

Universidad Autónoma de Madrid

Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares



**Papel de Caveolina-1 en la biogénesis de exosomas:
Implicación en la organización de la matriz extracelular
y en la progresión tumoral**

Lucas Albacete Albacete

Madrid, 2018

**Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid**



**Papel de Caveolina-1 en la biogénesis de exosomas:
Implicación en la organización de la matriz extracelular
y en la progresión tumoral**

Doctorando: Lucas Albacete Albacete, Licenciado en Bioquímica

Director: Miguel Ángel del Pozo Barriuso, MD, PhD

Directora: Inmaculada Navarro Lérída, PhD

Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC)

Madrid, 2018

AGRADECIMIENTOS

El ser humano, al igual que la gran mayoría de las especies, es social por naturaleza ¹, lo que le hace necesitar y ser necesitado de otras personas y mi caso no es una excepción. Por tanto, yo soy yo y mi circunstancia ², es decir, toda la gente que ha estado a mi alrededor ha contribuido en mi construcción como persona y concretamente como científico, aunque la primera siempre será la prevalente.

Los cimientos, por supuesto, han sido mi familia. Mi madre y mi padre que, aunque ya no están, sin sus enseñanzas nunca habría sido quien soy. Mi hermano Miguel, que no solo está en mis cimientos, sino que es la mitad de esta especie de motorcillo que hemos creado juntos y que continúa en marcha, apoyándonos el uno en el otro. De él sigo aprendiendo muchísimo día a día, lo que me hace sentir cada vez más admiración y orgullo.

Mi familia nunca se ha definido por ser pequeña y dentro de ella también he encontrado amigos y pilares de sostén. Mi abuela, Pepe, Ana, Julio, Juana, Cari, Alfonso, Marisa, Paula, Itziar, Tana, Rocío. Todos ellos han estado en momentos muy felices, pero también en los malos.

No puedo olvidarme de mis amigos de toda la vida, esos de los que cuando miras atrás, siempre han estado, esos que también forman parte de los cimientos. Parte de mi personalidad se formó a la vez que la suya por lo que siempre existirá ese vínculo por el que aún nos entendemos sin decir nada.

La edificación continúa y nuevos peones se ponen manos a la obra. En la facultad conocí a mucha gente que puso su propio grano de arena, Ivy, Cholo, Clara, Elsa, Marta, pero, sobre todo, lo que más me hizo aprender fue llegar a Madrid de la mano de Ari y donde Nora y Adriana, a su manera especial, fueron referentes.

En los 10 años que llevo ya en Madrid he conocido a verdaderos aparejadores de quien soy. Inés es una de estas personas. Nos hemos visto crecer en este Madrid convulso lleno de penas y alegrías, con cervezas, lágrimas y por supuesto y siempre, manifestaciones. Borja, compañero de plazas y reflexiones de vida. Mirar al cielo siempre es un placer contigo.

Ángel, arquitecto, sin ti este edificio que hemos levantado juntos no sería el mismo y seguramente haría aguas. Te has asomado a mis cimientos y no solo los has aceptado si no que has ayudado a reforzarlos.

Al final hay que poner el tejado. La vida científica. Agradezco a Miguel Ángel la oportunidad que me dio de trabajar en este laboratorio y haberme dado todos los materiales necesarios para la construcción y a Inma como directora de obras y el imprescindible andamiaje.

Como no, no puedo olvidarme de todos los que a mi alrededor edificaban sus propios proyectos y que a su vez me ayudaban con el mío. Especialmente Rober, Sergio, Alberto, Tere, Cris, Montero, Amaia, Mauro, Xenia y Sarah.

Él ya llevaba un tiempo esperándola
aunque en realidad estaba acostumbrado,
ella siempre fue un alma libre.
Por fin apareció con un cigarro encendido como si no pasase nada.
¡Vamos, María!

Encendieron el motor y soltaron amarras
Cuando ya salieron de puerto pudieron izar las velas
Amolla, ¡amolla! ¡La escota del génova, coño!

Ya se alejaban rumbo al Cabo de Hornos
y el viento de alta mar hizo escorar el barco.
A lo lejos se podían escuchar los gritos
¡Manolo, por favor! Y él con una sonrisa

RESUMEN

La composición y las propiedades físicas de la matriz extracelular (ECM, ExtraCellular Matrix) condicionan significativamente el comportamiento de las células presentes en los tejidos. En los últimos años, el papel de la deposición y remodelado de la ECM ha cobrado una gran importancia como elemento esencial en la progresión tumoral. Sin embargo, los mecanismos por los que las células estromales regulan la formación de la ECM son aún poco conocidos. La interacción estroma-tumor depende de manera fundamental de la comunicación celular a través de exosomas, pequeñas vesículas secretadas por la mayoría de los tipos celulares y generadas en el lumen de los cuerpos multivesiculares (MVBs, MultiVesicular Body). En este trabajo hemos mostrado que Caveolina-1 (Cav1), un organizador esencial de las membranas lipídicas, juega un papel crucial en la regulación tanto de la biogénesis de exosomas como en la selección de su cargo proteico a través de la modulación del colesterol. Mediante ensayos proteómicos, hemos podido identificar que las proteínas de matriz constituyen una de las principales familias cuya incorporación a los exosomas depende específicamente de la presencia de Cav1. En concreto, y dentro de esta familia, Tenascina-C (TnC) es uno de los representantes más relevantes. Utilizando diferentes ensayos funcionales hemos demostrado que Cav1 modula la deposición de ECM a través de exosomas, lo que promueve la invasión y migración celular. Además, hemos confirmado que los exosomas derivados de células Cav1WT, pero no los procedentes de células Cav1KO, eran capaces de nuclear ECM en nichos distantes en diferentes órganos *in vivo*. Estas observaciones sugieren, por tanto, el papel clave de Cav1 como regulador de los niveles de colesterol en los MVBs, lo cual condiciona la deposición de ciertos componentes de la ECM a través de su selección para la entrada en los exosomas. Todos estos datos apoyan el modelo en el que Cav1 es un regulador central de las interacciones estroma-tumor a través de la deposición de ECM mediada por exosomas.

SUMMARY

The composition and physical properties of the extracellular matrix (ECM) critically influence the behavior of cells located in different tissues. Moreover, the role of the ECM deposition and remodeling in cancer has emerged as a crucial element in tumor progression. However, the molecular mechanisms by which stromal and tumour cell populations regulate ECM layering are poorly understood. Tumour-stroma interaction is critically dependent on cell-cell communication mediated by exosomes, small vesicles secreted by most cell types and generated within multivesicular bodies (MVBs). Here, we show that caveolin-1 (Cav1), an essential regulator of lipid membranes, plays a central role in modulating both exosome biogenesis and exosomal protein cargo sorting through cholesterol-dependent mechanisms. Quantitative proteomics profiling revealed that a major share of Cav1-dependent exosomal cargoes are composed of ECM proteins, one of the most important components being tenascin-C (TnC). Comparative functional assays demonstrated that Cav1 is required for fibroblast-derived exosomes to deposit ECM and promote tumour cell invasiveness. Exosomes purified from Cav1^{WT} cells, but not those from Cav1-null cells, were able to nucleate distant stromal niches in different organs *in vivo*. These findings suggest a key role for Cav1 as a cholesterol rheostat in MVBs, and seems to determine ECM deposition by eliciting ECM component sorting into specific exosome pools. These results, together with previous work, support a model in which Cav1 is a central regulatory hub for tumour-stroma interactions through a novel exosome-dependent ECM deposition mechanism.

ÍNDICE

RESUMEN.....	9
SUMMARY.....	10
ABREVIATURAS.....	15
GLOSARIO.....	17
1. INTRODUCCIÓN.....	19
1.1 MATRIZ EXTRACELULAR.....	21
1.1.1 Aspectos generales. Introducción.....	21
1.1.2 Componentes principales de la matriz extracelular.....	21
1.1.3 ECM y patologías. Progresión tumoral y metástasis.....	24
1.1.4 Mecanismos de biogénesis y secreción de la matriz extracelular.....	28
1.2 EXOSOMAS.....	28
1.2.1 Definición. Antecedentes.....	28
1.2.2 El Sistema endosomal. Mecanismos de biogénesis de exosomas.....	28
1.2.3 Mecanismos de secreción de exosomas.....	32
1.2.4 Composición molecular los exosomas.....	32
1.2.5 Funciones de los exosomas.....	33
1.3 CAVEOLINA-1 REGULADOR DE MEMBRANAS LIPÍDICA.....	36
1.3.1 Propiedades estructurales de Cav1.....	36
1.3.2 Propiedades funcionales de Cav1.....	38
2. OBJETIVOS.....	43
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
3.1 Anticuerpos.....	49
3.2 Reactivos.....	50
3.3 Cultivos celulares.....	50
3.4 Silenciamiento génico y medición de la expresión génica.....	51
3.5 Plásmidos de expresión.....	53
3.6 Extracción de proteínas y ensayos de <i>Western Blot</i>	54
3.6.1 Distinción entre lisados intracelulares y extracto total de células.....	55
3.7 Técnicas de microscopía.....	55
3.7.1 Microscopía óptica de inmunofluorescencia.....	55
3.7.2 Microscopía electrónica de exosomas.....	56
3.7.3 Tinción y cuantificación de colesterol por marcaje con filipina III.....	56

3.8	Aislamiento y caracterización de exosomas	56
3.8.1	Obtención de suero fetal bovino libre de exosomas	58
3.8.2	Análisis de partículas mediante la utilización de la tecnología NTA	58
3.8.3	Marcaje de los exosomas con la sonda fluorescente PKH67	59
3.9	Estudios mediante tecnologías ómicas.....	59
3.9.1	Análisis proteómico.....	59
3.9.2	Análisis de la composición de los glicerofosfolípidos de los exosomas.....	60
3.10	Cuantificación de las fibras de matriz extracelular	61
3.11	Ensayos de migración celular	62
3.11.1	Ensayos de quimiotaxis en cámaras Transwell	62
3.11.2	Ensayos de cierre de herida <i>in vitro</i>	62
3.12	Ensayos de formación de esferoides	63
3.12.1	Estudio de la motilidad de los esferoides	63
3.13	Generación de matrices derivadas de células	64
3.13.1	Incubación de exosomas con matrices derivadas de células.....	64
3.14	Ensayos de fraccionamiento en gradientes de sacarosa	65
3.14.1	Ensayos de fraccionamiento subcelular.....	65
3.14.2	Extracción de dominios de membrana resistentes a detergente a partir de exosomas	65
3.15	Análisis estadístico	65
4.	RESULTADOS	67
4.1	Caveolina-1 en la vía hacia los exosomas	69
4.1.1	Localización de Cav1 en la ruta del endolisosoma.....	69
4.1.2	Presencia de Cav1 en los exosomas.....	76
4.2	La biogénesis de exosomas está regulada por Cav1	79
4.2.1	Implicación de Cav1 en la formación y tamaño de los exosomas	79
4.2.2	Papel de Cav1 en la formación de exosomas a través de su capacidad de modular el colesterol en los MVBs.....	81
4.2.3	La presencia de Cav1 en exosomas especifica su composición proteica.....	87
4.3	Los exosomas juegan un papel importante en la secreción y deposición tanto de TnC como de otros componentes de matriz tales como FN.....	96
4.4	La incorporación de TnC en exosomas se produce a través de su síntesis <i>de novo</i> .	103
4.5	Los exosomas generan puntos de nucleación de TnC. Implicaciones funcionales...	108
4.5.1	Modelos bidimensionales	108
4.5.2	Modelos tridimensionales	111
4.5.3	Los exosomas Cav1WT crean nichos ricos en TnC en un modelo animal <i>in vivo</i>	114

5.	DISCUSIÓN.....	119
5.1	Cav1 en la biogénesis de exosomas	122
5.2	Caveolina y la regulación de la entrada de proteínas de matriz extracelular en los exosomas	126
5.3	Los exosomas como vehículos para depositar y generar una matriz rica en TnC. Implicaciones funcionales	129
6.	CONCLUSIONES	135
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	139
8.	MATERIAL SUPLEMENTARIO	157

ABREVIATURAS

Proteínas, dominios y genes (Castellano, *Inglés*)

BIRC6	Proteína baculoviral 6 con repeticiones IAP, <i>Baculoviral IAP repeat-containing protein 6</i>
CARM1	Metiltransferasa de arginina asociada a coactivador, <i>Coactivator-Associated Arginine Methyltransferase</i>
Cav1	Caveolina-1
Cav2	Caveolina-2
Cav3	Caveolina-3
CH60	Chaperonina de 60 KDa
CHMP	Proteína cargada del cuerpo multivesicular, <i>Charged Multivesicular Body Protein</i>
CHOP	Proteína homóloga a C/EBP, <i>C/EBP Homologous Protein</i>
Col6	Colágeno tipo VI
COPII	Complejo de proteínas de recubrimiento tipo II, <i>Coat Protein II Complex</i>
CSD	Dominio de andamiaje de caveolina, <i>Caveolin-Scaffolding Domain</i>
EEA-1	Antígeno 1 del endosoma temprano, <i>Early Endosome Antigen 1</i>
EGF	Factor de crecimiento epidérmico, <i>Epidermal Growth Factor</i>
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial, <i>endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
ESCRT	Complejos de selección endosomal requeridos para el transporte, <i>Endosomal Sorting Complexes Required for Transport</i>
FN	Fibronectina
GAG	Glucosaminoglicano
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, <i>Glycerldehyde-3- phosphate dehydrogenase</i>
GFP	Proteína verde fluorescente, <i>Green Fluorescent Protein</i>
GM130	Marcador de Golgi 130, <i>Golgi Marker 130</i>
Hmcn1	Hemicentina-1
HRP	Peroxidasa derivada de rábano, <i>HorseRadish Peroxidase</i>
Hrs	Sustrato de tirosina kinasas regulado por el factor de crecimiento de hepatocitos, <i>Hepatocyte growth factor-Regulated tyrosine kinase Substrate</i>
Hsp70	Proteína de shock térmico 70, <i>Heat Shock Protein 70</i>
Lamp1	Proteína asociada a la membrana lisosomal 1, <i>Lysosomal Associated Membrane Protein 1</i>
LOX	Lisil Oxidasa
LTBP2	Proteína de unión a factor de crecimiento de transformación latente beta 2, <i>Latent-Transforming growth factor Beta-binding Protein 2</i>
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad II, <i>Mayor Histocompatibility-Complex II</i>
MMP	Metaloproteinasa
PGBM	Heparán sulfato específico de la membrana basal, <i>Basement Membrane-specific heparan sulfate</i>
PTRF	Factor de terminación de la transcripción y la polimerasa I (Cavina-1), <i>Polymerase I and Transcript Release Factor</i>
SCRB1	Receptor clase B1 de Scavenger, <i>Scavenger Receptor Class B1</i>

SMasa	Esfingomielinasa
SNAP	Proteína de unión a NSF soluble, <i>Soluble NSF Attachment Protein</i>
SNARE	Receptor de SNAP, <i>SNAP Receptor</i>
STAM	Molécula adaptadora de la transducción de señales 1, <i>Signal Transducing Adaptor Molecule 1</i>
TAD	Dominio de ensamblaje de tenascina, <i>Tenascin Assembly Domain</i>
TANGO1	Transporte y organización de Golgi 1, <i>Transport and Golgi Organization</i>
TIMP	Inhibidor de metaloproteínasa tisular, <i>Tissue Inhibitor of MetalloProteinase</i>
TnC	Tenascina-C
TSG101	Gen de susceptibilidad tumoral 101, <i>Tumour Susceptibility Gene 101</i>
UBXD1	Proteína con dominio UBX, <i>UBX domain-containing protein</i>
VCP	Proteína que contiene valoisina, <i>Valoisin-Containing Protein</i>
Vps	Selección de proteínas de vacuola, <i>Vacuolar Protein Sorting</i>
v-Src	Viral Src
XBP1	Proteína de unión a X-box 1, <i>X-box Binding Protein 1</i>

Orgánulos y estructuras celulares (Castellano, Inglés)

DRM	Membrana resistente a detergentes, <i>Detergent-Resistant Membrane</i>
ECM	Matriz extracelular, <i>ExtraCellular Matrix</i>
EE	Endosoma temprano, <i>Early Endosome</i>
ER	Retículo endoplasmático, <i>Endoplasmic Reticulum</i>
ILV	Vesícula intraluminal, <i>Intraluminal Vesicle</i>
LD	Cuerpo lipídico, <i>Lipid Droplet</i>
LE	Endosoma tardío, <i>Late Endosome</i>
MAM	Membrana asociada a mitocondria, <i>Mitochondria-Associated Membrane</i>
MVB	Cuerpo multivesicular, <i>MultiVesicular Body</i>
PM	Membrana plasmática, <i>Plasma Membrane</i>
TGN	Red Trans-Golgi, <i>Trans-Golgi Network</i>

Otras moléculas y macromoléculas orgánicas (Castellano, Inglés)

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNi	Ácido ribonucleico de interferencia
GPI	Gucosilfosfatidilinositol
GTP	Guanosín trifosfato
LBPA	Ácido liso-bis-fosfatídico, <i>LysoBisPhosphatidic Acid</i>
LDL	Lipoproteína de baja densidad, <i>Low Density Lipoprotein</i>
PA	Ácido fosfatídico, <i>Phosphatidic Acid</i>
PC	Fosfatidil colina, <i>Phosphatidil Coline</i>
PE	Fosfatidil etanolamina, <i>Phosphatidil Etanolamine</i>
PG	Fosfatidil glicerol, <i>Phosphatidil Glycerol</i>
PI	Fosfatidil inosito, <i>Phosphatidil Inositol</i>
PS	Fosfatidil serina, <i>Phosphatidil Serine</i>
SM	Esfingomielina, <i>Sphingomyelin</i>

Materiales y métodos (Castellano, *Inglés*)

BSA	Albúmina de suero bovino, <i>Bovine Serum Albumin</i>
dmA	Dimetil amilorida
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> .
DMSO	Dimetil sulfóxido, <i>Dimethyl Sulfoxide</i>
FBS	Suero fetal bovino, <i>Fetal Bovine Serum</i>
HEPES	Ácido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfónico
NTA	Análisis de nanopartículas por seguimiento, <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
PBS	Tampón fosfato, <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PFA	Paraformaldehído
RPMI	Medio del Roswell Park Memorial Institute
SDS	Dodecil sulfato sódico, <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
shRNA	ARN corto horiquillado, <i>Short Hairpin RNA</i>

Tipos celulares (Castellano, *Inglés*)

DC	Célula dendrítica, <i>Dendritic Cell</i>
MEF	Fibroblasto embrionario de ratón, <i>Murine Embryonic Fibroblast</i>
TAF	Fibroblasto asociado a tumor, <i>Tumour-Associated Fibroblast</i>

Otros (Castellano, *Inglés*)

EMT	Transición epitelio-mesénquima, <i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i>
KO	Versión Knock-Out de un gen
WT	Versión silvestre de un gen, <i>Wild Type</i>
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana, <i>Human Immunodeficiency Virus</i>

GLOSARIO

Desmoplasia: Fenómeno de producción excesiva de tejido conectivo, pobre en células y rico en matriz extracelular

ISGilación: Conjugación de diferentes dianas con ISG15 (gen estimulado por interferón, Interferon Stimulated Gene 15), una proteína similar a ubiquitina.

Organotropismo: Afinidad química de una sustancia, microorganismo o estructura por un tejido u órgano determinado.

Palmitoilación: Unión covalente a través de enlace tioéster de moléculas de ácidos grasos, como el ácido palmítico, a una proteína en residuos, principalmente de cisteína.

Prognosis: Conocimiento anticipado del progreso de una enfermedad.

01

INTRODUCCIÓN

1.1 MATRIZ EXTRACELULAR

1.1.1 Aspectos generales. Introducción

Con la aparición de los organismos pluricelulares surgió la diferenciación celular, lo que permitió el desarrollo de funciones especializadas dentro del propio organismo. Sin embargo, esta habilidad también trajo consigo la pérdida de la capacidad de vivir individualmente y por tanto la necesidad de las células de encontrarse unidas y en comunicación con el resto de células. Es por ello que, junto con el desarrollo de la pluricelularidad, emergió también un ambiente conectivo entre las células conocido como matriz extracelular (ECM, *ExtraCellular Matrix*). La ECM es una red acelular cuya composición y complejidad ha aumentado a lo largo de la evolución, alcanzando su máximo exponente en el grupo de los vertebrados^{3 4}. No sólo proporciona un andamiaje físico esencial en todos sus tejidos y órganos, sino también un soporte fundamental en la regulación de multitud de procesos bioquímicos y biomecánicos que intervienen en la morfogénesis, diferenciación y homeostasis de los tejidos. Aunque fundamentalmente la ECM está compuesta por agua, proteínas, glicoproteínas y proteoglicanos, cada tejido tiene una matriz con una composición y topología propias que le proporcionan unas propiedades fisicoquímicas únicas de manera que, alteraciones en estas características pueden derivar en diversas situaciones patológicas^{5 6 7} (**Figura I1**).

La ECM es un entramado altamente dinámico que está sometido a un remodelado continuo perfectamente orquestado por parte de las células del tejido para asegurar el correcto funcionamiento del organismo^{8 9 10}. Esta homeostasis tisular está mediada por la secreción coordinada de metaloproteinasas (MMPs)¹¹ y sus inhibidores (TIMPs)¹² y la actividad de otras enzimas como lisil oxidasas (LOX)^{13 14} y transglutaminasas que participan en la correcta formación de esta red tridimensional. Asimismo, una gran variedad de factores de crecimiento y citoquinas se encuentran unidos a la matriz extracelular modulando diferencialmente la adhesión y diferenciación celular, su crecimiento y migración, e interviniendo en multitud de procesos celulares, formando parte de un circuito de retroalimentación altamente controlado¹⁵.

1.1.2 Componentes principales de la matriz extracelular

La complejidad de la matriz extracelular se debe en gran medida a la enorme variedad de elementos que la componen y a su organización⁷. Esta red está constituida principalmente por: 1) componentes estructurales como colágenos, (formadores de fibras) y elastina, 2) proteínas de matriz especializadas, 3) y proteoglicanos, compuestos por una proteína central a la cual se unen largas cadenas de unidades de

disacáridos repetitivos llamados glicosaminoglicanos (GAGs) formando así complejos compuestos de alto peso molecular ⁷.

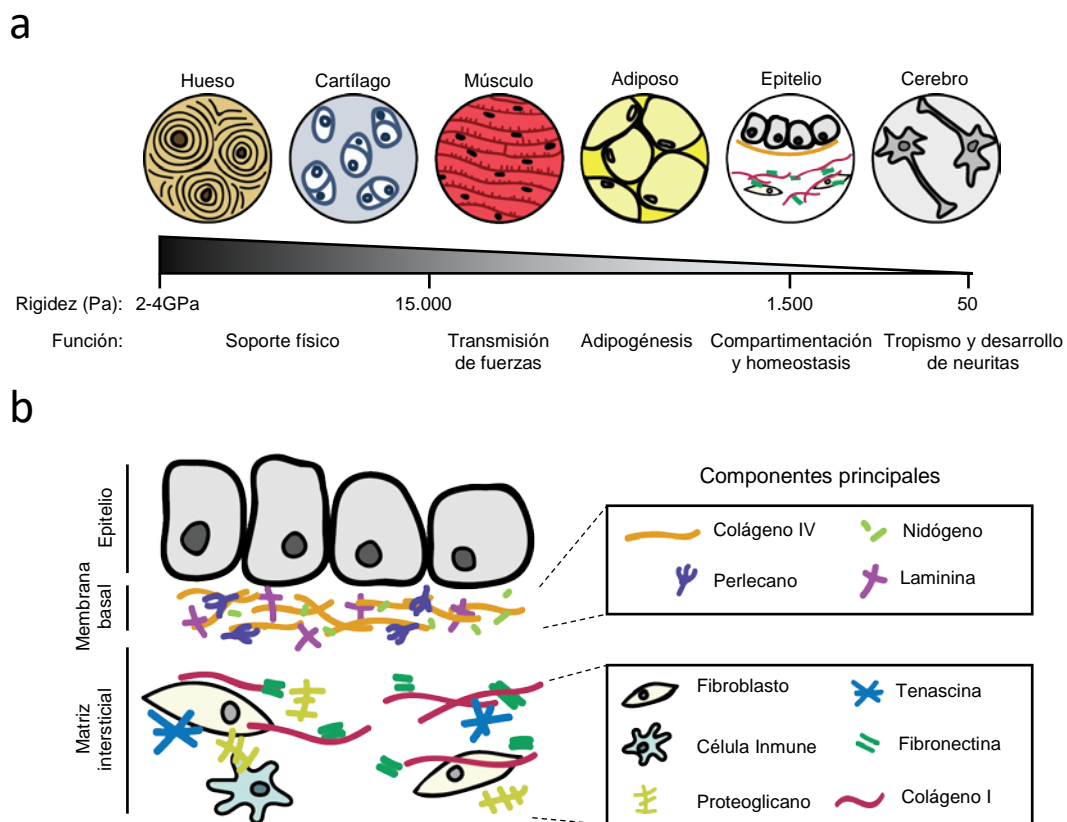


Figura 1I. Aspectos generales de la ECM. (a) La composición y estructura de la ECM puede variar entre diferentes tejidos, condicionando sus propiedades fisicoquímicas (rigidez) ⁵ e intervenir en un gran número de funciones fisiológicas específicas en cada uno de ellos ^{16 17 18 19 20}. **(b)** Composición básica de la membrana basal y matriz intersticial presente en los tejidos epiteliales.

1.1.2.1 Colágenos

El colágeno es la proteína mayoritaria en los mamíferos (representa aproximadamente el 30% del peso total de proteínas) y constituye una familia que abarca 28 miembros ²¹. Formados por tres cadenas polipeptídicas denominadas cadenas α , todos los colágenos contienen una estructura triple helicoidal ²² (**Figura 12a**). Los colágenos pueden formar diferentes tipos de complejos supramoleculares y se dividen en subfamilias en función de su capacidad para formar fibras (colágenos I, II, III, V y XI), filamentos y fibrillas de anclaje (colágenos IX, XII y XIV), y redes (colágenos IV, VI, VIII y X) que contribuyen a la arquitectura de una variedad de matrices diferentes ^{21 22 23}.

Aunque los colágenos se consideran proteínas estructurales prototípicas, su función se extiende más allá a través de su interacción con los receptores celulares, lo que permite también regular el crecimiento, diferenciación y migración celular ^{21 24 25}. Además, los colágenos pueden sufrir alteraciones en su estructura a través de su

ensamblaje, degradación, o fuerzas mecánicas que propician la exposición de sitios funcionales críticos, ampliando así el abanico de funciones que desempeñan en el desarrollo, angiogénesis y tumorigénesis ^{8 26 27}.

1.1.2.2 Proteínas de matriz especializadas. Glicoproteínas

Las glicoproteínas no colagenosas constituyen un grupo heterogéneo de macromoléculas que desempeñan funciones fundamentales en la regulación del ensamblaje de componentes de la matriz, proporcionan centros de interacción entre las macromoléculas y juegan un papel fundamental en la interacción con las células. En la mayoría de los casos contienen la secuencia RGD (Arg-Gly-Asp) ²⁸ de reconocimiento celular, a través de la cual interaccionan con integrinas expuestas por las células ²⁹. En el grupo de las glicoproteínas destacan a) las lamininas, b) la fibronectina y c) las tenascinas.

Lamininas

Las lamininas son uno de los principales componentes de la membrana basal. Su estructura proteica está formada por tres cadenas (alfa, beta y gamma) de aminoácidos altamente glicosiladas unidas por puentes disulfuro ³⁰. Esta familia de proteínas interacciona con diferentes componentes de la matriz, especialmente con colágeno tipo IV, proteoglicanos, entactina o nidógeno y heparina, desempeñando una función esencial en el mantenimiento de la estabilidad y en la organización de la matriz. Además, es la responsable de la interacción de la células a la membrana basal y del control de su estado de diferenciación ³¹.

Fibronectina

La Fibronectina (FN) es una glicoproteína multifuncional formada por dos cadenas polipeptídicas que se asocian por puentes disulfuro cerca del extremo carboxilo terminal formando un dímero de aproximadamente 500 KDa ³² (**Figura 12a**). Esta proteína muestra un carácter modular lo que permite su unión a las superficies celulares a través de integrinas ²⁸. Además, FN es capaz de interaccionar con una serie de moléculas biológicamente relevantes entre las que destacan heparina, colágeno, gelatina, tenascina y fibrina, interfiriendo en el remodelado de la matriz extracelular mediante la regulación de la adhesión, migración, crecimiento y diferenciación celular ^{33 34 35}.

En situaciones patológicas tales como el cáncer, se ha observado que FN presenta un aumento aberrante de su expresión en diferentes etapas de la progresión tumoral que no sólo promueve el crecimiento tumoral y su capacidad invasiva sino que limita la respuesta de las células tumorales a la terapia ^{36 37 38}.

Tenascinas

Las tenascinas son una familia de glicoproteínas de matriz compuesta por cinco miembros (Tenascina-C, R, W, X e Y), siendo Tenascina-C (TnC) su principal representante ^{3 39}.

TnC es una proteína hexamérica que actúa como elemento modulador de la adhesión celular mediante la regulación de las uniones de las células a otros componentes de la ECM a través de un gran número de ligandos ³⁹ (**Figura I2a**). Como ejemplo de ello, TnC posee capacidad de competir con sindecano-4, impidiendo así la adhesión celular mediada por FN concediéndole propiedades anti-adhesivas ³⁵. Esta característica de TnC genera un impacto en las adhesiones focales de las células ^{40 41}, induciendo la migración y movilidad celular ⁴². Aunque resulta fundamental durante el desarrollo embrionario, especialmente a nivel del sistema nervioso ^{43 44}, la expresión de TnC en el adulto se reduce considerablemente, quedando prácticamente restringida a los nichos de células madre embrionarias en los que desarrolla un importante papel en proliferación, diferenciación y supervivencia ⁴⁵. Sin embargo, existen situaciones patológicas como el caso del daño y reparación tisular, procesos inflamatorios crónicos y cáncer ⁴⁶ en las que se produce una rápida inducción de su expresión y un incremento en su deposición.

1.1.3 ECM y patologías. Progresión tumoral y metástasis

La extraordinaria importancia de la matriz extracelular y el amplio rango de sus funciones se revela en la existencia de múltiples patologías asociadas a alteraciones en sus componentes y estructura. Entre ellas se encuentran diferentes síndromes relacionados con anomalías genéticas asociadas generalmente a una carencia en la expresión y/o modificación post-traducciona l de ciertas proteínas de la ECM ^{47 48 49}.

Sin embargo, también se ha observado que el aumento en la deposición de la matriz, conocido como desmoplasia o fibrosis, y que conlleva una alteración en la organización y remodelado de la misma, está vinculado con el desarrollo de un gran número de patologías ⁵⁰ entre las que destacan las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. En el marco de ésta última patología, se ha visto que la matriz extracelular juega un papel crucial como modulador de la proliferación celular, la angiogénesis, así como en el proceso de migración e invasión celular que se produce durante el desarrollo de metástasis ^{51 52}.

Según la Organización Mundial de la Salud, el cáncer supone la segunda causa de muerte a nivel mundial, siendo los carcinomas (epidermoides y adenocarcinomas) el

tipo más común de cáncer, y concretamente el desarrollo de la metástasis la causa principal de muerte ^{53 54}.

Los carcinomas se forman a partir de células epiteliales que se encuentran sobre una ECM especializada que secretan ellas mismas (**Figura 12b**). Esta matriz está formada principalmente por colágeno amorfo tipo IV que forma estructuras en forma de red, lamininas y otras proteínas de unión y es conocida como membrana basal ⁵⁵. Esta composición proporciona a la ECM una estructura compacta y poco porosa que, además de servir como sostén del epitelio, favorece el mantenimiento de la polaridad celular ⁵⁶. Con la progresión tumoral se pierde esta polaridad celular, así como las adhesiones entre las células del epitelio. La pérdida de las uniones permite a las células epiteliales comenzar la invasión tumoral hacia la región intersticial del tejido a través de la degradación de la membrana basal, favorecida por un aumento en la expresión de metaloproteinasas ^{57 58}.

La matriz intersticial se encuentra bajo la membrana basal y constituye el principal tipo de ECM en tejidos conectivos ⁵⁹. Es depositada por las células estromales, principalmente por los fibroblastos ⁶⁰ y en condiciones fisiológicas esta matriz se compone esencialmente de colágeno fibrilar tipo I, proteoglicanos y otras glucoproteínas como TnC o FN ⁵⁵. Esta composición proporciona a la matriz intersticial una consistencia más laxa que la membrana basal, lo cual permite la migración de fibroblastos y células del sistema inmune, actuando al mismo tiempo como una barrera natural para evitar la diseminación de las células del epitelio.

Sin embargo, en condiciones patológicas, como sucede durante el desarrollo del cáncer, el equilibrio entre la síntesis/degradación, la deposición/organización de los componentes de la matriz se ve alterada, promoviendo la capacidad de las células tumorales de migrar a través de la matriz intersticial y de invadir localmente los vasos sanguíneos o linfáticos dando lugar a la metástasis (**Figura 12b**).

Entre los componentes de matriz mayoritariamente alterados durante el desarrollo y progresión tumoral destaca principalmente el colágeno. Un aumento excesivo en la deposición de colágeno tipo I parece ser una característica común en la mayoría de los diferentes tipos de cáncer ⁸. En todos ellos, se ha descrito la presencia de un incremento de esta proteína en el microambiente tumoral dando lugar a la generación de un proceso fibrótico que tiene como consecuencia cambios en la rigidez del estroma tumoral ^{61 62 63} lo que resulta en un aumento de la capacidad invasiva de las células tumorales ⁶⁴. Estos cambios en la rigidez del estroma son considerados como

un factor de mala prognosis en la mayoría de los tumores, especialmente en cáncer de mama ^{65 66}.

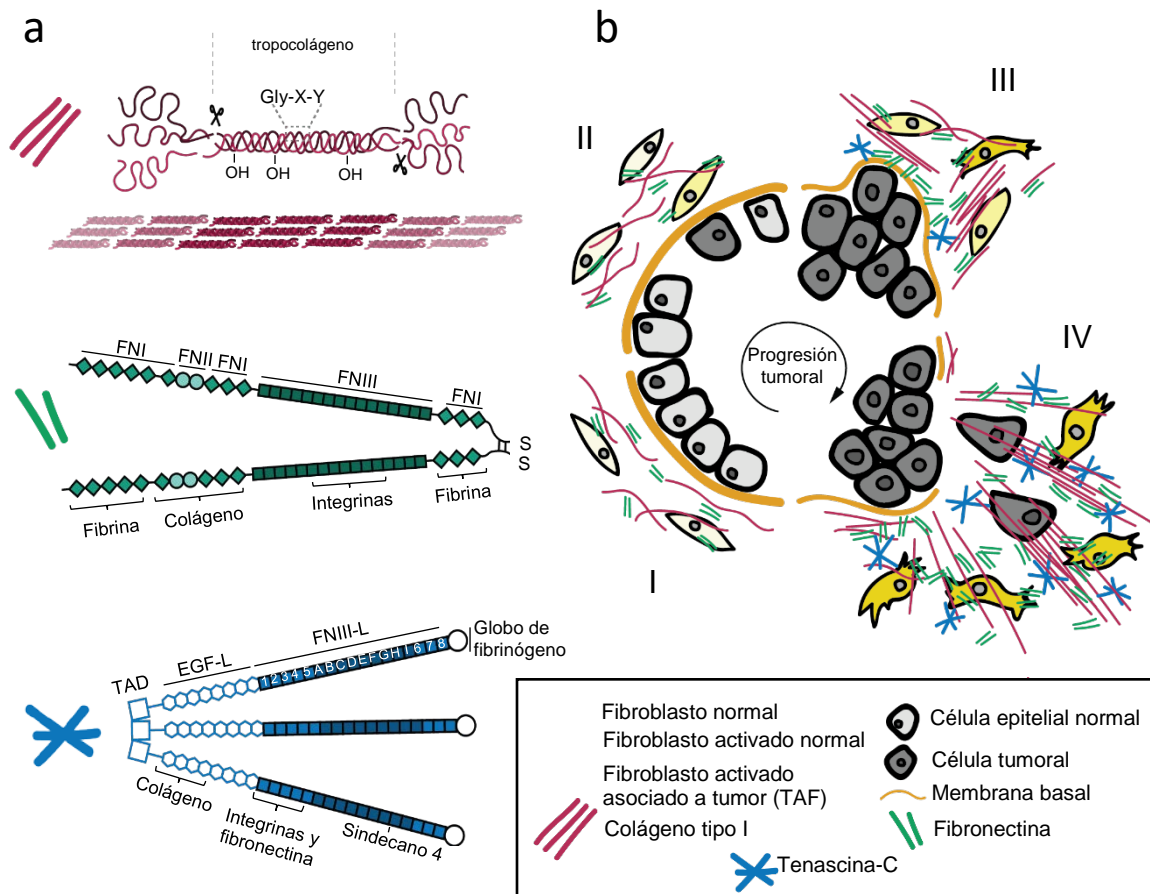


Figura I2. Principales alteraciones de la matriz extracelular durante la progresión tumoral. (a) Estructura y biología de las principales proteínas de matriz implicadas en la progresión tumoral. **Colágeno.** Estructura de triple α hélice indicando la acción de las proteasas necesarias para su maduración, su secuencia aminoacídica y puntos de hidroxilación ^{22 13}. **Fibronectina.** Estructura de un dímero mostrando los puntos de unión a otras proteínas de ECM y los dominios de fibronectina básicos que lo componen (FNI, II y III) ³³. **Tenascina-C.** Estructura de un trímero que conforma la típica forma de hexabraquion. Se indican puntos de unión a otras proteínas de ECM y los dominios básicos que componen cada monómero (TAD, Tenascin Assembly Domain; EGF-L, Dominio similar a EGF, FNIII-L, Dominio similar a FNIII) ⁶⁷. **(b)** Esquema explicativo de las principales etapas de la progresión tumoral de un carcinoma. La flecha negra indica el sentido en el que se desarrolla el proceso. La fase I muestra un epitelio normal. Posteriormente (fase II) se produce la pérdida de adhesión intercelular asociada a la transformación de las células epiteliales. La fase III se caracteriza por el inicio de la invasión tumoral para finalmente (fase IV) iniciar la migración de las células a través de la matriz intersticial hacia los vasos sanguíneos (metástasis) ⁵¹.

Junto a los colágenos, otros componentes de matriz fundamentales durante la progresión tumoral son FN y TnC. En condiciones generales, un incremento en la expresión y deposición de ambas proteínas se ha descrito que favorece la angiogénesis e invasión tumoral, por lo que la inhibición de la señalización inducida por estas

proteínas se ha convertido en la actualidad en una posible diana para el tratamiento del cáncer ^{38,68,69}.

1.1.3.1 *Estroma tumoral. TAFs (Tumour-Associated Fibroblasts)*

Los tumores se encuentran rodeados por multitud de poblaciones de células no cancerosas entre las que se incluyen fibroblastos, pericitos y células del sistema inmune. Estas células del estroma participan en la generación y modificación del microambiente alrededor del tumor, esencial para favorecer la progresión del cáncer.

En condiciones fisiológicas, los fibroblastos se mantienen en un estado quiescente activándose en procesos de daño tisular (fibroblastos activados normales). Si esta activación perdura en el tiempo como resultado de una situación patológica, como es el caso del cáncer, se puede volver irreversible, generando fibroblastos activados asociados a tumores (TAFs, *Tumor-Associated Fibroblast*)⁶⁰. Estos fibroblastos se caracterizan por ser capaces de secretar elevados niveles de proteínas de matriz extracelular, influyendo en la organización y rigidez del estroma tumoral lo que promueve la capacidad de los tumores de generar metástasis ^{61 62 70 71}. Al mismo tiempo, son capaces de secretar diversos factores de crecimiento que afectan también a la susceptibilidad, iniciación y progresión tumoral ^{60,72}.

La gran cantidad de funciones atribuidas a los TAFs, como promotores del inicio del tumor, la progresión, la transición epitelial a mesénquima, la invasión tumoral, la angiogénesis, y la resistencia a fármacos ponen de manifiesto la relevancia cada vez más creciente de esta población de células ^{73,74}.

1.1.3.2 *ECM-nicho premetastático*

El proceso de metástasis es sistémico de forma que, cuando un tumor se desarrolla no sólo se generan cambios locales entorno al propio tumor, sino que órganos distantes pueden verse modificados en su composición, reclutando numerosos tipos de células estromales y formando un microambiente favorable para la metástasis en los mismos, denominado “nicho premetastático” ⁷⁵.

Durante los últimos años se ha descrito que en la formación del nicho premetastático participan numerosas proteínas de matriz, en su conjunto conocidas como “matrisoma metastático” entre las que destacan FN, TnC, periostina, colágeno IV, lisil oxidasas y diferentes metaloproteasas de matriz ^{69 76 77}. Aunque aún se conoce poco acerca de los mecanismos por los cuales se producen la acumulación de estas proteínas y modificaciones de microambiente en tejidos distantes al tumor primario, diferentes estudios apuntan al papel de los exosomas (vesículas nanométricas de

origen endosomal) así como de otras vesículas secretadas por parte de los tumores como elementos fundamentales en la generación de los nichos premetastáticos ^{78 79 80}.

1.1.4 Mecanismos de biogénesis y secreción de la matriz extracelular

Aunque son sintetizadas, ensambladas e inicialmente modificadas post-traduccionalmente en el retículo endoplásmico (ER, *Endoplasmic Reticulum*), poco se conoce acerca de los mecanismos moleculares implicados en la secreción de las diferentes proteínas de matriz ⁸¹.

De ellas, la mejor estudiada ha sido el colágeno tipo I ^{81 82}, cuyo transporte entre el retículo endoplásmico y el Golgi está mediado por el complejo de proteínas de recubrimiento tipo II (COPII, *Coat Protein II Complex*) ⁸³. Desde allí, y gracias a la proteína adaptadora TANGO1 (*Transport and Golgi Organization 1*) el colágeno sufre una serie de modificaciones post-traduccionales que permiten su salida al espacio extracelular a través de la ruta clásica de secreción mediada por el trans-Golgi ⁸⁴.

Recientes estudios muestran cómo la inducción del estrés generado en el ER afecta directamente a la secreción de fibronectina y otras proteínas de matriz ⁸⁵, sin embargo y a diferencia de lo que sucede con el colágeno, la eliminación de la maquinaria COPII no afecta a su secreción, sugiriendo la existencia de mecanismos de secreción alternativos a la vía clásica ER-Golgi que aún están por descubrir ⁸⁶.

1.2 EXOSOMAS

1.2.1 Definición. Antecedentes

Los exosomas son vesículas de tamaño nanométrico que son liberadas al medio extracelular por la gran mayoría de los tipos celulares ⁸⁷, pudiendo encontrarse prácticamente en todos los fluidos de los organismos superiores ⁸⁸, incluidas las plantas ⁸⁹. En los años 70 ⁹⁰ se detectaron por primera vez como parte importante del proceso de maduración de los reticulocitos, sin embargo, no fue hasta los años 80 cuando se les atribuyó una entidad propia basada en su origen endosomal ⁹¹. En la actualidad, un gran número de investigaciones han demostrado la enorme variedad de funciones que los exosomas desempeñan gracias a su capacidad de actuar como un nuevo mecanismo de comunicación intercelular ⁹²⁻⁹⁵.

1.2.2 El Sistema endosomal. Mecanismos de biogénesis de exosomas

El sistema del endosoma es una compleja red de compartimentos cuya función principal ha sido típicamente relacionada con la internalización y posterior degradación de elementos del espacio extracelular, así como con el reciclaje de distintos componentes de la membrana plasmática. Sin embargo, otras funciones de gran importancia han sido reveladas como la regulación y distribución del colesterol libre o la

computación de señales procedentes del exterior celular^{96 97}. No obstante, la biogénesis de exosomas es la más destacada y en la actualidad se encuentra en amplio estudio.

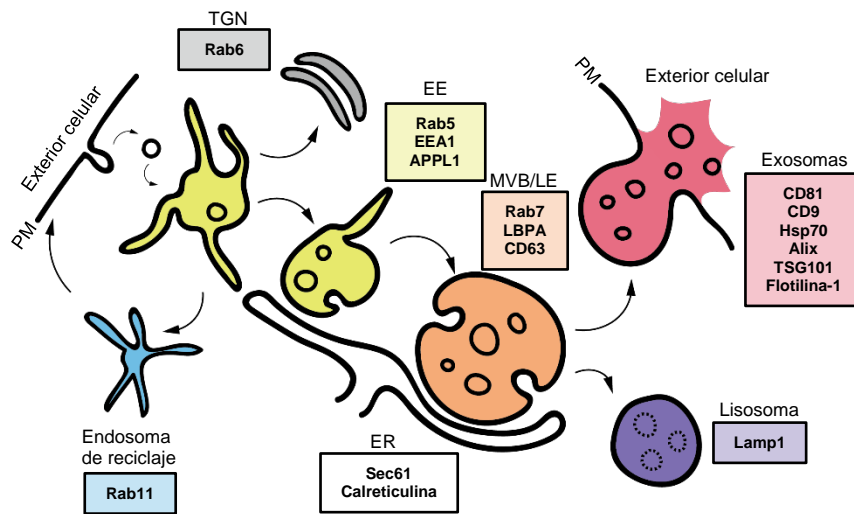


Figura I3. Sistema endosomal.

Esquema explicativo del tráfico intracelular observado en la ruta endosomal. En los recuadros se especifican los marcadores más comúnmente utilizados para su estudio⁹⁸.

La endocitosis es el punto de partida para la entrada de distintos componentes en la ruta endosomal^{98 99}. Tras la internalización, las vesículas que se forman desde la membrana plasmática (PM, *Plasma Membrane*) son llevadas a un compartimento común conocido como endosoma temprano (EE, *Early Endosome*). Algunos de estos elementos pueden ser reciclados directa o indirectamente a la PM (endosomas de reciclaje) o a la red Trans-Golgi (TGN, *Trans Golgi Network*). La continuación en la ruta endosomal supone la maduración de los EE hacia endosomas tardíos (LE, *Late Endosome*). Durante este proceso, los EE pierden sus características identificativas consistentes en la presencia de túbulos membranosos que emanan de ellos, así como de sus marcadores típicos EEA1, la Rab-GTPasa Rab5 o APPL1, pasando a ser sustituidos por nuevos marcadores específicos de LE tales como LBPA (*LysoBysPhosphatidic acid*), CD63 y la GTPasa Rab7¹⁰⁰. Asociado a este proceso de maduración se produce un incremento en su tamaño y la formación de vesículas intraluminales (ILVs, *IntraLuminal Vesicle*) en su interior. Al conjunto del endosoma tardío con sus ILVs se le conoce con el nombre de cuerpo multivesicular (MVB, *MultiVesicular Body*)^{101 102}. Los MVBs pueden finalmente ir a degradación mediante la fusión con los lisosomas o por el contrario pueden liberar su contenido al espacio extracelular tras su fusión con la membrana plasmática, dando lugar a los exosomas (Figura I3).

1.2.2.1. Mecanismos implicados en la formación de ILVs

La formación de ILVs se produce a través de la invaginación, y posterior escisión, de la bicapa lipídica de la membrana de los MVBs hacia el interior de éstos. Existe una

gran variedad de mecanismos capaces de regular este proceso dando lugar a diferentes tipos de ILVs con características específicas en cuanto a su tamaño y carga.

Mecanismos dependientes de ESCRT

La Maquinaria ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) es uno de los mecanismos mejor descritos. Está compuesto por alrededor de 30 proteínas diferentes, altamente conservadas, que se ensamblan en 4 complejos diferentes (ESCRT-0, -I, -II y -III) (**Figura I4**). El reclutamiento de estos complejos se produce secuencialmente sobre la cara citoplasmática de la membrana de los MVBs (**figura I4**). En primer lugar, el complejo ESCRT-0 (STAM-Hrs) es ensamblado a la membrana endosomal, favoreciendo la posterior incorporación de los complejos ESCRT I y II, implicados en la deformación de esta membrana. Una vez formada la invaginación, el complejo ESCRT-III dirige la escisión dando lugar a la formación de las ILVs ^{103 104}.

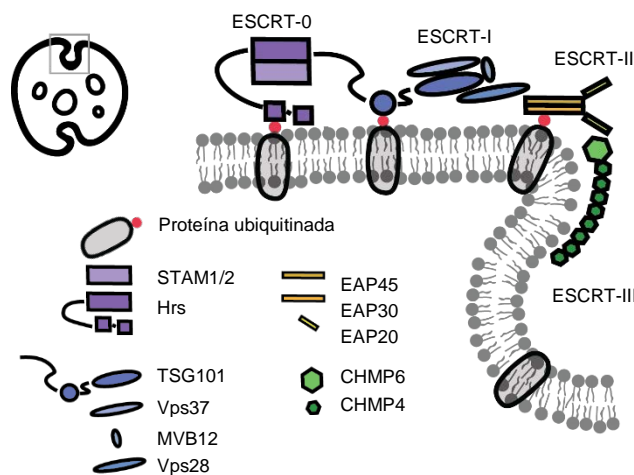


Figura I4. Estructura de la maquinaria ESCRT. Ensamblaje secuencial de los componentes ESCRT-0, I, II y III en la membrana de un MVB para la formación de las ILVs. Se especifican las proteínas que componen cada complejo con su nombre dado en humanos ^{105 106}.

El silenciamiento de la expresión de diferentes componentes de la maquinaria ESCRT0 y I (tales como Hrs, Stam o TSG101) provoca una disminución en la biogénesis de exosomas afectando tanto a su tamaño como a su composición ^{107 108}. Alternativamente a la ruta canónica mediada por los complejos ESCRT-0, -I, -II y -III, se han descrito mecanismos en los que específicamente participa alguno de estos complejos, como sucede en la ruta mediada por Alix-Sindecano-4-sintenina, en la que sólo tiene lugar el reclutamiento del complejo ESCRT-III para la escisión final de las ILVs ^{109 110}.

Mecanismos independientes de ESCRT

Diferentes estudios muestran que la biogénesis de ILVs se sigue produciendo en los MVBs a pesar del silenciamiento simultáneo de diferentes subunidades claves de los cuatro complejos ESCRT, lo que indica la existencia de otros mecanismos independientes de ESCRT ^{108 107}, entre los que destacan:

Tetraspaninas

Las tetraspaninas son una familia de proteínas integrales de membrana altamente enriquecidas en exosomas.¹¹¹ Capaces de modular la formación de microdominios de membranas, las tetraspaninas juegan un papel fundamental no sólo en la formación de las ILVs, sino en la selección de proteínas que específicamente se incorporan dentro de ellas^{112 113}. Entre los miembros de esta familia destacan CD9, CD63, CD37, CD81 y CD82 consideradas marcadores específicos de exosomas¹¹⁴.

Lípidos

En función de su estructura, los lípidos proporcionan a las bicapas lipídicas unas características estructurales y biofísicas que condicionan su deformabilidad y/o curvatura¹¹⁵. Recientes estudios muestran su importancia como elementos reguladores en la formación y composición específica de los exosomas^{116 117}.

BMP (Bis Monoacylglycerol Phosphate), también conocido como LBPA, es un lípido cuya presencia está restringida a los LE¹¹⁷. Se ha observado que LBPA puede jugar un papel en la deformación de la membrana durante la formación de las ILVs¹¹⁸ y que además este proceso puede estar regulado a través de Alix¹¹⁹.

Dentro de los lípidos altamente enriquecidos en exosomas está la ceramida. Aunque sintetizada “de novo” en el ER, su principal fuente proviene de la hidrólisis de esfingomiélinea por la acción de las esfingomiélinasas (SMasas)¹²⁰. La inhibición farmacológica de las SMasas neutrales 1 y 2 se ha visto que reduce significativamente la biogénesis de exosomas^{121 122}.

Asimismo, esfingomiélinea, glicoesfingolípidos y colesterol aparecen en niveles relativamente altos en exosomas¹²³. Esta composición lipídica es típica de los microdominios de membrana plasmática resistentes a detergentes (DRMs, *Detergent-Resistant-Membranes*)^{124 125} sugiriendo la posibilidad de que éstos puedan también encontrarse a nivel de los MVBs y que desarrollen un papel importante en la organización de las membranas implicadas en la formación de las ILVs¹²⁶.

Esta variedad de mecanismos permite la generación de diferentes subpoblaciones de exosomas, heterogéneas tanto en su composición como en su distribución y funciones^{127 128}. Sin embargo, nuevos estudios serán necesarios para poder entender si mecanismos dependientes e independientes de ESCRT actúan de forma independiente o por el contrario sinérgicamente en diferentes condiciones fisiológicas y/o patológicas¹²⁸.

1.2.3 Mecanismos de secreción de exosomas

Tras su maduración, los MVBs pueden fusionarse con la membrana plasmática dando lugar a la secreción de exosomas o, por el contrario, degradar su carga fusionándose a los lisosomas. Es conocido que señales como la ISGilación de proteínas desarrollan un papel en el destino de estos MVBs ¹²⁹, sin embargo, aún es necesario la realización de estudios que arrojen luz sobre este aspecto.

Aquellos MVBs cuyo destino final es la exocitosis son dirigidos hacia la membrana plasmática a través de un mecanismo de transporte modulado por la GTPasa Rab7. Tras el anclaje de los MVBs a la membrana en un proceso mediado por las GTPasas Rab35/Rab27 ¹³⁰ se produce la unión de los MVBs a la maquinaria SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive component attachment receptor*). Esta unión permite la fusión directa entre ambas membranas facilitando la liberación del contenido de los MVBs al medio extracelular. La importancia del calcio en la regulación de este último paso, se refleja en la reducción en la secreción de exosomas producida por inhibición farmacológica de las bombas H⁺/Na⁺ y Na⁺/Ca²⁺ presentes en la membrana plasmática ¹³¹.

1.2.4 Composición molecular los exosomas

A lo largo de los últimos años se ha realizado un gran número de estudios para evaluar el contenido presente en exosomas derivados de diferentes tipos celulares y fluidos corporales lo que ha permitido el desarrollo de bases de datos que incluyen las proteínas, ácidos nucleicos y lípidos identificados como componentes de estas nanovesículas (www.exocarta.org; ^{132,133}; www.microvesicles.org ¹³⁴).

Proteínas

Aunque el contenido de proteínas en los exosomas varía dependiendo del tipo celular, existe un grupo de proteínas conservado en todos los exosomas con independencia de su origen. A este grupo de proteínas características de los exosomas pertenecen algunas proteínas implicadas en el proceso de biogénesis de exosomas tales como Alix y TSG101 ¹¹⁰. Otra clase de proteínas detectadas con frecuencia es la correspondiente a la familia Rab, GTPasas pequeñas que regulan el acoplamiento y fusión de membranas. Las anexinas (I, II, IV, V, VI, VII y X), proteínas implicadas en el mecanismo de tráfico y fusión de membranas, aparecen enriquecidas en exosomas ¹³⁵ ⁹². Un gran número de proteínas de membrana como receptores o moléculas de adhesión también están presentes en exosomas (CD63, CD81, CD9) ¹¹⁴. Por otro lado, se han detectado diferentes proteínas globulares localizadas en el lumen de los exosomas. Un ejemplo de ellas son proteínas del citoesqueleto, chaperonas o incluso enzimas metabólicas ¹²⁷.

Lípidos

Tal y como se ha comentado previamente, los lípidos han sido postulados como factores claves en los mecanismos de formación de los exosomas. El enriquecimiento en esfingomiélin, fosfatidil serina y colesterol, así como en ceramida^{121 117 123 116} y otros lípidos con ácidos grasos saturados provoca en los exosomas una arquitectura en su membrana que promueve el reclutamiento de proteínas específicas tales como las flotilinas, proteínas ancladas a glucosilfosfatidilinositol (GPI) o modificadas lipídicamente por ácidos grasos¹²⁶.

Ácidos nucleicos

El descubrimiento de ácidos nucleicos en los exosomas sugiere la posibilidad de que estas nanovesículas puedan actuar en la transferencia horizontal de información genética entre unas células y otras¹³⁶. Un alto porcentaje del material genético presente en exosomas corresponde a moléculas de ARN tales como microARNs o ARNm^{137 138 139}, existiendo niveles considerablemente menores de ARNs ribosómico o de transferencia. Asimismo, se ha descrito la presencia de moléculas de ADN mono y bicatenarios, y de ADN mitocondrial¹⁴⁰.

Junto a estos ácidos nucleicos, una gran variedad de ribonucleoproteínas están presentes en exosomas, apuntando a un papel fundamental en el transporte y almacenamiento de este material genético en forma de complejos moleculares¹⁴¹.

1.2.5 Funciones de los exosomas

Los exosomas secretados son entidades biológicamente activas capaces de actuar como mensajeros intercelulares. Desde su descubrimiento como parte del proceso en la maduración de reticulocitos⁹¹, y gracias a la diversidad de cargos que son capaces de transportar, los exosomas constituyen un mecanismo fundamental en la regulación de multitud de procesos tanto fisiológicos como patológicos.

1.2.5.1 Exosomas y el sistema inmune

El funcionamiento del sistema inmune es un proceso finamente regulado y esencial en la defensa de nuestro organismo frente a agresiones externas, ya sean de naturaleza biológicas (agentes patógenos), físico-químicas (contaminantes o radiaciones) e internas (desarrollo de células tumorales). Alteraciones en su organización pueden dar lugar a situaciones patológicas severas como inmunodeficiencias, enfermedades autoinmunes e inflamatorias y cáncer. Parte de los procesos implicados en su regulación requieren de la comunicación intercelular a través de la sinapsis inmune y de la secreción de diferentes citoquinas, procesos en los que los exosomas juegan un papel fundamental¹⁴². Recientes estudios muestran cómo durante la formación de la sinapsis inmunológica se produce el reclutamiento de los

MVBs hacia la zona de sinapsis inmune, provocando un aumento en la secreción de exosomas ⁹³ y una transferencia selectiva de microRNAs desde el linfocito T a las células presentadoras de antígeno ¹⁴³.

