

## Regulación de K-Ras por Ca<sup>2+</sup>/CaM

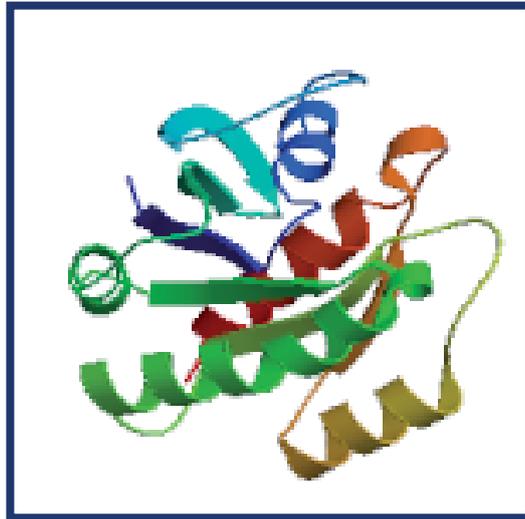
Cristina López Alcalá

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

# **REGULACIÓN DE K-RAS POR $\text{Ca}^{2+}$ /CaM**



**Cristina López Alcalá**

**2006**

**Universitat de Barcelona**



# **REGULACIÓN DE K-RAS POR $\text{Ca}^{2+}$ /CaM**

**Tesis presentada por Cristina López Alcalá  
para optar al grado de Doctora en Farmacia**

**Barcelona, julio 2006**





---

**Esta Tesis ha sido realizada bajo la dirección  
de la Doctora Neus Agell Jané en el Departamento de  
Biología Celular y Anatomía Patológica de la  
Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona.**

---

**Programa de doctorado de Biología y Patología Celulares,  
Bienio 2000-2002, de la Universitat de Barcelona**







---

<b>I. LA SUPERFAMILIA RAS .....</b>	<b>3</b>
<b>I.1 ESTRUCTURA Y BIOQUÍMICA DE LAS GTPASAS .....</b>	<b>4</b>
<b>I.2 MODIFICACIONES LIPÍDICAS.....</b>	<b>5</b>
<b>I.3 FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LAS GTPASAS.....</b>	<b>6</b>
<b>La familia Rho.....</b>	<b>6</b>
<b>La familia Rab.....</b>	<b>8</b>
<b>La familia Ran.....</b>	<b>9</b>
<b>La familia Arf.....</b>	<b>10</b>
<b>La familia Ras .....</b>	<b>11</b>
• Rap. ....	11
• Ral. ....	12
• Otros miembros de la subfamilia Ras. ....	14
<b>II. RAS.....</b>	<b>15</b>
<b>II.1 BIOQUÍMICA Y ESTRUCTURA DE RAS .....</b>	<b>17</b>
<b>Bioquímica de Ras .....</b>	<b>17</b>
<b>Estructura de Ras .....</b>	<b>17</b>
<b>II.2 MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES Y LOCALIZACIÓN SUBCELULAR.....</b>	<b>19</b>
<b>Modificaciones postraduccionales .....</b>	<b>19</b>
<b>Localización de Ras .....</b>	<b>21</b>
• Ras en endosomas.....	24
• Ras en el Golgi. ....	25
• Ras en el Retículo Endoplasmático (RE).....	26
• Ras en la mitocondria. ....	26
<b>II.3 REGULACIÓN DE LA ACTIVACIÓN/DESACTIVACIÓN DE RAS: GEFs Y GAPs .....</b>	<b>27</b>
<b>GEFs.....</b>	<b>27</b>
• Sos .....	27
• RasGRF1/RasGRF2.....	29
• RasGRP/CALDAG.....	29
• SmgGDS.....	30
• CNrasGEF .....	31
<b>GAPs .....</b>	<b>31</b>
• p120GAP .....	32
• NF1.....	33
• CAPRI .....	34
• p135SynGAP .....	34

<b>II.4 MECANISMOS DE ACTIVACIÓN DE RAS</b> .....	<b>35</b>
Activación de Ras por receptores tirosina-quinasa. ....	35
Activación de Ras por el receptor de células T (TCR).....	36
Activación de Ras por receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas .....	37
<b>II.5 EFECTORES DE RAS</b> .....	<b>38</b>
Raf.....	39
PI3K .....	42
RalGEFs.....	44
Otros efectores de Ras. ....	45
<b>II.6 RAS Y CÁNCER.</b> .....	<b>46</b>
• Inhibidores de la expresión de las proteínas Ras.....	48
• Inhibición del procesamiento de K-Ras. ....	48
• La proteína K-Ras como target. ....	49
• Inhibición de los efectores de Ras. ....	50
<b>III. CALMODULINA/Ca<sup>2+</sup></b> .....	<b>51</b>
<b>III.1 CALMODULINA (CAM)</b> .....	<b>51</b>
<b>III.2 CAM ES UN SENSOR DE CA<sup>2+</sup></b> .....	<b>51</b>
<b>III.3 LAS PROTEÍNAS DE UNIÓN A CAM: CAMBPs</b> .....	<b>52</b>
<b>III.4 PROCESOS REGULADOS POR CAM</b> .....	<b>52</b>
<b>III.5 REGULACIÓN DE LA VÍA RAS/RAF/MEK/MAPK POR CA<sup>2+</sup>/CAM</b> .....	<b>56</b>
<b>IV. PKC</b> .....	<b>58</b>
<b>IV.1 ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN DE LAS PKCs</b> .....	<b>58</b>
<b>IV.2 RELACIÓN ENTRE PKC Y LA VÍA DE RAS/ MAPK.</b> .....	<b>60</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>61</b>
<hr/>	
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>65</b>
<hr/>	
<b>I. PLÁSMIDOS</b> .....	<b>67</b>
<b>II CULTIVOS CELULARES.</b> .....	<b>68</b>
<b>II.1 Modelo celular</b> .....	<b>68</b>
<b>II.2 Mantenimiento de las células y tripsinización</b> .....	<b>68</b>
<b>II.3 Congelación y descongelación de células</b> .....	<b>69</b>
<b>II.4 Sincronización de células</b> .....	<b>69</b>

<b>II.5 Tratamiento de las células</b> .....	69
<b>II.6 Transfección de células</b> .....	70
<b>II.7 Cuantificación del número de células</b> .....	70
<b>II.8 Obtención de las líneas estables NIH3T3 HA-K-Ras, HA-K-Ras181A, K-Ras181D, HA-K-RasV12, HA-K-RasV12/181A, HA-K-RasV12/181D.</b> ....	70
<b>III EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN</b> .....	72
<b>III.1 Cepas y medios</b> .....	72
<b>III.2 Transformación</b> .....	72
<b>III.3 Expresión en bacterias y purificación de proteínas GST.</b> .....	73
Expresión.....	73
Purificación de GST-RBD.....	73
Purificación de GST-K-Ras1-166, GST-H-Ras1-166, GST-N-Ras1-166 y GST K-Ras1-150 ....	74
Eliminación del GST por digestión con trombina.....	76
<b>III.4 Expresión de proteínas en células de insecto SF9</b> .....	77
<b>IV INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS</b> .....	78
<b>IV.1 Electroforesis, electrotransferencia y Western Blot</b> .....	78
Cuantificación de proteínas .....	78
Preparación de las muestras para electroforesis en una dimensión .....	79
Electroforesis de una dimensión.....	79
Electroforesis bidimensional.....	79
Tinción de geles .....	81
Electrotransferencia.....	82
Western Blot .....	82
<b>IV.2 Inmunocitoquímica</b> .....	82
Inmunocitoquímica anti-HA.....	83
<b>V TÉCNICAS “IN VITRO”</b> .....	83
<b>V.1 Ensayos de unión a CaM-Sefarosa</b> .....	83
Ensayos de unión a CaM-Sefarosa a partir de lisados celulares.....	83
Ensayos de unión a CaM a partir de proteína purificada .....	85
<b>V.2 Análisis de la activación de Ras por unión a RBD.</b> .....	85
Titrición .....	87
<b>V.3 Ensayo de activación de Ral</b> .....	87
<b>V.4 Inmunoprecipitación anti-HA</b> .....	88
<b>V.5 Ensayos quinasa.</b> .....	88
Ensayos quinasa con la proteína purificada GST-K-Ras como sustrato.....	88
Ensayos quinasa con Ras-HA inmunoprecipitado como sustrato.....	89

<b>V.6 Tratamiento de la muestra con fosfatasa.....</b>	<b>90</b>
<b>IV.7 Ensayo de partición de fases con Tritón X-114.....</b>	<b>91</b>
<b>VI. TÉCNICAS “IN VIVO”.....</b>	<b>92</b>
<b>VI.1 Fosforilación “in vivo”.....</b>	<b>92</b>
<b>VI.2 Detección de células en fase S.....</b>	<b>93</b>
Incorporación de Bromodeoxuridina (BrdU).....	93
Incorporación de Timidina triada (T-H <sup>3</sup> ).....	94
<b>VI.3 Análisis del tiempo de vida media de Ras.....</b>	<b>95</b>
<b>VI.4 Ensayo de formación de focos.....</b>	<b>96</b>
<b>VI.5 Ensayos de crecimiento de células en suspensión.....</b>	<b>96</b>
Crecimiento en placas tratadas con poly-HEME.....	96
Crecimiento en agar blando.....	97
<b>VI.6 Ensayos de migración: “Wounding Assay”.....</b>	<b>99</b>

---

**RESULTADOS 101**

---

<b>I. ESTUDIO DEL DOMINIO DE UNIÓN DE K-RAS A CaM. ....</b>	<b>105</b>
<b>I.1 RAS Y CaM COLOCALIZAN “IN VIVO”.....</b>	<b>105</b>
<b>I.2 MUTACIONES EN EL DOMINIO EFECTOR DE RAS NO AFECTAN A LA UNIÓN A CaM.....</b>	<b>105</b>
<b>I.3 LAS ISOFORMAS K Y H-RAS CON EL DOMINIO HIPERVARIABLE DELECCIONADO SE UNEN A CaM “IN VITRO”.....</b>	<b>107</b>
<b>I.4 LA A-HÉLICE COMPRENDIDA ENTRE LOS AMINOÁCIDOS 150 Y 166 ES NECESARIA PARA LA UNIÓN DE K-RAS PURIFICADA A CaM.....</b>	<b>108</b>
<b>I.5 LAS CONSTRUCCIONES DE LAS ISOFORMAS K, H Y N-RAS SIN EL DOMINIO HIPERVARIABLE NO UNEN CaM “IN VIVO”.....</b>	<b>110</b>
<b>I.6 MUTACIONES PUNTUALES EN LA REGIÓN 150-166 AFECTAN A LA UNIÓN DE K-RAS A CaM PERO TAMBIÉN AFECTAN A LA LOCALIZACIÓN DE RAS.....</b>	<b>111</b>
I.6.1 Cambios de aminoácidos básicos por glutaminas en la región 150-166, no afectan a la unión a CaM.....	112
I.6.2 La sustitución de aminoácidos hidrofóbicos de la región 150-166 por prolinas, produce una pérdida de unión a CaM, al mismo tiempo que produce una deslocalización de Ras.....	114
I.6.3 La sustitución de aminoácidos básicos de la región 150-166 por has árticos produce una pérdida de unión de Ras a CaM, a la vez que una deslocalización.....	117
I.6.4 El cambio de la arginina 161 por un aspártico afecta tanto a la unión de Ras a CaM como a su localización.....	119

<b>I.7 ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DEL DOMINIO HIPERVARIABLE EN LA INTERACCIÓN DE RAS CON CAM.....</b>	<b>121</b>
I.7.1 La farnesilación de la cisteína 185 es necesaria para la unión de Ras a CaM.....	122
I.7.2 El mutante 161D no está farnesilado .....	123
<b>II. ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD DE LA UNIÓN DE RAS A CaM.....</b>	<b>129</b>
<b>II.1 K-RAS ES LA ÚNICA ISOFORMA ACTIVABLE POR TPA Y W13.....</b>	<b>129</b>
<b>II.2 K-RAS SE FOSFORILA POR PKC “IN VITRO” Y ESTA FOSFORILACIÓN ES INHIBIBLE POR CAM ...</b>	<b>130</b>
<b>II.3 K-RAS SE FOSFORILA EN LA SERINA 181 IN VITRO .....</b>	<b>130</b>
<b>II.4 EL TRATAMIENTO DE CÉLULAS NIH3T3 CON TPA Y W13 PROVOCA LA FOSFORILACIÓN DE K-RAS “IN VIVO” .....</b>	<b>132</b>
<b>II.5 EL MUTANTE K-RAS181A NO ES ACTIVABLE POR TPA Y W13 .....</b>	<b>134</b>
<b>II.6 RAS FOSFORILADO NO UNE CAM .....</b>	<b>135</b>
<b>ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD DE LA FOSFORILACIÓN DE K-RAS POR PKC.....</b>	<b>138</b>
<b>II.7 TANTO EL MUTANTE K-RAS181A COMO EL K-RAS181D O K-RAS181E SE LOCALIZAN EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA. ....</b>	<b>138</b>
<b>II.8 LOS MUTANTES K-RAS181A Y K-RAS181D SON CAPACES DE ACTIVARSE POR FACTORES DE CRECIMIENTO. ....</b>	<b>139</b>
<b>II.9 LOS MUTANTES K-RASV12/181A Y K-RASV12/181D SON CAPACES DE ACTIVAR LOS MISMOS EFECTORES QUE K-RASV12.....</b>	<b>139</b>
<b>II.10 LA FOSFORILACIÓN DE K-RAS NO FAVORECE LA UNIÓN A RBD .....</b>	<b>141</b>
<b>II.11 LA FOSFORILACIÓN DE K-RAS NO AFECTA A LA ESTABILIDAD DE LA PROTEÍNA. ....</b>	<b>143</b>
<b>III. ESTUDIO DE LA POSIBLE IMPLICACIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE K-RAS EN TRANSFORMACIÓN.....</b>	<b>144</b>
<b>III.1 LA FOSFORILACIÓN DEL RESIDUO 181 ES IMPORTANTE PARA LA TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS NIH3T3: ENSAYO DE FORMACIÓN DE FOCUS. ....</b>	<b>144</b>
<b>III.2 LAS CÉLULAS TRANSFECTADAS CON EL K-RASV12/181A PRESENTAN UN MENOR CRECIMIENTO EN SUSPENSIÓN.....</b>	<b>145</b>
<b>III.3 ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE LAS LÍNEAS ESTABLES EN CULTIVO QUE EXPRESAN KRASV12, KRASV12/181A, KRASV12/181D.....</b>	<b>146</b>
III.3.1 Estudio del número de células en fase S en las líneas que expresan K-RasV12, K-RasV12/181A o K-RasV12/181D.....	147
III.3.2 Estudio de la duración de la fase G <sub>1</sub> del ciclo celular de las líneas estables K-RasV12, K-RasV12/181A o K-RasV12/181D.....	148

III.3.3 Tasa de proliferación de las líneas estables K-RasV12, K-RasV12/181A o K-RasV12/181D. .....	149
<b>III.4 LA LÍNEA CELULAR QUE EXPRESA EL MUTANTE KRASV12/181A PROLIFERA MENOS EN CONDICIONES BAJAS DE FACTORES DE CRECIMIENTO .....</b>	<b>150</b>
<b>III.5 LA LÍNEA ESTABLE QUE EXPRESA EL K-RASV12/181A, TIENE UNA SUPERVIVENCIA MENOR EN CONFLUENCIA: ENSAYOS DE MTS. ....</b>	<b>151</b>
<b>III. 6 K-RASV12, K-RASV12/181A Y K-RASV12/181D TRANSFECTADOS EN CÉLULAS NIH3T3 DESESTABILIZAN LAS FIBRAS DE ESTRÉS. ....</b>	<b>153</b>
<b>III.7 NO SE OBSERVAN DIFERENCIAS EN LA CAPACIDAD MIGRATORIA ENTRE LAS LÍNEAS CELULARES K-RASV12, K-RASV12/181A Y K-RASV12181</b>	<b>153</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>157</b>
<hr/>	
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>175</b>
<hr/>	
<b>ANEXO</b>	<b>179</b>
<hr/>	
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>189</b>
<hr/>	





## I. LA SUPERFAMILIA RAS

Las proteínas de la superfamilia Ras son pequeñas proteínas G monoméricas de pesos moleculares de entre 20 y 40 kDa que actúan como interruptores moleculares regulando el inicio, duración y finalización de una gran variedad de funciones celulares (Takai, Yoshimi et al. 2001).

Esta superfamilia comprende más de 150 proteínas (Fig. 1) con homólogos encontrados en *Drosophila*, *C.Elegans*, *S. cerevisiae*, *Dictyostelium* y en plantas. Las proteínas Ras más conocidas y estudiadas, H, N y K-Ras, son los miembros fundadores de esta gran familia, la cual se divide en 5 subfamilias en base a similitudes en la secuencia y funcionalidad de las proteínas que las componen: Ras, Rho, Rab, Ran y Arf (Fig. 2) (Wennerberg, Krister et al. 2005)

Además de compartir una estructura parecida, todas estas proteínas tienen unas características generales comunes: tienen capacidad de unir nucleótidos de guanina (GTP o GDP), poseen actividad GTPasa intrínseca y necesitan estar unidas a sistemas de membrana para realizar su función.

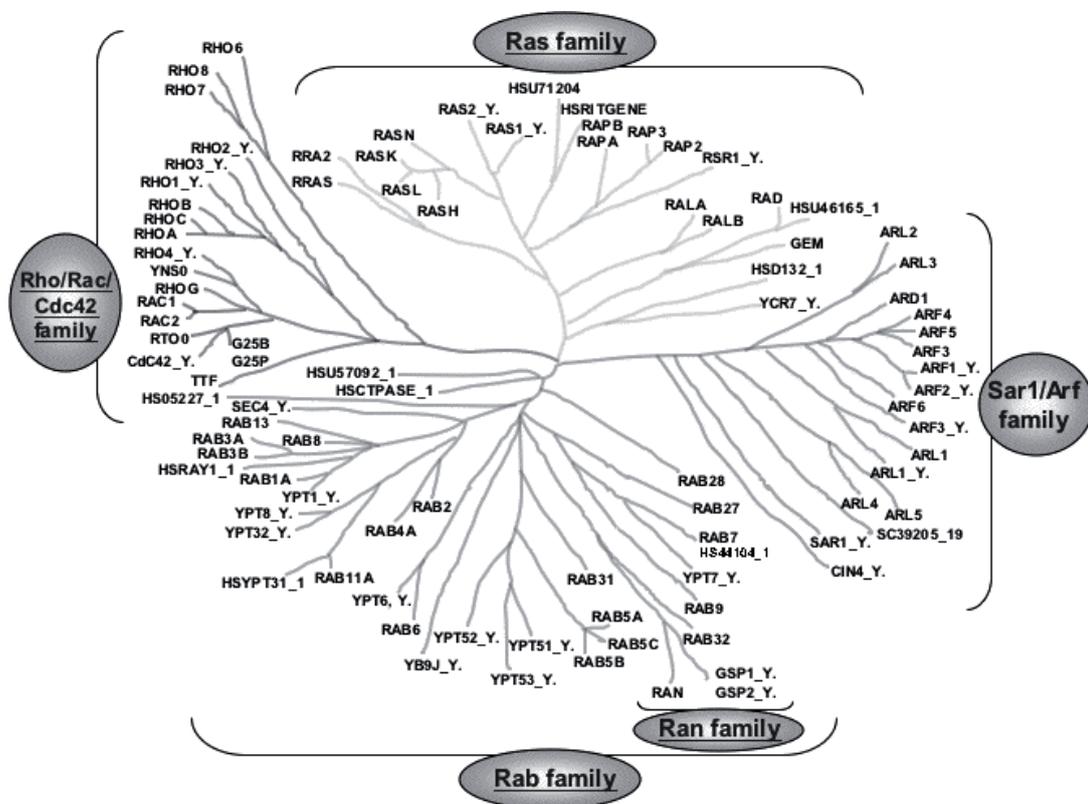


Figura 1. Dendrograma de la superfamilia Ras (Takai, Yoshimi et al. 2001)

	GENES HUMANOS	ISOFORMAS DESCRITAS
Rab	61	63
Ras	36	39
Arf	27	30
Rho	20	22
Ran	1	1
Otros	9	10

Tabla 1. Tabla del número de componentes de las subfamilias de la superfamilia Ras

## I.1 Estructura y bioquímica de las GTPasas

Las GTPasas de la superfamilia Ras funcionan como interruptores moleculares regulados por la unión al nucleótido GTP o GDP. Existen unas secuencias consensus, llamadas “G box”, comunes a todas las proteínas de la superfamilia Ras, en el extremo N-terminal (Takai, Yoshimi et al. 2001). Estas secuencias son las responsables para la interacción con GDP o GTP y para la actividad GTPasa. Las secuencias de estas “G box”, así como su situación en la GTPasa, se observan en la Figura 3.



Figura 2. Secuencias consensus para la unión a GDP o GTP y actividad GTPasa. A, Ala; D, Asp; E, Glu; G, Gly; K, Lys; N, Asn; S, Ser; X, cualquier aminoácido.

Estas pequeñas GTPasas tienen una elevada afinidad por el GDP y el GTP y presentan baja actividad GTPasa intrínseca. El ciclo GDP/GTP está controlado por dos tipos de proteínas reguladoras: Las proteínas intercambiadoras de nucleótidos “GEFs” (Guanine-nucleotide-exchange factors) promueven la formación de la forma activa de la GTPasa unida a GTP (Schmidt, Anja and Hall, Alan 2002) (Mitin, N. et al. 2005) y las proteínas “GAPs” (GTPase-activating proteins) aceleran la hidrólisis del GTP y por tanto aceleran la formación de la forma inactiva de la GTPasa unida a GDP (Bernards, Andre and Settleman, Jeffrey 2005). Las GTPasas de una misma rama de la superfamilia pueden compartir o no diferentes GEFs y GAPs. Las GTPasas de ramas diferentes presentan diferentes GAPs y GEFs en cuanto estructura pero que, mecanísticamente son similares.

El que la GTPasa esté unida a GTP o GDP comporta dos conformaciones similares pero muy distintas en dos regiones muy concretas de la proteína: la Switch I y la Switch II. El cambio conformacional de la proteína unida a GTP posee una elevada afinidad por los efectores. Estos cambios en el Switch I y II son los que permiten a las proteínas reguladoras, GAPs y GEFs y, a las efectoras, sentir el nucleótido al que la GTPasa se encuentra unido. Las proteínas Arf y las proteínas Ran tienen secuencias en el extremo amino y carboxi terminal respectivamente, que también sufren unos cambios conformacionales significativos al estar unidas a GTP o GDP.

En general las GTPasas son activas cuando se encuentran unidas a GTP, pero, para las proteínas Rab, Arf y Ran el estar unidas a GDP comporta también unas determinadas funciones específicas.

## **I.2 Modificaciones lipídicas**

Una segunda característica importante de la mayoría de las proteínas que componen la superfamilia Ras, es la modificación post-traduccional por adición de lípidos. Las proteínas Ras y Rho terminan en una secuencia CAAX (C=Cys, A=Alifático, X=cualquier aminoácido). Este motivo CAAX es una secuencia reconocida por los enzimas farnesiltransferasa y geranilgeraniltransferasa I que catalizan la adición covalente de los isoprenoides farnesil y geranil, respectivamente, al residuo cisteína de esta secuencia. Los miembros de la subfamilia Rab también terminan con una secuencia que contiene una cisteína que será modificada, pero en este caso hay más heterogeneidad. Estas secuencias pueden ser: CC, CXC, CCX, CCXX o CCXXX. Las cisteínas serán modificadas por las geranilgeraniltransferasas II que adicionaran grupos geranil. Algunos miembros de la familia Arf se modifican en el extremo amino por un miristilo.

Todas estas modificaciones lipídicas son esenciales para la interacción de las GTPasas con las membranas celulares y la localización subcelular, aspectos críticos para la realización de sus funciones biológicas.

Como en todo, siempre hay excepciones: hay algunos miembros de la superfamilia que todo interaccionar con membranas no están modificados por lípidos (p.ej. Rit, RhoBTB, Miro y SarI) y otros que, ni están modificados, ni interaccionan con membranas (p.ej. Ran y Rerg)

SECUENCIA CAAX		MODIFICACIONES LIPÍDICAS		
<b>FAMILIA RAS</b>				
		<b>FARNESIL</b>	<b>GERANILGERANIOL</b>	<b>PALMITOIL</b>
H-Ras	CVLS	+	-	+
N-Ras	CVVM	+	-	+
K-Ras4A	CIIM	+	-	+
K-Ras4B	CVIM	+	-	-
TC21	CVIF	-	+	?
R-Ras	CVLL	-	+	?
M-Ras	CVIL	-	+	-
Rap1A	CLLL	-	+	-
Rap1B	CQLL	-	+	-
Rap2A	CNIQ	+	-	?
Rap2B	CVIL	-	+	?
RalA	CCIL	-	+	-
RalB	CCLL	-	+	-
Rheb	CSVM	+	-	-
Rin	-	?	?	?
Rit	-	?	?	?
<b>FAMILIA RHO</b>				
RhoA	CLVL	-	+	-
RhoB	CKVL	+	<b>OR</b>	+
RhoC	CPIL	-	+	-
CDC42	CCIF	-	+	-
Rac1	CLLL	-	+	-
Rac2	CSLL	-	+	-

Figura 4. Tabla resumen de las modificaciones lipídicas de los miembros de las familias Ras y Rho

### I.3 Funciones biológicas de las GTPasas

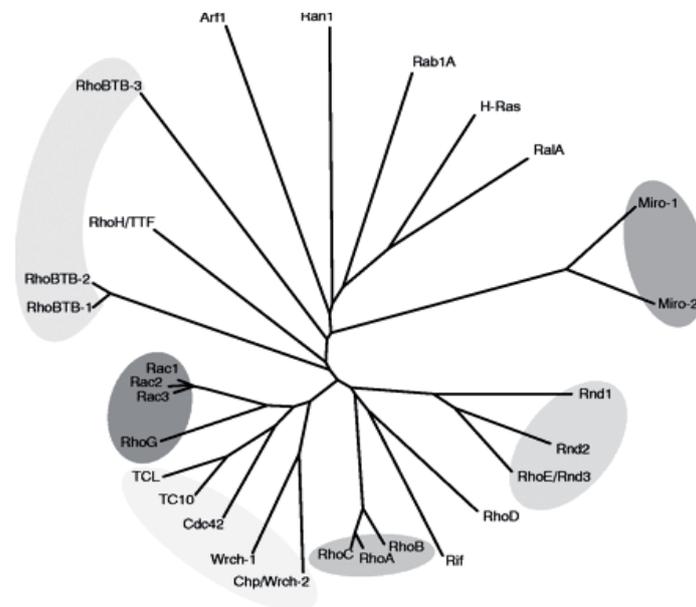
#### La familia Rho

Las “Ras homologous proteins” (Rho) son transductores claves que integran los estímulos extracelulares para regular la reorganización de la actina, la progresión del ciclo celular y la expresión génica (Etienne-Manneville, S. and Hall, A. 2002) (Jaffe, Aron B. and Hall, Alan 2005). Más de veinte miembros de esta familia han sido identificados y entre ellos, los más estudiados, han sido las proteínas RhoA, Rac1 y Cdc42. Las GTPasas Rho son claves regulando la reorganización de la actina: RhoA promueve la formación de fibras de estrés y de adhesiones focales, Rac1 promueve la

formación de lamellipodia y de “ruffles” de membrana y Cdc42 promueve “microspikes” de actina y de filopodias.

Así pues, las GTPasas Rho han sido implicadas en la regulación de la polaridad, en el movimiento y en la forma celular, en las interacciones célula-célula y célula-matriz, así como en endocitosis y exocitosis (Ridley, A. J. 2001) (Jaffe, Aron B. and Hall, Alan 2005). Como reflejo de su implicación en diferentes procesos celulares, RhoA, Rac1 y Cdc42 están reguladas cada una por una diversidad de GAPs y GEFs (Schmidt, Anja and Hall, Alan 2002) (Moon, S. Y. and Zheng, Y. 2003) y también utilizan diferentes efectores para llevar a cabo sus efectos (Bishop, A. L. and Hall, A. 2000).

A parte de las proteínas clásicas RhoA, Rac1 y Cdc42, otras GTPasas de la familia Rho, las proteínas de la subfamilia Rnd, han sido implicadas en reorganización de la actina (Wennerberg, Krister and Der, Channing J. 2004) (Véase la figura 5)



**Figura 3. Dendrograma de la familia de las Rho GTPasas (Wennerberg, Krister and Der, Channing J. 2004)**

Los tres miembros de la familia Rnd (Rnd1, Rnd2 y RhoE/Rnd3), a pesar de presentar en torno un 45-49% de homología respecto RhoA, tienen unas características bioquímicas y funcionales diferentes a ésta (Nobes, Catherine D. et al. 1998) (Foster, R. et al. 1996). Estas proteínas son consideradas GTPasas deficientes ya que son inestables en forma GDP y tienen mucha más afinidad por GTP. RhoE/Rnd3 se encuentra constitutivamente unida a GTP. Otra característica que las diferencia del resto de Rho GTPasas, es que se encuentran farnesiladas en vez de geranilgeraniladas. En cuanto a

las funciones, presentan efectos contrarios a la formación de fibras de estrés y adhesiones focales, inhibiendo estos fenómenos y causando el redondeo de las células (Nobes, Catherine D. et al. 1998) (Guasch, R. M. et al. 1998). Parece ser que estos efectos están mediados por, por un lado la unión y activación de p190RhoGAP (Wennerberg, K et al. 2003) y por otro, al menos en el caso de Rnd3/RhoE, por unión e inactivación del efector de RhoA, ROCK1 (Riento, Kirsi et al. 2003). La proteína Rnd3/RhoE también está implicada en la inhibición de la progresión del ciclo celular y de la transformación inducida por Ras (Villalonga, Priam et al. 2004).

Las proteínas Miro, son unas proteínas que fueron descritas al principio como de la familia Rho pero que, por sus características atípicas, ahora se describen como un subgrupo propio de la superfamilia Ras. Estas proteínas no regulan el citoesqueleto, si no que se encuentran en las mitocondrias, regulando la integridad de este compartimento (Wennerberg, Krister and Der, Channing J. 2004).

### **La familia Rab**

Primero descritas como “Ras-like proteins in brain” (Rab), las proteínas Rab conforman la rama de la superfamilia Ras con más miembros, unos 61 (Pereira-Leal, J. B. and Seabra, M. C. 2001). Las GTPasas Rab son reguladores del transporte vesicular intracelular y el transporte de proteínas entre diferentes orgánulos de las vías endocítica y secretora (Zerial, M and Mc Bride, H 2001). Las proteínas Rab participan en la formación de vesículas y escisión del compartimento donador, el transporte hasta el compartimento aceptor y en la fusión de las vesículas y liberación del contenido en este compartimento aceptor.

Las proteínas Rab se localizan en compartimentos intracelulares específicos relacionados con sus funciones en distintos procesos de transporte vesicular (Zerial, M and Mc Bride, H 2001). Esta localización depende de la prenilación de la proteína y, la especificidad viene dictada por secuencias en el extremo C-terminal. Por ejemplo, la proteína Rab1 se localiza en el compartimento intermedio del cis-Golgi y está involucrada en el transporte RE-Golgi. En cambio, la proteína Rab5 se localiza en endosomas tempranos y regula el transporte de vesículas cubiertas de clatrina desde la membrana plasmática hasta los endosomas tempranos. Así, diferentes localizaciones intracelulares según su papel en el transporte vesicular han sido descritas para otros miembros de la familia Rab (Memon, A. R. 2004).

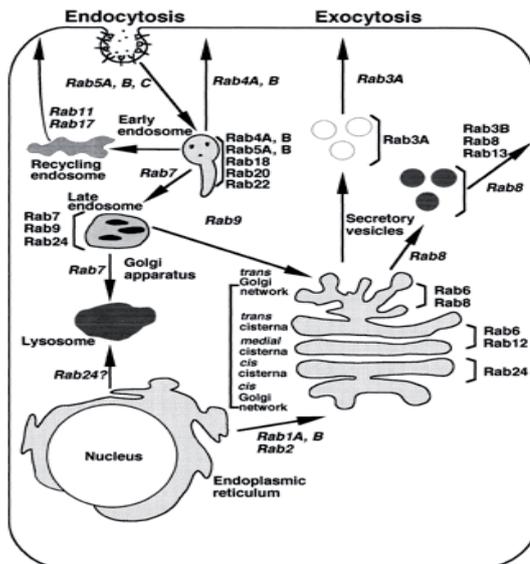
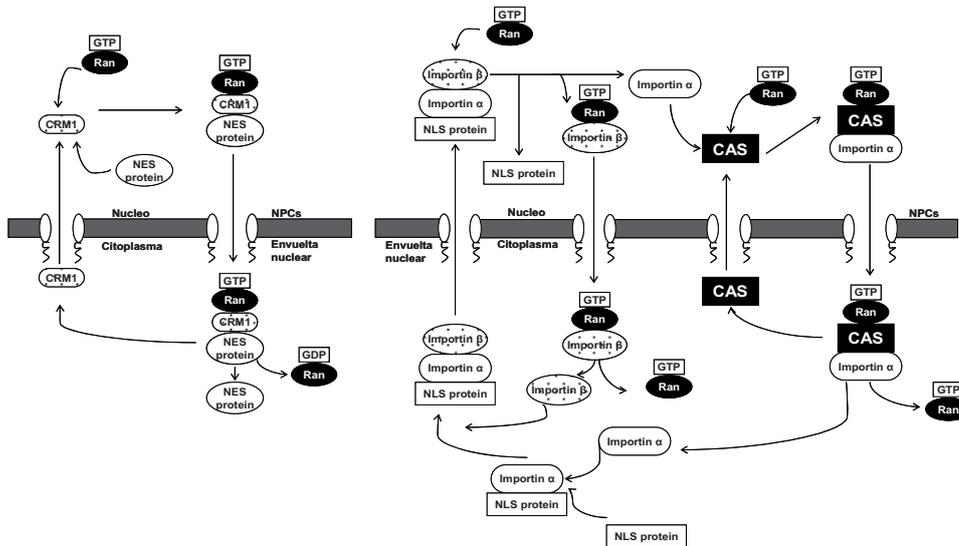


Figura 4. Localización subcelular de las proteínas Rab.

### La familia Ran.

La proteína Ran, de Ras-like nuclear proteins, es la GTPasa pequeña más abundante de la célula y es conocida por su función en el transporte nucleocitoplasmático, tanto de RNA como de proteínas (Weis, K 2003). Un rasgo característico de la proteína Ran es su ciclo GTP-GDP: la forma GTP y la forma GDP se encuentran asimétricamente distribuidas en el núcleo y en el citoplasma respectivamente. Esta distribución diferencial de las dos formas es debido a la asimétrica distribución de sus reguladores GEF y GAP. Sólo se ha descrito un RanGEF, RCC1 y, una RanGAP, RanGAP1 en mamíferos. RCC1 se localiza exclusivamente en el núcleo y RanGAP 1 se localiza exclusivamente en el citoplasma (aunque se ha detectado algo en el núcleo). Esto hace que en el núcleo haya una elevada concentración de Ran-GTP, hecho que facilita la dirección de la importación y exportación nuclear.

En presencia de Ran-GTP, la proteína a ser exportada y la GTPasa, se unen a la exportina-1, para formar un complejo que se exportará al citoplasma. Una vez allí Ran pasa a forma GDP, causando la liberación de la carga y la disociación con la exportina que volverá vacía al núcleo. En el citoplasma, en ausencia de Ran-GTP, la importina $\beta$  se asocia con la importina $\alpha$  que sirve como un adaptador de las proteínas con señal NLS. Este complejo es transportado al núcleo, donde se les unirá Ran-GTP causando la disociación del complejo. La importina $\beta$  será devuelta al citoplasma unida a Ran-GTP. La exportación de la importina $\alpha$  necesita de una exportina específica llamada CAS. Ran-GTP se une a CAS y ésta a la importina y, todo el complejo sale al citoplasma donde, una vez Ran-GTP pasa a forma GDP, se disociará liberando la importina $\alpha$ . Por un mecanismo similar, el ciclo Ran-GDP/GTP también regula el ensamblaje del huso mitótico, la replicación del ADN y el ensamblaje de la cobertura nuclear (Li, H. Y. et al. 2003)

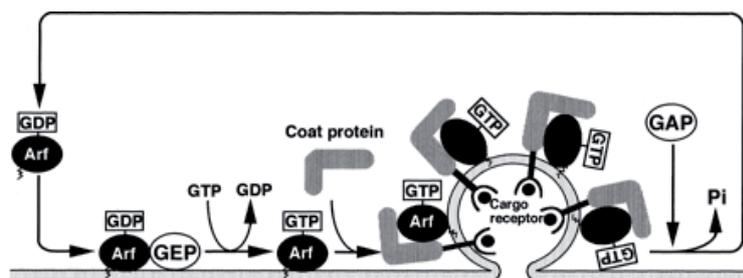


**Figura 5. Modo de acción de Ran en el transporte nucleocitoplasmático.**  
 A. Modo de acción en la exportación desde el núcleo. B. Modo de acción de Ran en la importación al núcleo. Extraído de (Takai, Yoshimi et al. 2001)

### La familia Arf

Al igual que las proteínas Rab, las proteínas Arf (de ADP-ribosylation factor), están implicadas en la regulación del transporte vesicular. Arf1, es la proteína de la familia mejor caracterizada (Memon, A. R. 2004). La forma activa, Arf-GTP, interacciona con efectores, entre ellos, proteínas de la cubierta vesicular. Los cambios conformacionales entre las formas GTP y GDP, incluyen, además del las regiones del SwitchI y SwitchII, cambios en le extremo amino terminal, que permiten que el grupo miristilo interaccione con membranas en el estado GTP (Pasqualato, S. et al. 2002).

Arf1 regula la formación de coberturas vesiculares en diferentes pasos de la vía endocítica y exocítica. El Arf-GTP unido a la membrana donante se asocia y activa a proteínas de la cobertura vesicular. El complejo Arf-cobertura proteínica facilita la formación y liberación de la vesícula. Cuando Arf pasa a forma GDP por acción de las GAPs, se produce la disociación del complejo y la consecuente fusión de la vesícula con la membrana aceptora. A diferencia de las proteínas Rab que actúan en un paso del tráfico, las proteínas Arf pueden actuar en múltiples pasos.



**Figura 6. Activación/Inactivación cíclica de las proteínas Arf (Takai, Yoshimi et al. 2001)**

## La familia Ras

Las cuatro proteínas Ras por excelencia, H-Ras, N-Ras, K-RasA y K,-RasB son los miembros fundadores de esta familia y han sido objeto de una intensa investigación durante las tres últimas décadas. En este apartado no hablaremos de estas proteínas (lo haremos en apartados posteriores) y centraremos la atención en otros miembros de la familia Ras: las proteínas Rap (Rap1A, Rap1B, Rap2A, Rap2B), Ral (RalA y RalB), R-Ras (R-Ras, R-Ras2/TC21 y R-Ras3/M-Ras), la proteína Rheb y las proteínas Rin y Rit.

- **Rap.** La proteína Rap mejor estudiada, Rap1A (también llamada Krev1), fue identificada en un “screening” de cDNAs que revertían la transformación de las células causada por K-Ras (Kitayama, H. et al. 1989). Rap 1 tiene un dominio efector casi idéntico al de Ras, hecho que indicaría que ambas proteínas comparten efectores. Una característica diferencial de Rap, es la treonina que presenta en la posición 61, donde Ras y otras GTPasas tienen como residuo una glutamina. Esto resulta en que Rap tenga 10 veces menos de capacidad GTPasa intrínseca, que Ras.

El hecho de que Rap revertiera la transformación de células NIH3T3 causada por Ras, junto con la elevada similitud de sus dominios efectores, llevó a pensar que Rap era un antagonista de Ras y que podía actuar atrapando los efectores y formando complejos inactivos. Pero posteriormente los estudios apuntaron en otra dirección: Rap 1 no en todos los casos era capaz de revertir la transformación por Ras (Sato, K. Y. et al. 1994), señales que activaban a Raf1 y ERK (como PDGF o EGF) activaban en vez de inhibir a Rap1 (Posern, Guido et al. 1998) (Zwartkruis, F. J. et al. 1998) y la activación de Rap1 por TPA no inhibía la activación de ERK causada por la activación de Ras por PDGF o EGF. En resumen, aunque la sobreexpresión de Rap1 pueda interferir en la señalización de Ras, Rap1 es más que un antagonista de Ras.

Rap1 se asocia con una serie de efectores de Ras, entre ellos Raf-1, B-Raf, PI3K, RalGEFs y PLCε. No ocurre lo mismo con los GEFs: Rap1 no comparte los intercambiadores de nucleótidos con Ras. Los GEFs descritos para Rap1 son: C3G (que se activaría por receptores tirosina kinasa), CalDAGFEF1 (mediaría la activación por PLC), Epac/cAMP-GEF-1 (mediaría la activación de Rap1 por aumento de AMPc) y RA-(PDZ)-GEF1 y 2. También sus GAPs son exclusivas: Rap1GAP, tuberina, Spa-1, GAP<sup>IP4BP</sup>. Esta última también presenta actividad Ras-GTPasa además de RapGTPasa.

Rap1 es una proteína ubicua, pero se expresa abundantemente en plaquetas, neutrófilos y en el cerebro. La localización de Rap es variable y depende del tipo celular. Rap se encuentra asociado a Golgi (en células Rat-1), en endosomas tardíos o tempranos y en lisosomas (en células BHK). En neutrófilos se localiza en membrana plasmática y en gránulos específicos que se fusionan con la membrana después de estímulo. En plaquetas se encuentra en membrana plasmática y gránulos  $\alpha$ . La localización de Rap1 podría venir regulada por la fosforilación por PKA de la serina adyacente al motivo CAAX, aunque no se descartan otras funciones para esta fosforilación (Hu, Chang Deng et al. 1999). Esta localización variable de Rap-1 en compartimentos intracelulares, explicaría porque se activa predominantemente por mensajeros secundarios y no por asociación directa de sus GEFs con receptores de la membrana plasmática. Esto también sería una posible explicación de porque Ras y Rap1 inducen diferentes respuestas aunque sus dominios efectores sean tan similares (Mochizuki, N. et al. 2001) (Ohba, Y. et al. 2003).

Trabajos recientes aclaran cual parece ser la función biológica de Rap1. Estos estudios relacionan a Rap1 con la señalización celular por integrinas. La introducción en la célula de un Rap1 constitutivamente activo, así como del GEF Epac, induce adhesión celular mediada por integrinas. Por el contrario, la introducción de Rap1GAP inhibe la activación de las integrinas. Pero más importante es el hecho de que, la activación de receptores acoplados a proteínas G provoque adhesión celular mediada por integrinas, en la que interviene Epac y Rap1. Por lo tanto, parece ser que la activación de Rap1 por receptores, regula la vía de las integrinas (Bos, J. L. 2005) (Bos, J. L. et al. 2003) (Kinbara, K. et al. 2003) (Storck, P. J. 2003).

Sobre las funciones de Rap2 se sabe menos. A diferencia de Rap1, no hay evidencias de que antagonice la función de Ras. La activación de Rap2 no está mediada por los GEFs de Rap1. Puede interactuar con los GEFs de Ral, pero esta interacción no produce la activación de Ral.

- **Ral.** La rama Ral de la familia Ras la componen dos proteínas, RalA y RalB que presentan un 85% de homología entre sí. El interés en estas proteínas nació al saberse que los Ral-GEFs (Ral-GDS, Rgl1, Rgl2 y Rlf) eran efectores de Ras, en cuanto se unían y eran activados por este último (Quilliam, L. A. et al. 2002). Esto inducía a pensar que Ral podía estar mediando algunas funciones celulares de Ras.

La activación de RalGDS ocurre como consecuencia de la combinación, por un lado, de la relocalización de RalGDS en la membrana inducida por Ras (Kishida,

S. et al. 1997) (Matsubara, K. et al. 1999) y, por otro lado, del aumento de su capacidad catalítica a través de la activación de la vía Ras/PI3K/PDK1 (Tian, X. et al. 2002).

