel principal: la endocitosis vía caveolas. Esta hipótesis está basada en la importancia de la interacción entre los dominios *raft* y la caveolina en la

formación de caveolas, así como en el papel de ambos en la internalización de moléculas cargo como por ejemplo partículas del virus SV40 (Pelkmans and Helenius 2002; Echarri et al. 2007).

Para abordar este estudio funcional decidimos seleccionar como molécula cargo la albúmina de suero bovino (BSA) ya que la endocitosis de esta proteína desde el plasma sanguíneo es dependiente de la expresión de caveolina 1 en células endoteliales (Schubert et al. 2001) y en fibroblastos (Razani et al. 2001). Llevamos a cabo incubaciones de células T-FGM-*AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} con BSA ligado al fluoróforo FITC a diferentes tiempos y se tomaron imágenes por microscopía confocal de la endocitosis producida (Figura RII.16). La fluorescencia total detectada por célula fue cuantificada para cada condición y los resultados mostraron que los fibroblastos T-FGM carentes del receptor de dioxina tienen una capacidad mayor de internalización de BSA, que fue más efectiva a las 4 horas de incubación con cargo.

Figura RII.16. Los fibroblastos T-FGM-*AhR*^{-/-} tienen mayor capacidad de endocitosis del cargo BSA-FITC. Células T-FGM de ambos genotipos fueron crecidas en cristales durante 24 h. Tras ello, se realizaron varios lavados y una incubación final de 2 h en medio sin suero,. Seguidamente, las células fueron incubadas durante 1, 2 o 4 h con BSA-FITC 10 μ M. Por último, se realizó la tinción de Hoechst para DNA, se realizaron lavados para eliminar el BSA-FITC del medio y las células fueron observadas por microscopía confocal. Las imágenes fueron analizadas y su fluorescencia total por célula calculada con el programa *Image J*. El resultado fue representado y analizado estadísticamente utilizando *GraphPad Prism 6.0*.



A partir de estos resultados, decidimos analizar las intensidades de fluorescencia del cargo endocitado, cuantificando no sólo el espacio ocupado por el BSA-FITC sino también la intensidad de señal procedente de cada vesícula. Para este fin utilizamos la aplicación *Heat map histogram* del programa *Image J* y representamos el área de internalización por célula en función de su intensidad de señal. Estos experimentos fueron realizados en nuestras líneas de células T-FGM y en fibroblastos de la dermis procedentes de ratones *AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-}. Pudimos observar que ambos tipos de fibroblastos *AhR*^{-/-} internalizaron y acumularon más BSA en sus endosomas que las células *AhR*^{+/+}, apreciándose una mayor diferencia con respecto a las células silvestres en las zonas de más alta intensidad (a la derecha en el eje X) (Figura RII.17).

El siguiente objetivo fue comprobar si la endocitosis de BSA-FITC era dependiente de la internalización por caveolas. Para ello utilizamos los reactivos metil- β -

ciclodextrina (M β CD) y nistatina, ambos empleados habitualmente como inhibidores de caveolas (Yumoto et al. 2006; Chen et al. 2012) ya que secuestran el colesterol presente en las membranas celulares, disolviendo los dominios *raft* (Allen et al. 2005).

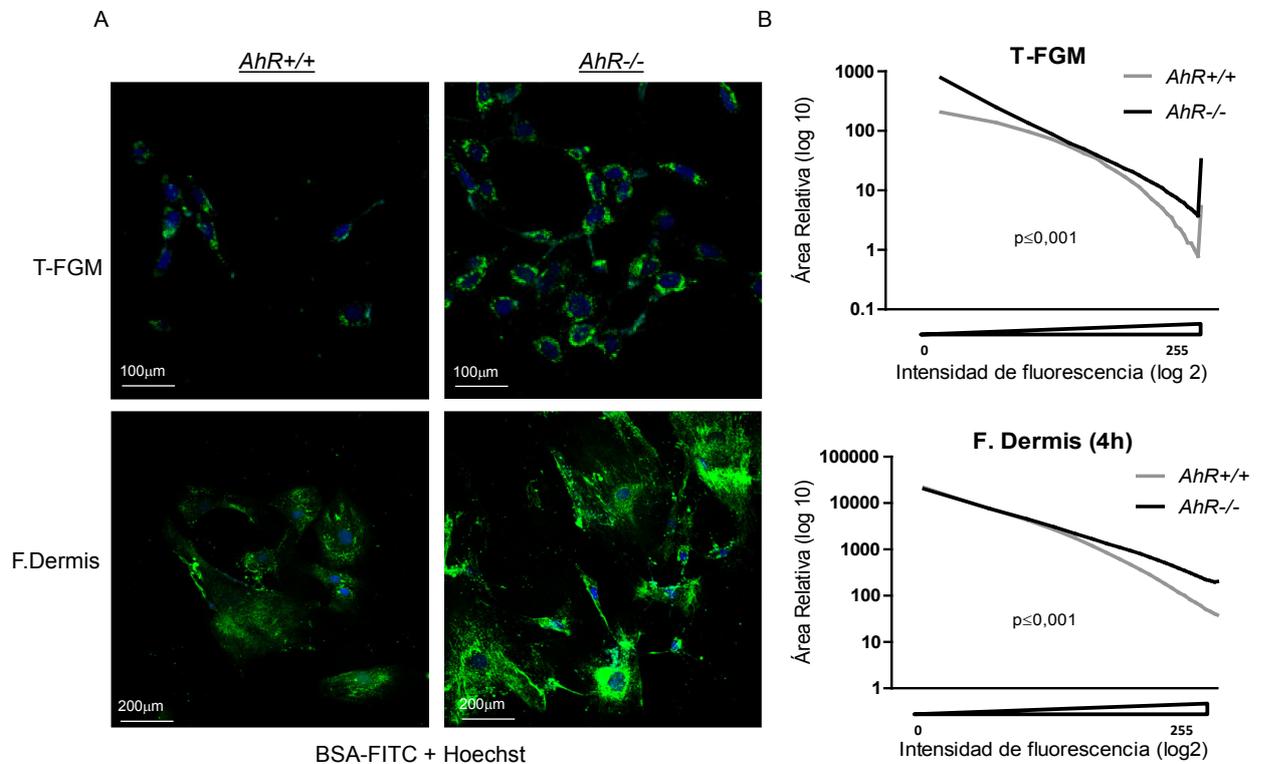


Figura RII.17. Los fibroblastos *AhR*^{-/-} endocitan y acumulan de forma más intensa la proteína cargo BSA-FITC. (A) Los fibroblastos T-FGM y los fibroblastos de la dermis de ratones *AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} fueron crecidos sobre cristales, incubados en medio sin suero durante 2 h y expuestos a BSA-FITC durante 4 h. Tras una tinción con Hoechst para el marcaje de los núcleos, las células fueron observadas por microscopía confocal. Las imágenes fueron analizadas y su fluorescencia total por célula calculada con el programa *Image J*. El resultado fue representado y analizado estadísticamente utilizando *GraphPad Prism 6.0*. (B) Las imágenes procedentes de tres ensayos de endocitosis realizados a 4 h en células T-FGM y en fibroblastos de la dermis *AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} fueron analizadas con la herramienta “*Heat map histogram*” que cuantificó la intensidad de fluorescencia por píxel y estableció el área correspondiente a cada intensidad. Esta información fue normalizada con respecto al total de núcleos observados en cada imagen. El resultado se representó utilizando *GraphPad Prism 6.0* y las tendencias de cada condición fueron analizadas utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov.

El tratamiento con M β CD disminuyó sensiblemente la endocitosis de BSA-FITC en las células T-FGM de ambos genotipos, sugiriendo que los *rafts* y las caveolas están implicadas en dicho proceso (Figura RII.18A) Nistatina produjo el mismo efecto que M β CD en la endocitosis, si bien su intensidad fue menor (no mostrado).

El exceso de colesterol presente en fibroblastos T-FGM-*AhR*^{-/-} es, en parte, responsable del fenotipo mostrado por estas células.

Teniendo en cuenta los efectos producidos por M β CD y por nistatina, quisimos determinar el papel del colesterol en la endocitosis por caveolas de nuestras líneas

celulares. De hecho, se ha mostrado que la caveolina puede estar implicada en la distribución subcelular de colesterol (Martin and Parton 2005) y que éste es indispensable para la estabilidad de las caveolas (Lajoie and Nabi 2010), posiblemente por interacción directa con caveolina (Rothberg et al. 1992). Se ha descrito incluso que un aumento del colesterol celular induce un incremento en la capacidad endocítica vía caveolas (Sharma et al. 2004).

Realizamos por tanto ensayos de endocitosis en fibroblastos T-FGM-*AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} tratados con colesterol en presencia de M β CD a baja concentración como transportador del colesterol al interior celular (Christian et al. 1997).

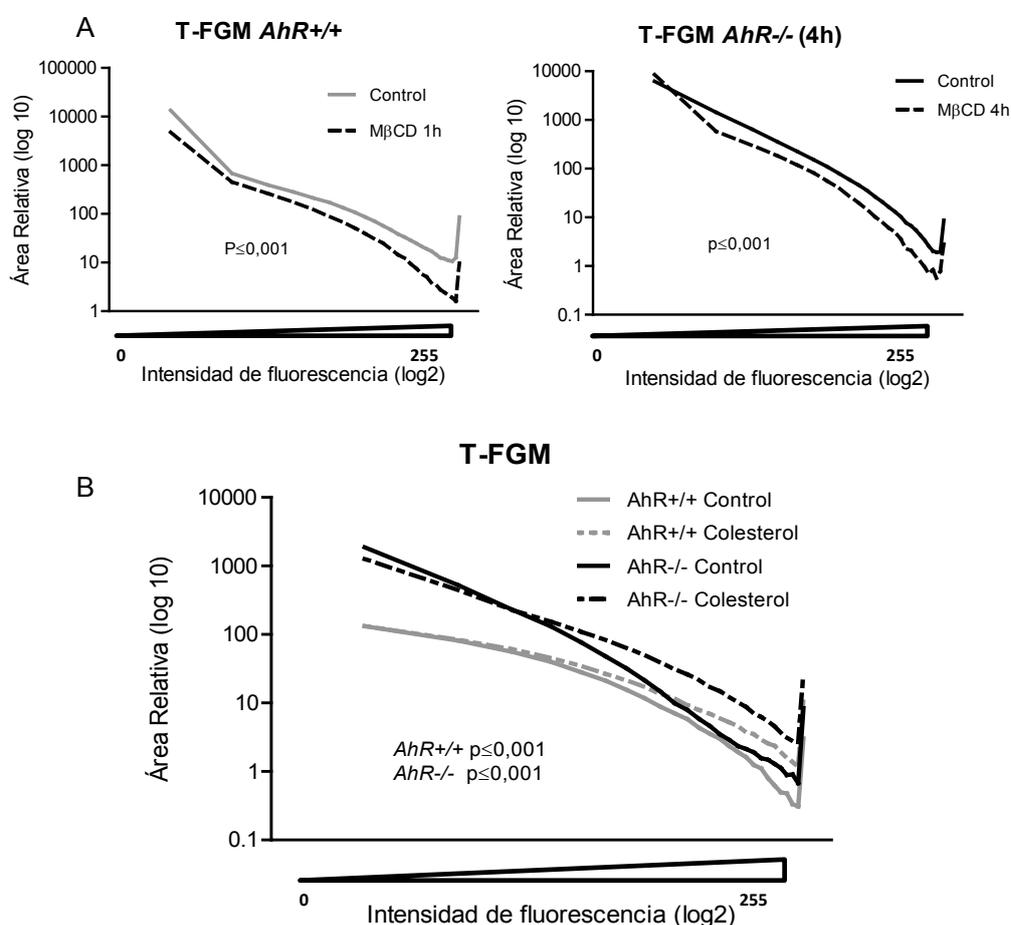


Figura RII.18. La capacidad de endocitosis de fibroblastos T-FGM se ve afectada por el disruptor de rafts M β CD y estimulada por la adición de colesterol. (A) Las células T-FGM-*AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} fueron crecidas sobre cristales e incubadas o no con M β CD 10 mM durante una hora en medio sin suero. A continuación, los cultivos fueron lavados y expuestos a BSA-FITC durante 4 h. Se procedió a la toma de imágenes y a su análisis siguiendo el mismo procedimiento que el empleado en experimentos anteriores. **(B)** Las células T-FGM-*AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} en crecimientos sobre cristales fueron incubadas durante 16 h con una mezcla de colesterol 100 μ M y M β CD 2.5 mM en medio completo o bien mantenidas en condiciones estándar de cultivo. Tras ello, se realizaron los ensayos de endocitosis en las diferentes condiciones y los análisis de fluorescencia fueron representados y analizados estadísticamente según el test de Kolmogorov-Smirnov, comparando controles y tratamientos para cada genotipo.

Los resultados mostraron que el tratamiento con colesterol aumentó la capacidad de endocitosis de BSA-FITC en ambos genotipos, consiguiendo que las células tratadas internalizaran y acumularan más BSA que las no tratadas (Figura RII.18B). Estos datos indican, en primer lugar, que el colesterol actúa como un potente inductor de la endocitosis por caveolas en células T-FGM y, en segundo lugar, que las diferencias en la captación de BSA entre fibroblastos *AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} pueden ser debidas a un exceso de colesterol en las segundas.

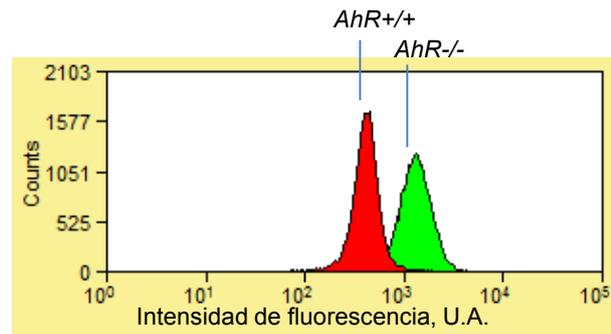


Figura RII.19. La ausencia del receptor de dioxina provoca un aumento del colesterol intracelular en células T-FGM. Los fibroblastos *AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} fueron levantados, fijados y teñidos con filipina III para detectar los niveles endógenos de colesterol. Se analizaron 10⁴ células para cada tipo celular mediante citometría y se representaron los perfiles de fluorescencia obtenidos.

Decidimos entonces realizar mediciones del nivel de colesterol en las membranas celulares de los fibroblastos T-FGM-*AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} utilizando el método de tinción con la molécula fluorescente filipina seguida de detección por citometría. Los resultados mostraron que el nivel basal de colesterol presente en fibroblastos carentes del receptor de dioxina es hasta tres veces superior al presente en fibroblastos silvestres (Figura RII.19). Estos resultados se vieron apoyados por ensayos realizados en fibroblastos de la dermis de ratones de ambos genotipos, aunque en este tipo celular las diferencias obtenidas fueron menores (no mostrado).

