

# ÍNDICE

*RESUMEN*

*ABSTRACT*

*RESUM*

*LISTA DE FIGURAS*

*LISTA DE TABLAS*

*ABREVIATURAS*

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1. Poliaminas.....	2
1.1. Tipos y estructura .....	2
1.2. Metabolismo de las poliaminas .....	3
1.3. Funciones de las poliaminas .....	5
1.4. Poliaminas y cáncer .....	6
2. Cáncer.....	7
2.1. Rasgos distintivos .....	7
3. La transición epitelio-mesénquima.....	14
3.1. Cambios morfológicos y reorganización del citoesqueleto .....	15
3.2. Cambios en la expresión génica y proteica .....	17
3.3. Factores de transcripción que dirigen la EMT .....	18
3.4. EMT en condiciones fisiológicas normales y cáncer .....	22
4. El factor de traducción eIF5A.....	23
4.1. Descubrimiento y estructura .....	24
4.2. Isoformas de eIF5A .....	25
4.3. Expresión y localización celular de eIF5A .....	26
4.4. El aminoácido hipusina .....	28
4.4.1. Ruta de hipusinación .....	29
4.4.2. Importancia de la hipusinación .....	30

4.5. Función biológica .....	31
4.6. eIF5A y cáncer .....	34
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>37</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
1. Ácidos nucleicos.....	40
1.1. ARN de interferencia .....	40
1.2. ADNs y plásmidos .....	40
1.3. Transformación de bacterias por choque térmico .....	41
1.4. Purificación del ADN .....	41
2. Cultivos celulares .....	42
2.1. Líneas celulares estables comerciales de CPNM .....	42
2.2. Generación de líneas celulares estables .....	42
2.2.1. Análisis de la capacidad proliferativa celular .....	43
2.3. Cultivo en adherencia de las líneas celulares .....	43
3. Ensayos celulares.....	44
3.1. Transfecciones transientes .....	44
3.2. Silenciamiento génico mediado por ARN pequeño de interferencia .....	45
3.3. Inducción de la EMT con TGF $\beta$ 1 .....	45
3.4. Inhibición farmacológica de eIF5A con GC7 .....	45
4. Análisis de expresión génica.....	46
4.1. Extracción de ARN .....	46
4.2. Transcripción reversa .....	47
4.3. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) .....	47
5. Análisis de expresión proteica.....	49
5.1. Preparación de extractos proteicos .....	49
5.2. Cuantificación de la concentración proteica .....	49
5.3. Western Blot .....	49
6. Análisis de la traducción celular.....	51
6.1. Perfiles polisomales .....	51

6.2. Ensayos de marcaje con puromicina .....	53
7. Análisis de imagen.....	53
7.1. Fijación del citoesqueleto .....	53
7.2. Inmunofluorescencia .....	54
8. Análisis celular.....	55
8.1. Citometría de flujo .....	55
8.2. Ensayos de proliferación .....	56
8.3. Ensayos de migración .....	56
9. Modelos experimentales <i>in vivo</i> .....	57
9.1. Animales de experimentación .....	57
9.2. Inyección subcutánea de células .....	58
9.3. Obtención de muestras .....	58
10. Análisis histológico de las muestras de modelo animal.....	58
10.1. Fijación en PFA .....	58
10.2. Inclusión en parafina y criopreservación .....	59
10.3. Obtención de cortes .....	59
10.4. Inmunofluorescencia .....	59
11. Análisis histológico de las muestras de biopsias de pacientes.....	60
11.1. Micromatrices de tejido (TMA) y técnicas de marcaje inmunohistoquímico .....	60
12. Análisis estadísticos.....	61
<b>RESULTADOS</b> .....	63
1. Clasificación fenotípica de las líneas celulares A549, H1395, PC9 y H441.....	64
2. Estudio de la inhibición génica de eIF5A1 y eIF5A2.....	68
2.1. El silenciamiento génico de eIF5A es específico de cada isoforma y existe una regulación entre ambas .....	68
2.2. El silenciamiento génico de <i>EIF5A2</i> disminuye la proliferación celular .....	71
2.3. El silenciamiento génico de <i>EIF5A2</i> inhibe el cambio de la morfología celular en la EMT inducida por TGFβ1 .....	72
2.4. El silenciamiento génico de eIF5A2 inhibe la migración celular .....	73