También se han descrito mecanismos independientes de Ras que resultan en la activación de RalGDS. Por ejemplo, Ral-GDS se encuentra en un complejo inactivo con  $\beta$ -arrestina en el citoplasma. La estimulación de las células con formal-Met-Leu-Phe (fMLP), provoca la disociación del complejo, cosa que permite a Ral-GDS activar a Ral (Bhattacharya, M. et al. 2002). Ral también se puede activar en respuesta a  $Ca^{2+}$  sin contribución de Ras (Hofer, F. et al. 1998). RalA presenta un dominio de unión a calmodulina en su extremo carboxi aunque parece ser que calmodulina esté más relacionada con la inhibición de Ral que con su activación (Wang, K. L. and Roufogalis, B. D. 1999). La GTPasa Rap, que presenta una elevada afinidad por el “Ras binding domain” de las Ral-GEFs, podría estar participando de alguna manera en la activación de Ral, porque la activación de Rap1 induce la formación de Ral-GTP mediada por Rlf1 (en experimentos usando transfecciones) y se sabe que Rap1 tiene capacidad de activar RalGDS “in vitro”. Pero experimentos con fibroblastos, Rap1 endógeno no activa Ral. La actividad catalítica de RalGDS, también puede verse modulada por PKC. Esta quinasa fosforila a RalGDS, en su dominio inhibidor N-terminal, previniendo así la disociación del complejo catalítico (Rusanescu, G. et al. 2001).

Ral se encuentra tanto en membrana plasmática como en vesículas intracelulares. Esta localización en vesículas se debe a que, Ral, participa en la vía exocítica tal como la liberación de componentes de la membrana basolateral de células epiteliales y la regulación de la secreción tanto en células epiteliales como neuronales. Ral también se encuentra implicado en procesos de endocitosis (Feig, L. A. 2003).

En el transporte a la membrana basolateral de células polarizadas, Ral se une al complejo exocítico. Sec5 que forma parte de este complejo se une directamente a las conformaciones activas de RalA y RalB. En cuanto a la endocitosis, Ral actúa a través de su efector RalBP1. RalBP1 se une a dos proteínas que se asocian al receptor del EGF, Pobs1 y Repl1, que tienen homología con Eps15, una proteína implicada en la endocitosis de este receptor.

Ral también podría influir en la morfología celular a través de efectos en el citoesqueleto de actina. Estos efectos podrían estar mediados por la interacción de Ral con el complejo exocítico (Sugihara, K. et al. 2002), por la interacción con otra proteína efectora, la filamina (Ohta, Y. et al. 1999) y tampoco se puede

descartar que estos efectos estén mediados por el efecto Rac-GAP y Cdc42-GAP de RalBP1.

De los efectos de Ral en proliferación celular y cáncer hablaremos en el capítulo dedicado a RalGDS como efector de Ras.

- **Otros miembros de la subfamilia Ras.** El grupo de proteínas R-Ras está compuesto por las proteínas R-Ras, R-Ras2/TC21 y R-Ras3/M-Ras. Igual que Ras, las proteínas R-Ras constitutivamente activas han demostrado promover la transformación y alterar la diferenciación celular. R-Ras tiene un 55% de homología con Ras, siendo idéntico el dominio efector y difiriendo en una prolongación de seis aminoácidos de este dominio que presenta R-Ras. Esto hace que estas dos proteínas compartan efectores entre ellos PI3K, RalGDS y Raf, pero, a pesar de esto, estas dos proteínas presentan diferentes funciones. Las células NIH3T3 transformadas con una forma constitutivamente activa de R-Ras, no presentan la misma morfología que las transformadas por Ras, si bien, si que crecen a bajas concentraciones de suero, forman colonias en agar blando y provocan tumores en ratones inmunodeprimidos. Los últimos trabajos relacionan a R-Ras con la migración celular a través de la regulación de Rho y Rac (Wozniak, Michele A. et al. 2005), con la pérdida de motilidad y morfología celular de células epiteliales de mama (Jeong, Ha Won et al. 2005) y, con la adhesión por integrinas (Zhang, Z. et al. 1996).

En cuanto R-Ras2/TC21, esta proteína tiene una elevada capacidad transformante y se ha encontrado mutada en algunos tumores humanos y sobreexpresada en cáncer de mama. Diferentes trabajos relacionan a esta proteína con transformación y supervivencia a través de la vía PI3K y NF-kappaB (Rong, R. et al. 2002) y con migración celular (Huang, Y. et al. 2004).

Las recientemente descubiertas, Rin y Rit (Lee, Ching Hsien et al. 1996), comparten bastante similitud en la secuencia con Ras. Una característica diferencial de estas proteínas es la falta de un motivo CAAX en el extremo carboxi-terminal, por lo que no se modifican lipídicamente. Su localización en la membrana plasmática se deberá probablemente a la interacción a través de aminoácidos básicos. Rit tiene una expresión ubicua y la expresión de Rin se limita al tejido neuronal. Rin une CaM por su extremo carboxi y esta asociación, junto con la activación de Rac/Cdc42 media el “neurite outgrowth signaling”, por lo que Rin está implicado en vías de señalización neuronales por calcio/CaM (Hoshino, Mitsunobu and Nakamura, Shun 2003). Rit inhibe la apoptosis inducida por falta de suero e induce la extensión de neuritas en células de feocromocitoma (Spencer, Michael L. et al. 2002). Un efector de estas dos

proteínas ha sido descrito recientemente, la proteína PAR6 (Hoshino, Mitsunobu et al. 2005). PAR6 es una proteína de la maquinaria molecular que regula la polaridad celular. Rit y Rin se unirían a PAR6 y junto con la forma activa de Rac/Cdc42, formarían un complejo ternario con implicaciones en transformación y tumorigénesis. Otro efector descrito para Rit, es el GEF de Ral, Rgl3, estableciendo una conexión entre Rit y la vía Ral (Shao, Haipeng and Andres, Douglas A. 2000)

Otras proteínas descritas recientemente, clasificadas en esta subfamilia y menos conocidas son: Rheb, Kir/Gem, Rad,  $\kappa$ B-Ras1,  $\kappa$ B-Ras2.

## II. RAS

Los genes *ras* fueron los primeros oncogenes en ser implicados en cáncer humano. Estos genes se identificaron como los elementos genéticos transformantes de dos retrovirus que inducían la formación de tumores en los animales infectados: las cepas Harvey y Kirsten del virus del sarcoma de rata (HARVEY, J. J. 1964) (Kirsten, W. H. and Mayer, L. A. 1969). Más tarde se descubrió que estos virus en realidad contenían versiones transformadas (oncogenes *ras*) de unos genes propios de la célula huésped (proto-oncogenes *ras*) (Ellis, R. W. et al. 1981). Poco después estos oncogenes, *H-ras* y *K-ras*, fueron localizados también en tumores humanos (Parada, L. F. et al. 1982) (Santos, E. et al. 1982). El último en descubrirse en 1983, fue el gen *N-Ras*, aislado de una línea celular de neuroblastoma (Shimizu, K. et al. 1983).

Estos tres genes *Ras*, *H-ras*, *K-ras*, *N-ras*, codifican para las proteínas de 21kDa H-Ras, K-Ras y N-Ras. El gen *K-ras* da lugar a dos proteínas, K-RasA y K-RasB, por “splicing” alternativo del cuarto exón codificante. Cuando se habla de la proteína K-Ras, normalmente se están refiriendo a la proteína K-RasB, ya que es ésta la que difiere de las otras isoformas y presenta unas propiedades que la distingue de las demás. K-RasA presenta unas características similares a las de H-Ras y N-Ras, además de representar tan solo un 10% del RNAm del total que transcribe el gen *K-ras*. Por estos motivos, nosotros también nos estaremos refiriendo a la proteína K-RasB, cuando hablemos de K-Ras.

Ya son muchos los trabajos que han demostrado que estas cuatro proteínas a pesar de tener una secuencia y estructura muy similares y, compartir muchas funciones, difieren en algunos aspectos. Aunque el patrón de expresión de estas proteínas puede variar según el tipo celular, estas diferencias genéticas, estructurales y funcionales, justificarían el porqué de tener tres isoformas.

Las diferencias que se han descrito hasta ahora entre las isoformas son muchas: diferencias en relación a su estructura (no comparten la secuencia en el extremo C-terminal), diferencias en cuanto especificidad por algunos efectores, GAPs o GEFs, diferencias de localización subcelular, diferentes asociaciones y regulaciones por otras proteínas (nuestro trabajo es un ejemplo como veremos), presencia de las formas oncogénicas de cada isoforma en diferentes tumores, etc... Hasta hoy, la lista de las características diferenciales de cada isoforma es extensa.

Si que sería interesante hacer referencia a las diferencias en los ratones “knockouts” de cada isoforma. El primer estudio en ratones fue el knockout de *K-ras* y demostró que K-Ras era esencial para el desarrollo normal del ratón (Johnson, L. et al. 1997) (Koera, K. et al. 1997). El embrión del ratón deficiente en *K-ras* moría al doceavo día. Por el contrario, los ratones deficientes en *H-ras*, *N-ras*, *K-rasA* respectivamente, eran viables y no mostraban anomalías obvias (Umanoff, H. et al. 1995) (Ise, K. et al. 2000) (Plowman, S. J. et al. 2003). Además el ratón deficiente para los genes *H-ras* y *N-ras*, al mismo tiempo, era viable, demostrando que el gen *K-ras* además de ser esencial, es suficiente para el normal desarrollo del ratón (Esteban, L. M. et al. 2001). Aún así se planteaba la cuestión de si esto era debido a las funciones específicas de la proteína K-Ras o era debido a un patrón de expresión distintivo. Un trabajo reciente (Potenza, N. et al. 2005), resuelve la cuestión. Este grupo ha obtenido un ratón con el gen de *H-ras*, en el locus del gen *K-ras* (ratón HrasKI). Este ratón no presenta expresión de la proteína K-Ras, y en el momento que se expresa su gen, se expresa la proteína H-Ras. La sorpresa es que este ratón es viable, H-Ras es capaz de sustituir las funciones de K-Ras durante el desarrollo del ratón, por lo que K-Ras es esencial por su patrón de expresión específico. Este ratón HrasKI presenta en la edad adulta hipertensión y una cardiomiopatía por lo que K-Ras podría tener una función en la homeostasis cardiovascular.

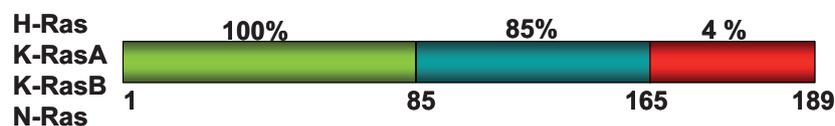


Figura 7. Las tres isoformas Ras y el porcentaje de homología en la secuencia

## II.1 Bioquímica y estructura de Ras

### Bioquímica de Ras

La GTPasa Ras (H, N y K-Ras) tiene una actividad bioquímica básica: la unión de GTP y la hidrólisis de este nucleótido a GDP. Cuando Ras está unido a GTP adopta una conformación que le permite interactuar con los efectores, se trata de la conformación activa. Cuando Ras está unido a GDP, esta interacción con los efectores no es posible y hablamos de una conformación inactiva.

Este ciclo GTP/GDP depende de las propiedades bioquímicas intrínsecas de Ras y de la modulación de estas propiedades por unas proteínas reguladoras; las proteínas GEFs (favorecen el intercambio de GDP a GTP) y de las proteínas GAPs (que aceleran la capacidad intrínseca de hidrolizar el GTP). El intercambio espontáneo de GDP por GTP, es muy lento ( $3.4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  para H-Ras), la cual cosa favorece que Ras se encuentre en la conformación inactiva a pesar de la elevada relación GTP/GDP que hay en las células (unas 10 veces más de GTP que de GDP). Es necesaria la intervención de las proteínas GEFs para que Ras pase a la conformación activa. Estas proteínas promueven la disociación del GDP y la entrada del GTP. Por otro lado, la capacidad GTPasa intrínseca de Ras es muy baja ( $4.2 \times 10^{-4} \text{ s}$  para H-Ras). La actividad GTPasa de Ras se potencia con la intervención de las GAPs.

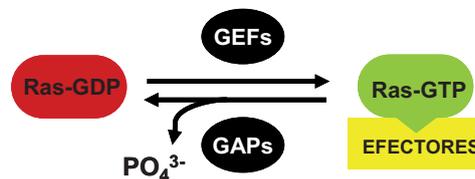


Figura 8. El ciclo GTP/GDP de Ras y los reguladores

### Estructura de Ras

Las proteínas Ras, H, N y K-Ras2A constan de 189 aminoácidos y 188 en el caso del K-Ras2B. Los aminoácidos comprendidos entre el 1 y el 165 constituyen el llamado dominio catalítico, siendo éste muy conservado entre las diferentes isoformas y, entre los aminoácidos 166 y 189 encontramos el denominado dominio hipervariable. Es en este dominio hipervariable donde las isoformas se diferencian considerablemente.

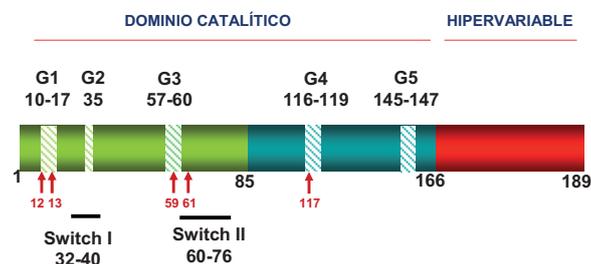
Como se ha visto en apartado I, las proteínas de la superfamilia Ras comparten una serie de “G box” conservadas. En la figura 9 se indica la localización y secuencia de estas “G box” para las proteínas Ras. El G1 está implicado en la interacción con los fosfatos  $\alpha$  y  $\beta$  del nucleótido, el G2 en la interacción con efectores, el G3 en la interacción con el  $\text{Mg}^{2+}$  y el fosfato  $\gamma$  del nucleótido, el G4 en establecer puentes de

hidrógeno con el anillo de guanina y en interacciones estabilizadoras con el G1 y el G5 está implicado en interacción con el nucleótido.

También podemos distinguir dos regiones en la estructura de Ras llamadas Switch I y Switch II. Estas dos regiones son las que cambian conformacionalmente cuando Ras se encuentra unido a GTP. El Switch I incluye el dominio efector (aminoácido 32-40) esencial para la interacción con los efectores. El Switch II (aminoácidos 60-76) es también importante para la interacción con algunos efectores y para la unión de las proteínas GAPs. Estas dos regiones también están representadas en la figura 9.

En la figura 9 también se han representado las mutaciones en la secuencia de Ras encontradas en tumores humanos. Estas mutaciones en la glicina 12 y 13, en la treonina 59, en la glutamina 61 y en la lisina 117 dan lugar a una forma hiperactiva de Ras. La mutación en la lisina 117 se asocia con un mayor intercambio del nucleótido y el resto, con una reducción de la actividad GTPasa independientemente a la unión a las proteínas GAPs.

Otros aminoácidos claves de la secuencia de Ras son la cisteína 186 y la serina 17. El primero es el aminoácido que se modifica lipídicamente por adición de un grupo farnesil, empezando así el procesamiento postraducciona de la proteína, proceso esencial para su actividad biológica. La mutación de la serina 17 da como resultado un dominante negativo de la proteína. Esta mutación afecta a la liberación del GEF del complejo Ras/GEF, una vez ha finalizado el intercambio del nucleótido. Esto hace que los GEFs de la célula sean secuestrados por este RasN17, no quedando GEFs suficientes para activar las proteínas Ras endógenas (Boguski, M. S. and McCormick, F. 1993) (Lowy, D. R. and Willumsen, B. M. 1993) (Bollag, G. and McCormick, F. 1991b).



**Figura 9.** Esquema de la secuencia de Ras donde se detallan las “G box”, el Switch I y II y en rojo las mutaciones encontradas en tumores “in vivo”

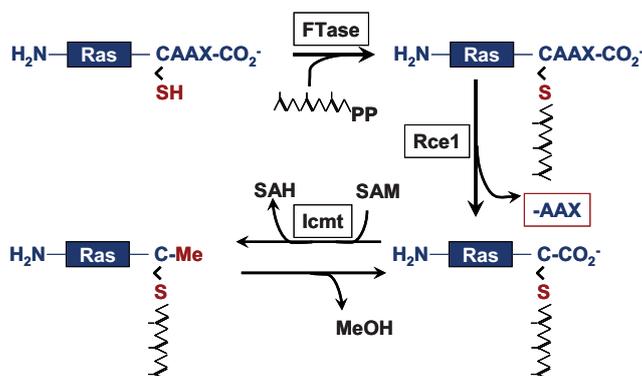
## II.2 Modificaciones postraduccionales y localización subcelular

### Modificaciones postraduccionales

Como ya se apuntó en el apartado general de las proteínas de la superfamilia Ras, estas GTPasas se caracterizan por tener una secuencia CAAX en el extremo carboxi-terminal. Esta secuencia CAAX dictamina una serie de modificaciones llevadas a cabo por diferentes enzimas, con el fin de conferir hidrofobicidad a la proteína y mediar la asociación con membranas celulares. CAAX es la representación de una secuencia donde C es una cisteína, A es un aminoácido alifático y X puede ser cualquier aminoácido. Para las proteínas Ras, H, N y K-RasB, las secuencia CAAX son respectivamente: CVLS, CVVM, CVIM.

La secuencia CAAX, es en primer lugar sustrato de unas preniltransferasas citosólicas, que añadirán un grupo polisoprenoide, mediante un enlace tioéter, a la cisteína (Basso, A. D. et al. 2006, Lane, K. T. and Beese, L. S. 2006). Cuando la secuencia CAAX termina en un aminoácido distinto a L o F (normalmente una S, M o Q), la cisteína se modifica con un farnesil (de 15 carbonos) y el enzima que lo cataliza es una farnesiltransferasa (FTasa), es el caso de H-Ras, N-Ras y K-Ras. Si la secuencia CAAX termina en una L o F (es el caso de otras GTPasas), se modifica en cambio, por la adición de un grupo geranilgeranil (de 20 carbonos) y el enzima que lo cataliza es una geranilgeraniltransferasa (GGTasa) (Moores, S. L. et al. 1991).

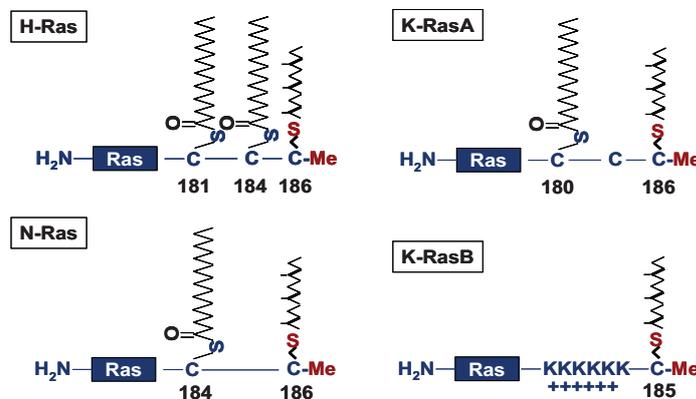
La secuencia CAAX prenilada es ahora sustrato del enzima Rce1, una endoproteasa que elimina los aminoácidos terminales -AAX (Boyartchuk, V. L. et al. 1997). Por último, la cisteína terminal prenilada es sustrato de una carboximetiltransferasa, la Icmt (isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase), que esterifica con un metil el carboxilo  $\alpha$  del la prenilcisteína (Clarke, S. et al. 1988) (Hrycyna, C. A. et al. 1991) (Dai, Q. et al. 1998). En la figura 10 se representa un esquema de estas reacciones.



**Figura 10.** Esquema del procesamiento de la secuencia CAAX. Encuadrados en negro, los enzimas que catalizan este procesamiento. El último paso, la metilación del extremo carboxi es reversible en condiciones fisiológicas, aunque no se ha identificado la esterasa capaz de hacerlo (Chelsky, D. et al. 1985)

En 1990, Hancock y colaboradores demostraron que el procesamiento de la secuencia CAAX si bien es necesaria, no es suficiente para la localización en la membrana plasmática de las proteínas Ras (Hancock, J. F. et al. 1990). Se necesita una segunda señal inmediatamente anterior en la secuencia al CAAX en el denominado dominio hipervariable. Para H, N y K-RasA esta segunda señal es la adición de un palmitoil en una cisteína anterior a la secuencia CAAX (en el caso del H-Ras son dos los grupos palmitoil que se adicionan). Para K-Ras la segunda señal es una secuencia polibásica rica en lisinas.

Estas segundas señales son las responsables de que, por un lado H, N y K-RasA y por otro, K-RasB, viajen de manera diferente hacia la membrana plasmática. Hasta que son metilados la ruta es la misma. Las proteínas son sintetizadas en el citosol en polisomas libres e inmediatamente después son farnesiladas. La adición de este grupo prenilo hace que las proteínas interaccionen con la cara externa de la membrana del retículo endoplasmático (RE) donde serán sustrato de la Rce1 y de la Icmt. A partir de aquí el camino hacia la membrana plasmática diverge. H, N y K-RasA pasan al Golgi donde serán sustrato de la palmitoiltransferasa, DHHC9/GCP16. Del Golgi viajarán a la membrana plasmática a través de vesículas. K-RasB en cambio, sigue una ruta desde el RE a la membrana plasmática aún desconocida.



**Figura 11. Representación de las modificaciones postraduccionales que reciben las cuatro isoformas**

A parte de este tráfico anterógrado, hacia la membrana, trabajos recientes apuntan hacia la existencia de un tráfico retrógrado de las proteínas Ras. Al contrario que el enlace tioéter de los grupos isoprenoides, el enlace tioéster del grupo palmitoil con la proteína es lábil. En condiciones fisiológicas se produce la hidrólisis de este enlace, aunque no esta claro si es o no vía enzimática (Smotrys, J. E. and Linder, M. E. 2004). Para las proteínas N-Ras y H-Ras se ha descubierto un ciclo de deacilación/reacilación del grupo palmitoil que regula la localización y actividad de estas isoformas de Ras (Rocks, O. et al. 2005). La despalmilación produce la liberación de estas proteínas de

la membrana plasmática y la internación hacia el Golgi, donde de nuevo será palmitoilado y reconducido a la membrana.

Trabajos también recientes muestran como el K-Ras puede sufrir también, de manera distinta, este transporte retrógrado que lo aparta de la membrana plasmática. Fivaz y Meyers muestran como el K-Ras puede desprenderse de la membrana plasmática de neuronas del hipocampo de rata, tras la estimulación con glutamato, siendo éste un proceso regulado por  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  (Fivaz, M. and Meyer, T. 2005). Otro grupo describió como CaM puede llegar a liberar a K-Ras de las membranas “in vitro” (Sidhu, R. S. et al. 2003). Un trabajo aún más reciente, de Philips MR, publicado durante la escritura de esta Tesis, describe como la fosforilación de la serina 181 por PKC, puede hacer que K-Ras se transloque de la membrana y se acumule en RE, Golgi y mitocondrias (Bivona, T. G. et al. 2006).

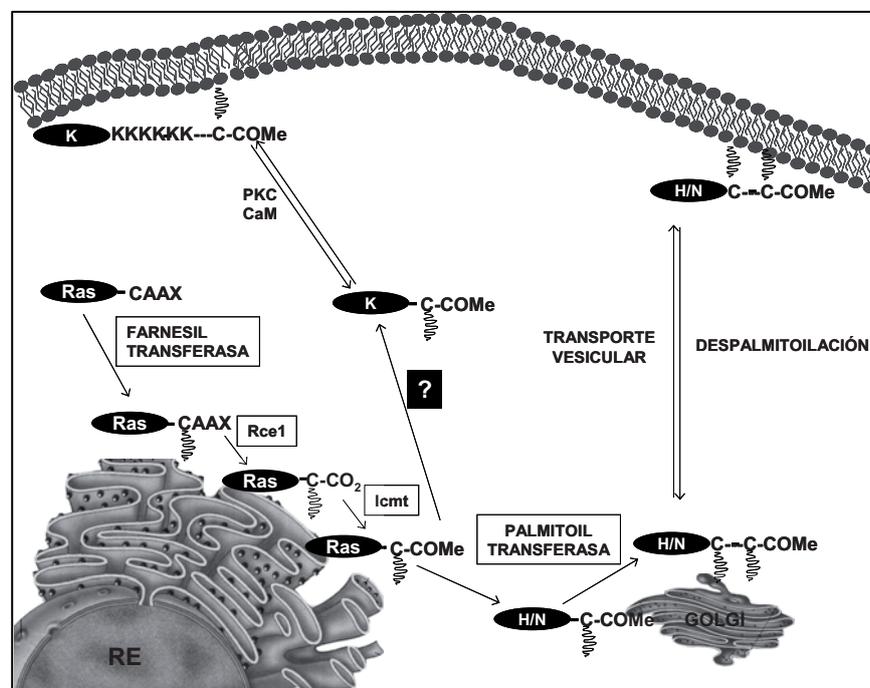


Figura 12. Esquema del transporte anterógrado y retrógrado de las isoformas Ras

### Localización de Ras

Uno de los aspectos más novedosos quizás, en la investigación de Ras en los últimos cinco años, ha sido en lo referente a su localización. Cuando se pensaba que Ras se localizaba exclusivamente en la membrana plasmática, diferentes trabajos demuestran que a parte de esta localización Ras puede encontrarse en endosomas, Golgi, RE y más sorprendentemente aún, en las mitocondrias. Además, la profundización en el

conocimiento de que la membrana plasmática no es una estructura uniforme, si no que es la suma de diferentes microdominios, también ha puesto en evidencia que las diferentes isoformas de Ras se localizan en diferentes microdominios de membrana y no sólo eso, además no lo hacen de manera rígida, si no que existe un dinamismo y una segregación de estos microdominios en determinadas condiciones.

- **Microlocalización de H-Ras, N-Ras y K-Ras en la membrana**

Dentro del dominio hipervariable de H-Ras, distinguimos la región “ancla” (del inglés “anchor region”), que comprende la cisteína farnesilada y las otras dos cisteínas palmitoiladas. Esta mínima región de H-Ras tiene capacidad de localizarse en la membrana plasmática y tiene afinidad por microdominios de membrana ricos en colesterol. Sin embargo, la interacción de esta región “ancla” con la membrana se ve modulada por la región adyacente “linker” del dominio hipervariable (166-180) y por el dominio G. El dominio G provee una fuerza repulsiva, la cual aumenta cuando la proteínas se carga de GTP, que se opone a la fuerza atrayente de la región “ancla”. Por el contrario, la región “linker” provee una fuerza atrayente, pero en este caso, por microdominios independientes de colesterol. El resultado neto de estas fuerzas es que, cuando la proteína se activa cargándose de GTP, se produce un movimiento de los microdominios ricos en colesterol hacia los microdominios independientes de colesterol. Por tanto H-Ras presenta una segregación lateral en la membrana plasmática que responde al ciclo GTP/GDP de la proteína (Rotblat, B. et al. 2004) (Prior, I. A. et al. 2001, Prior, I. A. et al. 2003) (Jaumot, M. et al. 2002).

Un trabajo reciente ayuda a entender como esta microlocalización de H-Ras está controlada. En este trabajo demuestran que la estequiometría de la palmitoilación y el espacio entre el grupo farnesil y palmitoil, influyen en esta segregación lateral (Roy, S. et al. 2005). La monopalmitoilación en la cisteína 184 es suficiente para la correcta segregación en el estado GTP desde los microdominios ricos en colesterol a los dominios sin colesterol. En cambio la monopalmitoilación de residuo 181 revierte esta segregación, encontrándose H-Ras-GTP en dominios ricos en colesterol y H-RasGDP en dominios sin.

También otras proteínas podrían jugar un papel en la regulación de la segregación lateral de H-Ras. El caso más conocido es el de galectina-1 (Paz, A. et al. 2001). Esta proteína se une a H-Ras por un mecanismo similar mediante el cual las proteínas Rho-GDI se unen a las proteínas Rho. Galectina-1 acoge en un bolsillo hidrofóbico el grupo farnesilo de H-Ras. Cuando H-Ras pasa a forma GTP, galectina-1 se le une y le ancla en estos microdominios independientes de colesterol, ayudándole, pues, a mantenerse activo. En

concordancia con esto, la expresión de galectina-1 estabiliza el Ras-GTP formado en respuesta a factores de crecimiento y, por el contrario, el “knock-down” de galectina-1 inhibe la transformación celular inducida por H-RasV12 (Paz, A. et al. 2001) (Elad-Sfadia, G. et al. 2002).

En cuanto a N-Ras, hasta ahora no se ha demostrado que el dominio G y la región “linker”, puedan jugar un papel similar al que desempeñan en el caso de H-Ras. Lo que si es sabido es que N-Ras padece también una segregación lateral cuando está cargado de GTP, pero la dirección es contraria a la del H-Ras. En este caso N-Ras en forma GDP reside en microdominios independientes de colesterol y cuando es activado se mueve a dominios ricos en colesterol. Recordemos que N-Ras está monopalmitoilado y que el mutante de H-Ras monopalmitoilado en el residuo 181 se comporta de la misma manera que N-Ras, por lo que parece que la posición del grupo acil respecto al grupo farnesil juega un papel en la segregación lateral.

K-Ras, debido a que su dominio de anclaje a la membrana está formado por una cisteína farnesilada y una secuencia de seis lisinas, se sitúa en dominios de membranas ricos en fosfolípidos aniónicos y libres de colesterol. Las cargas negativas de estos fosfolípidos (fosfoserina y PIP<sub>2</sub>) interactúan con la secuencia polibásica de las lisinas. Esta interacción depende de las cargas netas de la secuencia básica: el cambio de las lisinas por argininas (también básicas) no afecta a la interacción con la membrana, en cambio la sustitución por glutaminas (aminoácidos neutros) sí. Esto plantea si la introducción de una carga negativa, como una fosforilación, en la secuencia adyacente podría regular esta interacción a la membrana. Como hemos mencionado anteriormente parece ser que sí ya que el grupo de MR Philips demuestra en su último trabajo que la fosforilación de la serina 181 podría disminuir la interacción de K-Ras con la membrana plasmática. La farnesilación de K-Ras también debe jugar un papel importante en la microlocalización ya que, cuando K-Ras en vez de farnesilarse se geranilgeraniliza se encuentra en unas agrupaciones en la membrana diferentes.

En esta microlocalización de K-Ras, también podrían jugar un papel importante otras proteínas que hicieran de “scaffold”. En este sentido, similar al descrito para galectina-1 y H-Ras, galectina-3 puede jugar un papel. Galectina-3 es reclutada desde el citosol por Ras-GTP y parece ser que también alarga la señalización de éste, quizás reduciendo la eficiencia de p120GAP en hidrolizar el GTP de Ras (Elad-Sfadia, G. et al. 2004).

Cambios en el citoesqueleto de actina también podrían afectar a los microdominios de membrana de K-Ras. Los fosfolípidos aniónicos que componen estos microdominios son sensibles a estos cambios y como K-Ras se encuentra interaccionando con ellos podría ver afectada su difusión (Murase, K. et al. 2004) (Fujiwara, T. et al. 2002).

Hasta aquí hemos visto como Ras se localiza en endomembranas, RE y Golgi, como paradas en la ruta que siguen estas proteínas en su procesamiento y así correcta localización en la membrana plasmática. Pero Ras no se localiza solamente en estos compartimentos de forma pasajera si no que, existe una proporción de éste que reside en estos compartimentos, desde donde son capaces de señalar.

- **Ras en endosomas**

La primera evidencia de que la membrana plasmática no era, quizá, la única plataforma de señalización para la vía Ras/MAPK, llegó con el descubrimiento de complejos de transducción en los endosomas (Di Guglielmo, G. M. et al. 1994) (Baass, P. C. et al. 1995). Ya era sabido desde hacía tiempo que los receptores tirosina-quinasa, receptores acoplados a proteínas G y receptores de células T, estaban sujetos a endocitosis mediada por vesículas cubiertas de clatrina. Al principio este proceso era visto como el principal mecanismo de insensibilización de receptores. Los receptores internalizados eran dirigidos hacia lisosomas para ser degradados o de nuevo conducidos a la membrana plasmática para ser reutilizados.

El primer indicio de señalización en endosomas, vino del descubrimiento en este compartimento, por fraccionamiento subcelular, de Shc, Grb2, mSOS y fosfo-Raf-1, después de la estimulación de la célula con EGF o con insulina (Di Guglielmo, G. M. et al. 1994). Otro hecho que corroboraba lo anterior, es que las células deficientes en endocitosis mediada por clatrina también eran deficientes en la activación de Erk (Vieira, A. V. et al. 1996) (Kranenburg, O. et al. 1999).

Diferentes trabajos demostraron que el receptor de EGF estaba activo en estos endosomas (Stahl, P. D. and Barbieri, M. A. 2002) (Burke, P. et al. 2001) (Sorkin, A. et al. 2000) (Jiang, X. and Sorkin, A. 2002) (Wouters, F. S. and Bastiaens, P. I. 1999). Utilizando proteínas de fusión con GFP y tomando imágenes en células vivas, Ras también se localizó en endosomas (Choy, E. et al. 1999). Sorkin et al demostraron, con el RBD de Raf-1 fusionado a YFP, la existencia de Ras-GTP en endosomas (Jiang, X. and Sorkin, A. 2002). Hancock

et comprobaron que la señalización de H-Ras, pero no de K-Ras depende de su propia internalización por endocitosis (Roy, S. et al. 2002)

- **Ras en el Golgi.**

Un ensayo con el Ras binding domain de Raf-1 acoplado a GFP (GFP-RBD) puso en evidencia donde y cuando Ras se activaba. GFP-RBD expresado en una célula quiescente se distribuye por el citoplasma y nucleoplasma. Cuando una célula que expresa GFP-RBD se estimula con EGF, esta construcción se redistribuye rápidamente (3-10min) hacia la membrana plasmática. Pero a tiempos más tardíos (20-60min) el GFP-RBD se localiza principalmente en el Golgi. Este experimento indica que a tiempos cortos Ras se activa en la membrana plasmática y a tiempos largos Ras se activa en el Golgi y de forma más sostenida (Chiu, V. K. et al. 2002). Usando la misma herramienta, también se observó, que en células T Jurkat estimuladas por la activación de los receptores T, Ras se activaba exclusivamente en el Golgi y en 3 minutos de activación (Bivona, T. G. et al. 2003).

La descripción de endosomas que transportaban receptores tirosina-quinasa junto con proteínas acopladoras como Grb2 y SOS, daba una posible explicación a como se llegaba a activar Ras en el Golgi. Pero en seguida se vio que el bloqueo de la endocitosis no afectaba a la activación de Ras en este compartimento, por lo que el responsable de la propagación de la señal debía ser un mediador que difundiera hasta el Golgi de forma independiente al transporte vesicular. Esta hipótesis llevó al grupo de M. Philips (Chiu, V. K. et al. 2002) a centrar la atención en el  $Ca^{2+}$ . Tras quelar el  $Ca^{2+}$  o bloquear los canales de  $Ca^{2+}$ , observaron que la activación de Ras en la membrana plasmática no se afectaba, pero estos tratamientos si que inhibían por completo la activación de Ras en el Golgi. Como resultado de este trabajo se observó que la activación de Ras en el Golgi era mediada por PLC $\gamma$  (se activa por  $Ca^{2+}$ ) seguida de la activación del GEF RasGRP1 que depende de DAG y  $Ca^{2+}$ .

Este modelo de activación de Ras en el Golgi, supone la existencia de un “pool” de Ras que reside en este compartimento y que se activa por la vía PLC $\gamma$ /RasGRP1. Pero el descubrimiento del ciclo membrana plasmática /Golgi a consecuencia de un ciclo de palmitoilación/despalmitoilación de las proteínas H y N-Ras supone un nuevo mecanismo por el que se encuentra Ras-GTP en el Golgi (Rocks, O. et al. 2005). Según este modelo, Ras se activaría en la membrana y al despalmitoilarse viajaría en forma Ras-GTP activo hacia el Golgi. Un hecho que apoya esta hipótesis es que la inhibición del ciclo palmitoilación/despalmitoilación hace que disminuya la activación de Ras en el

Golgi. Pero otro hecho que lo cuestiona es que debería existir, entonces, un “pool” de Ras-GTP citosólico que todavía no se ha encontrado. Pero no hay que excluir una concomitancia de las dos vías, vía PLC $\gamma$ /RasGRP1 y vía despalmilación y, que ambas colaboren en la activación de Ras en el Golgi.

Lo explicado anteriormente se refería a las isoformas H y N-Ras. En cuanto a la presencia de K-Ras en el Golgi, muy recientemente se ha visto que en neuronas del hipocampo de rata estimuladas con glutamato, K-Ras se disocia de la membrana para acumularse en membranas intracelulares, entre ellas el Golgi, de forma dependiente a Ca<sup>2+</sup>/CaM (Fivaz, M. and Meyer, T. 2005).

- **Ras en el Retículo Endoplasmático (RE)**

También existen evidencias de que H y N-Ras se localicen en el RE, desde donde pueden activarse y señalizar. Este Ras podría ser un Ras en proceso de modificación postraduccional o un Ras maduro que después de localizarse en la membrana, se ha despalmilado y ha retornado al RE. Un Ras mutado en las cisteínas que se palmitan, expresado junto con el GFP-RBD, se activa acumulándose en el RE tras la estimulación de la célula (Chiu, V. K. et al. 2002). Los responsables de la activación de H-Ras en el RE serían los GEFs, RasGRF1 y RasGRF2 (Arozarena, I. et al. 2004), unos GEFs activables por Ca<sup>2+</sup> y receptores acoplados a proteínas G que se localizan tanto en membrana plasmática como en RE. Otra evidencia de la señalización de Ras en el RE, es el descubrimiento de un efector de Ras cuya localización se restringe a este compartimento. Este efector descrito en *Saccharomyces cerevisiae* es la proteína Eri1 (Sobering, A. K. et al. 2003)

- **Ras en la mitocondria.**

También componentes de la vía Ras/MAPK han sido localizados en la mitocondria. Rebollo et al, a través de fraccionamiento subcelular, encontró las tres isoformas de Ras en la fracción mitocondrial en una línea de células T de ratón dependientes de IL-2 (Rebollo, A. et al. 1999) y, estas tres proteínas co-inmunoprecipitaban con Bcl-2.

Un estudio aún más reciente del que ya hemos hablado anteriormente (Bivona, T. G. et al. 2006), muestra como K-Ras tras ser fosforilado por PKC, es translocado de la membrana plasmática hacia membranas internas, entre ellas las mitocondrias.

## II.3 Regulación de la activación/desactivación de Ras: GEFs y GAPs

### GEFs

El cambio del nucleótido GDP por GTP y la consiguiente activación de las proteínas Ras están mediados por los factores de intercambio de nucleótidos de guanina o GEFs. Estas proteínas comparten un mecanismo general de acción. El primer paso consiste en formar un complejo con la GTPasa unida a GDP muy estable. Tras la unión del GEF con la GTPasa, el nucleótido difosfato se disocia del complejo y el complejo restante, GEF y GTPasa libre de nucleótido es muy inestable. La elevada proporción GTP: GDP (10:1) que existe en la célula, hace que la GTPasa una rápidamente el nucleótido trifosfato. Al formarse Ras-GTP el GEF se disocia del complejo (ver figura).

De esta manera los GEFs cumplen con una doble función: por un lado desestabilizan la fuerte unión entre la GTPasa y el GDP y, por otro estabilizan la GTPasa cuando está libre de nucleótido.

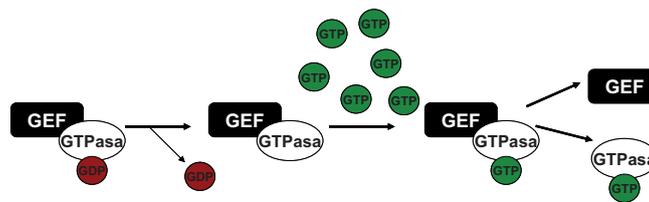


Figura 13. Esquema del intercambio GDP/GTP catalizado por GEF

El primer GEF identificado, Cdc25, fue descubierto en *S. cerevisiae* y tras él fueron descubiertas las proteínas homólogas, Ste6 en *S. pombe* y sos (son of sevenless) en *Drosophila*, tras las cuales fueron descritas las murinas y humanas. Hasta hoy, son muchas las proteínas que han ido engrosando la lista de GEFs, algunas de las cuales son específicas para unas GTPasas y otras son compartidas entre familias.

- **Sos**

Sos fue la primera proteína homóloga a Cdc25 identificada en organismos eucariotas superiores (Bonfini, L. et al. 1992) (Simon, M. A. et al. 1991). En mamíferos existen dos isoformas, Sos1 y Sos2, que comparten un 67% de homología entre sí.

Sos1 se expresa ubicuamente y parece ser el GEF que la célula más utiliza para activar a H, N y K-Ras. También se ha visto que puede activar a TC21/R-Ras2 ya M-Ras/R-Ras3. De acuerdo con su papel clave en señalización celular, los ratones “knock-out” de Sos1 mueren en la fase embrionaria. En cambio los

“knock-out” de Sos2 son viables (Esteban, L. M. et al. 2000) (Qian, X. et al. 1998).

Como todas las GEFs descritas para Ras, Sos presenta en la parte carboxilo terminal un dominio Cdc25, dominio catalítico homólogo a la proteína del mismo nombre. Este dominio Cdc25 está flanqueado por el extremo C-terminal por unas regiones ricas en prolina y, por el extremo N-terminal, por un dominio DH (homólogo a Dbl), seguido de un dominio PH (homólogo a pleckstrina). Por las regiones ricas en prolina Sos interacciona con los dominios SH3 de la proteína Grb2, proteína que, como se verá más adelante, se une a los receptores tirosina-quinasa activados, hecho que es clave para la transducción de la señal desde estos receptores activados, hasta Ras. El dominio DH, homólogo a Dbl (GEF de la familia Rho), tiene la misma función catalítica que el dominio Cdc25 para las proteínas Rho. Que Sos tenga este dominio DH sugiere un papel para este GEF en la activación de GTPasas de la familia Rho. De hecho, Sos1 ha sido descrito como un factor de intercambio de nucleótidos para Rac1 (Nimnual, A. S. et al. 1998). El dominio PH une fosfoinosítidos y es un dominio regulador del catalítico DH. En concreto, cuando el dominio PH une PIP<sub>2</sub> (sustrato de la PI3K) se produce una autoinhibición intramolecular por interacción de los dominios PH y DH de Sos. En cambio cuando PIP<sub>3</sub> (producto de la activación de la PI3K) se une al dominio PH, esta autoinhibición se rompe. Esta sería una forma de regular la actividad GEF de Sos sobre Rac1 (Das, B. et al. 2000).

Existe un estudio reciente muy interesante, en el que Bar-Sagi et al (Margarit, S. M. et al. 2003) postulan que el mismo Ras puede regular la actividad GEF de Sos1. Este grupo demuestra que Ras se puede unir a un centro alostérico distal al dominio Cdc25. La unión de Ras en forma GDP a este lugar provoca una baja actividad catalítica de Sos1. En cambio la unión en forma GTP provoca un aumento de esta actividad y un rápido intercambio del nucleótido del RasGDP que está unido al centro catalítico.

Existe un mecanismo de inactivación de Sos1 por fosforilación del mismo. En las regiones de unión a los dominios SH3 de Grb2, existen unos residuos fosforilables por MAPK. La fosforilación de estos residuos provoca la disociación del complejo Grb2/Sos, lo que supone un “feed-back” negativo de MAPK para inhibir la activación de Ras (Corbalan-Garcia, S. et al. 1996).

Sos2, pero no Sos1, se ubiquitina y se degrada vía proteasoma, presentando un tiempo de vida media menor (Nielsen, K. H. et al. 1997).