Este hallazgo nos llevó a realizar un experimento adicional en el que tratamos células T-FGM- *AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} con M β CD para reducir el nivel de colesterol o con colesterol+M β CD (baja concentración) para incrementar sus niveles. Estos cultivos fueron analizados por microscopía de fluorescencia para determinar cambios en la localización de caveolina 1 en células en proceso de migración direccional. Como se muestra en la Figura RII.20A, el tratamiento con M β CD redujo el nivel de caveolina 1 periférica e incrementó su contenido intracelular en ambos genotipos, si bien este efecto fue más apreciable en células *AhR*^{-/-}. La adición de colesterol exógeno a células *AhR*^{+/+} potenció la acumulación de caveolina 1 en zona trasera de las células en migración, induciendo un fenotipo similar al de células carentes de AhR. En los fibroblastos *AhR*^{-/-}, el colesterol acentuó aún más su patrón de distribución de caveolina hacia la parte trasera de la célula. Los tratamientos realizados con M β CD y colesterol+M β CD modularon los niveles de colesterol endógeno en fibroblastos T-FGM-

AhR^{+/+} y *AhR*^{-/-} según lo esperado (Figura RII.20B). Estos resultados sugieren que el mayor nivel de colesterol presente en los fibroblastos T-FGM-*AhR*^{-/-} muy probablemente tenga un papel importante en la localización y distribución de caveolina 1, lo que también puede afectar su funcionalidad en el control de la migración celular.

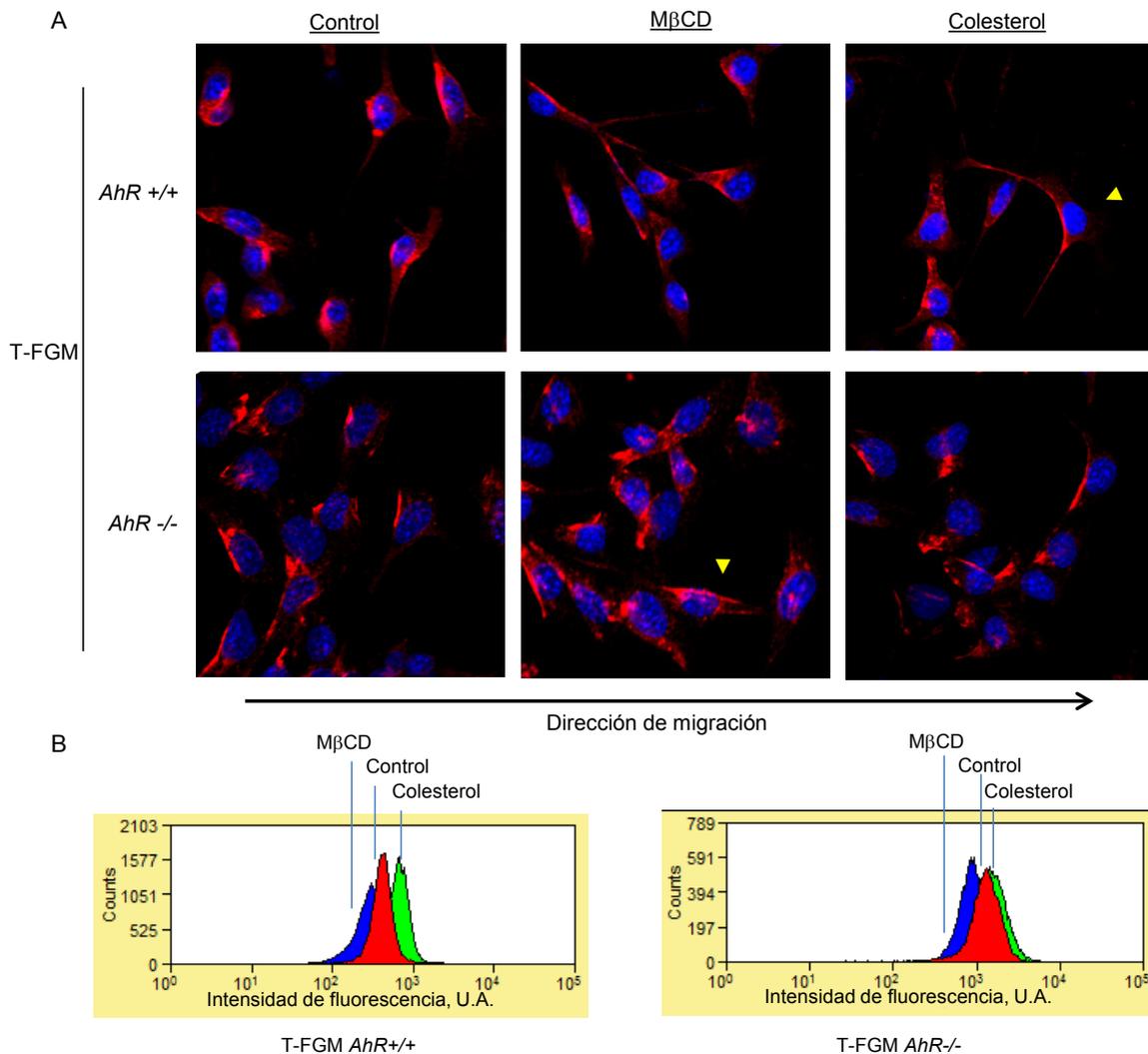


Figura RII.20. Los cambios en los niveles de colesterol celulares en T-FGM *AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} provocan cambios en la localización celular de caveolina 1. (A) T-FGM *AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} crecidos sobre cristales en medio completo fueron incubados en presencia de MbCD 2,5mM, una mezcla de MbCD 2,5mM y colesterol o el solvente relativo durante 16h. Tras ello se realizó un ensayo de cierre de herida *in vitro* durante 8 horas, manteniendo la presencia de los estímulos y se realizó una tinción inmunofluorescente para caveolina 1 y una tinción con DAPI. (B) Fibroblastos *AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} incubados 24h en condiciones similares a las del apartado A fueron levantados, fijados y teñidos con Filipina III para detectar sus niveles celulares de colesterol mediante citometría. Los datos procedentes de 10⁴ células fueron representados en forma de perfiles de intensidad de fluorescencia..

DISCUSIÓN

La importancia del receptor de dioxina en los efectos tóxicos y carcinogénicos provocados por xenobióticos, especialmente por el grupo de tóxicos ambientales conocido como dioxinas, ha focalizado la mayor parte de las investigaciones en torno a esta proteína durante décadas (Poland et al. 1976; Okey et al. 1979; Poland and Knutson 1982; Reyes et al. 1992; Chopra and Schrenk 2011).

Sin embargo, el estudio de las funciones del receptor como factor de transcripción en procesos fisiológicos ha cobrado gran fuerza en los últimos años, basándose en gran parte en el desarrollo de ratones *knock-out* en la década de los años '90 (Fernandez-Salguero et al. 1995; Schmidt et al. 1996; Fernandez-Salguero et al. 1997; Gonzalez and Fernandez-Salguero 1998; Zaher et al. 1998; Abbott et al. 1999; Benedict et al. 2000; Lahvis et al. 2000; Thackaberry et al. 2002; Lund et al. 2003). En este sentido, se ha descrito la implicación de AhR en múltiples procesos como proliferación celular (Puga et al. 2002), diferenciación (Lindsey and Papoutsakis 2012) y en el control de la función hepática (Corchero et al. 2004; Lahvis et al. 2005; Harstad et al. 2006).

En cuanto a la búsqueda de mecanismos de activación de AhR independientes de su unión a xenobióticos, se ha comprobado que los cambios en la confluencia celular o en el estado de fosforilación de la proteína (Ikuta et al. 2004), la pérdida de adhesión celular (Sadek and Allen-Hoffmann 1994; Cho et al. 2004) o la expresión relativa de co-activadores, chaperonas y represores (Kumar et al. 1999; Pollenz and Buggy 2006) (Bernshausen, Jux et al. 2006) afectan a su actividad transcripcional. En este sentido, se está trabajando activamente en la búsqueda de ligandos endógenos para esta proteína que pudieran explicar sus funciones en la fisiología celular (Stejskalova et al. 2011).

Uno de los aspectos más interesantes del papel fisiológico del receptor de dioxina es su implicación en el control de la migración de diferentes tipos celulares, demostrada en varios modelos animales (Mimura et al. 1997; Qin and Powell-Coffman 2004; Diry et al. 2006). Nuestro laboratorio ha centrado gran parte de sus esfuerzos de los últimos años en esta temática, habiendo caracterizado algunos de los mecanismos moleculares responsables de la migración dependiente de AhR, tanto en células epiteliales como mesenquimales.

Es en este último tipo celular donde más resultados se han obtenido, habiendo logrado describir que los fibroblastos carentes del receptor de dioxina tienen disminuida su capacidad de migración, un exceso de fibras de estrés y deficiencias en la generación de lamelipodios (Mulero-Navarro et al. 2005), así como una despolarización y un excesivo tamaño de las adhesiones focales que provocan una forma celular más

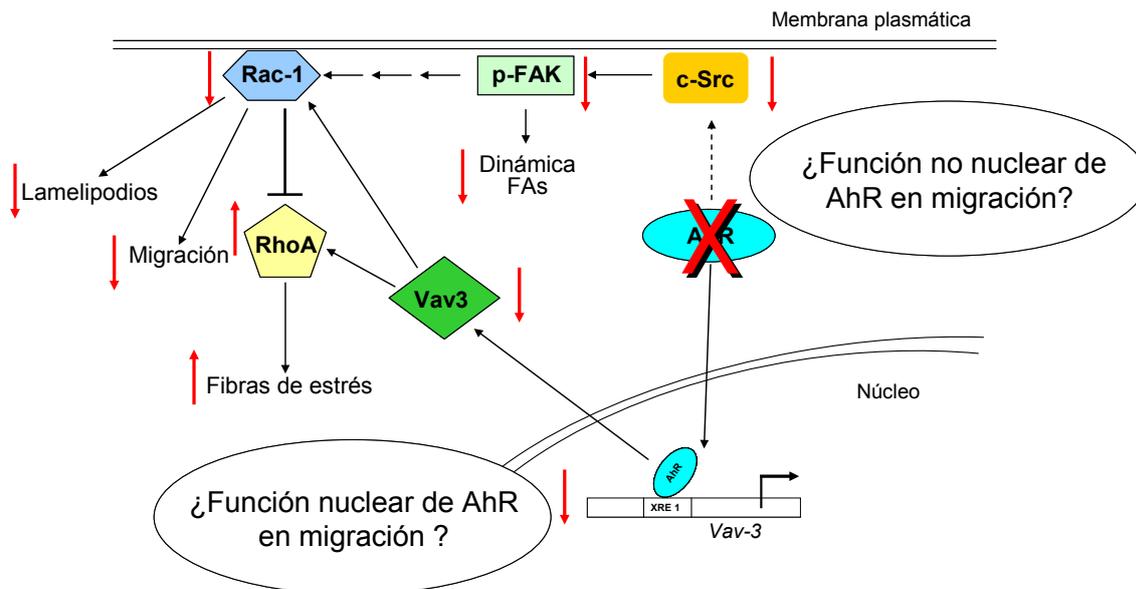


Figura D.1. Modelo de trabajo propuesto para explicar la participación de AhR en el mantenimiento de la morfología y en el control de la adhesión y la migración celulares, (Carvajal-González 2008). Partiendo de la ausencia de AhR en la célula, el esquema detalla la regulación por AhR del equilibrio de activación entre RhoA y Rac1 mediante el control de la expresión del proto-oncogén Vav3, así como el mantenimiento de la activación de c-Src. Se indican también las posibles consecuencias funcionales de ambos mecanismos de regulación.

extendida y con mayor capacidad de adhesión (Carvajal-Gonzalez et al. 2009). En cuanto a las rutas de señalización implicadas, se ha propuesto que el equilibrio entre las Rho GTPasas RhoA y Rac1 queda comprometido en ausencia del receptor debido a un descenso en la expresión del GEF de Rac1 Vav3 (Carvajal-Gonzalez et al. 2009), y que tanto FAK como c-Src se ven afectadas en su estado de fosforilación (Mulero-Navarro et al. 2005; Carvajal-González 2008; Gomez-Duran et al. 2008).

Es a partir de dichos estudios previos donde comienza este trabajo de Tesis Doctoral, en el cual nos planteamos comprender y profundizar en el papel del receptor de dioxina en adhesión y migración. Para ello, hemos identificado y analizado nuevas rutas de señalización y tratado de validar funcionalmente algunos de los intermediarios moleculares implicados. Este trabajo se ha centrado sobre células mesenquimales de fenotipo fibroblástico que expresan o que carecen de receptor de dioxina.

El análisis de la migración direccional de fibroblastos inmortalizados T-FGM sometidos a estímulo químico mostró una menor capacidad de movimiento de las células carentes del receptor, que recorrieron menores distancias debido, en parte, a una menor capacidad de persistencia, es decir, a una menor capacidad para realizar un movimiento direccional prolongado. Sin embargo, dicha deficiencia no era consecuencia

de no poder orientar su movimiento hacia a un estímulo quimiotáctico, lo que nos llevó a descartar problemas relacionados con la quimiotaxis y centrar nuestra investigación en defectos en adhesión. identificar a la integrina $\beta 1$ como un regulador importante de la adhesión mediada por AhR

A este respecto optimizando las condiciones para estudiar procesos de adhesión temprana, pudimos observar que la ausencia de AhR provoca un exceso de expresión de la proteína de matriz extracelular fibronectina, la cual podría contribuir a la mayor adhesión de dichas células. De estos resultados, y dado que la fibronectina es uno de los ligandos más relevantes de la integrina $\beta 1$, dedujimos que una mayor activación de ésta sería coherente con el fenotipo adhesivo de los fibroblastos *AhR*^{-/-}.

El papel regulador de AhR en la funcionalidad de la integrina $\beta 1$ quedó demostrado al observarse que no eran ni la expresión ni la presencia en membrana de la proteína los parámetros alterados en células T-FGM-*AhR*^{-/-}, sino su estado basal de activación, cuyo aumento potenció la unión a fibronectina soluble e incrementó su interacción con talina, un intermediario esencial de la maquinaria citoplasmática de adhesión.

La posibilidad de que la sobre-activación de integrina $\beta 1$ se debiera a un exceso de señales provenientes de la matriz extracelular (Anthis and Campbell 2011), nos llevó a considerar que el exceso de síntesis de fibronectina producido por los fibroblastos *AhR*^{-/-} se pudiera traducir en una matriz más densa y compleja capaz de sobre-activar los receptores celulares. Un fenotipo similar ya había sido observado en heridas realizadas en piel de ratones *AhR*^{-/-} en las que su cierre estaba asociado a un aumento de fibronectina en la dermis (Carvajal-Gonzalez et al. 2009) La influencia de la matriz extracelular en la activación de la integrina $\beta 1$ se confirmó al observarse que células silvestres sembradas sobre matriz generada por células carentes del receptor incrementaron significativamente la activación de su integrina $\beta 1$. Si bien AhR regula los niveles de mRNA del gen que codifica para fibronectina1, en este trabajo no pudimos definir completamente si se trata de un mecanismo transcripcional directo o si tiene lugar a través de intermediarios adicionales. En cualquier caso, nuestros resultados permiten sugerir la existencia de un proceso de activación de la integrina $\beta 1$ fuera-dentro mediado por proteínas de la matriz extracelular, y en especial por fibronectina.

