



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

SECRETARIA DE SALUD

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

*“Análisis del Receptor de motilidad mediado por Hialuronano (CD 168) y
sus variantes obtenidas por splicing alternativo mediante técnicas in silico”*

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

ESPECIALISTA EN PEDIATRÍA

PRESENTA:

DR JORGE ANTONIO BERMÚDEZ LUGO

TUTORES:

DR SERGIO JUAREZ MÉNDEZ

DRA ROCIO CÁRDENAS CARDÓS

MÉXICO, D.F.

2015





Universidad Nacional
Autónoma de México



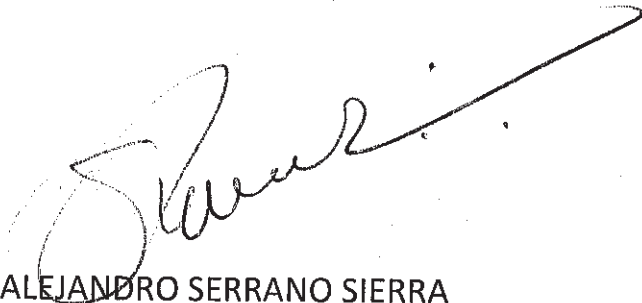
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

"Análisis del Receptor de motilidad mediado por Hialuronano (CD 168) y sus variantes obtenidas por splicing alternativo mediante técnicas *in silico*"



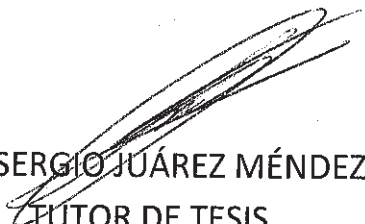
DR. ALEJANDRO SERRANO SIERRA
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE
ESPECIALIZACIÓN EN PEDIATRÍA



DRA. ROSAURA ROSAS VARGAS
DIRECTORA DE ENSEÑANZA



DR. MANUEL ENRIQUE FLORES LANDERO
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO



DR. SERGIO JUÁREZ MÉNDEZ
TUTOR DE TESIS



DRA. ROCÍO CÁRDENAS CARDÓS
COTUTOR DE TESIS

DEDICATORIAS:

A Itzel, que tardó tanto en llegar

AGRADECIMIENTOS:

A mis tutores de tesis, Doctora Rocío Cárdenas y
Doctor Sergio Juarez por darme libertad y todo su apoyo

A mi madre por tantos años de apoyo

CONTENIDO GENERAL

CONTENIDO GENERAL	II
ÍNDICE	III
ÍNDICE DE FIGURAS	V
GLOSARIO DE TÉRMINOS	VI
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII

ÍNDICE

	Pag
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	2
2.1 Receptor de motilidad mediado por ácido hialurónico	2
2.2 Métodos in silico	4
2.2.1 Algoritmos	4
2.2.2 Alineamientos	5
2.2.3 Protein folding	9
2.3 Cáncer	10
3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
4 JUSTIFICACIÓN	11
5 HIPOTESIS	12
6 OBJETIVOS	12
6.1 Objetivo general	12
6.2 Objetivo particulares	12

7	MATERIAL Y MÉTODO	13
7.1	Instalaciones y equipo	13
7.2	Tipo de estudio	13
7.3	Alineamiento general de HMMR	13
7.4	Alineamiento múltiple	14
7.5	Secuencia tridimensional	14
7.5.1	Obtención experimental	14
7.5.2	Obtención empírica	14
8	RESULTADOS	15
8.1	Alineamiento	15
8.1.1	BLAST	15
8.1.2	Clustal Omega	15
8.2	Estructura tridimensional	17
8.2.1	Protein Data Bank	17
8.2.2	LOOP	17
8.2.3	VMD	20
9	DISCUSIÓN	22
10	CONCLUSIONES	25
11	PERSPECTIVAS	26
12	BIBLIOGRAFÍA	26

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ejemplo de la organización de una matriz	7
Figura 2	Ejemplo de interpretación de un alineamiento	8
Figura 3	Alineamiento múltiple de HMMR con sus tres isoformas	16
Figura 4	Estructura tridimensional de HMMR	18
Figura 5	Estructura de HMMR y sus isoformas	19
Figura 6	Alineamiento de HMMR y sus variantes	20
Figura 7	Estructura de HMMR en membrana lipídica	21
Figura 8	Comparación de proteína de membrana y HMMR	23

GLOSARIO DE TERMINOS

AA	Aminoácido
HMMR	Receptor de motilidad mediado por hialuronano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
EMBL-EBI	European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute
WU-BLAST Tool	Washington University Basic Local Alignment Search Tool
PDB	Protein Data Bank
LOOPP	Learning, Observing and Outputting Protein Patterns
VMD	Visual molecular dynamics

RESUMEN

La expresión de HMMR (una proteína que se une a ácido hialurónico y favorece la migración celular) en células neoplásicas se ha asociado a metástasis y el pronóstico de los pacientes. Se ha reportado que existen isoformas de la proteína, que son obtenidas por *splicing* alternativo, sin embargo no se conoce si los cambios en la estructura primaria de estas isoformas modifican su estructura final y con ello su localización y su función. Con el fin de generar una respuesta a esta situación, utilizamos un modelo teórico basado en algoritmos de alineamiento de secuencias primarias, generación por homología de estructuras secundarias y obtención de la estructura terciaria por plegamiento empírico.

Una vez hubimos obtenido las estructuras, realizamos un análisis de confiabilidad de la predicción.

Encontramos que las estructuras primarias entre HMMR y sus tres isoformas presentan un grado de conservación de más del 98% los cambios en la estructura primaria se encuentran en la región inicial de la proteína (los primeros 90 aa), que al obtener las estructuras secundarias no existen cambios significativos y que todas las proteínas presentaron un patrón de alfa hélices por lo que se trata de una proteína transmembrana.

Concluimos que es probable que las 3 isoformas tienen la capacidad de ser funcionales, y que es necesario evaluar la asociación de su expresión con el pronóstico de los pacientes con LLA.

ABSTRACT

The expression of HMMR (a protein that binds to hyaluronic acid and enhances cellular migration) in neoplastic cells has been associated with an increase rate in metastasis, and the worsening of the patient's outcome. It has been reported that three isoforms of this protein exist, and that they are obtained by alternative splicing processes, however, it is not known if the changes in the primary structure of this isoforms modify their final structure and therefore modify their location and function. In aims of generating an answer to this problem we used a theoretic model based on primary structure alignment algorithms, second structure homology modeling and empiric folding of tertiary structures.

Once we had obtained the structures, we made a accountability analysis of this prediction.

We found that the primary structures between HMMR and its three isoforms had a conservation rate of 98% or more, that the changes in the primary structure appear on the initial portion of the protein (first 90 residues), that their secondary structures have no significant changes between them and that all the proteins have an all-helix pattern and therefore they are membrane proteins.

We concluded that it is probable that all 3 isoforms are capable of functioning and that it is necessary to evaluate the association of their expression with ALL patients outcome

1 INTRODUCCIÓN

El tema central de este estudio es la caracterización *in silico* de las diferencias en cuanto a secuencia primaria, secundaria y terciaria del receptor de motilidad mediado por hialuronano y sus tres variantes obtenidas mediante *splicing* alternativo.

La importancia del estudio de esta proteína radica en que su expresión se ha relacionado fuertemente con la capacidad metastásica de las células neoplásicas. Por tanto, el entendimiento de su estructura tridimensional, función, expresión y regulación puede generar estrategias tanto diagnósticas como terapéuticas.

Información no publicada del grupo de trabajo del laboratorio de oncología experimental del Instituto Nacional de Pediatría demuestra que la expresión del gen de HMMR se encuentra de forma más frecuente en células neoplásicas de pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia aguda linfoblástica que tuvieron mala respuesta al tratamiento con quimioterapia. Por otro lado se han encontrado que estos pacientes también expresaban dos isoformas de HMMR (A y C) que se generan a través del proceso de *splicing* alternativo, esto genera cambios en la secuencia primaria de cada una de las isoformas con respecto a la proteína canónica; sin embargo no se han descrito los cambios en estructura y función de cada isoforma que son consecuencia de este fenómeno.

El cáncer es un problema de salud pública, del cual no existe hasta el momento una explicación global y completa sobre su biología, herramientas moleculares que permitan diagnosticar de forma precoz esta entidad y marcadores moleculares que definan al 100% la estratificación de los pacientes en grupos de riesgos que predigan su desenlace posterior a recibir los tratamientos. Es por lo anterior que es de gran importancia la investigación activa en este campo.