Una de las primeras evidencias de la importancia de los exosomas en el sistema inmune se obtuvo al identificar el papel de estas nanovesículas como presentadoras de antígenos. La capacidad de los linfocitos B, las células dendríticas (DC, *Dendritic Cell*) y los macrófagos de liberar el complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC-II) a través de exosomas permite la presentación directa de antígenos a los linfocitos T CD4⁺ promoviendo su activación ¹⁴⁴.

Recientes estudios muestran también cómo los exosomas procedentes tanto de células tumorales, como de diferentes organismos patógenos, contienen antígenos específicos que pueden ser endocitados por las células dendríticas para su procesamiento y su posterior presentación a los linfocitos T CD4⁺ citotóxicos, iniciando su activación y dando lugar a la respuesta inmunológica ^{145 146}. En la actualidad, se está estudiando la posibilidad de utilizar los exosomas para dirigir la respuesta inmune (inmunoterapia) en enfermedades como el cáncer ¹⁴².

1.2.5.2 Exosomas en cáncer

Los exosomas pueden desempeñar múltiples funciones durante la progresión del cáncer. Tienen la capacidad de modular tanto el entorno tumoral local, como a nivel sistémico para promover el crecimiento y diseminación de las células tumorales dando lugar a metástasis ^{147,148}.

Ambiente tumoral local

A nivel local, el tumor primario está constituido no sólo por las células tumorales, sino por otros tipos celulares entre los que se encuentran fibroblastos, células endoteliales y células del sistema inmune. Este heterogéneo conjunto es capaz de secretar una gran variedad de exosomas, diferenciales en cuanto a su composición, permitiendo formar una compleja red de comunicación entre todas las células. Como resultado de este diálogo intercelular se producen cambios en la proliferación, migración e invasión de las células tumorales ^{52 79 147}.

La liberación de exosomas por parte de las células tumorales es muy elevado, tal y como se demuestra en diferentes estudios donde una gran cantidad de estas nanovesículas se concentra en plasma, orina, ascitis y derrames pleurales de pacientes con cáncer, considerándose la posibilidad de ser usados como biomarcadores en la progresión de esta enfermedad ^{149,150}.

Se ha observado que los exosomas liberados por las células tumorales juegan un papel fundamental en el proceso de activación de los fibroblastos y su activación a TAFs ⁹⁵. Asimismo, los exosomas tumorales tienen importantes implicaciones en el desarrollo de angiogénesis mediante la secreción de factores pro-angiogénicos o de ARNm y microARN que tienen un impacto directo en las células endoteliales ^{151,152}. Otras funciones relacionadas con los exosomas tumorales son el remodelamiento de la ECM a través de la acción de metaloproteinasas que contienen ¹⁵³ o incluso el desarrollo de quimiorresistencia ¹⁵⁴.

Metástasis

Durante el proceso de metástasis, las células tumorales invaden inicialmente el tejido colindante hasta alcanzar el torrente sanguíneo o el sistema linfático desde donde podrán invadir nuevos órganos. Recientemente se ha sido descubierto la generación de nichos pre-metastáticos en aquellos órganos que van a ser posteriormente colonizados por parte de las células tumorales ^{75 77 78 155}. En este proceso, se ha visto que los exosomas procedentes del tumor primario, a través de los vasos sanguíneos y linfáticos, son capaces de viajar hacia otros tejidos dependiendo de su organotropismo ¹⁵⁶. Una vez alcanzado el tejido diana, los exosomas son capaces de promover cambios en la integridad de los vasos sanguíneos ¹⁵⁷, así como en las características estructurales de la ECM de estos órganos facilitando el reclutamiento de las células tumorales y la formación de metástasis ¹⁵⁸.

1.2.5.3 Exosomas en otras patologías

Diferentes estudios muestran la relevancia de los exosomas en la modulación y desarrollo de otras patologías. Ejemplo de ello es su capacidad de actuar como mecanismo de propagación de ciertos patógenos como el virus del HIV ¹⁵⁹. Además, los exosomas liberados por patógenos y células infectadas portan factores de virulencia específicos, como proteínas, ARNm y microRNAs, que contribuyen a propagar la infección.

Aunque fundamentales en el desarrollo normal y la fisiología del sistema nervioso ^{160 161}, los exosomas también se han descrito como elemento clave en la generación y progresión de múltiples enfermedades neurodegenerativas gracias a su capacidad de actuar como mecanismos de transporte de agentes tóxicos o de proteínas mal plegadas, tales como péptidos de β -amiloide en el caso de la enfermedad de Alzheimer ¹⁶² u oligómeros de α -sinucleína en la enfermedad de Parkinson ¹⁶³. Finalmente, también se ha observado la implicación de los exosomas en la formación de los huesos ¹⁶⁴ o en patologías cardiovasculares en las que se han convertido en valiosos biomarcadores de diagnóstico y prognosis ¹⁶⁵.

1.3 CAVEOLINA-1 REGULADOR DE MEMBRANAS LIPÍDICA

Las membranas lipídicas juegan un papel crucial en la compartimentación, tanto de la célula con el medio extracelular, como de sus diferentes orgánulos con el citoplasma. Estas membranas se encuentran constituidas por una bicapa lipídica, formando estructuras altamente dinámicas que permiten el ensamblaje de proteínas esenciales para su correcto funcionamiento. La naturaleza lipídica de las membranas favorece la formación de microdominios especializados a través del empaquetamiento selectivo de colesterol y esfingolípidos fundamentales en la regulación de multitud de procesos celulares.

Un ejemplo de este tipo de microdominios son las caveolas (**Figura I5a**), pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática ricas en colesterol, con un tamaño comprendido entre 50 y 100 nm ¹⁶⁶. El principal componente proteico y estructural de las caveolas es la Caveolina ¹⁶⁷. Se han identificado 3 miembros de proteínas integrales de membrana dentro de esta familia: Caveolina-1 (Cav1), Caveolina-2 (Cav2) y Caveolina-3 (Cav3) ¹⁶⁸. Presentan una gran similitud tanto en su secuencia de aminoácidos como en su estructura, con un peso molecular de entre 21 y 25 KDa. Cav1 y Cav2 se coexpresan en la gran mayoría de los tejidos, siendo especialmente abundantes en adipocitos, células endoteliales y fibroblastos. Por el contrario, la expresión de Cav3 se encuentra prácticamente restringida a las células musculares estriadas, así como al músculo cardíaco ^{166 169}.

Además de las Caveolinas, recientemente se han identificado otro tipo de proteínas fundamentales para la formación de las caveolas, llamadas Cavininas, con funciones adaptadoras y estabilizadoras ^{170,171}. Esta familia se compone de 4 miembros (Cavina1-4), siendo Cavina-1 y 2 los que desarrollan un papel más importante en la regulación de las caveolas ¹⁷². Cavina-1 también llamada PTRF (*Polimerase I and Transcript Release Factor*) fue inicialmente descrita como factor de transcripción, sin embargo su ausencia se ha visto que también provoca el desensamblaje de las caveolas ¹⁷⁰. Por otro lado, cavina-2 o SDPR (Serum Deprivation Protein Response) es capaz de unirse directamente a PTRF favoreciendo la generación de la curvatura de la membrana característica de este tipo de invaginaciones de membrana ¹⁷³.

1.3.1 Propiedades estructurales de Cav1

Cav1 (178 residuos) es una proteína integral de membrana de 22-24 kDa que posee una estructura en forma de horquilla (**Figura I5b**) ¹⁷⁴. Al encontrarse inserta en la monocapa citosólica de la membrana a través de un dominio central hidrofóbico

(residuos 102-122) deja sus extremos N- y C-terminal (residuos 1-101 y 122-178 respectivamente) situados hacia la región citoplasmática¹⁷⁵. En la secuencia de Cav1 puede encontrarse el dominio de oligomerización (residuos 61-101) cuya principal función es la formación de homo-oligómeros de Cav1 y que incluye el dominio de andamiaje (CSD, *Caveolin-Scaffolding Domain*) (residuos 82-101), imprescindible para su anclaje a la membrana (**figura I5b**)¹⁷⁶. Este dominio CSD permite también la interacción de caveolina con otras proteínas sirviendo como mecanismo regulador de diferentes rutas de señalización^{177,178}, así como elemento fundamental para su unión a colesterol¹⁷⁹.

1.3.1.1 Principales modificaciones post-traduccionales de Cav1

Además de su regulación a nivel transcripcional, muchas proteínas son capaces de ser modificadas post-traduccionalmente, lo que permite la regulación tanto de su localización como de sus funciones dentro de la célula (**figura I5b**). En el caso concreto de Cav1, esta proteína se ha descrito que sufre las siguientes modificaciones:

Fosforilación

Cav1 es fosforilada por la acción de diferentes tirosina kinasas tales como v-Src o Abl en el residuo de tirosina en posición 14 (Y14) presente en su extremo N-terminal^{180 181}. Esta modificación se da en respuesta a diversos estímulos como la unión de la célula a adhesiones focales¹⁸² participando, tanto en el mantenimiento de dominios de membrana¹⁸³ como en la endocitosis de caveolas mediada por integrinas¹⁸⁴. Por otro lado, Cav1 también es fosforilada en el residuo serina-80 (S80), lo cual tiene una implicación en la unión de Cav1 a la membrana del ER y en la regulación de su entrada en la vía secretora¹⁸⁵.

Palmitoilación

En el extremo C-terminal, Cav1 posee 3 cisteínas que son palmitoiladas (residuos 133, 143, y 156) contribuyendo a su unión a colesterol y a su asociación con la membrana plasmática¹⁸⁶. Sin embargo, aunque la palmitoilación de Cav1 no es indispensable para su localización en membrana, sí que ejerce un papel importante estabilizando su estructura proteica y la formación de oligómeros^{175 187}.

Ubiquitinación

Cav1 presenta residuos de lisina susceptibles de ser modificados a través de la unión covalente de ubiquitina. En concreto, su ubiquitinación tiene lugar en los residuos presentes en el extremo amino terminal (lisinas 5, 26, 30, 39, 47 y 57), jugando un papel fundamental en el tráfico de Cav1 desde el endosoma temprano al endosoma tardío en ruta hacia su degradación lisosomal^{188 189}. Aunque este proceso se encuentra finamente

regulado a través de la acción de VCP (Valoisin-Containing Protein) y su cofactor UBXD1 ¹⁹⁰ aún se desconocen las señales que promueven su iniciación.

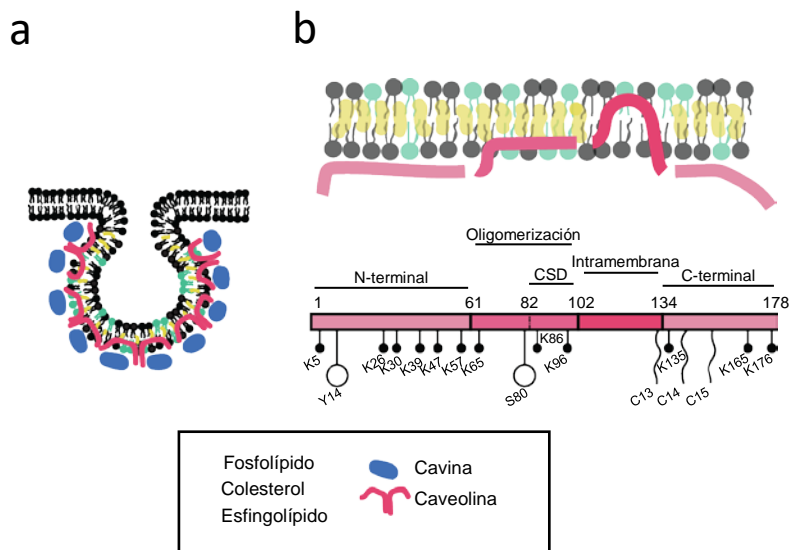


Figura 15. Organización de las caveolas. (a)

Microscopía electrónica (barra de escala, 100 nm) ¹⁶⁶ y estructura de una caveola indicando la composición lipídica y proteica básica. **(b)** Estructura de Cav1. Se muestra topología de Cav1 en una bicapa lipídica, así como sus principales dominios y modificaciones post-traduccionales (CSD, Caveolin Scaffolding Domain).

1.3.2 Propiedades funcionales de Cav1

Además de su función como componente estructural de las células, las membranas funcionan como una entidad de computación de las señales, tanto del exterior (en el caso de la membrana plasmática), como del interior celular (en el caso de las membranas de los diferentes orgánulos). Para que esta compleja red de señalización pueda funcionar correctamente es necesario que las membranas presenten una composición y organización específica. En este sentido, Cav1 actúa como un elemento clave en la generación de microdominios de membrana, de baja fluidez y ricos en colesterol, implicados tanto en la regulación de la señalización celular como en el tráfico intracelular de membranas ^{166 191}.

Esta regulación de la arquitectura de membrana por parte de Cav1 se encuentra íntimamente ligada a su capacidad de unir colesterol ¹⁹². Por un lado, Cav1 juega un papel fundamental como transportador de colesterol, afectando a su tráfico intracelular ¹⁹³, y regulando su homeostasis dentro de la células. Por otro, alteraciones en el contenido de colesterol de las membranas influyen directamente en la distribución y organización de Cav1 ^{194 195 196}, mostrando la estrecha interrelación entre ambos componentes.

En algunos casos Cav1 interviene de manera directa a través de su unión a componentes de las rutas de señalización. Tal es el caso de la inhibición de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) ^{177,197} o de la cascada de las kinasas Src ¹⁶⁸. En otros muchos casos, las funciones atribuidas a Cav1 se desprenden de su papel esencial en

la formación de caveolas. Estas estructuras tienen la capacidad de actuar como mecanismos para la compartimentación de proteínas de las diferentes vías de señalización, regulando espacial y temporalmente su interacción, bien mediante el secuestro o el acercamiento de los mismos ^{70 198 199}. Finalmente, las caveolas también pueden controlar el número de proteínas de señalización que se encuentran a nivel de la PM a través de procesos de endocitosis, tanto favoreciéndola como inhibiéndola. Ejemplo de ello son rutas como las de Rac1-PAK (*Rac1-p21-activated kinase*), de PI3K-AKT o RAS-ERK ²⁰⁰ así como los niveles de integrina $\beta 1$ ¹⁸⁴.

Cambios en el equilibrio de los diferentes componentes de las caveolas (Cav1, PTRF y colesterol entre otros) y/o en el estado de fosforilación de Cav1, se ha visto que impactan directamente sobre el ensamblaje-desensamblaje de estos dominios de membrana ^{183 201 196} afectando directamente a múltiples procesos celulares ^{170 202 203 204}.

1.3.2.1 Importancia de Cav1 en los compartimentos intracelulares

Aunque inicialmente la importancia de Cav1 se centraba en su señalización a nivel de la membrana plasmática, la presencia de esta proteína en diferentes orgánulos apunta a nuevas funciones de Cav1 a nivel intracelular ²⁰⁵.

Tras la endocitosis, Cav1 es transportada hasta la ruta endosomal ¹⁸⁸. En los endosomas, las vías de señalización que han sido endocitadas pueden continuar activas o por el contrario apagarse, lo que convierte a estas vesículas en puntos de procesamiento e integración de señales intracelulares ⁹⁷. En este sentido, Cav1, al igual que ocurre a nivel de PM, es capaz de regular las cascadas de señalización mediadas por el receptor de EGF, insulina, Raf-1 o Mek-P a nivel del endosoma ^{206 207}.

Durante su síntesis, Cav1 se inserta inicialmente en la membrana del ER donde se produce la formación de oligómeros ¹⁸⁵. Desde allí Cav1 es transportada al aparato de Golgi siguiendo la ruta exocítica hasta alcanzar la membrana plasmática ^{208 185}. Sin embargo, diferentes estudios muestran la importancia creciente del retículo endoplásmico no sólo dentro de la ruta secretora clásica, sino como vía de conexión funcional con diferentes compartimentos ^{209 210}. El ER es capaz de interactuar directamente con la membrana plasmática, los endosomas, lisosomas, peroxisomas, mitocondrias y con los cuerpos lipídicos (LD, *lipid droplets*) sirviendo como mecanismo de intercambio de metabolitos, lípidos y proteínas ²¹¹.

La presencia de Cav1 en el ER permite su transporte a través de este entramado reticular de membrana hasta diferentes localizaciones intracelulares. Uno de estos destinos son los LDs, estructuras dinámicas cuya función principal es la de acumular y distribuir lípidos en las células ²¹¹. La translocación de Cav1 a los cuerpos lipídicos actúa

como mecanismo de transporte de ácidos grasos y colesterol fundamental en procesos de regeneración hepática ^{212 213}.

En el caso de la interacción entre el ER y las mitocondrias, Cav1 participa en la formación de las conexiones de membrana que se establecen entre ambos compartimentos, conocidas como MAMs (*Mitochondria-associated membranes*). Desde allí, Cav1 es capaz de regular los niveles de colesterol mitocondrial, así como de una enorme variedad de proteínas implicadas en el metabolismo de esteroides y de lipoproteínas ²¹⁴. La presencia de Cav1 en estos contactos ER-Mitocondria permitiría su transferencia entre ambos compartimentos. Se ha visto que en condiciones patológicas como la esteatosis hepática, se produce un aumento de la Cav1 en la membrana interna mitocondrial, donde presumiblemente actúa reduciendo el daño mitocondrial producido por el estrés oxidativo ^{215 216}.

1.3.2.2 Papel de Cav1 en la progresión tumoral

Diferentes evidencias apuntan a Cav1 como un gen supresor de tumores. Los genes que codifican para Cav1 y 2 se encuentran en el locus humano 7q31 (en el 6-A2 en ratones), región que está frecuentemente alterada en células tumorales, y que por tanto es susceptible de contener genes supresores tumorales ²¹⁷. También se han encontrado mutaciones en el gen de Cav1 en el 16% de los cánceres de mama (P132L) ^{218 219 220}, y otros muchos tumores humanos presentan niveles reducidos de Cav1. Sin embargo, a pesar de todas las evidencias que avalan el papel de Cav1 como supresor tumoral, múltiples trabajos muestran que también puede actuar como promotor tumoral. Se ha encontrado un aumento de la expresión de Cav1 en carcinomas de próstata ²²¹, vejiga ²²², de células escamosas en esófago ²²³ y de células no- pequeñas de pulmón (NSCLC, *non-small cell lung cancer*) ²²⁴.

La complejidad aumenta aún más si se considera el papel de Cav1 no sólo a nivel de las células tumorales, sino en el estroma tumoral, especialmente en TAFs. En este sentido, la ausencia de Cav1 en TAFs se ha visto que influye directamente sobre el metabolismo del tumor asociándose a una mala prognosis de la enfermedad ^{225 226}. Sin embargo, otros grupos incluidos el nuestro hemos observado que elevados niveles de Cav1 en el estroma, promueven cambios en su rigidez que favorecen la invasión tumoral ^{70 227}.

Todos estos datos apuntan por tanto a la necesidad de nuevos estudios que nos permitan entender los mecanismos a través de los cuales Cav1 es capaz de regular las diferentes etapas del desarrollo tumoral.

02

OBJETIVOS

Caveolina-1 (Cav1) es una proteína integral de membrana implicada en un gran número de funciones derivadas de su capacidad de modular la arquitectura y composición de las bicapas lipídicas de las células ¹⁶⁶. Su localización celular no solo se restringe a la membrana plasmática, sino que se extiende a diferentes compartimentos intracelulares ^{212 214}, aunque aún no se conoce con claridad el papel que Cav1 juega en dichos orgánulos ni tampoco los mecanismos moleculares que regulan su tráfico a estas estructuras.

Por otro lado, diferentes grupos, entre los que se incluye el nuestro ^{70 228 229}, hemos observado el papel que puede desempeñar Cav1 en la regulación tanto de la composición como de la rigidez y remodelado de la matriz extracelular, produciendo un impacto en el desarrollo tumoral.

Finalmente, recientes estudios muestran la presencia de Cav1 en exosomas apuntando a un posible papel de esta proteína como marcador de progresión tumoral en melanomas ²³⁰. A pesar de ello, aún se desconoce cómo se regula la entrada de Cav1 a los exosomas y el papel que Cav1 juega en la señalización mediada por estas nanovesículas.

Por todo ello, en este trabajo se han abordado los siguientes objetivos:

- **Identificación de los mecanismos implicados en la incorporación de Cav1 a los exosomas mediante su endocitosis.**

- **Estudio del papel de Cav1 en la biogénesis de exosomas. Se abordará su participación tanto en la formación de exosomas como en la selección de sus cargos.**

- **Implicación de Cav1 en la composición y deposición de la ECM generada por fibroblastos.**

- **Evaluación del impacto funcional de los exosomas producidos por fibroblastos (con y sin Cav1) sobre el comportamiento tumoral.**

03

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Anticuerpos

Los anticuerpos primarios usados en este trabajo, así como su proveedor, aparecen reflejados en la siguiente tabla:

Tabla MM1. Anticuerpos primarios. Se indica la especie, casa comercial, y referencia.

Anticuerpo (tipo, especie)	Proveedor (referencia)
anti-Alix (3A9) (monoclonal, ratón)	<i>Cell Signaling Technology (2171)</i>
anti-Cadherina (monoclonal, ratón)	<i>BD transduction (610181)</i>
anti-Calreticulina (policlonal, conejo)	<i>Abcam (ab2907)</i>
anti-Caveolina 1 (D46G3) XP® (monoclonal, conejo)	<i>Cell Signaling Technology (3267)</i>
anti-Caveolina 1 (monoclonal, ratón)	<i>Sigma Aldrich (SAB4200216)</i>
anti-CD63 (H-193) (policlonal, conejo)	<i>Santa Cruz (sc15363)</i>
anti-CD63 [NK1/C3] (monoclonal, ratón)	<i>Abcam (ab1318)</i>
anti-Fibronectina (policlonal, conejo)	<i>Sigma Aldrich (F3648)</i>
anti-Flotilina 1 (policlonal, conejo)	<i>Abcam (ab13349)</i>
anti-GM130 (monoclonal, ratón)	<i>BD transduction (610823)</i>
anti-HA (monoclonal, ratón)	<i>Roche (1158381)</i>
anti-Histona H3 (policlonal, conejo)	<i>Abcam (ab1791)</i>
anti-LBPA (6C4) (monoclonal, ratón)	<i>Echelon (Z-LBPA)</i>
anti-N-SMase (B-1) (monoclonal, ratón)	<i>Santa Cruz (sc3777135)</i>
anti-N-SMase 2 (G-6) (monoclonal, ratón)	<i>Santa Cruz (sc166637)</i>
anti-Periostina (policlonal, conejo)	<i>Abcam (ab14041)</i>
anti-PTRF (policlonal, conejo)	<i>Abcam (ab48824)</i>
anti-py14-Caveolina 1 (monoclonal, ratón)	<i>BD transduction (611339)</i>
anti-Tenascina C (Mtn-12) (monoclonal, rata)	<i>Sigma Aldrich (T3413)</i>
anti-Tenascina C (policlonal, conejo)	<i>Millipore (AB19011)</i>
anti-TSG101 [4A10] (monoclonal, ratón)	<i>Abcam (ab83)</i>
anti- α -Tubulina (DM1A) (monoclonal, ratón)	<i>Sigma Aldrich (T-9026)</i>

Los anticuerpos secundarios y terciarios quedan reflejados en la siguiente tabla:

Tabla MM2. Anticuerpos secundarios y terciarios. Se indica su origen, el antígeno que reconocen, el elemento con el que están conjugado y su casa comercial.

Origen	Antígeno	Conjugación	Proveedor
cabra	IgG ratón	HRP [*]	<i>Thermo Fisher Scientific</i>
cabra	IgG conejo	HRP [*]	<i>Thermo Fisher Scientific</i>
cabra	IgG ratón	Alexa 488	<i>Molecular Probes</i>
cabra	IgG ratón	Alexa 546	<i>Molecular Probes</i>
cabra	IgG ratón	Alexa 647	<i>Molecular Probes</i>
cabra	IgG conejo	Alexa 488	<i>Molecular Probes</i>
cabra	IgG conejo	Alexa 546	<i>Molecular Probes</i>
pollo	IgG conejo	Alexa 647	<i>Molecular Probes</i>
pollo	IgG rata	Alexa 647	<i>Molecular Probes</i>
cabra	IgG conejo	Biotina	<i>Vector Labs</i>
cabra	Biotina	HRP [*]	<i>Cell Signaling</i>

HRP: peroxidasa derivada de rábano, del inglés HorseRadish Peroxidase.

La faloidina marcada con Alexa 546 ó 647 fue adquirida en *Molecular Probes*.

3.2 Reactivos

Para la inhibición de la producción de exosomas se usó GW4869 (*Calbiochem*, 567715) y dimetilamilorida (*Sigma*, A4562). Los ensayos de invasión de celular se realizaron utilizando matrigel (*BD*, 354230) o colágeno tipo I de cola de rata (*Corning*, 354249). Hoechst 3342 fue obtenido de *Sigma Aldrich*. Para la inducción de la acumulación del colesterol endosomal se usó U18666A ((3β) -3-[2-(Diethylamino)ethoxy]androst-5-en-17-one hydrochloride, *Sigma*, U3633).

Los medios de cultivo empleados (DMEM y DMEM-F12 y RPMI) y el suero fetal bovino (FBS, *Fetal Bovine Serum*) fueron proporcionados por *Gibco*. Los antibióticos, penicilina y estreptomicina fueron de *Bio-Whittaker*.

El medio de montaje de la inmunofluorescencias fue Permafluor, de *Thermoscientific*.

3.3 Cultivos celulares

En este trabajo se han utilizado fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs, Murine Embryonic Fibroblasts) inmortalizados procedentes de ratones silvestres (WT, Wild Type) y *knock-out* (KO) para caveolina-1 (Cav1KO), cedidos por el Dr. Michael P.

Lisanti (Thomas Jefferson University, Filadelfia, EEUU). También se usaron líneas de MEFs WT y KO para Tenascina C (TnCWT y TnCKO respectivamente) proporcionadas por la Dra. Gertraud Orend (Université de Strasbourg, Estrasburgo, Francia). Los MEFs KO para PTRF (PTRFKO) fueron proporcionados por el Dr. Robert G. Parton (Institute for Molecular Bioscience, University of Queensland, Australia) cuya reconstitución para la expresión de PTRF exógeno se llevó a cabo mediante infección retroviral utilizando el vector pMIGR1-PTRF (dando lugar a la línea celular PTRFKO + PTRF). Las células COS7 (células de riñón de mono verde, *Cercopithecus aethiops*) fueron adquiridas en ATCC (CRL-1651). La línea de fibroblastos humanos asociados a tumor (TAFs, tumor Associated Fibroblast) fue aislada a partir de tumores primarios de mama en el Instituto Europeo de Oncología (IEO, Milán) ²³¹. Para este trabajo también se utilizaron diferentes líneas tumorales. La línea de glioblastoma humano U-251 MG fue adquirida en ATCC. Por otra parte, se usaron líneas tumorales de cáncer de mama. La línea de ratón EO771 fue adquirida en CH3 BioSystems (940001-A). Las líneas humanas MDA-MB-231 (HTB-26), MDA-MB-468 (HTB-132), HCC1937 (CRL-2336), HCC1954 (CRL-2338) se consiguieron en ATCC. Todas las células fueron cultivadas a 37°C en atmósfera húmeda al 5% CO₂ y en medio suplementado con FBS al 10% y penicilina a 100 U/ml y estreptomycin a 100 µg/ml. El origen, especie y medio de cultivo de cada una de las líneas celulares previamente citadas se recoge en la siguiente tabla:

Tabla MM3. Líneas celulares utilizadas. Se indica su nombre, tipo celular de origen y especie y medio óptimo de cultivo.

Línea celular	Origen	Especie	Medio de cultivo
MEF	Fibroblasto embrionario	<i>Mus musculus</i>	DMEM
COS7	Fibroblasto de riñón	<i>Cercopithecus aethiops</i>	DMEM
U-251 MG	Glioblastoma multiforme	<i>Homo sapiens</i>	DMEM
EO771	Adenocarcinoma medular de mama	<i>Mus musculus</i>	RPMI
MDA-MB-231	Adenocarcinoma de mama (efusión pleural)	<i>Homo sapiens</i>	DMEM/F12
MDA-MB-468	Adenocarcinoma de mama (efusión pleural)	<i>Homo sapiens</i>	DMEM/F12
HCC1937	Carcinoma ductal de mama	<i>Homo sapiens</i>	RPMI
HCC1954	Carcinoma ductal de mama	<i>Homo sapiens</i>	RPMI
TAF	Fibroblasto asociado a tumor de mama	<i>Homo sapiens</i>	DMEM

3.4 Silenciamiento génico y medición de la expresión génica

Para el silenciamiento de la expresión génica de manera transitoria se transfectaron oligonucleótidos de ARNi específicos para cada gen. Para ello, se utilizó Lipofectamine® RNAiMAX (Thermo Fisher, 13778030) y una concentración final de los

diferentes ARNi de 20nM. Se utilizó el protocolo de transfección reversa. Brevemente, la cantidad de lipofectamina y de ARNi apropiados, según las indicaciones de la casa comercial, se incubaron en Opti-MEM durante 20 minutos ajustando las cantidades en función del tamaño de placa deseado. Una vez pasado el tiempo, se añadió a la placa el número de células deseadas junto con medio de cultivo suplementado con suero bovino. Los ARNi utilizados para interferir TSG101, nSMase1/Smpd2 y nSMase2/Smpd3 de ratón fueron *SMART pool ON-TARGET plus* obtenidos en Dharmacon (TSG101 Cat. L-049922-01-0005; nSMase1/Smpd2 Cat. L-044206-01-0005; nSmase2/Smpd3 Cat. L-059400-01-0005). Para el silenciamiento de Cav1 se utilizó un ARNi de Dharmacon (secuencia diana: GAGCUUCCUGAUUGAGAUU) y un ARNesi procedente de Sigma (EHU031251). En el caso de PTRF se utilizó un *SMART pool ON-TARGET plus* de Dharmacon (L-040777-01-0005). Como control de transfección de ARN se usó un ARNi de secuencia truncada (“scramble”) incapaz de reconocer ningún ARNm (ON-TARGET plus non-targeting Pool, Dharmacon Cat. D-001810-10-05).

El nivel de expresión del ARNm de cada gen se analizó posteriormente mediante PCR cuantitativa a tiempo real mediante el uso de oligonucleótidos cebadores específicos del gen de interés (**tabla MM4**). Comprobándose también la eficiencia de silenciamiento mediante análisis por Western Blot.

El silenciamiento de la expresión génica de Cav1 se realizó mediante infección lentiviral. Para ello la secuencia diana de Cav1 de ratón (nucleótidos 5'-GCTTCCTGATTGAGATTCAGT-3' y la secuencia control 5'-GCGCGCTTTGTAGGATTCG-3' se clonaron respectivamente en el vector pLVX-shRNA2 que contiene como el reporter ZsGreen1 (*Clontech*). Cada uno de estos vectores fueron cotransfectados con los plásmidos pMD2.G y p8.91 en células 293T, utilizando el reactivo de transfección Fugene 6. Tras 48 horas, los sobrenadantes cargados de partículas lentivirales se filtraron y fueron añadidos a los cultivos de fibroblastos Cav1WT, en presencia de suero (10% FBS) y del polímero catiónico protamina sulfato (4 µg/ml). Después de otras 48 horas, las células que expresaban GFP fueron detectadas y aisladas utilizando un separador de células MoFlo (DAKO-Cytomation). Se comprobó mediante Western Blot que los niveles de expresión de Cav1 se habían reducido de forma significativa.

Tabla MM4. Cebadores utilizados para la medición de la expresión génica

Gen	Especie	Cebador (5' → 3')	
Cav1	Ratón	Directo	CCGCGACCCCAAGCA
		Reverso	CTGCAATCACATCTTCAAAGTC
TSG101	Ratón	Directo	TCTAACCGTCCGTCAAACCTGT
		Reverso	TTGTACCAGTGAGGTTACCA
Hrs	Ratón	Directo	CGGAACGAACCCAAGTACAAG
		Reverso	CGAACATGGCATCACTTTTCCT
nSMase1/Smpd2	Ratón	Directo	TGGGACATCCCCTACCTGAG
		Reverso	TAGGTGAGCGATAGCCTTTGC
nSMase2/Smpd3	Ratón	Directo	GGGCAGAGAATCCGCAATG
		Reverso	GGCTGTCCTCTTAATGCTCCC
Hprt1	Ratón	Directo	GCTGGTGAAAAGGACCTCT
		Reverso	CACAGGACTAGAACACCTGC
Gapdh	Ratón	Directo	TGCACCACCAACRGCTAGC
		Reverso	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
mChop	Ratón	Directo	CCACCACACCTGAAAGCAGAA
		Reverso	AGGTGAAAGGCAGGGACTCA
XBP1	Ratón	Directo	AAACAGAGTAGCAGCGCAGACTGC
		Reverso	TCCTTCTGGGTAGACCTCTGGGA
XBP1	Humano	Directo	TTACGAGAAAACCTCATGGC
		Reverso	GGGTCCAAGTTGTCCAGAATG

3.5 Plásmidos de expresión

Los plásmidos que se han usado a lo largo de este trabajo se especifican en la siguiente tabla:

Tabla MM5. Plásmidos de expresión. Se indica el nombre y el tipo de vector, así como el gen de interés y la etiqueta usada para su detección.

Vector	Tipo de vector	Gen	Etiqueta
pcDNA3.1 (+)	de expresión	Cav1 WT	HA
pcDNA3.1 (+)	de expresión	Cav1 K5-57R	HA
pcDNA3.1 (+)	de expresión	Cav1 K5-176R	HA
pcDNA3.1 (+)	de expresión	Cav1 K65-176R	HA
pEGFP-C1	de expresión	Rab5 Q79L	EGFP
pRRL_CMV	retroviral	Cav1 WT	GFP
	retroviral	Cav1 Y14F	GFP
pLVX-shRNA2	lentiviral	shRNA Cav1	GFP
pMD2.G	lentiviral	VSV-G	-
pCMV-dR8.91	lentiviral	gag pol tat rev	-
pMIGR1	retroviral	Ptf	GFP

3.6 Extracción de proteínas y ensayos de *Western Blot*

Para la obtención de los extractos celulares, las células se lavaron en tampón fosfato (PBS, *Phosphate-Buffered Saline*), procediéndose a su ruptura mediante el uso de un tampón de lisis RIPA (10mM Tris-HCl, pH 7,2, 1% Triton X-100, 0,5% deoxicolato sódico, 0,1% dodecil sulfato de sodio (SDS), 150 mM NaCl y 5 mM EDTA) en presencia de inhibidores de proteasas (1 µg/ml aprotinina y 1µg/ml leupeptina) y fosfatasas (0,5mM Na₃VO₄, 20mM NaF). La cuantificación de la concentración de proteínas se realizó empleando el método de Bradford. Entre 20 y 40 µg de proteína se desnaturalizaron a 95°C en tampón Laemmli (60mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% β-mercaptoetanol, 0,01% azul de bromofenol). En el caso de los exosomas, se analizaron las proteínas procedentes del mismo número de partículas (determinado mediante la cuantificación de los exosomas por la tecnología NTA, Nanoparticle Tracking Analysis) mediante lisis en tampón de Laemmli.

Para el análisis de su composición proteica, las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida (con porcentaje de acrilamida en función del peso molecular de la proteína a analizar) en condiciones desnaturalizantes (presencia de dodecil sulato sódico SDS) y se separaron mediante electroforesis en Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Hybond C, Amersham Pharmacia, Biotech). Las membranas se bloquearon durante 1 hora en una solución de leche desnatada en polvo al 5% en PBS. En el caso de necesitar la detección posterior de proteínas fosforiladas, el bloqueo se realizó en albúmina de suero bovino (BSA, *Bovine Serum Albumin*) al 5% en PBS. A continuación, las membranas se incubaron durante la noche a 4°C con los anticuerpos primarios deseados en PBS a una concentración aproximada de 0,1 – 1 µg/ml. Después de lavar las membranas con PBS o PBS-Tween se incubaron de nuevo con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa HRP (a una concentración de 0,2 µg/ml) durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras lavar nuevamente las membranas con PBS o PBS-Tween las proteínas se visualizaron mediante una reacción de quimioluminiscencia usando los reactivos ECL™ (GE Healthcare-Amersham). En caso necesario de amplificar la señal a detectar se usaron anticuerpos secundarios conjugados con biotina y posteriormente se incubaron las membranas con un anticuerpo terciario anti-biotina conjugado con peroxidasa HRP.

El análisis densitométrico se realizó utilizando el software Image J. Las unidades expresadas son arbitrarias.

3.6.1 Distinción entre lisados intracelulares y extracto total de células

Los lisados intracelulares corresponden al conjunto de proteínas que se encuentran específicamente presentes dentro de las células. Para su extracción, las células adheridas a las placas de cultivos se incubaron con una proteasa (tripsina al 0,25%) a 37°C durante 5 minutos separándolas por tanto de cualquier proteína presente en el espacio extracelular. Las células despegadas se lavaron con PBS y se lisaron en RIPA para su posterior análisis. Los lisados o extractos totales consisten en las proteínas presentes tanto intracelularmente como aquellas presentes en la matriz extracelular donde las células se encuentran adheridas. Para su obtención, las células se lisaron directamente sobre la placa utilizando RIPA y llevando a cabo la extracción mediante levantamiento utilizando un raspador.

3.7 Técnicas de microscopía

3.7.1 Microscopía óptica de inmunofluorescencia

Inmunofluorescencia de células

Las células crecidas sobre cubreobjetos de cristal se fijaron en paraformaldehído al 4% a 37°C durante 15 minutos. Tras varios lavados en PBS se procedió a su permeabilización con un tampón PBS en presencia de Triton X-100 al 0.1% a 4°C durante 5 minutos realizándose posteriormente la incubación con BSA al 2% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tanto los anticuerpos primarios como los secundarios (a una concentración de 1-2 µg/ml) se incubaron durante 1 hora en PBS en presencia de BSA al 0,1%. Para la tinción de los núcleos, junto con los anticuerpos secundarios se llevó a cabo la incubación de las muestras con los marcadores de ADN DAPI o Hoechst 33342 1 µg/ml. Para llevar a cabo el marcaje del citoesqueleto de actina se procedió a la incubación con el marcador de actina faloidina. Finalmente, las muestras se montaron con medio de montaje para su conservación y posterior análisis.

Inmunofluorescencia de tejidos

Los órganos extraídos se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se sumergieron consecutivamente en soluciones de sacarosa al 15% y 30% en PBS hasta conseguir la pérdida de la flotación del órgano en estudio. Finalmente, los tejidos se embebieron en medio OCT (Tissue-Tek) y se guardaron a -80°C para la realización de cortes utilizando un criostato motorizado. Las tinciones se realizan en cortes de 20 µm de grosor. Para el bloqueo y posterior permeabilización las muestras se incubaron en PBS en presencia de suero al 4% correspondiente a la especie animal deseada (pollo o cabra, según el origen de los anticuerpos secundarios) y Triton X-100 al 0,3%. Tras 1 hora de incubación, los anticuerpos primarios a una concentración de 1-2 µg/ml fueron añadidos se incubaron

durante la noche a 4°C. Tras un lavado exhaustivo de las muestras con PBS en presencia de Triton X-100 al 0,15% y se realizó la incubación con el anticuerpo secundario durante 3 horas a 4°C en ese mismo tampón. Finalmente, las muestras lavaron abundantemente con PBS y se montaron sobre un portaobjetos con medio de montaje para su conservación y posterior análisis.

3.7.2 Microscopía electrónica de exosomas

Para la visualización de exosomas por microscopía electrónica de transmisión se siguió el protocolo previamente descrito ²³². La suspensión de exosomas se fijó en paraformaldehído al 2% depositándose sobre una rejilla recubierta de Formvar/carbono durante 20 minutos. Tras el lavado de las gradillas en PBS, éstas se transfirieron a glutaraldehído al 1% durante 5 minutos. A continuación, las rejillas se lavaron en agua destilada abundantemente y las muestras se contrastaron mediante tinción con acetato de uranilo al 2%.

3.7.3 Tinción y cuantificación de colesterol por marcaje con filipina III

Las células se sembraron sobre cubreobjetos de cristal y se fijaron 24 horas después con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos a 37°C. La permeabilización se realizó con una solución de BSA al 0,2% y de saponina al 0,1% (detergente) en PBS durante 30 minutos (Solución de Permeabilización, SP). Tanto los anticuerpos primarios como los secundarios conjugados con fluorescencia se incubaron durante 1 hora y fueron posteriormente lavados 3 veces con SP. A continuación, se llevó a cabo la incubación de las muestras con filipina III (50 µg/ml en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez lavadas las muestras en PBS, éstas se montaron sobre portaobjetos utilizando medio de montaje para su conservación.

Para el estudio de los niveles de colesterol en los cuerpos multivesiculares, se usó como marcador un anticuerpo primario dirigido frente el lípido LBPA. A través del programa Fiji (imageJ 1,50e x64, <http://fiji.sc/>) se procedió a cuantificar la intensidad media y total de filipina III que se encuentra específicamente colocalizando con la tinción de LBPA a nivel multivesicular, así como el área de todas las partículas positivas para LBPA con un área mayor de 0,25 µm².

3.8 Aislamiento y caracterización de exosomas

Los exosomas fueron purificados a partir del medio de cultivo en el que se crecieron las células durante al menos 72h. Dicho medio contiene, a parte de los componentes descritos previamente, FBS libre de exosomas. Una vez recogido el medio de cultivo que contiene los exosomas liberados por las células se realizaron centrifugaciones diferenciales sucesivas (**figura MM1**). En primer lugar, se centrifugó a

300 g durante 10 minutos a 4°C para la eliminación de aquellas células muertas o en suspensión que se encuentren en el medio. Posteriormente, se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 2000 g durante 20 minutos a 4°C. Con esta centrifugación se consigue la eliminación de los restos celulares que queden en suspensión. A continuación, el sobrenadante se ultracentrifugó a 10.000 g durante 30 minutos a 4°C para permitir la eliminación de los cuerpos apoptóticos, microvesículas y otros restos celulares de menor tamaño. El paso final para la sedimentación de los exosomas consistió en una última ultracentrifugación del sobrenadante obtenido anteriormente el a 110.000 g durante 70 minutos a 4°C. El precipitado correspondiente a los exosomas purificados, se lavó mediante resuspensión con PBS y procediéndose nuevamente a su ultracentrifugación a 110.000 g durante 70 minutos a 4°C. La muestra resultante de todos estos pasos corresponde a los exosomas totales producidos por las células ²³².

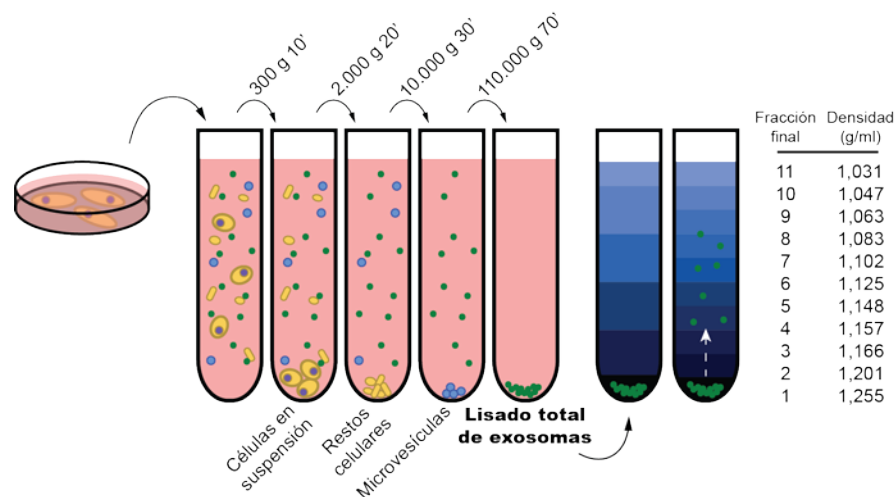


Figura MM1. Purificación y caracterización de exosomas. Se presentan las centrifugaciones seriadas realizadas para la purificación de exosomas, así como los principales componentes que se extraen en cada una. La tabla indica la densidad estimada de sacarosa que se obtiene tras la centrifugación del gradiente de sacarosa.

Para la caracterización de los exosomas purificados se procedió a una centrifugación zonal en un gradiente de sacarosa preformado y discontinuo (**figura MM1**) a partir de diferentes soluciones de sacarosa a las concentraciones 2M, 1,3M, 1,16M, 0,8M, 0,5M y 0,25M preparadas en una solución de HEPES 20mM, pH 7,4. La muestra correspondiente a los exosomas purificados anteriormente se cargó en el fondo del gradiente, junto con la solución de sacarosa 2M y a continuación se fueron cargando fracciones de 2ml de cada solución de sacarosa en orden decreciente de concentración. Tras la ultracentrifugación de los gradientes a 200.000 g durante 18h a 4°C, se extrajeron fracciones de 1ml en tubos de cristal en un total de once fracciones y se

añadió un volumen igual de acetona, incubándose las diferentes fracciones a -20°C durante 2 h para la permitir la precipitación de las proteínas presentes en cada fracción. Pasado ese tiempo las muestras se centrifugaron a 16.000 g durante 10 minutos a 4°C. Los precipitados de proteínas correspondientes a cada fracción se resuspendieron en tampón de Laemmli para su posterior análisis por Western Blot.

De forma alternativa, los exosomas producidos y purificados se analizaron directamente mediante Western Blot sin proceder a su separación mediante gradiente de sacarosa, y se utilizaron directamente para llevar a cabo los diferentes ensayos tal y como se especifica en cada apartado.

3.8.1 Obtención de suero fetal bovino libre de exosomas

El suero sanguíneo es un fluido corporal que contiene altos niveles de exosomas. Para el estudio de los exosomas liberados por las células en cultivo los exosomas presentes en el plasma han de ser extraídos previamente. Para ello, el FBS (Gibco) es centrifugado a 110.000 g a 4°C durante 16h. Posteriormente es filtrado y añadido al medio de cultivo ²³².

3.8.2 Análisis de partículas mediante la utilización de la tecnología NTA

El sistema NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) es un método de visualización y análisis de las partículas contenidas en un fluido que relaciona el movimiento browniano de cada una con su tamaño (**figura MM2**). Además, el algoritmo utilizado para el análisis también requiere de la temperatura y viscosidad a la que se encuentran las partículas a analizar. El resultado obtenido es una distribución de la cantidad de partículas por tamaño de entre 10 y 1000 nm.

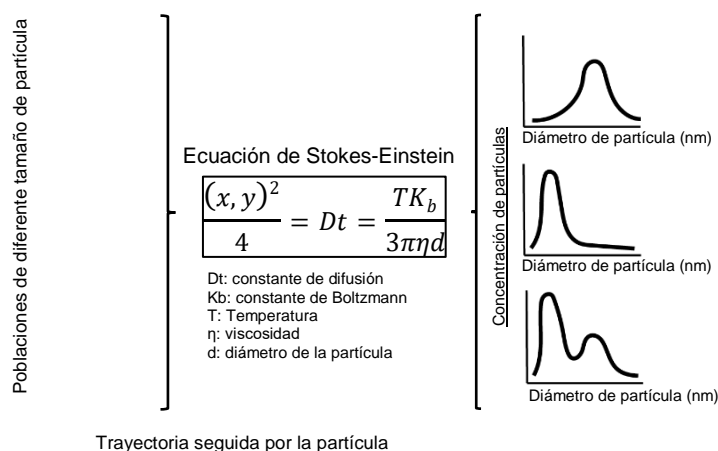


Figura MM2. Esquema explicativo del funcionamiento de la tecnología NTA. Se indica el resultado obtenido tras el análisis matemático del movimiento browniano obtenido de 3 tipos de poblaciones de partículas que difieren en tamaño.

3.8.3 Marcaje de los exosomas con la sonda fluorescente PKH67

Los exosomas purificados se marcaron con la sonda verde PKH67 (Sigma MIDI67) acorde con las indicaciones del fabricante. Tras la incorporación del marcaje a los exosomas, el exceso de sonda no unido se eliminó mediante la utilización de columnas (Thermo Fisher, 4484449).

3.9 Estudios mediante tecnologías ómicas

3.9.1 Análisis proteómico

Los lisados tanto celulares como los correspondiente a los exosomas producidos por dichas células se llevaron a cabo mediante el protocolo de digestión de muestras en filtro (FASP, del inglés Filter aided sample preparation protocol). Brevemente, las muestras se diluyeron en tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,5 SDS 4% y DTT 50 mM. Posteriormente se hirvieron durante 10 minutos y se centrifugaron. La concentración de proteína del sobrenadante se cuantificó con un espectrómetro de infrarrojo Direct Detect® (Millipore). Alrededor de 100µg de proteína se diluyeron en urea 8 M en Tris-HCl 100 mM pH 8,5 (tampón de desnaturalización, TD) y se cargaron sobre un filtro de centrifuga de 30 kDa (FASP Protein Digestion Kit). Posteriormente, las proteínas se alquilaron con iodoacetamida 50 mM en TD durante 20 minutos en oscuridad. La muestra se lavó tres veces en TD y posteriormente otras tres veces en bicarbonato amónico 50 mM. Las proteínas se digirieron durante la noche a 37°C con tripsina modificada (Promega) en bicarbonato amónico 50 mM en una ratio 50:1 proteína:tripsina (peso/peso). Los péptidos resultantes se eluyeron con NaCl 0,5 M. Finalmente, se añadió ácido trifluoroacético hasta el 1 %, los péptidos se desalaron en cartuchos C18 Oasis-HLB y se secaron mediante centrifugación en vacío.

Para el análisis cuantitativo, los péptidos se disolvieron en tampón de bicarbonato trietilamónico (TEAB 100 mM). La misma cantidad de péptidos de cada una de las muestras se marcó individualmente con su respectivo reactivo isobárico (iTRAQ4-plex iTRAQ Reagents Multiplex Kit, Applied Biosystems). El marcaje se realizó a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras la incubación, las reacciones se pararon con ácido trifluoroacético y se mezclaron las muestras adecuadamente. Finalmente, las muestras se concentraron en vacío, se desalaron sobre cartuchos C18 Oasis-HLB y se secaron como antes.

Los péptidos digeridos se cargaron en un sistema de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) y fueron analizados mediante el uso de nanocolumnas de fase reversa C-18 (75 µm I.D x 25 cm, tamaño de partícula 2 µm, Acclaim PepMap RSLC, 100 C18; Thermo Fisher Scientific) en un gradiente continuo

de acetonitrilo. Para eluir los péptidos de las nanocolumnas a un nanospray emisor se estableció un flujo de 200 nL/min para su posterior ionización en tiempo real y la fragmentación de los péptidos en un espectrómetro de masas Orbitrap QExactive (Thermo Fisher). Durante la cromatografía, se examinó el aumento del espectro de resolución-FT (resolución=70.000) seguido del espectro de masas HCD de los 20 iones más intensos. La exclusión dinámica se fijó en 40 s. Para aumentar la profundidad del análisis del proteoma, las muestras marcadas fueron también fraccionadas por cromatografía de intercambio catiónico (columnas Oasis HLB-MCX). Las fracciones se desalaron y se analizaron de la misma manera que la descrita anteriormente.

Para la identificación y cuantificación de la proteína se analizaron los espectros adquiridos con el programa Proteome Discoverer (versión 1.4.0.29, Thermo Fisher Scientific) usando el algoritmo SEQUEST-HT (Thermo Fisher Scientific). Se usó la base de datos Uniprot con los siguientes parámetros: Digestión de tripsina con un máximo de 2 cortes fallidos, tolerancia de 2 Da y 0,03 Da en la masa de los iones precursores y fragmentos respectivamente, la oxidación de metioninas como modificación dinámica y carbamidometil cisteína y las modificaciones de iTRAQ en la región N-terminal y en lisinas como modificaciones fijas. Los péptidos se validaron usando el método de la ratio de probabilidad (pRatio) y el índice de falso positivo (FDR, False Discovery Rate) fue calculado mediante el uso del método de bases de datos invertidas y el método refinado con un filtro adicional de tolerancia de masa del precursor de 15 ppm. Los péptidos identificados tuvieron un FDR igual o inferior al 1%.

Las proteínas se cuantificaron en base a las intensidades de los iones reporteros. Los datos cuantitativos se analizaron por QuiXoT, basado en el modelo estadístico WSPP. En este modelo, el \log_2 de las ratios de cada proteína se expresan en términos de variables estandarizadas como las unidades de desviación estándar en relación a sus varianzas estimadas (valores Zq).

3.9.2 Análisis de la composición de los glicerofosfolípidos de los exosomas

La composición lipídica de los exosomas se analizó mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas. Para ello, se usó una cantidad de muestra correspondiente a 2,5 mg de proteína. Antes de la extracción de lípidos, se añadieron 200 pmol de los estándares necesarios para el seguimiento (1,2-dipentadecanoyl-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-dilauroyl-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dipalmitoyl-sn-glicero-3-fosfoinositol, 1,2-dimiristoyl-sn-glicero-3-fosfoerina, 1,2-dimiristoyl-sn-glicero-3-fosfato, y 1-heptadecanoyl-2-araquidonoyl-3-fosfoglicerol) según establece el método de Bligh y Dyer. Tras la evaporación del solvente orgánico por acción del vacío, los

lípidos se disolvieron en 50 μ l de solvente (75% de A y 25% de B) y 40 μ l se inyectaron en un cromatógrafo líquido Agilent 1260 Infinity, equipado con una bomba cuaternaria Agilent G1311C y un autodispensador Agilent G1329B. La columna usada fue una FORTIS HILIC (150 x 3 mm y 3 μ m de tamaño de partícula, Fortis Technologies) protegida con un cartucho Supelguard (20 mm x 2,1 mm, Sigma Aldrich). Los glicerofosfolípidos y la esfingomielina se separaron según el procedimiento descrito por Axelsen. Brevemente, la fase móvil para la separación consistió en un gradiente del solvente A (hexanos:isopropanol 30:40) y del solvente B (hexanos:isopropanol:AcONH₄ 20mM en agua 30:40:7). El gradiente comenzó en un 75% A hasta 5 minutos. Posteriormente se redujo a un 40% de A en 15 minutos, del 40% de A al 5% en 20 minutos y finalmente se redujo al 5% hasta 40 minutos. El flujo a través de la columna se fijó en 0,4 ml/min para entrar en un cuádruple espectrómetro de masas API2000 (Applied Biosystems). Las especies de fosfolípidos se analizaron a través de una ionización negativa en Q1. Posteriormente dichas especies se detectaron como iones [M-H]⁻ excepto en el caso de las especies de fosfatidilcolina y la esfingomielina que se detectaron como iones [M+OAc]⁻. Finalmente, para la cuantificación, se integraron los picos cromatográficos de cada especie y se compararon con el área de los estándares previamente citados.

3.10 Cuantificación de las fibras de matriz extracelular

La cuantificación de las fibras correspondientes a las diferentes proteínas de matriz se realizó a través de la programación de un procesamiento de imagen en Fiji (ImageJ 1,50e x64, <http://fiji.sc/>). Dicho procesamiento proporciona una medida aleatoria que integra tanto la densidad como la longitud de estructuras reconocidas como fibras (Nivel de "Fibrosidad", **figura MM3**). Para ello, en primer lugar, se realiza una reducción del ruido de la imagen. La información estructural de los eigenvalores de la matriz Hessiana es usada para aplicar un filtro Frangi vesselness para aumentar el número de estructuras tubulares prácticamente unidimensionales (escala del filtro: $\sigma=0.179 \mu$ m, cercana al tamaño del pixel). El resultado obtenido es una imagen en la que se encuentra incrementadas las fibras y donde cada pixel contiene un valor del nivel de "Fibrosidad". El valor a medir se computa como la media de los niveles de Fibrosidad en toda la imagen.

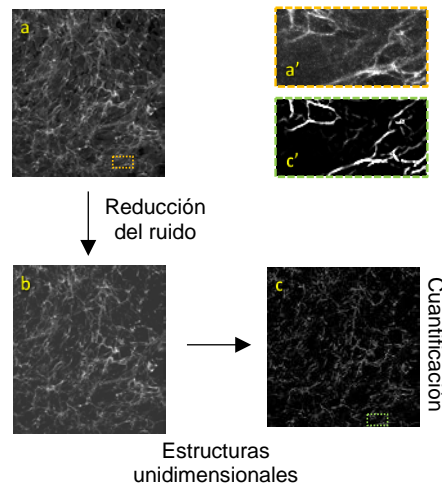


Figura MM3. Método de cuantificación de fibras de matriz extracelular. Se muestra el procesamiento de las imágenes necesario para el análisis de la “fibrosidad” de la matriz extracelular. “a” indica la imagen original obtenida, mientras que “c” representa la imagen final en la que se realiza la cuantificación.

3.11 Ensayos de migración celular

3.11.1 Ensayos de quimiotaxis en cámaras Transwell

Se utilizaron cámaras Transwell con membrana de policarbonato con tamaño de poro de 8 μm (Corning Costar Corp.). Las membranas fueron tapizadas con 5 $\mu\text{g/ml}$ de FN. Las células fueron privadas de suero durante las 24 horas previas al experimento. Después de tripsinizar las células, se resuspendieron y se añadieron a la parte superior del filtro de las cámaras. Los compartimentos inferiores fueron llenados con 500 μl de DMEM 10% FBS. Las cámaras fueron incubadas a 37°C durante 24 horas para permitir la migración celular en medio con o sin exosomas. Pasado ese tiempo, las membranas fueron lavadas con PBS, fijadas con metanol a -20°C durante 20 minutos y teñidas con cristal violeta durante 30 minutos a temperatura ambiente para marcar las células. Las células que habían migrado a la parte inferior de la membrana fueron contadas con la ayuda de un microscopio óptico.