Una de las proteínas con un papel central en la regulación de las adhesiones celulares y en el control de la dinámica de migración es la quinasa de la familia SFK, c-Src (Huveneers and Danen 2009). c-Src es particularmente interesante en nuestro estudio ya que se ha relacionado con el funcionamiento, y posiblemente con la inactivación, de integrinas mediante la fosforilación de su cadena β en la región NPX/Y. Dicha fosforilación se ha sugerido que aumenta la afinidad de la cadena β por proteínas inhibitoras (Tapley et al. 1989; Chiswell et al. 2008; Anthis et al. 2009).

Otro de los aspectos de interés acerca de c-Src es su relación con el propio AhR, la cual también ha sido previamente estudiada, llegándose a proponer que ambos participan en un complejo citosólico inactivo en el citoplasma, y que la llegada de un ligando exógeno de AhR provoca la liberación de ambos y la activación de c-Src (Matsumura 2011). Las consecuencias de esta activación no-genómica incluirían la reorganización de las adhesiones focales y la agregación de integrinas, favoreciendo la movilidad celular (Tomkiewicz et al. 2013).

Resultados previos de nuestro laboratorio habían mostrado que tanto c-Src, como su diana y principal responsable de la dinámica de las adhesiones focales FAK, tenían patrones de fosforilación propios de un estado inactivado en ausencia de AhR. Estos resultados permitían pensar que parte de la sobre-activación de la integrina $\beta 1$ observada en ausencia de AhR podía deberse a un menor efecto inhibitorio resultante de niveles bajos de c-Src. La menor fosforilación de caveolina 1 en su residuo Y¹⁴, una de las dianas clásicas de c-Src, fue el primer indicio de la inhibición de la ruta de esta quinasa en células T-FGM-AhR^{-/-}. Sin embargo, al no existir una disminución de los niveles proteicos de c-Src que pudiera explicar su inhibición, nos planteamos estudiar las proteínas que regulan su mecanismo de activación.

La quinasa citoplásmica Csk se ha definido como la principal responsable de la inactivación de c-Src por fosforilación de su extremo C-terminal (Nada et al. 1991; Nada et al. 1993). En este sentido, el exceso de fosforilación de c-Src en la tirosina inhibitoria Y⁵²⁷ descrito en células AhR^{-/-} (Carvajal-González 2008) podría deberse a una acción excesiva de Csk ya que la supresión de Csk provoca la sobre-activación mantenida de proteínas de la familia SFK (Nada et al. 1993). Sin embargo, y en parte inesperadamente, nuestros experimentos mostraron que la expresión de Csk es independiente de los niveles de AhR. No obstante, gran parte de la regulación de la función de Csk se basa en su localización celular y, en concreto, de su reclutamiento a zonas *rafts* de membrana por parte de adaptadores (Otahal et al. 2011). Esto nos

ofreció la posibilidad de analizar los adaptadores para Csk, y nos centramos en la proteína Cbp por ser la única que cómo tal ha sido descrita hasta el momento.

La proteína Cbp tiene un importante papel en la regulación de la actividad de las quinasas SFK (Svec 2008). Una de sus principales funciones es la de promover la acción de Csk, la cual se une al dominio citoplásmico de Cbp y queda fijada a dominios *rafts* de membrana, donde se realizará la fosforilación e inactivación de c-Src (Oneyama et al. 2008). Sin la adaptación a estas zonas de la membrana, Csk carece de actividad catalítica (Sirvent et al. 2010). Por otro lado, Cbp interacciona directamente con la SFK Fyn (Shima et al. 2003; Ingley 2009) e incluso con caveolina 1 (Place et al. 2011), por lo que su presencia o ausencia provoca importantes cambios en la morfología celular, alguno de ellos independientes de Csk (Oneyama et al. 2008). Este mecanismo permite explicar nuestros resultados ya que la sobre-expresión de Cbp en los fibroblastos *AhR*^{-/-} se tradujo en una mayor asociación con Csk que en último término inactiva a c-Src por la fosforilación de su residuo diana Y⁵²⁷. Un segundo conjunto de experimentos aportó confirmación adicional para esta ruta de señalización ya que el silenciamiento de Cbp en células carentes de AhR provocó un significativo incremento en la fosforilación de caveolina 1 en la Y¹⁴, la cual es diana de c-Src. En este punto llevamos a cabo repetidos intentos para co-localizar estas proteínas pero la escasa calidad de los anticuerpos disponibles no lo permitió.

Como se comentó anteriormente, c-Src parece participar en la inactivación de integrinas. Esto implica que la sobre-activación de integrina $\beta 1$ de los fibroblastos *AhR*^{-/-} podría derivar de sus menores niveles de c-Src activo, lo que permitiría conectar la ruta de Cbp con la de integrinas. Este resulta ser el caso ya que la reducción de los niveles de Cbp inhibe la activación de integrina $\beta 1$, restaura parcialmente la morfología celular e incrementa la migración de fibroblastos *AhR*^{-/-}. Proponemos, por tanto, que Cbp-Csk establece una ruta de señalización común y dependiente de AhR que se bifurca hacia caveolina 1 e integrina $\beta 1$, ambas contribuyentes al fenotipo adhesivo y migratorio. Planteamos también la existencia de un mecanismo de señalización dentro-fuera desde Cbp hasta la integrina $\beta 1$ que coopera en la adhesión exacerbada de los fibroblastos *AhR*^{-/-}. Cabría la posibilidad de que Cbp también influyera en la señalización fuera-dentro vía fibronectina; sin embargo, esto es poco probable ya que los niveles de fibronectina son insensibles a inhibición de la expresión de Cbp.

Uno de los aspectos de interés de este estudio fue determinar el mecanismo por el que AhR controla los niveles de Cbp. Dado que el incremento en los niveles de RNA

era coherente con el aumento en los niveles de proteína, decidimos descartar una posible acción de AhR como E3 ubiquitin ligasa (Ohtake et al. 2007). Por otro lado, la disminución de la expresión del mRNA de *Cbp* observada al rescatar la función de AhR en células *AhR*^{-/-} sugería la existencia de un control a nivel transcripcional. El estudio del promotor de *Cbp* detectó varios motivos XRE, el más distal de los cuales mostró ser funcional uniendo AhR in vivo. Estos resultados no sólo apoyan un papel transcripcional para AhR, sino que además están de acuerdo con los datos procedentes de un estudio de Chip on ChIP realizado en hígado de ratón en el que se identificó dicho XRE distal como un sitio ocupado por el AhR unido a ligando (Dere et al. 2011). Así, podemos afirmar que la represión de la expresión de *Cbp* por parte del receptor de dioxina se realiza transcripcionalmente mediante unión directa a su promotor.

A diferencia de Csk, cuyos residuos susceptibles de fosforilación no están aún bien descritos (Chong et al. 2005), la fosforilación de Cbp en la Y³¹⁴ permite su unión a Csk y, por tanto, la inhibición de c-Src. Por el contrario, su fosforilación en los residuos Y³⁸¹ e Y⁴⁰⁹ provoca su unión directa a c-Src y el secuestro de esta última en dominios *raft* de membrana, no pudiendo entonces ejercer su función en las zonas de adhesiones focales y actuando de manera independiente de Csk (Oneyama et al. 2008). En estudios futuros nos planteamos analizar si el estado de fosforilación de Cbp puede estar regulado por el receptor de dioxina e identificar los aminoácidos implicados.

Adicionalmente al mecanismo nuclear que implica la regulación transcripcional de Cbp por AhR, también consideramos la posibilidad de que la estabilidad del complejo citosólico formado por AhR y c-Src pudiera contribuir a la actividad de esta última y, consecuentemente, al control de caveolina 1 e integrina β 1. Sin embargo, y a pesar de que al interferir la expresión de XAP2 aumentó la represión transcripcional de Cbp y de fibronectina, dichos efectos no se vieron reflejados en cambios relevantes en la activación de integrina β 1, ni de caveolina 1 ni sobre la translocación a membrana y posterior activación de c-Src,. Consideramos, por tanto, que la chaperona XAP2 no tiene una función relevante en el mecanismo propuesto.

Desde una visión global, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral referentes al control de la activación de integrina β 1 caveolina 1 y c-Src, unidos a los obtenidos previamente en nuestro laboratorio, que implican a las rutas de TGF β (Carvajal-Gonzalez et al. 2009) (Rico-Leo et al. 2013) y a las Rho GTPasas Rac1 y RhoA (Carvajal-Gonzalez et al. 2009), definen al receptor de dioxina como un regulador global de los procesos de adhesión y migración. Dicha regulación la lleva

cabo mediante la estimulación o la represión de proteínas tanto intracelulares como de matriz extracelular, modulando mecanismos dentro-fuera y fuera-dentro.

La posible relevancia funcional del control realizado por el receptor de dioxina sobre las interacciones célula-microentorno fueron estudiadas mediante dos aproximaciones. En la primera de ellas analizamos la capacidad contráctil de los fibroblastos *AhR*^{-/-} y observamos, inesperadamente, que a pesar de su fenotipo de mayor contenido en fibras de estrés, adhesiones focales despolarizadas y de mayor tamaño y mayor adhesión al sustrato, poseían un menor poder de tracción. Una posible explicación para estos resultados es que la tracción no dependa tanto del establecimiento de las adhesiones como del reciclaje de las mismas, función esta última probablemente afectada en ausencia del receptor de dioxina. A este respecto, hemos intentado realizar mediciones de la capacidad de reciclaje de las adhesiones focales de los fibroblastos T-FGM-*AhR*^{-/-} pero los experimentos de disrupción de microtúbulos por nocodazol tuvieron que ser suspendidos al ser dichas células altamente resistentes al desensamblaje, lo que impidió estudiar la dinámica de formación y desaparición de fibras. En la segunda, el análisis de degradación de gelatina mostró que las protusiones invasivas se forman correctamente y que la velocidad de degradación de matriz no muestra diferencias significativas en fibroblastos T-FGM-*AhR*^{-/-}. Sin embargo, el estudio de la formación de estas estructuras degradativas en células de melanoma muestra de manera significativa que la activación de AhR reprime el potencial invasivo de la célula, lo que concuerda con su menor capacidad metastática in vivo (Contador-Troca et al. 2013). En conjunto, ambos resultados apoyan el papel del receptor de dioxina como regulador de los diferentes procesos que implican plasticidad celular por mecanismos dependientes del tipo celular.

La observación previa de la existencia de pequeños acúmulos de proteína de fusión EYFP-AhR en la membrana plasmática de fibroblastos T-FGM (Rey-Barroso et al. 2013) fue el punto de partida del segundo capítulo de este trabajo. Estos datos iniciales fueron confirmados al detectarse mediante inmunofluorescencia la presencia del receptor endógeno en células creciendo en condiciones basales. Interesantemente, AhR co-inmunoprecipita con la proteína reguladora de la actividad de integrinas talina, la cual se ha visto asociada a dominios *raft* en membrana plasmática (Wang et al. 2013). Estos resultados nos llevaron a hipotetizar la existencia de una subpoblación de AhR ubicada en la proximidad de la membrana plasmática cuya acción sería independiente de su función como factor de transcripción. La localización de AhR en dominios *raft*, observada tanto en fibroblastos T-FGM como en células de hepatoma, aportó un

importante apoyo a su probable función extranuclear dada la importancia atribuida a los dominios *raft* en diferentes rutas de señalización celular (Magee et al. 2002; Resh 2004). La existencia de una población del receptor de dioxina en membrana plasmática en estado basal no ha sido descrita hasta ahora y ofrece nuevas opciones en la búsqueda de las funciones fisiológicas del receptor, probablemente no relacionadas con su actividad como factor de transcripción.

Interesantemente, un estudio previo había descrito la asociación de AhR con caveolina 1 (Lim et al. 2008), y nos resultó de gran interés el poder confirmarla en nuestros fibroblastos *AhR*^{+/+}. La interacción AhR-caveolina 1 supone un importante apoyo a la función asociada a membrana del receptor y, además, resulta de especial interés debido al papel de caveolina 1 en polaridad celular y en migración direccionada (Grande-García et al. 2007). La relación funcional de AhR con caveolina 1 puede incluso extenderse al ámbito toxicológico ya que las caveolas parecen ser necesarias en la función del receptor en respuesta a xenobióticos (Lim et al. 2008; Oesterling et al. 2008; Majkova et al. 2009). Una estimación de que AhR puede modular la funcionalidad de la caveolina 1 se obtuvo a partir de la diferente localización de esta proteína en función de la presencia o ausencia del receptor, con un acusado descenso en los niveles de caveolina 1 en las membranas celulares internas y un incremento en el número de acúmulos de dicha proteína en la membrana plasmática en células T-FGM-*AhR*^{-/-}. Esta diferente localización sugiere que AhR modula la distribución de dicha proteína y, de hecho, el reparto de caveolina 1 en la membrana se ve alterada en ausencia del receptor, siendo menor su presencia en dominios *raft*. Al igual que lo observado para integrina β 1, este control de caveolina 1 por AhR también implica a la ruta de Cbp dado que el silenciamiento de esta proteína en fibroblastos *AhR*^{-/-} relocaliza parcialmente caveolina 1 hacia membranas internas y favorece su localización en dominios *raft*. Estos resultados proporcionan apoyo adicional a las interacciones funcionales entre Cbp y caveolina 1, que posiblemente tienen lugar a través de c-Src y de Csk (Cao et al. 2002; Place et al. 2011).

Tanto en fibroblastos (Cho et al. 2004) como en queratinocitos (Ikuta et al. 2009), se ha descrito que la densidad celular modula la actividad del receptor de dioxina. A baja densidad celular, el receptor es en buena parte nuclear y su actividad transcripcional aumenta; a alta densidad celular el receptor se localiza en el citosol y es menos activo. Basándonos en estos estudios previos, decidimos analizar si la densidad celular modula la distribución de caveolina 1 en función de la expresión de AhR. Observamos dicha relación inversa entre la densidad celular y la localización

nuclear/citosólica del receptor de dioxina, y lo que es de mayor interés, que los cambios de confluencia afectan al reparto de caveolina 1 entre regiones *raft* y de membrana general por un proceso dependiente de la presencia del receptor de dioxina. El hecho de que a baja confluencia caveolina 1 se localice en rafts en células *AhR*^{+/+} pero no en células *AhR*^{-/-} indicaría que la fracción de AhR nuclear modula dicha localización, presumiblemente a través de la ruta de Cbp. Esta hipótesis se ve sustentada porque a altas confluencias, donde el AhR es principalmente citosólico, la caveolina 1 se redistribuye hacia membrana general de manera independiente de la expresión de AhR. No obstante, aún no hemos podido valorar la influencia real del AhR citosólico en la funcionalidad de caveolina 1.