2 ANTECEDENTES

2.1 Receptor de motilidad mediado por ácido hialurónico (HMMR)

Los estudios moleculares han revolucionado la forma de diagnosticar, estratificar y tratar varios tipos de tumores ya que han permitido sub-clasificar las estirpes tumorales basados en la expresión génica¹, contribuyendo a la identificación de factores pronósticos, facilitando la elección de un tratamiento², la predicción de la respuesta, control de la evolución de la enfermedad, predicción de complicaciones, recaídas y mortalidad^{3,4,5,6}.

El oncogén HMMR, también llamado receptor de motilidad mediado por ácido hialurónico, CD168 o RHAMM está conformado por 18 exones y presenta diferentes patrones de corte y empalme alternativo (*splicing*), que le permite codificar cuatro variantes de proteína diferentes (725, 724, 709 y 638 aa)⁷. Algunas de estas variantes participan en diversos procesos celulares como motilidad, adhesión, cicatrización, angiogénesis, migración, metástasis, invasión y proliferación celular^{8,9,10,11}. De forma muy interesante, este oncogén se ha visto asociado a diversas formas de cáncer, como próstata¹², leucemia aguda mieloblástica^{13,14}, gástrico¹⁵, testicular¹⁶ y linfoma de células B¹⁷.

La información disponible sugiere que este oncogén podría presentar un papel muy relevante en la génesis, crecimiento y migración tumoral de algunos tipos de cáncer, ya que se sabe que participa en la regulación de diversas proteínas relevantes de procesos celulares como: transformación celular¹⁸, proliferación, migración y metástasis; entre ellos H-Ras, CD44, TGF- β 1, FGF β 1, PKC, ERK1/2 y PI3K^{19,20,21,22,23}. También se ha

demostrado que HMMR interactúa con proteínas de ensamblaje del uso mitótico²⁴, y de reparación del DNA, como BRCA/BARD1²⁵; éstos últimos considerados importantes en el desarrollo y progresión del cáncer.

Se ha reportado que la expresión de HMMR se asocia con un pronóstico desfavorable para algunos tipos neoplasias^{25,26,27,28}; sin embargo, no se ha elucidado completamente la capacidad oncogénica de las variantes del gen y los mecanismos moleculares asociados con el proceso de malignidad.

Estudios recientes han demostrado la existencia de *splicing* aberrante en oncogenes en diferentes tipos de cáncer^{29,30,31}, por ejemplo, BRCA1 y 2 en cáncer de mama y ovario^{32,33}, KLF6 y TLE3 en próstata³⁴, p53 (p53 δ) en cáncer de mama, o ik1 y ik4 en distintas estirpes de leucemias. De forma llamativa algunas de las isoformas expresadas pertenecen a genes que median la transformación celular, adhesión, proliferación, invasión y migración^{35,36,37,38}.

La expresión de variantes de algunas proteínas ha tenido impacto al ser asociadas con diversos contextos clínicos neoplásicos sirviendo como marcadores tumorales siendo un ejemplo la expresión de la variante TP53INP2 de p53 producida por *splicing*, la cual se ha asociado con un mal pronóstico en cáncer de ovario³⁹; ya que promueve procesos de migración e invasión celular⁴⁰.

Como se ha mencionado antes, la proteína HMMR presenta variantes o isoformas obtenidas mediante el proceso de *splicing*, sin embargo, se conoce poco sobre la expresión de estas variantes en la mayoría de los tumores humanos, así como de los procesos de los que pudieran ser responsables. Entre los tumores en los que se ha identificado la expresión de variantes de HMMR, destacan mieloma múltiple⁴¹ y astrocitomas²⁴. El grupo de investigación del laboratorio de oncología experimental del

Instituto Nacional de Pediatría ha obtenido resultados preliminares que muestran que la expresión de dos isoformas del RNA mensajero del gen HMMR (A y C) presentes en pacientes con LLA que tuvieron mal pronóstico.

2.2 Métodos *in silico*

Desde hace algunas décadas, las ciencias de la computación han avanzado de manera impresionante, tanto el desarrollo de software, como de procesadores con capacidad de calculo más grande y mayor accesibilidad al público en general.

La resolución de problemas con algoritmos computacionales a avanzado a su vez, arrojando datos cada vez más precisos, en muchas de las áreas en las que ha incursionado. Los métodos computacionales que auxilian a la biología, están basados en algoritmos matemáticos, que usan estrategias muy avanzadas para la búsqueda de soluciones para diversas situaciones, basándose en parámetros obtenidos de manera experimental⁴², por ejemplo, cálculos de mecánica cuántica para la optimización geométrica de moléculas pequeñas, uso de bases de datos a gran escala en conjunto con parámetros de mecánica molecular para el *protein folding*, cálculos termodinámicos para la predicción de interacciones ligando-proteína (mejor conocido como *Docking simulation*), entre otros⁴³.

2.2.1 Algoritmos

La mayor parte de los cálculos teóricos usados en este trabajo, serán obtenidos mediante algoritmos de optimización. Un algoritmo es una secuencia de instrucciones y pasos, no ambiguos, que permiten llevar a cabo una tarea; en ciencias de la computación, los

algoritmos son usados para codificar la secuencia de pasos que debe seguir una computadora, para encontrar la respuesta a un problema⁴⁴.

Los algoritmos que están destinados a la resolución de problemas, se dividen en muchas categorías, ya sea por las estrategias que usen para obtener la solución, la rigidez de los pasos, etc.; dentro de estos se encuentran aquellos dirigidos a encontrar a la mejor solución en un universo de soluciones, estos son llamados algoritmos de optimización⁴⁴.

La bioinformática se apoya de forma significativa en los algoritmos de optimización ya que los modelos biológicos, al ser planteados como problemas, pueden tener muchas soluciones, debido a la dinámica que caracteriza a la vida; por ejemplo, si queremos encontrar la conformación de una molécula cualquiera (no rígida) en el espacio, del mismo modo que sucede en la naturaleza, encontraremos una gran cantidad de conformeros, muy parecidos entre ellos (pero no iguales), sin embargo, uno de ellos será el más estable; en esta situación, el algoritmo tiene que discernir entre cual de todas las soluciones es la óptima⁴².

Los algoritmos de optimización usan diversas estrategias, como heurística, búsqueda tabú, *simulated annealing*, búsqueda local, inteligencia artificial (enjambres de hormigas, parvadas de pájaros, redes neurales y algoritmos genéticos)⁴⁴.

Los algoritmos de optimización son la base de muchas de las estrategias bioinformáticas, como alineamientos de secuencias de DNA, RNA y proteínas, la investigación de la forma de interacción entre fármacos y receptores y de macromoléculas entre sí.

2.2.2 Alineamientos

Secuencias proteicas similares derivan generalmente de un mismo ancestro común, esto quiere decir, que si se tienen dos secuencias parecidas entre ellas, es muy probable que

una secuencia anterior haya evolucionado de forma divergente para formar a cada una de ellas. Cuando esto sucede, puede llamarse a estas proteínas homólogos⁴⁵.

Una de las herramientas más usadas en el campo de la bioinformática es el alineamiento de secuencias mediante servidores que ofrecen bases de datos muy grandes y algoritmos muy eficientes⁴⁵.

Esto resulta necesario cuando dentro de una investigación se encuentra una proteína desconocida que el ser secuenciada es posible obtener mucha información, dado que los homólogos arrojan información sobre estructura y función; también resultan muy necesarios para encontrar características en común y diferencias entre proteínas ya conocidas.

Otra utilidad de este método se encuentra en la investigación de sitios de conservación de secuencias tanto de DNA como de proteínas. Uno de los ejemplos clásicos del uso de alineamientos masivos es el confrontar grandes cantidades de secuencias de DNA genómico de poblaciones con y sin enfermedades y que culminan en el reporte de polimorfismos de importancia diagnóstica y terapéutica.

La metodología que se usa para lograr obtener el alineamiento de la secuencia primaria de una proteína es la siguiente: las secuencias a alinear se acomodan en forma de matriz como se observa en la figura 1, una vez obtenido los sitios en los que las dos secuencias son iguales, el algoritmo recorre diversos métodos, ya sea por alineamiento global o local, usando el algoritmo de Needleman-Wunsch o el de Smith-Waterman, producen nuevos arreglos, usando operadores de inserción de *gaps*⁴⁴.