3.11.2 Ensayos de cierre de herida *in vitro*

Las células MDA-MB-468 se crecieron hasta confluencia en placas con fondo de cristal y fueron privadas de suero 24 horas antes de llevarse a cabo el ensayo. Las incisiones se realizaron con una punta de pipeta de 1 mm de grosor aproximadamente. El cierre de herida se monitorizó por videomicroscopía, tomando imágenes en campo claro en intervalos de 45 minutos durante el tiempo indicado. El área migrada fue calculada restando el área entre los bordes de la incisión a los distintos tiempos del área inicial medida a tiempo 0.

3.12 Ensayos de formación de esferoides

Las células tumorales se despegaron de la placa mediante tripsinización y se resuspendieron en medio con suero libre de exosomas. Cada esferoide se generó a partir de una solución de 20µl conteniendo 5.000 células, metilcelulosa a una concentración final de 0,25% (preparada a partir de una solución de metilcelulosa al 1,2% en medio sin suero) y los exosomas deseados (generalmente 1×10^6 partículas por esferoide). En el caso de los controles, en lugar de exosomas se añadió PBS (**figura MM4**). La mezcla se depositó cuidadosamente en forma de gota sobre la parte interior de la tapa de una placa de cultivo p100. Una vez colocadas todas las gotas, la placa se llenó con 10ml de PBS y se colocó la tapa dejando por tanto que las gotas quedarán suspendias parcialmente. Tras 24 horas, y gracias a la gravedad, las células contenidas en la gota se agregaron en el fondo dando lugar a una estructura esférica denominada esferoide.

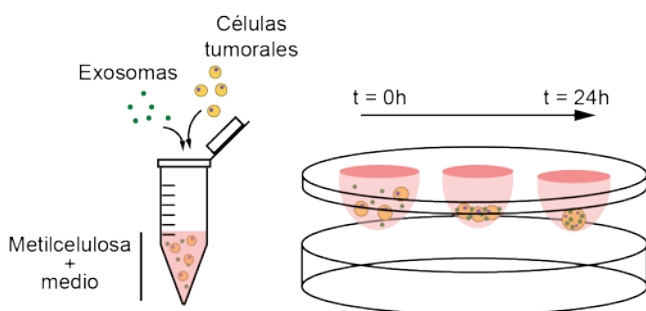


Figura MM4. Formación de esferoides. Se muestra el proceso por el cual se forman los esferoides de células tumorales mediante el método de "Hanging Drop" (Gota colgante) gracias al efecto de la gravedad.

3.12.1 Estudio de la motilidad de los esferoides

La capacidad migratoria de las células periféricas contenidas en los esferoides se estudió en condiciones tanto bidimensionales (2D) como tridimensionales (3D).

Para la migración 2D, los esferoides generados se depositaron en placas de cultivo p96 y se cubrieron con medio de cultivo. La motilidad celular se monitorizó mediante la captura de imágenes en contraste de fases cada 10 minutos durante un tiempo total de 72 horas.

En el caso del estudio de la invasión celular (ensayos tridimensionales) los esferoides generados se embebieron dentro de una matriz. Dos tipos de matrices fueron utilizadas para estos estudios. Por un lado, se generaron geles de colágeno I de 2 mg/ml de concentración siguiendo las instrucciones del fabricante (Corning, 354249). de manera que cada esferoide fue transferido a 25 µl de la solución de colágeno sobre placas IBIDI (15 µ-Slide Angiogenesis, IBIDI 81506). permitiendo su polimerización a 37°C durante 30 min. En el caso del matrigel (BD, 354230), los esferoides fueron

transferidos a 25 µl de matrigel diluido en medio libre de exosomas en proporción 1:1 permitiendo su polimerización a 37°C durante 30 min. Una vez obtenidos los esferoides en el interior de cada uno de ambos tipos de matriz, se evaluó el comportamiento del mismo durante 5 días mediante monitorización utilizando microscopía de contraste de fases o mediante microscopía confocal. En todos los casos, durante el periodo de estudio, se añadió medio de cultivo nuevo cada 48 h.

3.13 Generación de matrices derivadas de células

La matriz extracelular se obtuvo a partir de células en adhesión tras su cultivo durante un periodo de 8 días ⁷⁰. Para ello, previamente al sembrado de las células se llevó a cabo el recubrimiento de gelatina al 1% durante 1 hora a 37°C de la placa dónde se llevó a cabo la formación de la matriz. Posteriormente, se retiró la gelatina y tras lavar la placa con PBS se añadió glutaraldehído al 1% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, se lavó nuevamente la placa con PBS y se realizó la incubación con glicina 1M durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavó la placa con PBS y se realizó un último lavado de la misma con DMEM sin suplementar. Una vez generado preparado el soporte las células se sembraron sobre el mismo a la confluencia deseada permitiendo su crecimiento durante los siguientes 8 días. Cada 48 horas se llevó a cabo el cambio de medio añadiendo al mismo ácido ascórbico a una concentración final de 50 µg/ml. Transcurrido este periodo, las células se eliminaron mediante lisis alcalina en presencia de detergentes (tampón de lisis: NH₄OH a 20 mM y Triton X-100 al 0,5% en PBS). durante 5 minutos a 37°C. A continuación, se procedió a la comprobación microscópica de la eliminación completa de las células. Tras confirmar que todas las células han desaparecido, se lavó la placa con PBS quedando exclusivamente en la placa la matriz producida por las células que estuvieron sembradas previamente.

3.13.1 Incubación de exosomas con matrices derivadas de células

Una vez las matrices extracelulares se descelularizaron, se lavaron abundantemente con PBS y se extrajeron mediante raspado. A continuación, el equivalente a la matriz derivada de una placa p150 se incubó junto con los exosomas purificados previamente a 37°C durante 1h. Transcurrido este tiempo, se procedió a dos centrifugaciones seriadas a 110.000 g durante 70 minutos para eliminar aquellos elementos de la matriz extracelular que no se hubiesen unido a los exosomas. Las muestras obtenidas se lisaron el Laemmli y analizadas por electroforesis.

3.14 Ensayos de fraccionamiento en gradientes de sacarosa

3.14.1 Ensayos de fraccionamiento subcelular

Los diferentes compartimentos intracelulares se separaron mediante una centrifugación diferencial en gradiente de sacarosa. Para ello, las células se lavaron 3 veces con tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,5 y MgCl₂ 0,5 mM. A continuación, las células se separaron de la placa de cultivo mediante raspado resuspendiéndose en Tris-HCl 50 mM pH 7,5 y sacarosa 0,25 M. Las células se lisaron mediante fuerzas de cizalladura en un homogeneizador mediante la aplicación de 30 ciclos. El lisado se centrifugó a 3.000 g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se incorporó sobre un gradiente que abarca concentraciones de sacarosa desde 2 M hasta 0,5 M. Para la ultracentrifugación a 100.000 g durante 18 horas a 4°C se extrajeron fracciones de 1 ml que se precipitaron con acetona en una ratio 1:1 atrás su incubación a -20°C durante 4 horas y posterior centrifugación a 16.000 g a 4°C. Los sobrenadantes se retiraron y los precipitados se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Las muestras se resuspendieron en tampón Laemmli y se analizaron mediante Western Blot.

3.14.2 Extracción de dominios de membrana resistentes a detergente a partir de exosomas

Los exosomas procedentes de diferentes líneas celulares y/o tratamientos se lisaron en tampón MBS (MES Buffered Saline MES 25 mM pH 6,5, NaCl 0,15 M, PMSF 1mM y 1% de Triton X-100) y posteriormente se homogeneizaron mediante mecanismos de cizalla haciendo pasar la solución 10 veces a través de una jeringa de 25G (0,5x16 mm) en hielo. El lisado obtenido se llevó hasta una composición de 40% de sacarosa mediante la adición de sacarosa al 80% preparada en tampón MBS en una proporción 1:1 llevando la mezcla a volumen final de 4 ml. Posteriormente, se dispuso el gradiente mediante la adición de 4 ml de 30% sacarosa y finalmente otros 4 ml al 5% de sacarosa colocados en la parte superior. Tras la ultracentrifugación de las preparaciones a 200.000 g durante 18 horas a 4°C se procedió a la extracción del gradiente en fracciones de 1 ml y se precipitaron con acetona a -20°C durante 2 horas. A continuación, se centrifugaron y los precipitados obtenidos se resuspendieron en tampón Laemmli para el análisis de proteínas mediante Western Blot.

3.15 Análisis estadístico

La estadística de todos los datos fue estimada mediante la prueba *t de Student*, utilizando GraphPad para este análisis. Los resultados fueron considerados significativos con un valor $p \leq 0,05$. Valores $p < 0,05$ se marcaron con “*”, valores de $p < 0,01$ con “**” y valores de $p < 0,001$ con “***”.

04

RESULTADOS

4.1 Caveolina-1 en la vía hacia los exosomas

Caveolina-1 (Cav1), en el desarrollo de muchas de sus funciones, sufre un proceso de endocitosis a través de una compleja señalización intracelular^{166 233} que permite su entrada en el sistema endosomal. Desde allí, Cav1 puede ser directamente reciclada a la membrana plasmática (PM, *Plasma Membrane*) a través de endosomas de reciclaje o bien continuar en la ruta endolisosomal a través de su tráfico desde el endosoma temprano (EE, *Early Endosome*) al endosoma tardío (LE, *Late Endosome*), también conocido como cuerpo multivesicular (MVB, *MultiVesicular Body*) por su contenido intraluminal, siendo su destino final el lisosoma. Sin embargo, en los últimos años, se ha observado que, de forma alternativa a su fusión lisosomal con fines degradativos, existen MVBs capaces de fusionarse directamente con la membrana plasmática permitiendo la liberación de su contenido al medio extracelular. Entender los mecanismos implicados en el tráfico de Cav1 a través de esta nueva ruta de señalización que conecta MVB-PM y su implicación funcional ha sido uno de los principales objetivos de este trabajo.

4.1.1 Localización de Cav1 en la ruta del endolisosoma

En primer lugar, se procedió a confirmar la presencia de Cav1 en condiciones basales dentro de la ruta endosomal. Para la incorporación en dicha ruta, Cav1 debe ser translocada en primer lugar a los EEs. Con el fin de caracterizar este proceso, se comprobó mediante microscopía confocal, la distribución de Cav1 endógena en células COS7 que habían sido transfectadas con una construcción capaz de expresar una forma constitutivamente activa de Rab5 fusionada a la proteína verde fluorescente GFP (Rab5Q79L-GFP)²³⁴ (**Figura R1**). Rab5 es una de las principales proteínas marcadoras de los endosomas tempranos y como todas las GTPasas es capaz de ciclar entre una forma inactiva unida a GDP y una forma activa fusionada a GTP²³⁵ cuya función es la fusión de endosomas tempranos. La mutación del residuo de glutamina 79 por uno de leucina reduce la capacidad GTPasa de Rab5, dando lugar a una forma constitutivamente activa. Esta construcción, por tanto, genera endosomas de mayor tamaño de gran utilidad para realizar estudios de inmunofluorescencia que permitan estudiar la localización de Cav1 dentro del propio endosoma (ver esquema correspondiente a la **figura R1a**). Además, en la maduración de los endosomas tempranos hacia el endosoma tardío se ha observado la formación de vesículas intraluminales (ILV, *IntraLuminal Vesicle*). La tinción de los marcadores CD63, TSG101 o LBPA (*Lyso-Bis-Phosphatidic Acid*), propios de MVBs e ILVs, confirman que la formación de estas vesículas comienza en endosomas positivos para Rab5 (**Figura R1b**). Gracias a este abordaje, se pudo confirmar que Cav1 se encuentra situada

preferencialmente en el interior de los EE, mostrando una menor colocación con la zona de la membrana de estos endosomas (**Figura R1c**), sugiriendo la presencia de Cav1 a nivel de las ILVs de dichos endosomas. Finalmente, y mediante el empleo de microscopía de alta resolución se pudo demostrar la presencia de Cav1 en el interior de los MVBs mediante marcaje con CD63 (**Figura R1d**), observándose una distribución tanto a nivel de la membrana externa como en las ILVs presentes en los endosomas tardíos.

Estos resultados nos permiten confirmar la capacidad de Cav1 de localizarse en condiciones basales dentro de la ruta endosomal, siendo específicamente incorporada en los MVBs.

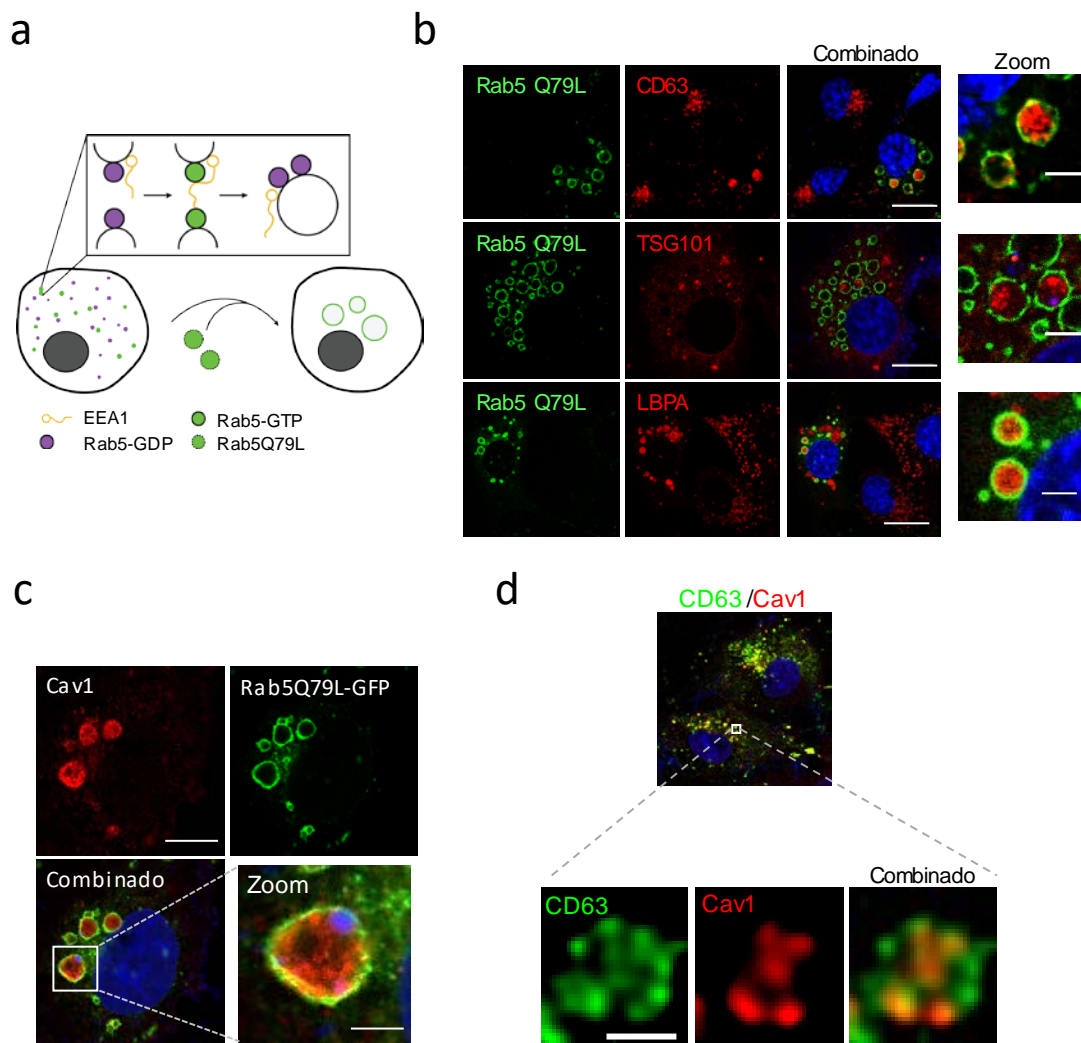


Figura R1. Cav1 se encuentra localizada en el sistema del endosoma en condiciones basales. (a) Esquema explicativo del mecanismo de fusión de endosomas mediado por Rab5. Rab5 es una guanosina trifosfatasa (GTPasa) que cuando está unida a GTP (forma activa) promueve la unión de los endosomas a través de un mecanismo dependiente de EEA1. Tras la fusión endosomal, Rab5 hidroliza GTP para volver de nuevo a su forma inactiva unida a GDP.

El mutante Rab5Q79L posee un cambio del residuo de Glutamina (Glu) en posición 79 por un residuo de Leucina (Leu) lo que provoca una reducción de su actividad GTPasa y por tanto permite que la proteína se mantenga en un estado activado de forma estable. Por lo tanto, la inducción de la expresión Rab5Q79L a nivel celular promueve la fusión de los endosomas tempranos induciendo la formación de endosomas de mayor tamaño que presentan vesículas intraluminales (ILVs) en su interior, de gran utilidad para realizar estudios de localización subcelular a nivel de estos compartimentos. **(b)** Microscopía confocal de células COS7 transfectadas con Rab5Q79L-GFP (verde) y teñidas para marcadores de vesículas intraluminales y cuerpos multivesiculares (ILVs/MVBs) CD63, TSG101 y LBPA (rojo) (barra de escala, 15 μ m). Las imágenes ampliadas muestran la acumulación de los marcadores CD63, TSG101 Y LBPA en la zona intraluminal de los endosomas (barra de escala, 5 μ m). **(c)** Distribución de Cav1 en células COS7 que expresan Rab5Q79L (barra de escala, 10 μ m). Imagen ampliada de un endosoma mostrando la presencia de Cav1 en ILVs (barra de escala, 2,5 μ m). **(d)** Colocalización entre Cav1 (rojo) y el marcador de MVBs, CD63 (verde). El panel inferior muestra una microscopía de alta resolución de un MVB (barra de escala, 1 μ m). Las células se tiñeron con Hoechst en todos los casos para visualizar los núcleos.

4.1.1.1 La fosforilación de Cav1 como mecanismo de entrada en la ruta endosomal

Cav1 es una proteína capaz de ser fosforilada específicamente en su residuo de tirosina en posición 14 (Y14) en respuesta a diversos estímulos, tales como el anclaje de integrinas, la estimulación por factores de crecimiento, y mediante estrés celular, lo que promueve su internalización ^{166 182}. Con el fin de poder estudiar la importancia de la fosforilación de Cav1, como primer paso para su internalización en la vía endolisosomal decidimos emplear tres abordajes diferentes. En primer lugar, se trataron fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs, Murine Embryonic Fibroblast) con ortovanadato sódico (NaV), un inhibidor específico de proteínas tirosina fosfatasas. Mediante análisis por Western Blot se confirmó que dicho tratamiento producía un incremento significativo de la fosforilación de Cav1 correlacionándose con una mayor presencia de esta proteína en los compartimentos intracelulares correspondientes a los MVBs, tal y como se aprecia de los estudios de colocalización mediante inmunofluorescencia con el marcador LBPA (**Figura R2a**). Por otro lado, se ha descrito que la fosforilación de Cav1 está implicada en la internalización de Cav1/caveolas mediadas por integrinas ^{184 236}, por tanto, como segundo abordaje se procedió a inducir la pérdida de la adhesión celular mediante la quelación de iones de Ca²⁺, componentes clave de las uniones celulares al sustrato, utilizando para ello EDTA. Como se observa en la **Figura R2b**, en presencia de concentraciones crecientes de EDTA se produjo un incremento de la fosforilación de Cav1 que resultó en un incremento de su endocitosis dentro de la ruta endosomal hacia los MVBs. En último lugar, se ha visto que PTRF/Cavina-1 es una proteína necesaria junto con Cav1 para la formación de caveolas y su ausencia provoca el desensamblaje de estas estructuras de membrana favoreciendo la endocitosis de Cav1 ¹⁷⁰. Por tanto, como tercer abordaje se procedió al silenciamiento de PTRF/Cavina-1 en MEFs usando

un RNA de interferencia (ARNi) para este gen. Mediante análisis por Western Blot se pudo observar una reducción de los niveles de expresión de PTRF asociada a un incremento en los niveles de fosforilación de Cav1 resultando nuevamente en un incremento en la internalización de Cav1 hacia los MVBs (**Figura R2c**).

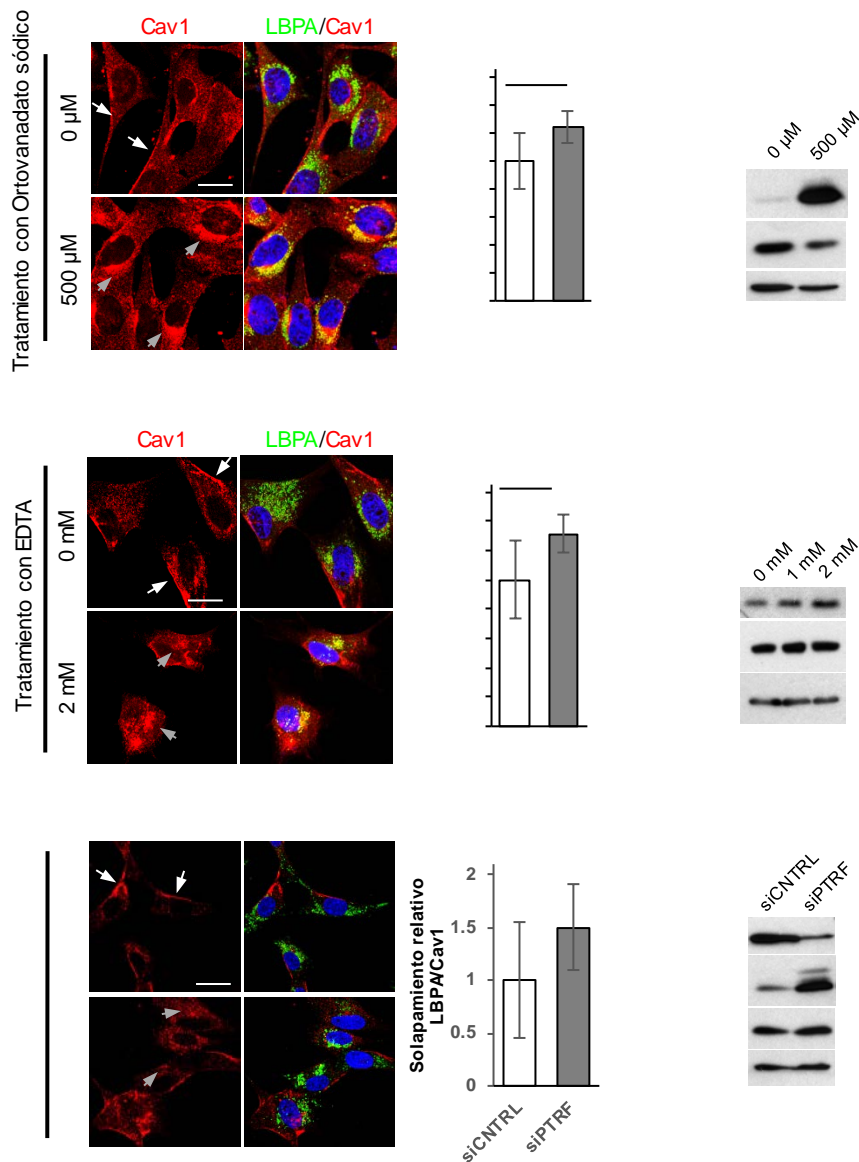


Figura R2. Cav1 es relocalizada a los endosomas tras la inducción de su fosforilación. En las imágenes de microscopía confocal se muestra la localización en MVBs (marcados con LBPA, verde) de Cav1 (rojo) en condiciones que promueven la fosforilación e internalización de Cav1 (barra de escala, 25 μ m). Los núcleos se marcaron con Hoechst (azul). Las flechas blancas indican la presencia de Cav1 en la membrana plasmática mientras que las grises muestran su relocalización a los compartimentos intracelulares a nivel citoplasmático presentes en áreas próximas al núcleo. A la derecha, se muestra en cada caso un Western Blot representativo tanto de los niveles de Cav1 total como de su estado fosforilación en el residuo de tirosina en posición 14 mediante un anticuerpo específico. Tubulina se utilizó como control de carga. **(a)** Tratamiento con 500 μ M de ortovanadato durante 2h. La gráfica muestra el solapamiento relativo entre Cav1 y LBPA (las barras de error indican los valores medios \pm desviación estándar; n = 80 células; **

$p < 0,01$). **(b)** Tratamiento con 2 mM de EDTA durante 12 minutos. La gráfica muestra el porcentaje de solapamiento entre Cav1 y LBPA (las barras de error indican los valores medios \pm desviación estándar; $n = 80$ células; ** $p < 0,01$). **(c)** Silenciamiento de la expresión de PTRF mediante la transfección de un ARNi específico. La gráfica muestra el porcentaje de solapamiento entre Cav1 y LBPA (las barras de error indican los valores medios \pm desviación estándar).

Finalmente, se llevó a cabo la reconstitución de fibroblastos derivados de ratones knock-out para Cav1 (Cav1KO) con la forma silvestre de Cav1 (Cav1 *wild type*, WT) o con el mutante correspondiente a la tirosina en posición 14 en el que se sustituyó dicho residuo por una fenilalalina (Cav1Y14F). Este mutante es incapaz de fosforilarse tal y como se confirmó mediante análisis por Western Blot tras la estimulación con ortovanadato sódico (**Figura R3a**). Se pudo observar que, además, la Cav1Y14F muestra una distribución subcelular totalmente polarizada y restringida prácticamente en su totalidad a la membrana plasmática con una reducida o casi nula capacidad de acumularse en vesículas intracelulares (**Figura R3b**).

Estos resultados confirman la importancia de la fosforilación de Cav1 en su entrada dentro de la ruta endocítica y su posterior incorporación en los MVBs.

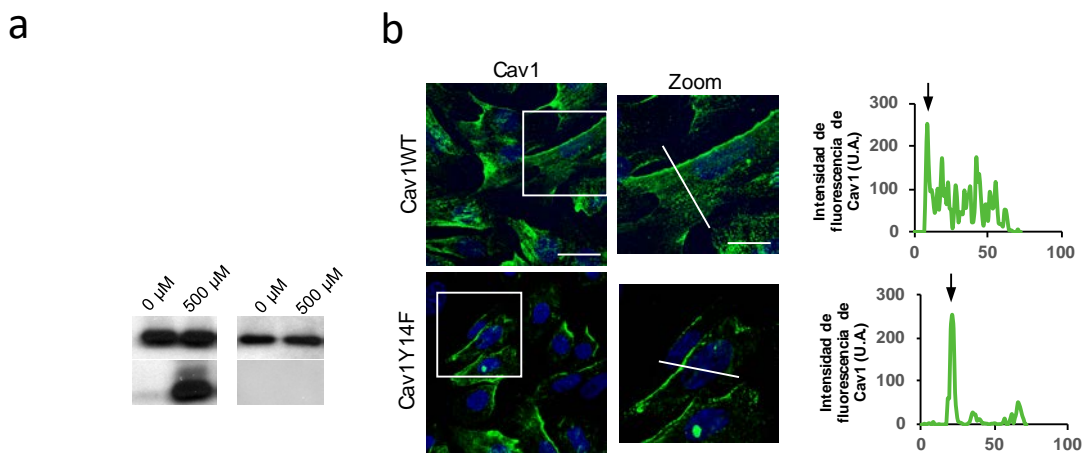


Figura R3. La ausencia de fosforilación de Cav1 en su residuo Y14 reduce su internalización. **(a)** MEFs Cav1WT y MEFs Cav1KO reconstituidos mediante infección lentiviral con el vector de expresión tanto de la forma silvestre de Cav1 como del mutante incapaz de fosforilarse (Cav1Y14F) fueron cultivados en ausencia o presencia de ortovanadato (500 μ M). Posteriormente se analizó mediante Western Blot la expresión tanto de Cav1 total como de Cav1 fosforilada específicamente en este residuo. **(b)** Análisis mediante microscopía confocal de la distribución subcelular de la forma silvestre de Cav1 (Cav1WT) y del mutante Cav1Y14F (en verde) (barra de escala, 25 μ m). En las imágenes magnificadas se muestra la marcada acumulación en membrana del mutante Cav1Y14F en comparación con la distribución correspondiente a Cav1WT (barra de escala, 15 μ m). Los gráficos muestran los perfiles de intensidad de fluorescencia de Cav1 (en unidades arbitrarias) a lo largo de toda célula (delimitada por la línea blanca).

4.1.1.2 Papel de la ubiquitinación de Cav1 en su entrada en de las ILVs

Diferentes estudios han descrito la importancia de la ubiquitinación/deubiquitinación en el tráfico específico de proteínas en las vesículas intraluminales presentes en los MVBs como paso fundamental para ser específicamente seleccionadas para su entrada en los exosomas ⁹² (**Figura I4**). Dado que se ha descrito que Cav1 es capaz de ubiquitinarse específicamente en varios residuos de lisina presentes en su extremo amino terminal ¹⁸⁸ (**Figura R4** esquema) decidimos evaluar cómo afectaba esta ubiquitinación en su capacidad para translocarse dentro de los MVBs. Para ello, se utilizaron varios mutantes de Cav1 en los que diferentes residuos de lisina presentes tanto en el extremo amino terminal como en su extremo carboxilo fueron reemplazados por argininas (**Figura R4a**). Mediante cotransfección de células COS7 con cada uno de estos mutantes junto con la versión constitutivamente activa de Rab5 se estudió su colocalización por inmunofluorescencia (**Figura R4c**). Nuestros resultados mostraron cómo todos ellos tenían la capacidad de asociarse a los endosomas tempranos, indicando que en ninguno de estos mutantes de ubiquitinación la internalización estaba afectada. De hecho, tal y como se muestra, todos ellos tienen la capacidad de ser fosforilados correctamente (**Figura R4b**). Sin embargo, su distribución dentro del endosoma temprano mostraba un patrón diferencial en función de su capacidad de ubiquitinación (**Figura R4c**). La versión silvestre de Cav1 o el mutante cuyas lisinas amino-terminales se encuentra intactas (mutante K65-176R), pudiendo ambos ser ubiquitinados correctamente, se distribuían tanto en la membrana del endosoma como en las ILVs presentes en su interior. Sin embargo, aquellos mutantes carentes de estas lisinas del extremo amino (Cav1 K5-57R y Cav1 K5-176R) mostraban una localización restringida específicamente a la membrana endosomal (**Figura R4d**). Para comprobar el impacto de estas alteraciones en la distribución, se procedió a estudiar la colocalización de estos mutantes con el marcador de MVBs, CD63, observándose una correlación entre la capacidad de cada mutante de encontrarse en las ILVs y su colocalización con los cuerpos multivesiculares (**Figura R5**).

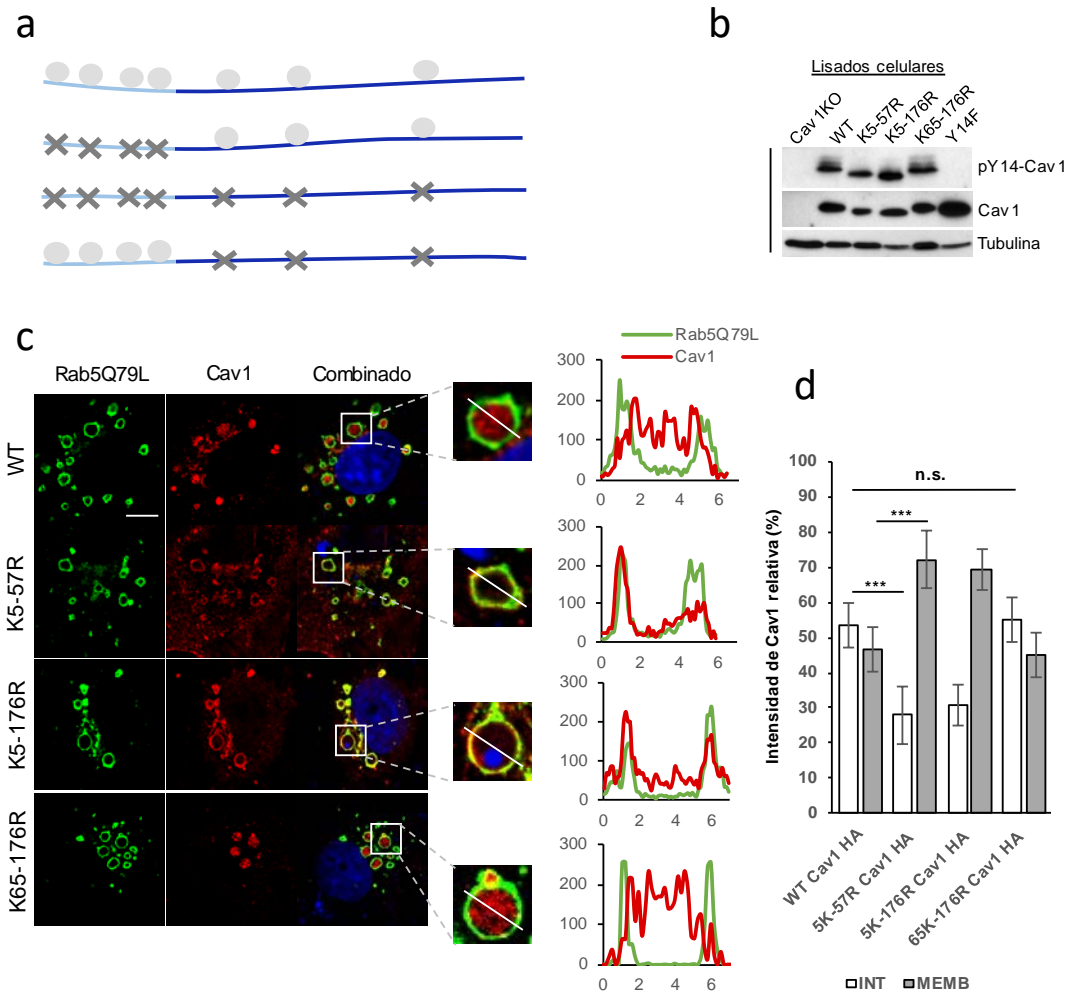


Figura R4. La incorporación de Cav1 en el interior del endosoma temprano está mediada por su ubiquitinación en el extremo amino-terminal. (a) Esquema explicativo de los diferentes residuos de lisina (K) susceptibles de ubiquitinación en la secuencia correspondiente a Cav1WT, así como de los mutantes de Cav1 en la que estos residuos de lisina se han sustituido por arginina (R). En todos los casos, tanto la forma silvestre de Cav1 como los diferentes mutantes de ubiquitinación, se encuentran fusionados a un péptido derivado de la hemaglutina (HA). La capacidad de ubiquitinación se encuentra abolida en el caso de los mutantes que carecen de las lisinas de la región amino-terminal (K5-57R) o de todas las lisinas (K5-176R), pero no en el caso de las lisinas 65-176 (K65-176R) tal y como se describe en Hayer, A. et al., 2010. (b) Análisis por Western Blot de la capacidad de fosforilación de los mutantes de ubiquitinación de Cav1 inducida tras el tratamiento con ortovanadato. Como control negativo de fosforilación se incluye el mutante no fosforilable de Cav1 (Cav1 Y14F). (c) Microscopía confocal de células COS7 transfectadas con Rab5Q79L (verde) y los mutantes de ubiquitinación de Cav1 (rojo) (barra de escala, 10 μ m). Las imágenes magnificadas muestran la distribución de los mutantes de Cav1 en endosomas representativos (barra de escala, 2,5 μ m) junto con los perfiles correspondientes a la intensidad de fluorescencia (en unidades arbitrarias) de Cav1 a lo largo de la línea blanca indicada. (d) El gráfico de barras muestra el porcentaje tanto de Cav1WT como de los diferentes mutantes de Cav1 presente en el lumen de los endosomas (interior, INT: blanco) y en la membrana endosomal (membrana, MEMB: gris) expresado respecto a la intensidad total.

Estos datos refuerzan la idea de un mecanismo de dos etapas en la entrada de Cav1 dentro de los MVBs. En primer lugar, la fosforilación constituye un elemento esencial para su internalización desde la membrana plasmática hasta la membrana

externa de los endosomas. Posteriormente, la ubiquitinación actuaría como un elemento de control en la entrada específica de Cav1 dentro de las ILVs del MVB.

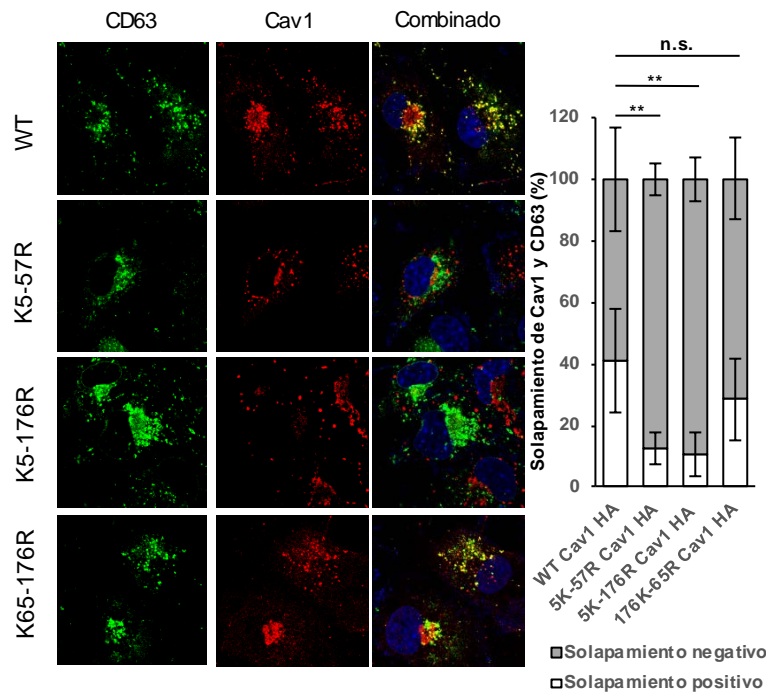


Figura R5. La progresión de Cav1 hacia el endosoma tardío es dependiente de la ubiquitinación amino-terminal. Análisis de la colocalización mediante microscopía confocal de los mutantes de Cav1 correspondientes a los diferentes residuos de lisina (rojo) con el marcador de MVBs, CD63 (verde) (barra de escala, 25 μ m). El gráfico de barras muestra el porcentaje de solapamiento entre ambos marcadores (las barras de error indican valores medios \pm desviación estándar, n = 3, ** p < 0,01).

4.1.2 Presencia de Cav1 en los exosomas

Los exosomas son nanovesículas de doble membrana lipídica que se forman por invaginación interna de la membrana externa de los endosomas tardíos y se acumulan como vesículas intraluminales dentro de los endosomas. La fusión de la membrana de los MVBs con la membrana plasmática da lugar a la secreción de los exosomas al medio extracelular, pudiendo actuar como mensajeros entre células⁸⁷. La presencia de Cav1 en las ILVs podría indicar que también se puede encontrar en dichos exosomas. Con el fin de arrojar luz sobre este aspecto, se llevó a cabo el estudio de los exosomas producidos por diferentes líneas celulares (incluyendo tanto fibroblastos como células tumorales). Para ello, se cultivaron las células durante varios días en un medio libre de exosomas (ver materiales y métodos). A continuación, se recogió el medio de cultivo y se procedió a la purificación de los exosomas mediante centrifugaciones seriadas. Posteriormente, y para su mejor caracterización se

separaron mediante gradientes de sacarosa dada la capacidad de los exosomas de flotar selectivamente a una densidad comprendida entre 1,1 y 1,2 g/ml de sacarosa ²³². Finalmente, las fracciones obtenidas se analizaron por Western Blot. En todos los tipos celulares, se observó que Cav1 cofraccionaba junto con el marcador de exosomas TSG101, confirmando la presencia específica de Cav1 en exosomas (**Figura R6**).

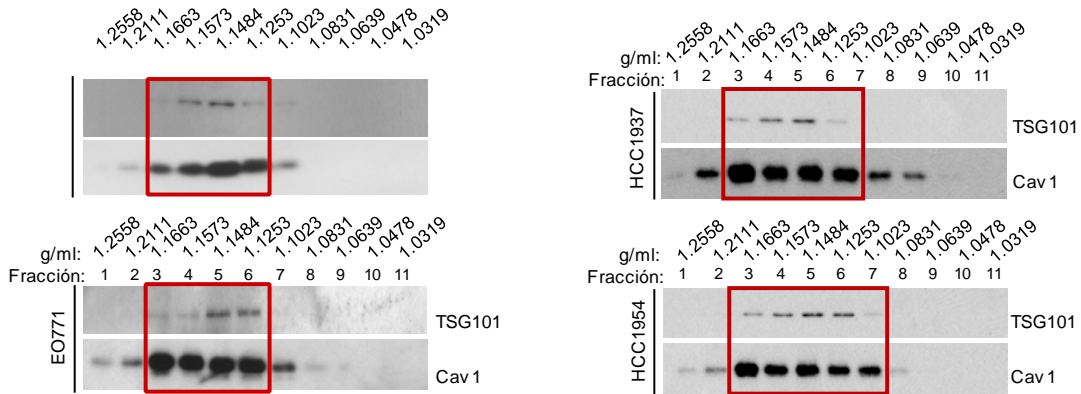


Figura R6. Cav1 se encuentra presente en los exosomas. Determinación de la presencia de Cav1 en exosomas derivados de diferentes líneas celulares. Western Blots representativos de la flotación de exosomas producidos tanto por fibroblastos como por diferentes líneas tumorales en gradientes de sacarosa (0,25 – 2M). Tras la centrifugación se extrajeron fracciones de 1 ml y se procedió a la precipitación de las proteínas presentes en cada una de ellas. Posteriormente, las fracciones precipitadas se cargaron en geles de electroforesis para el análisis de los niveles de Cav1 y del marcador de exosomas TSG101.

Aunque la entrada de Cav1 en los MVBs puede tener diferentes orígenes, nuestros datos previos muestran que procesos que promueven la internalización de Cav1 favorecen su presencia en los MVBs. Para confirmar si esto se traduce en una mayor presencia de Cav1 en exosomas se utilizaron fibroblastos deficientes en PTRF/Cavina1 (PTRFKO) y como control se empleó la misma línea celular reconstituida con un vector lentiviral que expresa la proteína PTRF (PTRFKO +PTRF). Los exosomas producidos por ambas líneas se purificaron y se analizaron mediante Western Blot. Se pudo observar un incremento de los niveles de Cav1 en los exosomas producidos por las células PTRFKO a pesar de que los niveles totales de Cav1 en los lisados eran menores que en las células reconstituidas (**Figura R7a**). Por el contrario, en las células en las que la internalización de Cav1 se encuentra bloqueada (Cav1KO reconstituidas con el mutante Cav1Y14F) (**Figura R7b**) o tienen un defecto en su tráfico a las vesículas intraluminales (**Figura R8**) (mutantes de CAV1 que no pueden ubiquitinarse en su extremo amino-terminal) se observó una reducción de la presencia de Cav1 en exosomas.

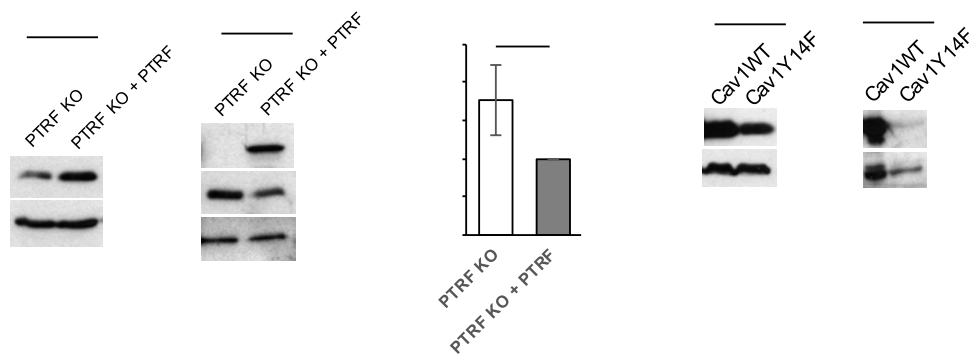


Figura R7. La endocitosis de Cav1 favorece su presencia en exosomas. (a) Análisis por Western Blot de los niveles de Cav1 presentes en lisados celulares y en exosomas derivados de fibroblastos deficientes para PTRF/Cavina-1 (PTRF KO) y fibroblastos reconstituidos con la expresión de PTRF exógeno (PTRF KO + PTRF). Tubulina y TSG101 se utilizaron como controles de carga de los lisados o de los exosomas respectivamente. El gráfico muestra la cantidad de Cav1 presente en exosomas (las barras de error muestran valores medios \pm desviación estándar, $n = 3$, * $p < 0,05$). **(b)** Análisis mediante Western Blot de la expresión de Cav1 en exosomas derivados de fibroblastos Cav1WT y fibroblastos que expresan el mutante no fosforilable de Cav1 (Cav1Y14F).

Todos estos datos sugieren, por tanto, una clara conexión entre los niveles de Cav1 endocitada y su posterior presencia en exosomas mostrando que en todas las líneas celulares que expresan Cav1, una fracción de esta proteína es incorporada a los exosomas.

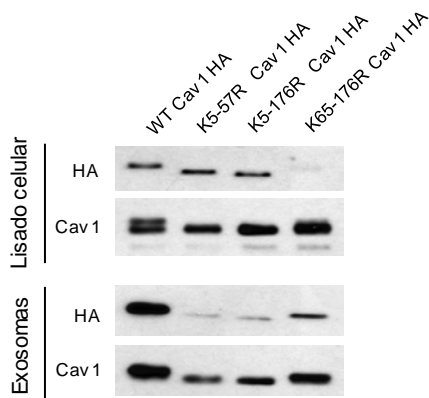


Figura R8. La ubiquitación en el extremo amino-terminal es determinante para la entrada de Cav1 en exosomas. Análisis por Western Blot de los niveles de Cav1 presentes en lisados celulares y en exosomas derivados de células COS7 transfectadas con las construcciones correspondientes a los diferentes mutantes de ubiquitinación de Cav1 fusionados a HA. La detección se realizó empleando anticuerpos específicos frente a Cav1 y frente al tag HA.

Finalmente, una vez los exosomas se encuentran en el medio extracelular pueden actuar como mensajeros entre células distantes. Una de las vías por las cuales los exosomas actúan como medio de comunicación es mediante la transferencia directa de las proteínas y ácidos nucleicos que contienen a la célula aceptora ⁹². Para comprobar la funcionalidad de los exosomas en la transferencia de Cav1 se realizó un ensayo en que se trataron MEFs Cav1KO con exosomas derivados de MEFs Cav1WT.

Una vez realizado el tratamiento durante 24, 48 y 72h se pudo observar mediante Western Blot que los MEFs Cav1KO tratados poseían ciertos niveles de Cav1, indicando la capacidad de los exosomas de transmitir Cav1 a células incapaces de expresarla (**Figura R9**).

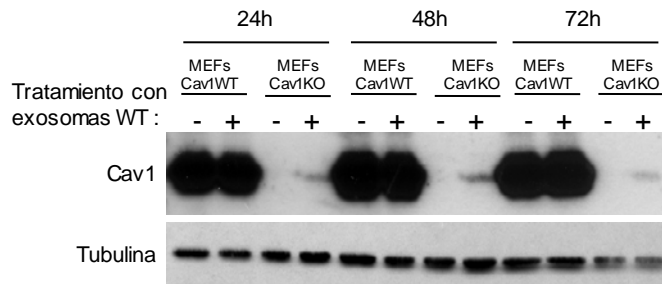


Figura R9. Cav1 es transferida a la célula receptora a través de exosomas. MEFs Cav1WT y Cav1KO fueron cultivados durante 24, 48 y 72h en presencia de exosomas purificados a partir de MEFs Cav1WT. Los lisados celulares correspondientes a las diferentes condiciones fueron analizados mediante Western Blot utilizando un anticuerpo específico para Cav1 permitiéndonos detectar los niveles de Cav1 transferidos a los MEFs a través de los exosomas. Tubulina se utilizó como control de carga.

4.2 La biogénesis de exosomas está regulada por Cav1

La formación de exosomas es un proceso altamente regulado. Entre los mecanismos implicados se encuentran sistemas dependientes de proteínas estructurales como CD63, Alix o la maquinaria ESCRT (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*)^{107 109 113}. Pero también se ha descrito un papel fundamental de la composición lipídica de los MVBs en la formación de exosomas^{117 121}. Cav1 es una proteína capaz de unir colesterol, condicionando la arquitectura de las membranas celulares¹⁹³. Por ello, en este trabajo, se decidió estudiar la posibilidad de que Cav1 además de estar presente en los exosomas pudiera estar jugando un papel activo en la biogénesis de estas nanovesículas.

4.2.1 Implicación de Cav1 en la formación y tamaño de los exosomas

En primer lugar, se realizó la caracterización de los exosomas producidos por los fibroblastos MEFs Cav1WT y Cav1KO. Tras su purificación mediante centrifugación secuencial, se vio que ambos tipos celulares presentan capacidad de secretar exosomas (**Figura R10a**), sin embargo, esta capacidad se encontraba aumentada en las células carentes de Cav1 en comparación con los controles (MEFs Cav1WT) tal y como se determinó mediante el análisis por seguimiento de nanopartículas (NTA, *Nanoparticle Tracking Analysis*) (**Figura R10b**). Para caracterizar mejor la población de exosomas producidos por los dos tipos celulares se llevó a cabo el estudio por Western Blot de la producción total de exosomas derivados del mismo número de células,

confirmándose nuevamente que la ausencia de Cav1 conllevaba un aumento en la secreción de exosomas (**Figura R10c**).

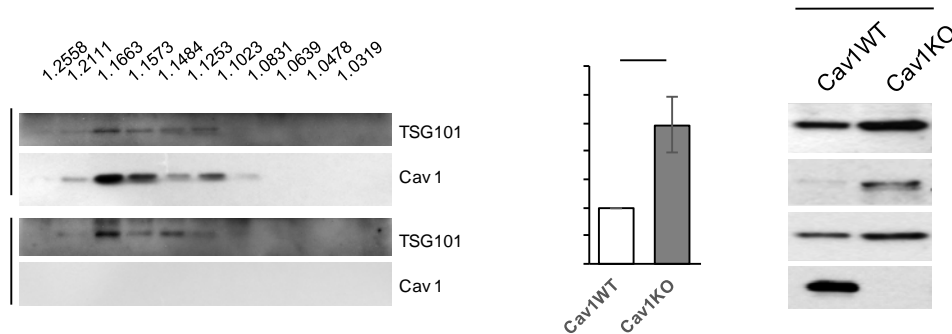


Figura R10. La producción de exosomas se encuentra aumentada en ausencia de Cav1. (a) Western Blots representativos de la flotación de exosomas de MEFs Cav1WT y Cav1KO en gradientes de sacarosa. Se muestran los niveles de Cav1 y TSG101(marcador de exosomas). (b) Cuantificación de la producción de exosomas relativa al mismo número de células productoras determinado mediante la tecnología NTA (las barras de error muestran valores medios \pm desviación estándar, $n = 3$, * $p < 0,05$). (c) Análisis por Western Blot de los exosomas producidos por el mismo número de MEFs Cav1WT y Cav1KO. TSG101, Alix y flotilina-1 se usaron como marcadores de exosomas.

Además de cuantificar el número de partículas, el sistema NTA permite a su vez obtener una distribución por tamaño de las vesículas analizadas. De esta manera se pudo observar que los exosomas producidos por los MEFs Cav1WT mostraban una distribución de tamaño heterogénea, pudiendo dividirse en dos poblaciones normales, una de menor tamaño (con un tamaño medio de $201,07 \pm 8,11$ nm) y otra de un tamaño ligeramente mayor ($308,71 \pm 11,53$ nm) (**Figura R11a**). Por el contrario, en ausencia de Cav1 esta segunda población de mayor tamaño desaparecía quedando la secreción de exosomas restringida a una única población homogénea (con un tamaño medio de $196,75 \pm 8,22$ nm). Estos datos se confirmaron mediante microscopía electrónica (**Figura R11b**), pudiéndose apreciar que los MEFs Cav1WT producían exosomas con una distribución de tamaño más heterogénea que los MEFs Cav1KO. Finalmente, esta alteración también se vio reflejada en el patrón tinción de LBPA diferencial de las vesículas intraluminales presentes en MEFs Cav1WT y Cav1KO transfectadas con la construcción Rab5Q79L-GFP (**Figura R11c**). Todos estos datos sugieren, por tanto, un papel de Cav1 en la regulación de la biogénesis de exosomas.

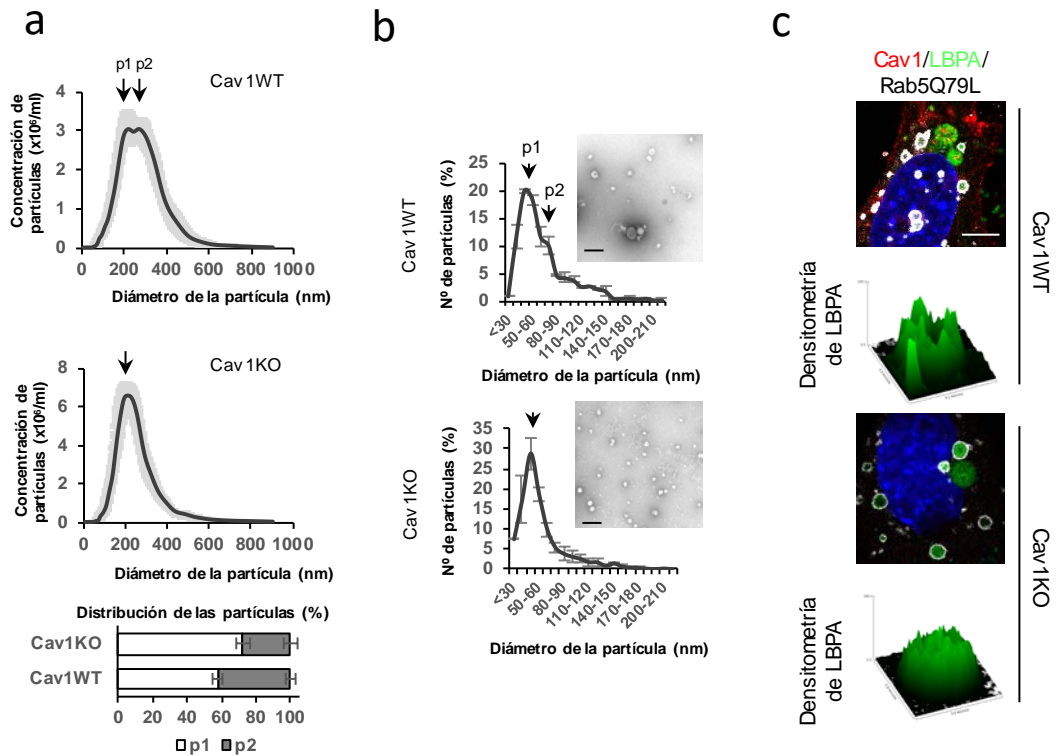


Figura R11. Cav1 modula el tamaño de los exosomas producidos. (a) Perfiles de distribución por tamaño de los exosomas producidos por MEFs Cav1WT y Cav1KO mediante la tecnología NTA. Las flechas negras señalan las poblaciones mayoritarias, encontrándose dos poblaciones claramente diferenciadas en exosomas Cav1WT (p1 y p2) y una en el caso de los exosomas Cav1KO (p1). El gráfico de barras muestra la cuantificación de la proporción de los exosomas encontrados en cada una de las dos poblaciones normales identificadas (las barras de error muestran valores medios \pm Error estándar de la media, SEM; $n = 10$, $** p < 0,01$). (b) Imagen representativa de microscopía electrónica de transmisión de exosomas producidos por MEFs Cav1WT y Cav1KO (barra de escala, 200 nm). Los gráficos muestran la distribución del tamaño de las partículas encontradas en las muestras, mostrando el tamaño medio de las dos poblaciones normales identificadas (las barras de error muestran valores medio \pm desviación estándar, $n = 3$). (c) Microscopía confocal de MEFs Cav1WT y Cav1KO transfectados con el mutante constitutivamente activo de Rab5 (Rab5Q79L, gris) y teñidos para Cav1 (rojo) y LBPA como marcador de ILVs/MVBs (verde). La densitometría muestra un cambio en el patrón del marcaje de LBPA localizado en el interior de los endosomas engrosados, siendo éste más homogéneo en el caso de los MEFs Cav1KO (barra de escala, 10 μ m).

4.2.2 Papel de Cav1 en la formación de exosomas a través de su capacidad de modular el colesterol en los MVBs

Los endosomas juegan un papel importante en la redistribución del colesterol procedente de la endocitosis al resto de los orgánulos celulares^{96,237}. Cambios en los niveles de colesterol no sólo afectan a la integridad de la célula en su conjunto, sino también a la estructura propia del endosoma, alterando su distribución en el interior celular, así como el tamaño y la cantidad de ILVs²³⁸⁻²³⁹. Por ello, se estudió si Cav1, gracias a su capacidad de asociarse a lípidos específicos, particularmente colesterol,

era capaz de promover la heterogeneidad observada en los exosomas producidos por los fibroblastos Cav1WT mediante la modulación de los niveles de colesterol y su organización en los MVBs.