- **RasGRF1/RasGRF2**

Estos intercambiadores de nucleótidos, presentan un dominio catalítico Cdc 25, dos dominios PH y un dominio DH. También presenta en su extremo N-terminal un dominio IQ de unión a CaM, por lo que este intercambiador de nucleótidos ve modulada su actividad GEF por flujos de  $Ca^{2+}$  y su consiguiente interacción con CaM (Farnsworth, C. L. et al. 1995).

En mamíferos, RasGRF1 se expresa en gran cantidad en cerebro, aunque pequeñas cantidades se han encontrado expresadas en otros tejidos (Guerrero, C. et al. 1996). RasGRF2, aunque también se expresa en mayor cantidad en el sistema nervioso central, presenta un patrón de expresión más amplio.

RasGRF1 y RasGRF2 tienen una elevada afinidad por H-Ras “in vivo”, aunque podría activar también a K y N-Ras (hay contradicciones al respecto). Lo que se sabe es que RasGRF1 puede activar además a proteínas R-Ras y, que tanto RasGRF1 y 2 presentan actividad RacGEF. En este sentido RasGRF estaría conectado con la activación de GTPasas de la familia Rho, pero en sentido contrario también ya que se ha visto que la GTPasa Cdc42 puede regular la actividad de Ras mediante la translocación de RasGRF1 a la fracción particular (Arozarena, I. et al. 2000, Arozarena, I. et al. 2001). Este grupo también demostró que RasGRF es el intercambiador de nucleótidos responsable de la activación de H-Ras en el retículo endoplasmático (Arozarena, I. et al. 2004).

RasGRF se activa por la activación de receptores acoplados a proteínas G y por el aumento de los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular pero no por la activación de receptores tirosina-quinasa como en el caso de Sos (Fam, N. P. et al. 1997) (Mattingly, R. R. and Macara, I. G. 1996) (Shou, C. et al. 1995) (Zippel, R. et al. 1996).

- **RasGRP/CALDAG**

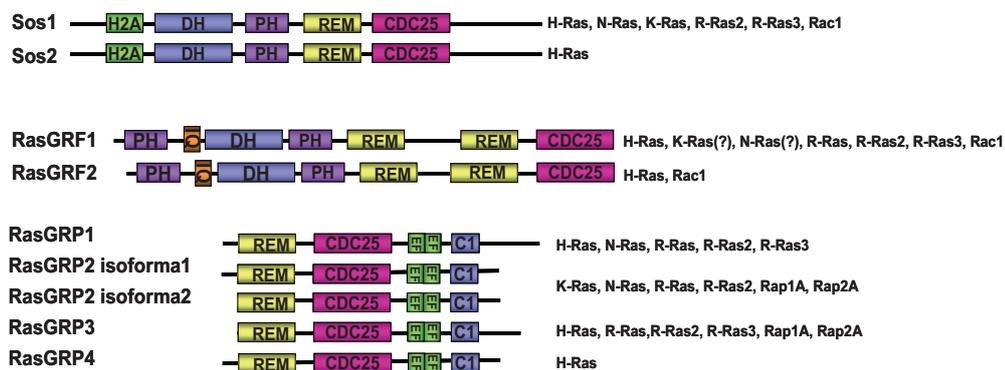
Estos factores intercambiadores de nucleótidos, se expresan en linfocitos y en el sistema nervioso central y, presentan unas características especiales que les diferencian de los otros GEFs. Estas proteínas a parte del dominio catalítico Cdc25, presentan dos dominios “EF-hand” de unión a  $Ca^{2+}$  y un dominio C1 de unión al diacilglicerol (DAG), muy similar al que presentan las PKCs clásicas y noveles. Este dominio C1 además de unir DAG puede unir ésteres de forbol. La unión del DAG al dominio C1 es el responsable del reclutamiento de la proteína a la membrana.

Cada isoforma de RasGRP tiene una afinidad diferente por unas GTPasas: RasGRP1 puede activar a H y N-Ras, a R-Ras1, 2 y 3; RasGRP2 puede activar a N y K-Ras, a R-Ras1 y 2, a Rap1A y 2A; RasGRP3 activa a H-Ras, R-Ras1, 2 y 3, Rap1A y 2B; RasGRP4 es la más específica y sólo activa a H-Ras.

La actividad y la especificidad hacia una GTPasa u otra son diferentes según el estímulo para cada isoforma RasGRP. Por ejemplo, el  $\text{Ca}^{2+}$  estimula la actividad RapGEF e inhibe la RasGEF de RasGRP2 (Clyde-Smith, J. et al. 2000), en cambio el  $\text{Ca}^{2+}$  estimula la actividad RasGEF de RasGRP1. Esta isoforma, al contrario que las otras, presenta una baja afinidad por el DAG y baja respuesta a éste.

RasGRP1 y 3 ven potenciada su actividad RasGEF por fosforilación por PKC, en cambio RasGRP4 no (Teixeira, C. et al. 2003).

Cabe destacar, que las isoformas RasGRP1 y RasGRP3, son los GEFs responsables de la activación de H y N-Ras en el Golgi (Bivona, T. G. et al. 2003).



- **SmgGDS**

SmgGDS aparentemente sólo actúa como GEF de aquellas GTPasas que contengan una región polibásica. En este sentido, aunque pueda interactuar con H y N, sólo cataliza el intercambio de nucleótido de K-Ras, así como también el de otras GTPasas con secuencia polibásica: RhoA, Rac1, Cdc42, Rap1A, Rap1B, RalA (Chuang, T. H. et al. 1994, Kikuchi, A. et al. 1992, Kotani, K. et al. 1992, Mizuno, T. et al. 1991, Orita, S. et al. 1993, Vikis, H. G. et al. 2002, Yaku, H. et al. 1994). Al parecer la secuencia polibásica estabiliza la unión entre SmgGDS y la GTPasa (se ha observado para Rac1 y K-RasB). La sustitución de estos aminoácidos básicos por glutaminas disminuye la estabilidad

del complejo produciendo un aumento del intercambio del nucleótido para Rac1 y K-RasB, al parecer debido a un mayor “turnover” del complejo SmgGDS/GTPasa (Lanning, C. C. et al. 2003).

SmgGDS es el único GEF conocido que pertenece a la familia de las proteínas armadillo. De la misma manera que estas proteínas, SmgGDS oscila entre el núcleo y el citoplasma. SmgGDS tiene una secuencia similar a las proteínas importina  $\alpha$  (Hatzfeld, M. 1999). Estas proteínas se asocian a otras proteínas con señales NLS (“nuclear localization signal”) y las importan al núcleo. Lo que se sugiere, es que como estas GTPasas con secuencias polibásicas contienen señales NLS, la asociación con el GEF SmgGDS provocaría la acumulación nuclear del complejo SmgGDS/GTPasa. Este modelo se ha demostrado para Rac1 (Lanning, C. C. et al. 2003). Esta GTPasa posee señales NLS funcionales en su secuencia polibásica. La activación de Rac1 provoca la acumulación de Rac1 y SmgGDS en células CHO. Las GTPasas sin estas señales NLS funcionales secuestrarían a SmgGDS en el citoplasma.

- **CNrasGEF**

CNrasGEF (“cyclic nucleotide RasGEF”) activa a Ras en respuesta a cAMP y cGMP (Pham, N. et al. 2000). CNrasGEF es también capaz de activar a Rap1 pero de manera independiente a cAMP. Este GEF ha sido el primero para el que se ha demostrado una interacción directa con receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas, como es el receptor  $\beta$ -adrenérgico, que llevaría a la activación de Ras tras la estimulación del receptor (Pak, Y. et al. 2002). CNrasGEF ha sido descrito como el GEF que activa Ras en respuesta a AMPc en células B16 de melanoma (Amsen, E. M. et al. 2006)

## **GAPs**

Las GAPs (“GTPase activating proteins”) son las proteínas encargadas de potenciar la actividad GTPasa intrínseca de Ras y, por tanto de desactivarlo. El genoma humano predice alrededor de 170 proteínas relacionadas estructuralmente con GAPs de la superfamilia Ras (Bernards, A. and Settleman, J. 2004). Esto implica que un 0.5% de los genes humanos codifican para estas proteínas, lo que indica la importancia de estos reguladores. Aunque las subfamilias Ras y Rho juntas supongan una tercera parte de las proteínas de la superfamilia Ras, estas dos subfamilias acaparan un 60% de todas las GAPs predichas. Que haya tantas GAPs para Ras y Rho se explica por diversos factores: algunas se restringen a un tipo celular (hay GAPs que sólo se expresan en neuronas), otras son específicas de GTPasa (hay GAPs específicas para cada miembro de la familia Rho) o regulan a cada GTPasa en un contexto específico en cuanto al

compartimento de membrana o el complejo de señalización (las GAPs además de su dominio catalítico presentan diferentes dominios de interacción con membranas o proteínas).

Dada la importancia de estos reguladores, no es de extrañar que ellos también se vean regulados a diferentes niveles: por interacción con otras proteínas, fosforilación, degradación o cambios en la localización subcelular (Bernards, A. and Settleman, J. 2004).

- **p120GAP**

p120GAP se descubrió tras observar que los niveles de Ras-GTP eran mucho más bajos que los que se predecían por la actividad GTPasa intrínseca del mismo Ras. Esto llevó a la identificación de esta proteínas de 120 kDa llamada p120GAP (Trahey, M. et al. 1988) (Vogel, U. S. et al. 1988). p120GAP tiene diferentes isoformas que se expresan ampliamente en diferentes tipos celulares y que catalizan la hidrólisis del GTP de las GTPasas Ras, R-Ras y Rab5.

Se compone de un dominio C-terminal catalítico y dos dominios N-terminal SH2 que flanquean un dominio SH3. Además p120GAP presenta un dominio PH y un dominio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  y a lípidos de membrana. También posee una región rica en prolinas en su extremo N-terminal, esencial para la interacción con miembros de la familia de quinasas Src.

Cuando se descubrió, p120GAP era la única proteína conocida que interaccionara con el dominio efector de Ras, cosa que llevó a pensar que pudiera ser, además de un inhibidor de la actividad Ras, un efector. Pero el descubrimiento de otras proteínas con dominio de unión a Ras, desplazó esta idea. Aunque no se puede descartar del todo ese concepto de efector porque hay hechos que como mínimo apoyan la idea de que p120GAP sea más que un inhibidor (Tocque, B. et al. 1997). Este concepto viene apoyado por el hecho de que las formas oncogénicas de Ras, RasV12 y RasV13, a pesar de no hidrolizar el GTP, interaccionan con la GAP, aún con más afinidad que las formas “wild-type”. Además se han descrito proteínas que se unen al extremo N-terminal de GAP.

p120GAP se une por sus dominios SH2 a los receptores tirosina-quinasa PDGF y EGF, cuando estos han sido activados (Cooper, J. A. and Kashishian, A. 1993) (Kazlauskas, A. et al. 1990) (Soler, C. et al. 1994). Por su extremo amino también p120GAP se une a la proteína p62<sup>DOK</sup>. DOK se une a la p120GAP

cuando se ha fosforilado en el extremo carboxi e, inhibe la actividad GAP de ésta, por lo que esta interacción activa Ras (Kashige, N. et al. 2000). Pero por estudios posteriores, su papel en el control del crecimiento no está claro (Yamanashi, Y. et al. 2000). Anexina VI, una proteína de unión a la membrana plasmática en respuesta a  $\text{Ca}^{2+}$ , también es una proteína de unión a p120GAP. En respuesta a diferentes estímulos, esta proteína recluta en la membrana plasmática a p120GAP para regular la actividad Ras (Grewal, T. et al. 2005).

Otra proteína que se identificó como una proteína de 190kDa que inmunoprecipitaba con la p120GAP en células que expresaban tirosina-quinazas activas, fue la p190RhoGAP (Ellis, C. et al. 1990) (Moran, M. F. et al. 1991). Esta proteína es una GAP de RhoA y de otros miembros de la familia Rho (Settleman, J. et al. 1992b) (Settleman, J. et al. 1992a) (Ridley, A. J. et al. 1993). La existencia de estos complejos p120GAP-p190RhoGAP sugiere una coordinación para desactivar Ras y Rho. Estos complejos actuarían junto con quinazas Src para regular cambios morfológicos. En un estudio en fibroblastos embrionarios de pollo se vio que la actividad Src era necesaria para la fosforilación en tirosinas de p190RhoGAP y unión a p120GAP, para la actividad p120GAP asociada a p190RhoGAP y para la desestructuración de las fibras de estrés (Fincham, V. J. et al. 1999).

Un descubrimiento reciente apoya la idea de que p120GAP pueda ser más que un mero inhibidor de la actividad Ras. En este sentido, se ha visto que un fragmento N-terminal de p120GAP generado por la acción de las caspasas, tiene un efecto antiapoptótico que promueve la supervivencia celular después de unas condiciones de estrés suaves (Yang, J. Y. et al. 2004).

- **NF1**

La neurofibromatosis tipo 1 es una enfermedad caracterizada por múltiples lesiones pigmentadas en la piel y una elevada propensión a desarrollar tumores benignos llamados neurofibromas que puede afectar a diferentes tipos celulares. Estos enfermos también están predispuestos a padecer unos tipos de cáncer específicos como neurofibrosarcomas, astrocitomas, feocromocitomas y leucemia mielomonocítica juvenil. El gen *NF1*, cuyo defecto provocaba la enfermedad, fue aislado en 1990 y su producto fue llamado neurofibromina. Un fragmento de esta proteína en seguida se vio que guardaba homología con las GAPs de levadura, Ira1 e Ira2, y con la GAP humana p120GAP. Al parecer la gran mayoría de las mutaciones que afectan al gen *NF1* provocan una proteína truncada que ve comprometida su actividad GAP. Muchos tumores deficientes

en NF1 presentan niveles elevados de Ras-GTP, en correlación al papel de esta proteína como regulador negativo de Ras.

La proteína NF1 se expresa de forma ubicua pero preferentemente en el sistema nervioso. A pesar de esta expresión preferencial, p120GAP y NF1 se encuentran coexpresadas en una gran variedad de tejidos, sugiriendo que estas GAPs puedan tener distintas funciones. De estudios cinéticos con estos dos enzimas (Wiesmuller, L. and Wittinghofer, A. 1992) (Bollag, G. and McCormick, F. 1991a) se desprende la idea de que NF1 es una GAP más eficiente a concentraciones bajas de Ras-GTP y, en cambio, la actividad de p120RasGAP predominaría a elevados niveles de Ras-GTP. Así pues, NF1 se encargaría mantener unos niveles bajos de Ras-GTP mientras que p120RasGAP regularía los niveles de Ras-GTP tras la activación por factores de crecimiento. Estudios en MEFs *GAP*<sup>-/-</sup> apoyan esta idea (van der, Geer P. et al. 1997): los niveles de Ras-GTP en los lisados, tras la estimulación con PDGF, eran dos veces mayores que en los lisados de células WT. En cambio la falta de GAP no afecta casi nada a los niveles basales de Ras-GTP. Por el contrario, los mutantes *NF1*<sup>-/-</sup> presentan elevados niveles basales de Ras-GTP y no se afectan tras la estimulación con PDGF.

- **CAPRI**

Esta proteína es miembro de la familia GAP1, que incluye otras proteínas como GAP1<sup>IP4BP</sup>, GAP1<sup>m</sup> y RASAL. Tiene una expresión ubicua. CAPRI (“Ca<sup>2+</sup>-promoted Ras inactivator”) presenta dos dominios C2 de unión a Ca<sup>2+</sup>, un dominio GRD (“GAP related domain”) y un dominio PH.

En células sin estimular, CAPRI es citosólica y no tiene actividad RasGAP. En cambio después del tratamiento de las células con agonistas que producen un aumento del Ca<sup>2+</sup> intracelular, CAPRI se transloca rápidamente a la membrana plasmática y allí si que presenta actividad RasGAP. CAPRI se une a los fosfolípidos de membrana de forma dependiente a Ca<sup>2+</sup> por sus dominios C2 (Lockyer, P. J. et al. 2001)

- **p135SynGAP**

p135SynGAP es otra GAP que está regulada por Ca<sup>2+</sup>, pero en este caso, negativamente. Contiene un dominio C2. Esta RasGAP abunda en el cerebro donde se localiza exclusivamente en las sinapsis de neuronas del hipocampo formando un complejo con los receptores NMDA. p135SynGAP se fosforila en respuesta a un aumento de Ca<sup>2+</sup> por la CaMKII. Esta fosforilación de SynGAP

reduce su capacidad de estimular la actividad GTPasa de Ras. Esto sugiere un modelo en el que el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  por la activación de los receptores NMDA, activa la vía Ras/MAPK por inhibición de la actividad SynGAP (Chen, H. J. et al. 1998).

## II.4 Mecanismos de activación de Ras

### Activación de Ras por receptores tirosina-quinasas.

Este es el mecanismo de activación de Ras mejor conocido y más ampliamente descrito. La familia de receptores tirosina-quinasas es amplia e incluye receptores para factores de crecimiento, citoquinas y hormonas.

Cuando el ligando se une al dominio extracelular del receptor, se produce la dimerización de éste. Esta dimerización del receptor produce un cambio conformacional del dominio intracelular, hecho que produce la activación de la actividad tirosina-quinasa del dominio quinasa que se encuentra en esta región. Esta actividad quinasa resulta en la fosforilación de muchos residuos tirosina del fragmento citoplasmático del receptor. Los receptores de citoquinas presentan una variación de este fenómeno ya que el receptor no es una tirosina-quinasa en si mismo, pero su activación conduce a la asociación y activación de JAK, una quinasa que fosforilará residuos tirosina tanto de ella misma como del receptor, produciéndose así lugares de interacción con proteínas adaptadoras.

Las tirosinas fosforiladas del receptor, sirven como lugares de unión para proteínas con dominios SH2 o dominios PTB (“PhosphoTyrosine-Binding”). Los aminoácidos más cercanos a cada fosfotirosina confieren el microambiente que permite la especificidad de unión a diferentes proteínas. Entre las proteínas que se unen a las fosfotirosinas se encuentra Grb2, que normalmente se encuentra en el citosol unida por su dominio SH3 a la región rica en prolinas de Sos. La fosforilación de los receptores es la señal que induce la translocación del complejo Grb2/Sos a la membrana plasmática, donde Sos catalizará el intercambio de nucleótidos de Ras conduciendo a su activación (Buday, L. and Downward, J. 1993)

Existen variaciones que incluyen la participación de adaptadores adicionales en algunos receptores. En muchos casos la unión del complejo Grb2/Sos al receptor no se produce directamente, si no que lo hace a través de la proteína adaptadora Shc. En estos casos, el dominio SH2 de Grb2 se une a las fosfotirosinas de Shc, que a su vez se une a las fosfotirosinas del receptor por su dominio PTB. Shc puede ser fosforilada por los receptores y por tirosinas-quinasas citoplasmáticas de la familia Src. En el caso del receptor de la insulina, la fosforilación de la proteína IRS-1 (“Insulin Receptor Substrate

1”) por el receptor, genera las fosfotirosinas que serán reconocidas por el complejo Grb2/Sos.

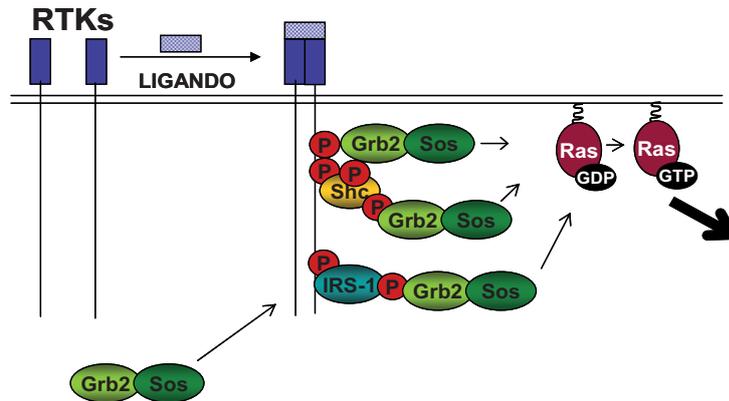


Figura 14. Esquema de la activación de Ras por receptores tirosina-quinasa

### Activación de Ras por el receptor de células T (TCR)

Una característica de la activación de Ras por el receptor de células T, es el gran porcentaje de Ras activado que se consigue, entre un 40-50% del Ras total. Una activación de esta magnitud no sería posible sin una inhibición de la actividad GTPasa de Ras. Respecto a esto, los primeros trabajos sobre la regulación de Ras en linfocitos apuntaban a que esa gran cantidad de Ras-GTP que se formaba, en respuesta a la activación del receptor, iba acompañada por la inhibición de la actividad GTPasa de Ras y supresión de las funciones de las RasGAPs, permitiéndose así una mayor acumulación de Ras-GTP. La relación entre la activación del receptor de células T y la inactivación de las GAPs sigue sin esclarecerse

Lo que si está claro, son los dos GEFs que pueden activar a Ras en los linfocitos T: Sos y RasGRP1. Un hecho clave para la translocación de Sos a la membrana y consiguiente activación de Ras, es la fosforilación de la proteína adaptadora LAT (“linker for activation in T-cells”) tras la estimulación del TCR (Sommers, C. L. et al. 2004). LAT fosforilada en tirosinas por las quinasas acopladas al receptor, ZAP70 y Syk, sirve para captar y unir diferentes proteínas con dominios SH2 como Grb2, PLC $\gamma$ 1 y Gads-SLP-76. La unión y activación de la PLC $\gamma$ 1 provoca la formación de los segundos mensajeros diacilglicerol (DAG) e inositoles 1, 4,5-trifosfatos (IP3). La translocación del complejo Grb2/Sos a la membrana plasmática, así como la expresión del dominio catalítico de Sos en la membrana, son suficientes para activar Ras. A pesar de esto DAG parecía jugar un papel importante en la activación de Ras. Tras la estimulación del TCR en células deficientes en SLP76, no se producía la activación de PLC ni de Ras, a pesar de que tanto PLC y Grb2/Sos si que se localizaban en la membrana. Los análogos sintéticos del DAG, como el TPA, producían la activación de Ras en los linfocitos.

Con el descubrimiento del GEF RasGRP1, el papel del DAG en la activación de Ras queda explicado. La activación del TCR activa a la PLC $\gamma$ 1 que genera IP3 y DAG y, éste DAG activa a RasGRP1 que estimulará la formación de Ras-GTP (Genot, E. and Cantrell, D. A. 2000)

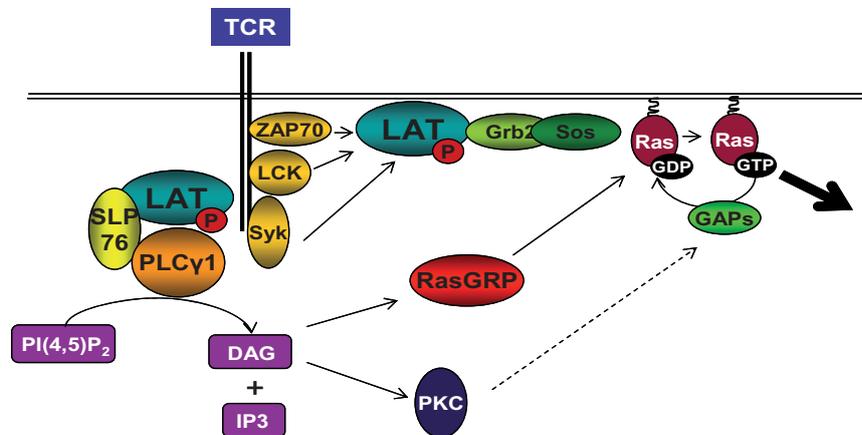


Figura 15. Esquema de la activación de Ras por el receptor de células T (TCR)

### Activación de Ras por receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas

Los receptores de membrana acoplados a proteínas G heterotriméricas, GPCRs (“G-protein-coupled receptors”), representan con diferencia el grupo más numerosos de receptores de membrana en las células de mamífero, con más de 1000 miembros. Dada su estructura con siete dominios  $\alpha$ -hélice transmembrana, estos receptores también son conocidos como receptores heptahelicales o “serpentine receptors”. Estos receptores participan en la transmisión de señales biológicamente muy diversas, en respuesta a agonistas que incluyen factores de crecimiento, hormonas, neurotransmisores, entre otros. De hecho se calcula que son la diana de actuación de aproximadamente el 60% de las drogas y principios activos conocidos. La unión del ligando provoca un cambio conformacionales en los dominios intracelulares del receptor que resulta en la asociación a proteínas G heterotriméricas. Estas proteínas G están constituidas por la subunidad  $G_\alpha$  y la subunidad  $\beta\gamma$  (dímero). Se conoce unas 20 subunidades  $\alpha$  diferentes agrupadas en cuatro familias ( $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_q$  y  $G_{12}$ ), mientras que se han descrito 12 subunidades  $\gamma$  y 6 subunidades  $\beta$ . La unión del agonista al receptor provoca el intercambio de GDP por GTP en la subunidad  $G_\alpha$  resultando en su activación y disociación de la subunidad  $\beta\gamma$ . Tanto la subunidad  $G_\alpha$  como la subunidad  $\beta\gamma$  participan en la señalización mediante la activación de múltiples proteínas efectoras (Gutkind, J. S. 1998) (Marinissen, M. J. and Gutkind, J. S. 2001)

Son varios los mecanismos por los cuales los receptores acoplados a proteínas G activan a Ras y, aquí detallaremos unos generalizados. Por un lado la subunidad  $\beta\gamma$  activa a las tirosina-quinasas citoplasmáticas de la familia Src. La activación de la quinasa Src conduce a la fosforilación de la proteína adaptadora Shc y a la consiguiente unión y activación del complejo Grb2/Sos. Src también podría intervenir a la asociación del complejo Grb2/Sos a la membrana plasmática fosforilando directamente residuos tirosina de los receptores tirosina-quinasa. Por otro lado, las subunidades  $\beta\gamma$  y  $\alpha$  activan a la PLC que provocara un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Este  $\text{Ca}^{2+}$  activa a una quinasa citosólica, Pyk2, que depende de  $\text{Ca}^{2+}$  y PKC, que se asocia con Grb2/Sos y que también puede activar a la quinasa Src. Este aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  provocado por la PLC, proporciona otro mecanismo de activación de Ras, activando los GEFs RasGRF.

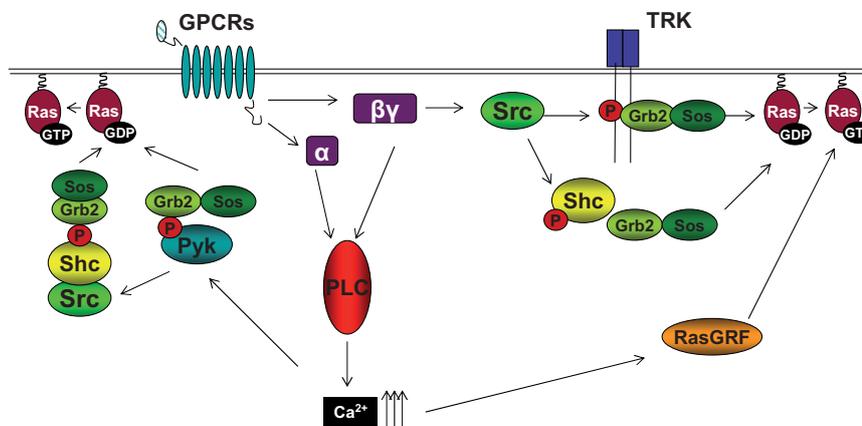


Figura16. Esquema de la activación de Ras por receptores acoplados a proteínas G

## II.5 Efectores de Ras

Un efector de Ras, se define como una proteína con una fuerte unión y, preferente, a la forma GTP de Ras y cuya interacción es alterada por mutaciones en el dominio efector. Pero la unión no es un hecho suficiente para considerar una proteína efectora de Ras. Además, la función de la proteína efectora se debe ver modulada por la interacción con Ras, ya sea por cambios en la localización subcelular (reclutamiento a la membrana plasmática), en la actividad catalítica intrínseca o por interacción con otros componentes de señalización. Por otro lado, las actividades biológicas de Ras dependen y son mediadas por este efector.

La primera proteína de unión a Ras-GTP en descubrirse fue la p120GAP. Como ya hemos visto anteriormente, esta proteína es un regulador negativo de la actividad Ras pero, por su asociación a otras proteínas implicadas en señalización, se considera como

un posible efector de Ras. La primera proteína en la que la interacción con Ras se asoció con una regulación “in vivo” fue la adenilato ciclasa en *S. cerevisiae*. Esta proteína no se regula por Ras en mamíferos.

Los tres efectores clásicos de Ras son las quinasas Raf (el primero en descubrirse en mamíferos) y PI3K y, el GEF RalGDS. Otros efectores descritos menos conocidos y estudiados son: Tiam1, PLC $\epsilon$ , Rin, Nore y AF6. Los efectores presentan un “Ras binding domain” (RBD), que no es igual en todos ellos pero, en base a unas similitudes se podrían agrupar en tres tipos: el RBD de Raf (también en Tiam1), el RBD encontrado en la PI3K y el dominio RA (Ras association) primero definido en RalGDS y AF6 y, luego en los otros efectores, Rin, PLC $\epsilon$ , Nore (Wohlgemuth, S. et al. 2005).

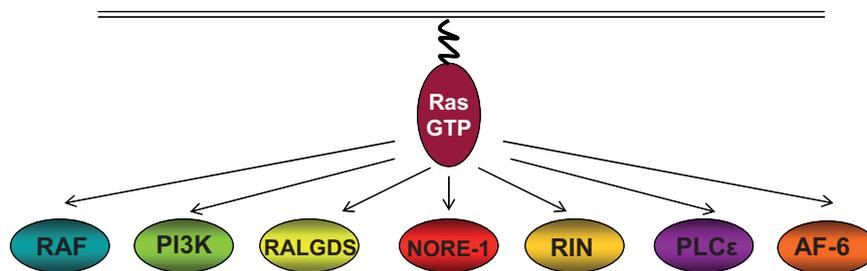


Figura 17. Esquema de los efectores de Ras

## Raf

Existen tres isoformas de esta serina/treonina-quinasa: Raf-1, A-Raf, B-Raf. Los primeros estudios establecieron que c-Raf (72-74kDa) tenía una expresión ubicua y que A-Raf (68kDa) y B-Raf (75-100kDa) tenían una expresión mucho más restrictiva, expresándose preferentemente A-Raf en órganos urogenitales y B-Raf en tejidos neuronales. Estudios posteriores han mostrado que A-Raf es bastante ubicua y que B-Raf también se expresa en un amplio rango de tejidos, aunque en muchos de ellos a unos niveles muy bajos.

En cuanto a la estructura, las tres isoformas presentan tres regiones muy conservadas llamadas, CR1, CR2 y CR3 (“Conserved Region” 1, 2, 3). La mitad N-terminal, que incluye los dominios CR1 y CR2, tiene función reguladora. La mitad C-terminal es casi en su totalidad el dominio catalítico quinasa y, se solapa con la región CR3. La delección de la parte reguladora N-terminal resulta en la activación constitutiva de Raf, mostrando así la función autoinhibidora de esta región (Hagemann, C. and Rapp, U. R. 1999). La unión de Ras-GTP se produce por esta parte N-terminal

por el llamado “Ras binding domain” (RBD, residuos 51-131) y es esencial para la translocación de Raf a la membrana plasmática (Vojtek, A. B. et al. 1993) (Warne, P. H. et al. 1993). Esta translocación es el papel que juega Ras en la activación de Raf (Levais, S. J. et al. 1994) (Marais, R. et al. 1995). Ras también puede unirse a otra región N-terminal llamada CRD (“Cysteine-Rich Domain”, residuos 139-184). La interacción con este dominio no es indispensable para la translocación de Raf a la membrana pero sí para su completa activación. La activación de Raf es un fenómeno muy complejo en el que la translocación por unión a Ras es el primer paso de una secuencia en la que intervienen diferentes proteínas.

La capacidad de Raf para unir Ras está regulada por proteínas 14-3-3. Estas proteínas se unen al dominio CR2 de Raf cuando la serina 259 está fosforilada y, esta interacción interfiere con la unión a Ras. El desplazamiento de la 14-3-3 tiene lugar cuando la serina 259 es defosforilada por la fosfatasa PP2A.

La regulación de Raf por fosforilación es un tema complejo y, en muchas ocasiones controvertido, ya que existen estudios opuestos sobre el efecto de alguna quinasa sobre Raf. En la figura 18 se detalla sobre la secuencia de Raf, los residuos implicados en su activación e inactivación. Como fosforilaciones activadoras se reconocen las de la S621, S338, Y341, T491 y S494. La fosforilación de la S621 provoca la unión de la proteína 14-3-3 al extremo C-terminal y esta unión ayuda a estabilizar la interacción Ras-Raf (Jaumot, M. and Hancock, J. F. 2001) (Yip-Schneider, M. T. et al. 2000) (Tzivion, G. et al. 1998). Las fosforilaciones en los residuos S338 y Y341, en el extremo N-terminal de la región CR3, también son claves para la actividad Raf. Las quinasas de la familia Src parecen ser las responsables tanto “in vitro” como “in vivo” de la fosforilación de Y341. Se ha propuesto que la fosforilación en esta región, revierte la acción inhibitoria del extremo N-terminal sobre el dominio catalítico de Raf (Tran, N. H. and Frost, J. A. 2003). Aunque la gran mayoría de los estudios sugieren una absoluta necesidad de la fosforilación en el residuo S338 para la actividad de Raf, estudios recientes demuestran que esta fosforilación no es requerida para la activación de Raf por proteínas G heterotriméricas (Oehrl, W. et al. 2003). También hay estudios contradictorios en cuanto a la quinasa que lleva a cabo la fosforilación de este residuo. Se ha propuesto a las quinasas PAK1 y PAK2 como responsables pero, hay estudios que se oponen. Finalmente, la fosforilación de los residuos T491 y S494 en el dominio quinasa también son imprescindibles para la activación de Raf pero, las quinasas responsables no han sido identificadas aún (Chong, H. et al. 2001).

Como fosforilaciones inhibitorias de la actividad Raf, hemos mencionado anteriormente la del residuo 259. También se han descrito fosforilaciones sobre los

residuos S43, S233. Se ha propuesto que la en fosforilación de estos dos residuos, junto con la del residuo 259, podría ser responsable la quinasa dependiente de AMPc o PKA (Dumaz, N. et al. 2002).

Además de las fosforilaciones, las proteínas “scaffold” juegan un importante papel en la regulación de C-Raf. Estas proteínas estabilizan y coordinan las interacciones entre componentes de una vía de señalización, haciendo que aumente la eficiencia de la señal y manteniendo la especificidad, restringiendo posibles interacciones entre componentes similares (Morrison, D. K. 2001, Morrison, D. K. and Davis, R. J. 2003) (Pouyssegur, J. et al. 2002). Se han descrito diferentes “scaffold” que mantienen la eficiencia de señalización entre C-Raf y MEK: KSR (“kinase supresor of Ras”), CNK (“connector enhancer of KSR”) y SUR8 (supresor of Ras). KSR presenta MEK a C-Raf en la membrana plasmática y luego recluta a ERK para que MEK la fosforile. CNK se une a C-Raf y coopera con Ras en la activación de Raf. SUR8 forma un complejo ternario con C-Raf y Ras, potenciando la señal.

Todos estos estudios de regulación se han llevado a cabo con la isoforma C-Raf o Raf-1. Pero irónicamente, hasta hace poco no se ha sabido que la isoforma implicada en cáncer es la B-Raf. Históricamente, las proteínas Raf se consideraban importantes en cáncer por su papel como efectores de Ras. La sorpresa vino cuando se descubrió la presencia de mutaciones de B-Raf en tumores humanos, con una frecuencia bastante elevada en alguno de ellos. Se sabe que, un 30-60% de los melanomas, entre un 30-50% de los cánceres de tiroides, entre un 5-20% de cáncer colon-rectal, un 30% de cánceres de ovario, tienen mutaciones en B-Raf. Se han descrito unas 45 mutaciones en B-Raf, pero la mutación por glutámico de la valina 599, aparece en un 90% de los tumores humanos en los que se ha encontrado B-Raf mutado (Wellbrock, C. et al. 2004)

La cascada de quinasas MEK-ERK es la vía mejor caracterizada por debajo de Raf. Aunque otras proteínas se han ido describiendo como posibles sustratos de c-Raf (inhibidor de NF- $\kappa$ B, la proteína antiapoptótica BAG1) MEK sigue siendo el único sustrato de Raf reconocido y aceptado. B-Raf es la isoforma que mejor y más eficientemente activa a MEK en las células (Catling, A. D. et al. 1994) (Jaiswal, R. K. et al. 1994).

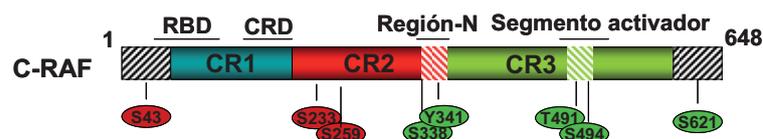


Figura 18. Esquema de la estructura de Raf-1 y de sus principales fosforilaciones

## PI3K

La fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) es el segundo efector de Ras mejor conocido y, tiene un importante papel mediando supervivencia y proliferación.

Este enzima cataliza la fosforilación del hidroxilo 3' de los fosfatidilinositoles (4,5)-bifosfato, convirtiéndolos en fosfatidilinositoles (3, 4,5)-trifosfato (PIP<sub>3</sub>). Estos productos actúan como mensajeros secundarios, favoreciendo la activación de muchas proteínas ya sea participando en su translocación a la membrana plasmática, induciendo cambios conformacionales o bien, regulando su interacción con otras proteínas. De las tres clases (I, II, III) de PI3Ks, nos centraremos en la clase I por ser ésta la más implicada en proliferación y estar sujeta a la regulación por receptores tirosina-quinasa (clase I<sub>A</sub>) y por GCPRs (clase I<sub>B</sub>).

Los miembros de la clase I<sub>A</sub> de PI3K están constituidos por dos subunidades: la subunidad catalítica p110 (de 110 kDa) y una subunidad reguladora p85 (de 85kDa). Esta última subunidad presenta dos dominios SH<sub>2</sub> de interacción con fosfotirosinas de diferentes receptores tirosina-quinasa, así como de quinasas citosólicas o proteínas adaptadoras. La activación de los receptores provoca la translocación de la PI3K a la membrana plasmática, su activación y, en consecuencia, el incremento de fosfatidilinositoles fosforilados en posición 3' (Vanhaesebroeck, B. and Waterfield, M. D. 1999). La PI3K se une a Ras-GTP mediante la subunidad catalítica, p110, provocándole un cambio conformacional que resulta en el incremento de la actividad quinasa del enzima. La unión se produce directamente "in vitro" entre p110 y Ras-GTP. La expresión del dominante negativo de Ras, RasN17, bloquea en gran parte la acumulación de PIP<sub>3</sub> en respuesta a NGF en células PC12, mientras que la coexpresión de RasV12 y PI3K incrementa mucho la presencia de estos productos (Rodríguez-Viciano, P. et al. 1994).

Después de la activación de PI3K y de la acumulación de sus productos en la membrana, se produce la translocación a la membrana plasmática de proteínas que presentan dominios de homología a pleckstrina, PH. Entre las proteínas que presentan estos dominios, hay dos de gran importancia para la transmisión de la señal generada por PI3K: PDK1 ("3'-Phosphoinositide Dependent Kinase-1") y la PKB/Akt.

PDK1 es una serina/treonina-quinasa que se une con mucha afinidad por su dominio PH, a los productos de la PI3K. La unión a los PIP<sub>3</sub> aumenta su presencia en la membrana plasmática y permite su interacción con las proteínas diana. Parece ser que esta interacción con sus sustratos es necesaria para la activación máxima de PDK1. La PDK1 cataliza la fosforilación en el "loop" de activación de una extensa familia de quinasas, llamada genéricamente familia de las "AGC quinasas". Esta familia incluye a

PKA, PKG, PKC y a PKB/Akt. Por lo tanto PDK1 tiene un papel esencial en la activación de múltiples quinasas con funciones biológicas muy diversas (Toker, A. and Newton, A. C. 2000).

Pero el papel más conocido de PDK1 es el de activador de la PKB, el efector estrella de la PI3K. Esta serina/treonina-quinasa se activa en respuesta a factores mitogénicos de forma dependiente a PI3K. Presenta un dominio PH en su parte N-terminal, pero de menor afinidad que el de la PDK1. Su activación comporta la fosforilación en su “loop” de activación de la treonina 308, catalizada por PDK1 y en la serina 473 del motivo hidrofóbico en la parte C-terminal. La quinasa responsable de la fosforilación del residuo 473 ha sido sujeto de una intensa búsqueda, pero todavía está por determinar. Una vez PKB está fosforilada en estos dos residuos es activa y transloca a la membrana donde fosforilará a sus sustratos. Entre la lista de sustratos de PKB, hay proteínas implicadas en el metabolismo de la glucosa (GSK-3, GLUT-4), en la traducción de proteínas (eIF2, 4EBP-1, mTOR), en transcripción (proteínas “forkhead”, FH), la proliferación celular (p21) y en supervivencia celular (BAD, caspasa 9, IκB) entre otras (Vanhaesebroeck, B. and Alessi, D. R. 2000)

PTEN es la fosfatasa que cataliza la reacción opuesta a la de PI3K: hidroliza el fosfato en posición 3' de los fosfatidilinositoles. Esta fosfatasa es el desregulador principal de la vía de señalización iniciada por la PI3K. PTEN es un supresor de tumores, cuya delección o mutación han sido descritas en diversos tumores humanos (Cully, M. et al. 2006)

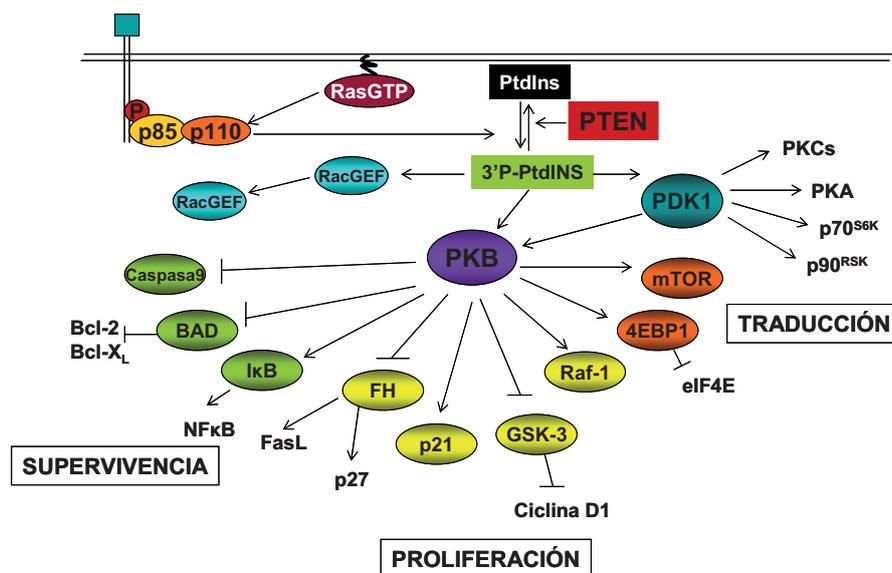


Figura 19. Esquema de la vía PI3K

## **RalGEFs**

De los RalGEFs hemos hablado en un apartado anterior, cuando nos referíamos a las funciones biológicas de la familia de GTPasas Ral. No comentamos nada sobre las funciones de los RalGEFs como efectores de Ras y sus implicaciones en proliferación celular y cáncer. De estos efectos hablaremos en este punto.

Los primeros estudios de transformación en fibroblastos murinos NIH3T3, mostraron que, al contrario del otro efector Raf, los mutantes constitutivamente activos de RalGEF o de sus sustratos (RalA o RalB) no producían ningún cambio morfológico ni transformación “in vitro” (Wolthuis, R. M. et al. 1997) por sí solos. En cambio, la transfección de un mutante RalA constitutivamente activo potencia la transformación inducida por Ras y por otro lado, un dominante negativo de RalA la reduce (Urano, T. et al. 1996).