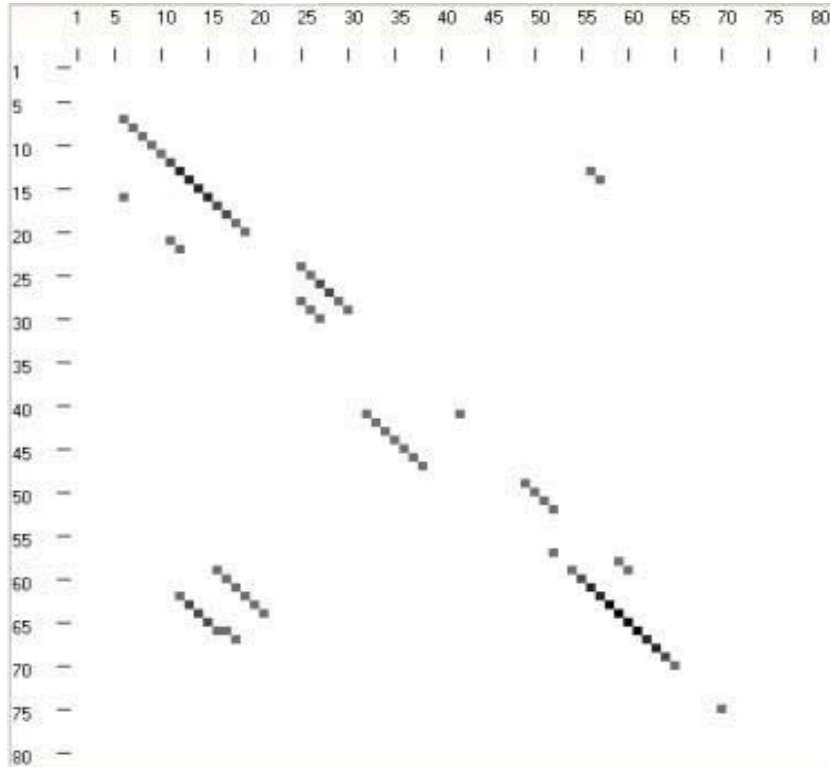


Figura 1.-Ejemplo de la organización de una matriz. Los puntos dentro de la matriz representan zonas de concordancia, y la similitud entre caracteres se representa con el tono de gris, donde el negro es el mayor puntaje.

Una vez obtenidas nuevas configuraciones de alineamientos entre las secuencias, se procede a valorar el desempeño de cada una, buscando el alineamiento óptimo, que obedece a los siguientes principios: cambios en la secuencia de aminoácidos (no coincidencias) entre regiones conservadas se interpretan como mutaciones puntuales que han sucedido con el tiempo desde la divergencia de las estructuras, cuando aparecen huecos se interpreta como inserciones o deleciones, tomando en cuenta esto, se valora cada resultado, considerando en cuenta la cantidad de gaps que tuvieron que ser usados, la cantidad de aminoácidos que coinciden etc., y al termino del proceso, el algoritmo arroja el resultado óptimo.

Al tener este resultado, se observan características que cabe mencionar en este apartado, las regiones que coinciden son muy probablemente motivos necesarios para la estructura o la función de las proteínas, cuando en un alineamiento múltiple se

encuentran conservaciones en regiones de solo un grupo, y se observa un cambio en otro grupo de secuencias, se puede pensar que ha sido un cambio que otorgó especificidad familia-dependiente, y si dentro de estas nuevas familias se encuentran cambios o conservaciones aparte, que no se presentan en el resto de la familia se puede considerar que este aminoácido/s dan especificidad subfamilia-dependiente⁴⁶, esta interpretación se ilustra en la figura 2.

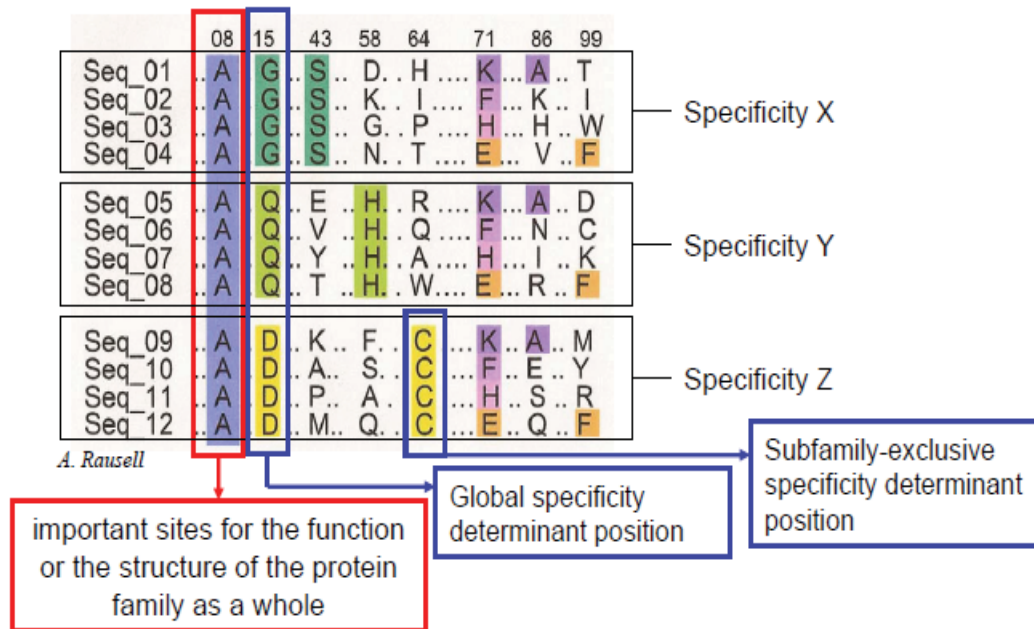


Figura 2.-Ejemplo de interpretación de un alineamiento.

2.2.3 Protein Folding

Existen tres abordajes para la resolución del protein folding, mencionados en orden de la exactitud de sus resultados: el modelado comparativo, threading y ab initio. El modelado comparativo (también llamado por homología) funciona de la siguiente manera: se utiliza el reconocimiento de secuencias independientes dentro de la secuencia problema, estas son comparadas con una base de datos y las secuencias que más coincidan son usadas como moldes y cada pieza es ensamblada en el espacio, arrojando la estructura tridimensional completa⁴⁷.

El plegado por homología esta basado en los siguientes establecimientos, Christian Anfisen describió que toda la información para la estructura terciaria de una proteína esta almacenada en su secuencia, poco después estableció la hipótesis termodinámica, donde se establece que la estructura final es la más estable energéticamente; años después Chothia y Lesk afirman que la estructura está más conservada que la secuencia, es por lo tanto razonable confiar, hasta cierto punto, en los resultados obtenidos por esta técnica^{47,48}. Algunas aplicaciones de esta técnica son el obtener estructuras tridimensionales de macromoléculas que han ayudado a explicar la función de proteínas que no se han aislado experimentalmente. Otra función es la de hacer interaccionar a una macromolécula con un fármaco y la predicción de farmacoporos, probabilidad de función in vivo o la interacción entre dos macromoléculas y la predicción de complejos inhibitorios o estimuladores en diversas funciones celulares.

A pesar de que hace casi 20 años que se describió la asociación de HMMR y el favorecimiento de la metástasis de algunas células tumorales⁴⁹, no se ha reportado mucha información estructural de esta proteína. Por otro lado solo se conoce que se expresa preferencialmente en la membrana celular (aunque también se encuentra reportado a nivel citosólico⁵⁰), sin embargo la información morfológica disponible solo existe hasta nivel de secuencia primaria. Por lo anterior decidimos que se generarían las

conformaciones tridimensionales para cada proteína mediante la técnica de plegado proteico semiempírico. Se escogió un método semiempírico y no uno ab initio (empírico), ya que este último presenta resultados más confiables solo cuando se trata de secuencias de menos de 150 aminoácidos de longitud. Para secuencias de aminoácidos más grandes (como este caso) se prefiere utilizar la técnica de threading, en la cual el algoritmo computacional encuentra subsecuencias dentro de la secuencia matriz y las compara con secuencias de proteínas descritas de forma experimental, para posteriormente generar un ensamblado y obtener la estructura global^{51,52}. Lo anterior se encuentra apoyado por información experimental que afirma que secuencias primarias semejantes generaran estructuras secundarias de un mismo tipo⁵³ (alfa hélices, laminas beta o giros libres) y que esto tiene repercusión regional y posteriormente global.

2.3 Cáncer

El cáncer en general representa uno de los problemas de salud más importantes en la actualidad, el Instituto Nacional de Cáncer de EUA reportó en el 2006 una incidencia global de casos de cáncer de ambos sexos de 456.20 por cada 100,000 habitantes, así como una prevalencia de 2.7076%, lo que representa alrededor de 11,384,892 pacientes⁵⁴. El cáncer pediátrico representa la segunda causa de muerte entre pacientes de 4 a 15 años de edad, antecedida en frecuencia solo por los accidentes.

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El receptor de motilidad mediado por hialuronano presenta isoformas que se obtienen por *splicing* alternativo, las cuales presentan 724, 709 y 638 aminoácidos de longitud, sin embargo, no se conoce si cambios en la secuencia promueven cambios en la estructura global de cada isoforma, y que esto a su vez, provoque cambios en la localización intracelular y su función.