Caveolina 1 tiene un papel relevante en la polarización celular y en migración direccional (Parat et al. 2003; Grande-García and del Pozo 2008) (Sun et al. 2007). Bajo condiciones de migración direccional, una fracción de la proteína se localiza en la parte trasera de la célula formando caveolas implicadas en el reciclaje de las adhesiones y en la contracción celular, mientras que otra fracción se sitúa en el frente de migración, en estructuras independientes de caveolas y, posiblemente, fosforilada en su residuo Y¹⁴. La función propuesta para caveolina 1 en esta zona delantera es la regulación de nuevas adhesiones y la adaptación de Csk a la membrana (Beardsley et al. 2005). Esta diferente distribución de caveolina 1 podría estar implicada en el fenotipo migratorio de los fibroblastos *AhR*^{-/-} (Mulero-Navarro et al. 2005) dado que estas células muestran una marcada desaparición de la caveolina 1 situada en el frente de migración y un enriquecimiento de la misma en la región posterior. Este papel de AhR en la localización de caveolina 1 parece general, al menos en células de fenotipo fibroblástico, ya que también se observó en fibroblastos de la dermis de ratones *AhR*^{-/-}. La siguiente cuestión que se plantea es si dicho efecto requiere de la fosforilación de caveolina 1 en la Y¹⁴.

Estudios previos empleando hepatocitos de hígados sometidos a hepatectomía parcial mostraron que la internalización de caveolina 1 era dependiente de su fosforilación en la Y¹⁴ (Mayoral et al. 2007). Por otro lado, la inducción de estrés por presión de flujo (Rizzo et al. 2003; Sun et al. 2003) también provocó la relocalización de caveolina 1 y su fosforilación en la Y¹⁴. Teniendo en cuenta estos estudios, nos planteamos si la relocalización de caveolina 1 en células T-FGM-*AhR*^{-/-} y en fibroblastos de la dermis pudiera estar asociada a su fosforilación en la Y¹⁴. Esta hipótesis se demostró errónea ya que tanto la Cav1-GFP fosforilable como su forma no fosforilable Cav1 Y14F-GFP mantuvieron la localización típica de la caveolina 1 endógena en cada

genotipo *AhR*^{+/+} o *AhR*^{-/-}. Es decir, el fenotipo observado en fibroblastos *AhR*^{-/-} no parece depender de alteraciones en la fosforilación de caveolina 1, al menos en su Y¹⁴. Esta conclusión se vio apoyada por el hecho de que la hiperfosforilación de caveolina 1 por pervanadato sódico tuvo un efecto similar en ambas líneas celulares, disminuyendo la presencia de la proteína en las fracciones *raft*, siendo este efecto más notable en las células *AhR*^{-/-}.

Dado que la fosforilación no parecía una causa probable de la alteración en la localización de caveolina 1, decidimos analizar la existencia de cambios en la movilidad de la proteína entre dominios de membrana, ya que estos interactúan con las caveolas y son claves en la señalización por caveolina así como en procesos de endocitosis (Parton and Richards 2003; Lajoie and Nabi 2010). Los fibroblastos T-FGM-*AhR*^{-/-} mostraron una deslocalización significativa de los dominios *raft* de membrana y una menor velocidad de movilización de caveolina 1, lo que unido a la ralentización en la reorientación del citoesqueleto durante la migración, hacía que nuestra hipótesis fuera plausible. Sin embargo, el seguimiento individualizado de vesículas Cav1-GFP mostró que tanto la velocidad de transporte intracelular como la distancia efectiva recorrida por cada una eran similares en ambos genotipos, lo que indica que AhR no contribuye al transporte intracelular de vesículas conteniendo caveolina 1.

No obstante lo anterior, cabía la posibilidad de que el fenotipo de caveolina 1 fuera debido a diferencias en la capacidad endocítica vía caveolas de los fibroblastos *AhR*^{-/-}. Esta función endocítica requiere de una versión funcional de caveolina 1 y una correcta interacción con *raft* lipídicos, lo que resulta relevante en procesos tales como la entrada de determinados virus en la célula (Pelkmans 2005) o la internalización y el reciclaje de integrinas (Echarri and Del Pozo 2006). Esta posibilidad fue analizada midiendo la endocitosis del cargo BSA-FITC, la cual está mediada por caveolina 1. Observamos que tanto los fibroblastos T-FGM-*AhR*^{-/-} como sus equivalentes derivados de la dermis produjeron no sólo una mayor superficie de BSA endocitado, sino también una mayor concentración de cargo en puntos concretos de la membrana, lo que sugería que en nuestros fibroblastos, la endocitosis está asociada a la dinámica de las caveolas. Esta hipótesis fue confirmada por el hecho de que los disruptores de dominios *raft* M β CD y nistatina (Yumoto et al. 2006; Chen et al. 2012) provocaron un descenso en la capacidad de endocitosis de los fibroblastos T-FGM.

La interacción entre las caveolinas y el colesterol ha sido ampliamente estudiada. No sólo se considera a las caveolinas como las principales responsables del transporte

de colesterol entre compartimentos subcelulares (Martin and Parton 2005), sino que, el colesterol, como componente indispensable de las balsas lipídicas, permite la formación y la estabilidad de las caveolas por un proceso dependiente de su interacción con caveolinas (Rothberg et al. 1992; Lajoie and Nabi 2010). De hecho, los principales inhibidores de la endocitosis por caveolas, incluyendo la M β CD y la nistatina, son en realidad secuestradores de colesterol (Allen et al. 2005). Desde el punto de vista funcional, se ha descrito que la adición exógena de colesterol a fibroblastos de la dermis humanos provoca una mayor endocitosis vía caveolas (Sharma et al. 2004). Nos planteamos entonces si las diferencias en endocitosis vía caveolas presentes en fibroblastos *AhR*^{-/-} pudieran estar relacionadas con cambios en el colesterol celular. Efectivamente, los fibroblastos T-FGM-*AhR*^{-/-} mostraron un aumento significativo en sus niveles de colesterol libre, lo es coincidente con el hecho de que la activación de AhR por TCDD es capaz de inhibir la biosíntesis del colesterol hepático (Tanos et al. 2012). Este hallazgo puede trascender más allá de la propia regulación de la endocitosis, ya que se ha descrito que un alto nivel de colesterol provoca el secuestro de c-Src en *rafts* de membrana bloqueando su función independientemente de su estado de fosforilación (Oneyama et al. 2008). Cabría por tanto la posibilidad de que el mayor nivel de colesterol en células *AhR*^{-/-} contribuyera a su menor actividad c-Src, confluyendo de este modo las rutas de Cbp y de colesterol en el control de la adhesión y migración celular a través de integrina β 1 y de caveolina 1. Adicionalmente, dado que un incremento en el nivel de colesterol en membrana disminuye la movilidad de las proteínas (Bastiaanse et al. 1997) y deslocaliza los dominios *raft* (Nguyen et al. 2004), proponemos que el exceso de colesterol puede contribuir a la menor velocidad de reclutamiento de vesículas Cav1-GFP y a la deslocalización de las balsas lipídicas en fibroblastos T-FGM-*AhR*^{-/-}. El papel del colesterol en el fenotipo adhesivo y migratorio de los fibroblastos *AhR*^{-/-} justifica estudios más detallados.

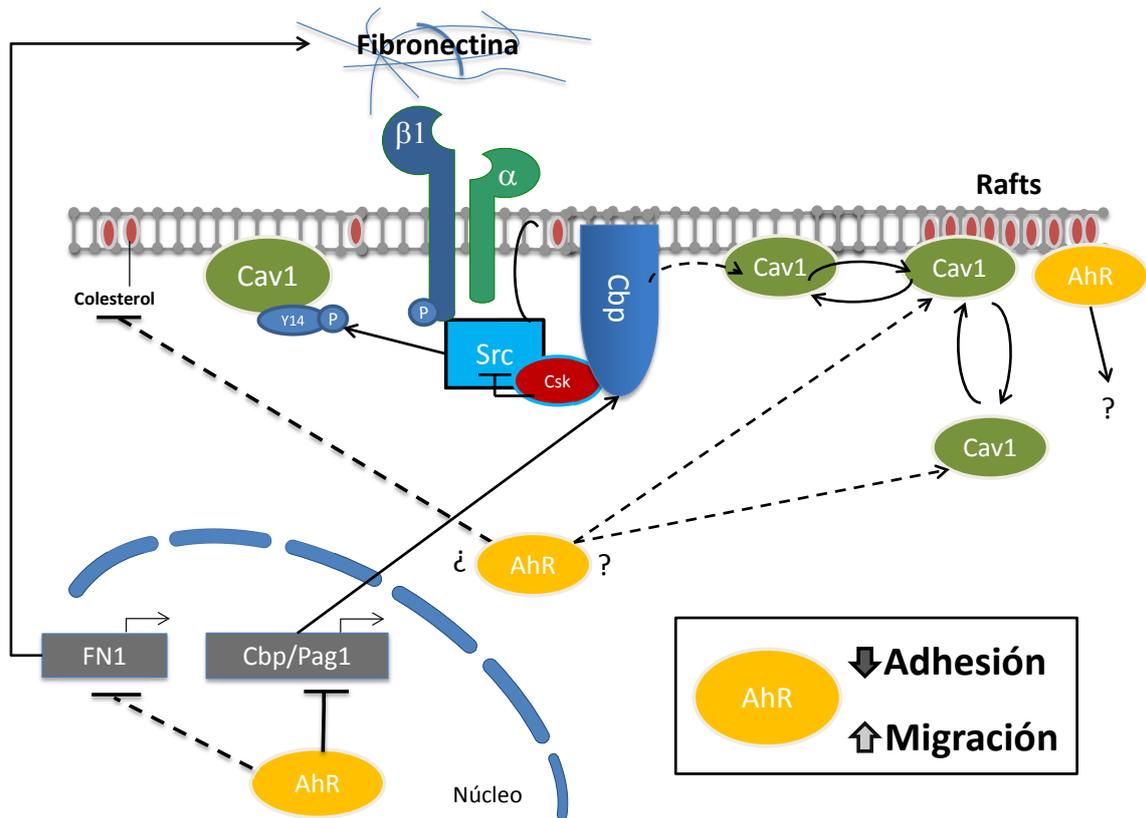


Figura D.2. Regulación de integrina $\beta 1$ y de caveolina 1 por parte del receptor de dioxina. Las principales rutas controladas por AhR relativas a la activación de la integrina $\beta 1$ y a la movilidad de caveolina 1 se muestran esquematizadas. Las líneas continuas simbolizan las interacciones definidas, mientras que las discontinuas representan las conexiones propuestas aún indeterminadas. Las interrogaciones entorno a AhR señalan que el papel transcripcional del receptor no ha sido aún determinado. El efecto global del receptor en el proceso se señala en el cuadro destacado.

Finalmente, es importante resaltar que aunque AhR interacciona con diferentes rutas de señalización para regular adhesión y migración, existe interacción funcional entre ellas, y así:

- En células sometidas a estrés por presión de flujo (*shear stress*), donde se produce una respuesta de mecanotransducción que relocaliza la integrina $\beta 1$ a caveolas, se fosforila caveolina 1 y se activa c-Src, lo que resulta en la regulación de las rutas de PKB/Akt y de eNOS (Radel et al. 2007; Yang and Rizzo 2013).
- En fibroblastos embrionarios de ratón creciendo en suspensión celular, la caveolina 1 es responsable de la internalización de integrina $\beta 1$ por un proceso que requiere de vesículas conteniendo gangliósido GM1 y en el que la fosforilación de caveolina 1 en la Y¹⁴ tienen un papel clave (del Pozo et al. 2005).
- Este papel de caveolina 1 en procesos de internalización vesicular también trasciende hasta la remodelación de la matriz de fibronectina, la cual precisa de

la unión física de esta última proteína con la forma activada de la integrina $\beta 1$ (Shi and Sottile 2008). Coherentemente, se ha demostrado que caveolina 1 participa en la remodelación del microentorno tumoral, el cual, a través del reordenamiento de las fibras de fibronectina, facilita la invasión de la matriz por células tumorales (Goetz et al. 2011).

- Por otro lado, se han establecido relaciones negativas en glioblastomas humanos entre integrina $\beta 1$ y caveolina 1 a través de $TGF\beta$ (Cosset et al. 2012). Parece incluso existir una capacidad recíproca de exclusión entre integrina $\beta 1$ y caveolina 1 en células HUVEC en proceso de *spreading* (Zemljic Jokhadar et al. 2013).

Nuestros resultados nos llevan a proponer que, globalmente, existe una relación negativa entre el estado de activación de la integrina $\beta 1$ y la movilidad de caveolina 1 en células de fenotipo fibroblástico, y que dicha relación es dependiente del receptor de dioxina (Figura D.2). Este equilibrio mantenido permite a la célula alcanzar la dinámica de adhesión necesaria para llevar a cabo la migración celular, proceso en el cual AhR parece intervenir a través de diferentes vías de señalización.

CONCLUSIONES

Del presente trabajo se extraen las siguientes conclusiones:

1. La expresión del receptor de dioxina (AhR) es necesaria para una orientación y un avance adecuados durante la migración direccional de fibroblastos T-FGM.
2. AhR regula el nivel basal de activación de la integrina $\beta 1$ mediante un proceso que incluye a la proteína de matriz extracelular fibronectina y a la cascada de señalización citoplásmica Cbp/Pag1-Csk-Src en estos fibroblastos.
3. El receptor de dioxina regula negativamente la expresión de fibronectina y de Cbp a nivel de mRNA y de proteína en fibroblastos T-FGM. La regulación de *Cbp* es transcripcional por unión de AhR a un sitio XRE localizado en su promotor distal.
4. El nivel de activación de integrina $\beta 1$ en fibroblastos *AhR*^{-/-} es el resultado de rutas de señalización fuera-dentro vía fibronectina y dentro-fuera a través de Cbp-Csk-Src.
5. La proteína chaperona XAP2 carece de un papel relevante en la regulación de la activación de integrina $\beta 1$ por el receptor de dioxina en fibroblastos T-FGM.
6. La expresión de AhR es necesaria para la correcta localización subcelular de caveolina 1 y para su fosforilación en el residuo Y¹⁴.
7. La sobre-expresión de Cbp es responsable, al menos en parte, del fenotipo morfológico y migratorio de los fibroblastos T-FGM-*AhR*^{-/-}. Los altos niveles de Cbp contribuyen también a la sobre-activación de la integrina $\beta 1$ y a la localización aberrante y al estado hipofosforilado de la caveolina 1.
8. El receptor de dioxina regula la localización de caveolina 1 en el frente de avance de fibroblastos T-FGM y de fibroblastos de la dermis durante la migración direccional.

9. El estado de fosforilación del residuo Y¹⁴ de la caveolina 1, así como la velocidad de transporte intracelular de vesículas cargadas con caveolina 1, no determinan la localización de esta proteína en fibroblastos *AhR*^{-/-}.