En primer lugar, se confirmó la presencia de colesterol en el sistema del endosoma en MEFs transfectadas con la construcción Rab5Q79L-GFP y mediante posterior tinción con LBPA (como marcador de MVBs e ILVs) y filipina III, una sonda fluorescente que se une específicamente al colesterol libre de la célula (**Figura R12**). Los resultados mostraron un claro marcaje de filipina III tanto en la membrana endosomal como en las ILVs, confirmando una presencia importante de este lípido a nivel de los MVBs. Con el fin de evaluar el impacto que la ausencia de Cav1 provocaba en este compartimento, se marcaron las células Cav1WT y Cav1KO con LBPA y filipina III y se analizaron los MVBs de cada tipo celular mediante inmunofluorescencia. Como se observa en la **figura R13a**, aunque el número de estructuras positivas para LBPA (es decir el número de MVBs) no mostraba diferencias entre ambas líneas celular, por el contrario, si se pudo determinar que tanto el área de los MVBs como su contenido medio y total de colesterol estaban significativamente incrementados en las células Cav1KO. Este fenotipo, además se recapituló tanto por silenciamiento de Cav1 en las células Cav1WT mediante el uso de un ARN de interferencia (ARNi) y de un ARN de interferencia generado a partir del corte de un ARN de doble hebra por una endoribonucleasa (ARNesi, *Endoribonuclease-prepared siRNA*) (**Figura R13b**), como por tratamiento de estas células con U18666A, una droga que promueve específicamente la acumulación de colesterol en los endosomas tardíos/MVBs ^{240 241} (**Figura R13a**). En ambos casos, se pudo observar un aumento significativo de la presencia de colesterol a nivel endosomal mimetizando el fenotipo de las células Cav1KO.

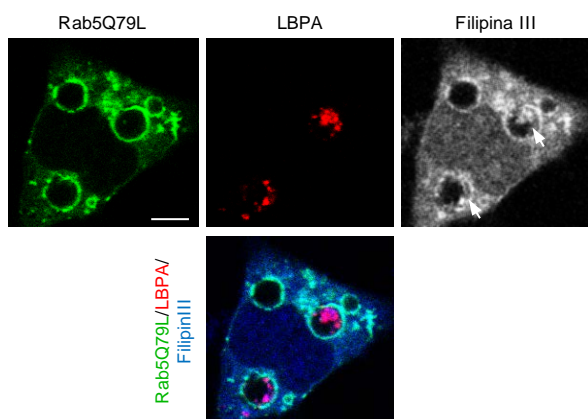


Figura R12. Los endosomas contienen elevados niveles de colesterol libre. Determinación de la distribución del colesterol libre en MEFsCav1WT transfectados con Rab5Q79L (verde) mediante microscopía confocal. Para la detección de colesterol libre se utilizó la sonda fluorescente Filipina III (gris y azul) y como marcador de ILVs/MVBs, LBPA (rojo). La tinción de Filipina III muestra la presencia de colesterol tanto a nivel de la membrana endosomal como en las ILVs (flechas blancas) (barra de escala, 10 µm).

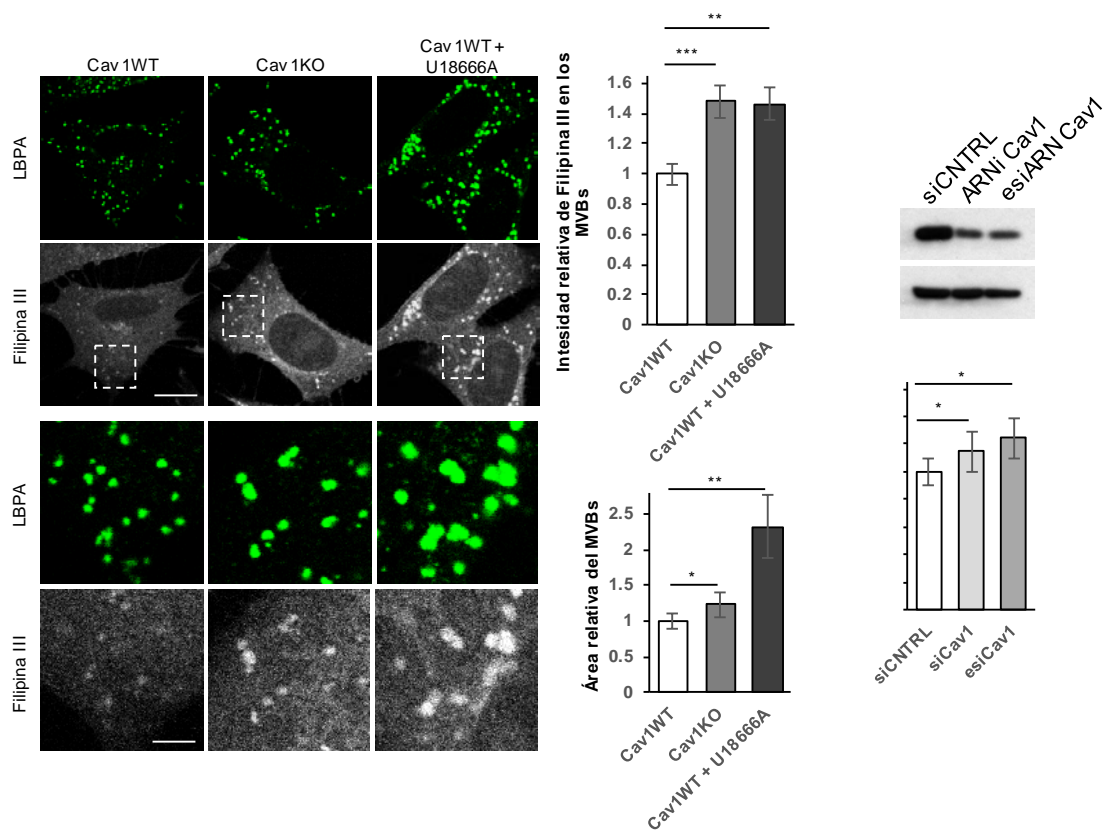


Figura R13. La ausencia de Cav1 produce un aumento en los niveles del colesterol libre endosomal. (a) (Izquierda) Imágenes de microscopía confocal correspondiente a la tinción con LBPA (ILVs/MVBs, verde) y Filipina III (colesterol libre, gris) en MEFs Cav1WT, Cav1KO y Cav1WT tratados con U18666A (barra de escala, 20 μ m). Los paneles inferiores muestran la magnificación del área indicada (barra de escala, 6 μ m). (Derecha) El gráfico de barras superior muestra la cuantificación de la intensidad media de Filipina III localizada en MVBs (las barras de error indican valores medios relativos \pm SEM, n = 4, ** p < 0,01, *** p < 0,001). El gráfico de barras inferior indica el área media de los endosomas en cada caso (las barras de error indican valores medios relativos \pm SEM, n = 4, * p < 0,05, ** p < 0,01). **(b)** Análisis del efecto del silenciamiento de Cav1 en el contenido de colesterol endosomal. (Parte superior) Western Blot representativo de la eficiencia del silenciamiento de Cav1 en MEFs Cav1WT. (Parte inferior) Cuantificación de la intensidad media de Filipina III en los MVBs en MEFs Cav1WT transfectados con el control y con los ARNs indicados (las barras de error indican valores medios relativos \pm SEM, n = 4, * p < 0,05).

Con el fin de confirmar si estas diferencias en los niveles de colesterol entre los MEFs Cav1WT y Cav1KO a nivel de los endosomas tardíos/MVBs estaban directamente implicadas en los cambios observados en los exosomas producidos por ambos tipos celulares, se decidió evaluar el impacto que el tratamiento de MEFs Cav1WT con la droga U18666A provocaba sobre la biogénesis de exosomas. El análisis de partículas mediante el uso de la tecnología NTA mostró un aumento significativo en el número de exosomas producidos tras inducir la acumulación de colesterol con esta

droga (**Figura R14a**). Además, la distribución por tamaño reveló que, al igual que ocurría en los exosomas derivados de MEFs Cav1KO, el tratamiento con U18666A provocó la pérdida de la población de exosomas de mayor tamaño, obteniéndose un perfil más homogéneo y de menor tamaño (**Figura R14a**). Finalmente, el análisis por Western Blot de estos exosomas reveló que el tratamiento con U18666A inducía un aumento en los niveles de Cav1 en los mismos, sugiriendo un reclutamiento de esta proteína hacia el endosoma como mecanismo de compensación del aumento en los niveles de colesterol provocados por la droga (**Figura R14b**).

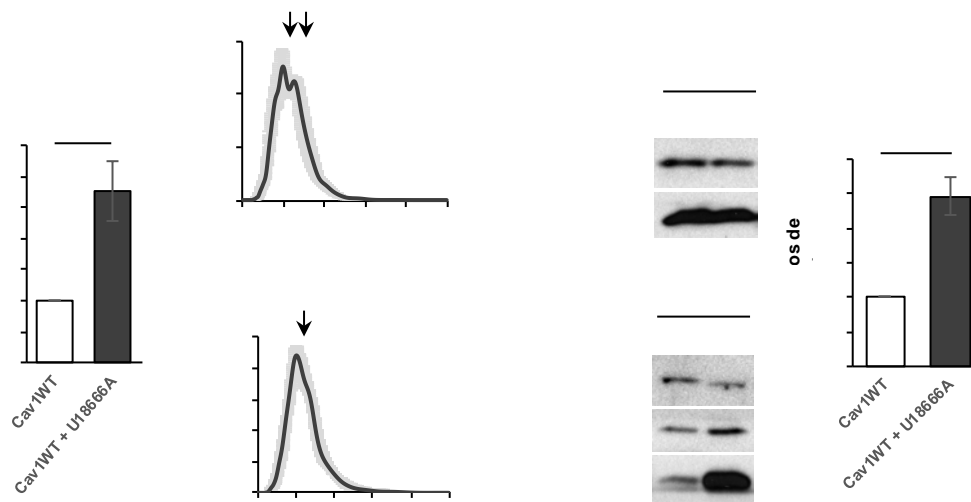


Figura R14. El aumento en los niveles de colesterol endosomal tiene un impacto en la formación de los exosomas. (a) Análisis de los exosomas producidos por MEFs Cav1WT control y tratados con U18666A mediante NTA. (Izquierda) La gráfica muestra los niveles de producción de exosomas relativa al mismo número de células en ambas condiciones (las barras de error indican valores medios \pm desviación estándar, $n = 3$, * $p < 0,05$). (Derecha) Perfil de distribución por tamaño de los exosomas indicados en a). Las flechas señalan las poblaciones normales identificadas. En el caso de MEFs Cav1WT se observa una distribución con dos poblaciones mayoritarias (p1 y p2). Este patrón desaparece con el tratamiento con U18666A, quedando restringida a una única población (p1). **(b)** Análisis por Western Blot de los lisados celulares y de los exosomas producidos por MEFs Cav1WT control y/o tratados con U18666A. El gráfico de barras de la derecha muestra la cantidad relativa de Cav1 presente en exosomas (las barras de error indican valores medios \pm desviación estándar, $n = 3$, *** $p < 0,001$). Tubulina se usó como control de carga para los lisados. TSG101 y Alix se emplearon como controles de carga de los exosomas producidos.

Las membranas lipídicas de la célula son estructuras dinámicas que presentan dominios que desempeñan un papel importante en la arquitectura de la propia membrana ¹²⁵. Estos dominios son el resultado del empaquetamiento selectivo de colesterol y esfingolípidos confiriendo a la membrana un estado de fase líquido-ordenada, resistente a la solubilización con diversos detergentes, de ahí que a estos

dominios también se les dé el nombre de DRMs (*Detergent Resistant Membranes*) ¹⁹¹. Con el fin de analizar si las diferencias de colesterol observadas en los MVBs de las células Cav1WT en comparación con las células Cav1KO se traducían también en cambios en la organización de la membrana de los exosomas que producen, se procedió al aislamiento de estos DRMs a partir de exosomas producidos por las células Cav1WT (control o tratadas con la droga U18666A) y por las células Cav1KO (**Figura R15**). Los resultados obtenidos mostraron como flotilina-1, un marcador específico tanto de DRMs como de exosomas, se distribuía diferencialmente en cada caso. En el caso de los exosomas producidos por las células Cav1KO o por las células Cav1WT tratadas con la droga, flotilina-1 mostraba una amplia distribución a lo largo de las fracciones 1 a 8. Sin embargo, la acumulación de flotilina-1 en los exosomas derivados de las células Cav1WT control se restringió a las fracciones 1 a 3 (**Figura R15**) lo que refleja un mayor contenido de microdominios ordenados en exosomas derivados de las células Cav1KO o en exosomas Cav1WT tratados con la droga.

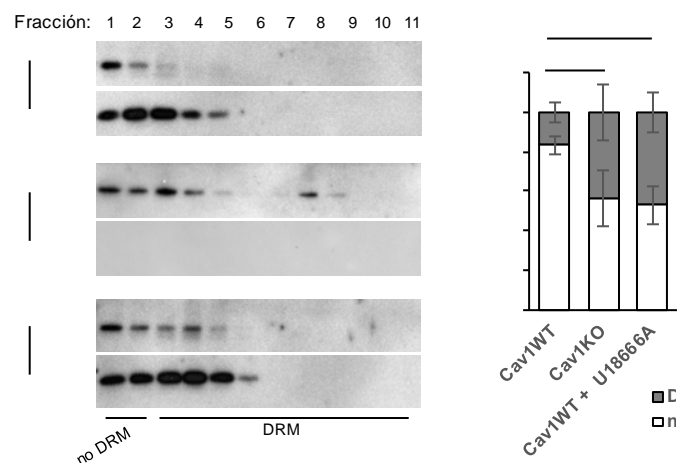


Figura R15. La organización lipídica de la membrana de los exosomas depende de Cav1 y está modulada por los niveles de colesterol. Purificación de los dominios de membranas resistentes a detergentes DRMs en exosomas. Western Blots representativos de las fracciones obtenidas a partir de gradientes de sacarosa de los exosomas producidos por MEFs Cav1WT, Cav1KO y MEFs Cav1WT tratados con U18666A en presencia de Triton X-100 a 4°C. Flotilina-1 se usó como marcador de DRMs. El gráfico de barras de la derecha muestra la proporción de flotilina-1 localizada en membranas resistentes y no resistentes a detergentes (las barras de error indican valores medios \pm desviación estándar, $n = 3$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Durante la formación de las ILVs, la membrana del MVB sufre un proceso de invaginación hacia el lumen del endosoma que origina a la formación de dichas estructuras intraluminales que darán lugar a los exosomas. En este proceso, la composición lipídica es fundamental para especificar tanto su tamaño como la

morfología de las mismas. De hecho, en los últimos años, diferentes lípidos han sido propuestos como elementos esenciales en la formación de diferentes poblaciones de exosomas ^{121 117}. Para confirmar si además de las diferencias a nivel del colesterol, la ausencia de Cav1 podría provocar cambios en otros lípidos, se procedió a determinar mediante análisis por espectrometría de masas la composición lipídica de exosomas derivados de células Cav1WT y Cav1KO (**Figura R16**). Curiosamente, se observó que mientras que los lípidos principalmente estructurales en la formación de exosomas tales como fosfatidil-colina, fosfatidil-serina y fosfatidil-etanolamina presentaban niveles similares en ambos tipos de exosomas, por el contrario, aquellos lípidos directamente relacionados con los procesos de invaginación y formación de las ILVs (tales como LBPA y ácido fosfatídico) estaban enriquecidos en los exosomas Cav1WT en comparación con los producidos por las células Cav1KO.

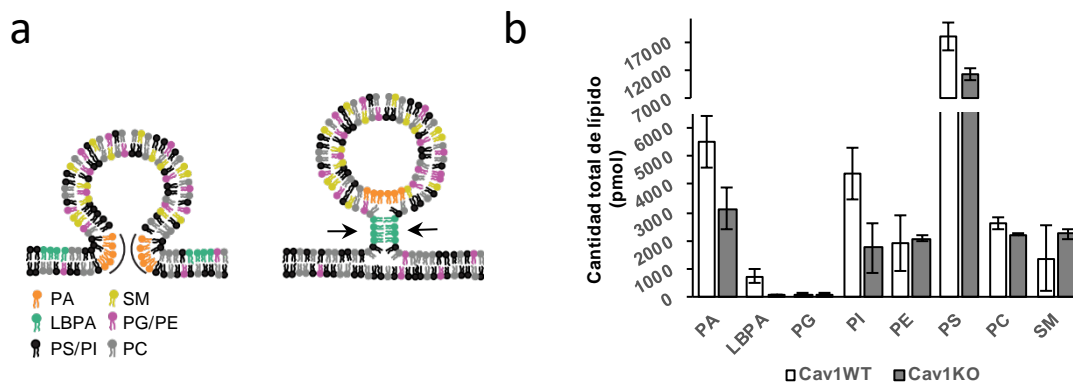


Figura R16. Alteraciones en la composición lipídica de los exosomas provocada por la ausencia de Cav1. (a) Esquema explicativo de la implicación de los diferentes componentes lipídicos en la invaginación y formación de las vesículas intraluminales a nivel de los MVBs (adaptado de Subra et al, 2007 ¹¹⁷). Se muestran aquellos lípidos que desempeñan un papel activo en el proceso de invaginación tales como PA (Ácido fosfatídico) o LBPA (Ácido liso-bis-fosfatídico), así como aquellos que desempeñan un papel estrictamente estructural tales como PS/PI (Fosfatidil serina/Fosfatidil inositol), SM (Esfingomielina), PG/PE (Fosfatidil glycerol/Fosfatidil etanolamina), PC (Fosfatidil Colina). (b) Análisis lipidómico de los exosomas producidos por MEFs Cav1WT (blanco) y MEFs Cav1KO (gris). El gráfico de barras muestra la cantidad total de cada lípido detectado en la muestra (las barras de error indican valores medios \pm desviación estándar, n = 2).

Todos estos resultados indican que Cav1 juega un papel clave en la modulación de la biogénesis de exosomas actuando como un “reóstato” o mecanismo de tamponamiento del colesterol a nivel de los MVBs. Esta capacidad de modular el colesterol por parte de Cav1 confiere plasticidad a este compartimento permitiendo la segregación de diferentes poblaciones de exosomas.

4.2.3 La presencia de Cav1 en exosomas especifica su composición proteica

Los exosomas, como nanovesículas liberadas al medio extracelular por la mayoría de las células, constituyen un novedoso sistema de comunicación de gran relevancia tanto en procesos fisiológicos como patológicos^{87 143}. Los exosomas pueden actuar localmente como mecanismos de comunicación entre células próximas entre sí (comunicación paracrina)⁹³ pero también pueden hacerlo a distancia, alcanzando otros órganos o tejidos distantes de aquellos que los han producido (comunicación endocrina)^{157 158}. Su contenido abarca desde ácidos nucleicos (ARNm, micro-ARN, ADN mitocondrial...), lípidos, así como una amplia colección de proteínas, por lo que son capaces de ejercer múltiples funciones sobre las células receptoras^{79 116,142 143,152}. La incorporación específica de todas estas moléculas es un proceso altamente regulado por lo que entender los mecanismos implicados en su regulación representa una estrategia para poder controlar la composición específica de los exosomas. Como se ha visto anteriormente, Cav1 es capaz de modular la biogénesis de exosomas, por lo que a continuación evaluamos la importancia que la presencia de Cav1 tenía en la incorporación selectiva de proteínas dentro de los exosomas.

Mediante un análisis proteómico cuantitativo basado en marcaje isobárico se analizó la composición proteica tanto de los lisados correspondientes a fibroblastos Cav1WT y Cav1KO como de los exosomas producidos por ambos tipos celulares. De un total de 9109 proteínas identificadas en los lisados, un 87,1% de las proteínas (7942 proteínas) presentaban niveles similares de expresión en ambas líneas celulares ($1,5 \geq Zq \geq -1,5$) (**Figura R17**). Esto nos permitió la demarcación de un subconjunto del proteoma común y que por tanto tenía una probabilidad similar de ser incorporado en los exosomas.

Por otro lado, el proteoma correspondiente a los exosomas producidos por ambos tipos de fibroblastos reveló un total de 2938 proteínas. Este estudio mostró que del total de proteínas encontradas en lisados únicamente un 25,8% (2359 proteínas) se encontraban presentes en exosomas (**Figura R17a**). Además, se pudo observar que existe un 19% de proteínas presente en los exosomas cuya presencia no es detectable en los lisados a nivel proteómico, indicando la existencia de un proceso altamente selectivo de estas proteínas en su entrada a los exosomas.

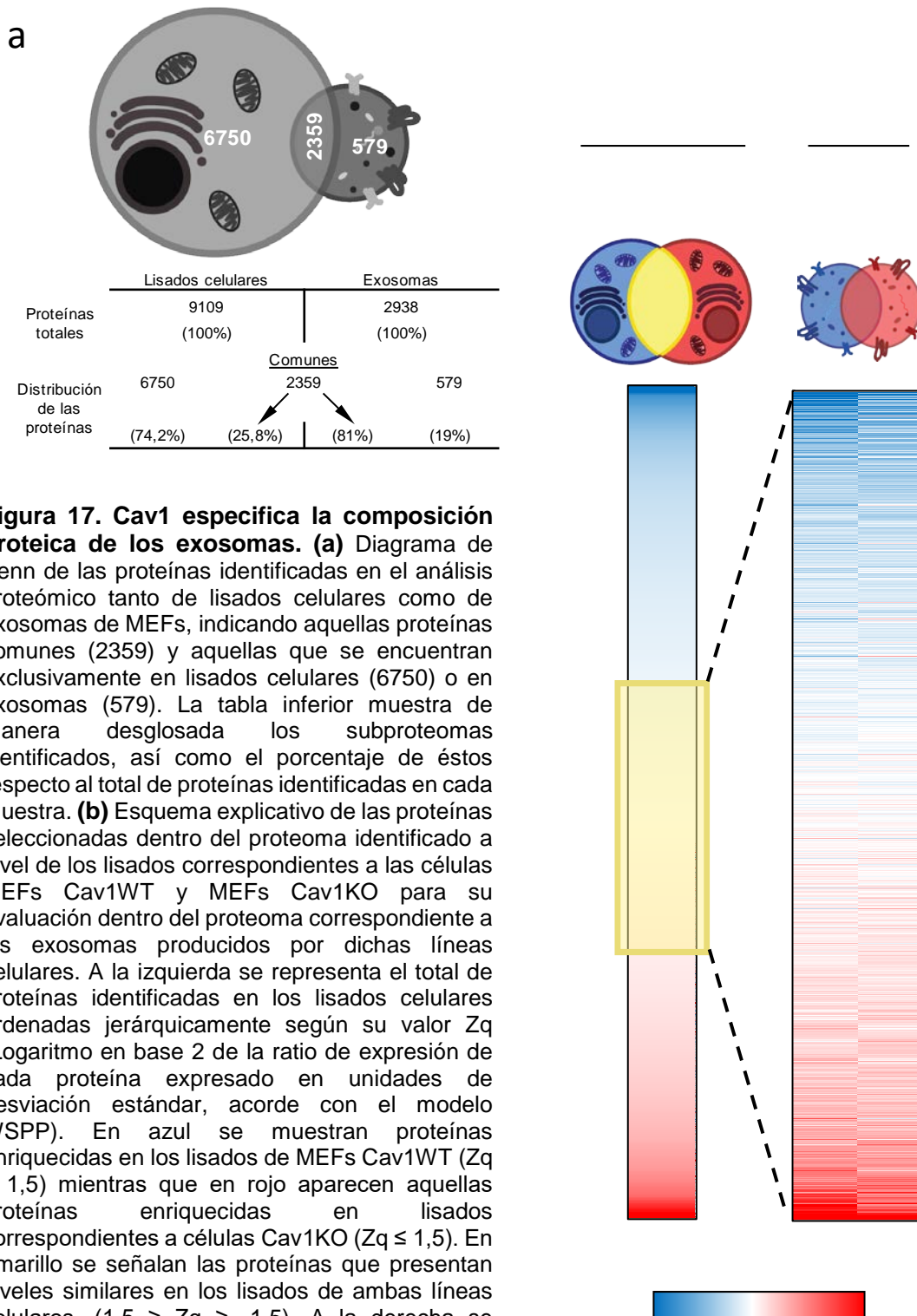


Figura 17. Cav1 especifica la composición proteica de los exosomas. (a) Diagrama de Venn de las proteínas identificadas en el análisis proteómico tanto de lisados celulares como de exosomas de MEFs, indicando aquellas proteínas comunes (2359) y aquellas que se encuentran exclusivamente en lisados celulares (6750) o en exosomas (579). La tabla inferior muestra de manera desglosada los subproteomas identificados, así como el porcentaje de éstos respecto al total de proteínas identificadas en cada muestra. **(b)** Esquema explicativo de las proteínas seleccionadas dentro del proteoma identificado a nivel de los lisados correspondientes a las células MEFs Cav1WT y MEFs Cav1KO para su evaluación dentro del proteoma correspondiente a los exosomas producidos por dichas líneas celulares. A la izquierda se representa el total de proteínas identificadas en los lisados celulares ordenadas jerárquicamente según su valor Zq (Logaritmo en base 2 de la ratio de expresión de cada proteína expresado en unidades de desviación estándar, acorde con el modelo WSP). En azul se muestran proteínas enriquecidas en los lisados de MEFs Cav1WT ($Zq \geq 1,5$) mientras que en rojo aparecen aquellas proteínas enriquecidas en lisados correspondientes a células Cav1KO ($Zq \leq 1,5$). En amarillo se señalan las proteínas que presentan niveles similares en los lisados de ambas líneas celulares. ($1,5 \geq Zq \geq -1,5$). A la derecha se representan los valores de Zq de las proteínas que fueron identificadas diferencialmente en exosomas y que se expresan por igual a nivel de los lisados.

Con todos estos datos se llevó a cabo un análisis comparativo entre los exosomas Cav1WT y Cav1KO. Entre el conjunto de proteínas detectadas, sólo se

consideraron aquellas cuyos niveles de expresión fueran similares en el proteoma de los lisados celulares, pero que a la vez estuvieran diferencialmente representadas en exosomas. Considerando como umbral de cambio significativo correspondiente a un $Zq \geq 1,5$ se identificaron 152 proteínas (5,1% del total de proteínas de los exosomas) cuya presencia se encontraba aumentada en exosomas Cav1WT, y que por tanto corresponderían a proteínas que requerirían de la presencia de Cav1 para su incorporación en exosomas. Por el contrario, considerando un $Zq \leq -1,5$ se identificaron 163 proteínas (5,5% del total de proteínas de los exosomas) que corresponderían a un subconjunto de proteínas para las que la presencia de Cav1 estaría condicionando negativamente su incorporación a estas nanovesículas (**Figura R17b**). Una vez seleccionados estos dos grupos de proteínas, se realizó un análisis estadístico basado en una red de interacciones (*STRING network analysis*: <https://string-db.org/cgi/network.pl>) así como un análisis funcional de ontología génica (*GOrilla, Gene Ontology enrichment analysis and visualization tool*: <http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/>). Estos análisis revelaron que, los exosomas derivados de MEFs Cav1WT estaban enriquecidos en proteínas componentes del sistema endosomal/endomembranas, mostrando también un enriquecimiento especialmente significativo en componentes de la matriz extracelular (ECM, ExtraCellular Matrix) (incluidos Tenascina-C, Fibronectina, Nidógeno, Emilina, EDIL3 y proteoglicanos de heparán sulfato entre otros) (**Figura R18 y Tabla S1**). Por el contrario, el análisis mediante STRING reveló una marcada presencia en los exosomas Cav1KO de proteínas relacionadas con ADN/ARN entre las que se encontraban diferentes histonas. Por otro lado, y apoyando nuestros datos previos en los que demostrábamos un mayor contenido de colesterol en los MVBs de las células Cav1KO, los análisis proteómicos revelaron un aumento significativo de anexinas en los exosomas Cav1KO (**Figura R19 y Tabla S2**). Las anexinas son proteínas dependientes de calcio que se unen a membranas ricas en colesterol promoviendo el ordenamiento lipídico de las membranas a las que se asocian. El enriquecimiento en anexinas en los exosomas Cav1KO, por tanto, podría ser un mecanismo de regulación del colesterol presente en estos exosomas. A continuación, y tras seleccionar algunas de las proteínas diferencialmente presentes en los exosomas Cav1WT y Cav1KO los resultados proteómicos se validaron mediante Western Blot (**Figura R20**).

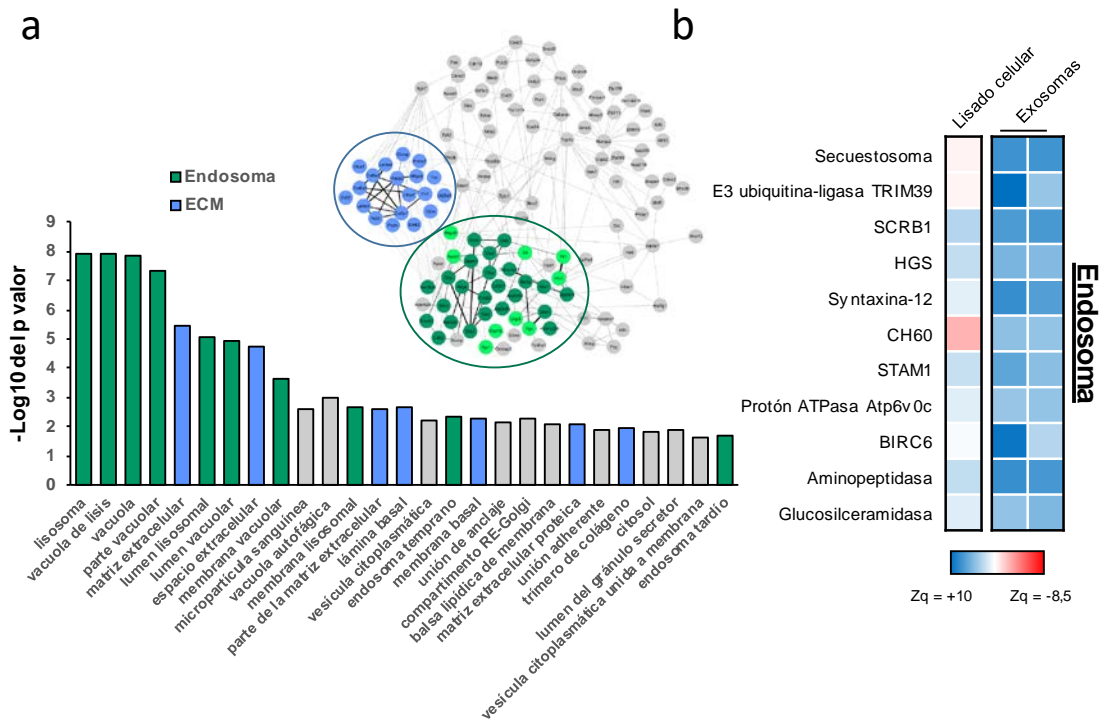
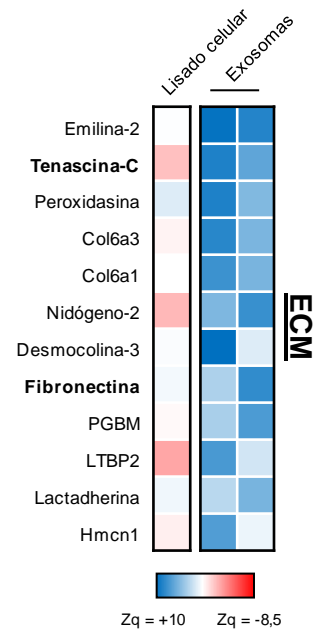


Figura R18. Los exosomas producidos por MEFs Cav1WT incorporan selectivamente proteínas del sistema endosoma y de matriz extracelular. (a) El gráfico de barras muestra las familias de proteínas significativamente enriquecidas en los exosomas derivados de MEFs Cav1WT ($p < 0,01$). En azul se señalan las familias relacionadas con la matriz extracelular (ECM). En verde aquellas vinculadas al sistema del endosoma/lisosoma. A la derecha se presenta el diagrama correspondiente a las redes de conexiones entre proteínas obtenido mediante análisis usando la base de datos STRING que se encuentran aumentadas significativamente en los exosomas derivados de MEFs Cav1WT. (b) Diagrama de intensidad de color correspondientes a los valores de Zq obtenidos para las diferentes proteínas endosomales (parte superior) y para las proteínas de la matriz extracelular (parte inferior) tanto en los lisados celulares como en los exosomas. El color azul indica proteínas enriquecidas en muestras Cav1WT mientras que el color rojo corresponde a aquellas que lo están en muestras Cav1KO. Tenascina-C y Fibronectina se resaltan en negrita dada su relevancia dentro de los componentes de proteínas de matriz extracelular.



4.2.3.1 Cav1 condiciona la presencia de proteínas de matriz en exosomas

De todos los grupos de proteínas cuya entrada al exosoma depende de la presencia de Cav1 nos llamó especialmente la atención el grupo correspondiente a las proteínas de matriz extracelular dada su importancia tanto en procesos fisiológicos como patológicos^{5 6 10}. Aunque estas proteínas han sido ampliamente estudiadas, aún se desconocen con exactitud cuáles son los mecanismos responsables de su secreción

al medio extracelular ⁸¹. Nuestros datos sugieren la posibilidad de que los exosomas puedan constituir al menos una de las vías empleadas por estas proteínas para su transporte y posterior secreción, por lo que decidimos profundizar en esta hipótesis. Para ello, nos centramos en Tenascina-C (TnC).

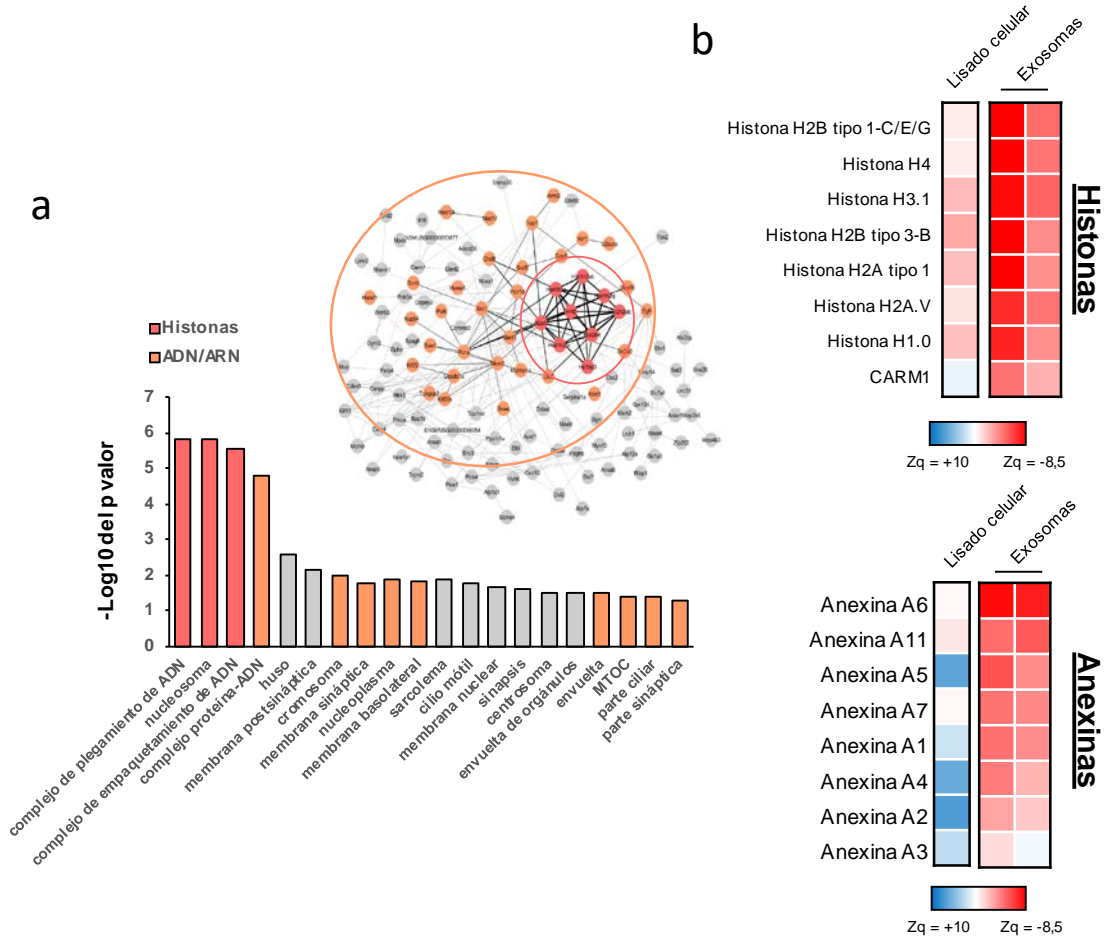


Figura R19. Los exosomas producidos por MEFs Cav1KO incorporan selectivamente anexinas y proteínas relacionadas con ADN/ARN. (a) Análisis de las categorías de proteínas enriquecidas en los exosomas derivados de MEFs Cav1KO. (Izquierda) En el gráfico de barras se muestran las familias de proteínas significativamente enriquecidas en dichos exosomas ($p < 0,01$). En rojo se señalan las familias relacionadas con las histonas y en naranja otras familias relacionadas con el ADN y el ARN. A la derecha se muestra la red de conexiones existentes entre las proteínas enriquecidas en exosomas Cav1KO. **(b)** Diagrama de intensidad de color correspondiente a los valores de Zq de las diferentes histonas (parte superior) y a los distintos miembros de la familia de las anexinas (parte inferior) tanto en lisados celulares como en exosomas derivados de MEFs Cav1KO. El color azul corresponde a proteínas más enriquecidas en muestras Cav1WT mientras que el color rojo aquellas que lo están en muestras Cav1KO.

TnC es una proteína moduladora de la adhesión ⁴¹ celular implicada en diferentes aspectos del desarrollo embrionario ⁴⁴. Sin embargo, también participa en procesos patológicos tales como en la progresión tumoral, jugando un papel

fundamental en el desarrollo de metástasis, y usado como un marcador tumoral relacionado con una mala prognosis de esta enfermedad y una baja tasa de supervivencia en pacientes de cáncer ²⁴².

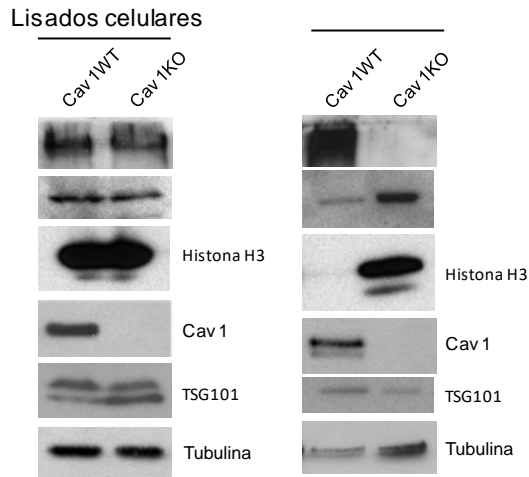


Figura R20. Confirmación del análisis proteómico. Análisis mediante Western Blot para confirmar los cambios en la expresión diferencial de diferentes proteínas identificadas por proteómica cuantitativa tanto de lisados correspondientes a fibroblastos Cav1WT y Cav1KO como de los exosomas producidos por dichas células. Tubulina se empleó como control de carga en los lisados celulares, y TSG101 como control de carga de exosomas.

Nuestros resultados proteómicos mostraron unos niveles similares de esta proteína entre lisados celulares de MEFs Cav1WT y Cav1KO ($Zq = -0,98$). Sin embargo, su presencia era muy elevada en los exosomas positivos para Cav1 ($Zq = 3,02$) sugiriendo un papel fundamental de Cav1 en la modulación de la entrada de TnC a los exosomas. Con el fin de confirmarlo, se llevó a cabo el silenciamiento de Cav1 en las células MEFs Cav1WT mediante infección lentiviral con un RNA de doble cadena en horquilla (shRNA) específico del gen de Cav1. Los resultados mostraron una bajada en los niveles de Cav1 que se correlacionaba con una disminución significativa de la incorporación de TnC en los exosomas (**Figura R21**) apoyando la idea de que la presencia de Cav1 es fundamental para la incorporación de TnC en estas nanovesículas.

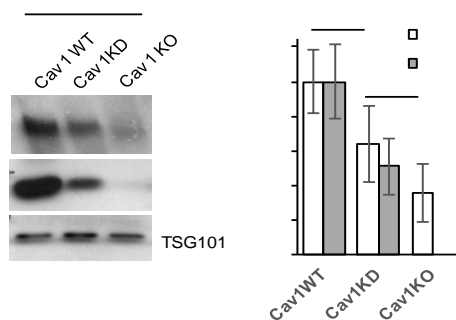


Figura R21. Los niveles de TnC en los exosomas se encuentran determinados por la expresión de Cav1. Análisis por Western Blot de la disminución de la incorporación de TnC en los exosomas tras el silenciamiento de la expresión de Cav1. La expresión de TnC en exosomas secretados por fibroblastos silenciados para Cav1 se comparó con la expresión de esta proteína en exosomas derivados de fibroblastos Cav1WT y Cav1KO. El gráfico de barras muestra los niveles de TnC (blanco) y Cav1 (gris) en cada caso (las barras de error muestran valores medios \pm SEM, $n = 6$, * $p < 0,05$).

Con el fin de establecer la cinética de deposición de TnC por parte de los fibroblastos Cav1WT se analizó la distribución subcelular de esta proteína a lo largo del tiempo mediante microscopía confocal. Como se observa en la **Figura R22**, tras 24-36 horas después de sembrar las células, TnC se encontraba localizada principalmente en el interior celular mostrando una acumulación en áreas próximas al núcleo. Esta primera etapa correspondería con la fase de síntesis de la proteína y con el inicio de su transporte hacia el exterior. Sin embargo, es a partir de las 48h cuando se puede observar la presencia de pequeñas fibras de TnC extracelulares, alcanzándose la máxima deposición y formación de la matriz de TnC a las 120 h.

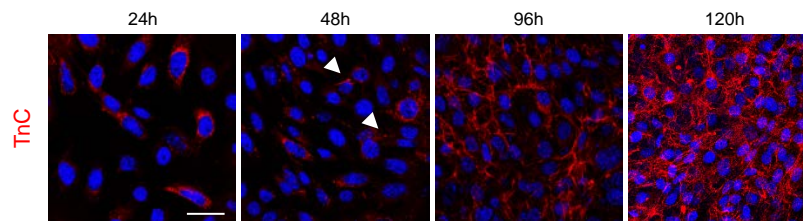


Figura R22. Estudio de la cinética de deposición de TnC. Imágenes de microscopía confocal de TnC (rojo) a lo largo del tiempo. Las células MEFs Cav1WT se sembraron fijándose posteriormente con paraformaldehído a los tiempos indicados. La localización subcelular de TnC (rojo) se evaluó en cada caso. Las flechas blancas muestran el momento en el que comienza la aparición de estructuras en forma de fibras de TnC en el espacio extracelular siendo máxima su deposición a las 120 h (barra de escala, 50 μ m).

Una vez establecido el tiempo óptimo (120 h) de secreción y deposición de TnC, decidimos estudiar si la ausencia de Cav1 afectaba a este proceso. El análisis comparativo de la deposición de matriz producido por los fibroblastos Cav1WT y Cav1KO confirmó la presencia de TnC extracelular distribuida en forma de fibras en el caso de los fibroblastos Cav1WT. Por el contrario, los fibroblastos Cav1KO mostraron un patrón de TnC principalmente intracelular, con una significativa disminución de fibras a nivel extracelular, un fenotipo que se recapituló mediante silenciamiento de Cav1 en los fibroblastos Cav1WT mediante shRNA específico contra esta proteína (**Figura R23a**). Estos resultados demuestran que, aunque la expresión/traducción de TnC no está afectada en los fibroblastos carentes de Cav1, su capacidad de ser transportada y secretada al exterior está alterada. Además, pudimos confirmar que la inducción de un aumento en los niveles de colesterol endosomal en los fibroblastos Cav1WT mediante tratamiento con la droga U18666A (mimetizando el fenotipo mostrado por las células Cav1KO) resultó también en una reducción en la capacidad de estas células de producir una matriz de TnC, así como en su presencia en exosomas (**Figura R23b**). Además, estas diferencias en la formación de fibras fueron cuantificadas mediante un análisis

informático desarrollado en el laboratorio (ver materiales y métodos) (**Figura R23c**). Sin embargo, y a diferencia de la acumulación intracelular de TnC asociada a la disminución o ausencia completa de Cav1 (**Figura R23a**), en las células Cav1WT tratadas con U18666A la retención de TnC a nivel intracelular fue mucho menos evidente probablemente reflejando una tasa mucho más alta de degradación en esta condición.

Asimismo, la inducción de la internalización de Cav1 a los MVBs mediante tratamiento de los fibroblastos Cav1WT con ortovanadato sódico o por silenciamiento de la expresión de PTRF (tal y como se mostró en la **Figura R2a y c**), resultó en un incremento significativo de la capacidad de estos fibroblastos de secretar y producir matrices ricas en TnC respecto a sus controles (**Figura R23d**).

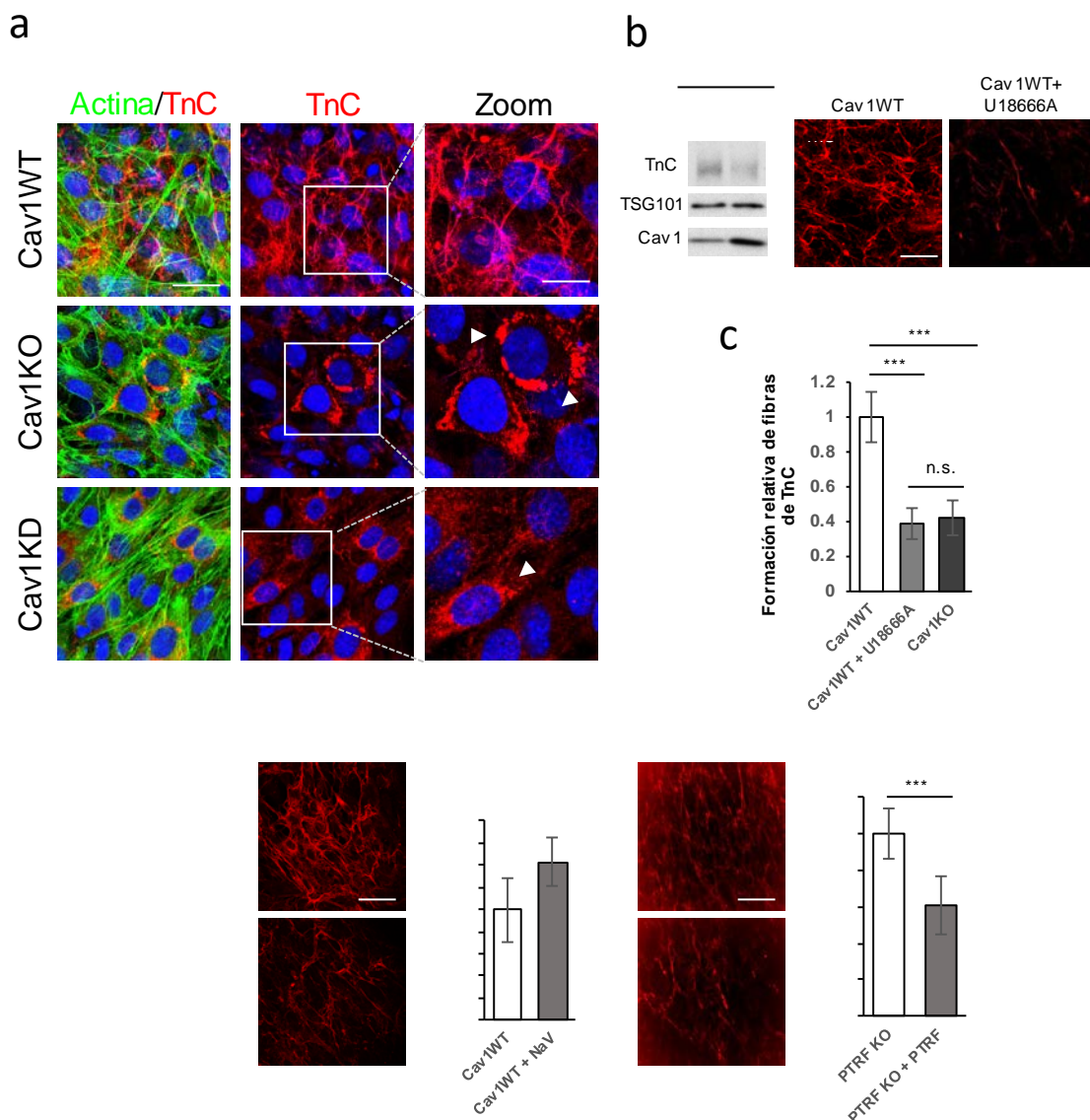


Figura R23. La deposición de la matriz extracelular de TnC depende de la regulación de los niveles de colesterol en proceso mediado por Cav1. (a) Proyección máxima de imágenes de microscopía confocal donde se muestra la TnC (rojo) depositada en forma de fibras a nivel extracelular por los MEFs Cav1WT, Cav1KO y Cav1KD tras 120h de cultivo. La actina celular se marcó en verde (barra de escala, 40 μ m). Las imágenes amplificadas muestran la

ausencia de deposición de matriz de TnC asociada a un incremento en la acumulación intracelular de esta proteína en MEFs Cav1KD y MEFs Cav1KO (barra de escala, 10 μ m). **(b)** Estudio del efecto de la acumulación de colesterol endosomal en MEFs Cav1WT. (Izquierda) Western Blot representativo mostrando la reducción en los niveles de TnC en los exosomas producidos por los MEFs Cav1WT tratados con la droga U18666A. (Derecha) Proyección máxima de imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de la matriz extracelular de TnC (rojo) producida por MEFs Cav1WT control y tratados con U18666A (barra de escala, 40 μ m). **(c)** Cuantificación de la deposición de TnC extracelular en fibras producidas por los MEFs Cav1WT control y tratados con U18666A y MEFs Cav1KO mediante la utilización de un software específico (ver materiales y métodos) (las barras de error muestran valores medios \pm desviación estándar, n = 8, *** p < 0,001). **(d)** Análisis del efecto que la inducción de la fosforilación y endocitosis de Cav1 provocan sobre la formación de la matriz extracelular de TnC (rojo) determinado mediante microscopía confocal y posterior cuantificación de fibras (barra de escala, 40 μ m). (Izquierda) Inducido por tratamiento de MEFs Cav1WT con NaV 100 μ M (las barras de error muestran valores medios \pm desviación estándar, n = 2). (Derecha) Inducido por la ausencia de PTRF. Las imágenes de microscopía confocal muestran la matriz extracelular de TnC (rojo) producida por MEFs deficientes en PTRF (PTRF KO). PTRF KO reconstituidos con PTRF (PTRF KO + PTRF) se usaron como control (las barras de error muestran valores medios \pm desviación estándar, n = 3, *** p < 0,001).

Consistente con estas observaciones, se confirmó la colocalización de TnC con Cav1 a nivel de los MVBs en la línea celular U251MG, derivada de un glioblastoma caracterizada por su elevada capacidad para secretar TnC. Mediante la expresión de Rab5Q79L en este tipo celular se observó la presencia de TnC en los endosomas agrandados colocalizando con Cav1 a nivel de las vesículas intraluminales, así como una elevada colocalización con el marcador de exosomas CD63 (**Figura R24**).

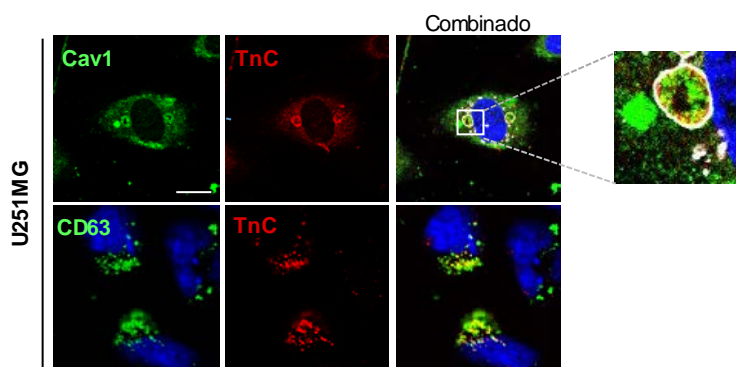


Figura R24. La proteína TnC se incorpora dentro de los endosomas. Análisis de la colocalización de TnC (rojo) con Cav1 o CD63 (verde) en células de glioblastoma U251 transfectadas con el mutante Rab5Q79L (blanco). La imagen magnificada muestra la presencia de TnC en el interior de los endosomas engrosados colocalizando con Cav1 (barra de escala, 5 μ m).

Finalmente, y mediante gradientes de sacarosa de exosomas producidos por fibroblastos Cav1 WT, se confirmó la presencia de TnC en las fracciones enriquecidas en Cav1 y en el marcador exosomal TSG101 (**Figura R25**).

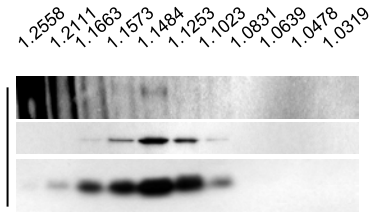
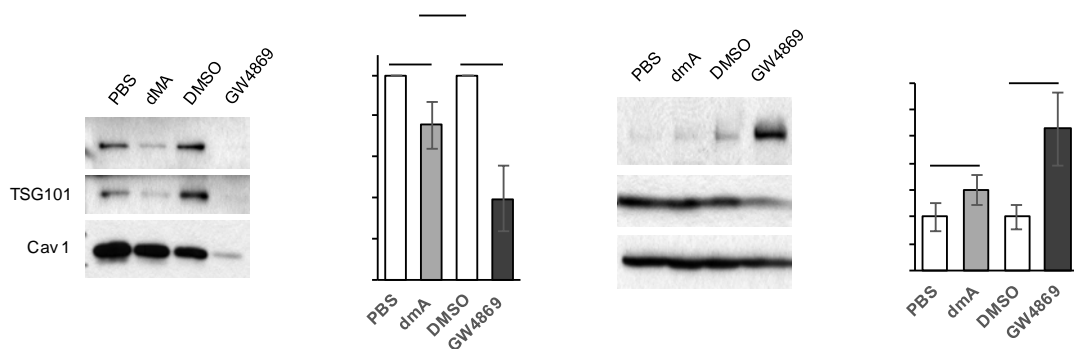


Figura R25. TnC se encuentra presente en exosomas. (a) Western Blot representativo de las fracciones obtenidas tras la ultracentrifugación diferencial en gradiente de sacarosa de los exosomas producidos por MEFs Cav1WT. Se observa la existencia de correlación entre el marcador de exosomas TSG101 con Cav1 y TnC.

4.3 Los exosomas juegan un papel importante en la secreción y deposición tanto de TnC como de otros componentes de matriz tales como FN

Los datos previamente mostrados indican que la secreción de TnC es mediada por exosomas. Con el fin de determinar la contribución específica que las rutas implicadas en la biogénesis y secreción de los exosomas ejercían sobre la secreción/deposición de TnC en primer lugar se llevó a cabo una inhibición farmacológica de estas rutas. Para ello, se utilizó dimetil amilorida (dmA), un inhibidor de canales de H^+/Ca^{2+} y H^+/Na^+ que impide la correcta fusión de los MVBs con la membrana plasmática impidiendo la secreción de exosomas y GW4869, una droga que inhibe la biogénesis de los exosomas mediada por ceramida, bloqueando las esfingomielinasas neutrales 1 y 2 (nSMase1 y 2). El tratamiento de fibroblastos Cav1WT con estas drogas provocó una reducción significativa en la secreción de exosomas (aunque más efectiva con el tratamiento con GW4869) tal y como se confirmó tanto por análisis de partículas utilizando la tecnología NTA como por Western Blot (**Figura R26a**). Una vez confirmados estos datos, se evaluó el efecto que dichas drogas provocaban en términos de secreción/producción de TnC en forma de matriz empleándose dos aproximaciones. Por un lado y mediante análisis informático se determinaron y cuantificaron las fibras producidas tras el tratamiento con estas drogas y por otro lado se llevó a cabo la medición mediante análisis por Western Blot de los niveles de TnC intracelulares tal y como se detalla en la sección de materiales y métodos. Los resultados obtenidos mostraron una perfecta correlación entre la reducción en los niveles de exosomas producidos tras el tratamiento con estas drogas con una disminución en su capacidad para producir y formar una matriz de TnC asociado a un incremento/acumulación de esta proteína a nivel intracelular (**Figura R26b y c**), reflejando un defecto en su capacidad para ser exportada.



C

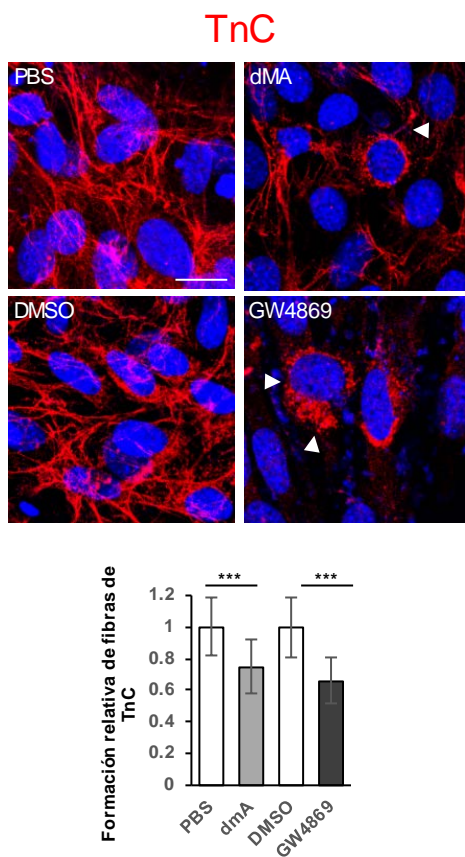


Figura R26. La inhibición de la secreción de exosomas reduce la formación de la matriz extracelular de TnC.