4 JUSTIFICACIÓN

Resultados preliminares del laboratorio de oncología experimental han revelado la coexpresión de las variantes A y C de HMMR en pacientes con LAL que presentan recaídas. Por tal motivo, resulta necesario entender las diferencias entre estructura y función que las variantes podrían presentar con respecto al gen de HMMR ya que se ha reportado que al cambiar la estructura de una proteína también cambia su función y su localización. Conocer los cambios en la estructura y función de las isoformas de HMMR conllevan una gran importancia en el estudio de esta proteína como marcador pronóstico.

5 HIPOTESIS

La estructura terciaria de las secuencias de aminoácidos de las isoformas de HMMR predecirá una función de receptor transmembrana y no existirán cambios entre el tipo de estructura terciaria entre HMMR y sus variantes obtenidas por *splicing* alternativo.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Realizar un análisis estructura-actividad del receptor de motilidad mediado por hialuronano y sus variantes obtenidas por *splicing* alternativo usando métodos teóricos.

6.2 Objetivos particulares

- Identificar la existencia de estructuras terciarias obtenidas experimentalmente de HMMR y sus isoformas.
- Realizar un alineamiento múltiple, usando las estructuras primarias de HMMR y sus isoformas.
- Obtener las estructuras terciarias usando plegado por *threading*.
- Comparar las diferencias estructurales de las isoformas realizando un alineamiento tridimensional.
- Determinar si existen cambios en la secuencia-estructura que predigan cambios en la actividad.

7 MATERIAL Y METODO

7.1 Instalaciones y equipo

Los siguientes experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio Oncología experimental del Instituto Nacional de Pediatría bajo la tutela del Dr. Sergio Méndez y la cotutoría de la Dra. Rocío Cárdenas.

7.2 Tipo de estudio

- Teórico

7.3 Alineamiento general de HMMR

Después de obtener la secuencia de la estructura primaria en formato FASTA de cada una de las isoformas obtenidas por *splicing* alternativo del gen de HMMR del servidor UniProt (<http://www.uniprot.org/>), se ingresaron al servidor del European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) llamado Washington University Basic Local Alignment Search Tool (WU-BLAST) versión 2.0⁵⁵, usando el programa BLASTP, con la base de datos de proteínas de *UnitProt Knowledgebase*, usando los siguientes parametros: program=blastp; matrix=blosum62; scores=50; alignment view pairwise; exp thr= 10; alignments=50; filter=seg; sort=pvalue; view filter=yes; stats=sump; sensitivity=normal; topcombn=1⁵⁵.

Este primer alineamiento nos sirvió para identificar las secuencias de aminoácidos con las que contábamos y como control de calidad de la secuencia.

7.4 Alineamiento múltiple

Las secuencias obtenidas por el método previo, se ingresaron para cómputo posterior al programa de alineamientos múltiples ClustalOmega⁵⁶, del servidor antes usado, usando los parámetros: output format=clustal w/o numbers; dealign input sequences=no; max guide tree iterations=default; MDEB-like clustering guide-tree=yes; max HMM iteration=default; MBED-like clustering iteration=yes; order=aligned; number of combined iterations=default(0). Esto nos arrojó el porcentaje de similitud entre las secuencias y las regiones que se mantienen conservadas.

7.5 Secuencia tridimensional

7.5.1 Obtención experimental

De las secuencias obtenidas y seleccionada anteriormente, se realizó una búsqueda en la base de datos del Protein Data Bank (PDB)⁵⁷, y en ella no encontramos coincidencias en los resultados arrojados. Al no contar con reportes experimentales de las secuencias que interesan a este estudio, procedimos a obtener las estructuras por plegamiento semiempírico.

7.5.2 Obtención empírica

Se ingresaron las secuencias primarias de las 4 proteínas de este estudio al servidor de LOOP para realizar un plegamiento semiempírico utilizando la técnica de threading^{58,59}. Posteriormente se validaron las estructuras obtenidas mediante este método utilizando mapas de Ramachandran. Con el programa visual molecular dynamics⁶⁰ y se generó el análisis de secuencia secundaria con el programa accelrys discovery studio 4.0⁶¹.

8 RESULTADOS

8.1 Alineamiento

8.1.1 BLAST

Al realizar la búsqueda general en la red mediante BLAST, usando la secuencia de la HMMR humana en formato fasta descargada del servidor UniProt, se obtuvieron como resultado la secuencia canónica de la proteína y sus tres isoformas con porcentaje de identidad de 99% para la isoforma C; 98% para la variante B y del 100% con la variante D. Se descargaron las secuencias de todas las isoformas en formato FASTA para realizar el alineamiento múltiple

8.1.2 Clustal Omega

El alineamiento múltiple se realizó con las secuencias, en formato fasta, de las cuatro proteínas escogidas en el paso anterior, el resultado se concentra en la figura 3, en la que se observa de manera mas amplia que la isoforma B cuenta con 15 aminoácidos menos localizados entre los aminoácidos 76 y 90 de la secuencia canónica, a la isoforma C solo le falta un triptófano ubicado en posición 75 y la isoforma D no cuenta con los primeros 90 aminoácidos de la secuencia canónica.

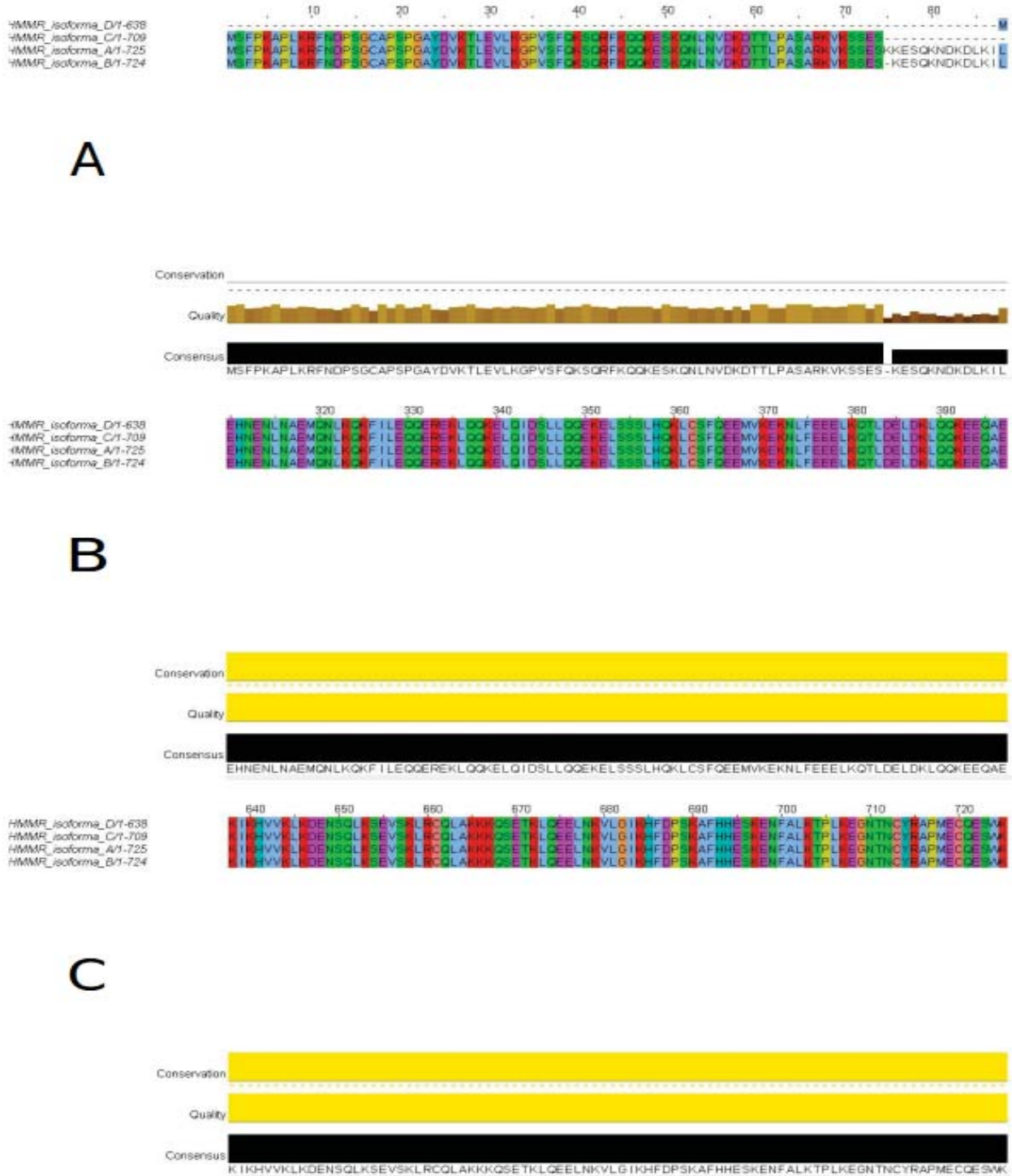


Figura 3.-Alineamiento múltiple de HMMR con sus tres isoformas. Se observan en las columnas amarillas y negra el grado de conservación, la calidad del alineamiento y el aminoácido consenso. Regiones de la secuencia A) inicial, B) media y C) terminal

8.2 Estructura tridimensional

8.2.1 Protein Data Bank

Al realizar la búsqueda en Protein Data Bank, no se encontraron estructuras tridimensionales obtenidas de forma experimental para esta proteína. Utilizamos una búsqueda exhaustiva en los servidores que almacenan datos de estructura y función proteica y no encontramos información experimental con respecto a la estructura secundaria ni terciaria de las proteínas en el estudio. Esta búsqueda se realizó con el fin de encontrar la estructura tridimensional completa o parcial de la secuencia canónica o a alguna de sus isoformas que se hubiese obtenido por cristalización y difracción de rayos X o por resonancia magnética nuclear, y con ello, usar dicha estructura como templete y así generar las estructuras tridimensionales de las proteínas restantes con un alto nivel de confiabilidad. Protein Data Bank (PDB)⁵⁷, esta es una base con miles de secuencias terciarias y cuaternarias de una variedad muy grande de proteínas, las cuales fueron obtenidas a través de métodos experimentales como cristalización y análisis por rayos X o por resonancia magnética nuclear con resolución de hasta 2-3 Armstrongs.