También se vio como la coexpresión de RalGDS y Raf produce un sinergismo en la formación de focos (White, M. A. et al. 1996). Pero la sola expresión de un RalGEF constitutivamente activo no produce ningún efecto morfológico ni de crecimiento en suspensión en fibroblastos murinos ni células epiteliales de rata. Por lo tanto, si bien RalGEF parecía contribuir a la transformación inducida por Ras, su papel parecía menor. Un estudio posterior demostró que la expresión de RalGEF activo solamente, era capaz de inducir un comportamiento metastático de células NIH3T3, por lo que parecía ser que RalGEF fuera más importante para la progresión de un tumor que no para la inducción del mismo (Ward, Y. et al. 2001).

Pero la importancia de RalGEF en oncogénesis se ha puesto de manifiesto en estudios con células humanas. Los estudios de transformación de células humanas fueron posibles gracias a la investigación llevada a cabo por Weinberg y colaboradores. Estos investigadores consiguieron transformar células primarias humanas con Ras, haciendo que éstas expresaran de forma ectópica la subunidad catalítica de la telomerasa hTERT y el antígeno T del virus SV40 (Hahn, W. C. et al. 1999). Usando estas células inmortalizadas, Hamad et al implicaron a RalGEF en la transformación de células humanas (Hamad, N. M. et al. 2002). Para ello utilizaron el mutante del dominio efector H-RasV12/G37, que tiene la capacidad de unirse y activar a RalGDS, pero no puede activar a PI3K ni a Raf. Pues bien, este mutante transfectado en las células humanas inmortalizadas era capaz de causar crecimiento en suspensión de fibroblatos primarios, de células embrionarias epiteliales de riñón y en astrocitos. En cambio, los mutantes H-RasV12/S35 (sólo activa Raf) y H-RasV12/C40 (sólo activa PI3K), eran ineficaces. Por lo tanto, al contrario de lo que pasa en las células de roedores, la vía RalGEF parece jugar un papel clave en la transformación de, como mínimo, algunas células humanas.

Los mecanismos por los que RalGEF/Ral promueven oncogénesis no están claros, aunque se implica a las proteínas PLD, Src, JNK, NF- $\kappa$ B y la expresión de Ciclina D, Pero la conexión entre estas proteínas y los efectores de Ral , está todavía por aclarar.

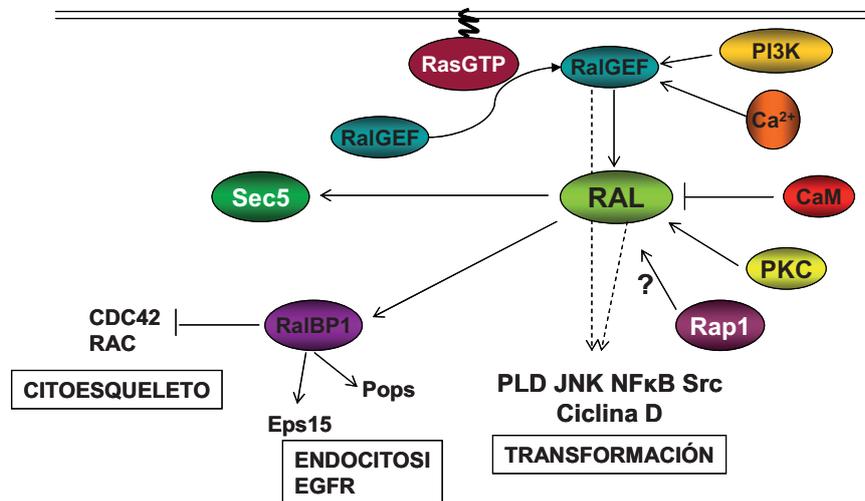


Figura 20. Esquema de la vía RalGDS/Ral

### Otros efectores de Ras.

PLC $\epsilon$ , pertenece a la familia de enzimas PLCs que catalizan la hidrólisis del fosfatidilinositoles 4,5-bifosfatos (PIP<sub>2</sub>) de la membrana plasmática. La reacción libera dos segundos mensajeros, DAG e inositol 1, 4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>), que activa la PKC y produce un aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular, respectivamente. La PLC $\epsilon$  se diferencia de los otros miembros de la familia por la falta de dominios PH y EF-hand y, por tener dos dominios RA de unión a Ras y un dominio Cdc25 de intercambiador de nucleótidos. El hecho de tener estos dominios de unión a Ras, junto con que el dominio RA2 se una a Ras en estado GTP con una elevada afinidad, más el hecho de que mutaciones en el dominio efector de Ras (como T35S y Y40C) desbaraten la unión a PLC $\epsilon$ , han hecho de este enzima un candidato a efector de Ras (Kelley, G. G. et al. 2001). Otra característica que presenta PLC $\epsilon$  para cumplir la definición de efector de Ras, es que su actividad fosfolipasa se ve regulada (de forma positiva) por la actividad de Ras.

De la proteína Rin hablamos en el apartado dedicado a las GTPasas de la subfamilia Ras. Rin posee un dominio RA en el extremo C-terminal y ha demostrado unirse a Ras tanto “in vitro” como “in vivo”. Esta proteína presenta una dependencia de unión a Ras en estado GTP y también a su dominio efector. Los estudios para elucidar las funciones biológicas de Rin han demostrado que Rin compite por la unión a Ras con Raf y este proceso está regulado por la unión de proteínas 14-3-3 a Rin (Wang, Y. et al. 2002). Rin,

cuyo patrón de expresión se limita al cerebro, también se ha implicado en el “neurite outgrowth” en células PC12, a través de su unión a CaM y de la activación de Rac/Cdc42.

Estudios recientes han demostrado que la lista de efectores de Ras incluye no sólo oncogenes, sino también algunos supresores de tumores. Estos efectores cuadrarían con la inhibición del crecimiento celular e inducción de la apoptosis mediada por Ras en algunas situaciones (Feig, L. A. and Buchsbaum, R. J. 2002) (Farnsworth, C. L. et al. 1995). Las proteínas RASSF tienen actividades antiproliferativas cuando son expresadas en una variedad de tipos celulares. Las proteínas de esta familia contienen un dominio RA, pero de ellas se han propuesto como efectores de Ras a NORE1 (también conocida por RASSF5), RASSF1, RASSF2 y RASSF4. En algunos tumores humanos se ha encontrado una pérdida de expresión de *NORE1A* y *RASSF1A*. Hay estudios que apoyan que estas proteínas puedan ser efectores de Ras y hay otros que lo contradicen. Por ejemplo, la expresión ectópica de NORE1 causa inhibición de la proliferación y apoptosis, efecto que es potenciado por la expresión de H-Ras activo e inhibido por la expresión de un dominante negativo de H-Ras (Vos, M. D. et al. 2003). Pero por otro lado, la inhibición del crecimiento de células tumorales humanas inducida por NORE1 no requiere la interacción con Ras (Aoyama, Y. et al. 2004).

Otra proteína con un “Ras Binding Domain” y que conectaría la vía Ras con la vía Rho, es Tiam1. Esta proteína es un GEF de la GTPasa Rac (Lambert, J. M. et al. 2002). La importancia de la interacción Tiam1 con Ras en transformación fue demostrada por Collard et al, quienes encontraron que el ratón *Tiam1*<sup>-/-</sup> era viable pero resistente a la formación de tumores inducida por la activación de Ras por carcinógenos. Aunque este ratón formaba muchos menos tumores que los ratones “wild-type”, los que se formaban presentaban una mayor malignidad. Parecía que Tiam jugaba un importante papel en la iniciación de tumores inducidos por Ras, pero posteriormente sirve como un antagonista en la progresión del tumor (Malliri, A. et al. 2002)

AF6 también ha sido descrita como posible efector de Ras. Esta proteína, identificada como proteína de unión a Ras, es similar a la proteína de *Drosophila* Canoe, implicada en la vía de señalización de Notch (Kuriyama, Masamitsu et al. 1996)

## II.6 Ras y cáncer.

Como hemos ido viendo en los apartados anteriores, Ras juega un papel clave en el control de la proliferación y supervivencia celular. No es de extrañar pues que, en un,

aproximadamente 30% de los tumores humanos se hayan encontrado mutaciones activadoras de los genes *Ras*. Como ya apuntamos en el apartado referente a la estructura de *Ras*, estas mutaciones tienen lugar en unos “puntos calientes”, críticos en la regulación de *Ras*: en el codón 12, 13 y 61. Estas mutaciones impiden la hidrólisis del GTP, quedando así *Ras* en un estado activo permanente.

En humanos, mutaciones en *Ras* ocurren, en una elevada frecuencia, en tumores de páncreas (~80%), colon (~35%), pulmón (~20%), tiroides (~50%) y en varios hematológicos. En ratones en cambio, a excepción del cáncer de pulmón, la expresión de la forma oncogénica de *Ras* no produce estos tipos de tumores. En ratones, mutaciones de *Ras* se han relacionado con la formación de carcinomas de mama inducidos por carcinógenos, mientras que en humanos, no se han encontrado mutaciones de *Ras* en este tipo de tumores.

Mientras que en células de ratón H-*Ras* es la isoforma con más capacidad transformante, en humanos una pequeña proporción de los tumores presenta mutaciones en H-*Ras* (~1%). En la gran mayoría, la isoforma mutada es K-*Ras* (en un casi 85% del total de tumores que presentan mutaciones en *ras*) seguido en frecuencia por N-*Ras* (~1%). Como observamos en la tabla 3 en cada tipo de tumor predomina una isoforma mutada de *Ras*.

Tipo de tumor	Isoforma de <i>Ras</i> mutada	Frecuencia de la mutación de <i>Ras</i> (%)
Adenocarcinoma pancreático	<b>K</b>	78
Carcinoma de tiroides		
Folicular	<b>H, K, N</b>	53
Papilar	<b>No definido</b>	25
Indiferenciado	<b>H, K, N</b>	58
Adenocarcinoma de colon	<b>K</b>	36
Colangiocarcinoma	<b>N</b>	56
Pulmón		
Carcinoma de células grandes	<b>K</b>	21
Adenocarcinoma	<b>K</b>	22
Carcinoma endometrial	<b>K</b>	21
Carcinoma de ovario	<b>K</b>	23
Seminoma	<b>K, N</b>	43
Dermatológico		
Queratoacantoma	<b>H</b>	26
Hematológico		
Carcinoma oral de células escamosas	<b>No definido</b>	23
Mieloma múltiple	<b>N, K</b>	30-40
Leucemia mieloide aguda	<b>N, K</b>	20-30
Leucemia mielomonocítica crónica	<b>N, K</b>	50-70
Plasma cell leucemia	<b>N, K</b>	60-70

**Tabla 3. Tabla de los principales tumores en los que se ha encontrado mutaciones en *Ras*, así como la isoforma mutada y la frecuencia de la mutación.** Información extraída de “*Ras* as a target in cancer therapy” (Midgley, R. S. and Kerr, D. J. 2002)

Dada la importante contribución de la vía Ras al crecimiento y progresión de tumores y a la elevada prevalencia de mutaciones en Ras encontrada en tumores de humanos, Ras se ha convertido en una diana terapéutica clave en la lucha contra el cáncer. Son varias las estrategias que se han seguido para diseñar inhibidores de Ras. En general estas estrategias han ido dirigidas a inhibir la expresión de Ras, inhibir el procesamiento de la proteína, inhibir la proteína mutada e inhibir los principales efectores de Ras (Friday, B. B. and Adjei, A. A. 2005). Algunos de estos inhibidores han llegado a fases clínicas dando, algunos, incluso buenos resultados. Veamos a continuación algunos ejemplos de las diferentes estrategias.

- **Inhibidores de la expresión de las proteínas Ras.** Para inhibir la expresión de la proteína se han seguido dos estrategias: oligonucleótidos antisentido y RNA de interferencia. Los oligonucleótidos consiguen reducir la expresión de Ras y disminuir la tumorigenicidad “in vitro”. Pero “in vivo” no ha habido tanta suerte. Un oligonucleótido, ISIS2503, que ha llegado a fases clínicas no ha demostrado tener una actividad antitumoral específica, de la misma manera que su uso no ha demostrado inhibir Ras en esos tumores humanos.

Los RNA de interferencia presentan la ventaja de ser muy selectivos y pueden ser dirigidos hacia la forma mutada de K-Ras, respetando así la forma “wild-type”. Un RNAi dirigido a K-RasV12, transfectado con virus en diferentes líneas tumorales, reduce los niveles de la proteína K-RasV12 y la tumorigenicidad de las células. En cambio la introducción de este RNAi no afecta a los niveles de K-Ras “wild-type”. Estos RNAi, al igual que los oligos antisentido, están limitados por su correcta y eficaz liberación en el tejido diana. Ningún RNAi de K-Ras ha entrado en fase clínica.

- **Inhibición del procesamiento de K-Ras.** Esta estrategia se basa en que la localización de Ras en la membrana plasmática es esencial para la señalización. Como ya vimos anteriormente, son varios los pasos que sigue la proteína K-Ras desde que es sintetizada hasta que se procesa para dirigirse a la membrana plasmática. La inhibición de cualquiera de estos pasos debería disminuir la actividad de Ras.

La prenilación es el primer paso de las modificaciones y es el paso que más estudios para desarrollar inhibidores ha acaparado, basándose en que la farnesilación es necesaria para la actividad oncogénica de Ras. Los primeros inhibidores diseñados con este fin, son los inhibidores de la farnesiltransferasa (FTIs). Los hay de dos tipos: péptidos que mimetizan el motivo CAAX y los no-peptidomiméticos. Muchos de estos FTIs han demostrado ser efectivos tanto en sistemas “in vitro”, modelos celulares tumorales y en estudios en animales.

Algunos de ellos han llegado a estudios clínicos. Uno de ellos, tipifarnib, está a punto de ser aprobado para el tratamiento de la leucemia mielógena aguda.

A pesar de su eficacia, la actividad antitumoral de estos inhibidores no es específica de la inhibición de Ras. K-Ras debido a la inhibición de la farnesiltransferasa se puede geranilizar por la geranylgeranyltransferasa “in vivo” y así llegar a la membrana. Así que, se han desarrollado tratamientos combinando los dos tipos de inhibidores, pero esta terapia combinada presenta el problema de una elevada toxicidad. En concreto, un peptidomimético que inhibía a los dos enzimas, no prosperó en la fase clínica debido a su elevada cardiotoxicidad.

Los otros dos enzimas encargados del procesamiento de las proteínas Ras, la proteasa Rce1 y la metiltransferasa Icmt, también han sido consideradas dianas terapéuticas para inhibir Ras. Un inhibidor de la Icmt, el cysmetinilo, ha demostrado tener actividad antitumoral “in vitro”

- **La proteína K-Ras como target.** Otro de los objetivos del desarrollo de fármacos contra K-Ras, es el de crear inhibidores de la proteína y que éstos diferencien entre la forma mutada de K-Ras oncogénica y la “wild-type”, de manera que el tratamiento diferenciaría las células tumorales de las normales y así se esperaría una mínima toxicidad. Ya hemos visto que los RNAi prometen en este sentido, aunque aún queda mucho en su desarrollo.

Otra forma de anular la proteína oncogénica sería a través de anticuerpos o péptidos inhibidores que reconociesen específicamente la secuencia mutada. La vacunación de humanos con péptidos de Ras mutado provoca una respuesta inmunológica, produciéndose linfocitos T reactivos. “In vitro”, estos linfocitos son capaces de reconocer e inhibir el crecimiento de varias líneas tumorales humanas que contienen Ras mutado. En un estudio con pacientes de adenocarcinoma pancreático, éstos fueron inmunizados con un péptido de Ras que contenía la mutación (si se sabía cual era la mutación que presentaba el tumor) o con una mezcla de péptidos con las mutaciones frecuentes. El 58% presentaba respuesta inmunitaria y éstos tuvieron una supervivencia mayor respecto a los que no presentaron respuesta.

Otra estrategia para anular la actividad de la proteína, es la creación de péptidos contra el dominio efector de K-Ras, basándose en pequeñas diferencias conformacionales entre la proteína mutada y la “wild-type”. Estos inhibidores están en fases muy tempranas de su desarrollo pero existen algunas pruebas “in vitro” esperanzadoras

- **Inhibición de los efectores de Ras.** La inhibición de los efectores “downstream” puede ser una forma de inhibir la transformación celular inducida por K-Ras. A pesar de los múltiples efectores de Ras, sólo unos pocos inhibidores de algunos de ellos han llegado a fases clínicas. En concreto, se han desarrollado inhibidores de Raf, MEK y mTOR (una serina/treonina-quinasa “downstream” de PI3K) y algunos de ellos están en fase clínica dando resultados esperanzadores.

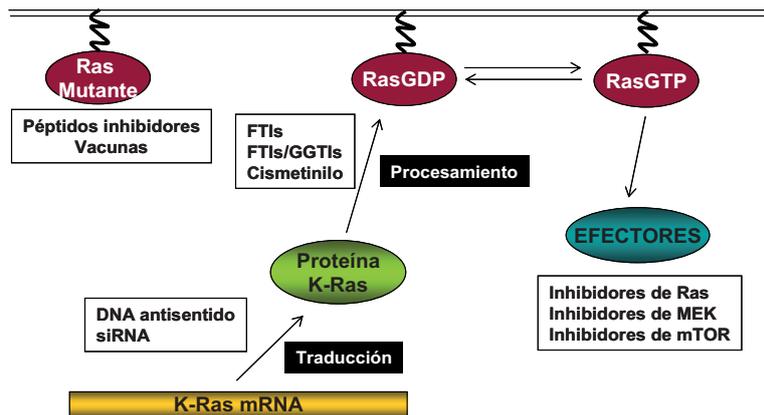


Figura 21. Esquema del lugar de intervención de los diferentes inhibidores de la actividad Ras.

A modo de resumen podríamos decir que las estrategias para diseñar inhibidores específicos de la actividad Ras, han proporcionado productos que en fase clínicas han demostrado tener actividad antitumoral. Pero ninguno de los que han llegado a esta fase, han demostrado tener una actividad específica sobre Ras. Los inhibidores de la farnesiltransferasa, de Raf, MEK y mTOR han dado buenos resultados en fases clínicas pero su actividad antitumoral es la suma de acciones contra Ras y otras vías de señalización. Sin embargo, no dejan de ser activos en el tratamiento de tumores que contienen mutaciones de K-Ras. Por otro lado los que serían muy específicos de Ras, como los oligonucleótidos antisentido o los RNA de interferencia, no han llegado a fases clínicas.

### III. CALMODULINA/ $\text{Ca}^{2+}$

#### III.1 Calmodulina (CaM)

CaM es el más abundante y conocido sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células no musculares. Esta proteína altamente conservada y, que se expresa en todas las células eucariotas, participa en la regulación de diferentes procesos tales como el crecimiento celular, la diferenciación, proliferación, supervivencia y motilidad celular entre otros (Toutenhoofd, S. L. and Strehler, E. E. 2000). Esta proteína pequeña de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  está formada por 148 aminoácidos y fue identificada como una proteína que estimulaba la fosfodiesterasa de nucleótido cíclico (Cheung, W. Y. 1970) (Kakiuchi, S. and Yamazaki, R. 1970). La CaM representa como mínimo un 0.1% de la proteína total de las células (Chin, D. and Means, A. R. 2000)

En mamíferos, una única e idéntica proteína es codificada por tres genes *CaMI*, *CaMII*, *CaMIII*, hecho que pone de manifiesto el interés de las células eucariotas en disponer en todo momento de esta proteína. La CaM está regulada a nivel transcripcional, postranscripcional, y postraducciona (Toutenhoofd, S. L. and Strehler, E. E. 2000). A nivel postraducciona, la CaM recibe diferentes modificaciones como acetilación, trimetilación, carboximetilación, proteólisis y fosforilación, pero el papel de estas modificaciones es todavía en gran parte desconocido (Kortvely, E. and Gulya, K. 2004). El principal elemento regulador de CaM es, sin duda, el  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### III.2 CaM es un sensor de $\text{Ca}^{2+}$ .

Hasta un experimento realizado por Ringer en el año 1883, en el que se relacionó el  $\text{Ca}^{2+}$  con la contracción cardíaca, este catión era considerado exclusivamente un elemento estructural (Ringer, S 1883). Hoy en día el  $\text{Ca}^{2+}$  se considera un segundo mensajero universal responsable del control de numerosos procesos celulares, entre ellos, la proliferación, el desarrollo, la motilidad, la secreción, el aprendizaje y la memoria (Berridge, M. J. et al. 2000, Carafoli, E. 2002).

El  $\text{Ca}^{2+}$  ejerce sus funciones uniéndose a proteínas que descodificaran e interpretaran la señal. Algunas de estas proteínas al unir el  $\text{Ca}^{2+}$  modifican su actividad (la PKC y las RasGRPs, por ejemplo). Otras proteínas unen  $\text{Ca}^{2+}$  pero no modifican su actividad (como los transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$  y las proteínas tamponadoras de  $\text{Ca}^{2+}$  como la calbindina y la parvalbumina). Y luego tenemos las proteínas que transducen la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ , a las que el  $\text{Ca}^{2+}$  les produce un cambio conformacional que les permite

interaccionar con las proteínas efectoras, que ejecutarán la señal. En este último grupo se sitúa CaM.

CaM pertenece por su estructura a la familia “EF-hand” de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos dominios “EF-hand” están formados por una hélice en el extremo N-terminal (hélice E), seguida de un dominio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  localizado en el centro y una hélice C-terminal (hélice F). CaM presenta dos regiones globulares de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  conectadas entre sí por una hélice- $\alpha$  muy flexible. Estas dos regiones globulares, situadas en el extremo C y N-terminal respectivamente, presentan cada una de ellas dos dominios “EF-hand”. Por lo tanto cada molécula de CaM une cuatro átomos de  $\text{Ca}^{2+}$ . Ambas regiones globulares no unen  $\text{Ca}^{2+}$  con la misma afinidad: la C-terminal tiene una elevada afinidad ( $K_d 5 \times 10^{-7}$ ) y la N-terminal une con menos afinidad ( $K_d 5 \times 10^{-6}$ ). Esta diferencia de afinidades entre sus regiones le permite sentir diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . El nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol de células sin estimular es del orden de  $10^{-7}$  mientras que tras la estimulación de la célula los niveles aumentan hasta un orden de  $10^{-6}$ .

Cuando CaM no está unida a  $\text{Ca}^{2+}$  se conoce con el nombre de “Apocalmodulina” (ApoCaM). En esta situación CaM se encuentra en una conformación cerrada (plegada sobre sí misma). Cuando CaM une los átomos de  $\text{Ca}^{2+}$ , adquiere una conformación abierta (holocalmodulina, holoCaM), la proteína se despliega y expone unas zonas hidrofóbicas de unión a sus proteínas efectoras. Aunque la forma holoCaM es la conformación activa, se han descrito proteínas de unión a la forma Apo, independientemente de  $\text{Ca}^{2+}$ .

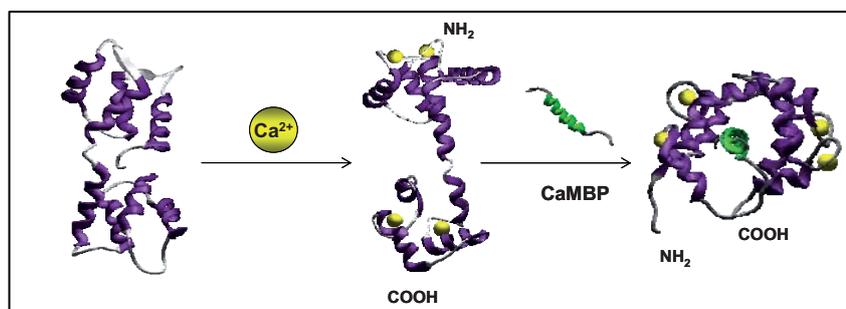


Figura 22. Estructura de la CaM en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , unida a los cuatro átomos de  $\text{Ca}^{2+}$  y uniendo una CaMBP

### III.3 Las proteínas de unión a CaM: CaMBPs

Las proteínas de unión a CaM (Calmodulin Binding Proteins, CaMBPs) ven modulada su actividad por la interacción con CaM y son consideradas sus proteínas efectoras. De CaMBPs hay muchas y de muy variada naturaleza, lo que da una idea de la cantidad de procesos que CaM regula.

A pesar del gran número de CaMBPs descritas, no es posible establecer un dominio de unión común a CaM. Podemos generalizar que existen dos tipos de dominios de unión a CaM: los que poseen las proteínas de unión a CaM dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y los que poseen las proteínas de unión a CaM de forma independiente a  $\text{Ca}^{2+}$ .

En el primer caso, las proteínas que se unen a CaM de forma dependiente a  $\text{Ca}^{2+}$  poseen unos dominios de unión que se caracterizan por una  $\alpha$ -hélice básica anfipática, formada por unos 20 aminoácidos. Estas regiones poseen unos residuos hidrofóbicos críticos en las posiciones 1,8 y 14 y frecuentemente otro adicional en la posición 5. A menudo también encontramos un residuo triptófano en el extremo N-terminal de la hélice que interacciona con la metionina 124 de CaM. Los aminoácidos hidrofóbicos de la hélice interaccionan con dominios también hidrofóbicos de CaM y los básicos estabilizan la unión con aminoácidos ácidos de CaM.

En el caso de las proteínas que unen CaM de forma independiente a  $\text{Ca}^{2+}$  el dominio de unión que presentan es el llamado "IQ motif". El nombre le viene de los dos primeros aminoácidos de la secuencia, isoleucina (I) y glutamina (Q), bastante conservados en casi todos los dominios IQ, aunque alguna leucina o valina también se ha encontrado ocupando la primera posición. La secuencia general de un dominio IQ se corresponde con "(I, L, V)QXXXRXXXX(R,K)". En algunos casos se han encontrado proteínas con dominios IQ que unen CaM de forma dependiente a  $\text{Ca}^{2+}$ : es el caso de RasGRF1.

Una posible clasificación de las CaMBPs, es la realizada por Chin et al (Chin, D. and Means, A. R. 2000), en las que se establecen seis categorías atendiendo a los requisitos de  $\text{Ca}^{2+}$  para la unión y los efectos de esta unión. Estos seis grupos de CaMBPs son los siguientes:

- Tipo A. Se unen a CaM de manera irreversible independientemente de  $\text{Ca}^{2+}$ . En este caso CaM se considera como una subunidad de la propia proteína. Ej: fosforilasa quinasa.
- Tipo B. Se unen a CaM en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  pero se disocian de manera reversible en presencia del catión. Ej: neuromodulina, neurogranina. Estas proteínas podrían servir como reservorios celulares de CaM en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , pero que la liberarían en respuesta a un aumento del ión.
- Tipo C. A bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  formarían complejos inactivos y de baja afinidad con CaM. Cuando las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  aumentasen, estas proteínas atraerían a CaM para formar un complejo de alta afinidad y ser activadas por ella. Ej: MLCK, calcineurina.

- Tipos D. Se unen a CaM en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , pero la CaM inhibe su función: Ej: Receptor EGF.
- Tipos E/F. El grupo E son las más comunes, siendo activadas por la unión a CaM en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este grupo incluye a las quinasas dependientes de CaM: CaMKI, CaMKII y la CaMKIV. El grupo F son proteínas de unión a CaM pero que a su vez están reguladas por otra CaMBP.

También se han descrito diferentes mecanismos por los que CaM puede activar a su efector (Hoeflich, K. P. and Ikura, M. 2002), representadas en la figura 23. CaM al unirse a la proteína podría desplazar un dominio autoinhibidor (así activa las CaMK I, II, IV, por ejemplo). Otro mecanismo reciente descrito para la adenilato ciclasa, propone la reorganización de los dominios de la CaMBP para formar el centro activo por la unión de CaM. Una tercera forma de actuar, como ocurren en el caso del canal iónico potasio activado por  $\text{Ca}^{2+}$ , es que la unión de CaM provoque la dimerización de proteínas de membrana.

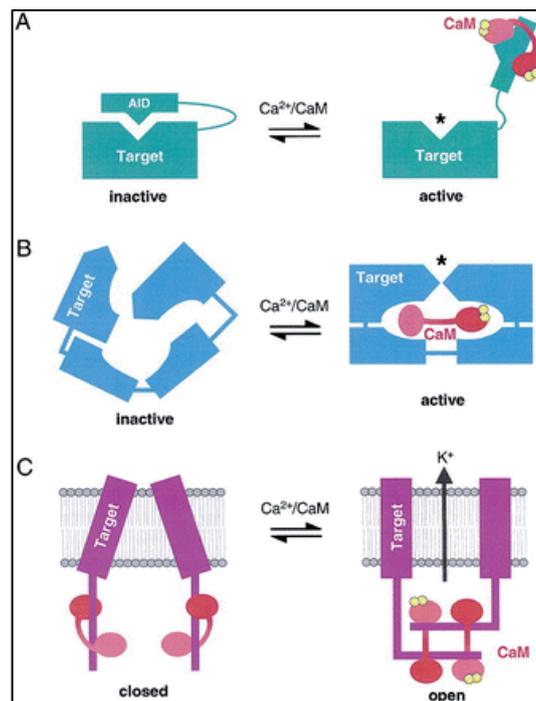


Figura 23. Esquema de las posibles formas de CaM para activar una CaMBP

### III.4 Procesos regulados por CaM

CaM ha sido implicada en múltiples procesos celulares tales como secreción, motilidad celular, homeostasis iónica, transcripción génica, transducción de señales, entre otros. CaM participa en estos procesos a través de la unión a las CaMBPs. Son muchas las CaMBPs descritas, haciéndose muy difícil hacer un resumen de todas. En la figura 24, se representa un resumen de los procesos regulados por CaM y unos ejemplos de CaMBPs que participan en cada uno de ellos.

En el apartado siguiente hablaremos de las CaMBPs implicadas en la modulación del proceso que más nos interesa en nuestro estudio: la transducción de señales de la vía Ras/MAPK. Cabe destacar que nuestro grupo describió a K-Ras como una CaMBP y que esta unión modulaba negativamente la vía MAPK en células NIH3T3 y Swiss3T3 (Villalonga, Priam et al. 2001).

Otra proteína que nuestro grupo ha descrito como una CaMBP, es el inhibidor de ciclo celular p21<sup>CIP1</sup> (Taulés, M. et al. 1999). Hace tiempo que está establecida la implicación de CaM en el ciclo celular. Utilizando drogas específicas anti-CaM se ha visto que esta proteína juega un papel esencial en la entrada al ciclo celular de células quiescentes (transición G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>), en la transición a fase S y en el inicio de la mitosis. También se sabe que la progresión del ciclo celular depende de Ca<sup>2+</sup>, ya que en ausencia de este elemento las células que estaban en transición G<sub>1</sub>/S, entran en quiescencia.

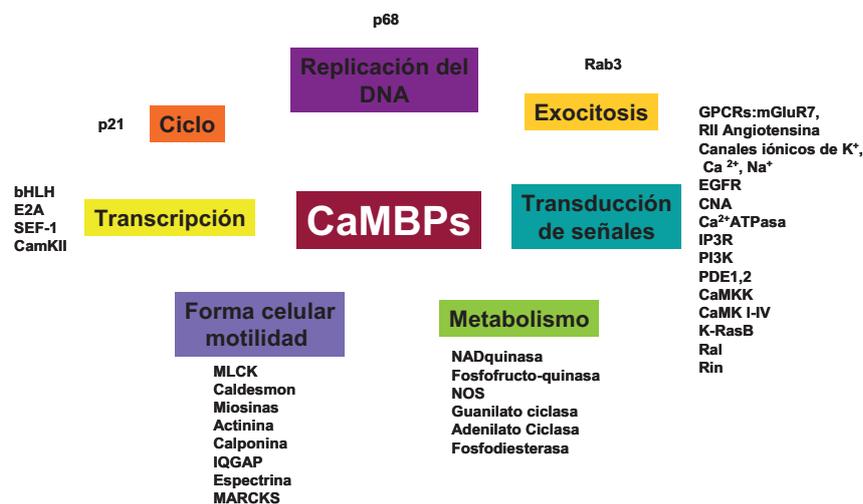


Figura 24. Esquema de algunas CaMBPs agrupadas según el proceso en el que intervienen

Cabe destacar también otras pequeñas GTPasas, a parte de K-Ras, de la superfamilia Ras que son CaMBPs: Kir/Gem (Fischer, R. et al. 1996), Ric (Wes, P. D. et al. 1996), Rin (Lee, C. H. et al. 1996), Rab3A (Park, J. B. et al. 1997) y RalA (Wang, K. L. et al. 1997). Regulando a estos interruptores de vías de señalización, CaM interviene en los procesos que regulan estas GTPasas. La unión a CaM, parece ser otro mecanismo de regulación para algunas GTPasas, a parte de la regulación por GEFs, GAPs o la misma localización de la proteína.

### III.5 Regulación de la vía Ras/Raf/MEK/MAPK por $\text{Ca}^{2+}$ /CaM

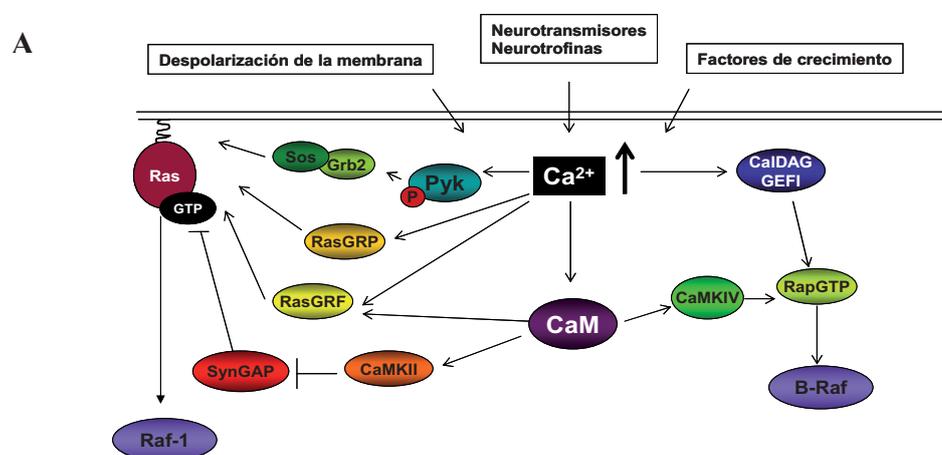
En células neuronales y fibroblastos existe una modulación de la vía Ras/Raf/MEK/MAPK por  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM. Pero esta modulación no es igual en ambos modelos: en células neuronales esta modulación es positiva y en los fibroblastos la modulación es negativa. En células neuronales, un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  debido a la activación por neurotrofinas, factores de crecimiento o por una despolarización de la membrana, produce una activación de la MAPK. Por otro lado la inhibición de CaM produce una menor activación de la MAPK en respuesta al NGF o a la despolarización. En estas células el  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM están implicados en una activación de la MAPK sostenida, relacionada con inhibición de la proliferación ligada a diferenciación y supervivencia neuronal. En cambio en fibroblastos y queratinocitos, modelos proliferativos, el  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM modulan negativamente la vía, haciendo que la activación de la MAPK sea transitoria para ser luego sostenida pero de forma moderada. Este patrón de la MAPK sería el compatible con la proliferación. En fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs), los quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, potencian la activación de la MAPK por EGF, tanto en intensidad como en duración. Este efecto podría ser debido a que la fosfatasa de la MAPK (MKP-1) se expresa de forma dependiente a  $\text{Ca}^{2+}$ . En queratinocitos, la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  tiene un efecto inhibitorio sobre la activación de la MAPK. También se ha descrito que la inhibición de CaM produce en NIH3T3, Swiss3T3 y células NRK, una activación sostenida de la vía. Esta inhibición también provocaba, en estas mismas células, una activación de la vía a bajas dosis de factores de crecimiento, por lo que CaM parecía estar implicada en la prevención de la activación de la vía a esas concentraciones bajas de mitógenos (Bosch, M. et al. 1998). Estos efectos opuestos del  $\text{Ca}^{2+}$  y CaM en estos dos modelos celulares diferentes, neuronas y fibroblastos, es seguramente debido a la presencia de diferentes CaMBPs y proteínas reguladas por  $\text{Ca}^{2+}$  en uno y otro modelo celular.

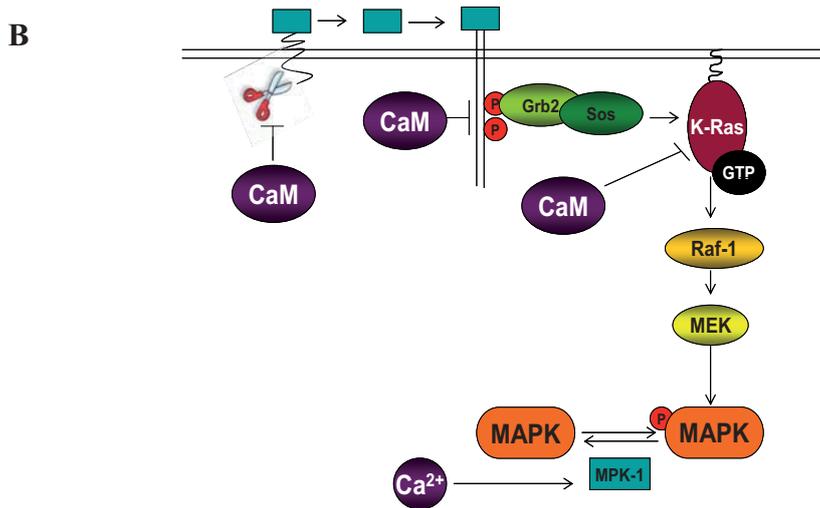
En neuronas tenemos a Pyk2, una quinasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , que está implicada junto con Src en el reclutamiento del complejo Grb2/Sos a la membrana plasmática y, la consiguiente activación de Ras. En neuronas también encontramos la presencia de dos

GEFs de Ras regulables por  $\text{Ca}^{2+}$ : RasGRP y RasGRF. Por otro lado, en estas células, también encontramos a la GAP SynGAP, modulada negativa e indirectamente por CaM. SynGAP es inhibida por fosforilación de la CaMKII que es activada por CaM. Otra quinasa dependiente de CaM, la CaMKIV, fosforila a la GTPasa Rap-1B y ésta, a través de su interacción con B-Raf, puede inducir una activación sostenida de la MAPK.

En células PC12, los efectos de  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM sobre MAPK son muy parecidos, pero en estas células no se expresa RasGRF, RasGRP ni CaMKIV. Los efectos sobre la MAPK podrían venir mediados por los efectos sobre Raf-1. En estas células, la activación de NGF o EGF inducen una activación de Ras pero la actividad Raf está muy inhibida y en consecuencia la activación de MAPK, sugiriendo un papel de la CaM en la activación de Raf-1 (Egea, J. et al. 1999) (Egea, J. et al. 1999).

En fibroblastos, otras CaMBPs o otros procesos dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM implicadas en la modulación de la vía, han sido descritas. Por un lado, CaM ha sido implicada en la inhibición de la proteólisis de ectodominios de algunos factores de crecimiento anclados a la membrana plasmática. Por lo tanto CaM estaría inhibiendo la liberación de estos factores de crecimiento y la consecuente activación de los receptores tirosina-quinasa. El receptor de EGF (EGFR) es una CaMBP y su unión por el dominio yuxtamembrana citoplasmático, provoca la inhibición de su actividad tirosina-quinasa (Martin-Nieto, J. and Villalobo, A. 1998, San Jose, E. et al. 1992). Otra CaMP que ha demostrado ver modulada su actividad por CaM en estas células es el mismo K-Ras (Villalonga, Priam et al. 2001). La inhibición de CaM provoca la activación de K-Ras por bajas concentraciones de suero y por TPA. Dos efectores de Ras también unen CaM: Raf-1 y PI3K. Raf-1 se une a CaM a partir de lisados celulares, pero no ha sido descrita su unión directa (Egea, J. et al. 1999) (Villalonga, Priam et al. 2001). En el caso de la PI3K, se ha demostrado la interacción tanto con la subunidad p85 como con la p110. Estudios en células CHO han demostrado que la unión de CaM a la subunidad p85 provoca una activación de la PI3K (Joyal, J. L. et al. 1997).





**Figura 25.** Representación de los diferentes puntos de la vía Ras/MAPK modulados por  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM en neuronas (A) y en fibroblastos (B)

## IV. PKC

La familia de las proteína quinasas C pertenece a la superfamilia de las quinasas A-G-C. Esta familia de quinasas está presente en todos los eucariotas y en humanos incluye 10 isoformas diferentes. Estas serina/treonina-quinatas son reguladores de diferentes procesos celulares tales como crecimiento, diferenciación y supervivencia, entre otros. Las PKCs también se han relacionado en enfermedades como la diabetes, cáncer y en la isquemia cardíaca.

Las diferentes isoformas de PKCs están ampliamente distribuidas en los diferentes tejidos en mamíferos. Los estudios con ratones “knockout” indican que determinadas isoformas de PKC son importantes sólo en contextos muy específicos, de forma que seguramente existe cierta redundancia (Parker, P. J. and Murray-Rust, J. 2004)

### IV.1 Estructura y clasificación de las PKCs

Las isoformas de la familia PKC han sido clasificadas en tres grupos según su homología y la capacidad de unir los cofactores fosfatidilserina (PS), diacilglicerol (DAG) y  $\text{Ca}^{2+}$ . De esta manera tenemos tres familias de PKCs: las PKCs clásicas o convencionales (cPKCs), las PKCs nuevas (nPKCs) y las PKCs atípicas (aPKCs). Las cPKCs (PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ) se activan por PS, DAG y  $\text{Ca}^{2+}$ , las nPKCs (PKC  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ) se activan por PS y DAG pero no por  $\text{Ca}^{2+}$  y finalmente las aPKCs ( $\zeta$ ,  $\lambda$ ) no se activan ni por  $\text{Ca}^{2+}$  ni por DAG, pero son sensibles a PS. Las isoformas activables por DAG

serían también activables por los ésteres de forbol, TPA o PMA, que no son más que unos análogos de DAG.

La estructura de las PKCs incluye los dominios conservados, C1-C4 y las regiones variables, V1-V5. El dominio autorregulador que hace de pseudosustrato, inhibiendo el dominio catalítico, está en el extremo amino. A continuación se encuentra el dominio C1, presente en las PKCs clásicas y nuevas, de unión al DAG. El dominio C2, presente en las PKCs clásicas, une  $\text{Ca}^{2+}$  y PS. Este dominio C2 está presente en las PKCs nuevas pero no es funcional y no se encuentra en las atípicas, por lo que se piensa que la PS podría unirse a otros lugares de las PKCs. El dominio catalítico en el extremo C-terminal está comprendido entre las regiones C3 y V5. La región C3 comprende los residuos de interacción con el ATP y la región C4 contiene el lugar de unión al sustrato y también la región de transferencia del fosfato (Liu, W. S. and Heckman, C. A. 1998).

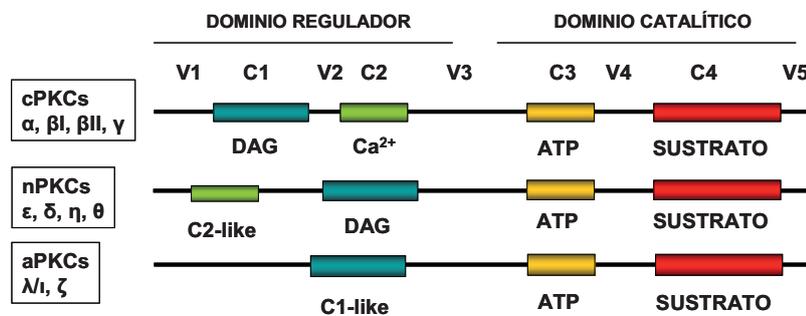


Figura 26. Estructura de las diferentes familias de PKCs

La modulación de la actividad PKC no está regulada únicamente por el DAG y el  $\text{Ca}^{2+}$ , si no que se han descrito además mecanismos de regulación a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional. Uno de los mecanismos más importantes de regulación sería a través de la fosforilación, esencial para la activación de las PKCs. Otro factor importante en la actividad de estas quinasas es su localización, ya que condiciona su interacción con los sustratos, que son los que en realidad transducen la señal (Poole, A. W. et al. 2004).