(a) Inhibición farmacológica de la producción de exosomas mediante el tratamiento de las células MEFs Cav1WT con los inhibidores dimetil amilorida (dmA, 75 nM) y GW4869 (10 μ M). (Izquierda) Western Blot representativo de los exosomas producidos por el mismo número de células en presencia de dichos inhibidores. (Derecha) Cuantificación por NTA de la producción de exosomas por célula en las condiciones anteriores (las barras de error muestran valores medios \pm SEM, n = 3, ** p < 0,01). **(b)** Análisis por Western Blot de los niveles de TnC acumulados intracelularmente en células MEFs Cav1WT inducidos por el tratamiento con dmA y GW4869 (las barras de error muestran valores medios \pm SEM, n = 9, * p < 0,05). **(c)** Imágenes representativas obtenidas mediante microscopía confocal mostrando el efecto que la exposición de MEFs Cav1WT a los inhibidores dmA y GW4869 provocan en la deposición de matriz de TnC (rojo) (barra de escala, 20 μ m). Las flechas blancas muestran la acumulación intracelular de TnC. El gráfico muestra la cuantificación de las fibras de TnC depositadas mediante un programa informático elaborado en el laboratorio (las barras de error muestran valores medios \pm SEM, n = 12, *** p < 0,001).

Dado que nuestros análisis proteómicos muestran un enriquecimiento no sólo de TnC sino de diferentes proteínas de matriz decidimos confirmar la implicación generalizada de los exosomas en la secreción de otras proteínas de matriz, incluyéndose en estos estudios fibronectina (FN), una proteína de gran relevancia en múltiples procesos fisiopatológicos³³. Como se observa en la **Figura R27**, el tratamiento con las drogas inhibitoras de la síntesis/secreción de exosomas también provocó una

disminución significativa en su capacidad para ser depositada al medio extracelular en forma de fibras sugiriendo que la secreción de la matriz extracelular por parte de los exosomas debe ser un mecanismo universal.

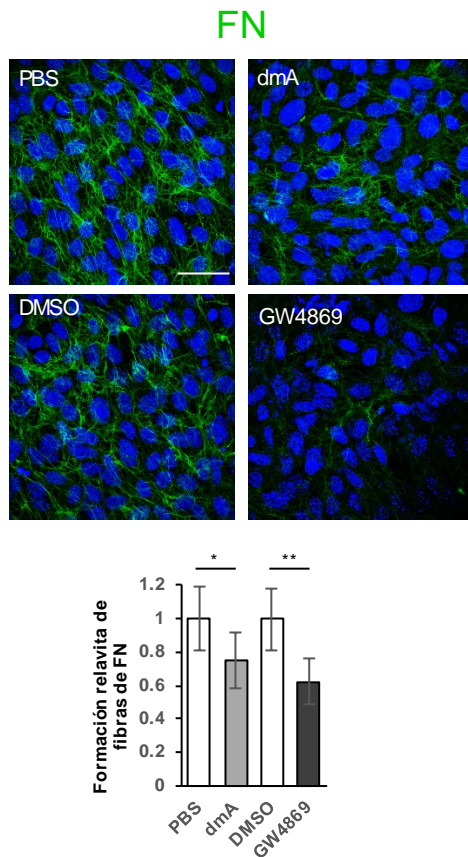
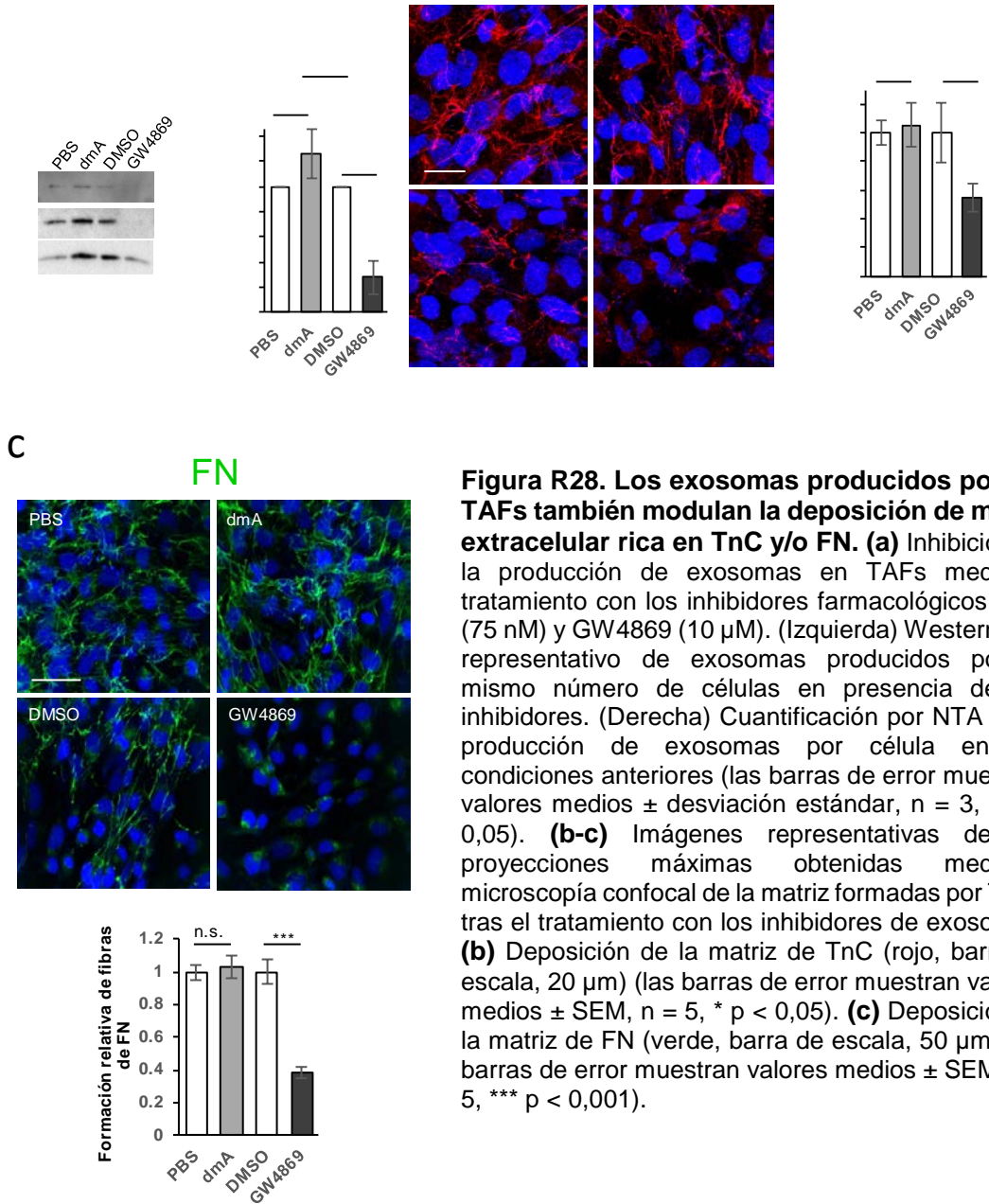


Figura R27. Inhibidores de la secreción de exosomas también afectan a la deposición de la matriz de FN. (a) Imágenes representativas obtenidas mediante microscopía confocal mostrando el efecto que la exposición de MEFs Cav1 WT a los inhibidores de exosomas dmA (75 nM) y GW4869 (10 μ M) provocan en la deposición de la matriz de FN (verde) (barra de escala, 50 μ m). El gráfico de barras muestra la cuantificación de las fibras de FN identificadas mediante análisis informático (las barras de error muestran valores medios \pm SEM, n = 5, * p < 0,05, ** p < 0,01).

Finalmente se confirmó el impacto general de la secreción de exosomas sobre la deposición de matriz extracelular a través de la extensión de estos estudios a fibroblastos humanos asociados a tumores (también conocidos como TAFs, *Tumour-Associated Fibroblasts*). Estos fibroblastos constituyen una población del estroma tumoral fundamental en la progresión del cáncer. Los resultados obtenidos mediante análisis de partículas (NTA) y mediante Western Blot mostraron cómo la secreción de exosomas por parte de estas células se inhibió significativamente mediante el tratamiento con GW4869, aunque a diferencia de lo observado en MEFs Cav1WT, la dmA no afectó a la cantidad de exosomas producidos por los TAFs, sugiriendo que en estas células posiblemente deben existir mecanismos de secreción de exosomas alternativos al modulado por esta droga (**Figura R28a**). En consecuencia, la deposición tanto de TnC como de FN por estos TAFs se vio específicamente afectada por el

bloqueo de las nSMAsas (droga GW4869) mientras que la dmA no modificó la secreción de estas proteínas de matriz respecto al control (**Figura R28 b y c**).



Con el fin de descartar que el defecto en la secreción/deposición de TnC y de FN fuera consecuencia de un efecto secundario de estos inhibidores farmacológicos sobre la ruta exocítica clásica. Se analizó, mediante microscopía confocal, el efecto que ambas drogas (GW4869 y dmA) provocaban sobre la estructura del retículo endoplasmático/aparato de Golgi. Los resultados obtenidos tanto en fibroblastos de ratón como en TAFs no mostraron ninguna alteración significativa en ninguna de las dos

estructuras tras el tratamiento (**Figura R29**). Además, se analizaron marcadores propios del estrés de retículo endoplásmico como son el corte del mensajero del gen XBP1 (*X-box Binding Protein 1*) o la expresión de CHOP (*CCAAT-enhancer-binding protein Homologous protein*)²⁴³. Ambos marcadores mostraban que, en presencia de las drogas dmA y GW4869, no se producía ningún tipo de estrés reticular (**Figura R29 b y d**). Estos datos confirman la selectividad de estos inhibidores farmacológicos sobre la ruta endosomal demostrando una vinculación clara entre la biogénesis de exosomas y la secreción/depósito extracelular de diferentes proteínas de matriz.

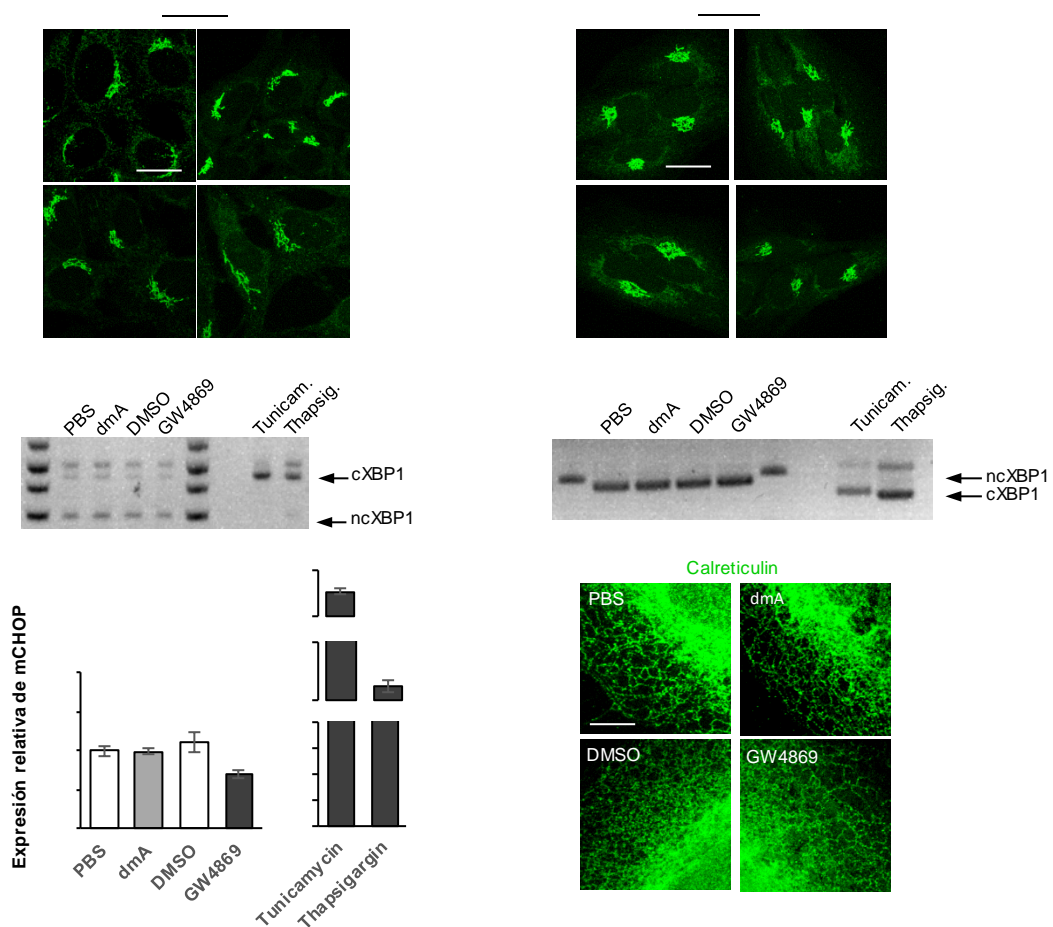


Figura R29. Los inhibidores de la secreción de exosomas no afecta a la ruta exocítica clásica retículo endoplasmático-Golgi. (a-b) Estudio del efecto de dmA y GW4869 sobre la estructura y estabilidad del retículo endoplásmico y el Golgi en MEFs. **(a)** Inmunofluorescencias representativas del aparato de Golgi en MEFs Cav1WT tras el tratamiento con los inhibidores de exosomas (GM130 se usó como marcador específico de Golgi, verde) (barra de escala, 15 μm). **(b)** Determinación del estrés del retículo endoplasmático inducido por la presencia de dmA y GW4869 mediante el análisis por RT-PCR y visualización en gel de agarosa del corte del mensajero de XBP1. Se señalan las formas cortadas (cXBP1, marcador positivo de estrés) y la no cortada (ncXBP1, marcador negativo de estrés (parte superior) o mediante análisis por PCR cuantitativa de los niveles de expresión de CHOP (parte inferior). Como inductores positivos de estrés reticular se incluyó el tratamiento con las drogas

tunicamicina y thapsigardina. **(c-d)** Estudio del efecto de dmA y GW4869 sobre la estructura y estabilidad del retículo endoplasmático y el Golgi en TAFs. **(c)** Inmunofluorescencias representativas del aparato de Golgi tras el tratamiento con inhibidores (GM130, verde) (barra de escala, 15 μ m). **(d)** Determinación del estrés del retículo endoplasmático en TAFs inducido por el tratamiento con dmA, GW4869 mediante análisis por RT-PCR y visualización en gel de agarosa del corte del mensajero de XBP1. Como inductores de estrés reticular se incluyeron las drogas tunicamicina y thapsigardina. En la parte inferior se muestran imágenes representativas obtenidas mediante microscopía confocal correspondientes al retículo endoplasmático (Calreticulina, verde) donde no se aprecian alteraciones estructurales tras el tratamiento con los inhibidores de exosomas (barra de error, 5 μ m).

La biogénesis de exosomas es un proceso regulado a través de diferentes mecanismos. Existe una vía dependiente del lípido ceramida y que puede ser inhibida, tal y como se mostró anteriormente por la droga GW4869, que bloquea la actividad de las nSMasas 1 y 2. Sin embargo, existe otro mecanismo alternativo dependiente de la maquinaria ESCRT, que requiere el ensamblaje secuencial de los complejos ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II y ESCRT-III. Ambos mecanismos pueden coexistir en los MVBs y estar cada uno de ellos implicado en la formación de poblaciones diferentes de exosomas ^{121 107}. Con el fin de determinar cómo afectaba cada uno de estos sistemas en la secreción de TnC, se llevó a cabo el silenciamiento tanto de las esfingomielinasas 1 y 2 (nSMase1/Smpd2, nSMase2/Smpd3) como de TSG101 (un componente clave del ensamblaje del complejo ESCRT-I) mediante ARNs de interferencia. Tras confirmar la eficiencia en el silenciamiento de estas proteínas en fibroblastos Cav1WT mediante Western Blot y PCR cuantitativa (**Figura R30**), se analizó su efecto sobre la capacidad para depositar matriz tanto de TnC como de FN en MEFs Cav1WT. Los resultados mostraron una reducción en la secreción de ambas proteínas de matriz (TnC y FN) con todos los ARNi testados. Sin embargo, el efecto era especialmente drástico tras el silenciamiento de la vía de síntesis de ceramida, reforzando los datos previamente obtenidos con el inhibidor farmacológico de esta ruta (GW4869) (**Figura R31**). Estos datos corroboran el papel de los exosomas como un mecanismo de deposición de ECM general, siendo la biogénesis de exosomas a través de ceramida la principal vía implicada en este proceso.

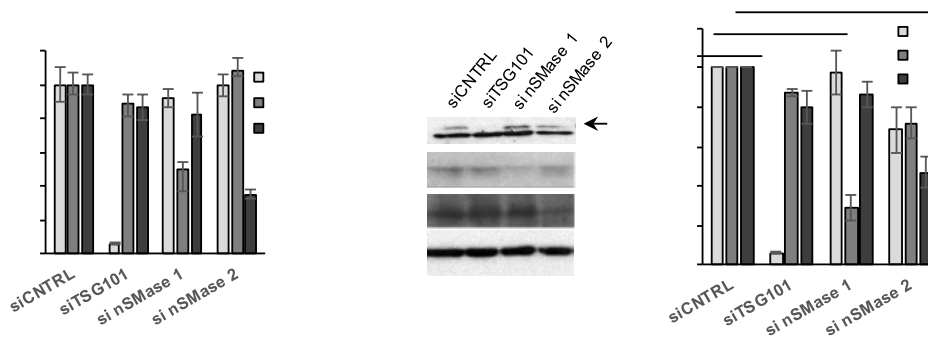


Figura R30. Determinación de la eficiencia de silenciamiento de la maquinaria implicada en la biogénesis de los exosomas mediante la utilización de ARNi específicos. (a-b) Análisis de la expresión de TSG101 y de las esfingomielinasas nSMase1 y 2 tras la transfección de MEFs Cav1WT con ARNi específicos frente a dichas proteínas, **(a)** mediante PCR cuantitativa **(b)** mediante análisis por Western Blot (las barras de error indican valores medios \pm desviación estándar; n = 4; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001).

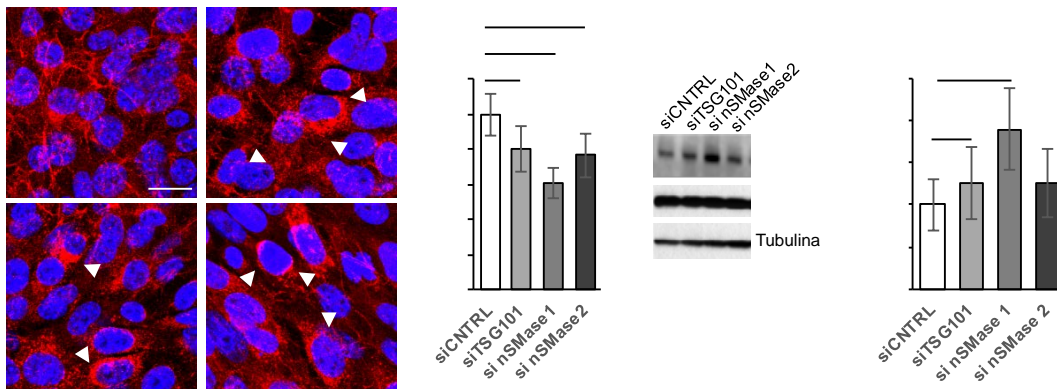
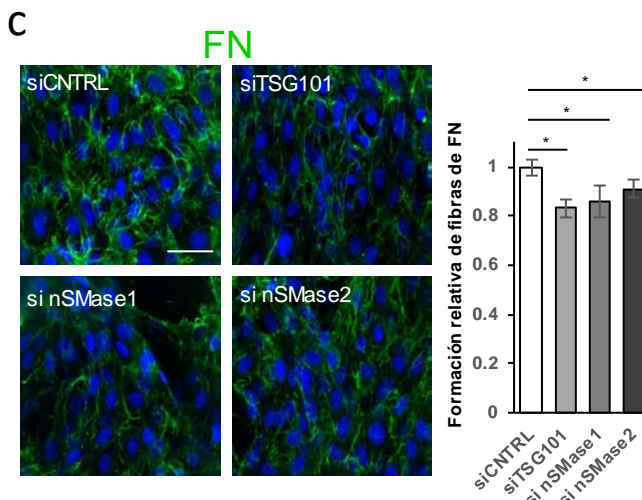


Figura R31. El silenciamiento de la maquinaria implicada en la biogénesis de exosomas inhibe la formación de matriz extracelular rica en TnC y FN. MEFs Cav1WT fueron transfectadas con ARNi para reducir la expresión de TSG101, nSMase 1 y nSMase 2. Posteriormente se procedió a analizar la matriz extracelular producida por las células en dichas condiciones. **(a)** Proyecciones máximas representativas de imágenes obtenidas mediante microscopía confocal correspondientes a la matriz de TnC (rojo) (barra de escala, 20 μ m). Las flechas



blancas señalan células que presentan una acumulación intracelular de TnC. El gráfico de barras muestra la cuantificación, mediante un programa informático, del número de fibras producidas

en presencia de cada uno de los ARNi utilizados (las barras de error indican valores medios \pm SEM; n = 5; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001). **(b)** Cuantificación mediante análisis por Western Blot de la cantidad de TnC acumulada intracelularmente inducida por los diferentes ARNi empleados (las barras de error indican valores medios \pm SEM; n = 9; * p < 0,05). **(c)** Proyecciones máximas representativas de imágenes obtenidas mediante microscopía confocal correspondientes a la matriz de FN (verde) (barra de escala, 50 μ m). El gráfico de barras muestra la cuantificación, mediante un programa informático, del número de fibras producidas en presencia de cada uno de los ARNi utilizados (las barras de error indican valores medios \pm SEM; n = 5; * p < 0,05).

4.4 La incorporación de TnC en exosomas se produce a través de su síntesis *de novo*

Con el fin de entender cuáles eran los mecanismos a través de los cuáles se producía la incorporación de TnC en los exosomas llevamos a cabo diferentes abordajes. En primer lugar, y para descartar la posibilidad de que estuviese ocurriendo de forma pasiva una vez que éstos hubieran sido secretados al medio como consecuencia de la unión inespecífica de TnC previamente existente en el medio extracelular, desarrollamos un ensayo basado en la generación de matrices derivadas de células (CDMs: *Cell-Derived-Matrices*). Para ello, se cultivaron durante 8 días tanto MEFs WT para la expresión de TnC (TnCWT) como MEFs en los que la expresión de esta proteína estaba delecionada (TnCKO). Posteriormente, se llevó a cabo la decelularización mediante lisis alcalina obteniéndose como resultado la matriz extracelular generadas por estas células (CDM TnCWT y CDM TnCKO) **(Figura R32a)**. Mediante microscopía confocal se pudo confirmar la ausencia de TnC en los CDMs generados por los fibroblastos TnCKO, aunque la deposición de otras proteínas de matriz extracelular tales como la FN no se encontraba alterada respecto al control **(Figura R32b)**. Las CDMs derivadas de estas dos líneas celulares se extrajeron y se incubaron a 37°C junto con exosomas purificados a partir de MEFs TnCKO. Tras la incubación, se procedió a una nueva purificación de los diferentes exosomas, para eliminar así toda la matriz extracelular que no se hubiese unido a éstos. Como control se incluyeron exosomas producidos por fibroblastos TnCWT incubados con CDMs producidas por estas mismas células **(Figura R32c)**. El análisis por Western Blot demostró que, aunque las matrices derivadas de MEFs TnCWT contenía cantidades considerables de TnC, esta proteína no co-precipitaba junto con los exosomas TnCKO **(Figura R32c)**. Este ensayo por tanto demuestra que la incorporación de TnC a los exosomas no se produce por su unión pasiva una vez que estos se han liberado al medio extracelular.

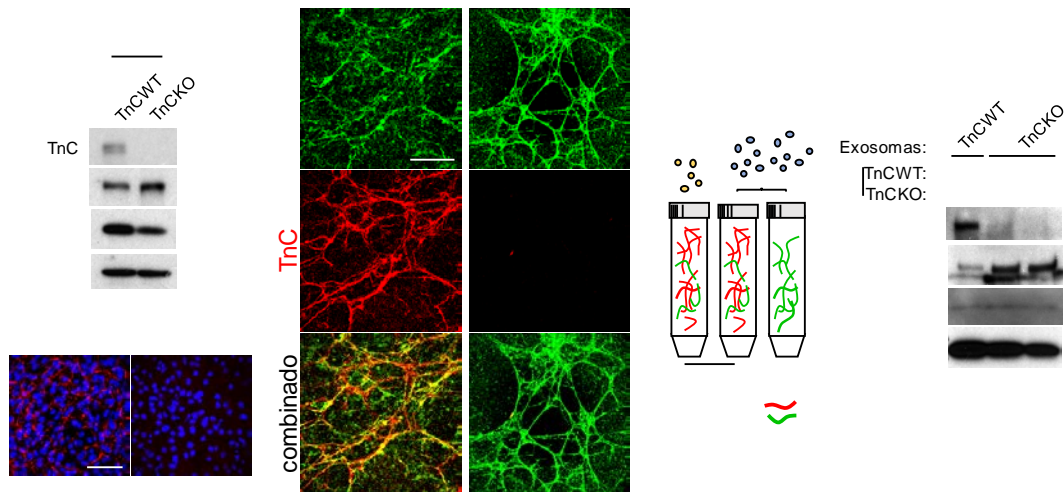


Figura R32. TnC no tiene la capacidad de unirse a los exosomas una vez que estos se han secretados. (a) Caracterización de los MEFs TnCWT y TnCCKO. (Parte superior) Western Blot representativo de los niveles de expresión de TnC, FN y Cav1 en lisados celulares de MEFs TnCWT y TnCCKO. (Parte inferior) Imágenes representativas obtenidas mediante microscopía confocal de la matriz de TnC producidos por ambas líneas celulares (barra de escala, 50 μ m). (b) Generación de matrices extracelulares tridimensionales (CDMs) producidas por MEFs TnCWT y TnCCKO. Las imágenes representativas obtenidas mediante microscopía confocal muestran la presencia y distribución de la matriz de FN (verde) y TnC (rojo) que permanece tras la lisis alcalina de las células que la han producido (ver Materiales y métodos) (barra de escala, 20 μ m). (c) (Izquierda) Esquema explicativo del diseño experimental. Los exosomas producidos por MEFs TnCWT (amarillo) y TnCCKO (azul) fueron purificados. A continuación, se incubaron en presencia de las CDMs derivadas de MEFs TnCWT y MEFs TnCCKO tal y como se muestra en el esquema (TnC, fibras rojas; FN, fibras verdes). Tras la incubación, los exosomas fueron purificados y analizados mediante Western Blot para determinar los niveles de TnC y FN unidos a los exosomas procedentes de una matriz extracelular preexistente (CDMs).

Los datos anteriores sugieren por tanto que la incorporación de esta proteína de matriz a nivel exosomal debe ocurrir intracelularmente planteándose de nuevo dos posibles vías para su incorporación. La primera de ellas implicaría la entrada de TnC al MVB para su posterior envío a los exosomas a través de un mecanismo de endocitosis de esta proteína desde el exterior celular, y otra derivada de su incorporación intracelular, tras su síntesis, hasta los MVBs. Para comprobar la posibilidad de que las células tuviesen la capacidad de endocitar matriz extracelular, internalizando así TnC dentro de la ruta del endosoma/MVB para su posterior incorporación a exosomas, se generaron CDMs tanto de fibroblastos TnCWT como de TnCCKO. Tras la decelularización se obtuvieron las CDMs producidas por estas células, sembrándose a continuación sobre ellas MEFs TnCWT o TnCCKO tal y como se indica en el esquema de la **figura R33**. Pasadas 24 h, las células se trataron con la proteasa tripsina para su

separación de la matriz y los lisados celulares correspondientes se analizaron mediante Western Blot, permitiéndonos evaluar específicamente la cantidad de TnC internalizada procedente del medio extracelular. Además, como control, se incluyeron muestras que fueron directamente lisadas, sin tratamiento con la proteasa, obteniéndose así un lisado del total de proteínas (que incluyen tanto las proteínas celulares como las proteínas presentes en las CDMs sobre las que se han sembrado). Los resultados muestran una ausencia de TnC intracelular dentro de los fibroblastos TnCKO cultivados sobre CDMs ricas en TnC, excluyendo así la endocitosis de TnC extracelular como principal vía de incorporación de esta proteína a los exosomas.

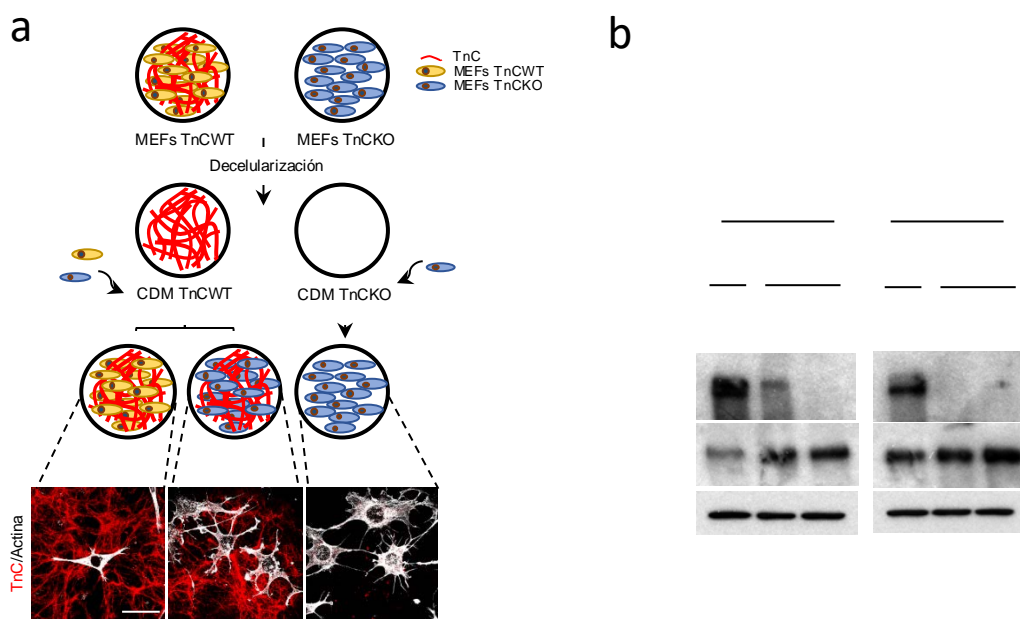


Figura R33. La endocitosis de TnC no es la principal vía de incorporación de TnC a los exosomas. (a) Esquema explicativo del diseño experimental. CDMs obtenidas a partir de MEFs TnCWT (amarillo) y TnCKO (azul) fueron generadas tras su decelularización. A continuación, MEFs TnCWT y TnCKO fueron nuevamente sembradas sobre dichas matrices tal y como se indica en la figura. En la parte inferior se muestran las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de las matrices generadas por estas líneas celulares teñidas con TnC (rojo) y de las células sembradas sobre las mismas teñidas con faloidina (actina, blanco) (barra de escala, 20 μ m). **(b)** Análisis por Western Blot de los niveles de TnC y FN presentes en los extractos celulares totales (CDMs + células sembradas) y de los lisados intracelulares (células sembradas y extraídas mediante el tratamiento con proteasas) (ver Materiales y métodos). Tubulina se empleó como control de carga.

Todos estos resultados nos llevan por tanto a que el origen de la TnC que se incorpora a los exosomas debe ser completamente intracelular procedente de la ruta biosintética. Apoyando esta hipótesis, resultados previos mostraron cómo tanto la ausencia de Cav1 como la inhibición de la biogénesis/secreción de exosomas producía,

de manera general, la acumulación de TnC en el interior celular. Para caracterizar en detalle en qué compartimento intracelular se produce la acumulación de TnC, se llevó a cabo un fraccionamiento subcelular mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa de lisados tanto de MEFs Cav1WT (control y tratados con la droga GW4869) como de MEFs Cav1KO. Este método nos permitió separar los MVBs, del retículo endoplásmico/aparato de Golgi (ambos compartimentos fraccionan juntos en este método de separación). El análisis de las fracciones obtenidas se realizó mediante Western Blot usando marcadores específicos de retículo endoplásmico (calreticulina), aparato de Golgi (GM130) y cuerpos multivesiculares (CD63) (**Figura R34a**). En el caso de los MEFs Cav1WT, TnC co-fraccionaba con CD63 y calreticulina (fracciones 3 – 7). Sin embargo, tras el tratamiento de estas células con el inhibidor de exosomas GW4869, TnC se excluyó prácticamente en su totalidad de las fracciones positivas CD63, distribuyéndose principalmente en las fracciones enriquecidas en el retículo endoplásmico (fracciones 10 – 12), una redistribución que se recapitulaba también en las células Cav1KO. Corroborando estos datos, se pudo observar mediante inmunofluorescencia una elevada colocalización entre TnC y calreticulina en células Cav1WT tratadas con GW4869, colocalización que aumentaba considerablemente tras el tratamiento con cloroquina (un inhibidor de la degradación lisosomal) tanto de las células pretratadas con GW4869 (**Figura R34b**) como de células Cav1KO (**Figura R34c**).

Finalmente, también se decidió tratar las células con monensina A, un antibiótico políéter que actúa como ionóforo de Na^+/H^+ , que es capaz de aumentar la secreción de exosomas. Sin embargo, también se ha observado que disrumpe el correcto funcionamiento del retículo ²⁴⁴. Acorde con esto, las células que son tratadas con esta droga presentan acúmulos de TnC, aunque sus exosomas si poseen altos niveles de Cav1, cuya incorporación muestra una mayor dependencia de su endocitosis (**Figura R34d**).

Todos estos resultados sugieren que la transferencia de TnC debe producirse intracelularmente desde el retículo, donde tiene lugar su síntesis, al interior de los MVBs en ruta hacia la formación de exosomas. De manera que una transferencia defectuosa ER-MVB daría como resultado una acumulación de TnC en el retículo, siendo su destino final la degradación como vía de eliminación de este exceso de TnC acumulada. Esto permitiría entender las diferencias en la acumulación de TnC observadas entre las células Cav1KO o las células Cav1WT tratadas con GW4869 o con U18666A.

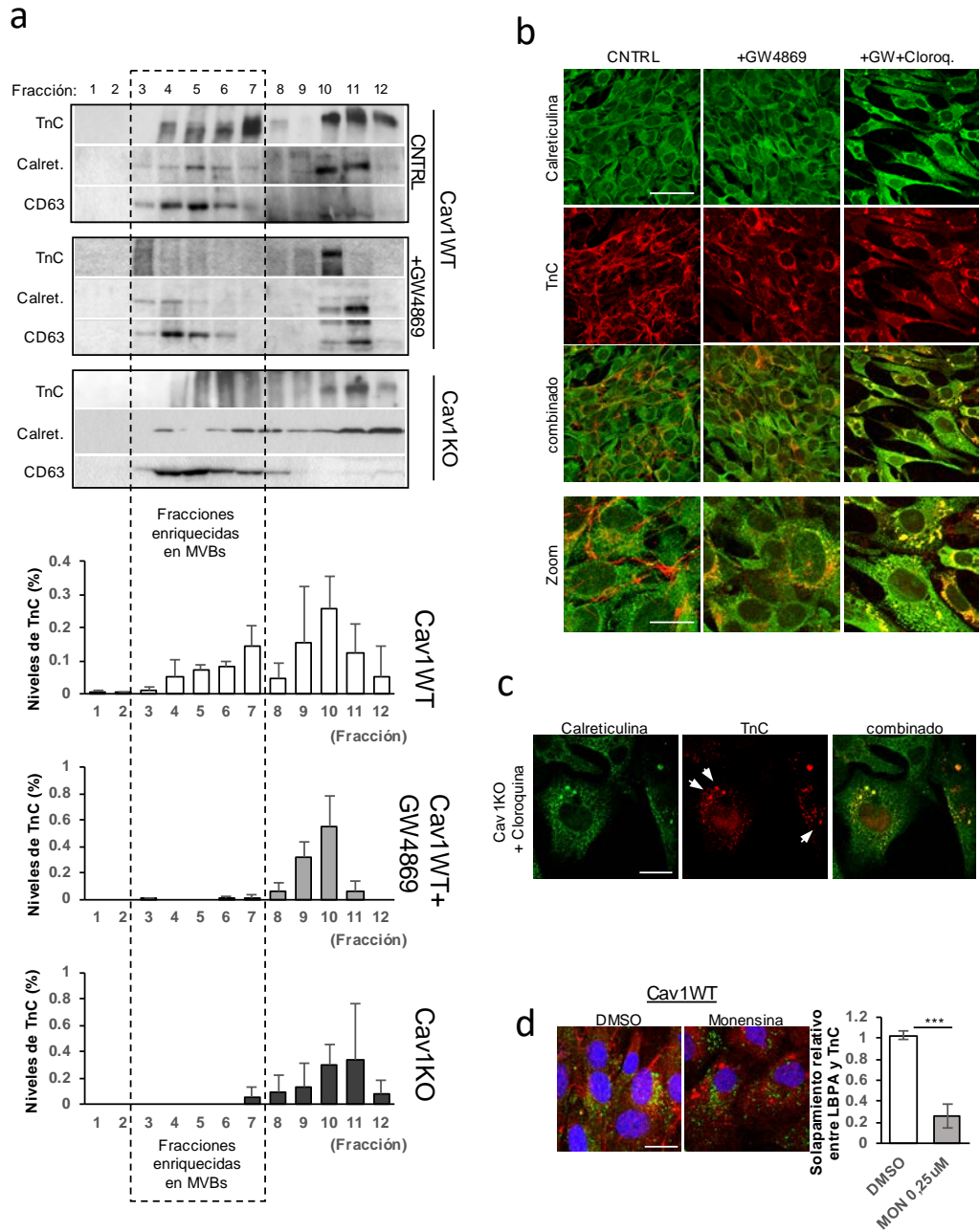


Figura R34. La incorporación de TnC a los exosomas ocurre intracelularmente a través de la ruta retículo endoplasmático-endosoma/MVB. (a) (Parte superior) Análisis mediante Western Blots de la distribución intracelular de TnC en MEFs Cav1WT control y tratados con el inhibidor de exosomas GW4869 y de MEFs Cav1KO tras fraccionamiento subcelular en gradientes de sacarosa. Se analizó la correlación en el patrón de distribución de TnC a lo largo del gradiente con respecto a los marcadores de retículo endoplásmico (calreticulina) y el marcador de MVB (CD63). El área enmarcada con la línea discontinua indica las fracciones enriquecidas en MVBs. (Parte inferior) La gráfica representa el porcentaje de los niveles de TnC en cada fracción con respecto al total (las barras de error indican valores medios \pm desviación estándar, $n = 3$). **(b)** Estudio mediante inmunofluorescencia de la colocalización de TnC (rojo) y calreticulina (verde) en MEFs Cav1WT control, tratados con GW4869 y con GW4869 + cloroquina (inhibidor lisosomal) (barra de escala, 40 μ m). Las imágenes magnificadas muestran

zonas representativas en las que se aprecia una clara colocalización entre ambas proteínas cuando las células son tratadas con GW4869 siendo incluso más evidente tras el tratamiento combinado GW4869 + cloroquina (barra de escala, 15 μm). **(c)** Inmunofluorescencia representativa de la colocalización existente entre TnC (rojo) y calreticulina (verde) en MEFs Cav1KO tratadas con cloroquina. Las flechas blancas muestran zonas de acumulación intracelular de TnC (barra de escala, 15 μm). **(d)** Estudio de la colocalización entre TnC (rojo) y LBPA (MVBs, verde) en MEFs Cav1WT tratados con monensina, un ionóforo que promueve la desorganización del retículo endoplasmático (barra de escala, 15 μm). La cuantificación muestra la reducción de la colocalización entre TnC y LBPA tras el tratamiento con dicha droga (las barras indican valores medios \pm desviación estándar, $n = 3$, *** $p < 0,001$).

4.5 Los exosomas generan puntos de nucleación de TnC. Implicaciones funcionales

A continuación, decidimos estudiar si los exosomas purificados son capaces de generar nuevos puntos de nucleación para la formación de nueva matriz, así como el efecto funcional que esta nueva matriz provocaba sobre la motilidad y capacidad invasiva de células tumorales en diferentes modelos.

4.5.1 Modelos bidimensionales

En primer lugar, se evaluó la capacidad de los exosomas purificados a partir de MEFs Cav1WT o Cav1KO de depositar directamente TnC en cultivos en dos dimensiones (2D) de la línea celular no invasiva MDA-MB-468. Se trata de una línea de cáncer de mama que presenta un fenotipo altamente epitelial caracterizada por la ausencia de expresión tanto de Cav1 como de TnC. Tras tratar estas células con exosomas Cav1WT y Cav1KO previamente marcados con una sonda fluorescente denominada PKH67 (en verde), se observó cómo las células MDA-MB-468 eran capaces de internalizar ambos tipos de exosomas con una eficacia similar, apreciándose también que parte de los exosomas se quedaban depositados en el exterior celular (**figura R35**). Sin embargo, sólo los exosomas Cav1WT mostraron la capacidad de desarrollar tinción positiva para TnC en áreas cercanas a la periferia celular (**Figura R35** en rojo), mostrando la aparición de nuevos puntos de nucleación de matriz de TnC. Por el contrario, los cultivos MDA-MB-468 expuestos a los exosomas Cav1KO mostraron niveles basales de deposición de TnC similares a los mostrados por los cultivos control (expuestos a PBS). Estos resultados indicaban que los exosomas por sí mismos son capaces de generar núcleos ricos en matriz extracelular de manera efectiva *in vitro*.

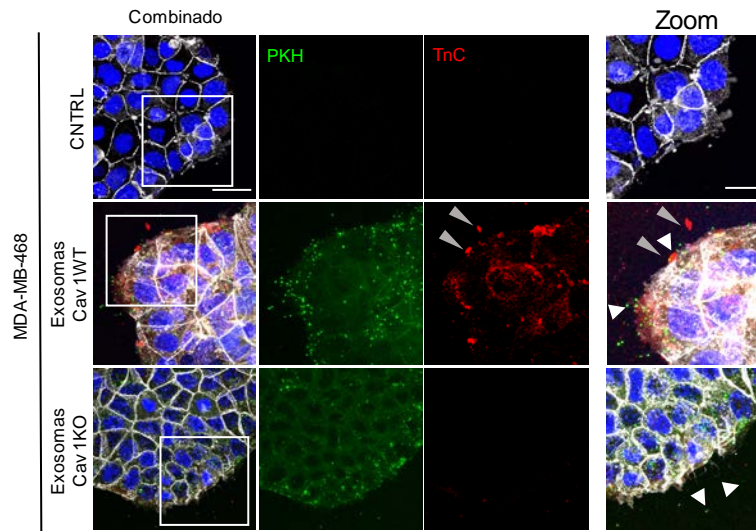


Figura R35. Los exosomas generan puntos de nucleación de TnC alrededor de las células receptoras. Microscopía confocal de células MDA-MB-468 tratadas con exosomas producidos por MEFs Cav1WT y Cav1KO marcados con la sonda PKH67 (verde). Se analizó la capacidad de los exosomas de depositar TnC (rojo) en un cultivo 2D (barra de escala, 20 μ m). E-Cadherina se utilizó como marcador para definir la morfología celular (en gris). Las imágenes magnificadas corresponden al área enmarcada (barra de escala, 10 μ m). Las flechas blancas muestran la presencia de los exosomas depositados en el espacio extracelular. Las flechas grises señalan regiones dónde se observa la presencia de depósitos extracelulares de TnC.

Esta deposición de TnC mediada por los exosomas Cav1WT indujo importantes cambios morfológicos en las células MDA-MB-468, provocando la pérdida de adhesión célula-célula que caracteriza a esta línea celular y favoreciendo la internalización del marcador epitelial E-cadherina. Asociado a esta reducción en las uniones celulares se observó un aumento del número de protrusiones y de emisión de filopodios (**Figura R36a**). Estos cambios, además provocaron una reestructuración del citoesqueleto de actina sugiriendo un proceso similar a una transición epitelio-mesénquima (EMT; *Epithelial-Mesenchymal Transition*) (**Figura R36a y b**).

En consonancia con estos cambios morfológicos similares a la EMT, las células MDA-MB-468 mostraron una mayor capacidad migratoria y un aumento en su capacidad invasiva tal y como se demostró mediante estudios de cierre de herida y de migración en transwell o en cámara de Boyden (**Figura R36c y d**). En el primer caso, se generó una monocapa de células MDA-MB-468 y se procedió a realizar una “herida” o área libre de células mediante raspado. Posteriormente, y mediante la captura periódica de imágenes, se evaluó el efecto que los exosomas provocaban sobre la capacidad migratoria de estas células para recubrir esta zona. La exposición de MDA-MB-468 a exosomas Cav1WT permitió a estas células cerrar la herida a mayor velocidad que aquellas que habían sido tratadas con los exosomas Cav1KO. De manera similar,

ensayos de transwell o en cámara de Boyden en los que se mide la capacidad de las células de atravesar una membrana de policarbonato (capacidad migratoria-invasiva) permitió nuevamente confirmar cómo los exosomas Cav1WT conferirían una mayor capacidad migratoria a las células MDA-MB-468 en comparación con los exosomas Cav1KO (**Figura R36d**).

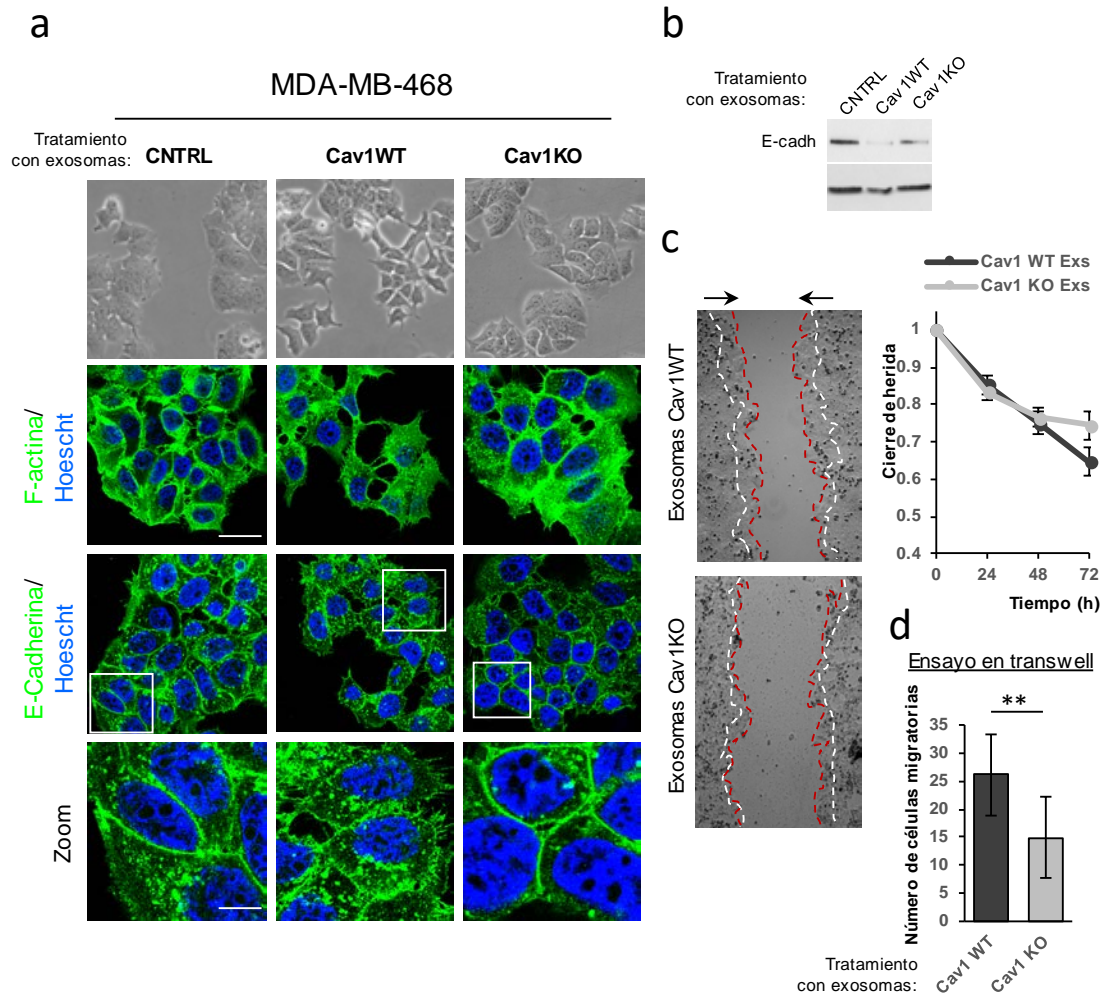


Figura R36. La deposición de TnC mediada por exosomas induce la motilidad de las células MDA-MB-468 en un sistema 2D. Exosomas procedentes de MEFs Cav1WT y Cav1KO fueron purificados y añadidos a cultivos de células MDA-MB-468. **(a)** Microscopía de contraste de fases de células MDA-MB-468 tratadas durante 36h con dichos exosomas (paneles superiores). Para los estudios realizados mediante microscopía confocal las células se tiñeron con faloidina (marcador de actina) y los núcleos se marcaron con Hoescht (paneles centrales) o con el marcador de transición epitelio-mesénquima, E-cadherina (paneles inferiores) (barra de escala 20 μ m). Las imágenes magnificadas muestran la redistribución de E-cadherina desde los contactos célula-célula a los compartimentos intracelulares (barra de escala, 10 μ m). **(b)** Análisis por Western Blot de los niveles de E-cadherina en células MDA-MB-468 tratadas con exosomas Cav1WT y Cav1KO. **(c)** Ensayo de cierre de herida de las células MDA-MB-468 en presencia de los exosomas producidos por MEFs Cav1WT y MEFs Cav1KO. (Izquierda) Microscopía de contraste de fase mostrando el avance de las células hacia la zona de cierre (la línea blanca indica la posición del frente de avance a tiempo inicial y la línea roja su posición a tiempo final. (Derecha) Cuantificación del área relativa de la herida en los tiempos indicados (las barras de error indican valores medios \pm desviación estándar, n = 6). **(d)** Ensayo de migración en cámara de Boyden o Transwell. Se determinó el número de células MDA-MB-468 capaces de atravesar

la membrana tras el tratamiento con los exosomas indicados (las barras de error indican valores medios \pm desviación estándar, n = 3, ** p < 0,01).

4.5.2 Modelos tridimensionales

In vivo, las células y la matriz extracelular constituyen un entramado tridimensional (3D). Con el fin de aproximarnos a estas condiciones más fisiológicas, decidimos evaluar la capacidad de los exosomas de depositar matriz en un sistema tridimensional basado en la generación de esferoides a partir de las células tumorales MDA-MB-468. Estos esferoides son estructuras tridimensionales que se generan mediante ensamblaje de las células y que dependen tanto de la comunicación intercelular como de la organización de la ECM para su formación. Para ello, se cultivó el número de células deseado (en nuestro caso utilizamos 5000 células MDA-MB-468) en presencia de metilcelulosa y en suspensión, permitiendo su agregación hasta conseguir la formación de estructuras esféricas y compactas (ver materiales y métodos).

De este modo, se generaron esferoides incluyendo en la preparación exosomas derivados de fibroblastos Cav1WT y Cav1KO, además se incluyeron también en estos estudios exosomas producidos por MEFs Cav1WT silenciadas para la expresión de Cav1 (Cav1KD). De manera similar a lo observado en los estudios en dos dimensiones, los exosomas ricos en TnC derivados de los fibroblastos Cav1WT, pero no aquellos derivados de células Cav1KO o Cav1KD permitieron la formación de depósitos de TnC en el interior de los esferoides (**Figura R37a**). Además, en este modelo 3D se aprecia la presencia de TnC no sólo en forma de pequeños acúmulos sino formando estructuras fibrilares (no presentes en los modelos 2D), sugiriendo que fuerzas generadas por las propias células en este sistema tridimensional permiten el remodelado estructural de los depósitos, induciendo la formación de fibras de TnC. La reconstrucción tridimensional de la distribución de las fibras de TnC formadas en el interior del esferoide en presencia de exosomas Ca1WT mostraba una localización preferentemente en los espacios intersticiales formados entre las células (**Figura R37b**). Estos datos respaldarían nuevamente el papel de los exosomas como mecanismos transportadores de proteínas de matriz extracelular implicados en su deposición.

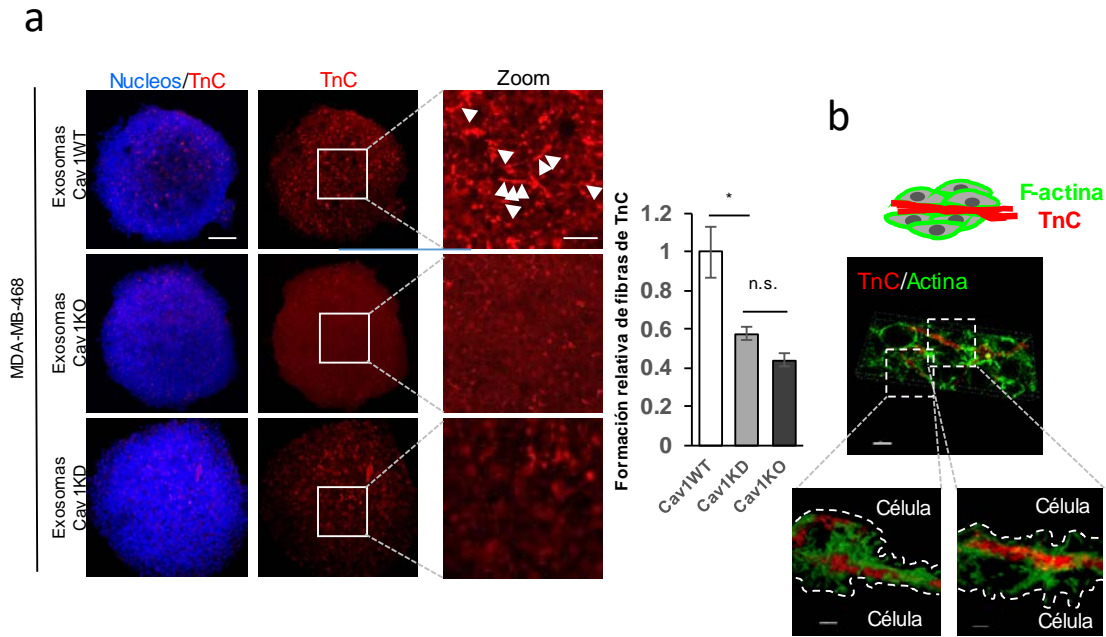


Figura R37. Los exosomas generan una matriz extracelular de TnC en modelos tridimensionales. (a) (Izquierda) Proyecciones máximas obtenidas por microscopía confocal de esferoides de MDA-MB-468 generados en presencia exosomas producidos por MEFs Cav1WT, Cav1KO y Cav1KD. TnC se marcó en rojo y los núcleos aparecen teñidos con Hoechst (azul) (barra de escala, 150 μ m). Las imágenes magnificadas muestran la distribución de TnC en el interior del esferoide (barra de escala, 50 μ m). Las flechas blancas indican la presencia de TnC organizada en forma de estructuras fibrilares. (Derecha) Cuantificación de la formación de fibras en el interior de los esferoides en cada una de las condiciones indicadas anteriormente (las barras de error indican valores medios \pm SEM, n = 3, * p < 0,05). **(b)** Reconstrucción tridimensional de la disposición de las fibras de TnC (rojo) en los esferoides. La delimitación de la periferia celular se realizó mediante tinción de la actina con el marcador faloidina (verde).

Para caracterizar los efectos inducidos por los exosomas Cav1WT y Cav1KO sobre los esferoides formados a partir de las células MDA-MB-468, éstos se depositaron sobre una superficie plana y se monitorizó *in vivo* el comportamiento migratorio de las células que los constituyen mediante microscopía de campo claro durante un periodo de 72 h. Los esferoides generados en presencia de exosomas derivados de los fibroblastos Cav1WT mostraron una migración significativamente mayor de las células periféricas del esferoide hacia el exterior comparados con los esferoides tratados con los exosomas Cav1KO (**Figura R38a**), que permanecieron altamente compactados. Para confirmar el papel de TnC en este proceso se llevó cabo el mismo ensayo utilizando exosomas derivados de fibroblastos TnCCKO (**Figura R38d**). Los resultados mostraron que los exosomas TnCCKO apenas estimulaban la capacidad migratoria de las células del esferoide en comparación con su control.

A continuación, evaluamos si estos cambios fenotípicos promovidos por exosomas Cav1WT sobre los esferoides tumorales se traducían también en cambios en su capacidad invasiva a través de diferentes sustratos. Para ello se llevaron a cabo ensayos de invasión en Matrigel (**Figura R38b**) y ensayos de invasión 3D en geles de colágeno (**Figura R38c**). Los resultados mostraron cómo los esferoides tratados con exosomas Cav1KO tenían una capacidad de invasión reducida respecto a los controles, similar a la producida por tratamiento de los esferoides con exosomas TncKO (**Figura R38e**).

Todo esto apoya nuevamente el hecho de que la capacidad de los exosomas producidos por los fibroblastos Cav1WT de inducir estos cambios fenotípicos y funcionales sobre los esferoides se deriva principalmente de la presencia de TnC y su capacidad para depositarla.