8.2.2 LOOP

Las secuencias primarias se ingresaron al servidor de LOOPP⁵⁹ de las instalaciones de Cornell en la universidad de Texas donde se obtuvo su estructura secundaria y terciaria. Se muestra en las figuras 4 y 5 las estructuras obtenidas, en ellas podemos observar que la estructura secundaria consta fundamentalmente de alfa hélices y una estructura terciaria tipo globular. Este tipo de patrones se ha denominado como proteínas “todo hélice”(del inglés “all-helix protein”). Con respecto a la confiabilidad del modelo teórico, a la estructura obtenida se le hizo un análisis mediante gráficos de Ramachandran^{51,52} (figura 4-D), donde se observan los ángulos de torsión Phi y Psi de

la cadena de la proteína, este mapa esta separado en 4 cuadrantes y estos contienen zonas de probabilidad de diferente color, donde se sitúa al residuo dependiendo de la combinación de los dos ángulos que lo componen; así, encontramos en el análisis que la estructura muestra varios aminoácidos a tensión, esto no ocurre en la naturaleza debido a que esto implicaría un alto costo energético, y el encontrarlos de esta forma aquí, es debido a que el algoritmo usado por el servidor de LOOP trabaja buscando secuencias parecidas que estén resueltas experimentalmente, y contando una vez con ellas, sobrepone la secuencia problema dándole una forma muy semejante, sin tomar en cuenta la composición de residuos; sin embargo, los aminoácidos en sitios no permitidos son muy pocos (<1%), por lo que se considera que de forma global la estructura es confiable. En la figura 6 se representa el alineamiento tridimensional de todas las estructuras, en esta figura se observa que tanto la proteína canónica como sus tres isoformas poseen una estructura tridimensional idéntica.

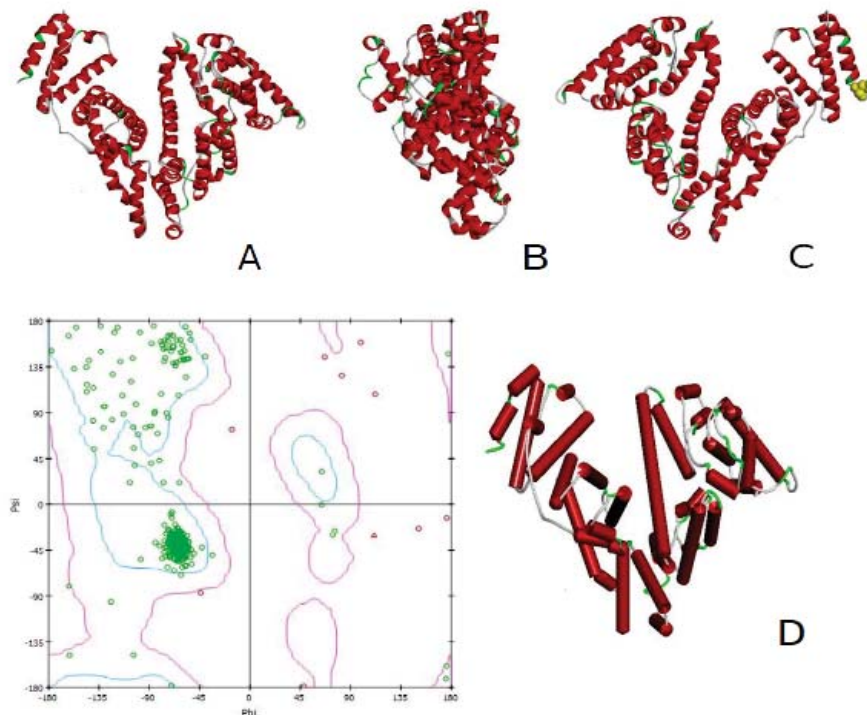


Figura 4 .-Estructura tridimensional de la secuencia canónica de HMMR. Perspectivas: A) Longitudinal, B) transversal, C) se muestra en Amarillo el sitio de unión de hialuronano, D) Mapa de Ramachandran y estructura esquemática

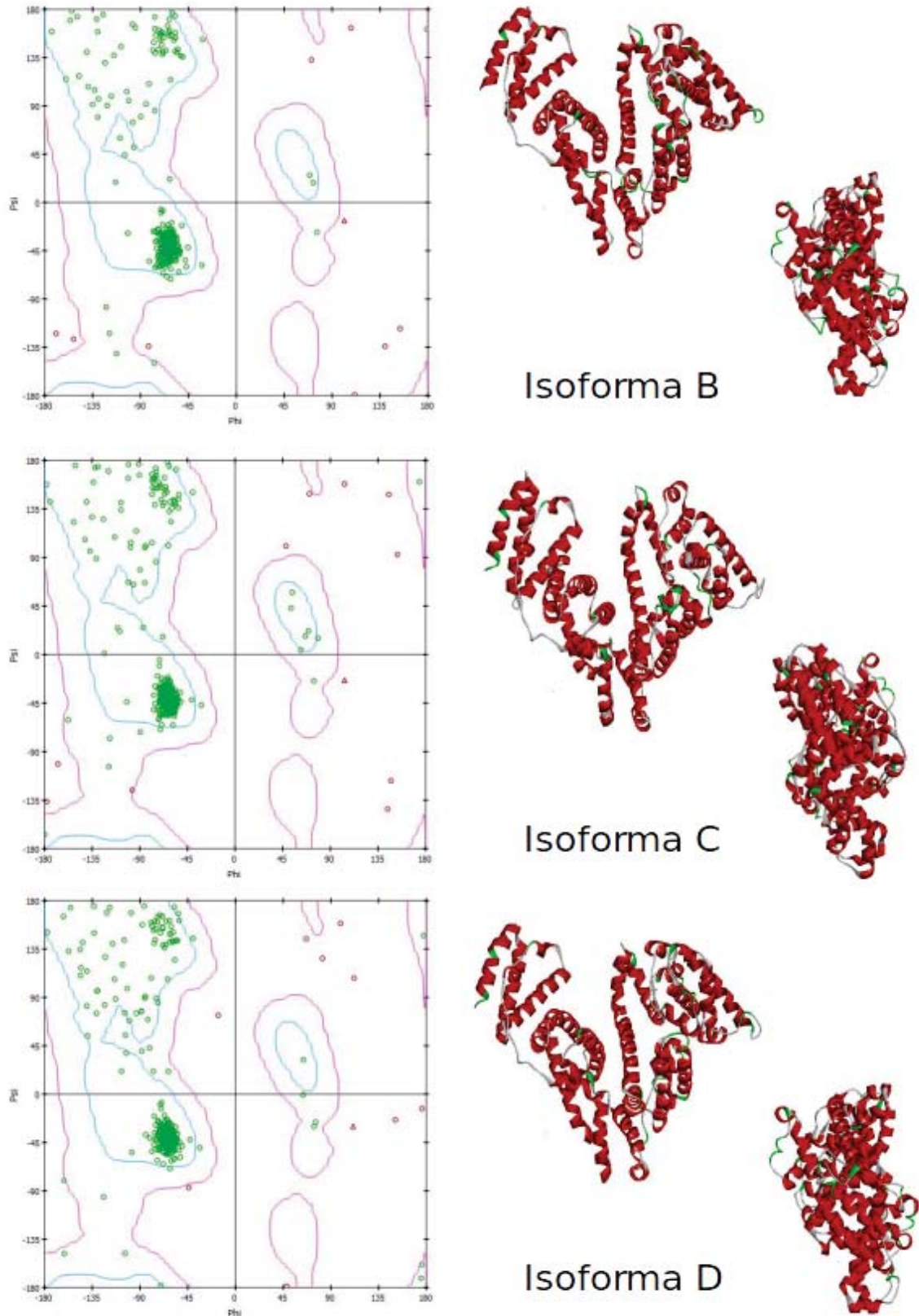


Figura 5 .-Estructuras tridimensionales de las isoformas de B, C y D de HMMR, a la izquierda de cada estructura se aprecia el mapa de Ramachandran para cada predicción.