En general, se piensa que las PKCs cuando son inactivas se encuentran en el citosol de la célula y, con la activación translocan a las membranas celulares. La activación de las PKCs convencionales y nuevas se relaciona con la producción de DAG que puede proceder de varias vías. Una de ellas sería vía activación de los receptores tirosina-quinasa que activarían a las PLC por reclutamiento de sus dominios SH2. Otra vía de producción de DAG sería a través de la activación de la PLCβ por los GCPRs. En general los efectos activadores sobre la PKC, tienen la finalidad de desplazar el dominio autoinhibidor del dominio catalítico. También para la activación óptima de la

quinasa, casi todos los miembros de la familia requieren la fosforilación en una treonina.

## **IV.2 Relación entre PKC y la vía de Ras/ MAPK.**

En la literatura, encontramos diferentes trabajos que han relacionado a la PKC con la vía Ras/MAPK. En general se sabe que PKC activa a las MAPK en fibroblastos, a través de su actuación en diferentes puntos de la vía. Lo que no ha habido quórum es si este efecto es Ras-dependiente o independiente: hay trabajos que apuntan a que es Ras-independiente en base a que el dominante negativo de Ras, RasN17, no bloquea la activación de MAPK por TPA, pero más tarde se vio que este efecto si que era Ras dependiente, como mínimo en células COS, ya que la microinyección del anticuerpo bloqueante de Ras Y13-259 inhibía completamente la activación de MAPK por TPA (Marais, R. et al. 1998). En este mismo trabajo demostraban que Raf-1 era activado por PKC y que para ello era necesaria la formación del complejo Ras-GTP/Raf. En concordancia con esto, Hamilton et al (Hamilton, M. et al. 2001) encontraron complejos de PKC $\epsilon$ /Ras/Raf en fibroblastos C3H10T1/2. En 1990, cuando las señales externas que controlaban la actividad de Ras no estaban del todo claras, Downward et al (Downward, Julian et al. 1990) demostraron que en linfocitos T, PKC activaba Ras a través de la inhibición de las GAPs. Ahora que sabemos de la existencia de los GEFs RasGRPs regulables por DAG y que además se ha visto que en linfocitos B, PKC fosforila y activa a RasGRP1 y RasGRP3 (Teixeira, C. et al. 2003) (Zheng, Y. et al. 2005), quizá la activación de Ras por PKC en estas células sea debido a la suma de varios efectos.

Por lo tanto, a pesar de los numerosos trabajos que relacionan a PKC con la vía Ras/MAPK, no queda claro si PKC regula directamente a Ras, porque en estos trabajos comentados PKC influye en la actividad de la GTPasa, pero de forma indirecta, a través de otras proteínas moduladoras de la actividad Ras. Un trabajo del año 1987 (Ballester, R. et al. 1987) sí que apuntaba a una relación directa, ya que demostraban que PKC podía fosforilar a K-Ras. Posteriormente, en un trabajo de nuestro grupo (Villalonga, Priam et al. 2002) comprobamos que PKC fosforilaba a K-Ras “in vitro” y esta fosforilación era inhibida por CaM. En concordancia con esto, en este estudio se comprueba que el TPA no activaba Ras en células NIH3T3 pero si inhibimos la CaM si que se produce la activación de Ras por PKC. Por lo que para acabar de enredar la ya complicada relación Ras/PKC, un efecto directo de PKC sobre Ras podría verse modulado por otra proteína como CaM.





## **OBJETIVOS**

1. Determinar el dominio de unión de K-Ras a Calmodulina
2. Investigar cómo afecta esta interacción a la funcionalidad de K-Ras







## I PLÁSMIDOS

A continuación se detallan los plásmidos utilizados, el cDNA, como se ha clonado, y el origen de estos plásmidos

<b>PLÁSMIDO</b>	<b>cDNA</b>	<b>DIANAS</b>	<b>ORIGEN</b>
pEF-HA-K-Ras	HA-K-Ras	BamHI/ClaI	Dr. Marais
pEF-HA-K-Ras181A	HA-K-Ras181A	BamHI/ClaI	Dr. Marais
pEF-HA-K-Ras181D	HA-K-Ras181D	BamHI/ClaI	Esta Tesis
pEF-HA-K-RasV12	HA-K-RasV12	BamHI/ClaI	Dr. Marais
pEF-HA-K-RasV12/181A	HA-K-RasV12181A	BamHI/ClaI	Esta Tesis
pEF-HA-K-RasV12/181D	HA-K-RasV12181D	BamHI/ClaI	Esta Tesis
pCDNA <sub>3</sub> -GFP-CaM	GFP-CaM		
pCEFL-KZ-AU5-K-Ras	AU5-K-Ras	BglII/NotI	Dr. Rojas
pCEFL-KZ-AU5-K-RasV12	AU5-K-RasV12	BglII/NotI	Dr. Rojas
pCEFL-KZ-AU5-K-RasG34	AU5-K-RasG34	BglII/NotI	Dr. Rojas
pCEFL-KZ-AU5-K-RasV12/G34	AU5-K-RasV12G34	BglII/NotI	Dr. Rojas
pCEFL-KZ-AU5-K-RasV12/S35	AU5-K-RasV12S35	BglII/NotI	Dr. Rojas
pCEFL-KZ-AU5-K-RasV12/G37	AU5-K-RasV12G37	BglII/NotI	Dr. Rojas
pCEFL-KZ-AU5-K-RasV12/C40	AU5-K-RasV12C40	BglII/NotI	Dr. Rojas
pGEXKG-K-Ras1-166	GST-K-Ras1-166	BamHI/XhoI	Esta Tesis
pGEXKG-H-Ras1-166	GST-H-Ras1-166	BamHI/XhoI	Esta Tesis
pGEXKG-N-Ras1-166	GST-N-Ras1-166	BamHI/XhoI	Esta Tesis
pGEXKG-K-Ras1-150	GST-K-Ras1-150	BamHI/XhoI	Esta Tesis
pEFHA-K-Ras1-166	HA-K-Ras1-166	BamHI/ClaI	Esta Tesis
pEFHA-H-Ras1-166	HA-H-Ras1-166	BamHI/ClaI	Esta Tesis
pEFHA-N-Ras1-166	HA-N-Ras1-166	BamHI/ClaI	Esta Tesis
pEFHA-K-RasQQQ	HA-K-RasQQQ	BamHI/ClaI	Esta Tesis
pEFHA-K-RasV12QQQ	HA-K-RasV12QQQ	BamHI/ClaI	Esta Tesis
pEFHA-K-RasPREP	HA-K-RasPREP	BamHI/ClaI	Esta Tesis
pEFHA-K-RasV12PREP	HA-K-RasV12PREP	BamHI/ClaI	Esta Tesis
pEFHA-K-RasDDD	HA-K-RasDDD	BamHI/ClaI	Esta Tesis
pEFHA-K-RasV12DDD	HA-K-RasV12DDD	BamHI/ClaI	Esta Tesis
pEFHA-K-Ras161D	HA-K-Ras161D	BamHI/ClaI	Esta Tesis
pEFHA-K-RasV12/161D	HA-K-RasV12161D	BamHI/ClaI	Esta Tesis
pEFHA-K-Ras164D	HA-K-Ras164D	BamHI/ClaI	Esta Tesis
pEFHA-K-RasV12/164D	HA-K-RasV12164D	BamHI/ClaI	Esta Tesis
pEFHA-K-Ras165D	HA-K-Ras165D	BamHI/ClaI	Esta Tesis
pEFHA-K-RasV12/165D	HA-K-RasV12165D	BamHI/ClaI	Esta Tesis
pEFHA-K-Ras185A	HA-K-Ras185A	BamHI/ClaI	Esta Tesis
pEFHA-K-RasV12/185A	HA-K-RasV12185A	BamHI/ClaI	Esta Tesis
pEFHA-K-RasV12ΔK	HA-K-RasV12ΔK	BamHI/ClaI	Esta Tesis
pGEX-RBD	GST-RBD		Dr. Marais

Todos los mutantes realizados se obtuvieron mediante PCR directa, en la que los oligonucleótidos contenían la mutación deseada, así como las dianas necesarias para la clonación en el plásmido.

## **II CULTIVOS CELULARES.**

### **II.1 Modelo celular**

Los modelos celulares utilizados en esta tesis han sido los siguientes:

- Fibroblastos de ratón NIH3T3
- Líneas estables derivadas de las anteriores que expresan constitutivamente las proteínas: HA-K-Ras, HA-K-Ras181A, HA-K-Ras181D, HA-K-RasV12, HA-K-RasV12/181A, HA-K-RasV12/181D. De cómo se obtuvieron, se hablará en un apartado posterior.

### **II.2 Mantenimiento de las células y tripsinización**

La línea NIH3T3 y las líneas estables se mantienen en un incubador a 37°C y a una presión parcial de CO<sub>2</sub> del 5%.

El medio en el que son cultivadas estas células es el Dulbecco's-modified Eagle's médium (DMEM) suplementado con 2 mM de L-Glutamina, 1% de aminoácidos no esenciales, 1 mM de ácido pirúvico, antibiótico (50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina) y 10% de "Donor Calf Serum" (DCS). En el caso de las líneas estables el medio es suplementado además con el antibiótico de selección G418 (Sigma) a una concentración de 0.5 mg/ml o 0.75 mg/ml según la concentración que había sido necesaria para la selección en cada obtención de las líneas estables.

Para la tripsinización de las células se hacen dos lavados con PBS ("Phosphate-buffered saline") NaCl 7.65 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.21 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.9 g/l en H<sub>2</sub>O a pH 7.2). Se añade un pequeño volumen, tal que cubra las células, de tripsina-EDTA. Ésta se deja actuar unos minutos hasta que veamos las células en suspensión y cuando esto ocurra, neutralizamos la tripsina diluyéndola con DMEM 10%DCS. De esta suspensión de células se coge la cantidad necesaria para resembrarlas a la densidad deseada.

Las NIH3T3 tienen un tiempo de duplicación de 24 h. Hay que mantener el cultivo subconfluyente para evitar la transformación de las células.

### II.3 Congelación y descongelación de células

Para congelar células, éstas se tripsinizan como se ha explicado anteriormente y se cuentan con la cámara de Neubauer. Congelamos un millón de células contenidas en un ml de una mezcla 50% de FCS y 50% de DMSO al 20% en PBS. Estas alícuotas de células se dejan primero unos 3 días a  $-80^{\circ}\text{C}$  y después se pasan al contenedor de nitrógeno líquido.

Para descongelar las células se calientan primero unos 25ml de DMEM 10%DCS a  $37^{\circ}\text{C}$ . Las células se descongelan rápidamente introduciendo pequeños volúmenes de este medio en el vial y pasándolos inmediatamente al *falcon* con los 25 ml. Así vamos descongelando las células y diluyendo el DMSO al mismo tiempo. Al final de este proceso tenemos una suspensión de células que centrifugamos 5 min a 2000 rpm. Se aspira este medio y se resuspende el pellet de células con medio fresco. Estas células se siembran en un frasquito de  $25\text{ cm}^2$  y al día siguiente se observan por si fuera necesario volver a sembrar en una placa mayor y si no, se hace un cambio de medio.

### II.4 Sincronización de células.

Las células NIH3T3 se sincronizan en la fase  $G_0$  con el método de privación de suero. En concreto, las células a un 90% de confluencia aproximadamente, se dejan 24 h en medio 0,5% FCS. En algunos casos, para determinados experimentos, se incuban 12 h con 0.5% FCS y 12 h con 0% FCS o 24 h con 0.5% FCS más unas horas sin nada de suero.

### II.5 Tratamiento de las células.

En algunos experimentos, tal como se verá en el apartado de Resultados, hemos tratado las células “in vivo” con determinadas drogas (inhibidoras o activadoras de terminadas proteínas enzimas o receptores). Para estos tratamientos, las drogas se disuelven en el mínimo volumen de medio que cubra perfectamente las células, por tal de minimizar la cantidad de droga. Luego se añade al cultivo y se incuba el tiempo indicado en cada experimento en el apartado de Resultados.

DROGA	CASA COMERCIAL	DISOLVENTE	C. INICIAL	C. FINAL
PDGF-BB	Sigma	4mM HCl 0,1% BSA	50 $\mu\text{g/ml}$	10 $\text{ng/ml}$
TPA	Calbiochem	DMSO	1 mM	100 nM
W13	Sigma	DMSO	10 $\text{mg/ml}$	15 $\mu\text{g/ml}$
W12	Sigma	DMSO	10 $\text{mg/ml}$	15 $\mu\text{g/ml}$
CICLOHEXIMIDA	Sigma	Hepes pH 7,5	10 $\text{mg/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$

Tabla 2. Relación de las drogas utilizadas

## II.6 Transfección de células

Se ha utilizado el sistema comercial Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Es un sistema basado en la inclusión del DNA en liposomas que al fusionarse con la membrana plasmática liberan el ácido nucleico en el interior de la célula. A la hora de transfectar, se ha seguido estrictamente el protocolo del fabricante. Hubo transfecciones en las que fue necesario transfectar cantidades inferiores a las indicadas, como en los experimentos de formación de focos, en los que transfectábamos sólo unos 20-50ng del gen de interés. En estos casos se añadía un DNA *carrier* (normalmente el mismo plásmido vacío) hasta llegar a la cantidad recomendada.

## II.7 Cuantificación del número de células

Como rutina, a la hora de sembrar células para realizar algún experimento las contamos utilizando la cámara de Neubauer. El número a sembrar depende del tamaño de la placa y de la confluencia que deseamos.

TIPO DE PLACA	Nº DE CÉLULAS
p100	1x10 <sup>6</sup>
p60	330,000
P35	200,000

**Tabla 3. Relación del número de células a sembrar de un día para otro, según el tamaño de la placa y para obtener un 90% de confluencia aproximadamente.**

En el apartado de resultados se verá un experimento de cuantificación de células para comparar la tasa de proliferación de las líneas NIH3T3, K-RasV12, K-RasV12/181A, K-RasV12/181D. En este experimento sembramos 50.000 células por pocillo de 35mm por triplicado para cada tiempo. A la hora de contar, para intentar minimizar la variabilidad, contamos 2 veces cada réplica (poniendo muestra nueva cada vez en la cámara de Neubauer) y cada vez contamos 10 cuadrados de la cámara. El número total es la media de las tres réplicas.

## II.8 Obtención de las líneas estables NIH3T3 HA-K-Ras, HA-K-Ras181A, K-Ras181D, HA-K-RasV12, HA-K-RasV12/181A, HA-K-RasV12/181D.

El plásmido pEFHA, donde están clonados nuestros mutantes, no contenía ningún gen de resistencia a antibióticos de selección. Así que para obtener las líneas estables co-transfectamos el plásmido pEFHA que contenía nuestro gen y el plásmido pCDNA3 que contenía el gen *neo*.

Antes de obtener las líneas estables, se hace una prueba con el antibiótico de selección G418 para saber cual es la concentración necesaria para matar las células NIH3T3 en unos 15 días (que es el tiempo en el esperaríamos obtener los clones de las estables). Sembramos las células tal como haríamos cuando hiciésemos las estables y se mantienen durante 15 días con varias concentraciones de G418. Transcurrido ese tiempo evaluamos cuál es la concentración que ha matado completamente el cultivo. Esa es la concentración de antibiótico que selecciona las células estables y es la que utilizamos.

El proceso para la obtención de las líneas estables es el siguiente:

- Sembramos 100.000 células NIH3T3 en una placa de 35 mm. Son menos células de las que sembramos normalmente cuando transfectamos con Lipofectamina 2000, pero lo hacemos así para que luego, cuando empecemos la selección tengamos una confluencia tal que el antibiótico sea efectivo. El G418 disminuye su eficiencia si el cultivo está demasiado confluyente.
- Al día siguiente procedemos a la transfección. Para asegurar que todas las células transfectadas con la resistencia lo estuviesen también con Ras, transfectamos 100 ng de pCDNA3 y 2 µg de pEFHARas.
- A las 24 h de transfección replantamos las células. Cada pocillo de 35mm se divide en 2 placas de 100 mm que ya contengan el medio con el antibiótico de selección. La concentración para nuestra selección es de 0.5 o 0.75 mg/ml. También sembramos células NIH3T3 control.
- A partir de aquí, hacemos cambios de medio con antibiótico cada tres días. Durante este tiempo observamos las células periódicamente por tal de evaluar la formación de clones dispersos, la muerte de las células no transfectadas y el fenotipo de las células en general.
- A los quince días aproximadamente se obtienen los *pools* y clones. Como tenemos dos placas, de una extraemos el *pool* y de la otra picamos los clones. El *pool* se obtiene por tripsinización completa de la placa y estas células se pasan a frasquitos de 25cm<sup>2</sup>. Los clones se pican con “Cloning disks” (Sigma) mojados en tripsina. Estos discos, que se empapan de las células, se depositan en placas de 24 pocillos.
- Cuando estos pocillos están llenos, las células se pasan a frasquitos de 25 cm<sup>2</sup>.
- Cuando estos frascos de 25 cm<sup>2</sup>, tanto de clones como de *pools* de células, están llenos, pasamos a comprobarlos. La comprobación se hace mediante

inmunofluorescencia anti-HA y mediante Western Blot de los lisados con anticuerpo también anti-HA.

### III EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN

#### III.1 Cepas y medios

Han sido utilizadas las siguientes dos cepas de la especie *Escherichia Coli*:

- DH5 $\alpha$ , para la obtención de DNA plasmídico
- BL21pLys, para expresar y posteriormente purificar proteínas de fusión. Estas bacterias tienen la particularidad de por un lado, de expresar la RNA polimerasa T7 bajo el control de un promotor inducible por IPTG, y por otro, expresar lisozima por lo se facilita en gran medida su lisis.

El medio de cultivo que se utiliza para hacer crecer estas bacterias es el siguiente:

- Medio de cultivo LB (Luria-Bertani): Triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0,5%, en agua pp. 7.5. Se autoclavan.
- Placas de cultivo LB/agar: Agar bacteriológico 1,5% en medio LB.

Los antibióticos de selección son:

- Para todas las DH5 $\alpha$  que contienen el plásmido pEFHA, Ampicilina 50  $\mu\text{g/ml}$ . Para aquellas que contienen el plásmido pCDNA3, Kanamicina 30  $\mu\text{g/ml}$ .
- Para las BL21pLys además de la Ampicilina (porque el plásmido pGEXKG utilizado codifica resistencia para este antibiótico), Cloranfenicol 10 $\mu\text{g/ml}$ .

#### III.2 Transformación

Para transformar las bacterias DH5 $\alpha$  o BL21pLys se sigue el siguiente procedimiento:

- Descongelar las células competentes en hielo. Las células competentes se obtienen por tratamiento de las bacterias con MgCl<sub>2</sub> y CaCl<sub>2</sub>.

- Mezclar 100  $\mu$ l de bacterias con una pequeña cantidad de DNA (0.1-0.5  $\mu$ l). Hacer un pequeño *vórtex* y dejar 20 min en hielo
- Proceder al choque térmico: incubación a 42°C durante 15 s e inmediatamente después, a 4°C durante 2 min.
- Recuperar las bacterias añadiendo 1 ml de LB sin antibiótico y dejarlas 1 h a 37°C.
- Centrifugar las bacterias a 6000 rpm durante 2 min.
- Descartar del sobrenadante unos 800  $\mu$ l de medio, y resuspender el pellet en los 300 restantes. Plaquear este volumen en la placa de LB que contenga el antibiótico adecuado.
- Incubar durante la noche a 37°C

### III.3 Expresión en bacterias y purificación de proteínas GST.

#### Expresión.

Para la expresión de las proteínas se empieza inoculando del *stock* de bacterias una pequeña proporción de masa en uno 5 l de LB con el antibiótico de selección adecuado. Se amplifica el cultivo hasta el volumen deseado, diluyéndolo sucesivamente en volúmenes crecientes de medio. Normalmente hacemos crecer cultivos de 0.5 o de 1 l.

El cultivo se incuba hasta obtener una OD de 0.8. En este momento, empezamos a inducir la expresión de la proteína GST clonada en el plásmido pGEX. Para ello, añadimos el IPTG (Isopropil- $\beta$ -Dtioglactopiranosido) a una concentración de 0.4 mM. Dejamos el cultivo a 37°C (en el caso de nuestras proteínas la inducción se realiza a esta temperatura) en agitación, durante unas 4 h.

Recogemos las bacterias por centrifugación a 5000 rpm en un rotor GSA (Sorvall) a 4°C durante 10 min. Si no se empieza la purificación de la proteína al momento, se congela el *pellet* de bacterias a -80°C.

#### Purificación de GST-RBD.

- Resuspender el pellet de bacterias en unos 40 ml de PBS con DTT 0.5mM y los inhibidores de proteasas habituales (\*), sobre hielo.  
(\*). Los inhibidores de proteasas y fosfatasas utilizados son: Leupeptina 10  $\mu$ M, aprotinina 1  $\mu$ M, PMSF 1mM, benzamidina 1 mM y Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM.
- Sonicar unas 6-8 veces de 1 min manteniendo la suspensión en hielo.

- Añadir Tritón X-100 tal que quede al 1% (v/v) y dejar incubando durante 30 min en agitación suave a 4°C
- Centrifugar a 12000 rpm durante 10 min a 4°C.
- Añadir hasta un 10% de Glicerol al sobrenadante y mezclar

Si lo que queremos es obtener alícuotas de GST-RBD para los ensayos de unión a RBD, no purificamos más el extracto. Este lisado bacteriano, que ha de ser claro y transparente, sin precipitados, se alícuota en la cámara fría, rápidamente, en *ependorfs* de 500 µl sobre nieve carbónica. Estas alícuotas se almacenan a -80°C.

Si queremos purificar el GST-RBD hasta el final (en los casos que lo utilicemos para ensayos de unión in vitro o para construir columnas covalentes de GST), seguimos con el procedimiento:

- Añadir unos 500-800 µl de Glutathiona-Sefarosa (lavada previamente con PBS) y dejar en agitación 1 h a 4°C.
- Centrifugar a 3000 rpm durante 3 min a 4°C e ir lavando con PBS las bolas de Glutathiona y volviendo a centrifugar, unas cinco veces.
- Eluir en dos volúmenes, de 500 µl cada uno, de Glutathión 20 mM en tampón de lisis. Para ello incubar unos 5 min cada elución y después de centrifugar, recoger el sobrenadante.
- Dializar el sobrenadante en 3x600 ml de tampón de diálisis (PBS, Glicerol 10% (v/v) y DTT 0.1mM. Cada diálisis se deja unas 2 h a 4°C y en agitación continua.
- Recoger la proteína dializada y mantenerla a -80°C.

#### **Purificación de GST-K-Ras1-166, GST-H-Ras1-166, GST-N-Ras1-166 y GST K-Ras1-150**

La particularidad de estas purificaciones, es que además de proceder a una purificación como proteínas GST normales, hay que cargarlas con GTP o GDP.

- Lisar el precipitado de bacterias con unos 20 ml de tampón de lisis, en hielo y dejar unos 20 min.

TrisHCl pH 7,5	50 mM
NaCl	100 mM
EDTA	1 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
Glicerol	10% (v/v)
Tritón X-100	1% (v/v)
β-Mercaptoetanol	0.5% (v/v)
Inhibidores de proteasas y fosfatasas	

- Sonicar el lisado (3x1 min), manteniendo el lisado en hielo.
- Centrifugar 10 min a 14000 rpm a 4°C.
- Añadir al sobrenadante 500-800 µl de Glutathiona-Sefarosa y dejar incubándose en agitación suave, 1 h a 4°C.
- Lavar las bolas unas 4 veces (centrifugando 3 min a 3000 rpm) con el tampón de lisis, y en el último lavado repartir la resina (si se quiere obtener Ras-GDP y Ras-GTP, si no, seguir con toda) en dos *ependorfs*.
- Lavar una vez con tampón de intercambio 1x.

TrisHCl pH 7.4	20 mM
NaCl	50 mM
Glicerol (v/v)	5%
Tritón X-100	0.1%

- Proceder al intercambio del nucleótido. Con este tampón de intercambio conseguimos que Ras libere el nucleótido que tenía y cogerá el que nosotros añadamos en exceso. Calculamos aproximadamente la cantidad de resina seca que tenemos en cada tubo y lo incubamos con el doble de volumen de medio de intercambio: este medio de intercambio se prepara a partir del tampón de intercambio 5x, EDTA, DTT y los nucleótidos.

GST-Ras/Glutathiona-Sefarosa



Tampón de intercambio 5x  
(1/5 parte del V total)  
GDP 1 mM (*stock* 20 mM)  
EDTA 10 mM  
DTT 1 mM  
H<sub>2</sub>O hasta V final

Tampón de intercambio 5x  
(1/5 parte del V total)  
GTP 1mM (*stock* 20 mM)  
EDTA 10 mM  
DTT 1 mM  
H<sub>2</sub>O hasta V final

- Incubar 30 min a 30°C en agitación suave
- Parar la reacción añadiendo MgCl<sub>2</sub> a 15 mM y pasando a 4°C. El Mg<sup>2+</sup>, no permite el intercambio de nucleótido, así que, al añadirlo Ras queda estabilizado con el nucleótido que hemos cargado en el punto anterior.
- Hacer un lavado con el tampón de intercambio 1x (le añadimos 2 mM de MgCl<sub>2</sub>) y otro con el tampón de lisis.
- Eluir el GST-Ras en dos volúmenes, uno de 1 ml y otro de 0.5 ml, con tampón de lisis con 20 mM de Glutación.
- Dializar el eluido en 3x 600 ml de tampón de diálisis a 4°C en agitación continua durante 2 h cada diálisis. El tampón de diálisis tiene la siguiente composición:

Tris HCl pH 7.4	10 mM
NaCl	150 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
Glicerol	10% (v/v)
DTT	0.1 mM

- Guardar la proteína dializada a -80°C

### **Eliminación del GST por digestión con trombina**

La expresión de proteínas utilizando los plásmidos pGEX, permite la eliminación del fragmento GST, ya que entre éste y el inicio de la proteína el plásmido tiene una secuencia de corte reconocida por trombina. Así que, una vez hemos utilizado el GST para la purificación, éste se puede eliminar para impedir interferencias en posteriores ensayos. El proceso es el siguiente:

- Después de tener ya lavada la proteína enganchada a la Glutaciona-Sefarosa, hacer otro lavado adicional con PBS y pasar la resina a un tubo de 1.5 ml.
- Calcular el volumen de resina seca que tenemos, y añadir el mismo volumen de una solución (95:5) de PBS: trombina (Amersham Pharmacia Biotech ind 1u/μl, en PBS).
- Incubamos 16 h a temperatura ambiente en agitación.
- Centrifugar a 3000 rpm 3 min y recuperar el sobrenadante

- Hacer un lavado de las bolitas restantes con un pequeño volumen de PBS y añadirsele al sobrenadante anterior.
- Para eliminar los restos de trombina, añadir 15µl de p-aminobenzamidina acoplada a bolas de agarosa (Sigma). Incubar durante 10 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 3000 rpm, 3 min y recuperar el sobrenadante. Seguir con la diálisis.

#### III.4 Expresión de proteínas en células de insecto Sf9

La expresión de proteínas en bacterias no nos permite obtenerlas en las mismas condiciones de procesado post-traduccionales que se dan “in vivo”. Para ello son muy útiles las células de insecto, ya que al ser eucariotas encontramos en ellas la maquinaria proteica encargada de traducir y de procesar post-traduccionales las proteínas, de forma similar a como se haría en las células de origen.

El DNA codificante para nuestra proteína, se introduce en las células de insecto Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) a través de los llamados “baculovirus”, que específicamente infectan células de insecto. Hay que disponer pues, de vectores contruidos de forma que tengan integrado en el genoma vírico el cDNA que queremos expresar. En este caso la proteína también estaba fusionada con GST para facilitar su purificación. En nuestro caso, los baculovirus que ya contenían el cDNA de GST-Ras, fueron cedidos por el Dr. Richard Marais.

Las células Sf9 se mantienen en el medio de cultivo BIOINSECT-1 (Biological Industries) suplementado con FCS 10% y Gentamicina 50µg/ml. Las células se mantienen en un incubador a 27°C y se diluyen periódicamente en medio fresco. No hace falta tripsinizarlas, ya que con unos leves golpes se despegan perfectamente.

Primeramente, para la infección de las células, deberíamos disponer de un *stock* de concentrado de virus. Para obtener este concentrado lo que hacemos es lo siguiente:

- Sembrar una placa p35 con un millón de células e infectarlas con unos 100-200 µl de virus en 1 ml total de medio. Después de 1 h, cambiar el medio y dejar en incubación durante unos tres días.
- Transcurrido este tiempo, recoger con una pipeta Pasteur todo el volumen de medio con las células infectadas e inocularlo en 10 ml de medio fresco y añadirlos a una placa de 75 cm<sup>2</sup> que contiene 7,5x10<sup>6</sup> células. Dejar la infección por espacio de 15 días.

- Recoger todo el medio con los restos de células en un tubo y mantener a 4°C.

Una vez tenemos nuestro concentrado de virus, podemos ir realizando infecciones a gran escala para producir proteína. Para ello:

- Sembrar las células a infectar. Para una purificación partimos de 3-4 frascos de 150 cm<sup>2</sup> con 15 millones de células cada uno.
- Inocular 3-5 ml de concentrado de virus en unos 20 ml de medio total. Dejar unos tres días antes de recogerlas para la purificación
- Recoger las células por centrifugación a 3000 rpm a 4°C durante 5 min. Si no empezamos la purificación en el momento, congelamos los *pellets* a -80°C.

A partir de aquí, el proceso de purificación es el mismo que el explicado anteriormente para las proteínas GST-Ras 1-166. Lo único que varía un poco es el tampón de lisis, que es el siguiente:

Tris HCl pH 7,4	50mM
NaCl	100mM
EDTA	1mM
MgCl <sub>2</sub>	5mM
Glicerol	10% (v/v)
Tritón-X-100	0.1% (v/v)
β-Mercaptoetanol	0.5% (v/v)
Inhibidores de proteasas	

Cabe decir, que este sistema de expresión no permite rendimientos tan elevados como la expresión de proteínas en bacterias.

## IV INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS

### IV.1 Electroforesis, electrotransferencia y Western Blot

#### Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas en las muestras, en este trabajo se han utilizado dos tipos de procedimientos:

- Método de Lowry. Se utiliza en el caso de extractos celulares obtenidos por lisis con un tampón que contenía SDS. Este reactivo interfiere en el siguiente método.
- Método de Bradford (Bradford, M. M. 1976) Se ha utilizado para todos los otros lisados obtenidos con tampones que no contenían SDS.

### **Preparación de las muestras para electroforesis en una dimensión**

Para resolver proteínas en electroforesis de una dimensión, se añade una tercera parte del volumen de muestra que tengamos, de tampón 4x (Laemmli, U. K. 1970) que contiene: 2% SDS (para desnaturalizar las proteínas y cargarlas negativamente), 0.5 mg de DTT (para romper los puentes disulfuro), 10% de glicerol y 0.1 mg/ml de azul de bromofenol.

Justo antes de cargar las muestras en el gel, éstas se hierven 5 min para acabar de desnaturalizar las proteínas y romper los puentes disulfuro. Después se centrifugan.

### **Electroforesis de una dimensión**

La separación de proteínas en función de su peso molecular se realiza mediante geles de SDS-poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) según el método de Laemmli (Laemmli, U. K. 1970). La técnica está basada en la diferente migración de las proteínas desnaturalizadas con el SDS (dodecil sulfato sódico) a través de una matriz de acrilamida y bis-acrilamida bajo el efecto de un campo eléctrico. Con el SDS conseguimos cargar negativamente las proteínas y estas se moverán hacia el polo positivo, separándose por su peso molecular.

En nuestro caso, para detectar Ras endógeno o HA-Ras, el porcentaje de acrilamida de los geles, es del 12%.

### **Electroforesis bidimensional**

La electroforesis bidimensional nos permite separar las proteínas según su peso molecular y su punto isoeléctrico (pI). Combinando estas dos propiedades se puede conseguir identificar y separar proteínas diferentes pero de mismo peso molecular, o separar modificaciones post-traduccionales de la misma proteínas (nosotras la hemos aplicado con esta última finalidad).

La electroforesis bidimensional consta de dos partes: una primera dimensión donde las proteínas se separan según el pI y una segunda dimensión donde se separan

según se peso molecular. Para la primera dimensión, se ha utilizado un sistema de tiras de gradiente de pH “IPG Strip” de Bio-Rad. El procedimiento que se utilizó fue el siguiente:

- Lisar las células (partíamos siempre de una p100) con 300  $\mu$ l de tampón de lisis: SDS 0.3%, Tris HCl pH 8 50 mM, DTT 200 mM e inhibidores de proteasas. Disponemos de un stock congelado de tampón con el SDS y el Tris y a la hora de lisar añadimos el DTT (en polvo) y los inhibidores de proteasas.
- Hervir las muestras 5 min y posteriormente enfriamos las muestras a 4°C durante unos minutos más
- Añadir 1:10 volumen de DNAsa y RNAsa e incubar 10 min en hielo
- Añadir Acetona 100% (almacenada a -20°C) tal que quede al 80% en la muestra. Dejamos la muestra 20 min en hielo
- Centrifugar a 14000 rpm durante 15 min a 4°C. Aparece un precipitado blanquecino. Eliminar el sobrenadante y secar al aire el *pellet*. (si no quisiésemos seguir con el procedimiento, podríamos congelar las muestras en este punto)
- Resuspender los pellets con 200  $\mu$ l de Tampón de Urea: Urea 9 M, 4% CHAPS, DTE 65 mM, 0.1% Biolitos 3-10. Tenemos un stock del tampón con la Urea y el CHAPS congelado.
- Centrifugar a 14000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente.
- Recoger el sobrenadante y cuantificar la muestra (Bradford)
- Preparar las muestras: coger volumen equivalente a 100-200  $\mu$ g de proteína y llevarlo a 125  $\mu$ l de volumen total con tampón de Urea.
- Hidratación de las tiras con las muestras. Introducir la punta de la pipeta mojada en azul de bromofenol en la muestra y mezclar suavemente sin hacer burbujas. Coger la muestra y colocarla en línea en un carril de la cubeta. Colocar encima la tira de tal manera que la acrilamida quede en contacto con la muestra. Esperar unos 20 min a que la tira se impregne y después colocar encima 1 ml de aceite mineral.
- Colocar en el aparato de Bio-Rad. Elegir la función “hidratación pasiva”. El aparato ayuda a mantener la temperatura constante, pero si no se dispone de él en ese momento, dejar la cubeta encima de la poyata

aislándola con algo del mármol frío. La hidratación se deja entre 11 y 16 h.

- Electroforesis de la primera dimensión: colocar las tiras en el electrodo. Tener la precaución de que el lado + de la tira quede en contacto con el ánodo (+). Aplicar el programa de voltaje ya preestablecido.

50V	30'
250V	30'
500V	30'
1000V	1h
4000V	1h
8000V	1h
14000V	8000V/h
100V	1'
100V	24h

- Después de correr la primera dimensión las tiras se pueden congelar hasta correr la segunda.
- Las tiras se incuban 10 min en agitación con el “tampón de equilibrio”: 6 M Urea, 0.375 M Tris HCl pH 8.8, 2% SDS, 20% Glicerol, 2% (w/v) DTT. Se añaden 2 ml por tira.
- Para la segunda dimensión: preparar el gel resolutivo de 1mm de espesor. Colocar las tiras equilibradas encima, que quede en contacto con el gel, intentando que no queden burbujas entre medio. Sellar colocando encima de la tira una solución de 1% agarosa en tampón electrolito que solidificará.

Una vez corrida la segunda dimensión se seguirá con la tinción del gel o con la electrotransferencia. En nuestro caso siempre se ha transferido para realizar Western Blot.

### Tinción de geles

Algunos de los geles de este trabajo se han evaluado por tinción con *Coomassie Blue*. Para ello, el gel se incubaba durante unos 10-20 min a temperatura ambiente y en continua agitación con una solución de *Coomassie* (2.5 g/l de *Coomassie Brilliant Blue* G250, 45% metanol, 10% ácido acético). A continuación se destiñe el gel para extraer el exceso de colorante con una solución de ácido acético 10%, 50% metanol y se deja en agitación el tiempo necesario para visualizar las bandas.

## Electrotransferencia

Las proteínas se transfieren, por aplicación de un campo eléctrico, del gel de acrilamida a una membrana de PVDF (Immobilion®, Millipore). Las proteínas del gel, desnaturalizadas y cargadas negativamente, migran hacia la membrana y aquí quedan retenidas. La electrotransferencia la hemos realizado a 4°C durante 2 h a 60V.

## Western Blot

Una vez tenemos las proteínas expuestas en la membrana, podemos proceder a su identificación a través de anticuerpos específicos. Para ello se utiliza un anticuerpo primario (ver apartado de materiales), que reconocerá específicamente nuestra proteína, y un anticuerpo secundario, específico contra las inmunoglobulinas de la especie donde se ha originado el primario. Los anticuerpos secundarios utilizados en este trabajo estaban conjugados con peroxidasa (HRP, *horseradish peroxidase*). El revelado se hizo con líquidos de ECL (Enhanced Chemiluminescence, Amersham), produciéndose una reacción lumínica que podíamos detectar mediante la impresión de films fotográficos (Hyperfilm ECL, Amersham)

ANTICUERPO	TIPO	CASA COMERCIAL	DILUCIÓN
pan-Ras	monoclonal	Oncogen	1 :100-1 :1000
Anti-HA	policlonal	Sigma	1 :1000
Anti-HA	monoclonal	Roche	1 :1000
Phospho-ERK	policlonal	Cell Signalling	1:500-1:1000
Anti-AU5	monoclonal	BAbCO	1:1000
Anti-RalA	monoclonal	Upstate	1:1000
Anti-K-Ras	monoclonal	Santa Cruz	1:100
Anti-H-Ras	policlonal	Santa Cruz	1:100
Anti-N-Ras	monoclonal	Santa Cruz	1:100

Tabla 4. Relación de los anticuerpos utilizados en esta Tesis

## IV.2 Inmunocitoquímica

Mediante esta técnica se pueden detectar las proteínas dentro de las células marcándolas con anticuerpos acoplados a sistemas de detección que se visualizarán después en el microscopio. El sistema de detección utilizado en este trabajo ha sido la inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos acoplados a proteínas que emiten fluorescencia en forma de colores diferentes. Detallaré brevemente la inmunocitoquímica que más se ha utilizado en esta tesis.

## Inmunocitoquímica anti-HA

Es la que más frecuentemente hemos utilizado. Consta de los siguientes pasos:

- Fijación de las células con una solución de paraformaldehído al 4% en PBS. 20 min a temperatura ambiente
- Permeabilización con una solución de Tritón al 0.2% en PBS. 5 min a temperatura ambiente
- Bloqueo con una solución de BSA al 1% en PBS. 30 min a temperatura ambiente
- Incubación con el anticuerpo primario. Se incuba con una gota de unos 30  $\mu$ l de anticuerpo anti-HA (monoclonal preferentemente, policlonal en el caso de hacer una doble inmunocitoquímica) diluido 1:200. La incubación la realizamos en una cámara húmeda a 37°C durante 2 h.
- Incubación con el anticuerpo secundario. Se incuba con una gota de anticuerpo Alexa594 (se ha preferido siempre que ha sido posible la fluorescencia roja) monoclonal o policlonal, diluido 1:500. Se incuba 45 min a 37°C.
- Montar los cubres sobre los portaobjetos añadiendo unos 3  $\mu$ l de medio de montaje: Mowiol (Calbiochem). Esperar a que los cubres estén bien secos antes de mirar al microscopio.

Entre las diferentes incubaciones con los diferentes reactivos se realizan unos lavados con PBS

## V TÉCNICAS “IN VITRO”

### V.1 Ensayos de unión a CaM-Sefarosa

#### Ensayos de unión a CaM-Sefarosa a partir de lisados celulares.

Para analizar la presencia de proteínas de unión a partir de lisados celulares, hemos utilizado la cromatografía de afinidad haciendo uso de la resina de CaM-Sefarosa comercial (CNBr-activated Sepharose™-4B, Amersham Pharmacia Biotech). CaM une específicamente sus proteínas dianas en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , cada lisado a ensayar se dividía en dos: una parte era incubada con la resina en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y la otra en presencia del quelante EGTA. Esto es un control interno del ensayo, la unión será

específica si se encuentra solamente en la fracción unida a la resina en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Otro control también sería incubar el lisado con Sefarosa sola. El ensayo de unión a partir de lisados celulares se realiza de la siguiente manera:

- Lisar las células (normalmente provenientes de una p60) con unos 250  $\mu\text{l}$  de tampón de “pull-down” (TPD), cuya composición es la siguiente:

Tris HCl pH 7.5	50 mM
NaCl	150 mM
Tritón X-100	1% (v/v)
DTT	1 mM
Inhibidores de proteasas y fosfatasas	

- Clarificar el lisado por centrifugación a 14000 rpm, 10 min a 4°C. Guardar una alícuota de lisado (unos 25  $\mu\text{l}$ )
- Dividir el lisado en dos y las dos partes añadirlas a tubos 1,5 ml que contienen ya los 30  $\mu\text{l}$  de resina, lavada con TPD. Un tubo contiene  $\text{CaCl}_2$  a 0.1 mM y el otro contiene EGTA a 2mM.
- Incubar 2 h a 4°C en rotación.
- Después de este tiempo centrifugar la resina, recoger 25  $\mu\text{l}$  de fracción no unida, y la fracción unida se lava 4 veces con TPD que contiene 0.1 mM de  $\text{CaCl}_2$  o 2 mM de EGTA para usar con cada condición.
- Añadir 30  $\mu\text{l}$  de tampón de muestra 2x a la fracción unida para eluir las proteínas.

Como se verá en el apartado de resultados, algunas veces hemos realizado paralelamente al ensayo de unión a CaM, un ensayo de unión a RBD (*Ras Binding Domain* de Raf-1). A RBD se une Ras en la conformación activa. Cuando realizábamos este doble ensayo el lisado obtenido con el TPD era dividido en dos partes, una para unirla a la resina de CaM y otra para unirla al RBD. Cabe destacar que, este tampón TPD, permite que Ras libere el nucleótido, y como en el lisado abunda más GTP que GDP, Ras se carga mayoritariamente de GTP. Esto se había demostrado en un trabajo anterior del grupo (Villalonga, Priam et al. 2001).

## Ensayos de unión a CaM a partir de proteína purificada

Para comprobar si una proteína que a partir de lisados celulares se une a CaM lo hace uniéndose directamente, realizamos el ensayo de unión con la proteína purificada. El procedimiento viene a ser el mismo que el anterior, pero en vez de partir de lisados celulares partimos de una cantidad determinada de proteína purificada. Igual que antes, analizamos la capacidad de unirse a la resina comercial CaM-Sefarosa en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  o EGTA. El tampón de “pull-down” varía ligeramente:

Tris HCl pp. 7,5	50 mM
NaCl	150 mM-300 mM
Tritón X-100	0,1-1% (v/v)

Como se puede ver hay un rango de concentración de NaCl y Tritón que se puede variar. Estas variables se determinan empíricamente en cada caso.

En este caso si se puede diluimos la proteína en TPD. Si no está diluido en este tampón aumentaremos el volumen total de la reacción para minimizar el efecto dilución de la proteína o, según sea el volumen de proteína, concentraremos el TPD para que una vez añadido, quede a la concentración 1x. El volumen total puede variar entre 40µl-100 µl. En este caso añadimos unos 10-20 µl de resina. Una vez ésta está mezclada con el TPD, añadimos  $\text{CaCl}_2$  1mM o EGTA 5mM. Podemos incubar una h a temperatura ambiente o 2 h a 4°C. Como anteriormente, el “input”, la fracción unida y la no unida se resuelven electroforéticamente y el gel, según la cantidad de proteína de la que hayamos partido, se puede analizar directamente por tinción con Coomassie o mediante Western Blot.