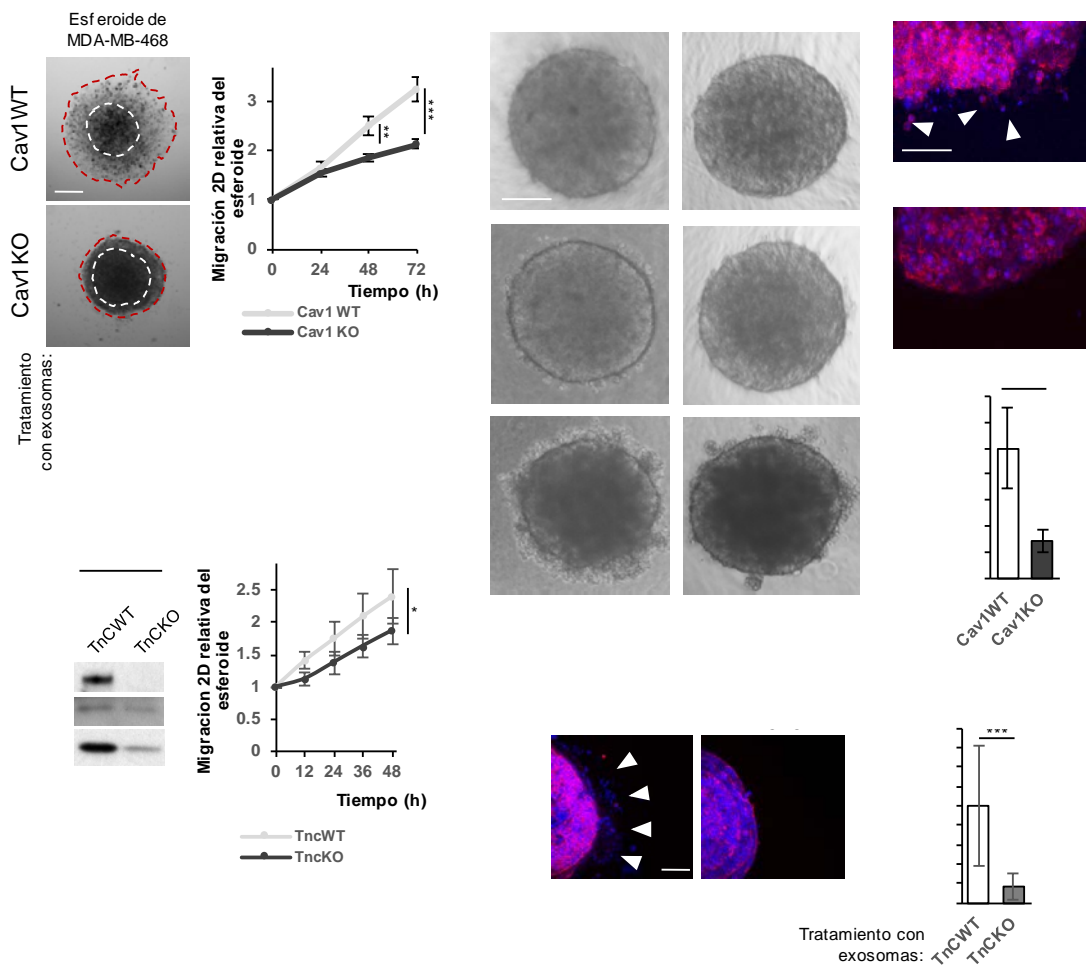


Figura R38. La matriz de TnC generada por los exosomas en el interior de los esferoides promueve la migración e invasión celular. (a-c) Estudio del efecto de los exosomas producidos por MEFs Cav1WT y Cav1KO sobre la capacidad migratoria e invasiva de los esferoides de células MDA-MB-468. **(a)** Los esferoides generados en presencia de los exosomas indicados se colocaron sobre una placa de 96 pocillos y se mantuvieron en cultivo durante 72 h para evaluar la capacidad migratoria de las células hacia el exterior del esferoide mediante microscopía de contraste de fase (barra de escala, 150 μ m). Las líneas blancas indican el lugar del frente de avance en momento inicial, mientras que las líneas rojas muestran la localización de su posición a tiempo final (72h). El gráfico muestra la cuantificación del área relativa de los esferoides en los tiempos indicados (las barras de error indican valores medios \pm SEM, n = 11, ** p < 0,01, *** p < 0,001). **(b)** Ensayo de invasión de los esferoides incluidos en Matrigel durante 24, 48 y 144h. Se muestran imágenes de microscopía de contraste de fase (barra de escala, 75 μ m). **(c)** Ensayo de invasión de los esferoides incluidos en geles de colágeno tipo I. La microscopía confocal muestra la tinción de los esferoides para la actina (usando faloidina, rojo) y los núcleos celulares (utilizando Hoescht, azul) que permite observar las células que han sido capaces de migrar a través del colágeno (flechas blancas) (barra de escala 50 μ m). En la parte inferior se muestra la cuantificación de la invasión relativa (las barras de error indican valores medios \pm desviación estándar, n = 24 esferoides, * p < 0,05). **(d-e)** Estudio de la migración e invasión de los esferoides de células MDA-MB-468 generados en presencia de exosomas producidos por MEFs TnCWT y TnCKO. **(d)** (Izquierda) El análisis mediante Western Blot muestra los niveles de TnC en los exosomas producidos por MEFs WT y TnCKO. (Derecha) Los esferoides generados en presencia de los exosomas TnCWT y TnCKO se depositaron sobre una placa de 96 pocillos y se mantuvieron en cultivo durante 72 h para evaluar la capacidad migratoria de las células hacia el exterior del esferoide mediante microscopía de contraste de fase. El gráfico muestra la cuantificación del área relativa de los esferoides en los tiempos indicados (las barras de error indican valores medios \pm SEM, n = 11, * p < 0,05). **(e)** Ensayo de invasión de los esferoides generados como en d) tras su inclusión en geles de colágeno tipo I. La capacidad invasiva se evaluó mediante microscopía confocal realizando la tinción de la actina celular con faloidina (rojo) y de los núcleos celulares con Hoechst (azul). Las flechas blancas muestran células que han sido capaces de invadir a través de la matriz de colágeno. (barra de escala 75 μ m). En la derecha se muestra la cuantificación de la invasión relativa (las barras de error indican valores medios \pm desviación estándar, n = 15 esferoides, * p < 0,05).

4.5.3 Los exosomas Cav1WT crean nichos ricos en TnC en un modelo animal *in vivo*

Los exosomas son secretados al medio extracelular y ocasionalmente pueden llegar al torrente sanguíneo para su diseminación por todo el organismo, pudiendo actuar como mensajeros entre diferentes órganos. De hecho, estudios previos muestran la capacidad de los exosomas producidos a partir de un tumor primario de inducir la formación de nichos pre-metastáticos en localizaciones distantes al lugar donde se han producido ^{157,158}. Por este motivo, se decidió evaluar la capacidad de los exosomas de generar puntos de nucleación de matriz extracelular en diferentes órganos mediante su diseminación a través del torrente sanguíneo. Para ello, marcamos exosomas Cav1WT y Cav1KO con la sonda fluorescente PKH67 inyectándose a través de la vena caudal de ratones TnCKO, cada 24h durante un periodo correspondiente a una semana. Pasado ese tiempo, se extrajeron los diferentes órganos pudiéndose apreciar mediante los estudios histopatológicos que tanto los pulmones como el hígado eran los órganos en los que se producía una acumulación preferencial de los exosomas inyectados

(Figura R39a). El posterior análisis de la presencia de TnC en estos órganos, reveló que sólo aparecían depósitos significativos de TnC en el caso de los ratones tratados con los exosomas Cav1WT, a pesar de que la cantidad de ambos tipos de exosomas alcanzaban de manera similar ambos órganos **(Figura R39b y R40)**. En el caso del hígado, la acumulación de TnC producida por los exosomas Cav1WT se localizaba principalmente en los sinusoides de este órgano, no apreciándose depósitos ni en los ratones inyectados con el vehículo (PBS) ni en aquellos tratados con exosomas Cav1KO **(Figura R39b)**. Respecto al pulmón, los niveles de exosomas que alcanzaron este órgano, fueron menores que los observados en el caso del hígado apareciendo parcialmente internalizados a nivel de ciertas células constituyentes de este órgano. Nuevamente la presencia de TnC en este órgano se produjo tras el tratamiento con exosomas Cav1WT localizándose preferentemente en la periferia de estas células **(Figura R40)**.

Todos estos datos demuestran que los exosomas pueden actuar como generadores de nuevos puntos de nucleación de matriz extracelular *in vivo*, creando así microambientes ricos en TnC que podrían potencialmente actuar como promotores para el desarrollo de futuras metástasis.

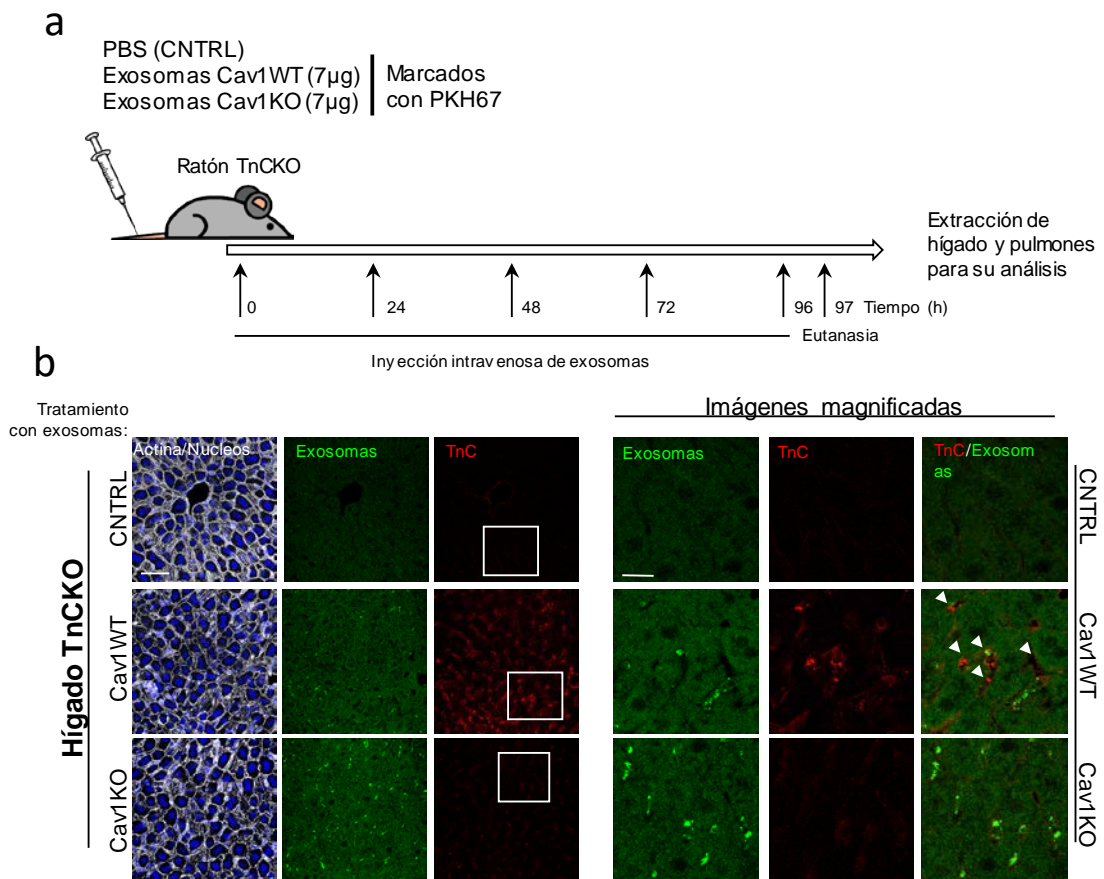


Figura R39. Los exosomas favorecen la deposición de TnC *in vivo* en diferentes tejidos: Hígado. (a) Esquema explicativo del procedimiento experimental. Los exosomas producidos por MEFs Cav1WT y Cav1KO fueron purificados y marcados con la sonda fluorescente PKH67. Los exosomas correspondientes a 7 µg de proteína fueron inyectados en ratones carentes de la expresión de TnC (ratones TnCKO). A continuación, se procedió a la eutanasia de los ratones y extracción de los diferentes órganos para su evaluación. Hígado y pulmones son los órganos principales de acumulación de los exosomas circulantes. (b) Análisis por microscopía confocal de la capacidad de los exosomas de generar nuevos puntos de nucleación en el hígado. Se muestran proyecciones máximas representativas obtenidas mediante microscopía confocal de cortes correspondientes a los hígados de los ratones tratados. La actina se marcó con faloidina (blanco), y la TnC aparece en rojo. Los exosomas marcados con PKH67 se muestran en verde (barra de escala, 60 µm). (Derecha) Imágenes ampliadas de la zona enmarcada muestran la presencia de depósitos de TnC generados por deposición a través de exosomas (flechas blancas) a nivel de los sinusoides hepáticos (barra de escala, 30 µm).

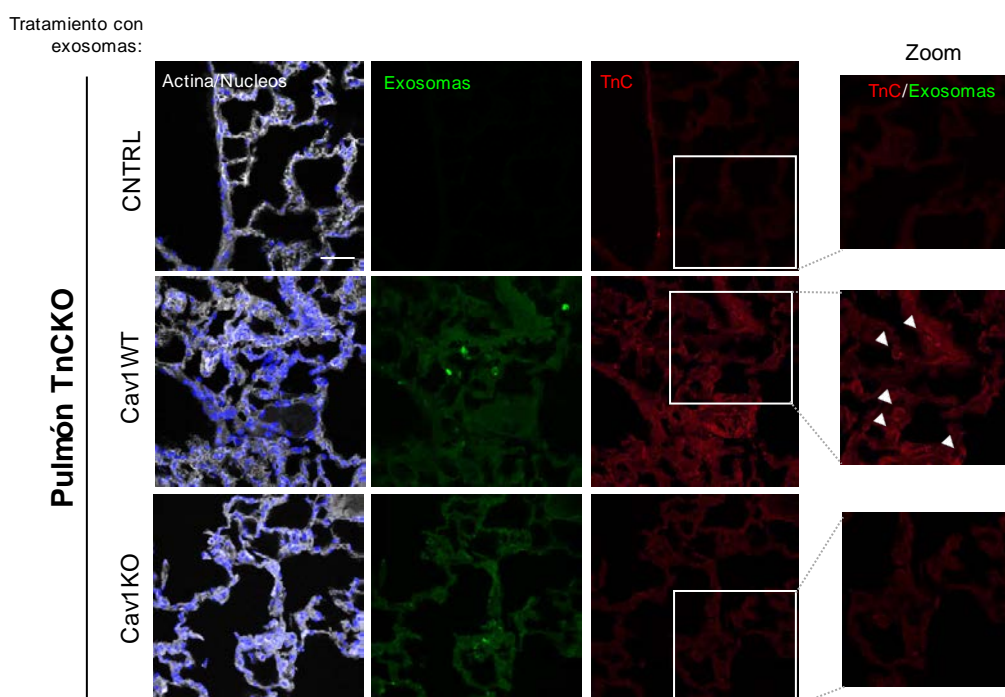


Figura R40. Los exosomas favorecen la deposición de TnC *in vivo* en diferentes tejidos: Pulmón. Análisis por microscopía confocal de la capacidad de los exosomas de generar nuevos puntos de nucleación de TnC en el pulmón. En las imágenes se muestran las proyecciones máximas obtenidas mediante microscopía confocal de los cortes correspondientes a los pulmones de los ratones tratados con exosomas. La actina se marcó con faloidina (blanco), y la TnC aparece en rojo. Los exosomas marcados con PKH67 se encuentran en verde (barra de escala, 60 µm). (Derecha) Las imágenes ampliadas de la zona enmarcada muestran la presencia de depósitos de TnC generados por deposición a través de exosomas (flechas blancas) a nivel de las células pulmonares (barra de escala, 30 µm).

05

DISCUSIÓN

Desde su descubrimiento, los exosomas se han convertido en uno de los campos más prometedores en el área de investigación biomédica dado su carácter ubicuo (al ser producidos por la mayoría de tipos celulares y estar presentes en la mayoría de los fluidos corporales ¹⁵⁰) y por su amplio abanico de funciones en situaciones fisiopatológicas. Uno de los marcos más estudiados es el papel de los exosomas en la comunicación entre las células tumorales y el estroma, en el que actúan no solo a nivel local sino también a distancia, permitiendo la modulación de diferentes respuestas a nivel sistémico ^{147 148 158 245}. Sin embargo, los mecanismos subyacentes a la biogénesis, la determinación de sus cargos y su funcionalidad siguen siendo desconocidos en muchos aspectos. A lo largo de esta Tesis Doctoral se ha abordado el papel de Caveolina-1 (Cav1) como elemento modulador en la biogénesis de exosomas y su impacto funcional. Mediante estudios comparativos de proteómica y lipidómica, hemos podido demostrar que Cav1 modula de manera específica los cargos que se incorporan a los exosomas a través de la segregación de diferentes subpoblaciones de exosomas mediante de su capacidad para regular los niveles de colesterol a nivel de los cuerpos multivesiculares (MVB, *MultiVesicular Body*).

En concreto, nuestros datos muestran que los exosomas derivados de fibroblastos que expresan Cav1 se encuentran significativamente enriquecidos en componentes de la matriz extracelular (ECM, *ExtraCellular Matrix*), siendo especialmente relevante la presencia de TnC, proteína de gran interés dada su implicación en la progresión tumoral ^{242 246}. Además, hemos visto que la inhibición de la biogénesis y secreción de exosomas impacta directamente en la deposición de ciertos componentes de matriz mostrando la importancia de estas nanovesículas como un nuevo mecanismo implicado en su deposición. Apoyando el papel relevante de Cav1 en este proceso, se ha demostrado que los exosomas derivados de fibroblastos que expresan Cav1 dan lugar a depósitos de TnC en áreas de la periferia de las células de tumor de mama (MDA-MB-468) lo que resulta en cambios en su migración e invasión.

Por otro lado, el papel de los exosomas en la deposición de ECM, se ha podido recapitular *in vivo*, lo que sugiere un papel fundamental de Cav1 en la modulación no sólo del estroma que rodea al tumor, sino también en la posible generación de nuevos nichos premetastáticos en órganos distantes.

Nuestro trabajo nos permite proponer a Cav1 como un elemento clave en la organización del microambiente tumoral a nivel local y en órganos distantes. Gracias a su capacidad de modular la plasticidad de los MVBs, Cav1 es capaz de modular la biogénesis de exosomas ricos en componentes de matriz que actúan como nuevos

vehículos para su deposición (**Figura D1**, modelo). Las posibles implicaciones de los resultados obtenidos, así como las propuestas para futuros trabajos y sus posibles aplicaciones se delinearán en este trabajo.

5.1 Cav1 en la biogénesis de exosomas

Cav1, es un elemento clave para la formación de caveolas y participa en la transducción y modulación de diversas rutas de señalización, estando implicada en multitud de procesos. Entre otros mecanismos, Cav1 interviene en la compartimentación e integración de señales gracias a su capacidad no sólo de modular la organización de la membrana mediante la generación de microdominios ricos en colesterol, sino de regular su dinámica a través de procesos de internalización^{168 197 198}. Ejemplo de ello es el control de los niveles de integrinas presentes en la membrana plasmática, así como de canales de iones o de ciertos receptores de hormonas como la insulina^{184 247 248}. Numerosos trabajos se han enfocado a entender cómo se regula la internalización de Cav1, aunque las señales que la desencadenan, así como sus posibles implicaciones funcionales aún se encuentran en estudio¹⁶⁶.

Una vez producida la endocitosis, Cav1 puede continuar en la vía endosomal, donde tal y como se ha observado, puede actuar como regulador de microdominios especializados en la compartimentación de cascadas de señalización^{206 207}. A continuación, aunque clásicamente se ha considerado esta internalización de Cav1 a los MVBs como una vía directa para su degradación a nivel lisosomal, recientes estudios muestran cómo estímulos tales como la perturbación del pH lisosomal, o cambios en los niveles de colesterol celular promueven la presencia de Cav1 en MVBs sin alterar su tasa de degradación¹⁹⁵, lo que apunta a la existencia de vías de regulación alternativas para esta población de Cav1. Nuestros datos muestran cómo los exosomas constituyen una de estas posibles vías.

En este trabajo hemos observado que al menos parte de la Cav1 que se endocita a través del sistema endosomal tiene como destino final su incorporación a los exosomas, a través de un proceso constituido por dos etapas consecutivas. Una primera, en la que la fosforilación en el residuo Y14 de Cav1 (inducida bien por estimulación por vanadato, o mediante desensamblaje de la caveolas a través de la eliminación de la expresión de PTRF) promueve su incorporación hasta la membrana externa de los endosomas tardíos/MVBs (**Figura R2**). Una vez allí, Cav1 puede incorporarse en las vesículas intraluminales (ILVs, *IntraLuminal Vesicle*) localizadas en el lumen de los endosomas tardíos a través de un proceso que depende directamente de su monoubiquitinación en los residuos de lisina localizados en su extremo N-terminal.

Finalmente, si los MVBs son dirigidos hacia la membrana plasmática, Cav1 será secretada formando parte de la membrana de los exosomas.

Estos datos ponen de manifiesto la existencia de una estrecha relación entre la fosforilación y ubiquitinación de Cav1, a través de la cual se conectan las señales que inducen su endocitosis con su tráfico intracelular y su presencia en exosomas.

El estudio de las conexiones existentes entre diferentes modificaciones post-traduccionales de proteínas es un campo emergente. En la actualidad se ha observado que ciertas modificaciones pueden afectar a otras presentes en diferentes dominios de una misma proteína, y que la regulación de un gran número de funciones celulares se encuentra condicionado por este tipo de interacciones, determinando las interacciones proteína-proteína ^{249 250}, el anclaje de proteínas a membranas específicas ²⁵¹ e incluso su tráfico intracelular ²⁵².

Por otro lado, diferentes trabajos señalan que cambios en las modificaciones post-traduccionales de proteínas localizadas en los MVBs pueden jugar un papel importante en la configuración de su destino hacia la fusión con el lisosoma o con la membrana plasmática para la liberación de los exosomas ^{121 129 253}. En el caso de Cav1, además de la fosforilación en su residuo de tirosina en posición 14 y su ubiquitinación a nivel amino terminal, otras modificaciones post-traduccionales tales como palmitoilación, podrían ser fundamentales para modular dinámicamente el balance de caveolina entre su degradación o su secreción exosomal ²⁵⁴ y actuar como mecanismo de incorporación selectiva a uno y otro tipo de MVBs. Estímulos específicos tales como la privación de suero o el tratamiento con rapamicina, redireccionan los MVBs para su fusión con el compartimento lisosomal ²⁵⁵. Nuevos estudios serán necesarios para evaluar el impacto que estos y otros estímulos tienen sobre Cav1 y/o sus diferentes modificaciones post-traduccionales para especificar su incorporación y liberación a través de los exosomas, así como el posible papel de Cav1 en la redirección de los MVBs.

Aunque nuestros datos demuestran que la endocitosis de Cav1 es una de las vías de entrada para su secreción a través de exosomas, no podemos descartar que otros compartimentos intracelulares tales como el retículo endoplasmático (ER) pueden también servir también como fuente de Cav1 para su incorporación exosomal.

Cav1 es un transportador del colesterol capaz de modular sus niveles en diferentes membranas celulares ¹⁹³. Como ejemplo, se ha observado que Cav1 promueve el transporte de colesterol de nueva síntesis desde el ER hasta la membrana plasmática ²⁰⁸. En este sentido, la ausencia de Cav1 a nivel celular reduce la secreción

de colesterol provocando la acumulación de esta molécula en el ER, y favoreciendo su transporte hasta las mitocondrias mediante los contactos que se establecen entre ambos compartimentos a través de las MAMs ^{214 216}. Por otro lado, una acumulación aberrante de Caveolina también puede generar un impacto en cuerpos lipídicos, provocando un desequilibrio en los niveles de colesterol ^{212,256 257}. En este trabajo hemos observado que, en las células carentes de la expresión de Cav1, los MVBs también muestran una acumulación de colesterol (**Figura R13**). Aunque nuestros datos no nos permiten descartar que parte de este colesterol acumulado en los MVBs provenga de procesos de endocitosis desde la membrana plasmática, una de las hipótesis más plausibles es que, de forma similar a lo que sucede a nivel mitocondrial y en cuerpos lipídicos, el tráfico de colesterol a este compartimento se produzca a través de los contactos existentes entre el ER y los MVBs ²³⁸, pudiendo producirse una transferencia bidireccional de colesterol entre ambos compartimentos dependiendo de los niveles de Cav1 ²⁰⁹.

Alteraciones en los niveles de colesterol en los MVBs pueden afectar la plasticidad y estructura de sus membranas, influyendo en los procesos de formación de las ILVs que se originan en su interior (futuros exosomas) condicionando tanto el número de invaginaciones como a su morfología ²³⁸. De hecho, elevados niveles de colesterol promueven la escisión temprana de las ILVs impidiendo que puedan progresar a estructuras de mayor tamaño ²³⁹. Nuestros datos apoyarían esto ya que, por un lado, muestran que la acumulación de colesterol en los MVBs en células que no expresan Cav1 o en células Cav1WT tratadas con el inhibidor farmacológico U18666A, resulta en la formación de única población de exosomas homogénea y de menor tamaño comparada con la heterogeneidad observada en los exosomas producidos por las células Cav1WT control (**Figura R14**). Pero, además, hemos podido observar que este exceso de colesterol también genera una alteración en la estructura de la membrana de los exosomas y su composición lipídica, así como un aumento en su secreción. Estos datos, por tanto, confirman la importancia de Cav1 como modulador de la plasticidad del MVBs en la formación de exosomas presumiblemente a través de su capacidad para generar microdominios de membrana ricos reguladores de colesterol a nivel de los endosomas.

Los exosomas pueden contener un gran número de cargos, cuya selección se produce durante el proceso de biogénesis. Es sabido que la maquinaria ESCRT participa en este proceso a través de la detección de proteínas monoubiquitinadas ¹⁰³, sin embargo aún se desconocen con exactitud qué otros mecanismos participan en la selección específica de los diferentes cargos durante la biogénesis de exosomas.

Nuestros resultados proteómicos tanto de exosomas como de lisados celulares muestran como la presencia o ausencia de Cav1 impactan de manera diferencial en la naturaleza de los componentes proteicos que se incorporan de forma selectiva a los exosomas. En concreto, una de las familias de proteínas enriquecidas en exosomas que expresan Cav1 corresponde a las proteínas relacionadas con la biogénesis y funciones endosomales (**Figura R18b**). Estos datos refuerzan por tanto la importancia de Cav1 en la formación de exosomas permitiendo la integridad y correcto funcionamiento de los MVBs durante el proceso de formación de ILVs.

En contraste con los exosomas producidos por las células Cav1WT, la población homogénea de exosomas secretados por las células Cav1KO muestra un significativo reclutamiento de anexinas. Esta familia de proteínas es capaz de unir colesterol en un proceso dependiente de Ca^{2+} ²⁵⁸ por lo que su incorporación en exosomas confirmaría el incremento en colesterol observado en MVBs Cav1KO que además, puede estar directamente relacionado con la tendencia de estos exosomas a agregar (datos observados), así como con la alteración observada en su arquitectura de membrana (**Figura R15**). En este mismo sentido hemos observado que en MEFs Cav1WT tratados con U18666A se produce una acumulación de Cav1 tanto en MVBs como en exosomas. Sin embargo, este aumento es menos significativo en el caso de la anexina A6 (datos no mostrados) comparado con exosomas Cav1KO, lo cual indicaría el papel de Cav1 en la regulación del colesterol endosomal y que de la misma manera que las anexinas tienen un papel en el tráfico de Cav1 ^{196 237} esta última podría también interferir en su biología.

Una de las enfermedades que cursa con una acumulación de colesterol a nivel de los endosomas tardíos es la enfermedad de Niemann-Pick C (NPC). Se trata de un síndrome genético autosómico recesivo que presenta un amplio espectro en su sintomatología, y aunque sus alteraciones más estudiadas son las que afectan al sistema neurológico, otros órganos como el hígado y el pulmón también se encuentran afectados ²⁵⁹. Esta enfermedad se produce principalmente como consecuencia de un desorden a nivel lisosomal, que provoca un defecto en el reciclaje y transferencia de este colesterol desde el MVB hacia otros compartimentos celulares como consecuencia de mutaciones en las proteínas NPC1 y NPC2 ^{260 261 262}. Este defecto en la dinámica de colesterol genera una reducción de este componente tanto a nivel del ER como de la PM provocando alteraciones relacionadas con la regulación del calcio lisosomal, el estrés oxidativo o el tráfico vesicular ^{260 261}.

Este secuestro del colesterol en los MVBs en la enfermedad de NPC induce el reclutamiento tanto de anexina A6 ^{263 264} como de Cav1, lo que provoca una reducción de los niveles de esta última en la PM ¹⁹⁵. Estos cambios en la distribución de Cav1 podrían estar afectando a las vías de señalización dependientes de caveolas localizadas en la membrana plasmática. En este sentido, resulta interesante el estudio en el que se ha observado deficiencias en la señalización de insulina, vía dependiente de Cav1, en cerebros de animales deficientes en NPC ^{265,266}.

Nuestro trabajo muestra cómo las células carentes de Cav1 se caracterizan por presentar una acumulación del colesterol a nivel endosomal acompañado de un reclutamiento de anexinas, simulando el fenotipo observado en células NPC. Estos datos indicarían un posible papel de Cav1 como mecanismo protector en el desarrollo de esta enfermedad de Niemann-Pick y opuesto al papel desempeñado por la anexinas ^{196 238}. Futuros estudios serán necesarios para entender cuál es la dinámica y la regulación bidireccional que existe entre Cav1 y anexinas a nivel endosomal como elementos moduladores del colesterol en este compartimento. Este aspecto sugiere la posibilidad de que cambios en el tráfico de Cav1 a MVBs en respuesta a estímulos específicos podrían ser usado para el desarrollo de dianas terapéuticas frente a esta enfermedad, así como una mejor comprensión de la sintomatología.

Junto al enriquecimiento en anexinas, los estudios proteómicos también nos permitieron identificar una acumulación de histonas y otras proteínas relacionadas con la regulación del ADN y ARN en exosomas producidos por células carentes de Cav1. Estos datos resultan de gran interés dado que la distribución canónica de este tipo de proteínas y de moléculas es principalmente nuclear. Recientes estudios muestran la presencia de histonas en los cuerpos lipídicos, en los que su unión se produce a través de proteínas de anclaje situadas específicamente en su membrana ²⁶⁷ jugando un papel fundamental en la respuesta antibacteriana ²⁶⁸. Estos estudios, junto con los datos obtenidos en este trabajo, sugieren la existencia de funciones de histonas más allá de la compactación de cromatina, y una posible relación de éstas con la regulación de las membranas lipídicas celulares. Sin embargo, estos aspectos deben ser aún ampliamente investigados con el fin de entender el vínculo entre estos elementos.

5.2 Caveolina y la regulación de la entrada de proteínas de matriz extracelular en los exosomas

Dentro del conjunto de proteínas específicamente incorporadas en los exosomas derivados de células Cav1WT, se identificó un subconjunto de proteínas correspondiente a proteínas de matriz extracelular (**Figura R18**). Dado el

desconocimiento que hasta el momento se tiene sobre los mecanismos implicados en la secreción de este tipo de proteínas al medio extracelular ⁸¹, estos resultados son especialmente relevantes, apuntando a los exosomas como un nuevo vehículo para el transporte de estas proteínas.

El único caso de proteínas de matriz para el que se ha descrito su mecanismo de secreción es el de los colágenos. Los colágenos son transportados a través de la ruta exocítica dependiente del tráfico mediado por vesículas positivas para COPII ⁸², siguiendo la ruta secretora clásica a través del Golgi hasta la membrana plasmática. Entre las proteínas de ECM que encontramos en exosomas positivos para Cav1, los colágenos apenas se encuentran representados, a excepción del colágeno tipo VI apoyando los datos anteriores que excluyen los exosomas como mecanismo para su transporte y secreción. De hecho, diferentes estudios han mostrado una correlación negativa entre la expresión de Cav1 y la deposición de colágenos durante los procesos fibróticos ^{229,269 270}, confirmando que en el caso de los colágenos, los exosomas no serían los responsables de su secreción.

Sin embargo, otras muchas proteínas fundamentales para la estructura de la ECM como FN, TnC, nidógeno o emilina sí que se encuentran significativamente enriquecidas en exosomas derivados de células Cav1WT, corroborando la selectividad de los exosomas como vehículo de secreción de ciertos componentes de esta familia de proteínas de matriz.

La confirmación de la implicación de los exosomas como mecanismo regulador en la formación de ECM se llevó a cabo utilizando diferentes estrategias, basadas tanto en el tratamiento farmacológico como por el silenciamiento de los componentes específicos implicados en la biogénesis y secreción de exosomas. En todos los casos, la inhibición de la ruta de formación de exosomas provocó una reducción en la deposición de algunas de las proteínas de matriz más relevantes, entre las que destacan TnC y FN (**Figura R26 y R27**) asociada, en la mayor parte de los casos, con una acumulación de estos componentes a nivel intracelular (principalmente en ER). Es importante destacar, que esta acumulación no mostraba un mismo patrón en todas las condiciones estudiadas (en unos casos la acumulación era más evidente que en otros), postulando que estas diferencias pueden ser debidas a una distinta tasa en la capacidad de degradación de estos acúmulos intracelulares. Apoyando esta hipótesis, nuestros datos confirman que la adición de cloroquina, un bloqueante de la actividad lisosomal, dio lugar a un incremento en la presencia de estos acúmulos intracelulares de componentes de matriz (**Figura R34b y c**).

Tal y como se indicó en la introducción, dentro de los mecanismos de biogénesis se han identificado mecanismos dependientes e independientes de la maquinaria ESCRT. Nuestros datos muestran cómo tanto la vía dependiente de ESCRT como la vía mediada por ceramida influyen en la deposición de TnC y FN, aunque es esta última la que impacta de forma más drástica en su deposición. Tras la inhibición de la actividad de las SMasas neutrales (nSMasas), la incapacidad de secreción de TnC y FN a través de los exosomas provoca su acumulación intracelular, mostrando un fenotipo similar al de las células carentes de Cav1 (**Figura R28 y R31**). La esfingomielinasas se caracterizan por catalizar la conversión de esfingomielina a ceramida y fosforilcolina ¹²⁰. Por tanto, su inhibición provoca una reducción de los niveles de ceramida en las membranas celulares, incluida la membrana de los MVBs. Esta disminución, tal y como se ha descrito, conlleva una reducción en la formación de ILVs, aunque el mecanismo por el cual ocurre aún no se ha determinado ¹²¹. Curiosamente además, diferentes estudios han descrito la capacidad de ceramida para actuar como mecanismo de regulación del colesterol de los DRMs permitiendo el desplazamiento de este componente fuera de estos microdominios ²⁷¹. Estos resultados sugieren que la inhibición de las esfingomielinasas provocaría un descenso en los niveles de ceramida a nivel de los MVB resultando en una elevación del colesterol en los microdominios presentes en este compartimento, dando lugar a un fenotipo similar al mostrado por las células sin Cav1, o a las situaciones en las que se fuerza una acumulación de colesterol en los MVBs (mediante tratamiento con U18666A). Esto explicaría la incapacidad de incorporar TnC o FN a los exosomas en células tratadas con GW4869 resultando en una reducción en la deposición de estos componentes a nivel extracelular vía exosomas, concomitante con su acumulación a nivel intracelular tal y como sucede en células que no expresan Cav1.

Para poder entender en más detalle el mecanismo molecular a través del cual se produce la incorporación de TnC a los exosomas, se realizaron diferentes abordajes bioquímicos que nos permitieron descartar tanto la vía endocítica como la unión inespecífica (unión de TnC a los exosomas con posterioridad a su secreción) como vías de entrada de este componente de matriz. Nuestros datos apuntan a una incorporación de TnC a nivel intracelular desde el retículo, donde se sintetiza ²⁷² hasta los MVBs. Cómo se produce esta transferencia entre ambos compartimentos, es algo que aún no se conoce y que, por tanto, abre un nuevo campo de investigación. Sin embargo, recientes estudios señalan la naturaleza dinámica del ER como un compartimento capaz de establecer contactos de membrana con multitud de orgánulos intracelulares, entre los que se incluyen los endosomas tardíos/MVBs ^{214 273,274}. Estas uniones se ha

visto que participan en la maduración de los endosomas, así como en su posicionamiento celular, en la selección de cargos o en la transferencia bidireccional de colesterol entre ambos compartimentos ^{273 275}, pudiendo por tanto servir como vía para la incorporación de TnC a los exosomas.

El contacto entre RE-MVBs se ha descrito que depende de la interacción entre diferentes proteínas, especialmente miembros de la familia ORP (ORP1L y ORP5) ²⁷⁶. Nuestro grupo ha demostrado recientemente la importancia de Cav1 como un elemento modulador en el establecimiento de los contactos que se producen entre el ER y las mitocondrias ²¹⁴, sugiriendo la posibilidad de que Cav1 pueda estar también implicada en el establecimiento de los contactos ER-MVBs a través de su capacidad de modular el colesterol entre estos compartimentos, y por tanto participando activamente en la regulación de la transferencia de TnC entre ellos.

Por otro lado, recientes estudios muestran cómo durante la biogénesis de lisosomas, se produce la incorporación de proteínas a este compartimento directamente tras su síntesis *de novo* a través de un sistema vesicular que se origina desde el ER en ruta hacia los lisosomas ^{277 278}. En nuestro caso, no podemos descartar que un mecanismo de naturaleza vesicular similar pueda estar también operando en el tráfico de TnC a los MVBs originándose desde el ER o desde el Golgi hasta los MVBs. Nuevos estudios enfocados a bloquear el tráfico desde el ER o el Golgi, o dirigidos a alterar los contactos ER-MVBs mediante silenciamiento de componentes implicados en estos contactos, nos permitirán tener una visión clara sobre cuál es la ruta concreta a través de la cual TnC se específicamente incorporada a los exosomas.

5.3 Los exosomas como vehículos para depositar y generar una matriz rica en TnC. Implicaciones funcionales

La formación de la matriz extracelular es un proceso complejo que requiere no sólo de la deposición de proteínas de matriz sino de su adecuado ensamblaje y organización en estructuras fibrilares, permitiendo la generación de un soporte estructural. Experimentos realizados *in vitro* han demostrado que en el caso de la fibronectina inicialmente se produce su deposición formando núcleos/puntos de ensamblaje a partir de los cuales tiene lugar su polimerización en estructuras de mayor tamaño molecular ²⁷⁹. En el remodelado posterior sin embargo es necesaria la fuerza de tracción que ejercen las células para la formación de fibras a través de las uniones focales provocando cambios en la arquitectura final de la matriz ⁶².

En nuestro trabajo, hemos podido demostrar que los exosomas producidos por los MEFs Cav1WT, y que se encuentran enriquecidos en TnC, son capaces de generar depósitos de TnC tanto en ensayos 2D como en ensayos 3D (esferoides). Sin embargo, sólo en esta última condición, la TnC depositada es capaz de reorganizarse en fibras de mayor longitud visibles en el interior del esferoide con consecuencia de las fuerzas que se ejercen por parte de las células en condiciones 3D (**Figura R37**).

La similitud en la respuesta celular mediada por los exosomas producidos por fibroblastos que carecen de la expresión de TnC y aquellos que carecen de la expresión de Cav1 (**Figura R38**) en comparación con el efecto producido por los exosomas producidos por fibroblastos Cav1WT sugieren un papel principal de la presencia de TnC en éstos últimos. De hecho, nuestros resultados muestran cómo los exosomas derivados de células Cav1WT, ricos en TnC, producen un doble efecto sobre las células tumorales. Por un lado, la deposición de TnC mediada por estos exosomas en áreas de la periferia celular promueve cambios en su morfología similares a un proceso de transición epitelio mesénquima, resultando en un incremento de su capacidad migratoria y de su capacidad invasiva (en ensayos 2D y 3D). Estos resultados son similares a los descritos en otros trabajos en los que la adición de TnC recombinante al medio de cultivo de las células provoca cambios morfológicos de una naturaleza similar a la inducida por los exosomas ricos en TnC ²⁸⁰, reforzando la importancia de TnC a nivel exosomal.

Por otro lado, además de este efecto local, nuestros datos *in vivo* muestran cómo los exosomas son capaces de ser transportados a través del torrente sanguíneo hasta alcanzar diferentes órganos, observándose una mayor acumulación de estas nanovesículas tanto en el hígado como en el pulmón, tejidos en los que aparecen nuevos núcleos ricos en TnC (**Figura R39 y R40**) Estos datos son especialmente relevantes, porque señalan la posibilidad de que los exosomas puedan actuar como un nuevo mecanismo en la generación de cambios en la composición de matriz en tejidos distantes.

Numerosos estudios demuestran que el microambiente necesario para la formación de los futuros sitios de metástasis, conocidos como nichos premetastáticos, se generan incluso antes de la llegada y colonización de las células tumorales, como consecuencia de cambios en la composición y organización de la matriz extracelular de los tejidos diana ^{76 78,155}. Aunque aún no se conocen con exactitud los mecanismos subyacentes a este proceso, trabajos recientes muestran cómo las células tumorales podrían influir en la formación de estos nichos premetastáticos mediante la activación secuencial y a distancia de diferentes tipos celulares a través de exosomas que las

propias células tumorales secretan, provocando en último término un incremento en su capacidad de metastatizar ¹⁵⁸. Nuestros datos, apuntan a que es posible que no sólo los exosomas tumorales sino los producidos por el propio estroma tumoral (fibroblastos) sean capaces de modular la formación de estos nichos, mediante el envío selectivo de proteínas de matriz extracelular a través de exosomas hasta los órganos diana donde posteriormente se producirá la metástasis. Nuevos estudios serán necesarios para evaluar el impacto que estos depósitos de TnC mediado por los exosomas producen sobre la capacidad de reclutamiento de las células tumorales a órganos específicos para generar metástasis.

El papel de Cav1 durante la progresión tumoral es muy complejo. A nivel de las células tumorales, se ha visto que los niveles de expresión de Cav1 fluctúan dependiendo de la fase en la que se encuentra en tumor. En etapas iniciales, la expresión de Cav1 en los tumores se reduce considerablemente, produciéndose un incremento de su expresión en aquellos tumores más agresivos y con una mayor capacidad de producir metástasis ²⁸¹. En el desarrollo de la progresión tumoral, las investigaciones que se han realizado se han centrado principalmente en la comprensión de la biología de las células tumorales.

Sin embargo, en la actualidad, cada vez existen más evidencias de que el ambiente que rodea los tumores juega un papel crucial en la progresión tumoral, e incluso en la propia transformación de las células de tejidos sanos ^{9 54 64 66}. Este aspecto aumenta considerablemente la complejidad del papel de Cav1 en el desarrollo tumoral. Por un lado, la ausencia de expresión de Cav1 en TAFs se ha visto que influye directamente en la desregulación metabólica del tumor favoreciendo el proceso tumoral ^{225,228}, mientras que otros grupos incluidos el nuestro hemos observado que un aumento de Cav1 en estos fibroblastos promueven el remodelado de la matriz favoreciendo su capacidad de generar metástasis ^{70 282}. El trabajo mostrado en esta tesis, nos permite extender el conocimiento sobre la implicación de Cav1 en cáncer, postulando que cambios en los niveles de Cav1 en los TAFs a lo largo de la progresión tumoral podrían servir como mecanismo de regulación del tipo de proteínas de matriz específicamente secretadas por estas células.

Múltiples trabajos muestran cómo la pérdida de expresión de Cav1 en los fibroblastos se correlaciona con un aumento en su capacidad para depositar colágeno, siguiendo la vía exocítica ER-Golgi ^{82 229} y dando lugar a un proceso fibrótico ²⁸³. Por tanto, es posible que, en etapas iniciales de la progresión tumoral, los TAFs muestren bajos niveles de Cav1 promoviendo un enriquecimiento en colágeno del estroma

tumoral. El endurecimiento y rigidez que esta proteína de matriz confiere, serviría como mecanismo de encapsulamiento del tumor. Sin embargo, una secreción sostenida de colágeno a lo largo del tiempo provocaría una rigidez extrema del estroma tumoral provocando una inducción de la expresión de Cav1 en los TAFs ^{55 60}. En esta segunda etapa, la elevación de la expresión de Cav1 provocaría que estos fibroblastos redujesen la secreción de colágeno, activándose las rutas de secreción de otras proteínas de matriz tales como TnC o FN a través de exosomas. Estas dos proteínas (TnC y FN) se encuentran estrechamente relacionadas con la migración celular y la adquisición de marcadores mesenquimales ^{69,242,280} en las células epiteliales, por lo que un aumento en su deposición provocaría la ruptura de ese encapsulamiento tumoral promoviendo su capacidad invasiva. Nuevos estudios serán necesarios para confirmar esta hipótesis, y para entender cómo es realmente la dinámica de regulación de Cav1 en el estroma tumoral a lo largo del tiempo, abriendo la posibilidad de identificar nuevos mecanismos para la actuación contra la progresión tumoral.

Por otro lado, se ha visto que alteraciones en la matriz extracelular se encuentran asociadas al desarrollo de diferentes enfermedades que cursan con fibrosis ^{5 10} y en las que Cav1 también podría estar jugando un papel fundamental ²²⁹. Aunque la deposición de ECM es un proceso que se encuentra exacerbado en numerosas patologías, constituye al mismo tiempo un mecanismo esencial para el mantenimiento de múltiples procesos fisiológicos, entre los que se incluye la mineralización ósea ²⁸⁴. Diferentes estudios muestran cómo la nucleación de ECM en los huesos sirve de soporte para su posterior calcificación. Trabajos recientes muestran cómo los exosomas están implicados en la regulación de este proceso y que ratones deficientes en las esfingomielinasas neutrales 1 y 2 presentan una displasia severa a nivel del tejido óseo ^{285 286}. Nuevos estudios empleando estos modelos animales de ratón serán necesarios para entender la importancia relativa de los exosomas en la composición y deposición de la matriz extracelular en los diferentes órganos.

Además del papel de los exosomas en cáncer, se ha visto que la secreción de estas nanovesículas también se encuentra alterada en diferentes enfermedades metabólicas, con especial atención en el caso de la aterosclerosis, donde los exosomas se ha visto que están implicados en el metabolismo de colesterol de los monocitos y macrófagos, la activación de las células endoteliales y las plaquetas y en la proliferación del músculo liso ^{148 287}. Además, también se ha apreciado que la secreción de exosomas puede mejorar los niveles de colesterol en células NPC ²⁸⁸. Por otro lado, se ha observado que Cav1 es un componente esencial para la transcitosis de LDL a través del endotelio ^{289 290 291}. Curiosamente, la ausencia de Cav1 produce hipercolesterolemia,

pero al mismo tiempo protege contra el desarrollo de las placas de ateroma. Nuevos estudios serán necesarios para confirmar si la modulación de la biogénesis de exosomas a través de Cav1 podría proporcionar una forma alternativa de regular los niveles de colesterol, así como la carga específica de moléculas pro-aterogénicas.

Por último, en el plasma de pacientes con melanoma se han detectado exosomas que expresan elevados niveles de Cav1 ²³⁰. Nosotros proponemos que el análisis de la expresión de Cav1 en los exosomas podrían ser un valioso marcador de prognosis de la capacidad de metástasis y malignidad tumoral, así como de otras enfermedades relacionadas con alteraciones del colesterol. Los resultados obtenidos en la presente tesis, abren nuevas vías para el diagnóstico, prevención e incluso para la intervención terapéutica basada en el papel de Cav1 en la regulación de la comunicación estroma-tumor a través de exosomas.

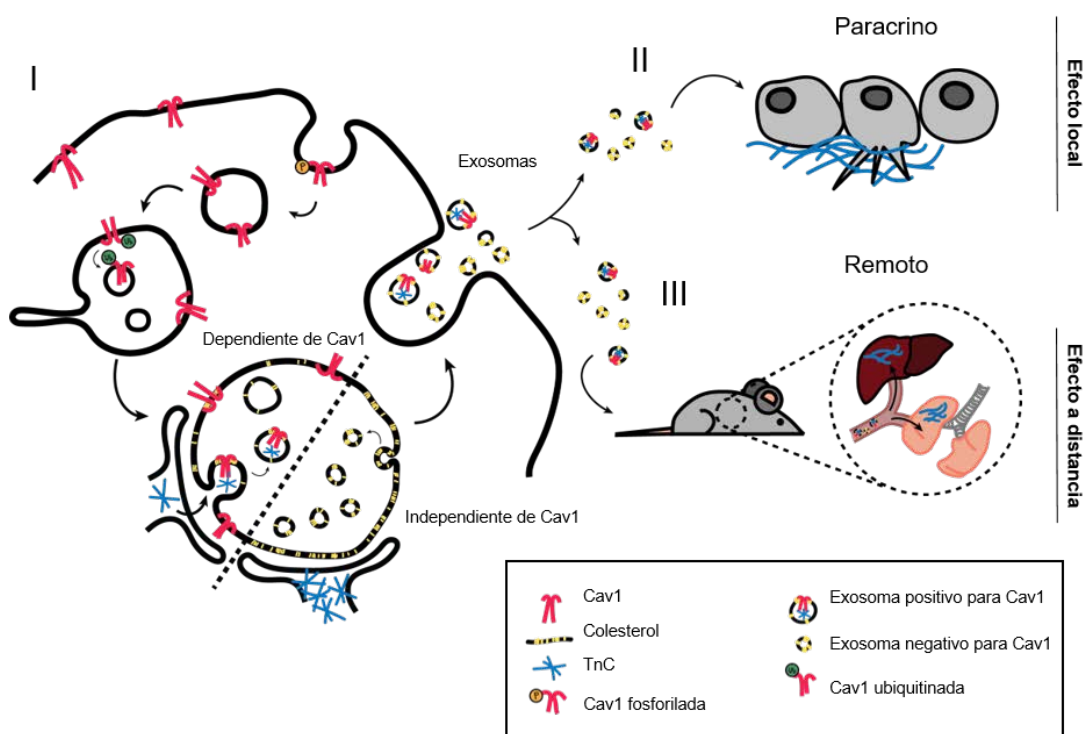


Figura D1. Modelo general. Modelo propuesto del papel de Cav1 en la deposición de ECM a través de exosomas. (I) La Cav1 endocitada entra en los MVBs, donde promueven la heterogeneidad en tamaño y composición de los exosomas, favoreciendo la entrada de componentes de ECM. (II) Los exosomas derivados de fibroblastos Cav1WT estimulan la formación de protrusiones y la actividad motil de células derivadas de cáncer de mama mediante la nucleación de ECM (TnC) local, rodeando las células tumorales. (III) Los exosomas derivados de fibroblastos Cav1WT pueden también generar depósitos ricos en ECM a largas distancias de donde se secretan a través del torrente sanguíneo, permitiendo la formación de posibles nichos pre-metastáticos.

06

CONCLUSIONES

- **Cav1 se encuentra presente en los exosomas derivados de la gran mayoría de tipos celulares que la expresan.**
- **La entrada de Cav1 en los exosomas es dependiente de su endocitosis y consiste en un proceso dividido en dos etapas consecutivas en las que Cav1 es primero fosforilada y posteriormente ubiquitinada.**
- **Cav1 es capaz de regular los niveles de colesterol en los cuerpos multivesiculares, influyendo directamente en la biogénesis de exosomas**
- **La selección e incorporación de proteínas de matriz extracelular como cargos específicos en exosomas es dependiente de la presencia de Cav1.**
- **Los exosomas actúan como elemento clave en la deposición y la formación de matriz de TnC y FN.**
- **La incorporación de TnC a los exosomas se produce a través de su síntesis *de novo*.**
- **La TnC localizada en exosomas promueve un fenotipo similar a una transición epitelio-mesénquima en células tumorales, induciendo un incremento en su motilidad y capacidad invasiva.**
- **Los exosomas que circulan a través del torrente sanguíneo son capaces de generar nuevos puntos de nucleación de matriz extracelular en órganos distantes.**

07

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Kropotkin, P. A. & Prat, J. *El Apoyo mutuo : un factor de la evolución.* (F. Sempere y Compañía, 1906).
- 2 Ortega y Gasset, J. *Meditaciones del Quijote.* (s. n., 1914).
- 3 Hynes, R. O. The evolution of metazoan extracellular matrix. *J Cell Biol* **196**, 671-679, doi:10.1083/jcb.201109041 (2012).
- 4 Ozbek, S., Balasubramanian, P. G., Chiquet-Ehrismann, R., Tucker, R. P. & Adams, J. C. The evolution of extracellular matrix. *Mol Biol Cell* **21**, 4300-4305, doi:10.1091/mbc.E10-03-0251 (2010).
- 5 Cox, T. R. & Erler, J. T. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis Model Mech* **4**, 165-178, doi:10.1242/dmm.004077 (2011).
- 6 Frantz, C., Stewart, K. M. & Weaver, V. M. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* **123**, 4195-4200, doi:10.1242/jcs.023820 (2010).
- 7 Alberts, B. *Molecular biology of the cell.* 4th ed edn, (Garland Science, 2002).
- 8 Egeblad, M., Rasch, M. G. & Weaver, V. M. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Curr Opin Cell Biol* **22**, 697-706, doi:10.1016/j.ceb.2010.08.015 (2010).
- 9 Kass, L., Erler, J. T., Dembo, M. & Weaver, V. M. Mammary epithelial cell: influence of extracellular matrix composition and organization during development and tumorigenesis. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 1987-1994, doi:10.1016/j.biocel.2007.06.025 (2007).
- 10 Bonnans, C., Chou, J. & Werb, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 786-801, doi:10.1038/nrm3904 (2014).
- 11 Mott, J. D. & Werb, Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 558-564, doi:10.1016/j.ceb.2004.07.010 (2004).
- 12 Arpino, V., Brock, M. & Gill, S. E. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biol* **44-46**, 247-254, doi:10.1016/j.matbio.2015.03.005 (2015).
- 13 Trackman, P. C. Functional importance of lysyl oxidase family propeptide regions. *J Cell Commun Signal* **12**, 45-53, doi:10.1007/s12079-017-0424-4 (2018).
- 14 Perryman, L. & Erler, J. T. Lysyl oxidase in cancer research. *Future Oncol* **10**, 1709-1717, doi:10.2217/fon.14.39 (2014).
- 15 Hynes, R. O. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* **326**, 1216-1219, doi:10.1126/science.1176009 (2009).
- 16 Gentili, C. & Cancedda, R. Cartilage and bone extracellular matrix. *Curr Pharm Des* **15**, 1334-1348 (2009).
- 17 Gillies, A. R. & Lieber, R. L. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle Nerve* **44**, 318-331, doi:10.1002/mus.22094 (2011).
- 18 Mariman, E. C. & Wang, P. Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. *Cell Mol Life Sci* **67**, 1277-1292, doi:10.1007/s00018-010-0263-4 (2010).
- 19 Ashkenas, J., Muschler, J. & Bissell, M. J. The extracellular matrix in epithelial biology: shared molecules and common themes in distant phyla. *Dev Biol* **180**, 433-444, doi:10.1006/dbio.1996.0317 (1996).
- 20 Ruoslahti, E. Brain extracellular matrix. *Glycobiology* **6**, 489-492 (1996).
- 21 Ricard-Blum, S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, a004978, doi:10.1101/cshperspect.a004978 (2011).
- 22 Kadler, K. E., Baldock, C., Bella, J. & Boot-Handford, R. P. Collagens at a glance. *J Cell Sci* **120**, 1955-1958, doi:10.1242/jcs.03453 (2007).
- 23 Gordon, M. K. & Hahn, R. A. Collagens. *Cell Tissue Res* **339**, 247-257, doi:10.1007/s00441-009-0844-4 (2010).
- 24 Hamaia, S. & Farndale, R. W. Integrin recognition motifs in the human collagens. *Adv Exp Med Biol* **819**, 127-142, doi:10.1007/978-94-017-9153-3_9 (2014).