10. La expresión del receptor de dioxina limita la capacidad de endocitosis vía caveolas en fibroblastos T-FGM y fibroblastos de la dermis de ratón

11. AhR regula negativamente los niveles de colesterol en fibroblastos, y dicho control es, en parte, responsable de la correcta localización de caveolina 1 en migración direccional.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, B. D., *et al.* (1995). "Developmental expression of two members of a new class of transcription factors: I. Expression of aryl hydrocarbon receptor in the C57BL/6N mouse embryo." *Dev Dyn* **204**(2): 133-143.
- Abbott, B. D., *et al.* (1999). "Adverse reproductive outcomes in the transgenic Ah receptor-deficient mouse." *Toxicol Appl Pharmacol* **155**(1): 62-70.
- Abdelrahim, M., *et al.* (2003). "Aryl hydrocarbon receptor gene silencing with small inhibitory RNA differentially modulates Ah-responsiveness in MCF-7 and HepG2 cancer cells." *Mol Pharmacol* **63**(6): 1373-1381.
- Adachi, J., *et al.* (2001). "Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine." *J Biol Chem* **276**(34): 31475-31478.
- Alexander, D. L., *et al.* (1998). "Aryl-hydrocarbon receptor is an inhibitory regulator of lipid synthesis and of commitment to adipogenesis." *J Cell Sci* **111** (Pt 22): 3311-3322.
- Alexandrova, A. Y., *et al.* (2008). "Comparative dynamics of retrograde actin flow and focal adhesions: formation of nascent adhesions triggers transition from fast to slow flow." *PLoS One* **3**(9): e3234.
- Allen, J. A., *et al.* (2005). "Beta-adrenergic receptor stimulation promotes G alpha s internalization through lipid rafts: a study in living cells." *Mol Pharmacol* **67**(5): 1493-1504.
- Aman, A. and T. Piotrowski (2010). "Cell migration during morphogenesis." *Dev Biol* **341**(1): 20-33.
- Andreola, F., *et al.* (2004). "Reversal of liver fibrosis in aryl hydrocarbon receptor null mice by dietary vitamin A depletion." *Hepatology* **39**(1): 157-166.
- Andreola, F., *et al.* (1997). "Aryl hydrocarbon receptor knockout mice (AHR-/-) exhibit liver retinoid accumulation and reduced retinoic acid metabolism." *Cancer Res* **57**(14): 2835-2838.
- Antenos, M., *et al.* (2002). "Interaction with Nedd8, a ubiquitin-like protein, enhances the transcriptional activity of the aryl hydrocarbon receptor." *J Biol Chem* **277**(46): 44028-44034.
- Anthis, N. J. and I. D. Campbell (2011). "The tail of integrin activation." *Trends Biochem Sci* **36**(4): 191-198.
- Anthis, N. J., *et al.* (2009). "Beta integrin tyrosine phosphorylation is a conserved mechanism for regulating talin-induced integrin activation." *J Biol Chem* **284**(52): 36700-36710.
- Baba, T., *et al.* (2005). "Intrinsic function of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor as a key factor in female reproduction." *Mol Cell Biol* **25**(22): 10040-10051.
- Baldassarre, M., *et al.* (2003). "Dynamin participates in focal extracellular matrix degradation by invasive cells." *Mol Biol Cell* **14**(3): 1074-1084.
- Ballestrem, C., *et al.* (2006). "Molecular mapping of tyrosine-phosphorylated proteins in focal adhesions using fluorescence resonance energy transfer." *J Cell Sci* **119**(Pt 5): 866-875.
- Barczyk, M., *et al.* (2010). "Integrins." *Cell Tissue Res* **339**(1): 269-280.
- Barnes-Ellerbe, S., *et al.* (2004). "2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin blocks androgen-dependent cell proliferation of LNCaP cells through modulation of pRB phosphorylation." *Mol Pharmacol* **66**(3): 502-511.
- Barouki, R., *et al.* (2007). "The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein." *FEBS Lett* **581**(19): 3608-3615.
- Bastiaanse, E. M., *et al.* (1997). "The effect of membrane cholesterol content on ion transport processes in plasma membranes." *Cardiovasc Res* **33**(2): 272-283.
- Bastiani, M. and R. G. Parton (2010). "Caveolae at a glance." *J Cell Sci* **123**(Pt 22): 3831-3836.
- Beardsley, A., *et al.* (2005). "Loss of caveolin-1 polarity impedes endothelial cell polarization and directional movement." *J Biol Chem* **280**(5): 3541-3547.
- Beischlag, T. V. and G. H. Perdew (2005). "ER alpha-AHR-ARNT protein-protein interactions mediate estradiol-dependent transrepression of dioxin-inducible gene transcription." *J Biol Chem* **280**(22): 21607-21611.

Beischlag, T. V., *et al.* (2002). "Recruitment of the NCoA/SRC-1/p160 family of transcriptional coactivators by the aryl hydrocarbon receptor/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator complex." *Mol Cell Biol* **22**(12): 4319-4333.

Bender, F., *et al.* (2002). "Caveolae and caveolae-like membrane domains in cellular signaling and disease: identification of downstream targets for the tumor suppressor protein caveolin-1." *Biol Res* **35**(2): 151-167.

Benedict, J. C., *et al.* (2000). "Physiological role of the aryl hydrocarbon receptor in mouse ovary development." *Toxicol Sci* **56**(2): 382-388.

Beningo, K. A., *et al.* (2004). "Responses of fibroblasts to anchorage of dorsal extracellular matrix receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(52): 18024-18029.

Berg, P. and I. Pongratz (2001). "Differential Usage of Nuclear Export Sequences Regulates Intracellular Localization of the Dioxin (Aryl Hydrocarbon) Receptor." *J Biol Chem* **276**(46): 43231-43238.

Blankenship, A. and F. Matsumura (1997). "2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced activation of a protein tyrosine kinase, pp60src, in murine hepatic cytosol using a cell-free system." *Mol Pharmacol* **52**(4): 667-675.

Blankenship, A. L., *et al.* (1993). "2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) accelerates differentiation of murine preimplantation embryos in vitro." *Reprod Toxicol* **7**(3): 255-261.

Boverhof, D. R., *et al.* (2005). "Temporal and dose-dependent hepatic gene expression patterns in mice provide new insights into TCDD-Mediated hepatotoxicity." *Toxicol Sci* **85**(2): 1048-1063.

Brakebusch, C. and R. Fassler (2003). "The integrin-actin connection, an eternal love affair." *EMBO J* **22**(10): 2324-2333.

Brdicka, T., *et al.* (2000). "Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (PAG), a novel ubiquitously expressed transmembrane adaptor protein, binds the protein tyrosine kinase csk and is involved in regulation of T cell activation." *J Exp Med* **191**(9): 1591-1604.

Brugge, J. S. and R. L. Erikson (1977). "Identification of a transformation-specific antigen induced by an avian sarcoma virus." *Nature* **269**(5626): 346-348.

Burbach, K. M., *et al.* (1992). "Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(17): 8185-8189.

Burchard, R. P. (1981). "Gliding motility of prokaryotes: ultrastructure, physiology, and genetics." *Annu Rev Microbiol* **35**: 497-529.

Calderwood, D. A. (2004). "Integrin activation." *J Cell Sci* **117**(Pt 5): 657-666.

Calderwood, D. A. (2004). "Talin controls integrin activation." *Biochem Soc Trans* **32**(Pt3): 434-437.

Caldieri, G., *et al.* (2009). "Cell and molecular biology of invadopodia." *Int Rev Cell Mol Biol* **275**: 1-34.

Cao, H., *et al.* (2002). "A phosphotyrosine-dependent protein interaction screen reveals a role for phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine 14: recruitment of C-terminal Src kinase." *J Biol Chem* **277**(11): 8771-8774.

Carvajal-González, J. (2008). El receptor de dioxina AhR regula rutas de señalización implicadas en el control de la migración celular. *Bioquímica, Biología Molecular y Genética*. Badajoz, Universidad de Extremadura. **Biología**: 111.

Carvajal-Gonzalez, J. M., *et al.* (2009). "The dioxin receptor regulates the constitutive expression of the vav3 proto-oncogene and modulates cell shape and adhesion." *Mol Biol Cell* **20**(6): 1715-1727.

Carvajal-Gonzalez, J. M., *et al.* (2009). "Loss of dioxin-receptor expression accelerates wound healing in vivo by a mechanism involving TGF{beta}." *J Cell Sci* **122**(Pt 11): 1823-1833.

Carvajal-Gonzalez, J. M., *et al.* (2009). "Loss of dioxin-receptor expression accelerates wound healing in vivo by a mechanism involving TGFbeta." *J Cell Sci* **122**(Pt 11): 1823-1833.

- Carver, L. A. and C. A. Bradfield (1997). "Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo." J Biol Chem **272**(17): 11452-11456.
- Casar, B., *et al.* (2009). "Ras subcellular localization defines extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 substrate specificity through distinct utilization of scaffold proteins." Mol Cell Biol **29**(5): 1338-1353.
- Ciolino, H. P., *et al.* (1998). "Diosmin and diosmetin are agonists of the aryl hydrocarbon receptor that differentially affect cytochrome P450 1A1 activity." Cancer Res **58**(13): 2754-2760.
- Cloutier, J. F., *et al.* (1995). "Requirement of the SH3 and SH2 domains for the inhibitory function of tyrosine protein kinase p50csk in T lymphocytes." Mol Cell Biol **15**(11): 5937-5944.
- Collins, B. M., *et al.* (2012). "Structure-based reassessment of the caveolin signaling model: do caveolae regulate signaling through caveolin-protein interactions?" Dev Cell **23**(1): 11-20.
- Contador-Troca, M., *et al.* (2013). "The Dioxin Receptor has Tumor Suppressor Activity in Melanoma Growth and Metastasis." Carcinogenesis.
- Corchero, J., *et al.* (2004). "Liver portal fibrosis in dioxin receptor-null mice that overexpress the latent transforming growth factor-beta-binding protein-1." Int J Exp Pathol **85**(5): 295-302.
- Cortesio, C. L., *et al.* (2008). "Calpain 2 and PTP1B function in a novel pathway with Src to regulate invadopodia dynamics and breast cancer cell invasion." J Cell Biol **180**(5): 957-971.
- Cosset, E. C., *et al.* (2012). "Involvement of the TGFbeta pathway in the regulation of alpha5 beta1 integrins by caveolin-1 in human glioblastoma." Int J Cancer **131**(3): 601-611.
- Cramer, L. P., *et al.* (1997). "Identification of novel graded polarity actin filament bundles in locomoting heart fibroblasts: implications for the generation of motile force." J Cell Biol **136**(6): 1287-1305.
- Crews, S. T. (1998). "Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins." Genes Dev **12**(5): 607-620.
- Cunningham, B. D. M., *et al.* (1996). "Substituted Flavones as Aryl Hydrocarbon (Ah) Receptor Agonists and Antagonists." Biochemical Pharmacology **51**(8): 1077-1087.
- Chan, W. K., *et al.* (1999). "Cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and hypoxia inducible factor signaling pathways. Demonstration of competition and compensation." J Biol Chem **274**(17): 12115-12123.
- Chang, C. Y. and A. Puga (1998). "Constitutive activation of the aromatic hydrocarbon receptor." Mol Cell Biol **18**(1): 525-535.
- Chen, W., *et al.* (2012). "Atrial natriuretic peptide enhances microvascular albumin permeability by the caveolae-mediated transcellular pathway." Cardiovasc Res **93**(1): 141-151.
- Chen, Y.-H., *et al.* (1995). "Regulation of CYP1A1 by Indolo[3,2-b]carbazole in Murine Hepatoma Cells." J. Biol. Chem. **270**(38): 22548-22555.
- Chen, Y. H., *et al.* (2006). "Role of GAC63 in transcriptional activation mediated by the aryl hydrocarbon receptor." J Biol Chem **281**(18): 12242-12247.
- Chiswell, B. P., *et al.* (2008). "The structural basis of integrin-linked kinase-PINCH interactions." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(52): 20677-20682.
- Cho, Y. C., *et al.* (2004). "Disruption of cell-cell contact maximally but transiently activates AhR-mediated transcription in 10T1/2 fibroblasts." Toxicol Appl Pharmacol **199**(3): 220-238.
- Chong, Y. P., *et al.* (2005). "C-terminal Src kinase (CSK) and CSK-homologous kinase (CHK)--endogenous negative regulators of Src-family protein kinases." Growth Factors **23**(3): 233-244.
- Chopra, M. and D. Schrenk (2011). "Dioxin toxicity, aryl hydrocarbon receptor signaling, and apoptosis-persistent pollutants affect programmed cell death." Crit Rev Toxicol **41**(4): 292-320.
- Christian, A. E., *et al.* (1997). "Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content." J Lipid Res **38**(11): 2264-2272.
- Davarinos, N. A. and R. S. Pollenz (1999). "Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export." J.Biol.Chem. **274**(40): 28708-28715.

de Diesbach, P., *et al.* (2008). "Differential subcellular membrane recruitment of Src may specify its downstream signalling." Exp Cell Res **314**(7): 1465-1479.

de Oliveira, S. K., *et al.* (2007). "Phosphodiesterase 2A forms a complex with the co-chaperone XAP2 and regulates nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor." J Biol Chem **282**(18): 13656-13663.

del Pozo, M. A., *et al.* (2005). "Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization." Nat Cell Biol **7**(9): 901-908.

DeMali, K. A. and K. Burridge (2003). "Coupling membrane protrusion and cell adhesion." J Cell Sci **116**(Pt 12): 2389-2397.

DeMali, K. A., *et al.* (2003). "Integrin signaling to the actin cytoskeleton." Curr Opin Cell Biol **15**(5): 572-582.

Dere, E., *et al.* (2011). "Integration of genome-wide computation DRE search, AhR CHIP-chip and gene expression analyses of TCDD-elicited responses in the mouse liver." BMC Genomics **12**: 365.

Destaing, O., *et al.* (2011). "Invadosome regulation by adhesion signaling." Curr Opin Cell Biol **23**(5): 597-606.

Destaing, O., *et al.* (2010). "beta1A integrin is a master regulator of invadosome organization and function." Mol Biol Cell **21**(23): 4108-4119.

Diry, M., *et al.* (2006). "Activation of the dioxin/aryl hydrocarbon receptor (AhR) modulates cell plasticity through a JNK-dependent mechanism." Oncogene **25**(40): 5570-5574.

Dong, B., *et al.* (2011). "FRET analysis of protein tyrosine kinase c-Src activation mediated via aryl hydrocarbon receptor." Biochim Biophys Acta **1810**(4): 427-431.

Dong, B. and F. Matsumura (2008). "Roles of cytosolic phospholipase A2 and Src kinase in the early action of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin through a nongenomic pathway in MCF10A cells." Mol Pharmacol **74**(1): 255-263.

Drab, M., *et al.* (2001). "Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice." Science **293**(5539): 2449-2452.

Echarri, A. and M. A. Del Pozo (2006). "Caveolae internalization regulates integrin-dependent signaling pathways." Cell Cycle **5**(19): 2179-2182.

Echarri, A., *et al.* (2007). "Intracellular trafficking of raft/caveolae domains: insights from integrin signaling." Semin Cell Dev Biol **18**(5): 627-637.

Elferink, C. J., *et al.* (2001). "Maximal aryl hydrocarbon receptor activity depends on an interaction with the retinoblastoma protein." Mol Pharmacol **59**(4): 664-673.

Elizondo, G., *et al.* (2000). "Altered cell cycle control at the G(2)/M phases in aryl hydrocarbon receptor-null embryo fibroblast." Mol Pharmacol **57**(5): 1056-1063.

Elizondo, G., *et al.* (2000). "Altered cell cycle control at the G(2)/M phases in aryl hydrocarbon receptor-null embryo fibroblast." Mol.Pharmacol. **57**(5): 1056-1063.

Ema, M., *et al.* (1992). "cDNA cloning and structure of mouse putative Ah receptor." Biochem Biophys Res Commun **184**(1): 246-253.