Figura 6 .-Alineamiento tridimensional de HMMR y sus variantes. HMMR en rojo, variante B en verde, variante C en Amarillo y variante D en negro. A) perspectiva longitudinal. B) perspectiva transversal

8.2.3 VMD

Por último, la estructura empírica de la secuencia canónica se procesó en el programa VMD para crear las condiciones en las que se encontraría la proteína si se encontrara embebida en una membrana lipídica. Los resultados se muestran en la figura 7, donde se observa que la proteína cuenta con porciones intracelulares, extracelulares y transmembrana.

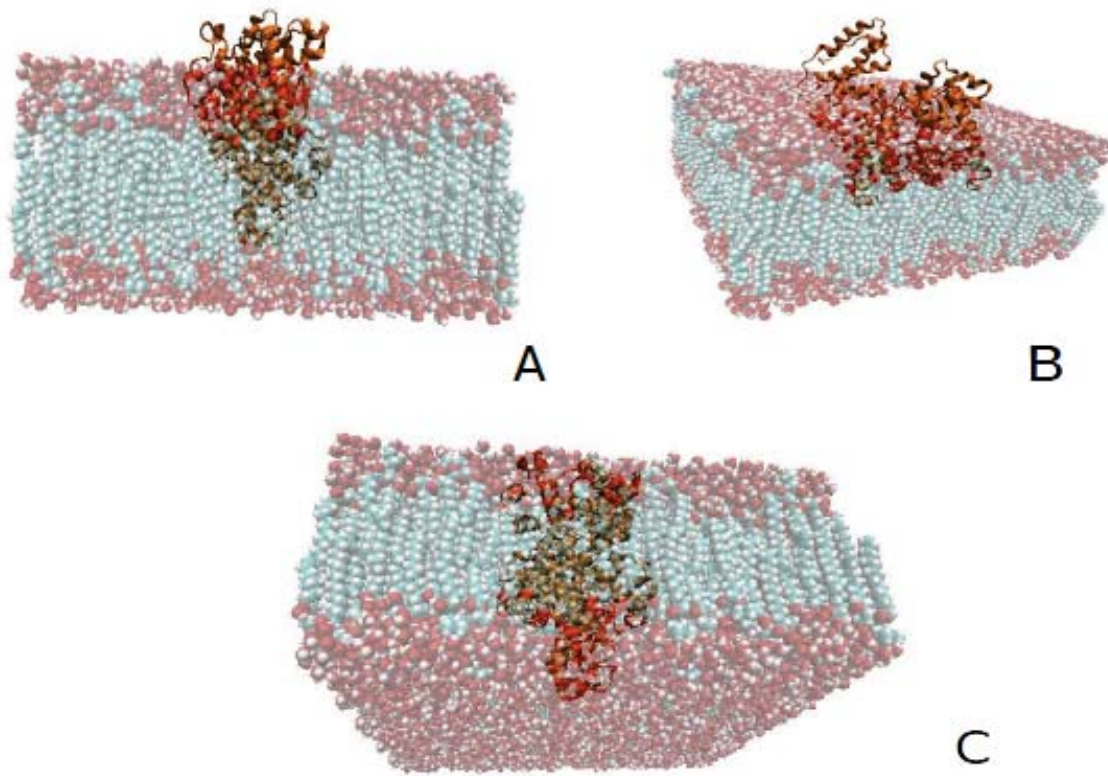


Figura 7.- Estructura tridimensional de HMMR embebida en una membrana lipídica. A) vista transversal, B) vista tangencial superior, C) vista tangencial inferior

9 DISCUSIÓN

9.1 Alineamientos

El alineamiento de las estructuras primarias que se observa en la figura 3 demuestra que existe poca diferencia entre HMMR y sus isoformas. Dentro de la información funcional de HMMR se sabe que los sitios de unión a hialuronano son dos, y están ubicados en una región de 10 aminoácidos de la posición 657-666 y otra región de 11 aminoácidos ubicados en los residuos 635-645. En la figura 3 C se observa que esta región se encuentra altamente conservada en las cuatro proteínas y que se trata de una región definitoria de la función de la familia . Por lo tanto se puede suponer que las 4 isoformas tienen capacidad de unión al hialuronano.

Por otro lado, las regiones en las que se encuentran los cambios son en la región inicial de la proteína, al momento no se ha asignado ninguna función para esta región en las bases de datos, sin embargo si se han reportado modificaciones postraduccionales, por ejemplo, la serina 20 se fosforila en la secuencia canónica, por lo que la isoforma D no presentaría esta modificación y las consecuencias de esto podrían ser un metabolismo o transporte intracitosólico diferente. El resto de modificaciones descritas (glicosilación en los residuos: 133, 477, 567 y 588) podrían estar conservadas en las C isoformas ya que la secuencia primaria es idéntica a partir del residuo 91.

9.2 Estructura tridimensional

Al comparar esta estructura con los diferentes tipos de estructura secundaria y terciaria, encontramos que se trata de una proteína transmembrana, esto basados en la revisión publicada por Von Heijne G en 2006 en nature reviews⁶² donde señala las características estructurales y topológicas de las proteínas transmembrana. Si

comparamos lo descrito en esa revisión con lo obtenido por nosotros encontramos lo que se representa en la figura 8, donde se observa el mismo patrón de alfa hélices y estructura globular.

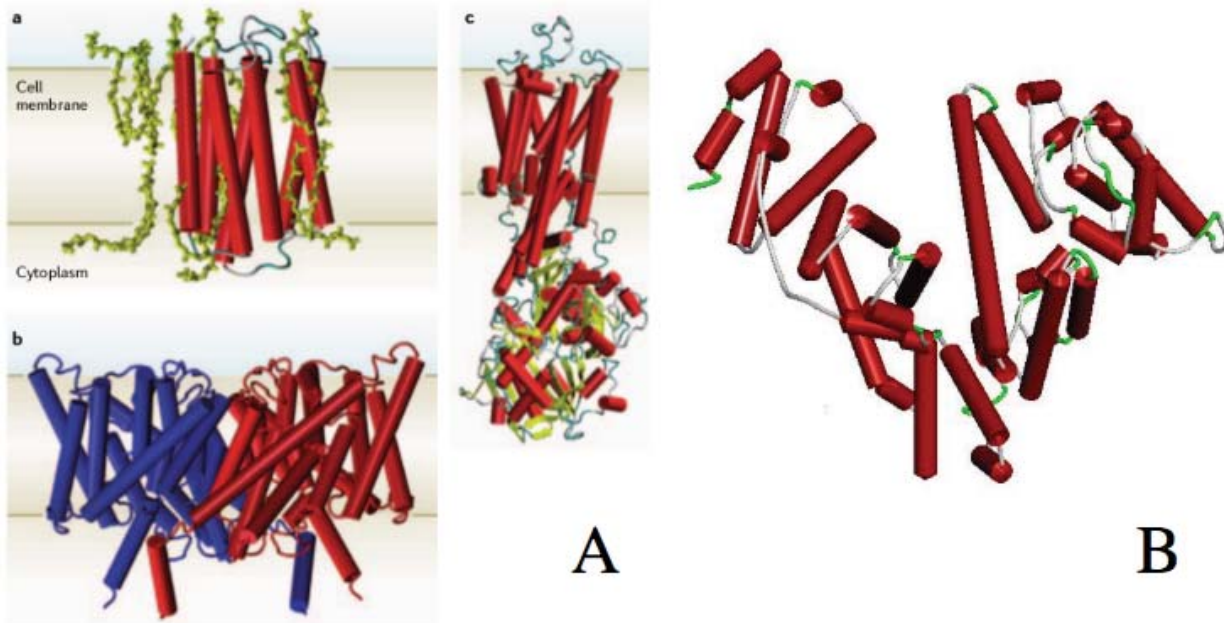


Figura 8.- Comparación entre la estructura de una proteína membranal (A) y HMMR (B). A) modificado de Von Heijne G. *Nature review molecular cell biology*. 2006

Posteriormente realizamos el embebido de la proteína en una membrana lipídica para corroborar lo expresado anteriormente y encontramos lo que se observa en la figura 7, donde apreciamos que la proteína abarca la longitud promedio de una membrana, teniendo una región libre la cual se describió en la figura 4-C como el sitio de unión a hialuronano.