- 25 Heino, J. Cellular signaling by collagen-binding integrins. *Adv Exp Med Biol* **819**, 143-155, doi:10.1007/978-94-017-9153-3_10 (2014).
- 26 Sudhakar, A. *et al.* Human alpha1 type IV collagen NC1 domain exhibits distinct antiangiogenic activity mediated by alpha1beta1 integrin. *J Clin Invest* **115**, 2801-2810, doi:10.1172/JCI24813 (2005).
- 27 Hamano, Y. *et al.* Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin. *Cancer Cell* **3**, 589-601 (2003).
- 28 Plow, E. F., Haas, T. A., Zhang, L., Loftus, J. & Smith, J. W. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* **275**, 21785-21788, doi:10.1074/jbc.R000003200 (2000).
- 29 Humphries, J. D., Byron, A. & Humphries, M. J. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci* **119**, 3901-3903, doi:10.1242/jcs.03098 (2006).
- 30 Aumailley, M. The laminin family. *Cell Adh Migr* **7**, 48-55, doi:10.4161/cam.22826 (2013).
- 31 Domogatskaya, A., Rodin, S. & Tryggvason, K. Functional diversity of laminins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**, 523-553, doi:10.1146/annurev-cellbio-101011-155750 (2012).
- 32 Skorstengaard, K., Jensen, M. S., Sahl, P., Petersen, T. E. & Magnusson, S. Complete primary structure of bovine plasma fibronectin. *Eur J Biochem* **161**, 441-453 (1986).
- 33 Pankov, R. & Yamada, K. M. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* **115**, 3861-3863 (2002).
- 34 Sottile, J. & Chandler, J. Fibronectin matrix turnover occurs through a caveolin-1-dependent process. *Mol Biol Cell* **16**, 757-768, doi:10.1091/mbc.e04-08-0672 (2005).
- 35 Huang, W., Chiquet-Ehrismann, R., Moyano, J. V., Garcia-Pardo, A. & Orend, G. Interference of tenascin-C with syndecan-4 binding to fibronectin blocks cell adhesion and stimulates tumor cell proliferation. *Cancer Res* **61**, 8586-8594 (2001).
- 36 Pontiggia, O. *et al.* The tumor microenvironment modulates tamoxifen resistance in breast cancer: a role for soluble stromal factors and fibronectin through beta1 integrin. *Breast Cancer Res Treat* **133**, 459-471, doi:10.1007/s10549-011-1766-x (2012).
- 37 Williams, C. M., Engler, A. J., Slone, R. D., Galante, L. L. & Schwarzbauer, J. E. Fibronectin expression modulates mammary epithelial cell proliferation during acinar differentiation. *Cancer Res* **68**, 3185-3192, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2673 (2008).
- 38 Topalovski, M. & Brekken, R. A. Matrix control of pancreatic cancer: New insights into fibronectin signaling. *Cancer Lett* **381**, 252-258, doi:10.1016/j.canlet.2015.12.027 (2016).
- 39 Jones, F. S. & Jones, P. L. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn* **218**, 235-259, doi:10.1002/(SICI)1097-0177(200006)218:2<235::AID-DVDY2>3.0.CO;2-G (2000).
- 40 Wenk, M. B., Midwood, K. S. & Schwarzbauer, J. E. Tenascin-C suppresses Rho activation. *J Cell Biol* **150**, 913-920 (2000).
- 41 Midwood, K. S. & Schwarzbauer, J. E. Tenascin-C modulates matrix contraction via focal adhesion kinase- and Rho-mediated signaling pathways. *Mol Biol Cell* **13**, 3601-3613, doi:10.1091/mbc.e02-05-0292 (2002).
- 42 Westhoff, M. A., Serrels, B., Fincham, V. J., Frame, M. C. & Carragher, N. O. SRC-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase couples actin and adhesion dynamics to survival signaling. *Mol Cell Biol* **24**, 8113-8133, doi:10.1128/MCB.24.18.8113-8133.2004 (2004).
- 43 Forsberg, E. *et al.* Skin wounds and severed nerves heal normally in mice lacking tenascin-C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6594-6599 (1996).

- 44 Akbareian, S. E. *et al.* Enteric neural crest-derived cells promote their migration by modifying their microenvironment through tenascin-C production. *Dev Biol* **382**, 446-456, doi:10.1016/j.ydbio.2013.08.006 (2013).
- 45 Chiquet-Ehrismann, R., Orend, G., Chiquet, M., Tucker, R. P. & Midwood, K. S. Tenascins in stem cell niches. *Matrix Biol* **37**, 112-123, doi:10.1016/j.matbio.2014.01.007 (2014).
- 46 Midwood, K. S. & Orend, G. The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. *J Cell Commun Signal* **3**, 287-310, doi:10.1007/s12079-009-0075-1 (2009).
- 47 Marini, J. C. *et al.* Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen: regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans. *Hum Mutat* **28**, 209-221, doi:10.1002/humu.20429 (2007).
- 48 Pober, B. R. Williams-Beuren syndrome. *N Engl J Med* **362**, 239-252, doi:10.1056/NEJMra0903074 (2010).
- 49 Jarvelainen, H., Sainio, A., Koulu, M., Wight, T. N. & Penttinen, R. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* **61**, 198-223, doi:10.1124/pr.109.001289 (2009).
- 50 Wynn, T. A. & Ramalingam, T. R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med* **18**, 1028-1040, doi:10.1038/nm.2807 (2012).
- 51 Pickup, M. W., Mouw, J. K. & Weaver, V. M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep* **15**, 1243-1253, doi:10.15252/embr.201439246 (2014).
- 52 Quail, D. F. & Joyce, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* **19**, 1423-1437, doi:10.1038/nm.3394 (2013).
- 53 Fidler, I. J. & Kripke, M. L. The challenge of targeting metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **34**, 635-641, doi:10.1007/s10555-015-9586-9 (2015).
- 54 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013 (2011).
- 55 Lu, P., Weaver, V. M. & Werb, Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol* **196**, 395-406, doi:10.1083/jcb.201102147 (2012).
- 56 Yurchenco, P. D. Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, doi:10.1101/cshperspect.a004911 (2011).
- 57 Clark, A. G. & Vignjevic, D. M. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Curr Opin Cell Biol* **36**, 13-22, doi:10.1016/j.ceb.2015.06.004 (2015).
- 58 Bartolome, R. A. *et al.* Stromal cell-derived factor-1 α promotes melanoma cell invasion across basement membranes involving stimulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and Rho GTPase activities. *Cancer Res* **64**, 2534-2543 (2004).
- 59 Halper, J. & Kjaer, M. Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. *Adv Exp Med Biol* **802**, 31-47, doi:10.1007/978-94-007-7893-1_3 (2014).
- 60 Kalluri, R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* **16**, 582-598, doi:10.1038/nrc.2016.73 (2016).
- 61 Humphrey, J. D., Dufresne, E. R. & Schwartz, M. A. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 802-812, doi:10.1038/nrm3896 (2014).
- 62 Malik, R., Lelkes, P. I. & Cukierman, E. Biomechanical and biochemical remodeling of stromal extracellular matrix in cancer. *Trends Biotechnol* **33**, 230-236, doi:10.1016/j.tibtech.2015.01.004 (2015).
- 63 Plodinec, M. *et al.* The nanomechanical signature of breast cancer. *Nat Nanotechnol* **7**, 757-765, doi:10.1038/nnano.2012.167 (2012).

- 64 Kai, F., Laklai, H. & Weaver, V. M. Force Matters: Biomechanical Regulation of Cell Invasion and Migration in Disease. *Trends Cell Biol* **26**, 486-497, doi:10.1016/j.tcb.2016.03.007 (2016).
- 65 Conklin, M. W. *et al.* Aligned collagen is a prognostic signature for survival in human breast carcinoma. *Am J Pathol* **178**, 1221-1232, doi:10.1016/j.ajpath.2010.11.076 (2011).
- 66 Provenzano, P. P. *et al.* Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. *BMC Med* **6**, 11, doi:10.1186/1741-7015-6-11 (2008).
- 67 Midwood, K. S., Chiquet, M., Tucker, R. P. & Orend, G. Tenascin-C at a glance. *J Cell Sci* **129**, 4321-4327, doi:10.1242/jcs.190546 (2016).
- 68 Orend, G. & Chiquet-Ehrismann, R. Tenascin-C induced signaling in cancer. *Cancer Lett* **244**, 143-163, doi:10.1016/j.canlet.2006.02.017 (2006).
- 69 Lowy, C. M. & Oskarsson, T. Tenascin C in metastasis: A view from the invasive front. *Cell Adh Migr* **9**, 112-124, doi:10.1080/19336918.2015.1008331 (2015).
- 70 Goetz, J. G. *et al.* Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis. *Cell* **146**, 148-163, doi:10.1016/j.cell.2011.05.040 (2011).
- 71 von Ahrens, D., Bhagat, T. D., Nagrath, D., Maitra, A. & Verma, A. The role of stromal cancer-associated fibroblasts in pancreatic cancer. *J Hematol Oncol* **10**, 76, doi:10.1186/s13045-017-0448-5 (2017).
- 72 Yamauchi, M., Barker, T. H., Gibbons, D. L. & Kurie, J. M. The fibrotic tumor stroma. *J Clin Invest* **128**, 16-25, doi:10.1172/JCI93554 (2018).
- 73 Cirri, P. & Chiarugi, P. Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* **31**, 195-208, doi:10.1007/s10555-011-9340-x (2012).
- 74 Paraiso, K. H. & Smalley, K. S. Fibroblast-mediated drug resistance in cancer. *Biochem Pharmacol* **85**, 1033-1041, doi:10.1016/j.bcp.2013.01.018 (2013).
- 75 Psaila, B. & Lyden, D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer* **9**, 285-293, doi:10.1038/nrc2621 (2009).
- 76 Aguado, B. A. *et al.* Extracellular matrix mediators of metastatic cell colonization characterized using scaffold mimics of the pre-metastatic niche. *Acta Biomater* **33**, 13-24, doi:10.1016/j.actbio.2016.01.043 (2016).
- 77 Hoyer, A. M. & Ertler, J. T. Structural ECM components in the premetastatic and metastatic niche. *Am J Physiol Cell Physiol* **310**, C955-967, doi:10.1152/ajpcell.00326.2015 (2016).
- 78 Peinado, H. *et al.* Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. *Nat Rev Cancer* **17**, 302-317, doi:10.1038/nrc.2017.6 (2017).
- 79 Xu, R. *et al.* Extracellular vesicles in cancer - implications for future improvements in cancer care. *Nat Rev Clin Oncol*, doi:10.1038/s41571-018-0036-9 (2018).
- 80 Rackov, G. *et al.* Vesicle-Mediated Control of Cell Function: The Role of Extracellular Matrix and Microenvironment. *Front Physiol* **9**, 651, doi:10.3389/fphys.2018.00651 (2018).
- 81 Unlu, G., Levic, D. S., Melville, D. B. & Knapik, E. W. Trafficking mechanisms of extracellular matrix macromolecules: insights from vertebrate development and human diseases. *Int J Biochem Cell Biol* **47**, 57-67, doi:10.1016/j.biocel.2013.11.005 (2014).
- 82 Malhotra, V. & Erlmann, P. The pathway of collagen secretion. *Annu Rev Cell Dev Biol* **31**, 109-124, doi:10.1146/annurev-cellbio-100913-013002 (2015).
- 83 Boyadjiev, S. A. *et al.* Cranio-lenticulo-sutural dysplasia is caused by a SEC23A mutation leading to abnormal endoplasmic-reticulum-to-Golgi trafficking. *Nat Genet* **38**, 1192-1197, doi:10.1038/ng1876 (2006).

- 84 Bard, F. & Malhotra, V. The formation of TGN-to-plasma-membrane transport carriers. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 439-455, doi:10.1146/annurev.cellbio.21.012704.133126 (2006).
- 85 Owusu, B. Y., Zimmerman, K. A. & Murphy-Ullrich, J. E. The role of the endoplasmic reticulum protein calreticulin in mediating TGF-beta-stimulated extracellular matrix production in fibrotic disease. *J Cell Commun Signal* **12**, 289-299, doi:10.1007/s12079-017-0426-2 (2018).
- 86 McCaughey, J. & Stephens, D. J. COPII-dependent ER export in animal cells: adaptation and control for diverse cargo. *Histochem Cell Biol*, doi:10.1007/s00418-018-1689-2 (2018).
- 87 Thery, C., Zitvogel, L. & Amigorena, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* **2**, 569-579, doi:10.1038/nri855 (2002).
- 88 Urbanelli, L. *et al.* Exosome-based strategies for Diagnosis and Therapy. *Recent Pat CNS Drug Discov* **10**, 10-27 (2015).
- 89 Hansen, L. L. & Nielsen, M. E. Plant exosomes: using an unconventional exit to prevent pathogen entry? *J Exp Bot* **69**, 59-68, doi:10.1093/jxb/erx319 (2017).
- 90 Lutz, H. U. Vesicles isolated from ATP-depleted erythrocytes and out of thrombocyte-rich plasma. *J Supramol Struct* **8**, 375-389, doi:10.1002/jss.400080314 (1978).
- 91 Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L. & Turbide, C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem* **262**, 9412-9420 (1987).
- 92 Colombo, M., Raposo, G. & Thery, C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* **30**, 255-289, doi:10.1146/annurev-cellbio-101512-122326 (2014).
- 93 Mittelbrunn, M., Vicente Manzanares, M. & Sanchez-Madrid, F. Organizing polarized delivery of exosomes at synapses. *Traffic* **16**, 327-337, doi:10.1111/tra.12258 (2015).
- 94 Chivet, M. *et al.* Exosomes as a novel way of interneuronal communication. *Biochem Soc Trans* **41**, 241-244, doi:10.1042/BST20120266 (2013).
- 95 Kahlert, C. & Kalluri, R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med (Berl)* **91**, 431-437, doi:10.1007/s00109-013-1020-6 (2013).
- 96 Kanerva, K. *et al.* LDL cholesterol recycles to the plasma membrane via a Rab8a-Myosin5b-actin-dependent membrane transport route. *Dev Cell* **27**, 249-262, doi:10.1016/j.devcel.2013.09.016 (2013).
- 97 Villasenor, R., Kalaidzidis, Y. & Zerial, M. Signal processing by the endosomal system. *Curr Opin Cell Biol* **39**, 53-60, doi:10.1016/j.ceb.2016.02.002 (2016).
- 98 Woodman, P. G. & Futter, C. E. Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 408-414, doi:10.1016/j.ceb.2008.04.001 (2008).
- 99 Di Fiore, P. P. & von Zastrow, M. Endocytosis, signaling, and beyond. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**, doi:10.1101/cshperspect.a016865 (2014).
- 100 Poteryaev, D., Datta, S., Ackema, K., Zerial, M. & Spang, A. Identification of the switch in early-to-late endosome transition. *Cell* **141**, 497-508, doi:10.1016/j.cell.2010.03.011 (2010).
- 101 Scott, C. C., Vacca, F. & Gruenberg, J. Endosome maturation, transport and functions. *Semin Cell Dev Biol* **31**, 2-10, doi:10.1016/j.semcd.2014.03.034 (2014).
- 102 Huotari, J. & Helenius, A. Endosome maturation. *EMBO J* **30**, 3481-3500, doi:10.1038/emboj.2011.286 (2011).
- 103 Raiborg, C. & Stenmark, H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* **458**, 445-452, doi:10.1038/nature07961 (2009).
- 104 Raiborg, C. *et al.* FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *J Cell Sci* **114**, 2255-2263 (2001).

- 105 Migliano, S. M. & Teis, D. ESCRT and Membrane Protein Ubiquitination. *Prog Mol Subcell Biol* **57**, 107-135, doi:10.1007/978-3-319-96704-2_4 (2018).
- 106 Teis, D., Saksena, S. & Emr, S. D. SnapShot: the ESCRT machinery. *Cell* **137**, 182-182 e181, doi:10.1016/j.cell.2009.03.027 (2009).
- 107 Colombo, M. *et al.* Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci* **126**, 5553-5565, doi:10.1242/jcs.128868 (2013).
- 108 Stuffers, S., Sem Wegner, C., Stenmark, H. & Brech, A. Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic* **10**, 925-937, doi:10.1111/j.1600-0854.2009.00920.x (2009).
- 109 Baietti, M. F. *et al.* Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol* **14**, 677-685, doi:10.1038/ncb2502 (2012).
- 110 Bissig, C. & Gruenberg, J. ALIX and the multivesicular endosome: ALIX in Wonderland. *Trends Cell Biol* **24**, 19-25, doi:10.1016/j.tcb.2013.10.009 (2014).
- 111 Escola, J. M. *et al.* Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem* **273**, 20121-20127 (1998).
- 112 Perez-Hernandez, D. *et al.* The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *J Biol Chem* **288**, 11649-11661, doi:10.1074/jbc.M112.445304 (2013).
- 113 van Niel, G. *et al.* The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev Cell* **21**, 708-721, doi:10.1016/j.devcel.2011.08.019 (2011).
- 114 Andreu, Z. & Yanez-Mo, M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol* **5**, 442, doi:10.3389/fimmu.2014.00442 (2014).
- 115 McMahan, H. T. & Boucrot, E. Membrane curvature at a glance. *J Cell Sci* **128**, 1065-1070, doi:10.1242/jcs.114454 (2015).
- 116 Record, M., Carayon, K., Poirot, M. & Silvente-Poirot, S. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological processes. *Biochim Biophys Acta* **1841**, 108-120, doi:10.1016/j.bbalip.2013.10.004 (2014).
- 117 Subra, C., Laulagnier, K., Perret, B. & Record, M. Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie* **89**, 205-212, doi:10.1016/j.biochi.2006.10.014 (2007).
- 118 Matsuo, H. *et al.* Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science* **303**, 531-534, doi:10.1126/science.1092425 (2004).
- 119 Odorizzi, G. The multiple personalities of Alix. *J Cell Sci* **119**, 3025-3032, doi:10.1242/jcs.03072 (2006).
- 120 Clarke, C. J. *et al.* The extended family of neutral sphingomyelinases. *Biochemistry* **45**, 11247-11256, doi:10.1021/bi061307z (2006).
- 121 Trajkovic, K. *et al.* Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* **319**, 1244-1247, doi:10.1126/science.1153124 (2008).
- 122 Llorente, A. *et al.* Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta* **1831**, 1302-1309 (2013).
- 123 Skotland, T., Sandvig, K. & Llorente, A. Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Prog Lipid Res* **66**, 30-41, doi:10.1016/j.plipres.2017.03.001 (2017).
- 124 Ikonen, E. Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 470-477 (2001).
- 125 Simons, K. & Sampaio, J. L. Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, a004697, doi:10.1101/cshperspect.a004697 (2011).

- 126 de Gassart, A., Geminard, C., Fevrier, B., Raposo, G. & Vidal, M. Lipid raft-associated
protein sorting in exosomes. *Blood* **102**, 4336-4344, doi:10.1182/blood-2003-03-0871
(2003).
- 127 Willms, E. *et al.* Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and
biological properties. *Sci Rep* **6**, 22519, doi:10.1038/srep22519 (2016).
- 128 Zhang, H. *et al.* Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular
vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation. *Nat Cell Biol* **20**, 332-343,
doi:10.1038/s41556-018-0040-4 (2018).
- 129 Villarroya-Beltri, C. *et al.* ISGylation controls exosome secretion by promoting lysosomal
degradation of MVB proteins. *Nat Commun* **7**, 13588, doi:10.1038/ncomms13588
(2016).
- 130 Ostrowski, M. *et al.* Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome
secretion pathway. *Nat Cell Biol* **12**, 19-30; sup pp 11-13, doi:10.1038/ncb2000 (2010).
- 131 Savina, A., Furlan, M., Vidal, M. & Colombo, M. I. Exosome release is regulated by a
calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J Biol Chem* **278**, 20083-20090,
doi:10.1074/jbc.M301642200 (2003).
- 132 Keerthikumar, S. *et al.* ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *J Mol
Biol* **428**, 688-692, doi:10.1016/j.jmb.2015.09.019 (2016).
- 133 Mathivanan, S. & Simpson, R. J. ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and
RNA. *Proteomics* **9**, 4997-5000, doi:10.1002/pmic.200900351 (2009).
- 134 Kalra, H. *et al.* Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous
community annotation. *PLoS Biol* **10**, e1001450, doi:10.1371/journal.pbio.1001450
(2012).
- 135 Maji, S. *et al.* Exosomal Annexin II Promotes Angiogenesis and Breast Cancer Metastasis.
Mol Cancer Res **15**, 93-105, doi:10.1158/1541-7786.MCR-16-0163 (2017).
- 136 Valadi, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel
mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* **9**, 654-659,
doi:10.1038/ncb1596 (2007).
- 137 Villarroya-Beltri, C. *et al.* Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into
exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun* **4**, 2980,
doi:10.1038/ncomms3980 (2013).
- 138 Zhang, J. *et al.* Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function.
Genomics Proteomics Bioinformatics **13**, 17-24, doi:10.1016/j.gpb.2015.02.001 (2015).
- 139 Janas, T., Janas, M. M., Sapon, K. & Janas, T. Mechanisms of RNA loading into exosomes.
FEBS Lett **589**, 1391-1398, doi:10.1016/j.febslet.2015.04.036 (2015).
- 140 Thakur, B. K. *et al.* Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer
detection. *Cell Res* **24**, 766-769, doi:10.1038/cr.2014.44 (2014).
- 141 Statello, L. *et al.* Identification of RNA-binding proteins in exosomes capable of
interacting with different types of RNA: RBP-facilitated transport of RNAs into
exosomes. *PLoS One* **13**, e0195969, doi:10.1371/journal.pone.0195969 (2018).
- 142 Robbins, P. D. & Morelli, A. E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles.
Nat Rev Immunol **14**, 195-208, doi:10.1038/nri3622 (2014).
- 143 Mittelbrunn, M. *et al.* Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells
to antigen-presenting cells. *Nat Commun* **2**, 282, doi:10.1038/ncomms1285 (2011).
- 144 Raposo, G. *et al.* B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* **183**,
1161-1172 (1996).
- 145 Thery, C. & Amigorena, S. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr
Opin Immunol* **13**, 45-51 (2001).
- 146 Greening, D. W., Gopal, S. K., Xu, R., Simpson, R. J. & Chen, W. Exosomes and their roles
in immune regulation and cancer. *Semin Cell Dev Biol* **40**, 72-81,
doi:10.1016/j.semcdb.2015.02.009 (2015).

- 147 Azmi, A. S., Bao, B. & Sarkar, F. H. Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer Metastasis Rev* **32**, 623-642, doi:10.1007/s10555-013-9441-9 (2013).
- 148 Bebelman, M. P., Smit, M. J., Pegtel, D. M. & Baglio, S. R. Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacol Ther* **188**, 1-11, doi:10.1016/j.pharmthera.2018.02.013 (2018).
- 149 Soung, Y. H., Ford, S., Zhang, V. & Chung, J. Exosomes in Cancer Diagnostics. *Cancers (Basel)* **9**, doi:10.3390/cancers9010008 (2017).
- 150 Boukouris, S. & Mathivanan, S. Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers. *Proteomics Clin Appl* **9**, 358-367, doi:10.1002/prca.201400114 (2015).
- 151 Liang, X., Zhang, L., Wang, S., Han, Q. & Zhao, R. C. Exosomes secreted by mesenchymal stem cells promote endothelial cell angiogenesis by transferring miR-125a. *J Cell Sci* **129**, 2182-2189, doi:10.1242/jcs.170373 (2016).
- 152 Kholia, S. *et al.* Extracellular vesicles as new players in angiogenesis. *Vascul Pharmacol* **86**, 64-70, doi:10.1016/j.vph.2016.03.005 (2016).
- 153 Hakulinen, J., Sankkila, L., Sugiyama, N., Lehti, K. & Keski-Oja, J. Secretion of active membrane type 1 matrix metalloproteinase (MMP-14) into extracellular space in microvesicular exosomes. *J Cell Biochem* **105**, 1211-1218, doi:10.1002/jcb.21923 (2008).
- 154 Becker, A. *et al.* Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. *Cancer Cell* **30**, 836-848, doi:10.1016/j.ccell.2016.10.009 (2016).
- 155 Sceneay, J., Smyth, M. J. & Moller, A. The pre-metastatic niche: finding common ground. *Cancer Metastasis Rev* **32**, 449-464, doi:10.1007/s10555-013-9420-1 (2013).
- 156 Hoshino, A. *et al.* Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* **527**, 329-335, doi:10.1038/nature15756 (2015).
- 157 Peinado, H. *et al.* Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* **18**, 883-891, doi:10.1038/nm.2753 (2012).
- 158 Costa-Silva, B. *et al.* Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat Cell Biol* **17**, 816-826, doi:10.1038/ncb3169 (2015).
- 159 Kulkarni, R. & Prasad, A. Exosomes Derived from HIV-1 Infected DCs Mediate Viral trans-Infection via Fibronectin and Galectin-3. *Sci Rep* **7**, 14787, doi:10.1038/s41598-017-14817-8 (2017).
- 160 Lachenal, G. *et al.* Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Mol Cell Neurosci* **46**, 409-418, doi:10.1016/j.mcn.2010.11.004 (2011).
- 161 Fruhbeis, C., Frohlich, D., Kuo, W. P. & Kramer-Albers, E. M. Extracellular vesicles as mediators of neuron-glia communication. *Front Cell Neurosci* **7**, 182, doi:10.3389/fncel.2013.00182 (2013).
- 162 Sardar Sinha, M. *et al.* Alzheimer's disease pathology propagation by exosomes containing toxic amyloid-beta oligomers. *Acta Neuropathol* **136**, 41-56, doi:10.1007/s00401-018-1868-1 (2018).
- 163 Danzer, K. M. *et al.* Exosomal cell-to-cell transmission of alpha synuclein oligomers. *Mol Neurodegener* **7**, 42, doi:10.1186/1750-1326-7-42 (2012).
- 164 Shapiro, I. M., Landis, W. J. & Risbud, M. V. Matrix vesicles: Are they anchored exosomes? *Bone* **79**, 29-36, doi:10.1016/j.bone.2015.05.013 (2015).
- 165 Zhao, W., Zheng, X. L. & Zhao, S. P. Exosome and its roles in cardiovascular diseases. *Heart Fail Rev* **20**, 337-348, doi:10.1007/s10741-014-9469-0 (2015).
- 166 Parton, R. G. & del Pozo, M. A. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 98-112, doi:10.1038/nrm3512 (2013).

- 167 Parton, R. G. Caveolae and caveolins. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 542-548 (1996).
- 168 Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P. E. & Lisanti, M. P. Caveolins, a family of scaffolding
proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane.
J Biol Chem **273**, 5419-5422 (1998).
- 169 Williams, T. M. & Lisanti, M. P. The caveolin proteins. *Genome Biol* **5**, 214,
doi:10.1186/gb-2004-5-3-214 (2004).
- 170 Hill, M. M. *et al.* PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola
formation and function. *Cell* **132**, 113-124, doi:10.1016/j.cell.2007.11.042 (2008).
- 171 Chidlow, J. H., Jr. & Sessa, W. C. Caveolae, caveolins, and cavins: complex control of
cellular signalling and inflammation. *Cardiovasc Res* **86**, 219-225,
doi:10.1093/cvr/cvq075 (2010).
- 172 Nassar, Z. D. & Parat, M. O. Cavin Family: New Players in the Biology of Caveolae. *Int
Rev Cell Mol Biol* **320**, 235-305, doi:10.1016/bs.ircmb.2015.07.009 (2015).
- 173 Hansen, C. G., Bright, N. A., Howard, G. & Nichols, B. J. SDPR induces membrane
curvature and functions in the formation of caveolae. *Nat Cell Biol* **11**, 807-814,
doi:10.1038/ncb1887 (2009).
- 174 Spisni, E., Tomasi, V., Cestaro, A. & Tosatto, S. C. Structural insights into the function of
human caveolin 1. *Biochem Biophys Res Commun* **338**, 1383-1390,
doi:10.1016/j.bbrc.2005.10.099 (2005).
- 175 Monier, S., Dietzen, D. J., Hastings, W. R., Lublin, D. M. & Kurzchalia, T. V.
Oligomerization of VIP21-caveolin in vitro is stabilized by long chain fatty acylation or
cholesterol. *FEBS Lett* **388**, 143-149 (1996).
- 176 Schlegel, A., Schwab, R. B., Scherer, P. E. & Lisanti, M. P. A role for the caveolin
scaffolding domain in mediating the membrane attachment of caveolin-1. The caveolin
scaffolding domain is both necessary and sufficient for membrane binding in vitro. *J Biol
Chem* **274**, 22660-22667 (1999).
- 177 Bernatchez, P. N. *et al.* Dissecting the molecular control of endothelial NO synthase by
caveolin-1 using cell-permeable peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 761-766,
doi:10.1073/pnas.0407224102 (2005).
- 178 Razani, B. & Lisanti, M. P. Caveolins and caveolae: molecular and functional
relationships. *Exp Cell Res* **271**, 36-44, doi:10.1006/excr.2001.5372 (2001).
- 179 Epand, R. M., Sayer, B. G. & Epand, R. F. Caveolin scaffolding region and cholesterol-rich
domains in membranes. *J Mol Biol* **345**, 339-350, doi:10.1016/j.jmb.2004.10.064 (2005).
- 180 Li, S., Seitz, R. & Lisanti, M. P. Phosphorylation of caveolin by src tyrosine kinases. The
alpha-isoform of caveolin is selectively phosphorylated by v-Src in vivo. *J Biol Chem* **271**,
3863-3868 (1996).
- 181 Sanguinetti, A. R. & Mastick, C. C. c-Abl is required for oxidative stress-induced
phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine 14. *Cell Signal* **15**, 289-298 (2003).
- 182 Nethe, M. & Hordijk, P. L. A model for phospho-caveolin-1-driven turnover of focal
adhesions. *Cell Adh Migr* **5**, 59-64 (2011).
- 183 Gaus, K., Le Lay, S., Balasubramanian, N. & Schwartz, M. A. Integrin-mediated adhesion
regulates membrane order. *J Cell Biol* **174**, 725-734, doi:10.1083/jcb.200603034 (2006).
- 184 del Pozo, M. A. *et al.* Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane
domain internalization. *Nat Cell Biol* **7**, 901-908, doi:10.1038/ncb1293 (2005).
- 185 Schlegel, A., Arvan, P. & Lisanti, M. P. Caveolin-1 binding to endoplasmic reticulum
membranes and entry into the regulated secretory pathway are regulated by serine
phosphorylation. Protein sorting at the level of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*
276, 4398-4408, doi:10.1074/jbc.M005448200 (2001).
- 186 Uittenbogaard, A. & Smart, E. J. Palmitoylation of caveolin-1 is required for cholesterol
binding, chaperone complex formation, and rapid transport of cholesterol to caveolae.
J Biol Chem **275**, 25595-25599, doi:10.1074/jbc.M003401200 (2000).

- 187 Dietzen, D. J., Hastings, W. R. & Lublin, D. M. Caveolin is palmitoylated on multiple
cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to
caveolae. *J Biol Chem* **270**, 6838-6842 (1995).
- 188 Hayer, A. *et al.* Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in
endolysosomes for degradation. *J Cell Biol* **191**, 615-629, doi:10.1083/jcb.201003086
(2010).
- 189 Kirchner, P., Bug, M. & Meyer, H. Ubiquitination of the N-terminal region of caveolin-1
regulates endosomal sorting by the VCP/p97 AAA-ATPase. *J Biol Chem* **288**, 7363-7372,
doi:10.1074/jbc.M112.429076 (2013).
- 190 Ritz, D. *et al.* Endolysosomal sorting of ubiquitylated caveolin-1 is regulated by VCP and
UBXD1 and impaired by VCP disease mutations. *Nat Cell Biol* **13**, 1116-1123,
doi:10.1038/ncb2301 (2011).
- 191 Lingwood, D. & Simons, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**,
46-50, doi:10.1126/science.1174621 (2010).
- 192 Murata, M. *et al.* VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S
A* **92**, 10339-10343 (1995).
- 193 Ikonen, E. & Parton, R. G. Caveolins and cellular cholesterol balance. *Traffic* **1**, 212-217
(2000).
- 194 Sengupta, D. Cholesterol modulates the structure, binding modes, and energetics of
caveolin-membrane interactions. *J Phys Chem B* **116**, 14556-14564,
doi:10.1021/jp3077886 (2012).
- 195 Mundy, D. I., Li, W. P., Luby-Phelps, K. & Anderson, R. G. Caveolin targeting to late
endosome/lysosomal membranes is induced by perturbations of lysosomal pH and
cholesterol content. *Mol Biol Cell* **23**, 864-880, doi:10.1091/mbc.E11-07-0598 (2012).
- 196 Cubells, L. *et al.* Annexin A6-induced alterations in cholesterol transport and caveolin
export from the Golgi complex. *Traffic* **8**, 1568-1589, doi:10.1111/j.1600-
0854.2007.00640.x (2007).
- 197 Garcia-Cardena, G. *et al.* Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS)
and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J Biol
Chem* **272**, 25437-25440 (1997).
- 198 Blouin, C. M. *et al.* Plasma membrane subdomain compartmentalization contributes to
distinct mechanisms of ceramide action on insulin signaling. *Diabetes* **59**, 600-610,
doi:10.2337/db09-0897 (2010).
- 199 Minguet, S. *et al.* Caveolin-1-dependent nanoscale organization of the BCR regulates B
cell tolerance. *Nat Immunol* **18**, 1150-1159, doi:10.1038/ni.3813 (2017).
- 200 Cerezo, A. *et al.* The absence of caveolin-1 increases proliferation and anchorage-
independent growth by a Rac-dependent, Erk-independent mechanism. *Mol Cell Biol*
29, 5046-5059, doi:10.1128/MCB.00315-09 (2009).
- 201 Hoffmann, C. *et al.* Caveolin limits membrane microdomain mobility and integrin-
mediated uptake of fibronectin-binding pathogens. *J Cell Sci* **123**, 4280-4291,
doi:10.1242/jcs.064006 (2010).
- 202 Echarri, A. *et al.* Caveolar domain organization and trafficking is regulated by Abl kinases
and mDia1. *J Cell Sci* **125**, 3097-3113, doi:10.1242/jcs.090134 (2012).
- 203 Muriel, O. *et al.* Phosphorylated filamin A regulates actin-linked caveolae dynamics. *J
Cell Sci* **124**, 2763-2776, doi:10.1242/jcs.080804 (2011).
- 204 Sinha, B. *et al.* Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell*
144, 402-413, doi:10.1016/j.cell.2010.12.031 (2011).
- 205 Fridolfsson, H. N., Roth, D. M., Insel, P. A. & Patel, H. H. Regulation of intracellular
signaling and function by caveolin. *FASEB J* **28**, 3823-3831, doi:10.1096/fj.14-252320
(2014).

- 206 Jackle, S., Runquist, E. A., Miranda-Brady, S. & Havel, R. J. Trafficking of the epidermal growth factor receptor and transferrin in three hepatocytic endosomal fractions. *J Biol Chem* **266**, 1396-1402 (1991).
- 207 Pol, A., Calvo, M. & Enrich, C. Isolated endosomes from quiescent rat liver contain the signal transduction machinery. Differential distribution of activated Raf-1 and Mek in the endocytic compartment. *FEBS Lett* **441**, 34-38 (1998).
- 208 Smart, E. J., Ying, Y., Donzell, W. C. & Anderson, R. G. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem* **271**, 29427-29435 (1996).
- 209 Raiborg, C., Wenzel, E. M., Pedersen, N. M. & Stenmark, H. ER-endosome contact sites in endosome positioning and protrusion outgrowth. *Biochem Soc Trans* **44**, 441-446, doi:10.1042/BST20150246 (2016).
- 210 Helle, S. C. *et al.* Organization and function of membrane contact sites. *Biochim Biophys Acta* **1833**, 2526-2541, doi:10.1016/j.bbamcr.2013.01.028 (2013).
- 211 Pol, A., Gross, S. P. & Parton, R. G. Review: biogenesis of the multifunctional lipid droplet: lipids, proteins, and sites. *J Cell Biol* **204**, 635-646, doi:10.1083/jcb.201311051 (2014).
- 212 Pol, A. *et al.* Dynamic and regulated association of caveolin with lipid bodies: modulation of lipid body motility and function by a dominant negative mutant. *Mol Biol Cell* **15**, 99-110, doi:10.1091/mbc.e03-06-0368 (2004).
- 213 van Meer, G. Caveolin, cholesterol, and lipid droplets? *J Cell Biol* **152**, F29-34 (2001).
- 214 Sala-Vila, A. *et al.* Interplay between hepatic mitochondria-associated membranes, lipid metabolism and caveolin-1 in mice. *Sci Rep* **6**, 27351, doi:10.1038/srep27351 (2016).
- 215 Mastrodonato, M. *et al.* Altered distribution of caveolin-1 in early liver steatosis. *Eur J Clin Invest* **41**, 642-651, doi:10.1111/j.1365-2362.2010.02459.x (2011).
- 216 Bosch, M., Mari, M., Gross, S. P., Fernandez-Checa, J. C. & Pol, A. Mitochondrial cholesterol: a connection between caveolin, metabolism, and disease. *Traffic* **12**, 1483-1489, doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01259.x (2011).
- 217 Engelman, J. A., Zhang, X. L. & Lisanti, M. P. Genes encoding human caveolin-1 and -2 are co-localized to the D7S522 locus (7q31.1), a known fragile site (FRA7G) that is frequently deleted in human cancers. *FEBS Lett* **436**, 403-410 (1998).
- 218 Hayashi, K. *et al.* Invasion activating caveolin-1 mutation in human scirrhous breast cancers. *Cancer Res* **61**, 2361-2364 (2001).
- 219 Williams, T. M. *et al.* Loss of caveolin-1 gene expression accelerates the development of dysplastic mammary lesions in tumor-prone transgenic mice. *Mol Biol Cell* **14**, 1027-1042, doi:10.1091/mbc.e02-08-0503 (2003).
- 220 Lee, H. *et al.* Caveolin-1 mutations (P132L and null) and the pathogenesis of breast cancer: caveolin-1 (P132L) behaves in a dominant-negative manner and caveolin-1 (-/-) null mice show mammary epithelial cell hyperplasia. *Am J Pathol* **161**, 1357-1369, doi:10.1016/S0002-9440(10)64412-4 (2002).
- 221 Freeman, M. R., Yang, W. & Di Vizio, D. Caveolin-1 and prostate cancer progression. *Adv Exp Med Biol* **729**, 95-110, doi:10.1007/978-1-4614-1222-9_7 (2012).
- 222 Rajjayabun, P. H. *et al.* Caveolin-1 expression is associated with high-grade bladder cancer. *Urology* **58**, 811-814 (2001).
- 223 Kato, K. *et al.* Overexpression of caveolin-1 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis and pathologic stage. *Cancer* **94**, 929-933 (2002).
- 224 Liu, W., Yin, N. C., Liu, H. & Nan, K. J. Cav-1 promote lung cancer cell proliferation and invasion through lncRNA HOTAIR. *Gene* **641**, 335-340, doi:10.1016/j.gene.2017.10.070 (2018).

- 225 Witkiewicz, A. K. *et al.* An absence of stromal caveolin-1 expression predicts early tumor recurrence and poor clinical outcome in human breast cancers. *Am J Pathol* **174**, 2023-2034, doi:10.2353/ajpath.2009.080873 (2009).
- 226 Simpkins, S. A., Hanby, A. M., Holliday, D. L. & Speirs, V. Clinical and functional significance of loss of caveolin-1 expression in breast cancer-associated fibroblasts. *J Pathol* **227**, 490-498, doi:10.1002/path.4034 (2012).
- 227 Eliyatkin, N. *et al.* Expression of Stromal Caveolin- 1 May Be a Predictor for Aggressive Behaviour of Breast Cancer. *Pathol Oncol Res* **24**, 59-65, doi:10.1007/s12253-017-0212-8 (2018).
- 228 Sloan, E. K. *et al.* Stromal cell expression of caveolin-1 predicts outcome in breast cancer. *Am J Pathol* **174**, 2035-2043, doi:10.2353/ajpath.2009.080924 (2009).
- 229 Gvaramia, D., Blaauboer, M. E., Hanemaaijer, R. & Everts, V. Role of caveolin-1 in fibrotic diseases. *Matrix Biol* **32**, 307-315, doi:10.1016/j.matbio.2013.03.005 (2013).
- 230 Logozzi, M. *et al.* High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS One* **4**, e5219, doi:10.1371/journal.pone.0005219 (2009).
- 231 Martin-Padura, I. *et al.* The white adipose tissue used in lipotransfer procedures is a rich reservoir of CD34+ progenitors able to promote cancer progression. *Cancer Res* **72**, 325-334, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1739 (2012).
- 232 They, C., Amigorena, S., Raposo, G. & Clayton, A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* **Chapter 3**, Unit 3 22, doi:10.1002/0471143030.cb0322s30 (2006).
- 233 Lajoie, P. & Nabi, I. R. Lipid rafts, caveolae, and their endocytosis. *Int Rev Cell Mol Biol* **282**, 135-163, doi:10.1016/S1937-6448(10)82003-9 (2010).
- 234 Stenmark, H. *et al.* Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *EMBO J* **13**, 1287-1296 (1994).
- 235 Zerial, M. & McBride, H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 107-117, doi:10.1038/35052055 (2001).
- 236 Aoki, T., Nomura, R. & Fujimoto, T. Tyrosine phosphorylation of caveolin-1 in the endothelium. *Exp Cell Res* **253**, 629-636, doi:10.1006/excr.1999.4652 (1999).
- 237 Reverter, M. *et al.* Cholesterol transport from late endosomes to the Golgi regulates t-SNARE trafficking, assembly, and function. *Mol Biol Cell* **22**, 4108-4123, doi:10.1091/mbc.E11-04-0332 (2011).
- 238 Eden, E. R. *et al.* Annexin A1 Tethers Membrane Contact Sites that Mediate ER to Endosome Cholesterol Transport. *Dev Cell* **37**, 473-483, doi:10.1016/j.devcel.2016.05.005 (2016).
- 239 Edgar, J. R., Eden, E. R. & Futter, C. E. Hrs- and CD63-dependent competing mechanisms make different sized endosomal intraluminal vesicles. *Traffic* **15**, 197-211, doi:10.1111/tra.12139 (2014).
- 240 Chu, B. B. *et al.* Cholesterol transport through lysosome-peroxisome membrane contacts. *Cell* **161**, 291-306, doi:10.1016/j.cell.2015.02.019 (2015).
- 241 Lu, F. *et al.* Identification of NPC1 as the target of U18666A, an inhibitor of lysosomal cholesterol export and Ebola infection. *Elife* **4**, doi:10.7554/eLife.12177 (2015).
- 242 Oskarsson, T. *et al.* Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. *Nat Med* **17**, 867-874, doi:10.1038/nm.2379 (2011).
- 243 Bravo, R. *et al.* Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. *Int Rev Cell Mol Biol* **301**, 215-290, doi:10.1016/B978-0-12-407704-1.00005-1 (2013).
- 244 Yoon, M. J. *et al.* Monensin, a polyether ionophore antibiotic, overcomes TRAIL resistance in glioma cells via endoplasmic reticulum stress, DR5 upregulation and c-FLIP downregulation. *Carcinogenesis* **34**, 1918-1928, doi:10.1093/carcin/bgt137 (2013).

- 245 Haderk, F. *et al.* Tumor-derived exosomes modulate PD-L1 expression in monocytes. *Sci Immunol* **2**, doi:10.1126/sciimmunol.aah5509 (2017).
- 246 Rupp, T. *et al.* Tenascin-C Orchestrates Glioblastoma Angiogenesis by Modulation of Pro- and Anti-angiogenic Signaling. *Cell Rep* **17**, 2607-2619, doi:10.1016/j.celrep.2016.11.012 (2016).
- 247 Lee, I. H. *et al.* The activity of the epithelial sodium channels is regulated by caveolin-1 via a Nedd4-2-dependent mechanism. *J Biol Chem* **284**, 12663-12669, doi:10.1074/jbc.M809737200 (2009).
- 248 Gonzalez-Munoz, E. *et al.* Caveolin-1 loss of function accelerates glucose transporter 4 and insulin receptor degradation in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology* **150**, 3493-3502, doi:10.1210/en.2008-1520 (2009).
- 249 Hunter, T. The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Mol Cell* **28**, 730-738, doi:10.1016/j.molcel.2007.11.019 (2007).
- 250 Duan, G. & Walther, D. The roles of post-translational modifications in the context of protein interaction networks. *PLoS Comput Biol* **11**, e1004049, doi:10.1371/journal.pcbi.1004049 (2015).
- 251 Seet, B. T., Dikic, I., Zhou, M. M. & Pawson, T. Reading protein modifications with interaction domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 473-483, doi:10.1038/nrm1960 (2006).
- 252 Latham, J. A. & Dent, S. Y. Cross-regulation of histone modifications. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 1017-1024, doi:10.1038/nsmb1307 (2007).
- 253 Fader, C. M., Sanchez, D., Furlan, M. & Colombo, M. I. Induction of autophagy promotes fusion of multivesicular bodies with autophagic vacuoles in k562 cells. *Traffic* **9**, 230-250, doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00677.x (2008).
- 254 Parat, M. O., Anand-Apte, B. & Fox, P. L. Differential caveolin-1 polarization in endothelial cells during migration in two and three dimensions. *Mol Biol Cell* **14**, 3156-3168, doi:10.1091/mbc.e02-11-0761 (2003).
- 255 Zhou, J. *et al.* Activation of lysosomal function in the course of autophagy via mTORC1 suppression and autophagosome-lysosome fusion. *Cell Res* **23**, 508-523, doi:10.1038/cr.2013.11 (2013).
- 256 Pol, A. *et al.* A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance. *J Cell Biol* **152**, 1057-1070 (2001).
- 257 Martin, S. & Parton, R. G. Caveolin, cholesterol, and lipid bodies. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 163-174, doi:10.1016/j.semcdb.2005.01.007 (2005).
- 258 Domon, M. *et al.* Annexins as organizers of cholesterol- and sphingomyelin-enriched membrane microdomains in Niemann-Pick type C disease. *Cell Mol Life Sci* **69**, 1773-1785, doi:10.1007/s00018-011-0894-0 (2012).
- 259 Vanier, M. T. Niemann-Pick diseases. *Handb Clin Neurol* **113**, 1717-1721, doi:10.1016/B978-0-444-59565-2.00041-1 (2013).
- 260 Wojtanik, K. M. & Liscum, L. The transport of low density lipoprotein-derived cholesterol to the plasma membrane is defective in NPC1 cells. *J Biol Chem* **278**, 14850-14856, doi:10.1074/jbc.M300488200 (2003).
- 261 Liscum, L., Ruggiero, R. M. & Faust, J. R. The intracellular transport of low density lipoprotein-derived cholesterol is defective in Niemann-Pick type C fibroblasts. *J Cell Biol* **108**, 1625-1636 (1989).
- 262 Vance, J. E. & Karten, B. Niemann-Pick C disease and mobilization of lysosomal cholesterol by cyclodextrin. *J Lipid Res* **55**, 1609-1621, doi:10.1194/jlr.R047837 (2014).
- 263 Domon, M. M., Besson, F., Bandorowicz-Pikula, J. & Pikula, S. Annexin A6 is recruited into lipid rafts of Niemann-Pick type C disease fibroblasts in a Ca²⁺-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* **405**, 192-196, doi:10.1016/j.bbrc.2010.12.138 (2011).



- 264 Rentero, C., Blanco-Munoz, P., Meneses-Salas, E., Grewal, T. & Enrich, C. Annexins-
Coordinators of Cholesterol Homeostasis in Endocytic Pathways. *Int J Mol Sci* **19**,
doi:10.3390/ijms19051444 (2018).
- 265 Ong, Q. R., Lim, M. L., Chua, C. C., Cheung, N. S. & Wong, B. S. Impaired insulin signaling
in an animal model of Niemann-Pick Type C disease. *Biochem Biophys Res Commun* **424**,
482-487, doi:10.1016/j.bbrc.2012.06.139 (2012).
- 266 Cohen, A. W. *et al.* Caveolin-1-deficient mice show insulin resistance and defective
insulin receptor protein expression in adipose tissue. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**, C222-
235, doi:10.1152/ajpcell.00006.2003 (2003).
- 267 Li, Z. *et al.* Lipid droplets control the maternal histone supply of *Drosophila* embryos.
Curr Biol **22**, 2104-2113, doi:10.1016/j.cub.2012.09.018 (2012).
- 268 Anand, P. *et al.* A novel role for lipid droplets in the organismal antibacterial response.
Elife **1**, e00003, doi:10.7554/eLife.00003 (2012).
- 269 Lee, J. A. *et al.* Methyl-beta-cyclodextrin up-regulates collagen I expression in
chronologically-aged skin via its anti-caveolin-1 activity. *Oncotarget* **6**, 1942-1953,
doi:10.18632/oncotarget.3039 (2015).
- 270 Le Saux, O. *et al.* The role of caveolin-1 in pulmonary matrix remodeling and mechanical
properties. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **295**, L1007-1017,
doi:10.1152/ajplung.90207.2008 (2008).
- 271 Yu, C., Alterman, M. & Dobrowsky, R. T. Ceramide displaces cholesterol from lipid rafts
and decreases the association of the cholesterol binding protein caveolin-1. *J Lipid Res*
46, 1678-1691, doi:10.1194/jlr.M500060-JLR200 (2005).
- 272 Giblin, S. P. & Midwood, K. S. Tenascin-C: Form versus function. *Cell Adh Migr* **9**, 48-82,
doi:10.4161/19336918.2014.987587 (2015).
- 273 Rowland, A. A., Chitwood, P. J., Phillips, M. J. & Voeltz, G. K. ER contact sites define the
position and timing of endosome fission. *Cell* **159**, 1027-1041,
doi:10.1016/j.cell.2014.10.023 (2014).
- 274 Pani, B. *et al.* Activation of TRPC1 by STIM1 in ER-PM microdomains involves release of
the channel from its scaffold caveolin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 20087-20092,
doi:10.1073/pnas.0905002106 (2009).
- 275 Dong, R. *et al.* Endosome-ER Contacts Control Actin Nucleation and Retromer Function
through VAP-Dependent Regulation of PI4P. *Cell* **166**, 408-423,
doi:10.1016/j.cell.2016.06.037 (2016).
- 276 Wijdeven, R. H., Jongsma, M. L., Neefjes, J. & Berlin, I. ER contact sites direct late
endosome transport. *Bioessays* **37**, 1298-1302, doi:10.1002/bies.201500095 (2015).
- 277 Braulke, T. & Bonifacino, J. S. Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta* **1793**,
605-614, doi:10.1016/j.bbamcr.2008.10.016 (2009).
- 278 Coutinho, M. F., Prata, M. J. & Alves, S. A shortcut to the lysosome: the mannose-6-
phosphate-independent pathway. *Mol Genet Metab* **107**, 257-266,
doi:10.1016/j.ymgme.2012.07.012 (2012).
- 279 Christopher, R. A., Kowalczyk, A. P. & McKeown-Longo, P. J. Localization of fibronectin
matrix assembly sites on fibroblasts and endothelial cells. *J Cell Sci* **110 (Pt 5)**, 569-581
(1997).
- 280 Nagaharu, K. *et al.* Tenascin C induces epithelial-mesenchymal transition-like change
accompanied by SRC activation and focal adhesion kinase phosphorylation in human
breast cancer cells. *Am J Pathol* **178**, 754-763, doi:10.1016/j.ajpath.2010.10.015 (2011).
- 281 Shatz, M. & Liscovitch, M. Caveolin-1: a tumor-promoting role in human cancer. *Int J*
Radiat Biol **84**, 177-189, doi:10.1080/09553000701745293 (2008).
- 282 Grande-Garcia, A. & del Pozo, M. A. Caveolin-1 in cell polarization and directional
migration. *Eur J Cell Biol* **87**, 641-647, doi:10.1016/j.ejcb.2008.02.001 (2008).

- 283 Shields, M. A., Dangi-Garimella, S., Redig, A. J. & Munshi, H. G. Biochemical role of the
collagen-rich tumour microenvironment in pancreatic cancer progression. *Biochem J*
441, 541-552, doi:10.1042/BJ20111240 (2012).
- 284 Golub, E. E. Biomineralization and matrix vesicles in biology and pathology. *Semin*
Immunopathol **33**, 409-417, doi:10.1007/s00281-010-0230-z (2011).
- 285 Stoffel, W., Jenke, B., Block, B., Zumbansen, M. & Koebke, J. Neutral sphingomyelinase
2 (smpd3) in the control of postnatal growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S*
A **102**, 4554-4559, doi:10.1073/pnas.0406380102 (2005).
- 286 Zumbansen, M. & Stoffel, W. Neutral sphingomyelinase 1 deficiency in the mouse
causes no lipid storage disease. *Mol Cell Biol* **22**, 3633-3638 (2002).
- 287 Pfrieger, F. W. & Vitale, N. Cholesterol and the journey of extracellular vesicles. *J Lipid*
Res, doi:10.1194/jlr.R084210 (2018).
- 288 Strauss, K. *et al.* Exosome secretion ameliorates lysosomal storage of cholesterol in
Niemann-Pick type C disease. *J Biol Chem* **285**, 26279-26288,
doi:10.1074/jbc.M110.134775 (2010).
- 289 Fernandez-Hernando, C., Yu, J., Davalos, A., Prendergast, J. & Sessa, W. C. Endothelial-
specific overexpression of caveolin-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-
deficient mice. *Am J Pathol* **177**, 998-1003, doi:10.2353/ajpath.2010.091287 (2010).
- 290 Frank, P. G., Pavlides, S. & Lisanti, M. P. Caveolae and transcytosis in endothelial cells:
role in atherosclerosis. *Cell Tissue Res* **335**, 41-47, doi:10.1007/s00441-008-0659-8
(2009).
- 291 Khosravi, M., Hosseini-Fard, R. & Najafi, M. Circulating low density lipoprotein (LDL).
Horm Mol Biol Clin Investig, doi:10.1515/hmbci-2018-0024 (2018).

08

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S1. Análisis proteómico de lisados celulares y exosomas derivados de MEFs Cav1WT y Cav1KO. Se muestran proteínas que presentan niveles similares entre lisados celulares ($-1,5 \leq Zq \leq 1,5$) y enriquecidas en exosomas derivados de MEFs Cav1WT ($Zq \geq 1,5$).