Enan, E. and F. Matsumura (1996). "Identification of c-Src as the integral component of the cytosolic Ah receptor complex, transducing the signal of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) through the protein phosphorylation pathway." Biochem Pharmacol **52**(10): 1599-1612.

Fernandez-Salguero, P., *et al.* (1995). "Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor." Science **268**(5211): 722-726.

Fernandez-Salguero, P. M., *et al.* (1996). "Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity." Toxicol Appl Pharmacol **140**(1): 173-179.

Fernandez-Salguero, P. M., *et al.* (1996). "Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity." Toxicol Appl Pharmacol **140**(1): 173-179.

- Fernandez-Salguero, P. M., *et al.* (1997). "Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice." Vet Pathol **34**(6): 605-614.
- Fleming, Y. M., *et al.* (2004). "PDE4-regulated cAMP degradation controls the assembly of integrin-dependent actin adhesion structures and REF52 cell migration." J Cell Sci **117**(Pt 11): 2377-2388.
- Fra, A. M., *et al.* (1995). "De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(19): 8655-8659.
- Frame, M. C. (2002). "Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour." Biochim Biophys Acta **1602**(2): 114-130.
- Frantz, C., *et al.* (2010). "The extracellular matrix at a glance." J Cell Sci **123**(Pt 24): 4195-4200.
- Frericks, M., *et al.* (2007). "Microarray analysis of the AHR system: tissue-specific flexibility in signal and target genes." Toxicol Appl Pharmacol **220**(3): 320-332.
- Friedl, P. and D. Gilmour (2009). "Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(7): 445-457.
- Friedl, P. and K. Wolf (2003). "Proteolytic and non-proteolytic migration of tumour cells and leucocytes." Biochem Soc Symp(70): 277-285.
- Fujii-Kuriyama, Y. and K. Kawajiri (2010). "Molecular mechanisms of the physiological functions of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor, a multifunctional regulator that senses and responds to environmental stimuli." Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci **86**(1): 40-53.
- Fukunaga, B. N., *et al.* (1995). "Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor." J Biol Chem **270**(49): 29270-29278.
- Furness, S. G. and F. Whelan (2009). "The pleiotropy of dioxin toxicity--xenobiotic misappropriation of the aryl hydrocarbon receptor's alternative physiological roles." Pharmacol Ther **124**(3): 336-353.
- Ge, N. L. and C. J. Elferink (1998). "A direct interaction between the aryl hydrocarbon receptor and retinoblastoma protein. Linking dioxin signaling to the cell cycle." J Biol Chem **273**(35): 22708-22713.
- Geiger, B. and K. M. Yamada (2011). "Molecular architecture and function of matrix adhesions." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(5).
- Gimona, M., *et al.* (2008). "Assembly and biological role of podosomes and invadopodia." Curr Opin Cell Biol **20**(2): 235-241.
- Gingras, D., *et al.* (1998). "Localization of RhoA GTPase to endothelial caveolae-enriched membrane domains." Biochem Biophys Res Commun **247**(3): 888-893.
- Glenney, J. R., Jr. (1989). "Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus." J Biol Chem **264**(34): 20163-20166.
- Goetz, J. G., *et al.* (2011). "Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis." Cell **146**(1): 148-163.
- Gomez-Duran, A., *et al.* (2008). "Recruitment of CREB1 and histone deacetylase 2 (HDAC2) to the mouse *Ltbp-1* promoter regulates its constitutive expression in a dioxin receptor-dependent manner." J Mol Biol **380**(1): 1-16.
- Gomez-Duran, A., *et al.* (2006). "LTBP-1 blockade in dioxin receptor-null mouse embryo fibroblasts decreases TGF-beta activity: Role of extracellular proteases plasmin and elastase." J Cell Biochem **97**(2): 380-392.
- Gonzalez, F. J. and P. Fernandez-Salguero (1998). "The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice." Drug Metab Dispos **26**(12): 1194-1198.
- Gradin, K., *et al.* (1994). "A tyrosine kinase-dependent pathway regulates ligand-dependent activation of the dioxin receptor in human keratinocytes." J Biol Chem **269**(38): 23800-23807.
- Grande-Garcia, A. and M. A. del Pozo (2008). "Caveolin-1 in cell polarization and directional migration." Eur J Cell Biol **87**(8-9): 641-647.
- Grande-Garcia, A., *et al.* (2007). "Caveolin-1 regulates cell polarization and directional migration through Src kinase and Rho GTPases." J Cell Biol **177**(4): 683-694.

Greenlee, W. F. and A. Poland (1979). "Nuclear uptake of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in C57BL/6J and DBA/2J mice. Role of the hepatic cytosol receptor protein." J Biol Chem **254**(19): 9814-9821.

Gunzer, M., *et al.* (2000). "Migration of dendritic cells within 3-D collagen lattices is dependent on tissue origin, state of maturation, and matrix structure and is maintained by proinflammatory cytokines." J Leukoc Biol **67**(5): 622-629.

Gunzer, M., *et al.* (2000). "Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential." Immunity **13**(3): 323-332.

Hahn, M. E. (2002). "Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution." Chem Biol Interact **141**(1-2): 131-160.

Hahn, M. E., *et al.* (1997). "Molecular evolution of two vertebrate aryl hydrocarbon (dioxin) receptors (AHR1 and AHR2) and the PAS family." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(25): 13743-13748.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.

Hankinson, O. (1995). "The aryl hydrocarbon receptor complex." Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol. **35**: 307-340.

Harburger, D. S. and D. A. Calderwood (2009). "Integrin signalling at a glance." J Cell Sci **122**(Pt 2): 159-163.

Harstad, E. B., *et al.* (2006). "Liver deformation in Ahr-null mice: evidence for aberrant hepatic perfusion in early development." Mol Pharmacol **69**(5): 1534-1541.

Hayashibara, T., *et al.* (2003). "Possible involvement of aryl hydrocarbon receptor (AhR) in adult T-cell leukemia (ATL) leukemogenesis: constitutive activation of AhR in ATL." Biochem Biophys Res Commun **300**(1): 128-134.

Hill, M. M., *et al.* (2008). "PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function." Cell **132**(1): 113-124.

Hill, M. M., *et al.* (2012). "Co-regulation of cell polarization and migration by caveolar proteins PTRF/Cavin-1 and caveolin-1." PLoS One **7**(8): e43041.

Howe, A. K. (2011). "Cross-talk between calcium and protein kinase A in the regulation of cell migration." Curr Opin Cell Biol **23**(5): 554-561.

Huang, G. and C. J. Elferink (2005). "Multiple mechanisms are involved in Ah receptor-mediated cell cycle arrest." Mol Pharmacol **67**(1): 88-96.

Humphries, M. J., *et al.* (2003). "Mapping functional residues onto integrin crystal structures." Curr Opin Struct Biol **13**(2): 236-243.

Huvneers, S. and E. H. Danen (2009). "Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho." J Cell Sci **122**(Pt 8): 1059-1069.

Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." Cell **110**(6): 673-687.

Ikuta, T., *et al.* (1998). "Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor." J Biol Chem **273**(5): 2895-2904.

Ikuta, T. and K. Kawajiri (2006). "Zinc finger transcription factor Slug is a novel target gene of aryl hydrocarbon receptor." Exp Cell Res **312**(18): 3585-3594.

Ikuta, T., *et al.* (2004). "Cell density regulates intracellular localization of aryl hydrocarbon receptor." J Biol Chem **279**(18): 19209-19216.

Ikuta, T., *et al.* (2004). "Phosphorylation of nuclear localization signal inhibits the ligand-dependent nuclear import of aryl hydrocarbon receptor." Biochem Biophys Res Commun **317**(2): 545-550.

Ikuta, T., *et al.* (2009). "AhR protein trafficking and function in the skin." Biochem Pharmacol **77**(4): 588-596.

Ikuta, T., *et al.* (2010). "B lymphocyte-induced maturation protein 1 is a novel target gene of aryl hydrocarbon receptor." J Dermatol Sci **58**(3): 211-216.

Ikuta, T., *et al.* (2000). "Nucleocytoplasmic shuttling of the aryl hydrocarbon receptor." J Biochem (Tokyo) **127**(3): 503-509.

- Imamoto, A. and P. Soriano (1993). "Disruption of the csk gene, encoding a negative regulator of Src family tyrosine kinases, leads to neural tube defects and embryonic lethality in mice." Cell **73**(6): 1117-1124.
- Ingle, E. (2008). "Src family kinases: regulation of their activities, levels and identification of new pathways." Biochim Biophys Acta **1784**(1): 56-65.
- Ingle, E. (2009). "Csk-binding protein can regulate Lyn signals controlling cell morphology." Int J Biochem Cell Biol **41**(6): 1332-1343.
- Isshiki, M., *et al.* (2002). "Sites of Ca(2+) wave initiation move with caveolae to the trailing edge of migrating cells." J Cell Sci **115**(Pt 3): 475-484.
- Ito, T., *et al.* (2004). "A constitutively active arylhydrocarbon receptor induces growth inhibition of jurkat T cells through changes in the expression of genes related to apoptosis and cell cycle arrest." J Biol Chem **279**(24): 25204-25210.
- Jana, N. R., *et al.* (1999). "Cross-talk between 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and testosterone signal transduction pathways in LNCaP prostate cancer cells." Biochem Biophys Res Commun **256**(3): 462-468.
- Jarvelainen, H., *et al.* (2009). "Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy." Pharmacol Rev **61**(2): 198-223.
- Jones, L. C., *et al.* (2002). "Myb-binding protein 1a augments AhR-dependent gene expression." J Biol Chem **277**(25): 22515-22519.
- Joshi, B., *et al.* (2008). "Phosphorylated caveolin-1 regulates Rho/ROCK-dependent focal adhesion dynamics and tumor cell migration and invasion." Cancer Res **68**(20): 8210-8220.
- Kalluri, R. and M. Zeisberg (2006). "Fibroblasts in cancer." Nat Rev Cancer **6**(5): 392-401.
- Kang, H. J., *et al.* (2006). "BRCA1 modulates xenobiotic stress-inducible gene expression by interacting with ARNT in human breast cancer cells." J Biol Chem **281**(21): 14654-14662.
- Kawabuchi, M., *et al.* (2000). "Transmembrane phosphoprotein Cbp regulates the activities of Src-family tyrosine kinases." Nature **404**(6781): 999-1003.
- Kazlauskas, A., *et al.* (1999). "Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor." J Biol Chem **274**(19): 13519-13524.
- Kazlauskas, A., *et al.* (2001). "The hsp90 chaperone complex regulates intracellular localization of the dioxin receptor." Mol Cell Biol **21**(7): 2594-2607.
- Kim, H. and C. A. McCulloch (2011). "Filamin A mediates interactions between cytoskeletal proteins that control cell adhesion." FEBS Lett **585**(1): 18-22.
- Kim, J. H. and M. R. Stallcup (2004). "Role of the coiled-coil coactivator (CoCoA) in aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription." J Biol Chem **279**(48): 49842-49848.
- Klemke, R. L. (2012). "Trespassing cancer cells: 'fingerprinting' invasive protrusions reveals metastatic culprits." Curr Opin Cell Biol **24**(5): 662-669.
- Klinge, C. M., *et al.* (1999). "The aryl hydrocarbon receptor (AHR)/AHR nuclear translocator (ARNT) heterodimer interacts with naturally occurring estrogen response elements." Mol Cell Endocrinol **157**(1-2): 105-119.
- Klinge, C. M., *et al.* (2000). "The aryl hydrocarbon receptor interacts with estrogen receptor alpha and orphan receptors COUP-TFI and ERRalpha1." Arch Biochem Biophys **373**(1): 163-174.
- Knight, B., *et al.* (2000). "Visualizing muscle cell migration in situ." Curr Biol **10**(10): 576-585.
- Knutson, J. C. and A. Poland (1980). "Keratinization of mouse teratoma cell line XB produced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: an in vitro model of toxicity." Cell **22**(1 Pt 1): 27-36.
- Ko, H. P., *et al.* (1997). "Transactivation domains facilitate promoter occupancy for the dioxin-inducible CYP1A1 gene in vivo." Mol Cell Biol **17**(7): 3497-3507.
- Kobayashi, A., *et al.* (1996). "Cooperative interaction between AhR.Arnt and Sp1 for the drug-inducible expression of CYP1A1 gene." J Biol Chem **271**(21): 12310-12316.
- Kohle, C., *et al.* (2002). "Conditional expression of a constitutively active aryl hydrocarbon receptor in MCF-7 human breast cancer cells." Arch Biochem Biophys **402**(2): 172-179.

Koliopoulos, A., *et al.* (2002). "Increased arylhydrocarbon receptor expression offers a potential therapeutic target for pancreatic cancer." *Oncogene* **21**(39): 6059-6070.

Kolluri, S. K., *et al.* (2001). "Novel target genes of the Ah (dioxin) receptor: transcriptional induction of N-myristoyltransferase 2." *Cancer Res* **61**(23): 8534-8539.

Kolluri, S. K., *et al.* (1999). "p27(Kip1) induction and inhibition of proliferation by the intracellular Ah receptor in developing thymus and hepatoma cells." *Genes Dev* **13**(13): 1742-1753.

Kudo, K., *et al.* (2009). "Characterization of the region of the aryl hydrocarbon receptor required for ligand dependency of transactivation using chimeric receptor between *Drosophila* and *Mus musculus*." *Biochim Biophys Acta* **1789**(6-8): 477-486.

Kumar, M. B., *et al.* (1999). "Differential recruitment of coactivator RIP140 by Ah and estrogen receptors. Absence of a role for LXXLL motifs." *J Biol Chem* **274**(32): 22155-22164.

Labat-Robert, J., *et al.* (1990). "Extracellular matrix." *FEBS Lett* **268**(2): 386-393.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.

Lahvis, G. P., *et al.* (2000). "Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(19): 10442-10447.

Lahvis, G. P., *et al.* (2005). "The aryl hydrocarbon receptor is required for developmental closure of the ductus venosus in the neonatal mouse." *Mol Pharmacol* **67**(3): 714-720.

Lajoie, P. and I. R. Nabi (2010). "Lipid rafts, caveolae, and their endocytosis." *Int Rev Cell Mol Biol* **282**: 135-163.

Lamallice, L., *et al.* (2007). "Endothelial cell migration during angiogenesis." *Circ Res* **100**(6): 782-794.

Le Lay, S. and T. V. Kurzchalia (2005). "Getting rid of caveolins: phenotypes of caveolin-deficient animals." *Biochim Biophys Acta* **1746**(3): 322-333.

Le, P. U., *et al.* (2002). "Caveolin-1 is a negative regulator of caveolae-mediated endocytosis to the endoplasmic reticulum." *J Biol Chem* **277**(5): 3371-3379.

Lee, S. S., *et al.* (1995). "Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators." *Mol Cell Biol* **15**(6): 3012-3022.

Lees, M. J. and M. L. Whitelaw (1999). "Multiple roles of ligand in transforming the dioxin receptor to an active basic helix-loop-helix/PAS transcription factor complex with the nuclear protein Arnt." *Mol Cell Biol* **19**(8): 5811-5822.

Legate, K. R., *et al.* (2009). "Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling." *Genes Dev* **23**(4): 397-418.