## V.2 Análisis de la activación de Ras por unión a RBD.

Para medir el nivel de activación de Ras en un extracto celular, hemos utilizado el método de precipitación de Ras-GTP con GST-Raf-1-RBD (Ras Binding Domain de Raf1). Este método está basado en que la quinasa Raf-1, efector de Ras, solamente puede unirse a la GTPasa cuando ésta está en forma GTP (estado activo). Así, si añadimos a un lisado celular una cantidad en exceso del dominio de Raf-1 que se une a Ras (el RBD), previamente acoplado a una resina de Glutathiona-Sefarosa, conseguiremos precipitar todo el Ras-GTP del extracto. Posteriormente, la fracción unida se analiza por Western Blot, y se asume que todo el Ras que ha co-precipitado con la resina de GST-Raf-1-RBD es el Ras activo (de Rooij, J. and Bos, J. L. 1997)

Hay que tener en cuenta, que la proporción de Ras-GTP respecto el Ras total, incluso en las condiciones de máxima activación, es pequeña y ésta dependerá de la conformación y del mantenimiento del nucleótido unido a Ras una vez hemos lisado de las células. Por tanto es un ensayo delicado en el que sobretodo hay que tener en cuenta: la calidad del GST-Raf-1-RBD, la composición del tampón de lisis (Ras Extraction Buffer, REB, que contiene  $Mg^{2+}$  para inhibir el intercambio de nucleótidos, y de esa manera tener en la muestra Ras fijado al nucleótido que tenía en la célula) y la temperatura (hay que mantener en todo momento las muestras en hielo). El protocolo para realizar este ensayo de unión a RBD es el siguiente:

- Lavar las células dos veces con PBS frío. Colocar las placas sobre hielo y aspirar el exceso de PBS.
- Lisar las células (normalmente procedentes de una p100) con 300  $\mu$ l de REB. La composición de este tampón es la siguiente:

Tris HCl pH 7.5	20 mM
EDTA	2 mM
NaCl	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
Tritón-X-100	1% (v/v)
Glicerol	10% (v/v)
NaF	1 mM
B-Mercaptoetanol	0.5% (v/v)
Inhibidores de proteasas y fosfatasas	

- Clarificar el lisado por centrifugación a 14000 rpm durante 10 min a 4°C
- Reservar 30  $\mu$ l de lisado como control. El resto lo añadimos a RBD unido a Glutathiona-Sefarosa. Las cantidades de RBD y de Glutathiona son diferentes para cada Titulación (ver más adelante). El RBD y la Glutathiona son incubados en rotación a 4°C mientras se lisan las placas (una media h). Antes de añadir el extracto celular y después de la incubación, el RBD-Glutathiona se lava con 1 ml de REB para retirar el exceso de RBD que no se ha acoplado.
- Incubar el extracto celular junto con el RBD-Glutathiona durante 2 h a 4°C en rotación.
- Se lava 4 veces la resina con REB (unos 400  $\mu$ l) manteniendo las muestras, el tampón y las centrifugaciones a 4°C
- Eluir con tampón de muestras 2x. Las proteínas se separan por electroforesis en gel de un 12% de acrilamida para luego ser analizadas por Western Blot utilizando un anticuerpo pan-Ras (si se quiere detectar

la proteína endógena) o un anticuerpo anti-HA (si se quiere detectar específicamente la forma transfectada). También se cargan las alícuotas de lisado reservadas como control de la cantidad total de Ras en las muestras.

### **Titulación**

Es un experimento control después de cada purificación de GST-RBD, para determinar cual es la mínima cantidad de lisado bacteriano con GST-RBD acoplado a Glutathiona-Sefarosa, que es necesaria para precipitar la máxima cantidad de Ras-GTP de una muestra. La cantidad que se usará en los sucesivos experimentos, será un poquito mayor a la que se ha determinado en la titulación. Las muestras para la titulación son lisados de células NIH3T3 activadas 5 min con PDGF. Cada muestra se incubaba con diferentes cantidades de GST-RBD (10, 25, 50, 75, 100, 200  $\mu$ l por ejemplo) acoplado a unos 30  $\mu$ l de Glutathiona-Sefarosa. Realizamos el ensayo de unión tal como se ha descrito en el apartado anterior, y en el análisis por Western Blot, determinamos cual ha sido la mínima cantidad de GST-RBD que ya ha precipitado todo el Ras-GTP de la muestra. Normalmente, para casi todas las purificaciones de RBD-GST que hemos realizado, ya con 25  $\mu$ l de extracto precipitábamos el Ras-GTP de la muestra, así que casi siempre hemos usado entre 30-50  $\mu$ l de GST-RBD para los experimentos.

### **V.3 Ensayo de activación de Ral**

Para analizar la activación del efector de Ras, RalGDS, también se ha utilizado un método indirecto. Ral-GDS es un intercambiador de nucleótido de la GTPasa Ral, y Ral cuando está en forma activa unida a GTP se une a la proteína RalBP1 (que tiene actividad GAP para Cdc42 y Rac). Para detectar la activación de Ral-GDS, se incuban los extractos celulares con el dominio de unión a Ral de la proteína RalBP1 conjugada a agarosa y con ella precipitaremos el Ral activado (Ral unido aGTP). La presencia de Ral activo indicará que ha habido actividad RalGDS, ya que es éste quien intercambia el nucleótido GTP a Ral. En este caso se ha utilizado un kit comercial (Ral activation assay kit de Upstate) que contiene la proteína RalBP1 unida a agarosa (Ral assay reagent), el tampón RAB (Ral Activation Assay Buffer) y el anticuerpo anti-Ral-A. Para el procedimiento se han seguido las instrucciones del fabricante. El protocolo es muy parecido al anterior explicado para medir la activación de Ras con el Ras Binding Domain de Raf-1.

#### V.4 Inmunoprecipitación anti-HA

La inmunoprecipitación (IP) que más se ha realizado en este trabajo es la IP anti-HA ya que todas nuestras construcciones de Ras están conjugadas con el tag HA. Cuando nos ha interesado precipitar nuestra proteína-HA, bien sea para realizar con ella algún ensayo posterior (véase los ensayos quinasas por ejemplo) o para analizar su interacción con otras proteínas, hemos utilizado el anticuerpo monoclonal anti-HA conjugado con bolas de agarosa. Esta es una IP muy agradecida, por su alto rendimiento y porque como el anticuerpo ya está conjugado a una resina nos ahorramos el paso posterior de precipitar el anticuerpo con proteína A/G. El protocolo que hemos seguido es el siguiente:

- Lavar las células 2 veces con PBS frío y recoger sobre hielo las células en un volumen de PBS (si es una p100, 500  $\mu$ l). Centrifugar las células a 2000 rpm 5 min a 4°C.
- Lisar el pellet de células con 300  $\mu$ l de REB más inhibidores de fosfatasa y proteasas. Si quisiéramos precipitar mucha cantidad de proteína-HA podríamos concentrar el pellet de células y luego lisarlo con un volumen variable de REB. Incubamos unos 10 min en hielo.
- Clarificar el lisado por centrifugación a 14000 rpm durante 10 min a 4°C. Reservar una alícuota de lisado y añadir al resto unos 30  $\mu$ l de bolitas HA.
- Incubar el lisado con el anticuerpo unas 4 h en rotación a 4°C
- Lavar la resina cuatro veces con tampón REB.
- Eluir las proteínas con tampón de muestra 2x (mismo volumen que de resina)

#### V.5 Ensayos quinasa.

##### Ensayos quinasa con la proteína purificada GST-K-Ras como sustrato

- Incubar con tampón quinasa (25 mM Hepes pH 7,5, 10 mM  $MgCl_2$ , 2 mM DTT y 25  $\mu$ M ATP) 3  $\mu$ g del GST-K-Ras-GTP expresado en células de insecto SF9 y purificado tal y como se ha descrito anteriormente, en presencia o ausencia de 7  $\mu$ g de CaM y también en presencia de  $Ca^{2+}$  (1  $\mu$ M) o EGTA (1mM) en un volumen final de reacción de 40  $\mu$ l.

- Cuando se tiene preparada la mezcla anterior, añadir 0.25  $\mu\text{l}$  de la subunidad catalítica de la PKC (purificada de cerebro de rata, de la casa Biomol) y 0.1  $\mu\text{l}$  ( $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ) ATP (3000 Ci/mmol) (Amersham Bioscience).
- Incubar la reacción durante 30 min a 30°C y pararla con la adición del tampón de muestras.
- Las muestras se resuelven en un gel de acrilamida por electroforesis, y este gel se tiñe, se destiñe y se seca. Exponer y obtener la imagen con el aparato “Phosphorimaging” de Bio-Rad.

### **Ensayos quinasa con Ras-HA inmunoprecipitado como sustrato**

Cuando realizamos los ensayos quinasa para encontrar el residuo de fosforilación, el control HA-K-Ras y los posibles mutantes no fosforilables (HA-K-Ras171A, HA-K-Ras181A, HA-K-Ras183A) se transfectaron y expresaron en células COS. A partir de los lisados, las proteínas HA se inmunoprecipitaron y fueron usadas como sustrato para el ensayo quinasa. El procedimiento es el siguiente:

- Transfectar 4 p60 con células COS, para cada construcción con Lipofectamina 2000, según instrucciones del fabricante. 24 h después de la transfección replantamos las células en p100. El transfectar células COS lo hicimos para obtener más cantidad de proteína. Las dejamos crecer en la p100 un día más
- Recoger las células de las 4 p100 en PBS y obtenemos un solo pellet para cada condición por centrifugación a 2000 rpm 5 min a 4°C
- Lisar el pellet de células con 1 ml de de REB e inhibidores de proteasas y fosfatasas. Reservamos unos 30  $\mu\text{l}$  de lisado como control.
- Repartir el lisado en dos tubos de 1,5 ml que ya contengan unos 60  $\mu\text{l}$  de anticuerpo anti-HA acoplado a bolas de agarosa.
- Incubar la IP anti-HA durante 3 h a 4°C en rotación
- Reservar 30  $\mu\text{l}$  de fracción no unida. La fracción unida se lava tres veces con tampón REB y una última vez con tampón kinasa 1x (25mM HEPES pH 7.5, 10mM  $\text{MgCl}_2$ ). Apartar unos 10  $\mu\text{l}$  de esta fracción unida como control de IP.
- Esta fracción unida es el sustrato para el ensayo quinasa. Tenemos dos IPs para cada construcción: una para realizar la reacción en presencia de CaM y otra para realizarla sin.

- El volumen total de la reacción es de unos 40  $\mu\text{l}$ : 10  $\mu\text{l}$  de volumen residual proveniente de la resina, 10  $\mu\text{l}$  de mezcla quinasa 4x y 20  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ . En la condición con CaM, se resta el volumen de proteína del agua.
- La mezcla quinasa 4x se prepara para todas las condiciones que tengamos y una más. Para una reacción esta mezcla quinasa 4x contiene:

Tampón quinasa 10x	4 $\mu\text{l}$
DTT 100 mM	0.2 $\mu\text{l}$
ATP 1 mM	1 $\mu\text{l}$
PKC	0.25 $\mu\text{l}$
$\text{CaCl}_2$ 100 mM	0.4 $\mu\text{l}$
$\text{H}_2\text{O}$	Hasta 10 $\mu\text{l}$

- La reacción quinasa comienza con la adición del ( $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ) ATP (3000 Ci/mmol). La reacción se incubó a 30°C durante 30 min. Para asegurar la homogeneidad de la mezcla, se realizan un par de vórtex durante la incubación.
- Parar la reacción y eluir las proteínas con 14  $\mu\text{l}$  de tampón de muestras 4x.
- Proseguir con la separación de las proteínas por electroforesis, tinción del gel, desteñido, secado y exposición. Se obtiene la imagen digital con el aparato “Phosphorimaging” de Bio-Rad.

#### V.6 Tratamiento de la muestra con fosfatasa.

En el tratamiento con fosfatasa de muestras provenientes de células tratadas con TPA y W13 el procedimiento fue el siguiente:

- Juntar los lisados provenientes de tres p100 de células NIH3T3 tratadas con W13 y TPA. El tampón de lisis es REB más inhibidores de proteasas pero no de fosfatasa. Los lisados se clarifican por centrifugación a 14000 rpm durante 10 min
- Dividir la muestra en tres tubos de 1.5 ml y proceder al ensayo de unión a RBD.
- Una vez precipitado el Ras activo, proceder al tratamiento con fosfatasa. Dejar una de las tres muestras intacta. A las otras dos les añadimos 20  $\mu\text{l}$  de  $\text{MnCl}_2$  10x (la fosfatasa depende del  $\text{Mn}^{2+}$ ) y a una de ellas 1,5  $\mu\text{l}$  de fosfatasa (Lambda Protein Phosphatase, 400,000 U/ml, Biolabs). Incubamos las muestras 30 min a 30°C.

- Eluir las muestras con tampón de muestra 4x y analizarlas por Western Blot.

#### IV.7 Ensayo de partición de fases con Tritón X-114

Bordier (Bordier, C. 1981) fue el primero que supo aprovechar las características físicas del Tritón X-114 para separar proteínas hidrofílicas y proteínas integrales de membrana (hidrofóbicas). Aplicado a las proteínas Ras, es un método para diferenciar aquellas proteínas que están modificadas postraduccionalmente (preniladas o miristoiladas) de aquellas que no lo están (Gutierrez, L. et al. 1989). Una solución del detergente no iónico Tritón X-114 es homogénea a 0°C pero por encima de los 20°C se separa en dos fases: una fase acuosa y una fase rica en detergente. La separación de fases se hace más patente cuando aumenta la temperatura. Así que, a una temperatura ambiente normal el Tritón X-114 forma soluciones miscelares claras pero cuando la temperatura sube a 20°C la solución se vuelve turbia debido a la formación de miscelas de elevado peso (la temperatura a la que ocurre esto es el llamado “cloud point”). Por debajo de la temperatura del “cloud point”, el Tritón X-114 solubiliza las proteínas de membrana. Cuando la temperatura sube por encima del “cloud point”, el Tritón ya no es soluble, se forman unas grandes miscelas que contienen proteínas hidrofóbicas aislándolas de la fase acuosa donde permanecen las proteínas hidrofílicas.

Aplicado a nuestro caso, el procedimiento para separar el Ras farnesilado (hidrofóbico) del no farnesilado (más hidrofílico) es el siguiente:

- Antes de empezar el experimento, preparamos una solución “stock” de Tritón X-114 al 10% en TBS frío. El método original de Bordier, (Bordier, C. 1981), realiza una precondensación de esta solución con la finalidad de eliminar los posibles contaminantes hidrofílicos del Tritón X-114. Pero una modificación del original por Brusca (Brusca, J. S. and Radolf, J. D. 1994) demostraba que este paso era innecesario. El no hacerlo no afecta a la eficiencia de la partición y por el contrario, el hacerlo produce un stock de Tritón X 114 de una concentración variable. Nosotras decidimos obviar esta precondensación y preparamos el stock al 10% directamente (para que fuera más exacto, pesábamos el tritón)
- Lisar las células: cada placa (partíamos de p100) se lisa con 1 ml de Tritón X-114 1% en TBS frío, más inhibidores de proteasas y fosfatas. Incubar los lisados 15 min, realizando dos vórtex entre medio.
- Centrifugar las muestras 10 min a 14000 rpm a 4°C. Pasar el sobrenadante a un tubo rotulado como D (de detergente) y reservar una alícuota de 30 µl.

- Incubar la muestra 2 min a 37°C (en un baño). La muestra, que se enturbia, se centrifuga a 13000 g 2 min a temperatura ambiente.
- Después de esta centrifugación observamos la formación clara de dos fases. La superior (unos 900 µl) es la fase A, de acuosa, libre de detergente, y la inferior (unos 100 µl) es la fase D, de detergente, donde éste se encuentra concentrado. Traspasamos la fase superior A a un tubo nuevo
- Restituir la concentración de detergente en las dos fases. A la fase A añadimos 100 µl de solución de Tritón X-114 al 10%, y a la fase D añadimos 900 µl de TBST
- Separar por electroforesis 30 µl de lisado, 30 µl de fase D y 30 µl de fase A, y lo analizamos por Western Blot mediante un anticuerpo anti-HA. Las proteínas Ras farnesiladas las encontraremos en la fase D y las no farnesiladas en la fase A.

## **VI. TÉCNICAS “IN VIVO”**

### **VI.1 Fosforilación “in vivo”**

Para la fosforilación “in vivo” se utilizó la línea celular NIH3T3 que expresaba constitutivamente el HA-K-Ras. El procedimiento fue el siguiente:

- Privar a las células de suero durante 24 h.
- Posteriormente incuba durante 2 h con medio libre de fosfato (DMEM phosphate free de GIBCO)
- Transcurrido ese tiempo, añadir a esos 4 ml de medio sin fosfato, 250 µl de fósforo radioactivo: P-32, ortofosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) en solución acuosa, 10 mCi/ml, Amersham Bioscience.
- Dejar incorporar el fósforo durante una h en el incubador
- Tratar las células con TPA (100 nM) y W13 (15 µg/µl), añadiéndolos al medio durante 10 min.
- Lavar las células tres veces con PBS y lisar las células con 500 µl de REB más inhibidores de proteasas y fosfatasas.
- Clarificar el lisado por centrifugación a 14000 rpm durante 10 min a 4°C.

- Traspasar el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 ml y añadir 30 µl de anticuerpo anti-HA acoplado a bolas de agarosa.
- Incubar la IP en rotación durante 2 h manteniendo los tubos a 4°C.
- Lavar la fracción unida tres veces con 500 µl de REB
- Eluir las muestras con 30 µl de tampón de muestras 2x.

## VI.2 Detección de células en fase S

### Incorporación de Bromodeoxuridina (BrdU)

Para medir la síntesis de DNA “in vivo” de células en cultivo, y poder así determinar la proporción de células que se encuentran en fase S, se utiliza la 5-bromo-2’deoxidurina (BrdU). Este compuesto es un análogo de la timidina, y como tal, se incorporará al DNA durante su síntesis, de igual manera que lo haría la base original. Posteriormente esta BrdU incorporada en el DNA se detectará por inmunocitoquímica con un anticuerpo específico anti-BrdU.

En este trabajo esta técnica la hemos aplicado para comparar la tasa de proliferación de unas líneas celulares. Se dejaba incorporar la BrdU durante un espacio corto de tiempo en el cultivo ciclante y tras realizar la inmunocitoquímica, se analizaba el porcentaje de células que habían realizado la fase S. El procedimiento y la inmunocitoquímica se detallan a continuación:

- Añadir la BrdU al medio a una concentración de 3 µg/ml durante 2 h.
- Transcurrido ese tiempo, aspirar el medio y hacer dos lavados de PBS
- Fijar las células con paraformaldehído al 4% durante 10 min a temperatura ambiente
- Permeabilizar las células con una solución de Tritón X-100 al 0.2% en PBS durante 5 min a temperatura ambiente
- Bloquear con una solución al 0.1% Tween y 1% BSA en PBS durante 20 min a temperatura ambiente
- Incubar 90 min con DNAsa (de la casa Roche) diluida 1:1 en PBS. La incubación se hace sobre gota, en una cámara húmeda a temperatura ambiente.
- Incubar con el anticuerpo primario anti-BrdU durante 1 h a 37°C en una cámara húmeda. Si también nos interesaba detectar las células que

expresaban HA-K-Ras, incubábamos junto con anti-BrdU, con anti-HA policlonal, y aumentábamos el tiempo de incubación a 1 h y media.

- Incubar con el anticuerpo secundario monoclonal de nuestro interés durante 30 min. Si habíamos incubado también con anti-HA, a la vez incubábamos con el anticuerpo secundario policlonal.
- Montar los cubres con Mowiol.

### **Incorporación de Timidina triada (T-H<sup>3</sup>)**

Esta es otra técnica para la detección de células en fase S. En este caso el análogo de la base Timidina es la H<sup>3</sup>-metil-timidina que se incorporará a las células que sintetizan DNA. Por el procedimiento que se detalla a continuación, se cuantifica la timidina radioactiva incorporada en la totalidad del cultivo.

Para células en adhesión:

- Sembrar las células en placas de seis pocillos de 35 mm con 1.6 ml de medio
- Añadir la T-H<sup>3</sup>, 8 µl (Amersham 1 mCi/ml, 5 Ci/mmol) por ml de medio. Dejar incorporar por espacio de 1 h mínimo.
- Lavar dos veces las células con PBS
- Añadir una solución de TCA 5% y pirofosfato sódico al 1% frío y dejar incubar a 4°C durante 30 min
- Lavar dos veces con la solución de TCA 5% y pirofosfato 1% frío.
- Lavar dos veces con PBS frío
- Añadir Etanol frío. Incubar de 2 a 10 h a 4°C. Si tuviésemos que procesar más placas, las dejaríamos en este punto y proseguiríamos con todas juntas.
- Retirar el etanol y secar el exceso dejando las placas en una estufa (70°C) unos min.
- Añadir 600 µl de 0.3 M NaOH en incubar 10 min
- Añadir a los tubos de centelleo 100 µl de HCl 1.5 M. Coger 500 µl de muestra de las placas y añadirlos al tubo de centelleo.
- Añadir 5 ml de líquido de centelleo y contar las cpms

Cuando las células crecen en suspensión:

- Recoger las células en el medio y centrifugarlas a 2000 rpm 5 min
- Lavar dos veces el pellet de células con PBS frío
- Lisar el pellet de células con 50  $\mu$ l de tampón de lisis (50 mM TrisHCl pH 7.5, 100 mM DTT, 0.2% de SDS)
- Añadir 1 ml de solución 5% TCA y 1% pirofosfato e incubamos 1 h a 4°C
- Centrifugar a 12000 rpm 5 min
- Descartar el sobrenadante y lavar el pellet dos veces con la solución de TCA.
- Añadir al último pellet 1 ml de Etanol absoluto frío e incubar 2-10 h a 4°C.
- Centrifugar a 12000 rpm 10 min y descartar el sobrenadante
- Secar los pellets en la estufa a 37°C
- Añadir 500  $\mu$ l de 0.3 M NaOH, resuspender el pellet e incubar 1 h a 4°C
- Añadir 100  $\mu$ l de 1.5 M HCl para neutralizar
- Recoger 500  $\mu$ l de muestra y dejar en el tubo de centelleo. Añadir 5 ml de líquido de centelleo. Contar las cps

### VI.3 Análisis del tiempo de vida media de Ras

El tiempo de vida media de Ras, es decir el tiempo que tarda en degradarse el 50% de la cantidad total de la proteína, está descrito que es de 24 h (Ulsh, L. S. and Shih, T. Y. 1984). Para comparar el  $t_{1/2}$  de K-Ras y de otros mutantes, células NIH3T3 transfectadas con estas construcciones se trataron con cicloheximida (Sigma) que inhibe la traducción de las proteínas.

La cicloheximida se prepara a una concentración de 10 mg/ml en un tampón 25 mM HEPES pH. 7.5 y se añade al cultivo a una concentración de 100  $\mu$ g/ml. En este momento se recoge el punto “0h”. Se incuban las células durante más tiempo y se van recogiendo a 8 h, 24 h, 32 h, 48 h, 56 h, 72 h.

Las células se recogen en PBS y obtenemos el pellet que se congelada a -80°C. Cuando tenemos los pellets de todos los puntos, lisamos las células y normalizamos la cantidad de proteína por el método de Bradford. Las muestras son cargadas en un gel

de acrilamida y mediante Western Blot con un anticuerpo anti-HA, se detectan los niveles de proteína en cada muestra.

#### **VI.4 Ensayo de formación de focos.**

Para comparar la capacidad transformantes de nuestros mutantes se utilizó el ensayo de formación de focos (Wigler, M. et al. 1977). El procedimiento es el siguiente:

- Sembrar pocillos de p35 por cuadruplicados con unas 200.000 células NIH3T3 por pocillo de un día para otro.
- Al día siguiente transfectar las células con Lipofectamine 2000. Transfectar 20 ng de Ras más un DNA carrier hasta la cantidad de DNA recomendada por el fabricante para transfectar.
- Después de 24 h de expresión, tripsinizar las células y sembrarlas en p100. Guardamos una pequeña proporción de células para tener un control de transfección.
- Cuando la p100 está confluyente, cambiar el medio DMEM 10% DCS por medio DMEM 5%.
- Cultivar las células por espacio de 15 días. Realizar cambios de medio y observarlas periódicamente por si fuera necesario intervenir antes.
- Tras ese tiempo, lavar las células dos veces con PBS. Fijar y teñir las células con una solución 1% de cristal violeta en etanol al 70%. Extremar precauciones porque el cristal de violeta es muy tóxico. Se deja unos minutos.
- Retirar el cristal violeta (se puede reciclar para varias tinciones). Lavar con agua destilada hasta que el lavado salga limpio, libre de cristal violeta. Como este producto es tan tóxico, los lavados se recogen en un recipiente (no lanzar por la pica) para luego gestionar el residuo adecuadamente.

#### **VI.5 Ensayos de crecimiento de células en suspensión.**

##### **Crecimiento en placas tratadas con poly-HEME.**

Una manera de comparar y evaluar la capacidad de una línea celular de proliferar en suspensión es a través de estudiar la capacidad de síntesis de DNA en esas condiciones. Se cuantifica la incorporación de timidina triada (como se ha explicado

anteriormente) que realizan las células estando en suspensión, comparando con la que realizan estando adheridas a la placa. Para mantener las células en suspensión evitando que se adhieran, las placas se tratan con el polímero inerte poli (2-Hidroxietil metacrilato) (poly-HEME, Sigma).

Para preparar las placas con poly-HEME (protocolo para placas de 6 p35):

- Preparar una solución al 1% de poly-HEME en etanol al 95% (en agua)
- Filtrar la solución para esterilizarla (filtro de 0.2 $\mu$ m)
- Se añaden 0.65 ml de solución al pocillo de 35 mm (este volumen dependerá del tamaño de la placa: para p100 serían 4 ml, para p60 1.5 ml)
- Dejar las placas abiertas dentro de la campana de flujo laminar hasta que se evapore el etanol.
- Una vez secas, volver a añadir 0.65 ml de solución de poly-HEME y esperar a que se sequen.
- Antes de sembrar las células, lavar las placas dos veces con PBS.

Para realizar la incorporación de timidina titriada de células que crecen en placas poly-HEME:

- Sembrar en las placas p35 de poly-HEME, 200.000 células en 1.6 ml de medio.
- Incubar las células durante 17 h
- Transcurrido ese tiempo, incorporar la timidina titriada por espacio de una hora.

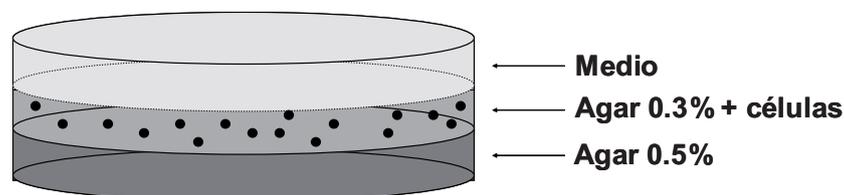
Para recoger las células y tratar las muestras, seguiríamos el procedimiento explicado en el punto V.II.

### **Crecimiento en agar blando**

Otra técnica para evaluar la capacidad de una línea celular de crecer en suspensión, es a través de la formación de colonias en agar blando. El procedimiento es el siguiente:

- Preparar una solución al 2% de agar. Autoclavar. Autoclavando conseguimos esterilizar la solución y disolver completamente el agar.

- Enfriar y mantener en una estufa a 45°C. No bajar de esta temperatura para impedir que solidifique la solución.
- Preparar una mezcla 3:1 DMEM 10% DCS (el medio en el que crecen nuestras células): solución agar 2%. Queda una solución al 0.5% de agar en medio. Añadimos 1 ml de esta solución a cada pocillo de 35 mm y repartirlo suavemente por la placa, ha de quedar uniforme. Para que gelifique esta capa, dejamos las placas 15 min a 4°C y posteriormente 10 min a temperatura ambiente. Hasta que las utilicemos podemos dejar las placas en el incubador a 37°C.
- Contar las células a sembrar. Si partíamos de células transfectadas sembrábamos 50.000 células por pocillo y si partíamos de líneas estables sembrábamos unas 5.000.
- Por pocillo añadir 1 ml de una mezcla 1:1 de medio con las células a sembrar y de solución 0.6% de agar (preparada a partir de la del 2%). Sembrar siempre 4 réplicas por condición, así que preparar la mezcla para 5 réplicas. Por lo tanto necesitamos 5 ml de los cuales, 2.5 ml provendrán de las células (si el número de células necesario se corresponde con un volumen menor, añadimos medio hasta los 2,5 ml) y los otros 2.5 ml provienen de la solución al 0.6 % de agar. Aplicamos, de esos 5 ml, 1 ml por pocillo sin hacer burbujas.
- Dejar las placas unos 20 min a 37°C para que solidifique esa placa. Después añadir 1 ml de medio.
- Incubar las células por espacio de tres semanas. A simple vista se observaran puntos que en el microscopio se corresponden con grandes agregados de células. Las imágenes se captan con una cámara acoplada a una lupa. Se cuentan las colonias.



## VI.6 Ensayos de migración: “Wounding Assay”

Para evaluar diferencias en la capacidad migratoria de las células hemos utilizado el método de “Wounding Assay” o daño de la monocapa.

Este método consiste en, una vez tenemos las células ocupando la mayor parte de la superficie de la placa, realizar con una punta amarilla de pipeta una línea entre dos puntos. Con esto conseguimos provocar una “herida” en la monocapa. Las células se irán moviendo, irán migrando, hasta ocupar el espacio abierto con la punta y después de un tiempo reconstituirán la monocapa. Mirando al microscopio a diferentes tiempos, entre dos puntos de referencia, según el número de células que ocupan el espacio se puede evaluar si hay células de alguna condición que migran más o menos.

Nosotras tomamos fotos a tiempo 0 (recién provocada la herida) y 24 h después. Las imágenes fueron tomadas con una cámara acoplada a un microscopio de platina monitorizada, ya que nos permitía marcar una zona de referencia entre dos puntos cuando observábamos a tiempo 0 y cuando volvíamos a colocar la placa para la evaluación 24 h más tarde, nos localizaba esa misma zona de referencia. Con las dos fotos podíamos analizar si la herida estaba más cerrada en una condición que otra y así poder evaluar si unas células migraban más.

## VI.7 Ensayos de viabilidad con MTS.

Los ensayos de MTS son una forma colorimétrica de determinar la viabilidad de las células en condiciones determinadas de proliferación o citotoxicidad. La solución comercial (CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent, Promega) contiene el compuesto MTS en un solvente en el que es estable. El tetrazolium MTS es bio-reducido por las células formándose un compuesto colorimétrico soluble en el medio de cultivo. Esta reducción del compuesto es producida por las deshidrogenasas de las células metabólicamente vivas. Los ensayos se realizan añadiendo este compuesto al medio, se incuban de 1-4 h y por último se lee a una absorbancia de 490 nm en un lector colorimétrico de placas de Elisa.

Se cuentan las células a sembrar en las placas de 96 pocillos con la cámara de Neubauer. Se llevan a un volumen tal que, 100 µl de medio contuvieran 1.500 células (es decir, a una concentración de 15.000 células/ml). Con la pipeta multicanal sembramos las células por cuadruplicados y dos filas diferentes. A algunos pocillos añadimos sólo 100 µl sin células para restar el *background*.

El día del ensayo añadimos 20 µl de reactivo MTS por pocillo. El protocolo del fabricante aconseja una incubación de 1-4 h. El medio pasa de un amarillo a un

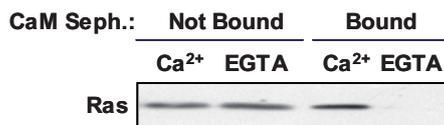
marrón más o menos oscuro. Nosotras, transcurrida la primera hora de incubación observábamos la placa y si se había producido el cambio de color, realizábamos la lectura a 490 nm. A la hora de cuantificar se hace la media de los tres cuádruplicados y se analiza si entre las dos filas (que provenían de dos pipeteos diferentes) existe menos de un 20% de diferencia. Si la diferencia sobrepasa ese valor el ensayo no tiene validez. A los valores de absorbancia de los pocillos con células se restaba el valor de absorbancia de los pocillos que sólo contenían medio.



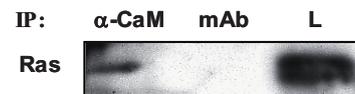


## ANTECEDENTES.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Villalonga, Priam et al. 2001) demostraron que K-Ras es una proteína de unión a CaM (es una Calmodulin binding protein, CaMBP). Esta unión tenía lugar “*in vivo*”, como demostraban los experimentos de cromatografía de afinidad, en los que extractos de células NIH3T3 eran pasados por una columna de calmodulina-sefarosa y se observaba K-Ras en la fracción unida, y también lo demostraba la coimmunoprecipitación de K-Ras con anticuerpos anti-CaM.



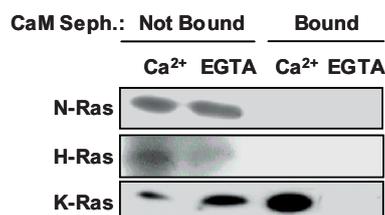
**Figura A. Ras se une a CaM-Sefarosa en presencia de Calcio.** Extractos celulares fueron incubados con CaM sefarosa en presencia de calcio o EGTA. La fracción unida y no unida fue analizada por Western blot con anticuerpo pan Ras



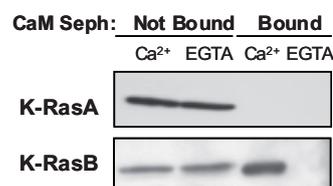
**Figura B. Ras co-inmunoprecipita con anti-CaM.** Extractos celulares de NIH3T3 fueron incubados con anticuerpos anti-CaM o con suero control. Los inmunoprecipitados fueron analizados por Western blot utilizando un anticuerpo anti-pan-Ras.

Esta interacción también ocurría a partir de las proteínas purificadas: K-Ras expresada y purificada a partir de células de insecto SF9, e incubada con Calmodulina unida a Sefarosa también era capaz de unirse específicamente. Esto demostraba que la unión entre estas dos proteínas era directa, no ocurría a través de ninguna proteína puente, como se podría suponer de los experimentos a partir de extractos celulares.

La unión de Ras a CaM es específica de isoforma: de las tres isoformas de Ras, únicamente K-RasB (no K-RasA, ni H-Ras, ni N-Ras) era capaz de interactuar.

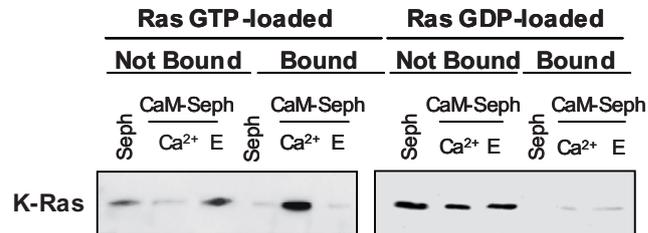


**Figura C. K-Ras es la isoforma que une CaM y no H o N-Ras.** Extractos celulares pasados por una columna de Calmodulina-Sefarosa fueron analizados tanto en la fracción unida como no unida con anticuerpos específicos anti-K, anti-H o anti-N-Ras.



**Figura D. K-RasB es la forma que une CaM y no K-RasA.** El mismo experimento realizado en la figura C, pero la fracción unida y no unida fue analizada por Western blot con anticuerpos específicos anti-K-RasB o A.

También se demostró que la unión de Ras a CaM-sefarosa en extractos celulares se produce cuando éste está en forma GTP (forma activa) y no cuando está unido a GDP (forma inactiva).



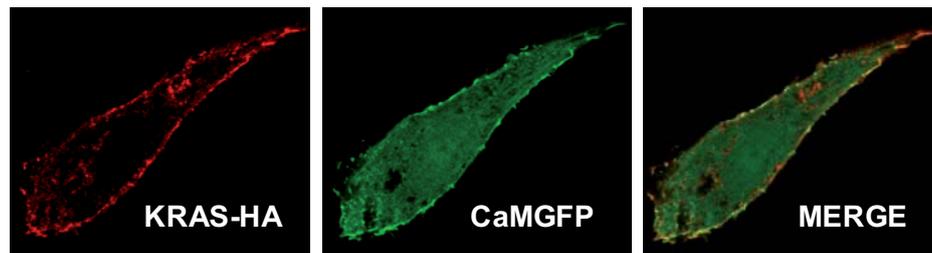
**Figura E. Unión directa de la proteína purificada K-Ras cargada con GTP a Calmodulina-Sefarosa.** K-RasV12-GST fue expresado en células SF9 y posteriormente purificado y cargado con GDP o GTP. Estas proteínas fueron incubadas con bolas de CaM-Sefarosa y la fracción unida y no unida fueron analizadas por Western-Blot con anticuerpo pan-Ras.

## I. ESTUDIO DEL DOMINIO DE UNIÓN DE K-RAS A CaM.

### I.1 Ras y CaM colocalizan “in vivo”

Como hemos visto en el apartado de antecedentes, estudios previos del grupo habían demostrado una unión “in vivo” de Ras a CaM. Con el fin de profundizar en el estudio de esta interacción nos interesó analizar una posible colocalización de estas dos proteínas a través de la microscopía de fluorescencia.

Células NIH3T3 fueron transfectadas con HA-K-Ras (el cual es detectado por inmunofluorescencia con un anticuerpo primario monoclonal anti-HA y posteriormente uno secundario Alexa594) y con GFP-CaM (que emite fluorescencia verde). Como se muestra en la figura I.1 Ras y CaM colocalizan en zonas de membrana plasmática, sin embargo, la colocalización en el citoplasma es muy baja. Esto da soporte a la existencia de la interacción entre estas dos proteínas “in vivo” y, a que esta interacción tiene lugar mayoritariamente en la membrana plasmática.



**Figura I.1 K-Ras y CaM co-localizan en zonas de membrana plasmática.** Células NIH3T3 fueron transfectadas con HA-K-Ras y con GFP-CaM y fijadas con paraformaldehído 4%. Se realizó una inmunocitoquímica anti-HA con un secundario conjugado con Alexa594. El análisis por microscopía óptica confocal demuestra la colocalización de Ras y CaM en zonas de membrana plasmática.

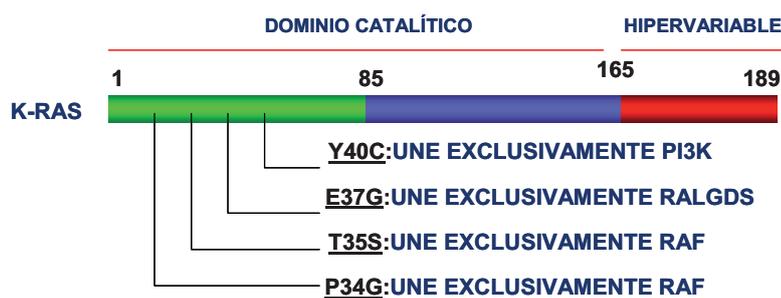
### I.2 Mutaciones en el dominio efector de Ras no afectan a la unión a CaM.

Con el fin de estudiar el dominio de unión de Ras a CaM, quisimos analizar si mutaciones en el dominio efector de Ras, afectaban a esta unión. Esta región nos resultaba interesante porque como se demostró en el trabajo previo de Villalonga et al, (Villalonga, Priam et al. 2001), K-Ras se une específicamente a CaM cuando está en la conformación activa y, es en esta conformación activa cuando Ras se une a sus efectores. Para ello utilizamos unos mutantes ya descritos en la bibliografía (Rodríguez-Viciano, P. et al. 1997, White, M. A. et al. 1995) y cedidos por el Dr. JM Rojas. Dichos mutantes tienen un cambio de aminoácido en el dominio efector (ver

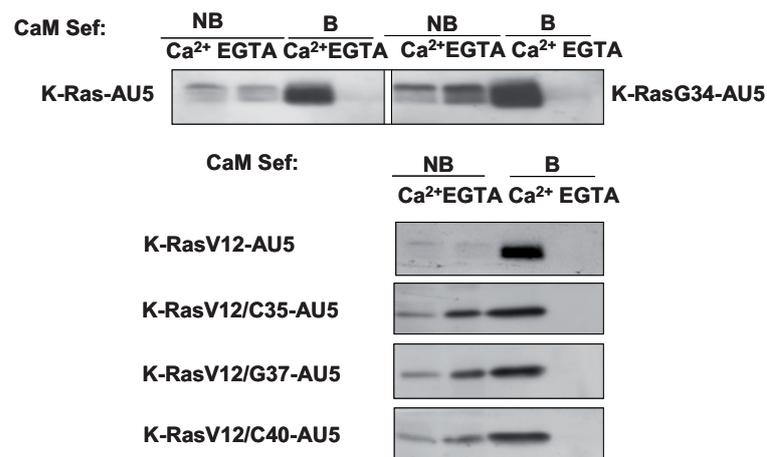
figura I.2.A) que hace que Ras se una exclusivamente a uno solo de sus efectores (Raf, PI3K o RalGDS) y pierda la unión a los otros dos. Por ejemplo, el mutante K-RasY40C se une exclusivamente a PI3K y no a Raf ni a RalGDS. Esto nos ayudaría a discernir si para la unión con CaM, Ras necesita intacta la capacidad de unirse a uno de sus efectores.

Transfectamos estos mutantes y el control en células NIH3T3. Éstas fueron lisadas con el tampón (descrito en el apartado de materiales y métodos) en el que se realiza posteriormente el ensayo de unión a CaM-Sefarosa. Este tampón (como demostramos en el trabajo (Villalonga, Priam et al. 2001)) permite el intercambio de nucleótido de Ras y como en la célula abunda el GTP conseguimos obtener una gran proporción de Ras-GTP en el lisado celular. Incubamos los extractos celulares con CaM-Sefarosa en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  o EGTA. Tras dos horas de incubación se analizó por Western blot, tanto la fracción unida como la no unida, con un anticuerpo específico anti-AU5, ya que es el tag con el que están conjugados los mutantes y así identificamos selectivamente nuestras proteínas transfectadas.

Como se puede observar en la figura I.2.B, tanto el mutante Y40C que une exclusivamente PI3K, como los mutantes E37G que une solamente RalGDS y los mutantes T35S y P34G que unen únicamente Raf, no ven afectada su unión a Calmodulina en presencia de calcio. Esto nos indica que la unión de Ras a CaM no utiliza los mismos aminoácidos que la GTPasa utiliza para unir los efectores estudiados. Además la interacción Ras-CaM no depende de la unión de Ras a estos efectores.



**Figura I.2.A Esquema de los mutantes del dominio efector de Ras estudiados.** Se señalan las mutaciones del dominio efector de Ras de los mutantes utilizados en este experimento y el efecto que produce en la capacidad de Ras de unirse a unos efectores determinados.



**Figura I.2.B Mutaciones en el dominio efector de Ras no afectan a la unión a CaM** Los mutantes AU5-K-RasWT/G34, AU5-K-RasV12/C35, AU5-K-RasV12/G37 y AU5-K-RasV12/C40, así como los controles AU5-K-Ras y AU5-K-RasV12 fueron transfectados en células NIH3T3 y los lisados fueron incubados con la resina CaM-Sefarosa. La fracción unida (B) y 1/10 de la no unida (NB) fueron analizadas por Western blot con un anticuerpo anti-AU5.

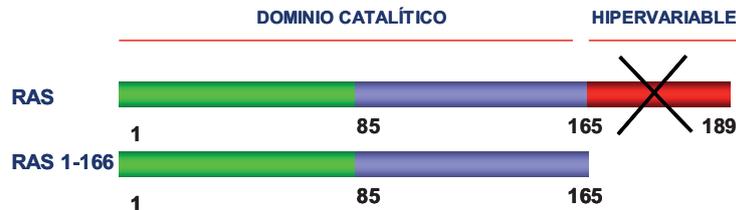
### I.3 Las isoformas K y H-Ras con el dominio hipervariable delecionado se unen a CaM “in vitro”

En el estudio del dominio de unión de Ras a CaM, lo siguiente que nos interesó fue analizar si K-Ras sin el dominio hipervariable podía unir CaM. Dado que los experimentos previos realizados a partir de extractos celulares y a partir de las proteínas purificadas habían puesto de manifiesto que K-Ras era la única isoforma capaz de unir CaM (Villalonga, Priam et al. 2001) y dado que estas tres proteínas se diferencian mayoritariamente en el extremo carboxi-terminal, era posible que el dominio de interacción de Ras a CaM estuviera en esta región.