Una vez conociendo la información de la proteína canónica, realizamos el análisis de los cambios estructurales tridimensionales que ocurrieran como consecuencia de los cambios en la estructura primaria para cada isoforma, y encontramos lo que se observa en la figura 5, en la que se contemplan proteínas basadas meramente en hélices alfa y estructura globular. Por otro lado el análisis de cada estructura mediante mapas de Ramachandran demuestra lo mismo encontrado para la estructura canónica. Por lo anterior podemos concluir que las estructuras secundarias no sufrieron cambios secundarios a las modificaciones ocasionadas por splicing alternativo, así mismo se concluye que las estructuras son confiables.

Para concluir se realizó un alineamiento tridimensional, con el fin de encontrar cambios finos en la estructura terciaria, los resultados de esto se representa en la figura 7. En dicha figura se superponen las cuatro estructuras y se le asigna un color a cada proteína en general, con lo que observamos que las diferencias son mínimas y se encuentran en las asas libres, las cuales en la naturaleza son móviles.

Finalmente y con lo antes descrito, podemos considerar que aunque si existen cambios en la estructura primaria entre HMMR y sus tres isoformas, esto no conlleva a cambios en la estructura secundaria ni terciaria. Esto es de suma importancia, ya que puede inferirse que las isoformas son funcionantes, y que al ser expresadas en una célula neoplásica, tienen la misma capacidad de promover la migración que la proteína canónica, más aún, el expresar en un mismo momento a la proteína HMMR y a alguna o varias de sus isoformas, tendría la misma consecuencia que una sobreexpresión de la proteína y por tanto un incremento intracelular de su función.

10 CONCLUSIONES

- ✓ El porcentaje de homología entre HMMR y sus tres isoformas es mayor al 98%, debido a que los cambios generados por splicing alternativo son mínimos.
- ✓ La secuencia secundaria de HMMR consta de hélices alfa y asas libres, y no existen cambios significativos con respecto a las estructuras secundarias de sus isoformas.
- ✓ La estructura terciaria de HMMR es globular y coincidente con una proteína transmembrana y no existen cambios con respecto a las estructuras terciarias de sus isoformas.
- ✓ Al no contar con cambios importantes en las estructuras secundarias y terciarias, las isoformas de HMMR podrían ser igualmente funcionantes.
- ✓ La expresión de HMMR y de sus isoformas en células neoplásicas, podrían incrementar la probabilidad de migración de la célula, mucho mas que la expresión sólo de HMMR.

11 PERSPECTIVAS

- ✓ Las estructuras tridimensionales obtenidas en este estudio pueden ser usadas para estudios posteriores enfocados en el análisis de epítopes y generación de anticuerpos dirigidos a estas proteínas.
- ✓ Es importante evaluar si la expresión de HMMR se asocia de forma estadísticamente significativa a un incremento en la metástasis de diversos tipos de tumores, así como si la expresión concomitante de sus isoformas lo incrementa

12 BIBLIOGRAFÍA

1. Rivera-Luna R, Correa-Gonzalez C, Altamirano-Alvarez E, Sanchez-Zubieta F, Cardenas-Cardos R, Escamilla-Asian G, Olaya-Vargas A, Bautista-Marquez A, Aguilar-Romo M. **Incidence of childhood cancer among Mexican children registered under a public medical insurance program.** *International journal of cancer Journal international du cancer.* 2013;**132**(7):1646-1650.
2. Marquez RT, McCaffrey AP. **Advances in microRNAs: implications for gene therapists.** *Human gene therapy.* 2008;**19**(1):27-38.
3. Berchuck A, Iversen ES, Lancaster JM, Pittman J, Luo J, Lee P, Murphy S, Dressman HK, Febbo PG, West M *et al.* **Patterns of gene expression that characterize long-term survival in advanced stage serous ovarian cancers.** *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2005;**11**(10):3686-3696.
4. Hartmann LC, Lu KH, Linette GP, Cliby WA, Kalli KR, Gershenson D, Bast RC, Stec J, Iartchouk N, Smith DI *et al.* **Gene expression profiles predict early relapse in ovarian cancer after platinum-paclitaxel chemotherapy.** *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2005;**11**(6):2149-2155.

5. Lancaster JM, Dressman HK, Whitaker RS, Havrilesky L, Gray J, Marks JR, Nevins JR, Berchuck A. **Gene expression patterns that characterize advanced stage serous ovarian cancers.** *Journal of the Society for Gynecologic Investigation.* 2004;**11**(1):51-59.
6. Spentzos D, Levine DA, Ramoni MF, Joseph M, Gu X, Boyd J, Libermann TA, Cannistra SA. **Gene expression signature with independent prognostic significance in epithelial ovarian cancer.** *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2004;**22**(23):4700-4710.
7. Wang C, Entwistle J, Hou G, Li Q, Turley EA. **The characterization of a human RHAMM cDNA: conservation of the hyaluronan-binding domains.** *Gene.* 1996;**174**:299-306
8. Assmann V, Jenkinson D, Marshall JF, Hart IR. **The intracellular hyaluronan receptor RHAMM/IHABP interacts with microtubules and actin filaments.** *Journal of cell science.* 1999;**112**(Pt 22):3943-3954.
9. Gares SL, Pilarski LM. **Balancing thymocyte adhesion and motility: a functional linkage between beta1 integrins and the motility receptor RHAMM.** *Developmental immunology.* 2000;**7**(2-4):209-225.
10. Samuel SK, Hurta RA, Spearman MA, Wright JA, Turley EA, Greenberg AH. **TGF-beta 1 stimulation of cell locomotion utilizes the hyaluronan receptor RHAMM and hyaluronan.** *The Journal of cell biology.* 1993;**123**(3):749-758.
11. Turley EA, Austen L, Moore D, Hoare K. **Ras-transformed cells express both CD44 and RHAMM hyaluronan receptors: only RHAMM is essential for hyaluronan-promoted locomotion.** *Experimental cell research.* 1993;**207**(2):277-282.
12. Gurski LA, Xu X, Labrada LN, Nguyen NT, Xiao L, van Golen KL, Jia X, Farach-Carson MC. **Hyaluronan (HA) interacting proteins RHAMM and hyaluronidase impact prostate cancer cell behavior and invadopodia formation in 3D HA-based hydrogels.** *PloS one.* 2012;**7**(11):e50075.
13. Snauwaert S, Vanhee S, Goetgeluk G, Verstichel G, Van Caeneghem Y, Velghe I, Philippe J, Berneman ZN, Plum J, Taghon T *et al.* **RHAMM/HMMR (CD168) is not an ideal target antigen for immunotherapy of acute myeloid leukemia.** *Haematologica.* 2012;**97**(10):1539-1547.
14. Tzankov A, Strasser U, Dirnhofer S, Menter T, Arber C, Jotterand M, Rovo A, Tichelli A, Stauder R, Gunthert U. **In situ RHAMM protein expression in acute myeloid leukemia blasts suggests poor overall survival.** *Annals of hematology.* 2011;**90**(8):901-909.
15. Ishigami S, Ueno S, Nishizono Y, Matsumoto M, Kurahara H, Arigami T, Uchikado Y, Setoyama T, Arima H, Yoshiaki K *et al.* **Prognostic impact of CD168 expression in gastric cancer.** *BMC cancer.* 2011;**11**:106.
16. Menon S, Gujral S, Bakshi G, Tongaonkar HB. **Bilateral testicular metastasis from prostatic adenocarcinoma mimicking an intertubular pattern of seminoma and expressing Rhamm.** *Journal of cancer research and therapeutics.* 2010;**6**(1):97-99.
17. Nagel S, Hirschmann P, Dirnhofer S, Gunthert U, Tzankov A. **Coexpression of CD44 variant isoforms and receptor for hyaluronic acid-mediated motility (RHAMM, CD168) is an International Prognostic Index and C-MYC gene status-independent predictor of poor outcome in diffuse large B-cell lymphomas.** *Experimental hematology.* 2010;**38**(1):38-45.
18. Hall CL, Turley EA. **Hyaluronan: RHAMM mediated cell locomotion and signaling in tumorigenesis.** *Journal of neuro-oncology.* 1995;**26**(3):221-229.