Lim, E. J., *et al.* (2008). "Coplanar polychlorinated biphenyl-induced CYP1A1 is regulated through caveolae signaling in vascular endothelial cells." *Chem Biol Interact* **176**(2-3): 71-78.

Lin, B. C., *et al.* (2007). "Deletion of the aryl hydrocarbon receptor-associated protein 9 leads to cardiac malformation and embryonic lethality." *J Biol Chem* **282**(49): 35924-35932.

Linder, S. (2009). "Invadosomes at a glance." *J Cell Sci* **122**(Pt 17): 3009-3013.

Lindsey, S. and E. T. Papoutsakis (2012). "The evolving role of the aryl hydrocarbon receptor (AHR) in the normophysiology of hematopoiesis." *Stem Cell Rev* **8**(4): 1223-1235.

Lund, A. K., *et al.* (2003). "Cardiac hypertrophy in aryl hydrocarbon receptor null mice is correlated with elevated angiotensin II, endothelin-1, and mean arterial blood pressure." *Toxicol Appl Pharmacol* **193**(2): 177-187.

Ma, Q. and K. T. Baldwin (2000). "2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced degradation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) by the ubiquitin-proteasome pathway. Role of the transcription activation and DNA binding of AhR." *J Biol Chem* **275**(12): 8432-8438.

Ma, Q. and K. T. Baldwin (2002). "A cycloheximide-sensitive factor regulates TCDD-induced degradation of the aryl hydrocarbon receptor." *Chemosphere* **46**(9-10): 1491-1500.

- Ma, Q., *et al.* (2000). "Superinduction of CYP1A1 Gene Expression. REGULATION OF 2,3,7,8-TETRACHLORODIBENZO-p-DIOXIN-INDUCED DEGRADATION OF Ah RECEPTOR BY CYCLOHEXIMIDE." Journal of Biological Chemistry **275**(17): 12676-12683.
- Ma, Q. and J. P. Whitlock, Jr. (1996). "The aromatic hydrocarbon receptor modulates the Hepa 1c1c7 cell cycle and differentiated state independently of dioxin." Mol Cell Biol **16**(5): 2144-2150.
- Ma, Q. and J. P. Whitlock, Jr. (1997). "A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin." J Biol Chem **272**(14): 8878-8884.
- Magee, T., *et al.* (2002). "Lipid rafts: cell surface platforms for T cell signaling." Biol Res **35**(2): 127-131.
- Majkova, Z., *et al.* (2009). "Up-regulation of endothelial monocyte chemoattractant protein-1 by coplanar PCB77 is caveolin-1-dependent." Toxicol Appl Pharmacol **237**(1): 1-7.
- Manahan, C. L., *et al.* (2004). "Chemoattractant signaling in dictyostelium discoideum." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 223-253.
- Mao, Y. and J. E. Schwarzbauer (2005). "Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process." Matrix Biol **24**(6): 389-399.
- Margadant, C. and A. Sonnenberg (2010). "Integrin-TGF-beta crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing." EMBO Rep **11**(2): 97-105.
- Marlowe, J. L., *et al.* (2004). "The aryl hydrocarbon receptor displaces p300 from E2F-dependent promoters and represses S phase-specific gene expression." J Biol Chem **279**(28): 29013-29022.
- Martin, S., *et al.* (2009). "Caveolin-1 regulates glioblastoma aggressiveness through the control of alpha(5)beta(1) integrin expression and modulates glioblastoma responsiveness to SJ749, an alpha(5)beta(1) integrin antagonist." Biochim Biophys Acta **1793**(2): 354-367.
- Martin, S. and R. G. Parton (2005). "Caveolin, cholesterol, and lipid bodies." Semin Cell Dev Biol **16**(2): 163-174.
- Matikainen, T., *et al.* (2001). "Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals." Nat Genet **28**(4): 355-360.
- Matsumura, F. (2011). Nongenomic route of action of TCDD: Identity, characteristics, and toxicological significance. The AH Receptor in Biology and Toxicology. R. Pohjanvirta, John Wiley & Sons: 197-215.
- Matthews, J., *et al.* (2005). "Aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription: ligand-dependent recruitment of estrogen receptor alpha to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-responsive promoters." Mol Cell Biol **25**(13): 5317-5328.
- Mayoral, R., *et al.* (2007). "Dispensability and dynamics of caveolin-1 during liver regeneration and in isolated hepatic cells." Hepatology **46**(3): 813-822.
- Meves, A., *et al.* (2009). "The Kindlin protein family: new members to the club of focal adhesion proteins." Trends Cell Biol **19**(10): 504-513.
- Meyer, B. K., *et al.* (1998). "Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity." Mol Cell Biol **18**(2): 978-988.
- Mimura, J., *et al.* (1999). "Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function." Genes Dev **13**(1): 20-25.
- Mimura, J., *et al.* (1997). "Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor." Genes Cells **2**(10): 645-654.
- Minsavage, G. D., *et al.* (2004). "The aryl hydrocarbon receptor (AhR) tyrosine 9, a residue that is essential for AhR DNA binding activity, is not a phosphoresidue but augments AhR phosphorylation." J Biol Chem **279**(20): 20582-20593.
- Miyazono, K., *et al.* (2012). "Tumor-promoting functions of transforming growth factor-beta in progression of cancer." Ups J Med Sci **117**(2): 143-152.

Moennikes, O., *et al.* (2004). "A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor promotes hepatocarcinogenesis in mice." Cancer Res **64**(14): 4707-4710.

Morley, M. E., *et al.* (2007). "Hypoxic inhibition of human cardiac fibroblast invasion and MMP-2 activation may impair adaptive myocardial remodelling." Biochem Soc Trans **35**(Pt 5): 905-907.

Moser, M., *et al.* (2009). "The tail of integrins, talin, and kindlins." Science **324**(5929): 895-899.

Mulero-Navarro, S., *et al.* (2006). "The dioxin receptor is silenced by promoter hypermethylation in human acute lymphoblastic leukemia through inhibition of Sp1 binding." Carcinogenesis **27**(5): 1099-1104.

Mulero-Navarro, S., *et al.* (2005). "Immortalized mouse mammary fibroblasts lacking dioxin receptor have impaired tumorigenicity in a subcutaneous mouse xenograft model." J Biol Chem **280**(31): 28731-28741.

Nada, S., *et al.* (1991). "Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60c-src." Nature **351**(6321): 69-72.

Nada, S., *et al.* (1993). "Constitutive activation of Src family kinases in mouse embryos that lack Csk." Cell **73**(6): 1125-1135.

Navarro, A., *et al.* (2004). "A role for caveolae in cell migration." FASEB J **18**(15): 1801-1811.

Nebert, D. W., *et al.* (2000). "Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis." Biochem Pharmacol **59**(1): 65-85.

Nguyen, D. H., *et al.* (2004). "Cellular cholesterol enrichment impairs T cell activation and chemotaxis." Mech Ageing Dev **125**(9): 641-650.

Nguyen, T. A., *et al.* (1999). "Interactions of nuclear receptor coactivator/corepressor proteins with the aryl hydrocarbon receptor complex." Arch Biochem Biophys **367**(2): 250-257.

Nie, M., *et al.* (2001). "Interactions between aryl hydrocarbon receptor (AhR) and hypoxia signaling pathways." Environ Toxicol Pharmacol **10**(1-2): 17-27.

Niermann, T., *et al.* (2003). "Aryl hydrocarbon receptor ligands repress T-cadherin expression in vascular smooth muscle cells." Biochem Biophys Res Commun **300**(4): 943-949.

Oesch-Bartlomowicz, B., *et al.* (2005). "Aryl hydrocarbon receptor activation by cAMP vs. dioxin: divergent signaling pathways." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(26): 9218-9223.

Oesch-Bartlomowicz, B. and F. Oesch (2005). "Phosphorylation of cytochromes P450: first discovery of a posttranslational modification of a drug-metabolizing enzyme." Biochem Biophys Res Commun **338**(1): 446-449.

Oesterling, E., *et al.* (2008). "Benzo[a]pyrene induces intercellular adhesion molecule-1 through a caveolae and aryl hydrocarbon receptor mediated pathway." Toxicol Appl Pharmacol **232**(2): 309-316.

Ogi, T., *et al.* (2001). "Expression of human and mouse genes encoding polkappa: testis-specific developmental regulation and AhR-dependent inducible transcription." Genes Cells **6**(11): 943-953.

Ohsato, Y., *et al.* (1994). "Mitotic activation of c-Src is suppressed by Csk." Jpn J Cancer Res **85**(10): 1023-1028.

Ohtake, F., *et al.* (2007). "Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase." Nature **446**(7135): 562-566.

Ohtake, F., *et al.* (2007). "[Transcription factor AhR is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase]." Tanpakushitsu Kakusan Koso **52**(15): 1973-1979.

Ohtake, F., *et al.* (2003). "Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor." Nature **423**(6939): 545-550.

Oikawa, T., *et al.* (2008). "Sequential signals toward podosome formation in NIH-src cells." J Cell Biol **182**(1): 157-169.

Okey, A. B., *et al.* (1979). "Regulatory gene product of the Ah locus. Characterization of the cytosolic inducer-receptor complex and evidence for its nuclear translocation." J Biol Chem **254**(22): 11636-11648.

- Oneyama, C., *et al.* (2008). "The lipid raft-anchored adaptor protein Cbp controls the oncogenic potential of c-Src." *Mol Cell* **30**(4): 426-436.
- Otahal, P., *et al.* (2011). "The effects of membrane compartmentalization of csk on TCR signaling." *Biochim Biophys Acta* **1813**(2): 367-376.
- Oxvig, C. and T. A. Springer (1998). "Experimental support for a beta-propeller domain in integrin alpha-subunits and a calcium binding site on its lower surface." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(9): 4870-4875.
- Parat, M. O., *et al.* (2003). "Differential caveolin-1 polarization in endothelial cells during migration in two and three dimensions." *Mol Biol Cell* **14**(8): 3156-3168.
- Park, H. (1999). "Aromatic hydrocarbon nuclear translocator as a common component for the hypoxia- and dioxin-induced gene expression." *Mol Cells* **9**(2): 172-178.
- Park, S., *et al.* (2000). "Regulation of DNA binding activity of the ligand-activated aryl hydrocarbon receptor by tyrosine phosphorylation." *Arch Biochem Biophys* **381**(2): 302-312.
- Parsonage, G., *et al.* (2005). "A stromal address code defined by fibroblasts." *Trends Immunol* **26**(3): 150-156.
- Parton, R. G., *et al.* (2006). "Biogenesis of caveolae: a structural model for caveolin-induced domain formation." *J Cell Sci* **119**(Pt 5): 787-796.
- Parton, R. G. and A. A. Richards (2003). "Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms." *Traffic* **4**(11): 724-738.
- Pearce, S. T., *et al.* (2004). "Interaction of the aryl hydrocarbon receptor ligand 6-methyl-1,3,8-trichlorodibenzofuran with estrogen receptor alpha." *Cancer Res* **64**(8): 2889-2897.
- Pelkmans, L. (2005). "Secrets of caveolae- and lipid raft-mediated endocytosis revealed by mammalian viruses." *Biochim Biophys Acta* **1746**(3): 295-304.
- Pelkmans, L., *et al.* (2005). "Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and caveolae/raft-mediated endocytosis." *Nature* **436**(7047): 78-86.
- Pelkmans, L. and A. Helenius (2002). "Endocytosis via caveolae." *Traffic* **3**(5): 311-320.
- Pelkmans, L., *et al.* (2002). "Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae." *Science* **296**(5567): 535-539.
- Perdew, G. H. (1988). "Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein." *J Biol Chem* **263**(27): 13802-13805.
- Peters, J. M., *et al.* (1999). "Amelioration of TCDD-induced teratogenesis in aryl hydrocarbon receptor (AhR)-null mice." *Toxicol Sci* **47**(1): 86-92.
- Phelan, D., *et al.* (1998). "Activation of the Ah receptor signal transduction pathway by bilirubin and biliverdin." *Arch Biochem Biophys* **357**(1): 155-163.
- Place, A. T., *et al.* (2011). "Cooperative role of caveolin-1 and C-terminal Src kinase binding protein in C-terminal Src kinase-mediated negative regulation of c-Src." *Mol Pharmacol* **80**(4): 665-672.
- Playford, M. P. and M. D. Schaller (2004). "The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology." *Oncogene* **23**(48): 7928-7946.
- Pohjanvirta, R., Ed. (2012). *The AH Receptor in Biology and Toxicology*. Ney Jersey, USA, John Wiley and Sons Inc.
- Pohjanvirta, R. and J. Tuomisto (1994). "Short-term toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in laboratory animals: effects, mechanisms, and animal models." *Pharmacol Rev* **46**(4): 483-549.
- Poincloux, R., *et al.* (2009). "Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia." *J Cell Sci* **122**(Pt 17): 3015-3024.
- Poland, A., *et al.* (1976). "Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase." *J Biol Chem* **251**(16): 4936-4946.

Poland, A. and J. C. Knutson (1982). "2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity." Annu Rev Pharmacol Toxicol **22**: 517-554.

Pollenz, R. S. (1996). "The aryl-hydrocarbon receptor, but not the aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator protein, is rapidly depleted in hepatic and nonhepatic culture cells exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin." Mol Pharmacol **49**(3): 391-398.

Pollenz, R. S. and C. Buggy (2006). "Ligand-dependent and -independent degradation of the human aryl hydrocarbon receptor (hAHR) in cell culture models." Chem Biol Interact **164**(1-2): 49-59.

Pollenz, R. S., *et al.* (1994). "The aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein show distinct subcellular localizations in Hepa 1c1c7 cells by immunofluorescence microscopy." Mol Pharmacol **45**(3): 428-438.

Porter, K. E. and N. A. Turner (2009). "Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling." Pharmacol Ther **123**(2): 255-278.

Procopio, M., *et al.* (2002). "A model for recognition of polychlorinated dibenzo-p-dioxins by the aryl hydrocarbon receptor." Eur J Biochem **269**(1): 13-18.

Puga, A., *et al.* (2002). "Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation." Toxicology **181-182**: 171-177.

Puga, A., *et al.* (2005). "Ah receptor signals cross-talk with multiple developmental pathways." Biochemical Pharmacology **69**(2): 199-207.

Puga, A., *et al.* (2002). "Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation." Chem Biol Interact **141**(1-2): 117-130.

Qin, H. and J. A. Powell-Coffman (2004). "The Caenorhabditis elegans aryl hydrocarbon receptor, AHR-1, regulates neuronal development." Dev Biol **270**(1): 64-75.

Radel, C., *et al.* (2007). "Participation of caveolae in beta1 integrin-mediated mechanotransduction." Biochem Biophys Res Commun **358**(2): 626-631.

Radel, C. and V. Rizzo (2005). "Integrin mechanotransduction stimulates caveolin-1 phosphorylation and recruitment of Csk to mediate actin reorganization." Am J Physiol Heart Circ Physiol **288**(2): H936-945.

Razani, B., *et al.* (2001). "Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities." J Biol Chem **276**(41): 38121-38138.

Resh, M. D. (2004). "Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins." Subcell Biochem **37**: 217-232.