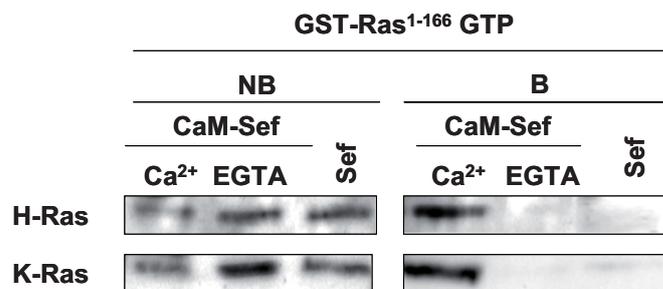
Para analizarlo, se construyeron las proteínas K, H y N-Ras con el dominio hipervariable delecionado (en el caso del K-Ras del aminoácido 167 al 188 y en el del H y N-Ras del 167 al 189) y fusionadas a GST, se expresaron en bacterias y se procedió a su purificación y carga con el nucleótido GTP (recordemos que es en la conformación activa cuando K-Ras une CaM). Una vez obtenidas las proteínas se pasó a la incubación con resina CaM-Sefarosa mediante técnica de “pull-down” y posteriormente se analizó mediante Western blot con un anticuerpo pan-Ras.

El resultado, que podemos observar en la figura I.3.B, fue que, no sólo la proteína K-Ras sin el dominio hipervariable seguía siendo capaz de unir CaM “in vitro” si no que además las proteínas H y N-Ras (ésta última no se muestra en la figura) que en la

forma entera de la proteína no unían CaM, ahora en la forma con el dominio hipervariable deleciónado si que eran capaces de interactuar con CaM. Esto nos sugería que la región hipervariable no era necesaria para la interacción entre las dos proteínas y que además el dominio de unión se podría localizar en una zona común a las tres isoformas pero que “in vivo” en el caso del K-Ras estaría expuesta para interactuar con CaM, y en el caso de las otras isoformas estaría oculta.



**Figura I.3.A. Esquema de la deleción** que se realizó a las proteínas H, K y N-Ras para obtener unas construcciones sin el dominio hipervariable

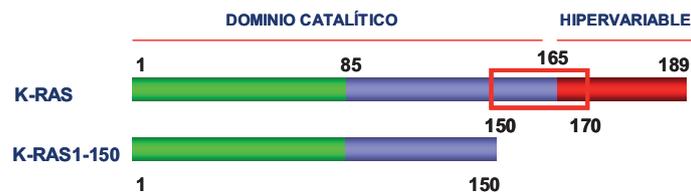


**Figura I.3.B Las proteínas H y K-Ras sin el dominio hipervariable interactúan con CaM “in vitro”** Ambas proteínas deleciónadas y fusionadas con GST fueron expresadas en bacterias, purificadas y cargadas con GTP, para luego proceder a su incubación con CaM-Sefarosa. Las fracciones unida y no unida a la resina, fueron analizadas por Western blot utilizando el anticuerpo pan-Ras

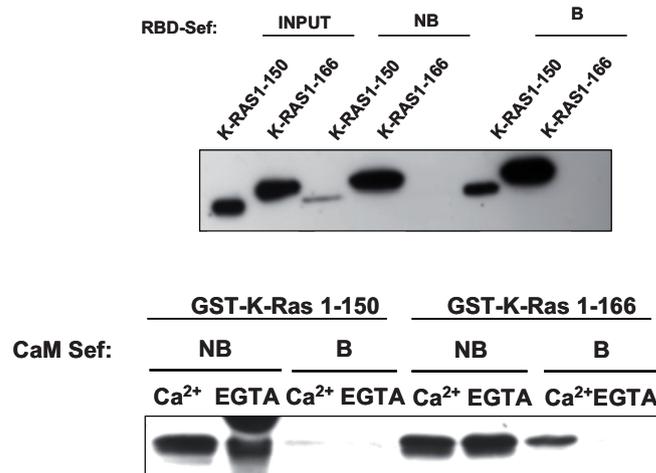
#### **I.4 La $\alpha$ -hélice comprendida entre los aminoácidos 150 y 166 es necesaria para la unión de K-Ras purificada a CaM**

Dado que el dominio hipervariable de K-Ras purificado no parecía ser imprescindible en la interacción con CaM, quisimos averiguar si los aminoácidos responsables de la unión estaban incluidos en la  $\alpha$ -hélice comprendida entre el aminoácido 150 y el 170. El motivo de nuestro interés por esta  $\alpha$ -hélice es porque se sabe que, aunque no se pueda hablar de una secuencia consenso para las CaMBPs, CaM une preferentemente aminoácidos que se estructuran en una  $\alpha$ -hélice básica anfipática, y por tanto, nuestra  $\alpha$ -hélice 150-170 podría ser una candidata.

Por ello, hicimos una primera aproximación construyendo un K-Ras hasta el aminoácido 150 incluido. Deleccionamos así, tanto la  $\alpha$ -hélice como el dominio hipervariable. Además esta construcción se fusionó a GST para facilitar su purificación. Procedimos a su expresión en bacterias, su purificación y carga con GTP. Antes de proceder al análisis de la unión a CaM, quisimos comprobar que la proteína efectivamente unía el nucleótido GTP y para ello realizamos un “pull-down” con RBD. Habíamos demostrado que la unión de Ras a CaM era dependiente de su conformación activa y por lo tanto cabía comprobar que nuestro mutante K-Ras1-150 fuera capaz de unir GTP. Tras este ensayo, tal como se muestra en la parte superior de la figura I.4.B, pudimos comprobar que este mutante K-Ras1-150 seguía siendo capaz de unirse a RBD, al igual que el mutante K-Ras1-166, y procedimos al ensayo de unión con CaM. Como se puede ver en la figura I.4.B, K-Ras1-150 perdía la capacidad de interaccionar con CaM, como control positivo se muestra la unión en el mismo experimento del mutante K-Ras1-166, sugiriendo que en la  $\alpha$ -hélice 150-170 se hallaban los aminoácidos responsables de la unión.



**Figura I.4.A Esquema del K-Ras 1-150.** Se indica la situación de la  $\alpha$ -hélice y de la deleción realizada para formar el mutante K-Ras1-150.



**Figura I.4.B K-Ras 1-150 no une CaM.** En el panel superior las proteínas purificadas K-Ras1-150 y K-Ras1-166 se incuban con RBD (Ras Binding Domain de Raf) unido covalentemente a sefarosa. Ambas proteínas conservan la capacidad de unir RBD. En la parte inferior de la figura, la proteína GST-K-Ras1-150 purificada y cargada con GTP se incuban con CaM-Sefarosa, así como el control positivo GST-K-Ras1-166. La fracción unida y no unida se analiza por Western blot con un anticuerpo pan-Ras. Observamos que GST-K-Ras1-150 no aparece en la fracción de unión en presencia de calcio y si el control GST-K-Ras 1-166.

### **I.5 Las construcciones de las isoformas K, H y N-Ras sin el dominio hipervariable no unen CaM “in vivo”**

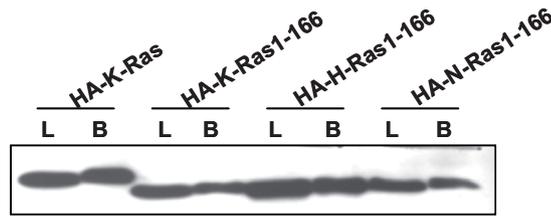
Ya sabíamos que las proteínas K, H y N-Ras sin el dominio hipervariable, purificadas de lisados bacterianos y sometidas a un “pull-down” con la resina CaM-Sefarosa eran capaces de unir Calmodulina. Nos interesó saber y comprobar si en un contexto celular también tenía lugar la interacción. Para ello construimos estos mutantes sin el dominio hipervariable con un tag HA y pasamos a transfectarlos en células NIH3T3. Los lisados se incubaron con CaM-Sefarosa en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  o EGTA, y tanto parte del lisado como la fracción unida y no unida a la resina fueron analizados por Western Blot mediante un anticuerpo específico anti-HA.

Como control positivo también se transfectó y analizó la unión del HA-K-Ras entero. Paralelamente al ensayo de unión a CaM, y para demostrar que en los lisados los mutantes K, H y N-Ras estaban cargados con GTP y eran por tanto susceptibles de unir CaM, realizamos también con los mismos extractos un ensayo de unión a RBD. Recordemos que el tampón con el que se lisaba las células y se realizaba el ensayo de unión a CaM, es un tampón que permite el intercambio de nucleótido y como en la célula hay una gran cantidad de GTP, Ras en el lisado se carga preferentemente con este nucleótido (Villalonga, Priam et al. 2001)

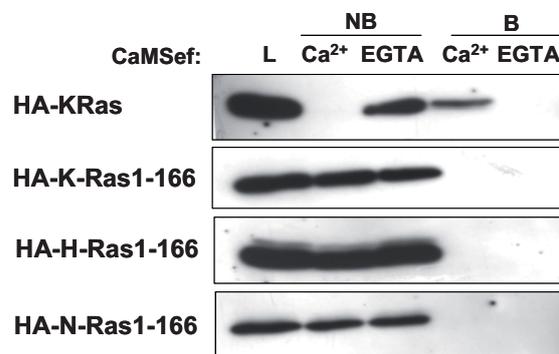
Como se observa en la figura I.5.A, todos los mutantes son capaces de unirse a RBD, por tanto se demuestra que en los lisados tenemos las GTPasas cargadas con GTP y que por tanto éste no será un factor limitante para la unión a CaM.

Como podemos observar en la figura I.5.B, los mutantes de K, H y N-Ras, sin el dominio hipervariable, expresados en células NIH3T3 e incubados directamente a partir del extracto celular con CaM-Sefarosa, no aparecen en la fracción unida a CaM.

Así pues, si bien al analizar la interacción a partir de proteínas purificadas la región hipervariable no es imprescindible y habría una unión dependiente de la región 150-166, el dominio hipervariable si que es esencial cuando se analiza la interacción de K-Ras a CaM a partir del lisado celular. Cobra, así, importancia el dominio hipervariable de K-Ras como región esencial para la unión a CaM “in vivo”.



**Figura I.5.A. Los mutantes K, H, N-Ras1-166 tienen capacidad de unir GTP.** Los mutantes HA-K-Ras1-166, HA-H-Ras1-166 y HA-N-Ras1-166HA fueron transfectadas en células NIH3T3. Se obtuvieron unos lisados con los que se realizaría el ensayo de unión con CaM y una fracción de estos mismos lisados fue incubada con RBD-GST conjugado con Glutaciona-Sefarosa para demostrar la carga de GTP de los mutantes. Se analizó por Western Blot con anticuerpo anti-HA tanto una alícuota de lisado (L), como la fracción unida a RBD (B).



**Figura I.5.B Los mutantes K, H, N-Ras1-166 no unen CaM a partir de lisados celulares.** Las construcciones HA-K-Ras1-166, HA-H-Ras1-166 y HA-N-Ras1-166HA fueron transfectadas en células NIH3T3. Los lisados fueron incubados con CaM-Sefarosa y tanto la fracción unida (B) como no unida (NB) se analizaron por Western Blot con un anticuerpo específico anti-HA.

## **L.6 Mutaciones puntuales en la región 150-166 afectan a la unión de K-Ras a CaM pero también afectan a la localización de Ras**

Aunque el resultado anterior parece conceder una mayor importancia al dominio hipervariable en la interacción “in vivo” entre K-Ras y CaM, la región 150-166 parecía participar en la unión a partir de las proteínas purificadas. Para analizar el papel de esta región “in vivo” pasamos a obtener unas construcciones con mutaciones puntuales en esta zona y a estudiar cómo afectaban a la unión a CaM. Hay que tener presente que, a parte de describir los aminoácidos de K-Ras responsable de la unión a CaM, otra finalidad del estudio era obtener un mutante incapaz de unir CaM, para así sernos útil en el estudio de la regulación de Ras por CaM. Por ello, paralelamente al análisis de la unión o no de los mutantes puntuales de la región 150-170 a CaM, también se comprobó su unión a GTP mediante “pull-down” a RBD, así como su localización en la membrana mediante inmunofluorescencia anti-HA, como garantías de la funcionalidad de estos

mutantes. El ensayo de unión a CaM y el ensayo de unión a RBD se realizaban a partir del mismo lisado, que se obtenía tras lisar las células con el tampón que permitía el intercambio de nucleótido y la consiguiente carga de Ras con GTP.

Como se ha comentado en la introducción, aunque no hay una secuencia consenso de unión a CaM, si que muchas de las CaMBPs presentan en sus dominios de unión una  $\alpha$ -hélice anfipática. Esto quiere decir que los aminoácidos apolares se distribuyen en una zona de la  $\alpha$ -hélice y los aminoácidos polares en otra. En el caso de las CaMBPs, la región de la  $\alpha$ -hélice hidrofóbica interaccionaría con los aminoácidos hidrofóbicos de la calmodulina, y los aminoácidos polares, en este caso básicos, interaccionarían con los aminoácidos polares ácidos de la CaM. Por lo tanto a la hora de diseñar mutantes de unión a CaM son varias las estrategias que se pueden seguir: mutar aminoácidos con la finalidad de reducir la hidrofobicidad o la basicidad de la  $\alpha$ -hélice, o mutar aminoácidos para intentar destruir la estructura secundaria de  $\alpha$ -hélice.

A continuación, por apartados, se describe los mutantes que obtuvimos y se muestra los ensayos de unión a CaM y a RBD, así como también las inmunocitoquímicas realizadas.

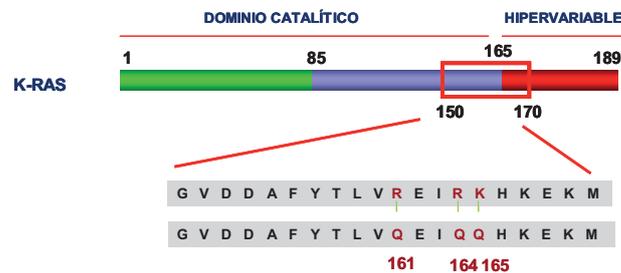
### **I.6.1 Cambios de aminoácidos básicos por glutaminas en la región 150-166, no afectan a la unión a CaM**

Con el fin de disminuir la basicidad en la región 150-166, sustituimos aminoácidos polares básicos por aminoácidos polares sin carga, neutros. En concreto, sustituimos la arginina 161 y 164 y la lisina 165, aminoácidos con carga positiva, por glutaminas que son aminoácidos neutros. A este mutante les llamamos WTQQQ por las tres glutaminas introducidas sobre la forma WT de Ras (glicina 12), o V12QQQ porque además de las tres glutaminas esta forma presentaba la mutación por valina en el codon 12. Estas construcciones se clonaron en un plásmido que contuviera el tag HA, para así poderlas transfectar en las células e identificarlo selectivamente tanto por inmunocitoquímica como por Western con un anticuerpo anti-HA. En la figura I.6.1.A hemos añadido un esquema que representa las mutaciones que se realizaron.

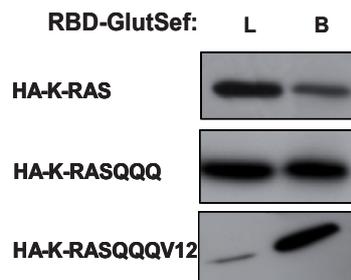
Así pues, transfectamos el mutante QQQ en células NIH3T3. Los lisados celulares fueron divididos en dos alícuotas: una de ellas fue incubada con RBD para comprobar que la proteína unía GTP y la otra se incubó con la resina CaM-Sefarosa para analizar la unión o no a CaM. En la misma placa donde sembramos las células para obtener los lisados, también colocamos unos cubres para realizar la inmunocitoquímica que nos revelaría donde se localizaba nuestro mutante QQQ.

En la figura I.6.1.B podemos comprobar que tras realizar el ensayo de unión a RBD, el mutante QQQ es capaz de unir GTP ya que aparece en la fracción unida. En la figura I.6.1.C se muestra la inmunocitoquímica anti-HA que se realizó a las células transfectadas con el mutante QQQ. El resultado de esta inmunocitoquímica fue analizado por microscopia confocal. Estas imágenes tomadas nos muestran que el mutante QQQ se localizaba normalmente en la membrana plasmática.

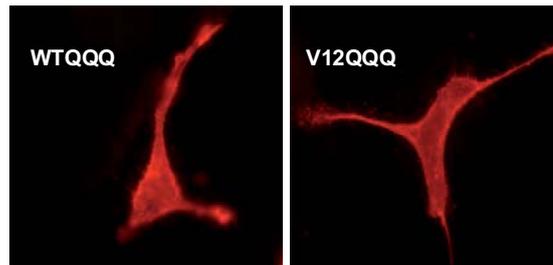
En la figura I.6.1.D Se muestra el Western blot que se realizó con una alícuota de lisado, una de la fracción no unida y la unida a la resina CaM-sefarosa, tras el ensayo de unión. Como se puede comprobar, el mutante QQQ aparece en la fracción unida, demostrándonos que estos cambios de aminoácidos básicos por aminoácidos neutros no han afectado a la unión de K-Ras a Calmodulina.



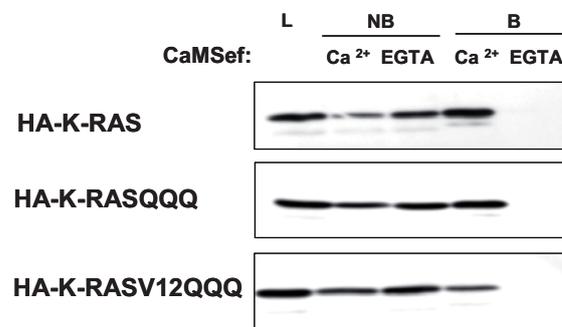
**Figura I.6.1.A. Esquema del mutante QQQ.** Se indica dentro de la secuencia de la región 150-170 donde se efectuó el cambio de aminoácidos básicos por el aminoácido neutro Glutamina. Estas mutaciones se incluyeron tanto en la secuencia del K-RasG12 (WT) como del mutante K-RasV12



**Figura I.1.6.B. El mutante QQQ es capaz de unir el nucleótido GTP.** Una parte de los lisados de células transfectadas con HA-K-Ras wt, o HA-K-RasQQQ o HA-K-RasV12 o HA-K-RasV12QQQ, fueron incubados con RBD-GST acoplado a bolas de glutatona-sefarosa. La fracción unida al RBD (B), junto con una alícuota del lisado (L) para comprobar la transfección, fueron analizadas por Western Blot con un anticuerpo anti-HA



**Figura I.6.1.C. Localización del mutante HA-K-RasQQQ y del HA-K-RasV12QQQ.** Células NIH3T3 transfectadas con los mutantes indicados, fueron fijadas con paraformaldehído 4%. Se incubaron con un anticuerpo primario anti-HA y posteriormente con uno secundario conjugado a Alexa594 que emite luz roja. Estas imágenes fueron captadas con un microscopio confocal y revelan que tanto el HA-K-RasQQQ como el HA-K-RasV12QQQ se localizan en la membrana plasmática.



**Figura I.6.1.D Los mutantes HA-K-RasQQQ y HA-K-RasV12QQQ interaccionan con CaM.** Los mutantes HA-K-RasQQQ y HA-K-RasV12QQQ fueron transfectados, al igual que el control HA-K-Ras en células NIH3T3 y los extractos celulares fueron incubados con CaM-Sefarosa en presencia o no de calcio. Tanto una 1/10 del lisado como la fracción unida (B) y 1/10 de la no unida (NB) a la resina fueron analizados por Western Blot mediante un anticuerpo contra el “tag” HA

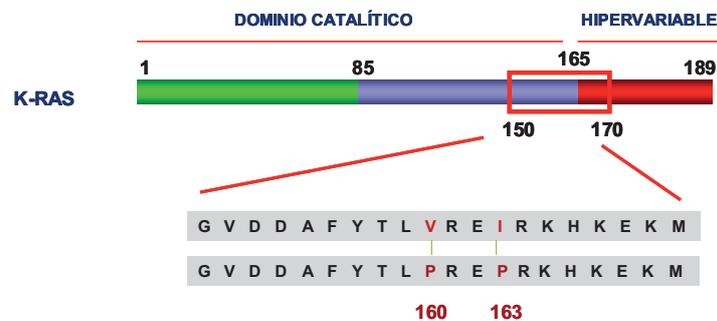
## **I.6.2 La sustitución de aminoácidos hidrofóbicos de la región 150-166 por prolinas, produce una pérdida de unión a CaM, al mismo tiempo que produce una deslocalización de Ras.**

Dado que el cambio de aminoácidos básicos por glutaminas en la secuencia 150-166 no había afectado a la unión de Ras a CaM, seguimos con la búsqueda de un mutante de no unión y cambiamos de estrategia. Esta vez sustituimos la valina 160 y la isoleucina 163 por prolinas. Con estos cambios conseguimos desestructurar la  $\alpha$ -hélice. La prolina debido a su radical en forma de anillo cíclico es una aminoácido rígido y desestructura la  $\alpha$ -hélice. Estas mutaciones las introdujimos tanto en la secuencia del K-RasG12 como en las del K-RasV12 y estos productos fueron clonados en un plásmido para que se expresaran conjugados con el “tag” HA. A estos mutantes les llamamos HA-K-RasPREP y HA-K-RasV12PREP. (Ver esquema de la figura I.6.2.A)

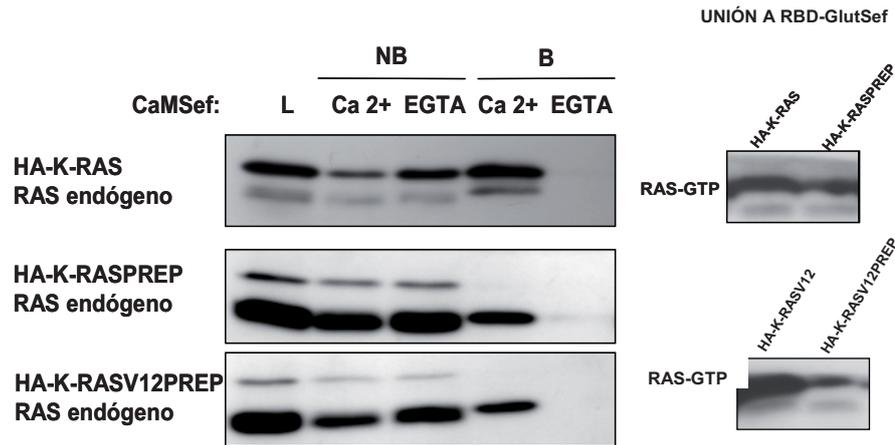
Estos mutantes y el control HA-K-Ras fueron transfectados en células NIH3T3. Con una parte de estas células transfectadas y sembradas en cubres se realizó la inmunocitoquímica de control y de la otra parte se obtuvieron los lisados que, divididos en dos alícuotas a su vez, se utilizaron para realizar el ensayo de unión a RBD-Glutationa-Sefarosa y el ensayo de unión a CaM-Sefarosa.

El resultado lo podemos observar en las figura I.6.2.B. Aunque, como podemos observar en el panel derecho de la figura B, los mutantes HA-K-RasPREP y HA-K-RasV12PREP son capaces de unir GTP ya que se unen a RBD (aparecen en la fracción unida), no unen CaM como se observa en el panel izquierdo. Parece pues, que al introducir el cambio de una valina y una isoleucina de la región 150-170 por prolinas, estamos afectando a la capacidad de Ras de interaccionar con Calmodulina. Cabe señalar también, como se puede observar en estos Westerns, que aunque transfectábamos la misma cantidad de HA-K-Ras control y de HA-K-RasPREP y HA-K-RasV12PREP, no conseguíamos unos niveles de expresión iguales. Los mutantes PREP se expresaban mucho menos.

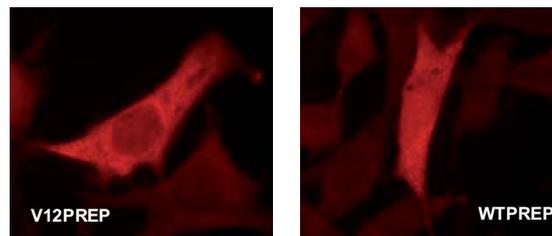
Las inmunocitoquímicas realizadas a las células transfectadas con HA-K-RasPREP y HA-K-RasV12PREP fueron analizadas con microscopia confocal (figura I.6.2.C). El análisis reveló que estos mutantes no se localizaban en la membrana plasmática, sino que parecían quedar dispersos por el citosol.



**Figura I.6.2.A. Esquema de los mutantes HA-K-RasPREP y HA-K-RasV12PREP.** Se sustituyó la valina 160 y la isoleucina 163 por prolinas. Por un lado disminuíamos la hidrofobicidad de la región, y con la introducción de las prolinas desestructurábamos la  $\alpha$ -hélice. Estas mutaciones se introdujeron tanto en la secuencia del K-Ras como en la secuencia del K-RasV12 y ambas construcciones fueron clonadas en un plásmido que también codificaba para el “tag” HA.



**Figura I.6.2.B. Los mutantes HA-K-RasPREP y HA-K-RasV12PREP unen GTP pero no unen CaM.** Lisados de células NIH3T3 transfectadas con HA-K-Ras control y HA-K-RasPREP y HA-K-RasV12PREP fueron incubados con RBD-GST acoplado a bolas de Glutathiona-Sefarosa (panel derecho) o con resina de CaM-Sefarosa (panel izquierdo). En la figura de la derecha, la fracción unida a RBD fue analizada por Western Blot. En la figura de la izquierda una décima parte del lisado total, una décima parte de la fracción no unida y toda la fracción unida fueron analizadas por Western Blot. Ambos Westerns se realizaron mediante anticuerpo anti-HA



**Figura I.6.2.C Inmunofluorescencia de los mutantes HA-K-RasPREP y HA-K-RasV12PREP.** Se realizó una inmunofluorescencia de las células transfectadas con los mutantes HA-K-RasPREP y HA-K-RasV12PREP. Se incubó, después de una fijación con paraformaldehído 4%, con un anticuerpo primario anti-HA, y el secundario utilizado emitía fluorescencia roja. Las imágenes mostradas fueron tomadas con microscopía confocal. No se observó marcaje en la membrana y sí un marcaje difuso por el citoplasma de la célula.

De estos experimentos realizados con los mutantes HA-K-RasPREP y HA-K-RasV12PREP podríamos concluir que la mutación de la valina 160 y la isoleucina 163 por prolinas afecta a la unión de Ras con Calmodulina pero también está afectando a la funcionalidad de la proteína. Estos mutantes sí son capaces de cargarse con GTP en los lisados, pero no se pueden localizar en la membrana, hecho que es necesario para la funcionalidad de Ras.

### **I.6.3 La sustitución de aminoácidos básicos de la región 150-166 por has árticos produce una pérdida de unión de Ras a CaM, a la vez que una deslocalización**

En la búsqueda del mutante de Ras que no una Calmodulina, el siguiente paso fue cambiar aminoácidos básicos de la región 150-170 por aminoácidos ácidos. Dado que el cambio de estos aminoácidos por aminoácidos neutros (glutaminas) no había afectado a la unión, y el cambio de aminoácidos hidrofóbicos por prolinas si que producía una pérdida de interacción pero también afectábamos a la funcionalidad de la proteína, decidimos probar el cambio de los aminoácidos arginina 161 y 164 y lisina 165 por has árticos. De esta manera disminuíamos considerablemente la basicidad de la zona y aumentábamos las cargas negativas, por lo que si esta zona colaboraba en la unión, con estos cambios deberíamos interferirla.

Al igual que las anteriores construcciones, introdujimos las mutaciones tanto en la secuencia del K-Ras como en la del K-RasV12 y ambas fueron clonadas en el plásmido pEFHA para que las proteínas se expresaran conjugadas al “tag” HA y así poderlas identificar selectivamente. Los mutantes fueron llamados de forma abreviada HA-K-RASD y HA- K-Rasv12ddd En la figura I.6.3.A se muestra un esquema de la construcción realizada.

Pasamos a transfectar los mutantes HA-K-RASD y HA- K-Rasv12ddd y el control HA-K-Ras en células NIH3T3. A continuación se procedió a realizar una inmunocitoquímica de las células transfectadas y a obtener los lisados celulares, parte de los cuales fue utilizado para realizar el ensayo de unión a RBD y la otra parte para realizar el ensayo de unión a CaM.

La parte derecha de la figura I.6.3.B muestra el ensayo de unión a RBD. Tras incubar los extractos celulares con RBD-GST unido a glutationa-sefarosa, una alícuota de lisado y la fracción unida fueron analizadas por Western Blot mediante un anticuerpo anti-HA. Como se observa en la figura, ambos mutantes HA-K-RASDDD y HA- K-RasV12DDD, al igual que el control, aparecen en la fracción unida, la cual cosa nos indica que estos dos mutantes son capaces de unir GTP en el lisado.

Pero, aunque el HA-K-RasDDD y HA- K-RasV12DDD se cargan bien de GTP, ambos son incapaces de unir CaM, como se puede observar en el panel izquierdo de la figura I.6.3.B. Tras incubar los lisados de las células transfectadas con la resina CaM-Sefarosa y analizarlos por WB con anticuerpo pan-Ras, ambos mutantes no aparecen en la fracción unida, mientras que el control sí. Por lo tanto, parece ser que estas mutaciones introducidas sobre la secuencia de Ras, interfieren en la unión de esta proteína con Calmodulina.

La figura I.6.3.C muestra las inmunocitoquímicas anti-HA realizadas a las células transfectadas con los mutantes HA-K-RasDDD y HA- K-RasV12DDD. Éstas revelan que estas mutaciones en la secuencia de Ras, producen una deslocalización de la proteína. Al igual que pasaba con los mutantes PREP, no se observa marcaje en la membrana y si una marcaje difuso citoplasmático.

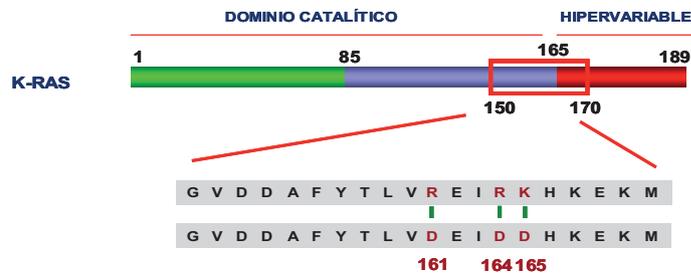


Figura I.6.3.A Esquema de las mutaciones realizadas para obtener el mut: HA-K-RasDDD

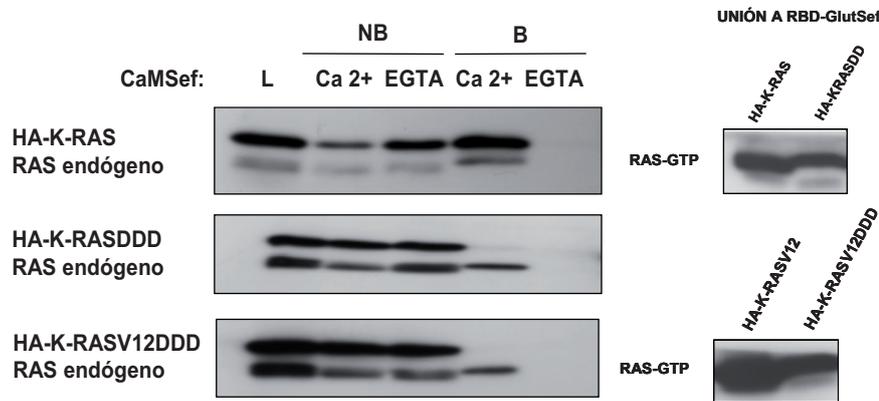


Figura I.6.3.B. Los mutantes HA-K-RasDDD y HA- K-RasV12DDD unen GTP pero no unen CaM. Células transfectadas con HA-K-RasDDD y HA- K-RasV12DDD y el control HA-K-Ras fueron lisadas, y una parte de los extractos fueron incubados con RBD-GST acoplado a bolas de Glutaciona-Sefarosa (panel derecho) y la otra parte con CaM-Sefarosa (panel izquierdo). Una 1/10 del lisado, una 1/ de la fracción no unida (NB) y toda la fracción unida a CaM (B) y unida a RBD se analizaron por Western Blot mediante un anticuerpo anti-pan-Ras.

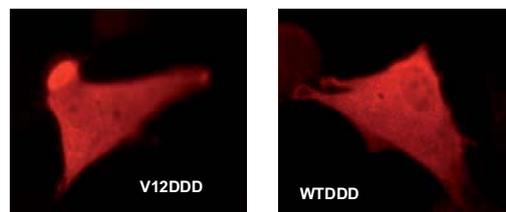


Figura I.6.3.C Las mutaciones R161D, R164D y K165D producen una deslocalización de la proteína Ras. Células NIH3T3 fueron transfectadas con los mutantes HA-K-RasDDD y HA- K-RasV12DDD y fueron sometidas a una inmunocitoquímica con anti-HA como anticuerpo primario y un anticuerpo secundario conjugado a Alexa594

En resumen, la triple mutación R161D, R164D y K165D si bien afectan a la capacidad de unión de Ras a CaM, también están afectando a la localización de la proteína.

#### **I.6.4 El cambio de la arginina 161 por un aspártico afecta tanto a la unión de Ras a CaM como a su localización**

Como hemos mostrado en el punto anterior, el cambio de las argininas 161 y 164 y de la lisina 165 por aspárticos en la secuencia del K-Ras conseguía hacer que éste perdiera su capacidad de interactuar con CaM, pero también afectaba a su capacidad de unirse a la membrana y por lo tanto podía afectar a su funcionalidad. Así que, decidimos realizar estas mutaciones una por una, ya que la introducción de tres cargas negativas en esta zona afectaba demasiado a la proteína y quizás la introducción de una sola no.

Realizamos las mutaciones puntuales R161D, R164D y K165D en la secuencia del K-Ras. Y una vez más los mutantes se clonaron en el plásmido pEFHA para que se expresaran conjugados al “tag” HA. Estos mutantes se llamaron HA-K-Ras161D, HA-K-Ras164D, HA-K-Ras165D. Véase el esquema de la figura I.6.4.A.

Los mutantes fueron transfectados en células NIH3T3 y posteriormente con sus lisados se realizó el ensayo de unión a RBD, para comprobar que todos unían GTP, y el ensayo de unión a CaM. Paralelamente con algunas células transfectadas se realizó la inmunocitoquímica anti-HA de control.

Como se observa en la figura I.6.4.B todos los mutantes unen RBD, y por tanto todos se unen a GTP. Pero, como se observa en la figura I.6.4.C, mientras que los mutantes HA-K-Ras164D y HA-K-Ras165D son capaces de unirse a CaM, el mutante HA-K-Ras161D es incapaz de interactuar.

Las inmunocitoquímicas anti-HA realizadas a las células transfectadas con los mutantes HA-K-Ras161D, HA-K-Ras164D y HA-K-Ras165D revelaron que, mientras el 164D y el 165D se localizaban normalmente en la membrana plasmática, el 161D no. Éste último presentaba una localización difusa por el citoplasma e incluso se localizaba en el núcleo.

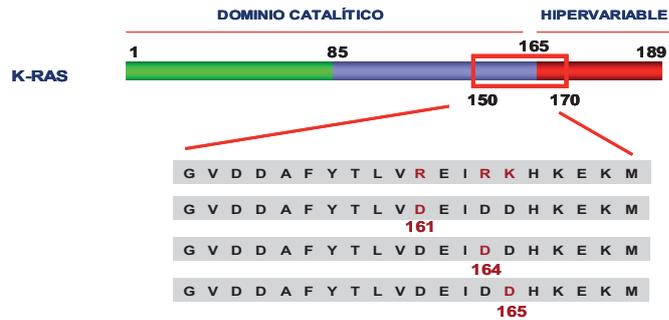


Figura I.6.4.A. Esquema de los mutantes HA-K-Ras161D, HA-K-Ras164D, HA-K-Ras165D

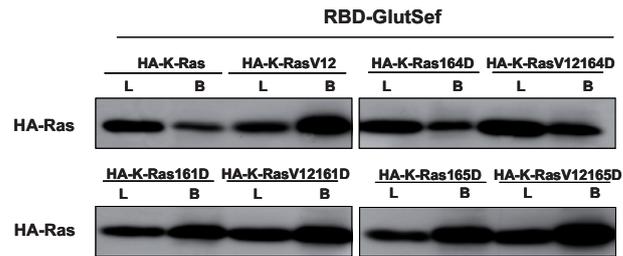


Figura I.6.4.B. Los mutantes HA-K-Ras161D, HA-K-Ras164D, HA-K-Ras165D son capaces de unirse a RBD. Los lisados de las células transfectadas con las construcciones HA-K-Ras161D, HA-K-Ras164D, HA-K-Ras165D fueron incubados con RBD-GST acoplado a Glutaciona-Sefarosa. Una pequeña proporción del lisado y toda la fracción unida fueron analizados por Western-Blott mediante un anticuerpo anti-HA

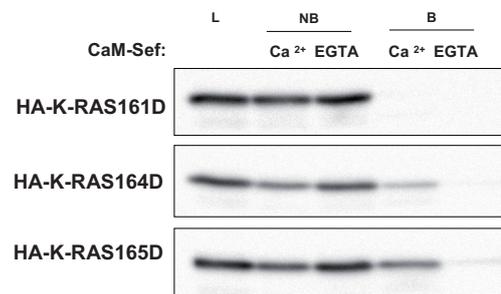


Figura I.6.4.C. El mutante HA-K-Ras161D no une CaM, mientras que el HA-K-Ras164D y el HA-K-Ras165D, sí. Los tres mutantes fueron transfectados en células NIH3T3 y los extractos resultantes de lisarlas fueron incubados con la resina CaM-Sefarosa en presencia de calcio o EGTA. Una 1/10 de lisado (L) y la fracción unida (B) y 1/10 no unida (NB) se analizaron por Western Blot mediante un anticuerpo específico anti-HA.

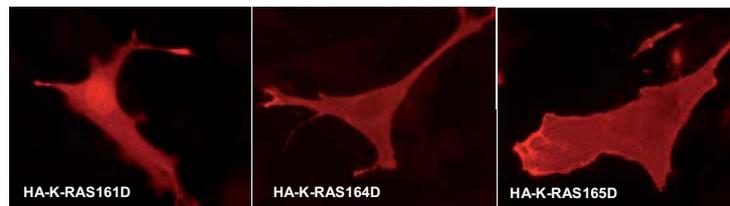


Figura I.6.4.D. El mutante HA-K-Ras161D no se localiza en la membrana plasmática. Se transfectaron células NIH3T3 con las construcciones HA-K-Ras161D, HA-K-Ras164D, HA-K-Ras165D. Posteriormente se realizó una inmunocitoquímica con anticuerpo anti-HA como anticuerpo primario, y con un secundario acoplado a Alexa 594.

En este apartado I.6 hemos investigado el papel de la región 150-170 del K-Ras en la unión a Calmodulina. Ya que en la proteína purificada esta región participaba en la unión, quisimos analizar si en un contexto celular podría participar. Para ello hemos realizado mutaciones puntuales para así poder discernir los aminoácidos exactos que intervendrían en la unión. He aquí un cuadro resumen de los mutantes realizados y de los resultados obtenidos en cuanto a unión a RBD, a CaM y a su localización en la membrana plasmática.

	UNIÓN RBD	UNIÓN CaM	LOCALIZACIÓN EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA
<b>K-RASQ<sup>161</sup>Q<sup>164</sup>Q<sup>165</sup></b>	SI	SI	SI
<b>K-RASP<sup>160</sup>P<sup>163</sup></b>	SI	NO	NO
<b>K-RASD<sup>161</sup>D<sup>164</sup>D<sup>165</sup></b>	SI	NO	NO
<b>K-RASD<sup>161</sup></b>	SI	NO	NO
<b>K-RASD<sup>164</sup></b>	SI	SI	SI
<b>K-RASD<sup>165</sup></b>	SI	SI	SI

Mutaciones puntuales de aminoácidos básicos por aspárticos( mutantes DDD, D161, D164, D165) o la sustitución de aminoácidos hidrofóbicos por prolinas (mutantes PREP), afectan a la unión a CaM a partir de los lisados celulares. Pero la mutación de estos residuos de alguna manera también está afectando a la localización de la proteína.

### **I.7 Estudio de la implicación del dominio hipervariable en la interacción de Ras con CaM**

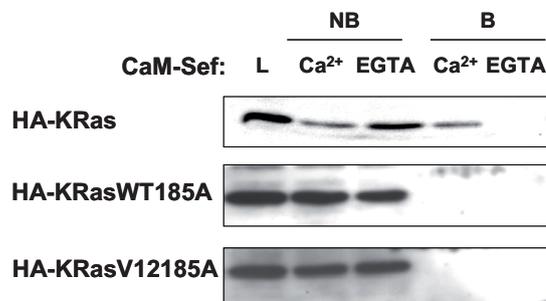
Pasamos a estudiar la implicación de la región 166-188 en la unión de Ras a CaM. Esta región, conocida como el dominio hipervariable de Ras, es la que habíamos demostrado en el punto I.5 como imprescindible para la unión de K-Ras a CaM a partir de los lisados celulares. En este dominio hipervariable de K-Ras es donde la proteína recibe las modificaciones post-traduccionales, tan necesarias para que la proteína se procese y se localice correctamente. En esta región es donde se encuentran las dos señales de localización de Ras a la membrana. Una señal es la farnesilación de la cisteína 185, que confiere la hidrofobicidad necesaria para interaccionar con las membranas y otra señal es la cola polibásica, una secuencia de seis lisinas que interaccionaran electrostáticamente con los fosfolípidos de la membrana.

Por lo tanto, para abordar el estudio del papel del dominio hipervariable en la unión de Ras a CaM, decidimos investigar si la farnesilación de la cisteína 185 y la cola polibásica eran necesarias para la interacción.

### I.7.1 La farnesilación de la cisteína 185 es necesaria para la unión de Ras a CaM

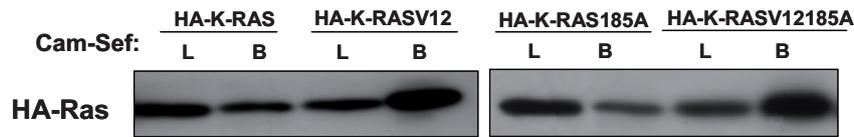
La manera como estudiamos si la farnesilación de la cisteína 185 del K-Ras era necesaria para la interaccionar con CaM, fue construyendo un mutante que no se pudiera farnesilar. Esto se consiguió cambiando la cisteína 185 por una alanina, residuo imposible de farnesilar. Así obtuvimos el mutante K-Ras185A. Como anteriormente hacíamos, introdujimos la mutación tanto en la secuencia del K-RasG12 como en la secuencia del K-RasV12, y ambos fueron clonados en el plásmido pEFHA para que se expresaran en la célula unidos al “tag” HA.

Ambos mutantes y el control K-Ras fueron transfectados en células NIH3T3 y los lisados fueron incubados con CaM-Sefarosa. Posteriormente, parte del lisado y tanto la fracción unida como no unida fueron analizados por Western Blot mediante un anticuerpo anti-HA. El resultado lo podemos ver en la figura I.7.1.A. Mientras que el control aparece en la fracción unida en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , los mutantes K-Ras185A y K-RasV12/185A, no. Así pues, podemos concluir que la farnesilación de la cisteína 185 es imprescindible para la unión de Ras a CaM.



**Figura I.7.1.A Los mutantes K-Ras185A y K-RasV12/185A, que no se pueden farnesilar, no unen CaM.** Los mutantes K-Ras185A y K-RasV12/185A, y el control K-Ras, fueron transfectados en células NIH3T3 y sus lisados fueron incubados con CaM-Sefarosa. Una alícuota de lisado junto con parte de la fracción no unida y la unida, se analizaron por Western Blot mediante un anticuerpo anti-HA.