19. Blencowe BJ, Ahmad S, Lee LJ. **Current-generation high-throughput sequencing: deepening insights into mammalian transcriptomes.** *Genes & development.* 2009;**23**(12):1379-1386.
20. Carninci P. **Constructing the landscape of the mammalian transcriptome.** *The Journal of experimental biology.* 2007;**210**(Pt 9):1497-1506.
21. Johnson JM, Castle J, Garrett-Engele P, Kan Z, Loerch PM, Armour CD, Santos R, Schadt EE, Stoughton R, Shoemaker DD. **Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays.** *Science.* 2003;**302**(5653):2141-2144.
22. Lareau LF, Green RE, Bhatnagar RS, Brenner SE. **The evolving roles of alternative splicing.** *Current opinion in structural biology.* 2004;**14**(3):273-282.
23. Zhao W, Manley JL. **Complex alternative RNA processing generates an unexpected diversity of poly(A) polymerase isoforms.** *Molecular and cellular biology.* 1996;**16**(5):2378-2386.
24. Zhou R, Wu X, Skalli O. **The hyaluronan receptor RHAMM/IHABP in astrocytoma cells: expression of a tumor-specific variant and association with microtubules.** *Journal of neuro-oncology.* 2002;**59**(1):15-26.
25. Maxwell CA, Benitez J, Gomez-Baldo L, Osorio A, Bonifaci N, Fernandez-Ramires R, Costes SV, Guino E, Chen H, Evans GJ *et al.* **Interplay between BRCA1 and RHAMM regulates epithelial apicobasal polarization and may influence risk of breast cancer.** *PLoS biology.* 2011;**9**(11):e1001199.
26. Mohan P, Castellsague J, Jiang J, Allen K, Chen H, Nemirovsky O, Spyra M, Hu K, Kluwe L, Pujana MA *et al.* **Genomic imbalance of HMMR/RHAMM regulates the sensitivity and response of malignant peripheral nerve sheath tumour cells to aurora kinase inhibition.** *Oncotarget.* 2013;**4**(1):80-93.
27. Tolg C, Poon R, Fodde R, Turley EA, Alman BA. **Genetic deletion of receptor for hyaluronan-mediated motility (Rhamm) attenuates the formation of aggressive fibromatosis (desmoid tumor).** *Oncogene.* 2003;**22**(44):6873-6882.
28. Maxwell CA, Rasmussen E, Zhan F, Keats JJ, Adamia S, Strachan E, Crainie M, Walker R, Belch AR, Pilarski LM *et al.* **RHAMM expression and isoform balance predict aggressive disease and poor survival in multiple myeloma.** *Blood.* 2004;**104**(4):1151-1158.
29. Modrek B, Lee C. **A genomic view of alternative splicing.** *Nature genetics.* 2002;**30**(1):13-19.
30. Stoilov P, Meshorer E, Gencheva M, Glick D, Soreq H, Stamm S. **Defects in pre-mRNA processing as causes of and predisposition to diseases.** *DNA and cell biology.* 2002;**21**(11):803-818.
31. Hastings ML, Krainer AR. **Pre-mRNA splicing in the new millennium.** *Current opinion in cell biology.* 2001;**13**(3):302-309.
32. Mazoyer S, Puget N, Perrin-Vidoz L, Lynch HT, Serova-Sinilnikova OM, Lenoir GM. **A BRCA1 nonsense mutation causes exon skipping.** *American journal of human genetics.* 1998;**62**(3):713-715.
33. Sevcik J, Falk M, Macurek L, Kleiblova P, Lhota F, Hojny J, Stefancikova L, Janatova M, Bartek J, Stribrna J *et al.* **Expression of human BRCA1Delta17-19 alternative splicing variant with a truncated BRCT domain in MCF-7 cells results in impaired assembly of**

DNA repair complexes and aberrant DNA damage response. *Cellular signalling*. 2013;25(5):1186-93.

34. Narla G, Difeo A, Reeves HL, Schaid DJ, Hirshfeld J, Hod E, Katz A, Isaacs WB, Hebbing S, Komiya A *et al.* **A germline DNA polymorphism enhances alternative splicing of the KLF6 tumor suppressor gene and is associated with increased prostate cancer risk.** *Cancer research*. 2005;65(4):1213-1222.

35. Bauer TW, Fan F, Liu W, Johnson M, Parikh NU, Parry GC, Callahan J, Mazar AP, Gallick GE, Ellis LM. **Insulinlike growth factor-I-mediated migration and invasion of human colon carcinoma cells requires activation of c-Met and urokinase plasminogen activator receptor.** *Annals of surgery*. 2005;241(5):748-756; discussion 756-748.

36. Brembeck FH, Rosario M, Birchmeier W. **Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin.** *Current opinion in genetics & development*. 2006;16(1):51-59.

37. Cheng C, Sharp PA. **Regulation of CD44 alternative splicing by SRm160 and its potential role in tumor cell invasion.** *Molecular and cellular biology*. 2006;26(1):362-370.

38. Wong MP, Cheung N, Yuen ST, Leung SY, Chung LP. **Vascular endothelial growth factor is up-regulated in the early pre-malignant stage of colorectal tumour progression.** *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1999;81(6):845-850.

39. Hofstetter G, Berger A, Fiegl H, Slade N, Zoric A, Holzer B, Schuster E, Mobus VJ, Reimer D, Daxenbichler G *et al.* **Alternative splicing of p53 and p73: the novel p53 splice variant p53delta is an independent prognostic marker in ovarian cancer.** *Oncogene*. 2010;29(13):1997-2004.

40. Moran-Jones K, Grindlay J, Jones M, Smith R, Norman JC. **hnRNP A2 regulates alternative mRNA splicing of TP53INP2 to control invasive cell migration.** *Cancer research*. 2009;69(24):9219-9227.

41. Crainie M, Belch AR, Mant MJ, Pilarski LM. **Overexpression of the receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) characterizes the malignant clone in multiple myeloma: identification of three distinct RHAMM variants.** *Blood*. 1999;93(5):1684-1696.

42. Bermúdez-Lugo JA, Rosales-Hernández MC, Deeb O, Trujillo-Ferrara J, Correa-Basurto J. **In silico methods to assist drug developers in acetylcholinesterase inhibitor design.** *Curr Med Chem*. 2011;18(8):1122-36

43. Bermúdez-Lugo JA, Perez-Gonzalez O, Rosales-Hernández MC, Ilizaliturri-Flores I, Trujillo-Ferrara J, Correa-Basurto J. **Exploration of the valproic acid binding site on histone deacetylase 8 using docking and molecular dynamic simulations.** *J Mol Model*. 2012;18(6):2301-10

44. Estévez-Valencia P. **Optimización mediante algoritmos genéticos.** *Anales del Instituto de Ingenieros de Chile*. 1997:83-92.

45. http://en.wikipedia.org/wiki/Structural_bioinformatics

46. Lesk AM, Chothia C. **How different amino acid sequences determine similar protein structures: the evolutionary dynamics of the globins.** *J Mol Biol*. 1980;136(3):225.

47. Compiani M, Capriotti E. **Computational and theoretical methods for protein folding.** *Biochemistry*. 2013;52(48):8601-8624.

48. Skolnick J, Kolinsky A. **Computational studies of protein folding.** *Computing in science & engineering*. 2001;22-31.

49. Assmann V, Marshall JF, Fieber C, Hofmann M, Hart IR. **The human hyaluronan receptor RHAMM is expressed as an intracellular protein in breast cancer cells.** *J Cell Sci.* 1998;**111**:1685-94.
50. Consultado en <http://www.uniprot.org/uniprot/O75330> el 10 de julio del 2014.
51. Kota P, Ding F, Ramachandran S, Dokholyan NV. **Gaia: Automated quality assessment of protein structure models.** *Bioinformatics.* 2011;**27**:2209-2215
52. Ramachandran S, Kota P, Ding, F, Dokholyan, NV. **Automated minimization of steric clashes in protein structures.** *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics.* 2011;**79**:261-270
53. Hopf TA, Colwell LJ, Sheridan R, Rost B, Sander C, Marks DS. **Three-dimensional structures of membrane proteins from genomic sequencing.** *Cell.* 2012;**22**:149:1607-21.
54. **SEER** Cancer Statistics Review 1975-2006 http://seer.cancer.gov/csr/1975_2006/browse_csr.php?section=2&page=sect_02_table.18.html
55. **WU-BLAST2** stands for Washington University Basic Local Alignment Search Tool Version 2.0. <http://www.ebi.ac.uk/Tools/blast2/index.html>.
56. **Clustal Omega.** <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>
57. **RCSB Protein Data Bank.** <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
58. Kizhakke B, Pillardy J, Majek P, Meller J, Blom T, Cao B, Elber R. **Building and assessing atomic models of proteins from structural templates: Learning and benchmarks.** *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics.* 2009;**76**:930-945.
59. **LOOPP** <http://cbsuapps.tc.cornell.edu/loopp.aspx>
60. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. **VMD: visual molecular dynamics.** *J. Mol. Graph.* 1996;**14**,33.
61. **Accelrys Software Inc.,** Discovery Studio Modeling Environment, Release 4.0, San Diego: Accelrys Software Inc., 2013.
62. Von Heijne G. **Membrane-protein topology.** *Nature review molecular cell biology.* 2006;**7**:909:918

13 CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividad	2013		2014							
	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Juni	Juli	Agosto
Búsqueda bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Obtención de secuencias y alineado				X	X	X				
Generación de estructuras tridimensionales de cada isoforma							X	X		
Análisis de resultados y redacción de tesis									X	X