Rey-Barroso, J., *et al.* (2013). "The dioxin receptor controls beta1 integrin activation in fibroblasts through a Cbp-Csk-Src pathway." Cell Signal **25**(4): 848-859.

Reyes, H., *et al.* (1992). "Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor." Science **256**(5060): 1193-1195.

Rezakhaniha, R., *et al.* (2012). "Experimental investigation of collagen waviness and orientation in the arterial adventitia using confocal laser scanning microscopy." Biomech Model Mechanobiol **11**(3-4): 461-473.

Rico-Leo, E. M., *et al.* (2013). "Dioxin Receptor Expression Inhibits Basal and Transforming Growth Factor beta-induced Epithelial-to-mesenchymal Transition." J Biol Chem **288**(11): 7841-7856.

Richter, C. A., *et al.* (2001). "Regulation of subcellular localization of the aryl hydrocarbon receptor (AhR)." Arch.Biochem.Biophys. **389**(2): 207-217.

Ridley, A. J., *et al.* (2003). "Cell migration: integrating signals from front to back." Science **302**(5651): 1704-1709.

Rizzo, V., *et al.* (2003). "Recruitment of endothelial caveolae into mechanotransduction pathways by flow conditioning in vitro." Am J Physiol Heart Circ Physiol **285**(4): H1720-1729.

- Roberts, B. J. and M. L. Whitelaw (1999). "Degradation of the basic helix-loop-helix/Per-ARNT-Sim homology domain dioxin receptor via the ubiquitin/proteasome pathway." J Biol Chem **274**(51): 36351-36356.
- Rocks, O., *et al.* (2006). "Spatio-temporal segregation of Ras signals: one ship, three anchors, many harbors." Curr Opin Cell Biol **18**(4): 351-357.
- Roman, A. C., *et al.* (2008). "Genome-wide B1 retrotransposon binds the transcription factors dioxin receptor and Slug and regulates gene expression in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(5): 1632-1637.
- Roman, A. C., *et al.* (2009). "Dioxin receptor deficiency impairs angiogenesis by a mechanism involving VEGF-A depletion in the endothelium and transforming growth factor-beta overexpression in the stroma." J Biol Chem **284**(37): 25135-25148.
- Ronnov-Jessen, L., *et al.* (1996). "Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction." Physiol Rev **76**(1): 69-125.
- Rothberg, K. G., *et al.* (1992). "Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats." Cell **68**(4): 673-682.
- Rottner, K., *et al.* (1999). "Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics." Curr Biol **9**(12): 640-648.
- Rowlands, J. C. and J. A. Gustafsson (1997). "Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction." Crit Rev Toxicol **27**(2): 109-134.
- Rozario, T. and D. W. DeSimone (2010). "The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view." Dev Biol **341**(1): 126-140.
- Sabe, H., *et al.* (1994). "Analysis of the binding of the Src homology 2 domain of Csk to tyrosine-phosphorylated proteins in the suppression and mitotic activation of c-Src." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(9): 3984-3988.
- Sadek, C. M. and B. L. Allen-Hoffmann (1994). "Cytochrome P450IA1 is rapidly induced in normal human keratinocytes in the absence of xenobiotics." J Biol Chem **269**(23): 16067-16074.
- Sadek, C. M. and B. L. Allen-Hoffmann (1994). "Suspension-mediated induction of Hepa 1c1c7 Cyp1a-1 expression is dependent on the Ah receptor signal transduction pathway." J Biol Chem **269**(50): 31505-31509.
- Sadek, C. M., *et al.* (2000). "Isolation and characterization of AINT: a novel ARNT interacting protein expressed during murine embryonic development." Mech Dev **97**(1-2): 13-26.
- Safe, S., *et al.* (1998). "Ah receptor agonists as endocrine disruptors: antiestrogenic activity and mechanisms." Toxicol Lett **102-103**: 343-347.
- Safe, S., *et al.* (2000). "Mechanisms of inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor crosstalk in human breast cancer cells." J Mammary Gland Biol Neoplasia **5**(3): 295-306.
- Salanueva, I. J., *et al.* (2007). "Integrin regulation of caveolin function." J Cell Mol Med **11**(5): 969-980.
- Santiago-Josefat, B. and P. M. Fernandez-Salguero (2003). "Proteasome inhibition induces nuclear translocation of the dioxin receptor through an Sp1 and protein kinase C-dependent pathway." J Mol Biol **333**(2): 249-260.
- Santiago-Josefat, B., *et al.* (2004). "Overexpression of latent transforming growth factor- β binding protein 1 (LTBP-1) in dioxin receptor-null mouse embryo fibroblasts." J Cell Sci **117**(Pt 6): 849-859.
- Santiago-Josefat, B., *et al.* (2001). "Proteasome inhibition induces nuclear translocation and transcriptional activation of the dioxin receptor in mouse embryo primary fibroblasts in the absence of xenobiotics." Mol Cell Biol **21**(5): 1700-1709.
- Savouret, J.-F., *et al.* (2001). "7-Ketocholesterol Is an Endogenous Modulator for the Arylhydrocarbon Receptor." J. Biol. Chem. **276**(5): 3054-3059.
- Schaldach, C. M., *et al.* (1999). "Lipoxin A4: a new class of ligand for the Ah receptor." Biochemistry **38**(23): 7594-7600.

Schmidt, J. V., *et al.* (1996). "Characterization of a murine Ahr null allele: Involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(13): 6731-6736.

Schubert, W., *et al.* (2001). "Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo." J Biol Chem **276**(52): 48619-48622.

Sharma, D. K., *et al.* (2005). "The glycosphingolipid, lactosylceramide, regulates beta1-integrin clustering and endocytosis." Cancer Res **65**(18): 8233-8241.

Sharma, D. K., *et al.* (2004). "Selective stimulation of caveolar endocytosis by glycosphingolipids and cholesterol." Mol Biol Cell **15**(7): 3114-3122.

Shaw, T. J. and P. Martin (2009). "Wound repair at a glance." J Cell Sci **122**(Pt 18): 3209-3213.

Shi, F. and J. Sottile (2008). "Caveolin-1-dependent beta1 integrin endocytosis is a critical regulator of fibronectin turnover." J Cell Sci **121**(Pt 14): 2360-2371.

Shima, T., *et al.* (2003). "Transmembrane phosphoprotein Cbp senses cell adhesion signaling mediated by Src family kinase in lipid rafts." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(25): 14897-14902.

Shimizu, Y., *et al.* (2000). "Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(2): 779-782.

Sinal, C. J. and J. R. Bend (1997). "Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent Induction of Cyp1a1 by Bilirubin in Mouse Hepatoma Hepa 1c1c7 Cells." Mol Pharmacol **52**(4): 590-599.

Singh, S. S., *et al.* (1996). "Characterization of the activated form of the aryl hydrocarbon receptor in the nucleus of HeLa cells in the absence of exogenous ligand." Arch Biochem Biophys **329**(1): 47-55.

Sirvent, A., *et al.* (2010). "Src family tyrosine kinases-driven colon cancer cell invasion is induced by Csk membrane delocalization." Oncogene **29**(9): 1303-1315.

Smida, M., *et al.* (2007). "A novel negative regulatory function of the phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains: blocking Ras activation." Blood **110**(2): 596-615.

Smith, M. L., *et al.* (2007). "Force-induced unfolding of fibronectin in the extracellular matrix of living cells." PLoS Biol **5**(10): e268.

Song, J., *et al.* (2002). "A ligand for the aryl hydrocarbon receptor isolated from lung." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(23): 14694-14699.

Stahlhut, M. and B. van Deurs (2000). "Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton." Mol Biol Cell **11**(1): 325-337.

Stan, R. V. (2005). "Structure of caveolae." Biochim Biophys Acta **1746**(3): 334-348.

Stejskalova, L., *et al.* (2011). "Endogenous and exogenous ligands of aryl hydrocarbon receptor: current state of art." Curr Drug Metab **12**(2): 198-212.

Sun, R. J., *et al.* (2003). "Caveolin-1 redistribution in human endothelial cells induced by laminar flow and cytokine." Biorheology **40**(1-3): 31-39.

Sun, X. H., *et al.* (2007). "Identification of a novel domain at the N terminus of caveolin-1 that controls rear polarization of the protein and caveolae formation." J Biol Chem **282**(10): 7232-7241.

Superti-Furga, G., *et al.* (1993). "Csk inhibition of c-Src activity requires both the SH2 and SH3 domains of Src." EMBO J **12**(7): 2625-2634.

Svec, A. (2008). "Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains/Csk-binding protein: a protein that matters." Pathol Res Pract **204**(11): 785-792.

Swanson, H. I., *et al.* (1995). "DNA binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT, and SIM proteins." J Biol Chem **270**(44): 26292-26302.

Tan, Z., *et al.* (2002). "Activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) by aromatic hydrocarbons: role in the regulation of aryl hydrocarbon receptor (AHR) function." Biochem Pharmacol **64**(5-6): 771-780.

Tanos, R., *et al.* (2012). "Aryl hydrocarbon receptor regulates the cholesterol biosynthetic pathway in a dioxin response element-independent manner." Hepatology **55**(6): 1994-2004.

- Tapley, P., *et al.* (1989). "Integrins isolated from Rous sarcoma virus-transformed chicken embryo fibroblasts." *Oncogene* **4**(3): 325-333.
- Thackaberry, E. A., *et al.* (2002). "Aryl hydrocarbon receptor null mice develop cardiac hypertrophy and increased hypoxia-inducible factor-1alpha in the absence of cardiac hypoxia." *Cardiovasc Toxicol* **2**(4): 263-274.
- Tian, W. M., *et al.* (2002). "[Effect of gufuhuotang on hemorheology and lipid metabolism of hormonal necrosis of femoral head]." *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **27**(10): 769-771.
- Tian, Y., *et al.* (1999). "Ah receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity." *J Biol Chem* **274**(1): 510-515.
- Tijet, N., *et al.* (2006). "Aryl hydrocarbon receptor regulates distinct dioxin-dependent and dioxin-independent gene batteries." *Mol Pharmacol* **69**(1): 140-153.
- Tomasek, J. J., *et al.* (2002). "Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(5): 349-363.
- Tomkiewicz, C., *et al.* (2013). "The aryl hydrocarbon receptor regulates focal adhesion sites through a non-genomic FAK/Src pathway." *Oncogene* **32**(14): 1811-1820.
- Trimmer, C., *et al.* (2010). "CAV1 inhibits metastatic potential in melanomas through suppression of the integrin/Src/FAK signaling pathway." *Cancer Res* **70**(19): 7489-7499.
- Ulrich, F. and C. P. Heisenberg (2009). "Trafficking and cell migration." *Traffic* **10**(7): 811-818.
- van Deurs, B., *et al.* (2003). "Caveolae: anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean." *Trends Cell Biol* **13**(2): 92-100.
- Vicente-Manzanares, M. and A. R. Horwitz (2011). "Adhesion dynamics at a glance." *J Cell Sci* **124**(Pt 23): 3923-3927.
- Vicente-Manzanares, M., *et al.* (2005). "Cell migration at a glance." *J Cell Sci* **118**(Pt 21): 4917-4919.
- Vogel, C. F., *et al.* (2004). "Dioxin increases C/EBPbeta transcription by activating cAMP/protein kinase A." *J Biol Chem* **279**(10): 8886-8894.
- Wang, M., *et al.* (2004). "Conservation of the genomic structure and receptor-mediated signaling between human and rat IL-24." *Genes Immun* **5**(5): 363-370.
- Wang, R., *et al.* (2013). "Lipid raft regulates the initial spreading of melanoma A375 cells by modulating beta1 integrin clustering." *Int J Biochem Cell Biol* **45**(8): 1679-1689.
- Wang, S. and O. Hankinson (2002). "Functional Involvement of the Brahma/SWI2-related Gene 1 Protein in Cytochrome P4501A1 Transcription Mediated by the Aryl Hydrocarbon Receptor Complex." *J.Biol.Chem.* **277**(14): 11821-11827.
- Wei, Y. D., *et al.* (1998). "Rapid and transient induction of CYP1A1 gene expression in human cells by the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole." *Chem Biol Interact* **110**(1-2): 39-55.
- Weiss, C., *et al.* (1996). "Complementation of Ah receptor deficiency in hepatoma cells: negative feedback regulation and cell cycle control by the Ah receptor." *Exp Cell Res* **226**(1): 154-163.
- Whitlock, J. P., Jr. (1999). "Induction of cytochrome P4501A1." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**: 103-125.
- Wihlen, B., *et al.* (2009). "Estrogen receptor subtype- and promoter-specific modulation of aryl hydrocarbon receptor-dependent transcription." *Mol Cancer Res* **7**(6): 977-986.
- Wilhelmsson, A., *et al.* (1990). "The specific DNA binding activity of the dioxin receptor is modulated by the 90 kd heat shock protein." *Embo J* **9**(1): 69-76.
- Wilson, S. R., *et al.* (2013). "The tumor suppressor Kruppel-like factor 6 is a novel aryl hydrocarbon receptor DNA binding partner." *J Pharmacol Exp Ther* **345**(3): 419-429.
- Williams, T. M. and M. P. Lisanti (2005). "Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis." *Am J Physiol Cell Physiol* **288**(3): C494-506.
- Wormke, M., *et al.* (2000). "Crosstalk between estrogen receptor alpha and the aryl hydrocarbon receptor in breast cancer cells involves unidirectional activation of proteasomes." *FEBS Lett* **478**(1-2): 109-112.

Wormke, M., *et al.* (2003). "The aryl hydrocarbon receptor mediates degradation of estrogen receptor alpha through activation of proteasomes." Mol Cell Biol **23**(6): 1843-1855.

Woudenberg, J., *et al.* (2010). "Caveolin-1 is enriched in the peroxisomal membrane of rat hepatocytes." Hepatology **51**(5): 1744-1753.

Xing, X., *et al.* (2012). "SUMOylation of AhR modulates its activity and stability through inhibiting its ubiquitination." J Cell Physiol **227**(12): 3812-3819.

Yang, B. and V. Rizzo (2013). "Shear Stress Activates eNOS at the Endothelial Apical Surface Through 1 Containing Integrins and Caveolae." Cell Mol Bioeng **6**(3): 346-354.

Yang, X., *et al.* (2005). "The aryl hydrocarbon receptor constitutively represses c-myc transcription in human mammary tumor cells." Oncogene **24**(53): 7869-7881.

Yumoto, R., *et al.* (2006). "Clathrin-mediated endocytosis of FITC-albumin in alveolar type II epithelial cell line RLE-6TN." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **290**(5): L946-955.

Zaher, H., *et al.* (1998). "The involvement of aryl hydrocarbon receptor in the activation of transforming growth factor-beta and apoptosis." Mol Pharmacol **54**(2): 313-321.

Zaidel-Bar, R., *et al.* (2003). "Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells." J Cell Sci **116**(Pt 22): 4605-4613.

Zavadil, J. and E. P. Bottinger (2005). "TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions." Oncogene **24**(37): 5764-5774.

Zemljic Jokhadar, S., *et al.* (2013). "Positioning of integrin beta1, caveolin-1 and focal adhesion kinase on the adhered membrane of spreading cells." Cell Biol Int.