2.5. El silenciamiento génico de <i>EIF5A2</i> en presencia de TGFβ1 disminuye la expresión de marcadores de tipo mesenquimal .....	76
2.6. El silenciamiento génico de <i>EIF5A2</i> en presencia de TGFβ1 disminuye la expresión de proteínas implicadas en la EMT .....	78
2.7. El silenciamiento génico de <i>eIF5A2</i> provoca la rotura de los filamentos de actina y su acumulación en nudos .....	83
3. Estudio de la sobreexpresión constitutiva de <i>eIF5A</i> .....	84
3.1. Generación de las líneas estables H1395-EV y H1395- <i>eIF5A2</i> .....	85
3.2. La sobreexpresión de <i>eIF5A2</i> aumenta la proliferación celular .....	89
3.3. La sobreexpresión de <i>eIF5A2</i> induce la migración celular .....	92
3.4. Efecto del tratamiento con TGFβ1 .....	93
3.4.1. El tratamiento con TGFβ1 induce la expresión de <i>eIF5A2</i> y <i>eIF5A2</i> hipusinado .....	93
3.4.2. El tratamiento con TGFβ1 aumenta la expresión de algunos marcadores de fenotipo mesenquimal en las células H1395- <i>eIF5A2</i> .....	96
3.4.3. El tratamiento con TGFβ1 aumenta la expresión de proteínas involucradas en la EMT en las células H1395- <i>eIF5A2</i> .....	98
3.5. Efecto de la inhibición farmacológica con GC7, solo o en combinación con TGFβ1 .....	100
3.5.1. La inhibición farmacológica con GC7 inhibe la expresión de <i>eIF5A</i> y <i>eIF5A</i> -Hip .....	101
3.5.2. El tratamiento con GC7 inhibe la expresión de marcadores de fenotipo mesenquimal en las células H1395- <i>eIF5A2</i> .....	103
3.5.3. El tratamiento con GC7 inhibe la expresión de proteínas involucradas en la EMT en las células H1395- <i>eIF5A2</i> .....	105
3.6. El tratamiento con TGFβ1 induce la localización en la membrana plasmática de <i>eIF5A2</i> -Hip .....	108
4. Papel de <i>eIF5A2</i> en la traducción de proteínas .....	109
4.1. La sobreexpresión de <i>eIF5A2</i> aumenta la cantidad de polisomas en las células ..	110
4.2. <i>eIF5A2</i> -Hip colocaliza con puromicina en puntos de traducción activos .....	111

5. Estudio de eIF5A2 <i>in vivo</i> en modelos de xenotrasplante en ratón .....	114
5.1. La sobreexpresión de eIF5A2 promueve la formación de masas de células metastásicas .....	114
6. Expresión de eIF5A2 en muestras de pacientes de CPNM .....	116
<b>DISCUSIÓN</b> .....	125
1. Características fenotípicas de las líneas de CPNM estudiadas.....	126
2. Inhibición génica de eIF5A.....	126
3. Efecto del tratamiento con TGFβ1 sobre la expresión de eIF5A.....	128
4. Papel de eIF5A2 en la señalización por TGFβ1.....	130
5. La inhibición de eIF5A2 mediante GC7 como posible diana terapéutica.....	134
6. Modelos experimentales <i>in vivo</i> para el estudio de la función de eIF5A.....	135
7. Relación de eIF5A2 con la maquinaria de traducción.....	137
8. Modelo de acción y perspectivas futuras.....	138
<b>CONCLUSIONES</b> .....	141
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	145
<b>CONTRIBUCIONES</b> .....	169
<b>ANEXO</b> .....	175