 Proteínas enriquecidas en muestras Cav1WT
 Proteínas enriquecidas en muestras Cav1KO

fasta	proteína	Descripción	Zq medio en lisados celulares	Zq medio en exosomas
Q9WV54	ASAH1_MOUSE	ASAH1_MOUSE Acid ceramidase OS=Mus musculus GN=Asah1 PE=1 SV=1	0.78392745	4.336153
Q9R118	HTRA1_MOUSE	HTRA1_MOUSE Serine protease HTRA1 OS=Mus musculus GN=Htra1 PE=1 SV=2	0.33184315	4.328745
P46718	PDCD2_MOUSE	PDCD2_MOUSE Programmed cell death protein 2 OS=Mus musculus GN=Pdc2 PE=2 SV=2	0.90756925	4.3019925
Q8R4X3	RBM12_MOUSE	RBM12_MOUSE RNA-binding protein 12 OS=Mus musculus GN=Rbm12 PE=1 SV=3	0.114948248	4.2897575
Q9ESJ1	CABL1_MOUSE	CABL1_MOUSE CDK5 and ABL1 enzyme substrate 1 OS=Mus musculus GN=Cables1 PE=1 SV=2	-0.81621195	3.9317435
Q9WTJ8	FA50B_MOUSE	FA50B_MOUSE Protein FAM50B OS=Mus musculus GN=Fam50b PE=2 SV=1	0.13549215	3.903764
B2RWG1	B2RWG1_MOUSE	B2RWG1_MOUSE 1700101E01Rik protein OS=Mus musculus GN=1700101E01Rik PE=2 SV=1	-0.125391739	3.879301
Q8K482	EMIL2_MOUSE	EMIL2_MOUSE EMILIN-2 OS=Mus musculus GN=Emilin2 PE=1 SV=1	0.0423805	3.6890135
C0IQA4	C0IQA4_MOUSE	C0IQA4_MOUSE MCG64379 OS=Mus musculus GN=Spanxn4 PE=2 SV=1	-0.71804545	3.331964
Q6XBG2	Q6XBG2_MOUSE	Q6XBG2_MOUSE ATP-binding cassette transporter sub-family A member 15 OS=Mus musculus GN=Abca15 PE=2 SV=1	0.41893005	3.2316165
Q60932	VDAC1_MOUSE	VDAC1_MOUSE Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 OS=Mus musculus GN=Vdac1 PE=1 SV=3	-0.084288975	3.074369
Q9R1R2	TRIM3_MOUSE	TRIM3_MOUSE Tripartite motif-containing protein 3 OS=Mus musculus GN=Trim3 PE=1 SV=1	0.2934282	3.068363
Q9R159	ADA25_MOUSE	ADA25_MOUSE Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 25 OS=Mus musculus GN=Adam25 PE=2 SV=1	-0.6659502	3.048651
Q64337	SQSTM_MOUSE	SQSTM_MOUSE Sequestosome-1 OS=Mus musculus GN=Sqstm1 PE=1 SV=1	-0.179680485	3.027232
Q80YX1	TENA_MOUSE	TENA_MOUSE Tenascin OS=Mus musculus GN=Tnc PE=1 SV=1	-0.98165065	3.0236015
P97449	AMPN_MOUSE	AMPN_MOUSE Aminopeptidase N OS=Mus musculus GN=Anpep PE=1 SV=4	0.9788574	3.0217055
Q810A7	DDX42_MOUSE	DDX42_MOUSE ATP-dependent RNA helicase DDX42 OS=Mus musculus GN=Ddx42 PE=1 SV=3	-0.434245703	3.011201
P52785	GUC2E_MOUSE	GUC2E_MOUSE Guanylyl cyclase GC-E OS=Mus musculus GN=Gucy2e PE=2 SV=2	0.905745	2.9570065
Q9ER00	STX12_MOUSE	STX12_MOUSE Syntaxin-12 OS=Mus musculus GN=Stx12 PE=1 SV=1	0.447242263	2.938017
Q8BL99	DOP1_MOUSE	DOP1_MOUSE Protein dopey-1 OS=Mus musculus GN=Dopey1 PE=1 SV=2	0.39597874	2.905634
Q9DCZ4	APOO_MOUSE	APOO_MOUSE Apolipoprotein O OS=Mus musculus GN=Apoo PE=2 SV=1	-1.007922175	2.86806725
Q35188	X3CL1_MOUSE	X3CL1_MOUSE Fractalkine OS=Mus musculus GN=Cx3cl1 PE=2 SV=3	0.09547645	2.8670793
Q9ESN2	TRI39_MOUSE	TRI39_MOUSE E3 ubiquitin-protein ligase TRIM39 OS=Mus musculus GN=Trim39 PE=2 SV=1	-0.15674985	2.8543595
Q61009	SCRB1_MOUSE	SCRB1_MOUSE Scavenger receptor class B member 1 OS=Mus musculus GN=Scarb1 PE=1 SV=1	1.185963525	2.8415575
Q8CHK3	MBOA7_MOUSE	MBOA7_MOUSE Lysophospholipid acyltransferase 7 OS=Mus musculus GN=Mboat7 PE=2 SV=1	1.1417149	2.815465
Q3UQ28	PXDN_MOUSE	PXDN_MOUSE Peroxidase homolog OS=Mus musculus GN=Pxdn PE=2 SV=2	0.540062	2.76277
P18242	CATD_MOUSE	CATD_MOUSE Cathepsin D OS=Mus musculus GN=Ctsd PE=1 SV=1	0.773206825	2.7282835
E9PWQ3	E9PWQ3_MOUSE	E9PWQ3_MOUSE Protein Col6a3 OS=Mus musculus GN=Col6a3 PE=4 SV=2	-0.1807033	2.7264675
Q9DCD6	GBRAP_MOUSE	GBRAP_MOUSE Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein OS=Mus musculus GN=Gabarap PE=1 SV=2	1.209291	2.674758
Q3TMP1	Q3TMP1_MOUSE	Q3TMP1_MOUSE General transcription factor IIIC, polypeptide 3 OS=Mus musculus GN=Gtf3c3 PE=2 SV=1	-0.46729295	2.601646
Q01320	TOP2A_MOUSE	TOP2A_MOUSE DNA topoisomerase 2-alpha OS=Mus musculus GN=Top2a PE=1 SV=2	0.037450628	2.5989933
Q9ERU9	RBP2_MOUSE	RBP2_MOUSE E3 SUMO-protein ligase RanBP2 OS=Mus musculus GN=Ranbp2 PE=1 SV=2	0.27990246	2.596589
Q8K297	GT251_MOUSE	GT251_MOUSE Procollagen galactosyltransferase 1 OS=Mus musculus GN=Glt25d1 PE=1 SV=2	1.465486225	2.5892185
Q04857	CO6A1_MOUSE	CO6A1_MOUSE Collagen alpha-1(VI) chain OS=Mus musculus GN=Col6a1 PE=2 SV=1	1.449959575	2.5845805
O88322	NID2_MOUSE	NID2_MOUSE Nidogen-2 OS=Mus musculus GN=Nid2 PE=1 SV=2	-1.1068702	2.5778585

fasta	proteína	Descripción	Zq medio en lisados celulares	Zq medio en exosomas
Q9ET22	DPP2_MOUSE	DPP2_MOUSE Dipeptidyl peptidase 2 OS=Mus musculus GN=Dpp7 PE=2 SV=2	0.2904772	2.5555365
Q3UKC1	TAXB1_MOUSE	TAXB1_MOUSE Tax1-binding protein 1 homolog OS=Mus musculus GN=Tax1bp1 PE=1 SV=2	0.07988715	2.548679
Q3U1N2	SRBP2_MOUSE	SRBP2_MOUSE Sterol regulatory element-binding protein 2 OS=Mus musculus GN=Sreb2 PE=1 SV=2	-1.42626695	2.5442075
Q5SS00	ZDBF2_MOUSE	ZDBF2_MOUSE DBF4-type zinc finger-containing protein 2 homolog OS=Mus musculus GN=Zdbf2 PE=2 SV=1	-0.46733685	2.526584
Q91W10	S39A8_MOUSE	S39A8_MOUSE Zinc transporter ZIP8 OS=Mus musculus GN=Sic39a8 PE=2 SV=1	-0.76057773	2.523536
O88738	BIRC6_MOUSE	BIRC6_MOUSE Baculoviral IAP repeat-containing protein 6 OS=Mus musculus GN=Birc6 PE=1 SV=2	0.115002505	2.5139935
P97313	PRKDC_MOUSE	PRKDC_MOUSE DNA-dependent protein kinase catalytic subunit OS=Mus musculus GN=Prkdc PE=1 SV=3	1.0161486	2.5035225
P60521	GBRL2_MOUSE	GBRL2_MOUSE Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2 OS=Mus musculus GN=Gabarapl2 PE=1 SV=1	0.06845555	2.4852225
Q9JJX6	P2RX4_MOUSE	P2RX4_MOUSE P2X purinoceptor 4 OS=Mus musculus GN=P2rx4 PE=1 SV=1	-0.36373225	2.484015
P55850	DSC3_MOUSE	DSC3_MOUSE Desmocollin-3 OS=Mus musculus GN=Dsc3 PE=1 SV=2	0.085902618	2.46269195
B9EJ54	B9EJ54_MOUSE	B9EJ54_MOUSE MCG21756, isoform CRA_b OS=Mus musculus GN=Nup205 PE=2 SV=1	-0.425688875	2.4445325
Q923Z0	GPC5B_MOUSE	GPC5B_MOUSE G-protein coupled receptor family C group 5 member B OS=Mus musculus GN=Gprc5b PE=2 SV=1	-0.4581425	2.4212405
Q8CDG3	VCIP1_MOUSE	VCIP1_MOUSE Deubiquitinating protein VCIP135 OS=Mus musculus GN=Vcpi1 PE=2 SV=1	-0.261339875	2.415296
A2AWA9	RBGP1_MOUSE	RBGP1_MOUSE Rab GTPase-activating protein 1 OS=Mus musculus GN=Rabgap1 PE=2 SV=1	0.570538703	2.4007205
A2RTH5	A2RTH5_MOUSE	A2RTH5_MOUSE Leucine carboxyl methyltransferase 1 OS=Mus musculus GN=Lcmt1 PE=2 SV=1	0.2172642	2.360012
Q8BIQ5	CSTF2_MOUSE	CSTF2_MOUSE Cleavage stimulation factor subunit 2 OS=Mus musculus GN=Cstf2 PE=1 SV=2	-0.4521907	2.350102
Q8CG46	SMC5_MOUSE	SMC5_MOUSE Structural maintenance of chromosomes protein 5 OS=Mus musculus GN=Smc5 PE=2 SV=1	0.0126489	2.3312955
Q8BKJ9	SIR7_MOUSE	SIR7_MOUSE NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-7 OS=Mus musculus GN=Sirt7 PE=1 SV=2	-0.4998911	2.3035535
Q8K010	OPLA_MOUSE	OPLA_MOUSE 5-oxoprolinase OS=Mus musculus GN=Oplah PE=2 SV=1	1.034229	2.2996924
Q9D082	Q9D082_MOUSE	Q9D082_MOUSE Protein Zfp715 OS=Mus musculus GN=Zfp715 PE=2 SV=2	1.00270415	2.28918505
P11276	FINC_MOUSE	FINC_MOUSE Fibronectin OS=Mus musculus GN=Fn1 PE=1 SV=4	0.1896813	2.271737
Q8BHL4	RAI3_MOUSE	RAI3_MOUSE Retinoic acid-induced protein 3 OS=Mus musculus GN=Gprc5a PE=2 SV=1	1.16802375	2.266714
P24638	PPAL_MOUSE	PPAL_MOUSE Lysosomal acid phosphatase OS=Mus musculus GN=Acp2 PE=2 SV=2	0.846061075	2.26446
Q8BJU2	TSN9_MOUSE	TSN9_MOUSE Tetraspanin-9 OS=Mus musculus GN=Tspan9 PE=1 SV=1	-0.0154478	2.2523295
F7BEU1	F7BEU1_MOUSE	F7BEU1_MOUSE Sorbin and SH3 domain-containing protein 2 (Fragment) OS=Mus musculus GN=Sorbs2 PE=4 SV=1	-0.75528655	2.2480974
E9Q9Q5	E9Q9Q5_MOUSE	E9Q9Q5_MOUSE Protein 1700113H08Rik OS=Mus musculus GN=1700113H08Rik PE=4 SV=1	0.9350357	2.21912
Q6Y7W8	PERQ2_MOUSE	PERQ2_MOUSE PERQ amino acid-rich with GYF domain-containing protein 2 OS=Mus musculus GN=Gigyf2 PE=1 SV=2	-0.284491373	2.2161159
P29391	FRIL1_MOUSE	FRIL1_MOUSE Ferritin light chain 1 OS=Mus musculus GN=Ftl1 PE=1 SV=2	0.97054925	2.206739
Q8VC57	KCTD5_MOUSE	KCTD5_MOUSE BTB/POZ domain-containing protein KCTD5 OS=Mus musculus GN=Kctd5 PE=2 SV=1	0.0861098	2.1945155
Q8R4B8	NALP3_MOUSE	NALP3_MOUSE NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3 OS=Mus musculus GN=Nlrp3 PE=2 SV=1	0.7662384	2.1897236
Q9CR84	AT5G1_MOUSE	AT5G1_MOUSE ATP synthase lipid-binding protein, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5g1 PE=2 SV=1	-0.86372805	2.1828295
Q9R117	TYK2_MOUSE	TYK2_MOUSE Non-receptor tyrosine-protein kinase TYK2 OS=Mus musculus GN=Tyk2 PE=1 SV=2	-0.824255	2.1766775
P70297	STAM1_MOUSE	STAM1_MOUSE Signal transducing adapter molecule 1 OS=Mus musculus GN=Stam PE=2 SV=3	0.909257925	2.171165
P32233	DRG1_MOUSE	DRG1_MOUSE Developmentally-regulated GTP-binding protein 1 OS=Mus musculus GN=Drg1 PE=1 SV=1	1.040028375	2.1705615
Q8R2U6	NUDT4_MOUSE	NUDT4_MOUSE Diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase 2 OS=Mus musculus GN=Nudt4 PE=1 SV=1	-0.404222775	2.1683798
P09528	FRIH_MOUSE	FRIH_MOUSE Ferritin heavy chain OS=Mus musculus GN=Fth1 PE=1 SV=2	0.26264675	2.142144
P51910	APOD_MOUSE	APOD_MOUSE Apolipoprotein D OS=Mus musculus GN=Apod PE=2 SV=1	0.11741715	2.1237195
F7BE84	F7BE84_MOUSE	F7BE84_MOUSE Protein Ankrd50 (Fragment) OS=Mus musculus GN=Ankrd50 PE=4 SV=1	-1.086270275	2.107991
Q91XB7	YIF1A_MOUSE	YIF1A_MOUSE Protein YIF1A OS=Mus musculus GN=Yif1a PE=2 SV=1	-0.96543655	2.098649
B1B0C7	B1B0C7_MOUSE	B1B0C7_MOUSE Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein OS=Mus musculus GN=Hspg2 PE=4 SV=1	0.40560075	2.0968645
Q05793	PGBM_MOUSE	PGBM_MOUSE Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein OS=Mus musculus GN=Hspg2 PE=1 SV=1	-0.093233675	2.08989

fasta	proteína	Descripción	Zq medio en lisados celulares	Zq medio en exosomas
Q8CGU1	CACO1_MOUSE	CACO1_MOUSE Calcium-binding and coiled-coil domain-containing protein 1 OS=Mus musculus GN=Calcoco1 PE=1 SV=2	-0.0673214	2.071684
P41731	CD63_MOUSE	CD63_MOUSE CD63 antigen OS=Mus musculus GN=Cd63 PE=1 SV=2	-0.6401162	2.0652935
A2ANY6	A2ANY6_MOUSE	A2ANY6_MOUSE Midasin OS=Mus musculus GN=Mdn1 PE=3 SV=1	0.470651875	2.058062
P03995	GFAP_MOUSE	GFAP_MOUSE Glial fibrillary acidic protein OS=Mus musculus GN=Gfap PE=1 SV=4	1.366023575	2.0507295
Q8VHE6	DYH5_MOUSE	DYH5_MOUSE Dynein heavy chain 5, axonemal OS=Mus musculus GN=Dnah5 PE=1 SV=2	-0.239992575	2.035527
O08983	HPS1_MOUSE	HPS1_MOUSE Hermansky-Pudlak syndrome 1 protein homolog OS=Mus musculus GN=Hps1 PE=2 SV=2	-0.5669905	2.0310925
P23780	BGAL_MOUSE	BGAL_MOUSE Beta-galactosidase OS=Mus musculus GN=Glb1 PE=2 SV=1	1.3736035	2.0117755
Q99LI8	HGS_MOUSE	HGS_MOUSE Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate OS=Mus musculus GN=Hgs PE=1 SV=2	0.970713625	2.009634
Q91VN6	DDX41_MOUSE	DDX41_MOUSE Probable ATP-dependent RNA helicase DDX41 OS=Mus musculus GN=Ddx41 PE=1 SV=2	-0.02863132	2.00456295
Q3ULB0	Q3ULB0_MOUSE	Q3ULB0_MOUSE Protein Rbm6 OS=Mus musculus GN=Rbm6 PE=2 SV=1	0.2640209	1.996537
Q62210	BIRC2_MOUSE	BIRC2_MOUSE Baculoviral IAP repeat-containing protein 2 OS=Mus musculus GN=Birc2 PE=1 SV=1	-1.397086	1.9903882
Q6P2K6	P4R3A_MOUSE	P4R3A_MOUSE Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 3A OS=Mus musculus GN=Smek1 PE=1 SV=1	0.26841807	1.9755245
Q9CWR1	WDR73_MOUSE	WDR73_MOUSE WD repeat-containing protein 73 OS=Mus musculus GN=Wdr73 PE=2 SV=1	0.191813188	1.95389
O08992	SDCB1_MOUSE	SDCB1_MOUSE Syntenin-1 OS=Mus musculus GN=Sdcbp PE=2 SV=1	0.574791575	1.946372
A2AN33	A2AN33_MOUSE	A2AN33_MOUSE Novel protein (5830434P21Rik) (Fragment) OS=Mus musculus GN=Prrc2b PE=4 SV=1	0.80901875	1.94125
P97927	LAMA4_MOUSE	LAMA4_MOUSE Laminin subunit alpha-4 OS=Mus musculus GN=Lama4 PE=1 SV=2	0.020546815	1.920444
P60469	LIPA3_MOUSE	LIPA3_MOUSE Liprin-alpha-3 OS=Mus musculus GN=Ppfia3 PE=1 SV=1	0.52541115	1.90227825
Q80U87	UBP8_MOUSE	UBP8_MOUSE Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 8 OS=Mus musculus GN=Usp8 PE=1 SV=2	-0.99877395	1.8993925
P70699	LYAG_MOUSE	LYAG_MOUSE Lysosomal alpha-glucosidase OS=Mus musculus GN=Gaa PE=1 SV=2	0.399695325	1.8963755
Q8C052	MAP1S_MOUSE	MAP1S_MOUSE Microtubule-associated protein 1S OS=Mus musculus GN=Map1s PE=1 SV=2	0.997152975	1.891214
Q8R143	PTTG_MOUSE	PTTG_MOUSE Pituitary tumor-transforming gene 1 protein-interacting protein OS=Mus musculus GN=Pttg1ip PE=1 SV=1	0.10862892	1.8887255
P17439	GLCM_MOUSE	GLCM_MOUSE Glucosylceramidase OS=Mus musculus GN=Gba PE=1 SV=1	0.52844506	1.8695675
P25085	IL1RA_MOUSE	IL1RA_MOUSE Interleukin-1 receptor antagonist protein OS=Mus musculus GN=Il1rn PE=2 SV=1	0.119502303	1.865456
D3Z6E8	D3Z6E8_MOUSE	D3Z6E8_MOUSE Deleted in lung and esophageal cancer protein 1 homolog OS=Mus musculus GN=Dlec1 PE=4 SV=1	-1.43041295	1.8502895
Q9QVP9	FAK2_MOUSE	FAK2_MOUSE Protein-tyrosine kinase 2-beta OS=Mus musculus GN=Ptk2b PE=1 SV=2	0.84712695	1.8424734
Q5H8C4	VP13A_MOUSE	VP13A_MOUSE Vacuolar protein sorting-associated protein 13A OS=Mus musculus GN=Vps13a PE=1 SV=1	-0.5867027	1.836893
Q9DCM0	ETHE1_MOUSE	ETHE1_MOUSE Protein ETHE1, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Ethe1 PE=1 SV=2	0.14963035	1.8148855
Q8K1G9	Q8K1G9_MOUSE	Q8K1G9_MOUSE DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 35 OS=Mus musculus GN=Dhx35 PE=2 SV=1	-0.4495439	1.8041685
O08999	LTBP2_MOUSE	LTBP2_MOUSE Latent-transforming growth factor beta-binding protein 2 OS=Mus musculus GN=Ltbp2 PE=1 SV=2	-1.381954	1.8009296
Q9JH22	ANKH_MOUSE	ANKH_MOUSE Progressive ankylosis protein OS=Mus musculus GN=Ankh PE=2 SV=1	1.2508773	1.7891245
Q8CDI7	CC150_MOUSE	CC150_MOUSE Coiled-coil domain-containing protein 150 OS=Mus musculus GN=Ccdc150 PE=2 SV=2	-1.107584	1.78608615
E9Q9B7	E9Q9B7_MOUSE	E9Q9B7_MOUSE Protein Kidins220 OS=Mus musculus GN=Kidins220 PE=4 SV=1	-0.48420846	1.7768329
Q9WU78	PDC6I_MOUSE	PDC6I_MOUSE Programmed cell death 6-interacting protein OS=Mus musculus GN=Pdc6ip PE=1 SV=3	0.732154025	1.7659175
O35316	SC6A6_MOUSE	SC6A6_MOUSE Sodium- and chloride-dependent taurine transporter OS=Mus musculus GN=Slc6a6 PE=1 SV=2	0.6854966	1.7488495
P63038	CH60_MOUSE	CH60_MOUSE 60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Hspd1 PE=1 SV=1	-1.18113905	1.7473635
Q9WUU7	CATZ_MOUSE	CATZ_MOUSE Cathepsin Z OS=Mus musculus GN=Ctsz PE=2 SV=1	-0.986859688	1.747167
Q9CR89	ERG12_MOUSE	ERG12_MOUSE Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 2 OS=Mus musculus GN=Ergic2 PE=2 SV=1	0.634107985	1.7400865
P97864	CASP7_MOUSE	CASP7_MOUSE Caspase-7 OS=Mus musculus GN=Casp7 PE=1 SV=2	-1.466913	1.7390065
P16675	PPGB_MOUSE	PPGB_MOUSE Lysosomal protective protein OS=Mus musculus GN=Ctsa PE=1 SV=1	-0.355063865	1.7368905
Q00623	APOA1_MOUSE	APOA1_MOUSE Apolipoprotein A-I OS=Mus musculus GN=Apoa1 PE=1 SV=2	0.1591697	1.7347475
P12265	BGLR_MOUSE	BGLR_MOUSE Beta-glucuronidase OS=Mus musculus GN=Gusb PE=2 SV=2	0.104365108	1.726214

fasta	proteína	Descripción	Zq medio en lisados celulares	Zq medio en exosomas
Q9D7P9	SPB12_MOUSE	SPB12_MOUSE Serpin B12 OS=Mus musculus GN=Serpib12 PE=2 SV=1	-1.2247078	1.72473115
P48381	RFX3_MOUSE	RFX3_MOUSE Transcription factor RFX3 OS=Mus musculus GN=Rfx3 PE=1 SV=2	-1.376425275	1.719215
O35988	SDC4_MOUSE	SDC4_MOUSE Syndecan-4 OS=Mus musculus GN=Sdc4 PE=1 SV=1	-0.1060065	1.713113
O09159	MA2B1_MOUSE	MA2B1_MOUSE Lysosomal alpha-mannosidase OS=Mus musculus GN=Man2b1 PE=2 SV=4	0.0172945	1.710113
Q02788	CO6A2_MOUSE	CO6A2_MOUSE Collagen alpha-2(VI) chain OS=Mus musculus GN=Col6a2 PE=2 SV=3	1.08820545	1.697079
P28574	MAX_MOUSE	MAX_MOUSE Protein max OS=Mus musculus GN=Max PE=1 SV=1	0.635077293	1.6964885
Q7TS99	HELT_MOUSE	HELT_MOUSE Hairy and enhancer of split-related protein HELT OS=Mus musculus GN=Helt PE=1 SV=1	1.34337525	1.6856635
E9Q394	E9Q394_MOUSE	E9Q394_MOUSE Protein Akap13 OS=Mus musculus GN=Akap13 PE=4 SV=1	-1.30285005	1.6745905
Q99JH8	ERD21_MOUSE	ERD21_MOUSE ER lumen protein retaining receptor 1 OS=Mus musculus GN=Kdelr1 PE=2 SV=1	0.09843285	1.6731315
E9Q5M6	E9Q5M6_MOUSE	E9Q5M6_MOUSE Protein Wdr52 OS=Mus musculus GN=Wdr52 PE=4 SV=1	0.033608475	1.667401
P63082	VATL_MOUSE	VATL_MOUSE V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit OS=Mus musculus GN=Atp6v0c PE=2 SV=1	0.487737343	1.6601835
Q3UH7	ZEP2_MOUSE	ZEP2_MOUSE Transcription factor HIVP2 OS=Mus musculus GN=Hivep2 PE=1 SV=1	0.625228	1.64478355
Q3UH68	LIMC1_MOUSE	LIMC1_MOUSE LIM and calponin homology domains-containing protein 1 OS=Mus musculus GN=Limc1 PE=1 SV=2	-0.841204689	1.6310477
Q9QWR8	NAGAB_MOUSE	NAGAB_MOUSE Alpha-N-acetylgalactosaminidase OS=Mus musculus GN=Naga PE=2 SV=2	-1.28979805	1.6237445
P21956	MFGM_MOUSE	MFGM_MOUSE Lactadherin OS=Mus musculus GN=Mfge8 PE=1 SV=3	0.2424041	1.615049
D3Z623	D3Z623_MOUSE	D3Z623_MOUSE MCG7194, isoform CRA_a OS=Mus musculus GN=9330159F19Rik PE=4 SV=2	-1.10424985	1.6131325
Q9D2F7	P210L_MOUSE	P210L_MOUSE Nuclear pore membrane glycoprotein 210-like OS=Mus musculus GN=Nup210l PE=2 SV=2	0.373082575	1.6102342
Q9ES74	NEK7_MOUSE	NEK7_MOUSE Serine/threonine-protein kinase Nek7 OS=Mus musculus GN=Nek7 PE=2 SV=1	0.89487005	1.60979875
Q32N26	TMC5_MOUSE	TMC5_MOUSE Transmembrane channel-like protein 5 OS=Mus musculus GN=Tmc5 PE=2 SV=1	-0.06643125	1.59121865
Q9CQW9	IFM3_MOUSE	IFM3_MOUSE Interferon-induced transmembrane protein 3 OS=Mus musculus GN=Ifitm3 PE=1 SV=1	-0.3668547	1.578817
E9Q2I4	E9Q2I4_MOUSE	E9Q2I4_MOUSE Uncharacterized protein OS=Mus musculus GN=Elmsan1 PE=4 SV=1	-1.3351723	1.5784745
Q9CXF4	TBC15_MOUSE	TBC15_MOUSE TBC1 domain family member 15 OS=Mus musculus GN=Tbc1d15 PE=1 SV=1	1.326292825	1.5667525
Q3UE31	K0930_MOUSE	K0930_MOUSE Uncharacterized protein KIAA0930 homolog OS=Mus musculus PE=1 SV=2	-0.168702105	1.5655737
Q9JIP7	S15A1_MOUSE	S15A1_MOUSE Solute carrier family 15 member 1 OS=Mus musculus GN=Slc15a1 PE=1 SV=2	-0.56940705	1.5604861
Q03265	ATPA_MOUSE	ATPA_MOUSE ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Atp5a1 PE=1 SV=1	-1.34324565	1.557187
Q1WG82	ZGLP1_MOUSE	ZGLP1_MOUSE GATA-type zinc finger protein 1 OS=Mus musculus GN=Zglp1 PE=2 SV=1	0.173817145	1.547324
Q9R0Q6	ARC1A_MOUSE	ARC1A_MOUSE Actin-related protein 2/3 complex subunit 1A OS=Mus musculus GN=Arpc1a PE=1 SV=1	-0.38585062	1.53921945
Q99JW2	ACY1_MOUSE	ACY1_MOUSE Aminoacylase-1 OS=Mus musculus GN=Acy1 PE=1 SV=1	0.79768725	1.53567265
Q9DBM1	GPTC1_MOUSE	GPTC1_MOUSE G patch domain-containing protein 1 OS=Mus musculus GN=Gpatch1 PE=2 SV=1	1.032124525	1.5331435
Q61838	A2M_MOUSE	A2M_MOUSE Alpha-2-macroglobulin OS=Mus musculus GN=A2m PE=1 SV=3	0.29355033	1.5290635
O08749	DLDH_MOUSE	DLDH_MOUSE Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Dld PE=1 SV=2	-0.548929145	1.523671
A2RT91	ANKAR_MOUSE	ANKAR_MOUSE Ankyrin and armadillo repeat-containing protein OS=Mus musculus GN=Ankar PE=2 SV=1	-1.0796173	1.52167125
D3Z2Q7	D3Z2Q7_MOUSE	D3Z2Q7_MOUSE Protein Hmcn1 OS=Mus musculus GN=Hmcn1 PE=4 SV=1	-0.2365211	1.52080025
Q62187	TTF1_MOUSE	TTF1_MOUSE Transcription termination factor 1 OS=Mus musculus GN=Ttf1 PE=1 SV=2	-0.136151475	1.51941415
Q8BM75	ARI5B_MOUSE	ARI5B_MOUSE AT-rich interactive domain-containing protein 5B OS=Mus musculus GN=Arid5b PE=1 SV=3	0.514485678	1.5011009

Tabla S2. Análisis proteómico de lisados celulares y exosomas derivados de MEFs Cav1WT y Cav1KO. Se muestran proteínas que presentan niveles similares entre lisados celulares ($-1,5 \leq Zq \leq 1,5$) y enriquecidas en exosomas derivados de MEFs Cav1KO ($Zq \leq 1,5$).

Proteínas enriquecidas en muestras Cav1WT
 Proteínas enriquecidas en muestras Cav1KO

fasta	proteína	Descripción	Zq medio en lisados celulares	Zq medio en exosomas
Q8CIG0	DEP1A_MOUSE	DEP1A_MOUSE DEP domain-containing protein 1A OS=Mus musculus GN=Depdc1a PE=1 SV=1	0.492053875	-7.139197
O55103	PRAX_MOUSE	PRAX_MOUSE Periaxin OS=Mus musculus GN=Prx PE=1 SV=1	0.289042	-6.678576
Q3URD3	SLMAP_MOUSE	SLMAP_MOUSE Sarcolemmal membrane-associated protein OS=Mus musculus GN=Smap PE=1 SV=2	-0.61783492	-6.391332
Q3UXZ6	FA81A_MOUSE	FA81A_MOUSE Protein FAM81A OS=Mus musculus GN=Fam81a PE=2 SV=2	-1.0614964	-5.580975
Q8CH09	SUGP2_MOUSE	SUGP2_MOUSE SURP and G-patch domain-containing protein 2 OS=Mus musculus GN=Sugp2 PE=2 SV=2	-0.63230825	-5.4315825
Q61704	ITIH3_MOUSE	ITIH3_MOUSE Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 OS=Mus musculus GN=Itih3 PE=1 SV=3	0.634889435	-5.4309515
Q5QNR3	Q5QNR3_MOUSE	Q5QNR3_MOUSE Ankyrin repeat domain 36 (Fragment) OS=Mus musculus GN=Ankrd36 PE=4 SV=2	0.14663565	-5.381203
P60041	SMS_MOUSE	SMS_MOUSE Somatostatin OS=Mus musculus GN=Sst PE=2 SV=1	0.0800093	-4.838257
Q9D0M5	DYL2_MOUSE	DYL2_MOUSE Dynein light chain 2, cytoplasmic OS=Mus musculus GN=Dynl2 PE=1 SV=1	-1.39417195	-4.6404315
P48759	PTX3_MOUSE	PTX3_MOUSE Pentraxin-related protein PTX3 OS=Mus musculus GN=Ptx3 PE=1 SV=2	-1.489377875	-4.5634045
O88879	APAF_MOUSE	APAF_MOUSE Apoptotic protease-activating factor 1 OS=Mus musculus GN=Apaf1 PE=1 SV=3	0.07667068	-4.351049
O70439	STX7_MOUSE	STX7_MOUSE Syntaxin-7 OS=Mus musculus GN=Stx7 PE=1 SV=3	-0.678975125	-4.0837535
Q8CIM1	LRC45_MOUSE	LRC45_MOUSE Leucine-rich repeat-containing protein 45 OS=Mus musculus GN=Lrrc45 PE=2 SV=2	1.19418255	-3.994488
Q8K0Z7	TACO1_MOUSE	TACO1_MOUSE Translational activator of cytochrome c oxidase 1 OS=Mus musculus GN=Taco1 PE=2 SV=1	-0.070446115	-3.912003
Q8C6P5	Q8C6P5_MOUSE	Q8C6P5_MOUSE MCG118654 OS=Mus musculus GN=E230019M04Rik PE=2 SV=1	-0.10734535	-3.85474
Q6PHQ8	NAA35_MOUSE	NAA35_MOUSE N-alpha-acetyltransferase 35, NatC auxiliary subunit OS=Mus musculus GN=Naa35 PE=1 SV=1	0.289695113	-3.8043265
P14824	ANXA6_MOUSE	ANXA6_MOUSE Annexin A6 OS=Mus musculus GN=Anxa6 PE=1 SV=3	-0.1089906	-3.707107
Q8C1A3	MTRR_MOUSE	MTRR_MOUSE Methionine synthase reductase OS=Mus musculus GN=Mtrr PE=2 SV=2	-0.86639315	-3.6848055
Q6ZWY9	H2B1C_MOUSE	H2B1C_MOUSE Histone H2B type 1-C/E/G OS=Mus musculus GN=Hist1h2bc PE=1 SV=3	-0.26717725	-3.5709335
Q05512	MARK2_MOUSE	MARK2_MOUSE Serine/threonine-protein kinase MARK2 OS=Mus musculus GN=Mark2 PE=1 SV=3	-1.2945246	-3.4789985
Q8BGA5	KRR1_MOUSE	KRR1_MOUSE KRR1 small subunit processome component homolog OS=Mus musculus GN=Krr1 PE=2 SV=1	-0.23709815	-3.43994
P56564	EAA1_MOUSE	EAA1_MOUSE Excitatory amino acid transporter 1 OS=Mus musculus GN=Slc1a3 PE=1 SV=2	-0.159957275	-3.382943
Q5DU37	ZFY26_MOUSE	ZFY26_MOUSE Zinc finger FYVE domain-containing protein 26 OS=Mus musculus GN=Zfyve26 PE=2 SV=2	-0.72484869	-3.37957
Q9QYX7	PCL0_MOUSE	PCL0_MOUSE Protein piccolo OS=Mus musculus GN=Pclo PE=1 SV=4	0.43473455	-3.3379555
Q09XV5	CHD8_MOUSE	CHD8_MOUSE Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 8 OS=Mus musculus GN=Chd8 PE=1 SV=1	0.29407045	-3.2994605
Q08481	PECA1_MOUSE	PECA1_MOUSE Platelet endothelial cell adhesion molecule OS=Mus musculus GN=Pecam1 PE=1 SV=1	-0.1334888	-3.2882955
Q64522	H2A2B_MOUSE	H2A2B_MOUSE Histone H2A type 2-B OS=Mus musculus GN=Hist2h2ab PE=1 SV=3	0.4528265	-3.287061
F8WIT2	F8WIT2_MOUSE	F8WIT2_MOUSE Annexin OS=Mus musculus GN=Anxa6 PE=3 SV=1	-1.15266515	-3.276662
Q8CDM4	CCD73_MOUSE	CCD73_MOUSE Coiled-coil domain-containing protein 73 OS=Mus musculus GN=Ccdc73 PE=1 SV=2	0.69508935	-3.276174
B2RXC6	B2RXC6_MOUSE	B2RXC6_MOUSE DNA-directed RNA polymerase OS=Mus musculus GN=Polr3a PE=2 SV=1	0.56381955	-3.2355195

fasta	proteina	Descripción	Zq medio en lisados celulares	Zq medio en exosomas
P62806	H4_MOUSE	H4_MOUSE Histone H4 OS=Mus musculus GN=Hist1h4a PE=1 SV=2	-0.2806253	-3.158023
Q8BGC0	HTSF1_MOUSE	HTSF1_MOUSE HIV Tat-specific factor 1 homolog OS=Mus musculus GN=Htatsf1 PE=1 SV=1	-0.4277447	-3.1530725
Q3USW5	FXRD2_MOUSE	FXRD2_MOUSE FAD-dependent oxidoreductase domain-containing protein 2 OS=Mus musculus GN=Foxred2 PE=2 SV=1	1.144015525	-3.149493
P68433	H31_MOUSE	H31_MOUSE Histone H3.1 OS=Mus musculus GN=Hist1h3a PE=1 SV=2	-1.06596385	-3.1307975
Q8CGP0	H2B3B_MOUSE	H2B3B_MOUSE Histone H2B type 3-B OS=Mus musculus GN=Hist3h2bb PE=1 SV=3	-1.381308425	-3.1213465
Q80V11	TRI56_MOUSE	TRI56_MOUSE E3 ubiquitin-protein ligase TRIM56 OS=Mus musculus GN=Trim56 PE=1 SV=1	0.4141244	-3.095956
P22752	H2A1_MOUSE	H2A1_MOUSE Histone H2A type 1 OS=Mus musculus GN=Hist1h2ab PE=1 SV=3	-1.0177139	-3.0830405
O35600	ABCA4_MOUSE	ABCA4_MOUSE Retinal-specific ATP-binding cassette transporter OS=Mus musculus GN=Abca4 PE=2 SV=1	0.3378392	-3.060893
P97868	RBBP6_MOUSE	RBBP6_MOUSE E3 ubiquitin-protein ligase RBBP6 OS=Mus musculus GN=Rbbp6 PE=1 SV=5	-0.1679444	-3.007676
Q70FJ1	AKAP9_MOUSE	AKAP9_MOUSE A-kinase anchor protein 9 OS=Mus musculus GN=Akap9 PE=2 SV=2	0.22078809	-2.9942545
Q9WVB4	SLIT3_MOUSE	SLIT3_MOUSE Slit homolog 3 protein OS=Mus musculus GN=Slit3 PE=2 SV=2	0.2308981	-2.927334
Q9JIQ3	DBLOH_MOUSE	DBLOH_MOUSE Diablo homolog, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Diablo PE=1 SV=2	0.2715241	-2.919587
O08808	DIAP1_MOUSE	DIAP1_MOUSE Protein diaphanous homolog 1 OS=Mus musculus GN=Diaph1 PE=1 SV=1	0.7310884	-2.884417
Q6KAR6	EXOC3_MOUSE	EXOC3_MOUSE Exocyst complex component 3 OS=Mus musculus GN=Exoc3 PE=1 SV=2	0.181928605	-2.870761
A2AFR3	FRPD4_MOUSE	FRPD4_MOUSE FERM and PDZ domain-containing protein 4 OS=Mus musculus GN=Frmpd4 PE=1 SV=1	1.201638375	-2.8594015
Q7M6Y6	HTRB2_MOUSE	HTRB2_MOUSE HEAT repeat-containing protein 7B2 OS=Mus musculus GN=Heatr7b2 PE=1 SV=2	-0.24368275	-2.856035
Q91ZV8	GP124_MOUSE	GP124_MOUSE G-protein coupled receptor 124 OS=Mus musculus GN=Gpr124 PE=2 SV=2	-0.77948585	-2.8019115
Q3V300	KIF22_MOUSE	KIF22_MOUSE Kinesin-like protein KIF22 OS=Mus musculus GN=Kif22 PE=2 SV=2	0.56344495	-2.755578
Q3THW5	H2AV_MOUSE	H2AV_MOUSE Histone H2A.V OS=Mus musculus GN=H2afv PE=1 SV=3	-0.43509165	-2.7245435
Q8R1U1	COG4_MOUSE	COG4_MOUSE Conserved oligomeric Golgi complex subunit 4 OS=Mus musculus GN=Cog4 PE=2 SV=1	0.4550031	-2.689075
Q9JLZ3	AUHM_MOUSE	AUHM_MOUSE Methylglutacetyl-CoA hydratase, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Auh PE=2 SV=1	-0.0526517	-2.679432
Q8VDP4	K1967_MOUSE	K1967_MOUSE DBIRD complex subunit KIAA1967 homolog OS=Mus musculus PE=1 SV=2	0.065294825	-2.651144
Q9QUG2	POLK_MOUSE	POLK_MOUSE DNA polymerase kappa OS=Mus musculus GN=Polk PE=1 SV=1	0.711130722	-2.6414295
P10922	H10_MOUSE	H10_MOUSE Histone H1.0 OS=Mus musculus GN=H1f0 PE=2 SV=4	-0.981066675	-2.606747
P10852	4F2_MOUSE	4F2_MOUSE 4F2 cell-surface antigen heavy chain OS=Mus musculus GN=Slc3a2 PE=1 SV=1	-1.492468125	-2.5860915
Q04750	TOP1_MOUSE	TOP1_MOUSE DNA topoisomerase 1 OS=Mus musculus GN=Top1 PE=1 SV=2	-0.6614879	-2.578468
Q8K4S1	PLCE1_MOUSE	PLCE1_MOUSE 1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase epsilon-1 OS=Mus musculus GN=Plce1 PE=1 SV=3	0.2880974	-2.5754195
Q61464	ZN638_MOUSE	ZN638_MOUSE Zinc finger protein 638 OS=Mus musculus GN=Znf638 PE=1 SV=2	0.387129	-2.5643985
Q921G8	GCP2_MOUSE	GCP2_MOUSE Gamma-tubulin complex component 2 OS=Mus musculus GN=Tubgcp2 PE=2 SV=2	-0.255987483	-2.5029685
Q5U4C3	SFR19_MOUSE	SFR19_MOUSE Splicing factor, arginine/serine-rich 19 OS=Mus musculus GN=Scaf1 PE=1 SV=1	-0.1009311	-2.4749055
Q80T85	DCAF5_MOUSE	DCAF5_MOUSE DDB1- and CUL4-associated factor 5 OS=Mus musculus GN=Dcaf5 PE=1 SV=2	-0.8107547	-2.4575655
P97384	ANX11_MOUSE	ANX11_MOUSE Annexin A11 OS=Mus musculus GN=Anxa11 PE=1 SV=2	-0.388739375	-2.443557
A2AG06	CQ104_MOUSE	CQ104_MOUSE Uncharacterized protein C17orf104 homolog OS=Mus musculus GN=Gm1564 PE=2 SV=1	-0.991816	-2.4380715
E9PUS4	E9PUS4_MOUSE	E9PUS4_MOUSE Protein Zfp944 OS=Mus musculus GN=Zfp944 PE=4 SV=1	0.64590455	-2.4367035
Q80WE4	KI20B_MOUSE	KI20B_MOUSE Kinesin-like protein KIF20B OS=Mus musculus GN=Kif20b PE=1 SV=3	0.7062975	-2.421928
E9Q3P4	E9Q3P4_MOUSE	E9Q3P4_MOUSE Protein Cenpf OS=Mus musculus GN=Cenpf PE=4 SV=1	0.1351035	-2.4155335
A2A7F4	A2A7F4_MOUSE	A2A7F4_MOUSE MCG122876 OS=Mus musculus GN=Rif PE=4 SV=1	-0.92340135	-2.414259
Q6ZWR6	SYNE1_MOUSE	SYNE1_MOUSE Nesprin-1 OS=Mus musculus GN=Syne1 PE=1 SV=2	0.237680725	-2.412317
Q62293	Q62293_MOUSE	Q62293_MOUSE Interferon-gamma-inducible GTPase Ifggb5 protein OS=Mus musculus GN=Tgtp PE=2 SV=1	-0.7969779	-2.391253
Q8R4U6	TOP1M_MOUSE	TOP1M_MOUSE DNA topoisomerase I, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Top1mt PE=2 SV=1	0.2492915	-2.3825325
B1AQJ2	UBP36_MOUSE	UBP36_MOUSE Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 36 OS=Mus musculus GN=Usp36 PE=2 SV=1	0.152612425	-2.3764055

fasta	proteina	Descripción	Zq medio en lisados celulares	Zq medio en exosomas
A3KG81	A3KG81_MOUSE	A3KG81_MOUSE Multiple PDZ domain protein OS=Mus musculus GN=Mpdz PE=4 SV=1	0.98571325	-2.372374
Q8C4Y3	NELFB_MOUSE	NELFB_MOUSE Negative elongation factor B OS=Mus musculus GN=Cobra1 PE=2 SV=2	0.0578979	-2.3721825
Q8BUV3	GEPH_MOUSE	GEPH_MOUSE Gephyrin OS=Mus musculus GN=Gphn PE=1 SV=2	-0.96703745	-2.3437155
Q8BTS4	NUP54_MOUSE	NUP54_MOUSE Nuclear pore complex protein Nup54 OS=Mus musculus GN=Nup54 PE=1 SV=1	0.318808315	-2.313369
Q61235	SNTB2_MOUSE	SNTB2_MOUSE Beta-2-syntrophin OS=Mus musculus GN=Sntb2 PE=1 SV=2	-0.9237506	-2.302934
P31750	AKT1_MOUSE	AKT1_MOUSE RAC-alpha serine/threonine-protein kinase OS=Mus musculus GN=Akt1 PE=1 SV=2	0.157577475	-2.293791
Q9QZZ4	MYO15_MOUSE	MYO15_MOUSE Unconventional myosin-XV OS=Mus musculus GN=Myo15a PE=1 SV=2	0.842512	-2.262373
Q8C166	CPNE1_MOUSE	CPNE1_MOUSE Copine-1 OS=Mus musculus GN=Cpne1 PE=1 SV=1	-0.106032535	-2.198329
P25976	UBF1_MOUSE	UBF1_MOUSE Nucleolar transcription factor 1 OS=Mus musculus GN=Ubt1 PE=1 SV=1	0.16988003	-2.1711105
Q8BH66	ATLA1_MOUSE	ATLA1_MOUSE Atlastin-1 OS=Mus musculus GN=At11 PE=1 SV=1	-1.14690585	-2.1637945
Q80XJ3	TTC28_MOUSE	TTC28_MOUSE Tetratricopeptide repeat protein 28 OS=Mus musculus GN=Ttc28 PE=2 SV=2	0.0725544	-2.1628035
Q99PP2	ZN318_MOUSE	ZN318_MOUSE Zinc finger protein 318 (Fragment) OS=Mus musculus GN=Znf318 PE=1 SV=2	-1.0659272	-2.1491575
Q99MJ9	DDX50_MOUSE	DDX50_MOUSE ATP-dependent RNA helicase DDX50 OS=Mus musculus GN=Ddx50 PE=2 SV=1	-0.437810413	-2.1045935
Q8BTJ4	ENPP4_MOUSE	ENPP4_MOUSE Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 4 OS=Mus musculus GN=Enpp4 PE=1 SV=1	-1.3537899	-2.0994985
Q8JZZ7	LPHN2_MOUSE	LPHN2_MOUSE Latrophilin-2 (Fragment) OS=Mus musculus GN=Lphn2 PE=1 SV=2	-1.3852275	-2.0980885
Q61735	CD47_MOUSE	CD47_MOUSE Leukocyte surface antigen CD47 OS=Mus musculus GN=Cd47 PE=1 SV=2	0.05880495	-2.0940625
Q80W49	CRBG3_MOUSE	CRBG3_MOUSE Beta/gamma crystallin domain-containing protein 3 OS=Mus musculus GN=Crybg3 PE=2 SV=2	0.200417	-2.0379395
E0CZ16	KLHL3_MOUSE	KLHL3_MOUSE Kelch-like protein 3 OS=Mus musculus GN=Klh3 PE=1 SV=2	-0.6835018	-2.020152
Q07076	ANXA7_MOUSE	ANXA7_MOUSE Annexin A7 OS=Mus musculus GN=Anxa7 PE=2 SV=2	-0.1334569	-2.0198945
Q6NV83	SR140_MOUSE	SR140_MOUSE U2 snRNP-associated SURP motif-containing protein OS=Mus musculus GN=U2surp PE=1 SV=3	-0.26062885	-2.015169
P97376	FRG1_MOUSE	FRG1_MOUSE Protein FRG1 OS=Mus musculus GN=Fr11 PE=1 SV=2	-0.126245748	-2.0098715
P10107	ANXA1_MOUSE	ANXA1_MOUSE Annexin A1 OS=Mus musculus GN=Anxa1 PE=1 SV=2	0.819101575	-2.008743
Q9Z1W8	AT12A_MOUSE	AT12A_MOUSE Potassium-transporting ATPase alpha chain 2 OS=Mus musculus GN=Atp12a PE=1 SV=3	0.533568275	-2.003361
Q3UKJ7	SMU1_MOUSE	SMU1_MOUSE WD40 repeat-containing protein SMU1 OS=Mus musculus GN=Smu1 PE=2 SV=2	0.431808125	-1.9910455
Q9R002	IFI2_MOUSE	IFI2_MOUSE Interferon-activable protein 202 OS=Mus musculus GN=Ifi202 PE=1 SV=3	-0.2884163	-1.979839
Q6VNS1	NTRK3_MOUSE	NTRK3_MOUSE NT-3 growth factor receptor OS=Mus musculus GN=Ntrk3 PE=1 SV=1	-0.9486528	-1.978329
D3YZU1	SHAN1_MOUSE	SHAN1_MOUSE SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 1 OS=Mus musculus GN=Shank1 PE=2 SV=1	1.1795551	-1.975272
Q7TPV4	MBB1A_MOUSE	MBB1A_MOUSE Myb-binding protein 1A OS=Mus musculus GN=Mybbp1a PE=1 SV=2	-0.197273475	-1.9673355
Q99LB6	MAT2B_MOUSE	MAT2B_MOUSE Methionine adenosyltransferase 2 subunit beta OS=Mus musculus GN=Mat2b PE=2 SV=1	-1.025617325	-1.954822
P05622	PGFRB_MOUSE	PGFRB_MOUSE Platelet-derived growth factor receptor beta OS=Mus musculus GN=Pdgfrb PE=1 SV=1	-1.4780345	-1.952385
Q8BWM0	PGES2_MOUSE	PGES2_MOUSE Prostaglandin E synthase 2 OS=Mus musculus GN=Ptges2 PE=1 SV=3	0.27492953	-1.9409392
Q3TEA8	HP1B3_MOUSE	HP1B3_MOUSE Heterochromatin protein 1-binding protein 3 OS=Mus musculus GN=Hp1bp3 PE=1 SV=1	-0.31185695	-1.940511
Q7TMY8	HUWE1_MOUSE	HUWE1_MOUSE E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1 OS=Mus musculus GN=Huwe1 PE=1 SV=5	-1.3550889	-1.93579
O54734	OST48_MOUSE	OST48_MOUSE Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit OS=Mus musculus GN=Ddost PE=1 SV=2	-0.268782555	-1.905627
Q3TWW8	Q3TWW8_MOUSE	Q3TWW8_MOUSE Protein Srsf6 OS=Mus musculus GN=Srsf6 PE=2 SV=1	-0.4380179	-1.89574
Q9Z277	BAZ1B_MOUSE	BAZ1B_MOUSE Tyrosine-protein kinase BAZ1B OS=Mus musculus GN=Baz1b PE=1 SV=2	0.408102675	-1.8779685
P30658	CBX2_MOUSE	CBX2_MOUSE Chromobox protein homolog 2 OS=Mus musculus GN=Cbx2 PE=1 SV=2	0.84694175	-1.87706495
P19137	LAMA1_MOUSE	LAMA1_MOUSE Laminin subunit alpha-1 OS=Mus musculus GN=Lama1 PE=1 SV=1	0.974480825	-1.86619
Q3UTQ8	CDKL5_MOUSE	CDKL5_MOUSE Cyclin-dependent kinase-like 5 OS=Mus musculus GN=Cdkl5 PE=2 SV=1	0.154849	-1.8277985
O54824	IL16_MOUSE	IL16_MOUSE Pro-interleukin-16 OS=Mus musculus GN=Il16 PE=1 SV=3	-0.52242825	-1.8223295
Q9CZW4	ACSL3_MOUSE	ACSL3_MOUSE Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 3 OS=Mus musculus GN=Acsl3 PE=2 SV=2	-1.379620225	-1.815814

fasta	proteina	Descripción	Zq medio en lisados celulares	Zq medio en exosomas
Q09143	CTR1_MOUSE	CTR1_MOUSE High affinity cationic amino acid transporter 1 OS=Mus musculus GN=Slc7a1 PE=2 SV=1	-0.553424075	-1.8122005
Q61656	DDX5_MOUSE	DDX5_MOUSE Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 OS=Mus musculus GN=Ddx5 PE=1 SV=2	0.128016975	-1.8074435
Q6PHS9	CA2D2_MOUSE	CA2D2_MOUSE Voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-2 OS=Mus musculus GN=Cacna2d2 PE=1 SV=1	0.789331875	-1.8031655
Q63829	COMD3_MOUSE	COMD3_MOUSE COMM domain-containing protein 3 OS=Mus musculus GN=Commd3 PE=2 SV=1	-0.61347	-1.7785064
E9PYK3	E9PYK3_MOUSE	E9PYK3_MOUSE Protein Parp4 OS=Mus musculus GN=Parp4 PE=4 SV=1	-0.299329	-1.7700899
Q8VHI3	OFUT2_MOUSE	OFUT2_MOUSE GDP-fucose protein O-fucosyltransferase 2 OS=Mus musculus GN=Pofut2 PE=1 SV=1	0.176851473	-1.7498815
Q9R008	KIME_MOUSE	KIME_MOUSE Mevalonate kinase OS=Mus musculus GN=Mvk PE=2 SV=1	-0.4667503	-1.74041
Q8BLN5	ERG7_MOUSE	ERG7_MOUSE Lanosterol synthase OS=Mus musculus GN=Lss PE=2 SV=2	0.3823731	-1.729372
Q01279	EGFR_MOUSE	EGFR_MOUSE Epidermal growth factor receptor OS=Mus musculus GN=Egfr PE=1 SV=1	-0.593740675	-1.717385
Q9WVG6	CARM1_MOUSE	CARM1_MOUSE Histone-arginine methyltransferase CARM1 OS=Mus musculus GN=Carm1 PE=1 SV=2	0.29961271	-1.7078905
Q6P9P6	KIF11_MOUSE	KIF11_MOUSE Kinesin-like protein KIF11 OS=Mus musculus GN=Kif11 PE=2 SV=1	0.860283223	-1.703483
P59242	CING_MOUSE	CING_MOUSE Cingulin OS=Mus musculus GN=Cgn PE=1 SV=1	-0.6399701	-1.700078
Q8CC70	Q8CC70_MOUSE	Q8CC70_MOUSE Protein 9230110C19Rik OS=Mus musculus GN=9230110C19Rik PE=2 SV=1	-0.54603065	-1.687325
Q9D7P6	ISCU_MOUSE	ISCU_MOUSE Iron-sulfur cluster assembly enzyme ISCU, mitochondrial OS=Mus musculus GN=Iscu PE=1 SV=1	-0.365224985	-1.6843985
Q8VDN2	AT1A1_MOUSE	AT1A1_MOUSE Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 OS=Mus musculus GN=Atp1a1 PE=1 SV=1	-0.5416816	-1.6791835
Q9QUJ7	ACSL4_MOUSE	ACSL4_MOUSE Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4 OS=Mus musculus GN=Acsl4 PE=2 SV=2	-0.7774958	-1.675535
P40224	SDF1_MOUSE	SDF1_MOUSE Stromal cell-derived factor 1 OS=Mus musculus GN=Cxcl12 PE=2 SV=2	-0.94043435	-1.674403
P59108	CPNE2_MOUSE	CPNE2_MOUSE Copine-2 OS=Mus musculus GN=Cpne2 PE=2 SV=1	-0.551229175	-1.664166
A2A6A1	GPTC8_MOUSE	GPTC8_MOUSE G patch domain-containing protein 8 OS=Mus musculus GN=Gpatch8 PE=2 SV=1	1.13310405	-1.6641445
Q8BFY6	PEF1_MOUSE	PEF1_MOUSE Peflin OS=Mus musculus GN=Pef1 PE=2 SV=1	0.037529375	-1.663258
P20444	KPCA_MOUSE	KPCA_MOUSE Protein kinase C alpha type OS=Mus musculus GN=Prkca PE=1 SV=3	-0.10052165	-1.6609865
Q9EQK5	MVP_MOUSE	MVP_MOUSE Major vault protein OS=Mus musculus GN=Mvp PE=1 SV=4	-0.0356334	-1.659332
Q8R146	APEH_MOUSE	APEH_MOUSE Acylamino-acid-releasing enzyme OS=Mus musculus GN=Apeh PE=2 SV=3	-0.207562815	-1.651233
P53690	MMP14_MOUSE	MMP14_MOUSE Matrix metalloproteinase-14 OS=Mus musculus GN=Mmp14 PE=2 SV=3	-0.342394325	-1.6383805
Q8BK62	OLFL3_MOUSE	OLFL3_MOUSE Olfactomedin-like protein 3 OS=Mus musculus GN=Olflm3 PE=2 SV=2	0.08579105	-1.6320145
Q9WTS6	TEN3_MOUSE	TEN3_MOUSE Teneurin-3 OS=Mus musculus GN=Tenm3 PE=1 SV=1	1.269845	-1.630478
Q60838	DVL2_MOUSE	DVL2_MOUSE Segment polarity protein dishevelled homolog DVL-2 OS=Mus musculus GN=Dvl2 PE=1 SV=2	-0.23034338	-1.6227015
P30412	PPIC_MOUSE	PPIC_MOUSE Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C OS=Mus musculus GN=Ppic PE=1 SV=1	-0.692046725	-1.598411
Q80T74	KLH29_MOUSE	KLH29_MOUSE Kelch-like protein 29 OS=Mus musculus GN=Klhl29 PE=2 SV=2	1.250241	-1.5943585
E9Q6P5	E9Q6P5_MOUSE	E9Q6P5_MOUSE Protein Ttc7b OS=Mus musculus GN=Ttc7b PE=4 SV=1	-1.01614145	-1.58779
Q9EPK6	SIL1_MOUSE	SIL1_MOUSE Nucleotide exchange factor SIL1 OS=Mus musculus GN=Sil1 PE=1 SV=2	1.4380755	-1.5828995
Q9D1M1	Q9D1M1_MOUSE	Q9D1M1_MOUSE DNA-directed RNA polymerases I and III subunit RPAC2 OS=Mus musculus GN=Polr1d PE=2 SV=1	-0.39317485	-1.579408
P0C027	NUD10_MOUSE	NUD10_MOUSE Diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase 3-alpha OS=Mus musculus GN=Nudt10 PE=1 SV=1	-0.9874414	-1.577782
P17918	PCNA_MOUSE	PCNA_MOUSE Proliferating cell nuclear antigen OS=Mus musculus GN=Pcna PE=1 SV=2	-1.134103825	-1.5689185
Q64430	ATP7A_MOUSE	ATP7A_MOUSE Copper-transporting ATPase 1 OS=Mus musculus GN=Atp7a PE=1 SV=3	-1.38178745	-1.564196
Q9R1T2	SAE1_MOUSE	SAE1_MOUSE SUMO-activating enzyme subunit 1 OS=Mus musculus GN=Sae1 PE=2 SV=1	-0.408654175	-1.5640595
Q9Z0T6	PKDRE_MOUSE	PKDRE_MOUSE Polycystic kidney disease and receptor for egg jelly-related protein OS=Mus musculus GN=Pkdrej PE=2 SV=1	0.2310716	-1.562343
Q80UZ0	FGD5_MOUSE	FGD5_MOUSE FYVE, RhoGEF and PH domain-containing protein 5 OS=Mus musculus GN=Fgd5 PE=1 SV=2	-0.8966598	-1.561054
P21279	GNAQ_MOUSE	GNAQ_MOUSE Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha OS=Mus musculus GN=Gnaq PE=1 SV=4	-0.480527925	-1.5580455
P31786	ACBP_MOUSE	ACBP_MOUSE Acyl-CoA-binding protein OS=Mus musculus GN=Dbi PE=1 SV=2	-0.80820145	-1.557912
Q8CDL9	CCD87_MOUSE	CCD87_MOUSE Coiled-coil domain-containing protein 87 OS=Mus musculus GN=Ccdc87 PE=2 SV=2	-0.9034457	-1.5538812

fasta	proteina	Descripción	Zq medio en lisados celulares	Zq medio en exosomas
P28653	PGS1_MOUSE	PGS1_MOUSE Biglycan OS=Mus musculus GN=Bgn PE=2 SV=1	0.763910375	-1.5513725
Q80U72	SCRIB_MOUSE	SCRIB_MOUSE Protein scribble homolog OS=Mus musculus GN=Scrib PE=1 SV=2	-0.28618435	-1.5426335
O88866	HUNK_MOUSE	HUNK_MOUSE Hormonally up-regulated neu tumor-associated kinase OS=Mus musculus GN=Hunk PE=2 SV=1	0.26816725	-1.538813
Q61234	SNTA1_MOUSE	SNTA1_MOUSE Alpha-1-syntrophin OS=Mus musculus GN=Snta1 PE=1 SV=1	-0.469388898	-1.53714
O54962	BAF_MOUSE	BAF_MOUSE Barrier-to-autointegration factor OS=Mus musculus GN=Banf1 PE=1 SV=1	-0.141920808	-1.532403
B2RT41	B2RT41_MOUSE	B2RT41_MOUSE Protein Zfc3h1 OS=Mus musculus GN=Zfc3h1 PE=2 SV=1	1.16211915	-1.52911505
P25206	MCM3_MOUSE	MCM3_MOUSE DNA replication licensing factor MCM3 OS=Mus musculus GN=Mcm3 PE=1 SV=2	-1.008582025	-1.5172475
Q3V0M1	Q3V0M1_MOUSE	Q3V0M1_MOUSE Gene model 906, (NCBI) OS=Mus musculus GN=Gm906 PE=2 SV=1	0.13860632	-1.514371
Q9JJE7	FADS3_MOUSE	FADS3_MOUSE Fatty acid desaturase 3 OS=Mus musculus GN=Fads3 PE=2 SV=2	-1.34789725	-1.511395
Q8BWZ3	NAA25_MOUSE	NAA25_MOUSE N-alpha-acetyltransferase 25, NatB auxiliary subunit OS=Mus musculus GN=Naa25 PE=1 SV=1	0.2478496	-1.506909