Como control de que estos mutantes podían cargarse normalmente de GTP en los lisados, también realizamos paralelamente el ensayo de unión a RBD. El resultado se muestra en la figura I.7.1.B. Tanto el control como los mutantes K-Ras185A y K-RasV12/185A aparecen en la fracción unida a RBD, la cual cosa indica que se cargan normalmente del nucleótido GTP.



**I.7.1.B. Los mutantes K-Ras185A y K-RasV12/185A unen GTP.** Los lisados de las células transfectadas con el control y los mutantes K-Ras185A y K-RasV12/185A, fueron incubados con RBD-GST acoplado a bolas de Glutaciona-Sefarosa. Una décima parte del lisado (L) y la fracción unida (B) fueron analizados por Western Blot mediante anticuerpo anti-HA

## I.7.2 El mutante 161D no está farnesilado

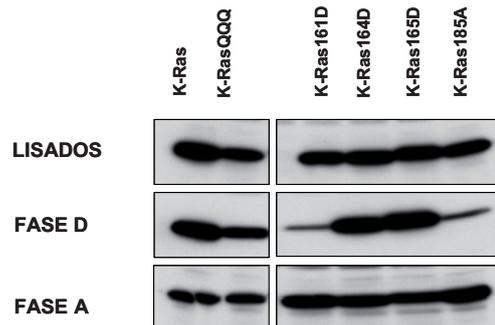
Ante el resultado anterior, que la farnesilación era necesaria para la unión de Ras a CaM, nos planteamos si todos aquellos mutantes de la región 150-170 que no unían CaM y no se localizaban en la membrana, no lo hacían porque no se farnesilaban. Por lo tanto quisimos averiguar si los mutantes K-RasPREP, K-RasDDD, K-Ras161D, K-Ras164D y K-Ras165D, estaban farnesilados.

Para ello realizamos un ensayo de partición de fases en TritónX-114 (Brusca, J. S. and Radolf, J. D. 1994). Este es un método que se utiliza para separar proteínas hidrofóbicas de proteínas hidrofílicas y por ello se aplica para la separación de proteínas de la familia Ras preniladas, de sus precursores no procesados. A partir de una extracción celular con TritónX-114 al 1% en TBS y tras someter al lisado a una incubación a 37°C y una posterior centrifugación, se forman dos fases: una fase D, fase de detergente, rica en proteínas hidrofóbicas y por tanto donde se situaran principalmente las proteínas preniladas, y una fase A, fase acuosa donde se situaran las proteínas hidrofílicas y por tanto las proteínas no preniladas. (Más detalles de este ensayo en Materiales y Métodos).

Así pues, transfectamos como control positivo HA-K-Ras y como control negativo HA-K-Ras185A, y transfectamos los mutantes HA-K-RasPREP, HA-K-RasDDD, HA-K-RasQQQ, HA-K-Ras161D, HA-K-Ras164D, HA-K-Ras165D. Se lisaron las células con TritónX-114 al 1% en TBS y se realizó como se ha descrito en el apartado de materiales y métodos la separación de fases. Para el análisis, se cargó para la separación electroforética de las muestras 30µl de lisado total, 30µl de la fase D y 30µl de la fase A. Se analizó por Western Blot mediante un anticuerpo anti-HA.

El resultado se puede ver en la figura I.7.2. Para sacar una conclusión sobre los mutantes, éstos se comparaban con el resultado obtenido en los controles. Vemos

como el K-Ras, que sabemos que se encuentra farnesilado, se distribuye mayoritariamente en la fase D y también en la A. El K-Ras185A, que sabemos que no se farnesila, se distribuye de forma mayoritaria en la fase A. Así pues podemos concluir que los mutantes K-RasQQQ, K-Ras164D y K-Ras165D siguen el mismo patrón que el K-Ras y por lo tanto podríamos decir que estos mutantes se encuentran farnesilados en la célula. En cambio el mutante K-Ras161D sigue el mismo patrón que el control negativo K-Ras185A, es decir se distribuyen mayoritariamente en la fase acuosa y por consiguiente podemos concluir que este mutante no se encuentra farnesilado en la célula.



**Figura I.7.I. El mutante K-Ras161D no está farnesilado.** Células NIH3T3 fueron transfectadas con las construcciones K-RasQQQ, K-Ras161D, K-Ras164D y K-Ras165D y con los controles K-Ras y K-Ras185A. Los lisados se sometieron a un ensayo de partición de fases con TritónX-114 tal como se detalla en materiales y métodos. Se analizó por Western Blot 30µl del lisado total, 30µl de la fase D (fase de detergente) y 30µl de la fase A (fase acuosa), mediante un anticuerpo anti-HA

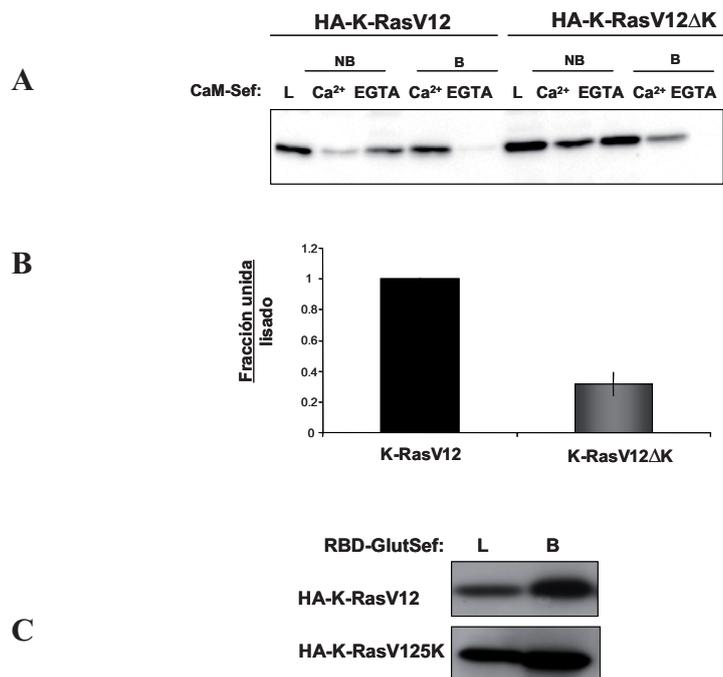
Este experimento demuestra que el mutante K-Ras161D no está farnesilado. Sabiendo, tras el experimento del punto I.7.1, que K-Ras necesita la cisteína farnesilada para la unión a CaM, seguramente el mutante K-Ras161D no unía CaM por la falta de grupo farnesil. Esto también explicaría porque este mutante se deslocalizaba, ya que sin esta señal la localización en la membrana plasmática de K-Ras se ve afectada.

### I.7.3 Para la unión de Ras a CaM es necesaria la integridad de la cola polibásica

Como ya se ha ido comentando en varias ocasiones, CaM se une a las CaMBPs a través de interacciones hidrofóbicas principalmente, pero también la unión se estabiliza mediante la interacción con aminoácidos básicos. En el caso de Ras parecía que la interacción hidrofóbica se producía por el grupo farnesil de la cisteína 185 y quisimos averiguar si la cola polibásica de lisinas tan característica del K-Ras intervenía en la unión, ayudando a estabilizarla.

Para investigar esto disponíamos de un mutante del K-RasV12 que sólo tenía 5 lisinas en vez de las seis. Quisimos estudiar si la falta de una lisina, en definitiva la falta de una carga positiva en esta región, afectaba a la unión de K-Ras a CaM. Así pues transfectamos este mutante al que llamamos K-RasV12 $\Delta$ K y procedimos a realizar el ensayo de unión a CaM. Una vez más también se realizó el ensayo de unión a RBD para comprobar la carga del mutante con GTP.

Como se observa en la figura I.7.3.A, tras analizar una parte del lisado y la fracción no unida y unida por Western Blot mediante un anticuerpo anti-HA, y comparando con el control positivo K-RasV12, el mutante K-RasV12 $\Delta$ K se une en menor proporción a CaM. En la figura I.7.3.B se ha incluido una cuantificación del resultado como promedio de cuatro experimentos. La proporción de fracción unida en presencia de calcio respecto a la cantidad del lisado del K-RasV12 $\Delta$ K se expresa en tanto por ciento respecto al K-RasV12. Como se observa en la gráfica el K-RasV12 $\Delta$ K se une sólo un 30% respecto al K-RasV12 a CaM. En la figura I.7.3.C se demuestra que la mutación de la lisina no ha afectado a la carga del mutante con GTP, comprobado mediante el ensayo de unión a GTP.



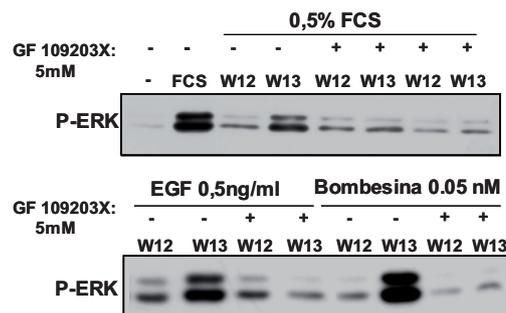
**Figura I.7.3 El mutante K-RasV125K une en menor proporción CaM.** (A). Células NIH3T3 fueron transfectadas con el control K-RasV12 y el mutante K-RasV125K. Los lisados fueron incubados con CaM-Sefarosa y se analizó por Western Blot una alícuota del lisado y la fracción no unida y unida mediante un anticuerpo anti-HA. (B). Cuantificación del resultado de cuatro experimentos. El "1" es el cociente entre la cantidad de K-RasV12 de la fracción unida y el lisado del K-RasV12. (C). Ensayo de unión a RBD con los lisados de células transfectadas con el control HA-K-RasV12 o con el mutante K-RasV125K. Una alícuota de lisado (L) y de la fracción unida (B), se analizaron por Western Blot mediante un anticuerpo anti-HA.

Así pues, de este primer capítulo en el que hemos estudiado el dominio de interacción de Ras a CaM, podríamos concluir que el dominio hipervariable de Ras es esencial para la unión “in vivo”. CaM estaría interaccionando con el grupo farnesil de la cisteína 185, y la secuencia de lisinas de Ras sería también importante para la estabilización de la unión. La región 150-166 podría estar implicada en la interacción, pero su participación seguramente es muy minoritaria “in vivo”.

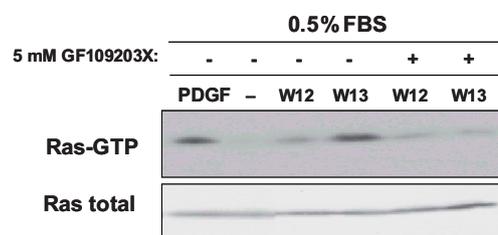
## ANTECEDENTES.

Estudios previos del grupo, habían demostrado que, a pesar de que concentraciones bajas de suero y mitógenos no son capaces de activar la vía Ras/Raf/MEK/ERK en fibroblastos, estas concentraciones si que activaban la vía cuando CaM era inhibida, por lo que CaM estaba previniendo la activación de la vía a niveles basales de suero (Bosch, M. et al. 1998). También en estas células la inhibición de CaM conducía a una activación sostenida de la MAPK. Posteriormente se demostró que esta regulación de la vía por CaM, sucedía a nivel de Ras (Villalonga, Priam et al. 2001)

En el trabajo de Villalonga et al (Villalonga, Priam et al. 2002) se estudió la implicación de la PKC en este sinergismo para activar la vía Ras/Raf/MEK/ERK entre la inhibición de la CaM y las concentraciones bajas de mitógenos. La activación que se observaba de ERK cuando se inhibía CaM y se trataba con bajas concentraciones de factores de crecimiento, era abolida en presencia de un inhibidor de la PKC. Por lo tanto este sinergismo entre factores e inhibición de CaM era dependiente de la actividad PKC. Esto mismo que se observó a nivel de MAPK, también se demostró a nivel de Ras.

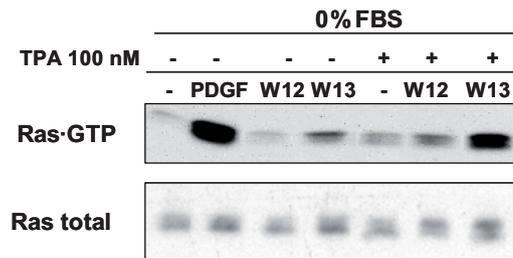


**Figura A. La activación de ERK inducida por la inhibición de CaM es dependiente de PKC.** Células quiescentes Swiss3T3 fueron tratados 10 min con 10% FCS y con W12 (15µg/ml) o W13 (15µg/ml) junto con 0.5% FCS o 0.05nM de Bombesina en presencia o ausencia del inhibidor GF109203 (5µM). Se analiza por Western Blot la activación de la ERK con anticuerpo anti-MAPK fosforilada.



**Figura B. PKC también es necesaria para la activación de Ras por W13.** Células NIH3T3 fueron privadas de suero y luego tratadas durante 5 min con PDGF (0.4nM), W12 (15µg/ml) o W13 (15µg/ml) en ausencia o presencia del inhibidor GF109203 (5µM). La activación de Ras se captó por ensayo de unión con RBD-GST y Western Blot con anti-pan-Ras.

También se comprueba que existe un sinergismo por el contrario cuando activamos PKC e inhibimos CaM. En ausencia de suero, la inhibición de CaM produce, cuando no, una pequeñísima activación de Ras. El activador de PKC, TPA, por su cuenta, no produce ninguna activación de Ras. En cambio cuando activamos la PKC con TPA a la vez que inhibimos CaM con W13, observamos una gran activación de Ras casi comparable a la que se observa con PDGF. Estaba claro que en las NIH3T3 CaM estaba previniendo la activación de Ras por PKC.



**Figura C. Activación de Ras por TPA y W13.** Células NIH3T3 privadas de suero fueron tratadas con PFGF (0.4nM), TPA (100nM) en presencia o ausencia de W12 (15µg/ml) o W13 (15µg/ml). La activación de Ras se analizó por ensayo de unión con RBDGST y por Western-Blot mediante anticuerpo anti-pan-Ras

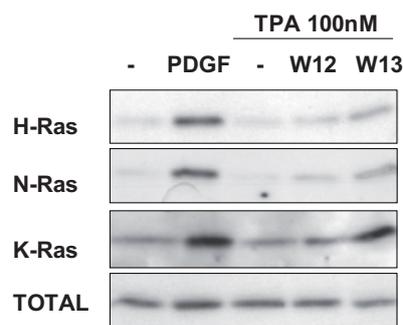
## II. ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD DE LA UNIÓN DE RAS A CaM

### II.1 K-Ras es la única isoforma activable por TPA y W13

Como se ha visto en los antecedentes, Ras se activaba únicamente por TPA en células NIH3T3 cuando además inhibíamos la CaM con la droga W13 (Villalonga, Priam et al. 2002). Como ya habíamos descrito también en el anterior trabajo (Villalonga, Priam et al. 2001), de las tres isoformas de Ras, K, H y N-Ras, solamente K-Ras une Calmodulina como también es esta la única isoforma que se activa por dosis bajas de suero cuando se inhibe la CaM con W13. Investigamos si TPA activaba exclusivamente a esta isoforma cuando tratábamos las células con W13.

Células NIH3T3 fueron hechas quiescentes 24 h con medio 0.5% FCS y después de ese tiempo fueron incubadas 2 h con medio sin suero. Posteriormente fueron tratadas 5 min con PDGF como control positivo, y con W12 o W13 junto con TPA. El Ras-GTP formado fue precipitado con RBD-GST acoplado a bolas de Glutaciona-Sefarosa y la fracción unida fue dividida en tres geles diferentes para así cada membrana ser incubada individualmente con anticuerpos específicos anti-K-Ras, anti-H-Ras, o anti-N-Ras.

Como se observa en la figura II.1, el análisis reveló que K-Ras es la única isoforma que se activa por TPA y W13. Por lo tanto CaM está regulando la activación por PKC exclusivamente del K-Ras.

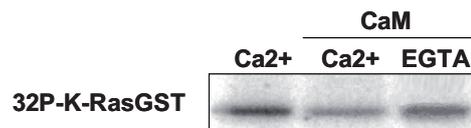


**Figura II.1 K-Ras es la única isoforma que se activa por TPA y W13.** Lisados de células quiescentes NIH3T3 tratadas con PDGF (0.4nM), W13 (15 $\mu$ M) o W12 (15 $\mu$ M) a la vez que TPA (100nM) fueron incubados con RBD-GST acoplado a bolas de Glutaciona-Sefarosa. La fracción unida fue repartida en tres geles para así analizar el Ras-GTP precipitado por Western Blot por separado con anticuerpos anti-K-Ras, anti-H-Ras y anti-N-Ras.

## II.2 K-Ras se fosforila por PKC “in vitro” y esta fosforilación es inhibible por CaM

Estudios realizados por Ballester et al en el año 1987 habían demostrado una relación entre K-Ras y PKC, en la que PKC fosforilaba “in vitro” a K-Ras (Ballester, R. et al. 1987). Nosotros quisimos averiguar si esta fosforilación estaba modulada por CaM. Para ello expresamos la proteína K-Ras en células de insecto SF9, la purificamos. Luego pasamos a realizar un ensayo quinasa “in vitro” con la subunidad catalítica de la PKC, en presencia o no de CaM.

El resultado lo podemos ver en la figura II.2. Como ya se había descrito, PKC fosforila a K-Ras “in vitro”, pero lo interesante es que CaM inhibe esta fosforilación en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta inhibición que ejerce CaM se revierte en ausencia de calcio, es decir en presencia del quelante EGTA, condición en la que CaM no puede unirse a K-Ras, indicando así que la inhibición se produce de manera específica y no por el mero hecho de añadir la proteína CaM a la reacción.



**Figura II.2 Calmodulina inhibe la fosforilación “in vitro” de K-Ras por PKC.** 3  $\mu\text{g}$  de K-Ras-GST purificado tras expresarlo en baculovirus, se preincubó o no con 7  $\mu\text{g}$  de CaM en presencia de Calcio o EGTA durante 10 minutos. Pasado este tiempo, la fosforilación se realizó añadiendo la subunidad catalítica de la PKC y el  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ . Tras separar las muestras por electroforesis, el gel se tiñó con “coomassie-blue”, se secó y posteriormente se analizó por autoradiografía. Se muestra la imagen digital captada con un “phosphorimager”.

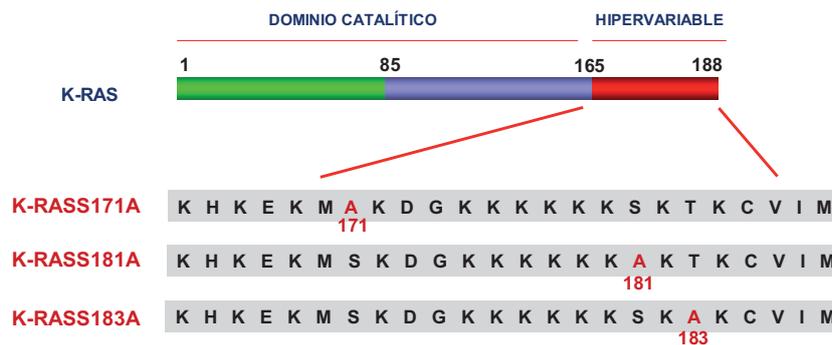
## II.3 K-Ras se fosforila en la serina 181 in vitro

En el trabajo de (Ballester, R. et al. 1987), comparando diferentes líneas de NIH3T3 que expresaban diferentes isoformas de Ras y diferentes construcciones con el exón 4A y 4B del K-Ras, demostraron que la fosforilación de la proteína p21 Ras ocurría en el exón 4B y por comparativa de esta zona con las otras, concluían que el residuo de fosforilación podía ser la serina 181.

Nosotros quisimos asegurar que en nuestro modelo era realmente el residuo 181 el lugar de fosforilación por PKC y que éste era regulable por CaM. En la figura II.3.A se representa la secuencia del extremo carboxi-terminal de la proteína K-Ras y en ella se

señala tres hipotéticos residuos fosforilables por PKC. Éstos son la serina 171, la serina 181, y la treonina 183. Los tres están rodeados de aminoácidos básicos, la cual cosa haría que la PKC los reconociera como posibles lugares de fosforilación

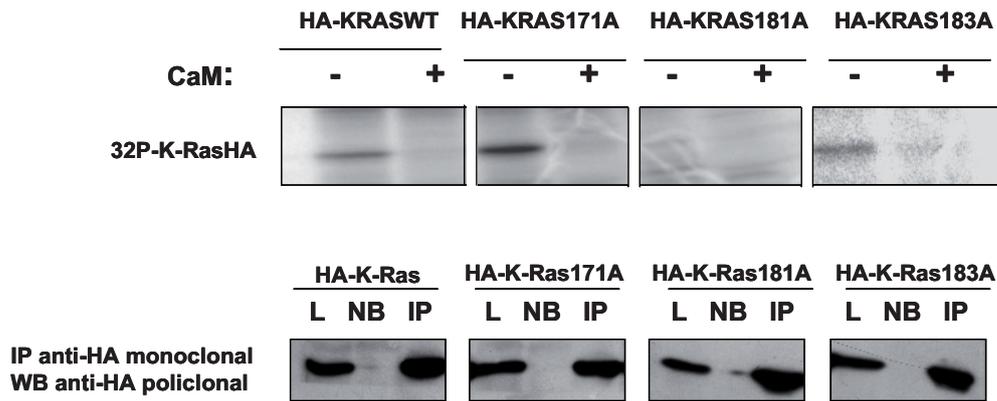
La estrategia para saber cuál era el residuo de fosforilación, fue utilizar mutantes no fosforilables, éste es, mutantes que tuvieran mutada la serina 171, la serina 181 o la treonina 183 por alaninas, aminoácido imposible de fosforilar. Estos tres mutantes, K-Ras171A, K-Ras181A y K-Ras183A, estaban clonados en un plásmido pEFHA y fueron cedidos por el Dr. Richard Marais.



**Figura II.3.A. Representación de los posibles residuos de fosforilación por PKC en el dominio hipervariable de K-Ras.** Se representa la mutación por alanina de estos residuos

Los mutantes de fosforilación y el control HA-K-Ras fueron expresados en células COS (ya que con estas células obteníamos una cantidad de proteína mayor que con las NIH) y fueron inmunoprecipitados con anticuerpo anti-HA conjugado a bolas de agarosa. Una vez precipitadas las proteínas se procedió al ensayo quinasa con la subunidad catalítica de la PKC y  $[\gamma^{32}\text{P}]$  ATP en presencia o no de la CaM.

El resultado se recoge en la figura II.3.B. El control HA-K-Ras expresado en células e inmunoprecipitado, al igual que habíamos visto con la proteína purificada de baculovirus, se fosforila y esta fosforilación es inhibida por CaM. Lo mismo ocurre con los mutantes K-Ras171A y K-Ras183A. Pero en el caso del mutante K-Ras181A, no se observa ninguna fosforilación ni en presencia ni en ausencia de CaM. Esto nos estaría indicando que el residuo de fosforilación “in vitro” es la serina 181.



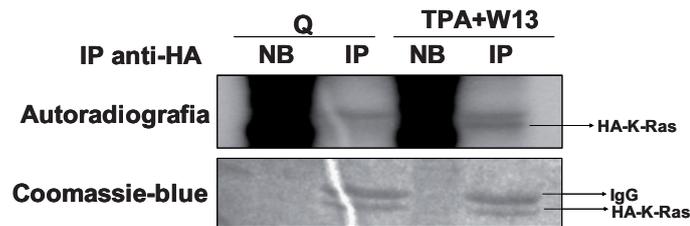
**Figura II.3.B K-Ras se fosforila en la serina 181 “in vitro”.** Los mutantes K-Ras171A, K-Ras181A, K-Ras183A y el control K-Ras, tras ser expresados en células COS y ser inmunoprecipitados con anticuerpo anti-HA acoplado a bolas de agarosa, se usaron como sustrato en el ensayo quinasa llevado a cabo por la PKC en presencia o ausencia de CaM. Se muestra la imagen digital de la autoradiografía. En la figura inferior se muestra el Western Blot control de la inmunoprecipitación.

#### II.4 El tratamiento de células NIH3T3 con TPA y W13 provoca la fosforilación de K-Ras “in vivo”

Hasta este punto sabíamos que K-Ras se fosforilaba por PKC en la serina 181 “in vitro” y que cuando “in vivo” activábamos la PKC con TPA al mismo tiempo que inhibíamos la CaM con W13, K-Ras se activaba y el mutante no fosforilable K-Ras181A no. Por lo tanto, parecía ser que tras este efecto “in vivo” y por los ensayos quinasa “in vitro”, Ras se estuviera fosforilando cuando tratábamos la célula con TPA y W13.

Por lo tanto, pasamos a demostrar esta fosforilación “in vivo” y para ello utilizamos el método clásico que utiliza fósforo radioactivo (para una descripción más detallada véase la sección materiales y métodos). Células que sobreexpresaban constitutivamente HA-K-Ras fueron privadas de suero durante 24 horas. Al día siguiente se incubaron durante 1 hora con un DMEM libre de fosfatos y después una hora más con este medio al cual se le había añadido el ortofosfato  $^{32}\text{P}$  a una concentración de  $650\mu\text{Ci/ml}$ . Transcurrido este tiempo se procedió a tratar las células con TPA y W13 durante 10 minutos. Tanto las células control sin tratar, como las células tratadas fueron lisadas normalmente y se procedió a la inmunoprecipitación con anticuerpo anti-HA unido a bolas de agarosa. Una alícuota de la fracción no unida y toda la fracción unida se corrieron en un gel de acrilamida que se tiñó luego por coomassie y se secó y se expuso a una placa de autoradiografía. La imagen digital de esta autoradiografía se muestra en la figura II.4.A

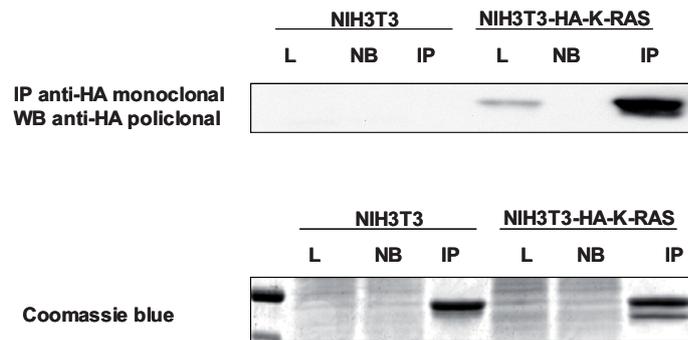
En esta figura (panel superior), observamos como aparece una banda en el carril de la inmunoprecipitación de los lisados celulares tratados con TPA y W13 y como no aparece en el carril de la IP de las células control sin estimular. En ambos carriles se observa una banda superior inespecífica. Comparando exactamente la imagen de la autoradiografía con el coomassie blue, vemos que la banda fosforilada, que aparece únicamente con el tratamiento con TPA y W13, corresponde a la misma banda del HA-K-Ras inmunoprecipitado y teñido y que está presente en las dos muestras por igual.



**Figura II.4.A. K-Ras se fosforila “in vivo” cuando activábamos la PKC e inhibimos la CaM.** Células NIH3T3 que sobreexpresaban HA-K-Ras fueron privadas de suero durante 24 horas. Pasado este tiempo se incubaron dos horas con DMEM libre de fosfato y posteriormente a ese medio se añadió el ortofosfato  $^{32}\text{P}$  durante una hora. Una placa se trató con TPA(100nM) y W13 (15 $\mu\text{g/ml}$ ) durante 10 minutos. Se lisaron las células y se inmunoprecipitó el HA-K-Ras con anticuerpo anti-HA acoplado a bolas de agarosa. La fracción inmunoprecipitada (IP) y una alícuota de la fracción no unida (NB) se corrieron en un gel, y éste fue teñido por coomassie blue, desteñido y secado y analizado por autoradiografía. Se enseña la imagen digital de ésta misma y del coomassie-blue.

Por lo tanto, este experimento nos demostraba como el tratamiento de las células con TPA y W13, o lo que es igual, como la activación de la PKC en condiciones de CaM inactiva, provoca una fosforilación de Ras.

Como control de este experimento (Figura II.4.B), se muestra el Western Blot anti-HA (panel superior) de una IP realizada en paralelo y al mismo tiempo que la inmunoprecipitación del ensayo radioactivo para comprobar que realmente estamos inmunoprecipitando específicamente el K-Ras. También mostramos un coomassie blue (panel inferior) de dos inmunoprecipitaciones anti-HA a partir de dos lisados diferentes: uno proveniente de células NIH3T3 control y otro proveniente de la línea celular estable para HA-K-Ras utilizada en el experimento, para demostrar que las bandas que aparecen en los carriles de las IPs en el coomassie y que usamos para comparar las de la autoradiografía, se corresponden realmente con HA-K-Ras.



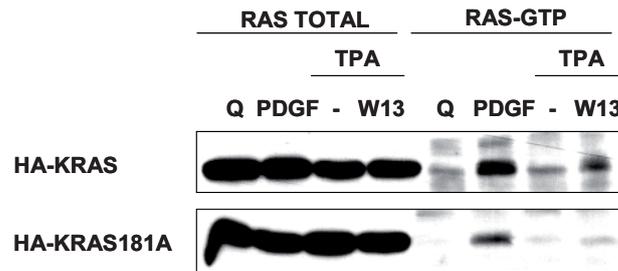
**Figura II.4.B Controles de la fosforilación “in vivo”.** En el panel superior se muestra la inmunoprecipitación con anticuerpo anti-HA monoclonal acoplado a bolas de agarosa del HA-K-Ras-HA a partir de células control NIH3T3 y a partir de células NIH3T3 que sobreexpresan el HA-K-Ras. La fracción no unida (NB) y la unida (IP) y una alícuota de lisado total (L) se analizaron por Western Blot mediante una anticuerpo anti-HA policlonaal. En el panel inferior se muestra el coomasie blue del mismo experimento que el del panel superior

## II.5 El mutante K-Ras181A no es activable por TPA y W13

Si PKC fosforilaba a K-Ras en la serina 181 “in vitro”, y esta fosforilación era inhibida por Calmodulina, cabía suponer pues, que la activación de K-Ras que observábamos “in vivo” al activar la PKC (con TPA), y al mismo tiempo inhibir la CaM (con W13), estaba mediada por la fosforilación. Si esto era así, cabía esperar que el mutante K-Ras181A, que no se puede fosforilar, no se pudiera activar por TPA y W13.

Para comprobarlo, células NIH3T3 que expresaban constitutivamente el HA-K-Ras o el HA-K-Ras181A, fueron incubadas durante 12 horas con DMEM 0.5% de FCS y durante 12 horas más con DMEM 0%. Posteriormente fueron tratadas con PDGF, con TPA con o sin W13 durante 10 minutos. Los lisados se incubaron con RBD-GST acoplado a bolas de glutatona-sefarosa para precipitar el Ras activo. La fracción unida al RBD y una alícuota de lisado de cada condición se analizaron por Western Blot mediante una anticuerpo específico anti-HA.

El resultado se observa en la figura II.5. Mientras que el HA-K-Ras, como ya sabíamos, sufre una activación por el tratamiento con TPA y W13, el mutante HA-K-Ras181A no se activa por la adición de estas drogas. Esto nos está indicando que la activación por TPA y W13 depende de la fosforilación de la serina 181.



**Figura II.5 El mutante K-Ras181A no se activa por TPA y W13.** Células NIH3T3 que expresan de manera estable HA-K-Ras o HA-K-Ras181A, fueron privadas de suero durante 24 horas, las 12 primeras horas con DMEM 0.5% FCS y las últimas con medio 0%. Se trataron con PDGF (0.4nM), TPA (100nM) con o sin W13 (15µg/ml) durante 10 minutos. Los lisados celulares se incubaron con RBD-GST acoplado a Glutaciona-Sefarosa. El Ras activo precipitado en las bolas y el Ras total de los lisados se detectaron por Western Blot mediante un anticuerpo anti-HA.

## II.6 Ras fosforilado no une CaM

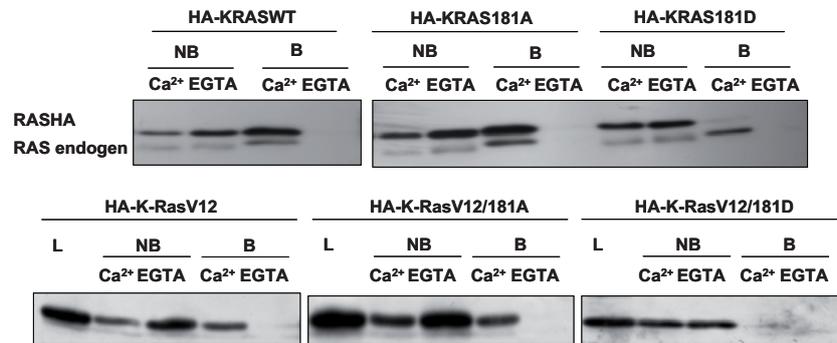
Existen otras proteínas que se regulan por PKC y Calmodulina y en ellas se observa que esta doble regulación es excluyente, es decir: cuando CaM se encuentra unida a la proteína en cuestión PKC no puede fosforilarla y al revés, si PKC fosforila a la proteína ésta deja de unirse a CaM.

Nos interesó averiguar si esto también ocurría con K-Ras. Ya sabíamos que la fosforilación por PKC era inhibida tanto “in vitro” como “in vivo” por CaM, y quisimos comprobar si el K-Ras fosforilado era capaz de unirse a CaM.

Para ello, construimos el mutante mimético de fosforilación. Este mutante de K-Ras tiene sustituida la serina 181 (el residuo de fosforilación) por un aspártico (D) que imita la carga negativa de la fosforilación real. Cuando obtuvimos este mutante, fue clonado en el plásmido pEFHA. Una vez tuvimos la construcción, pasamos a expresar el K-Ras181D, junto con el K-Ras como control y el K-Ras181A en células NIH3T3, y los lisados de éstas se incubaron con resina CaM-Sefarosa para realizar el ensayo de unión a CaM. Las fracciones unidas y no unidas se analizaron por Western Blot mediante un anticuerpo pan-Ras que revela tanto la forma endógena como la forma transfectada HA-K-Ras.

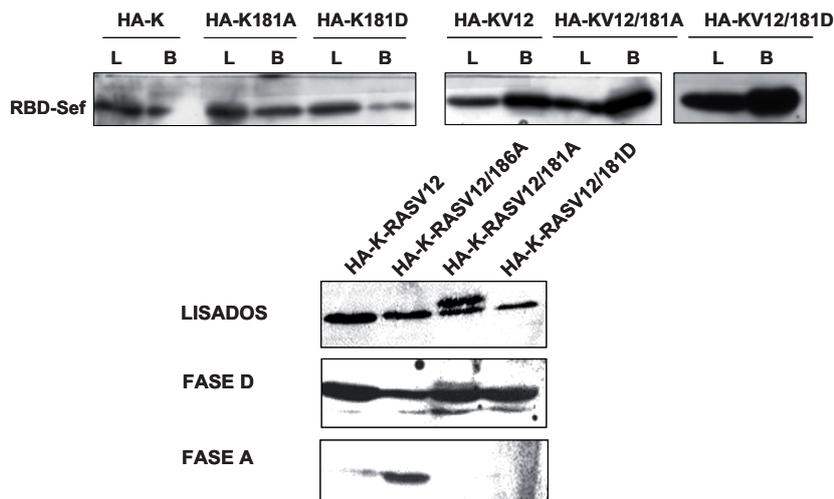
Como observamos en la figura II.6.A, tanto el control K-Ras como el mutante K-Ras181A, unen perfectamente CaM en presencia de  $Ca^{2+}$ , mientras que el mutante pseudofosforilado es incapaz de unirse a ella. Lo mismo ocurre con las formas oncogénicas V12. Se comprueba así que en el K-Ras se da esta doble regulación excluyente: como ya habíamos visto en el punto II.2.A, cuando se encuentra unido a CaM, PKC no puede fosforilarlo, y cuando PKC lo fosforila (representando por el

mutante K-Ras181D), deja de unirse a CaM. Se podría decir que la fosforilación del residuo 181 impide la unión de K-Ras con CaM.



**Figura II.6.A K-Ras fosforilado no une CaM** Células NIH3T3 se transfectaron con el mutante mimético de fosforilación HA-K-Ras181D, el mutante de no fosforilación HA-K-Ras181A y el control HA-K-Ras. Los extractos celulares se incubaron con CaM-Sefarosa y la fracción no unida (NB) y la unida (B) se analizó mediante Western Blot con anticuerpo pan-Ras, revelando así, tanto la proteína Ras endógena como la transfectada HA

En la figura II.6.B se muestran los controles de este experimento. Por un lado, en el panel superior, se muestra que el mutante mimético de fosforilación se carga perfectamente con GTP. Puesto que sabemos que la farnesilación de la proteína es imprescindible para la interacción con CaM, comprobamos a través de un ensayo de partición con Tritón-X114, tal como se muestra en la parte inferior de la figura, que el mimético de fosforilación se encuentra prenilado. Por lo tanto este resultado nos da una doble información: que la fosforilación del residuo 181 no afecta a la farnesilación de la proteína, y que el mimético de fosforilación no une CaM debido a la fosforilación específica de la serina.



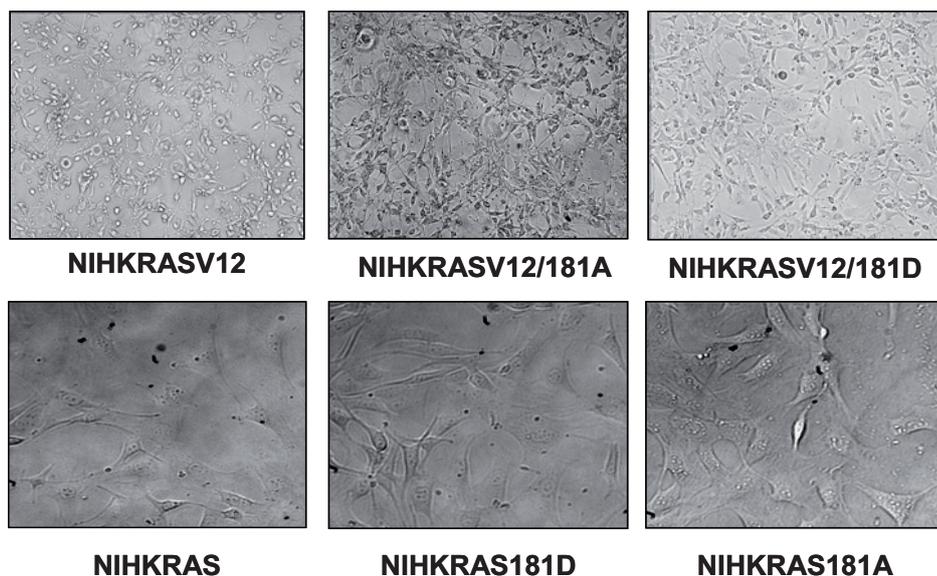
**Figura II.6.B. Ensayo de unión a RBD y ensayo de partición en TritónX-114 de los mutantes de fosforilación.** Los lisados de células transfectadas con los mutantes de fosforilación o el control fueron incubados con RBD acoplado a Glutaciona-Sefarosa (parte superior). En la parte inferior se muestra el ensayo de partición en TritónX-114 con lisados de células transfectadas con las formas oncogénicas de los mutantes de fosforilación.

En estos seis puntos de este capítulo hemos demostrado que K-Ras se fosforila “in vivo” e “in vitro” por PKC y que esta fosforilación es inhibida por CaM. Sabemos que el mutante no fosforilable K-Ras181A no es activable por TPA y W13 “in vivo”, y que el mutante pseudo fosforilado K-Ras181D no une CaM.

Una vez demostrada esta fosforilación, lo siguiente fue investigar el papel de esta fosforilación, para qué y por qué Ras se fosforilaba por PKC y ésta estaba siendo impedida en determinados momentos por CaM.

Para este estudio de la funcionalidad de la fosforilación de K-Ras nos fue muy útil la construcción de líneas celulares estables que expresaban HA-K-Ras, HA-K-Ras181A, K-Ras181D, así como las formas oncogénicas HA-K-RasV12, HA-K-RasV12/181A y HA-K-RasV12/181D (cómo se hicieron se encuentra explicado en el apartado de materiales y métodos). Para determinados experimentos necesitábamos que un gran número de células del cultivo expresaran los mutantes y con las líneas no estables no hubiésemos conseguido esta elevada proporción que nos hacía falta. Aún así algún experimento se realizó también en paralelo con las células transfectadas y ya se irá indicando en el punto correspondiente.

Estas líneas que expresaban el mutante K-Ras-181A o el K-Ras-181D no presentaban diferencias morfológicas apreciables, en relación a la línea control que expresaba el K-Ras. A continuación se muestra unas imágenes tomadas con el microscopio



Imágenes de las líneas estables HA-K-RasV12, HA-K-RasV12/181A, HA-K-RasV12/181D, HA-K-Ras, HA-K-Ras181A y HA-K-Ras181D

## ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD DE LA FOSFORILACIÓN DE K-RAS POR PKC

En el apartado anterior de resultados hemos visto como el papel de CaM en la regulación de Ras es impedir la fosforilación del mismo por PKC. Hemos demostrado que esta fosforilación tanto “in vitro” como “in vivo” está regulada por CaM. El residuo de fosforilación “in vitro” es la serina 181 y la fosforilación de este residuo es importante para la activación de K-Ras “in vivo” por TPA y W13 puesto que el mutante K-Ras181A no se activa.

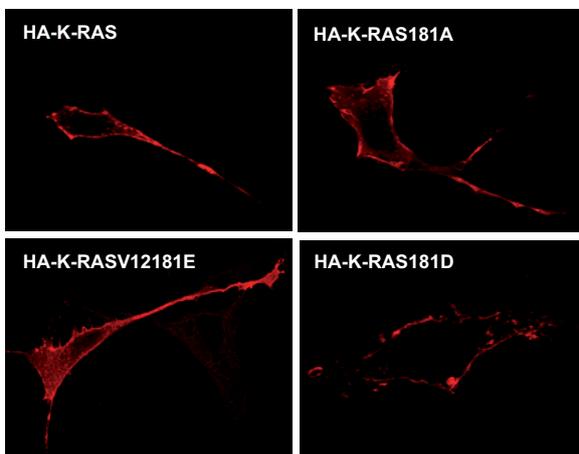
En los siguientes apartados hemos querido estudiar como esta fosforilación puede afectar a la funcionalidad de Ras.

### II.7 Tanto el mutante K-Ras181A como el K-Ras181D o K-Ras181E se localizan en la membrana plasmática.

Una de las primeras cosas que nos interesó en cuanto obtuvimos el mutante de no fosforilación y el mutante pseudofosforilado, fue comprobar si la fosforilación afectaba a la localización de Ras en la membrana.

Así pues transfectamos HA-K-Ras181A (mutante no fosforilable), HA-K-Ras181D y K-RasV12/181E (ambos mutantes pseudofosforilados), y el control HA-K-Ras. Se realizó una inmunocitoquímica con un anticuerpo específico anti-HA y un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia. Las imágenes mostradas en la figura II.7 se obtuvieron por microscopía confocal.

Como se observa en la figura II.7, se observa marcaje del control y de los tres mutantes en la membrana plasmática. Estas inmunocitoquímicas no revelan diferencias relevantes de localización de los mutantes.



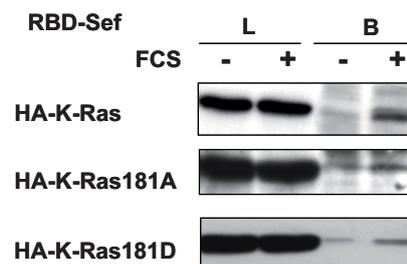
**II.7 La fosforilación no afecta a la localización de Ras en la membrana plasmática.** Células NIH3T3 fueron transfectadas con HA-K-Ras, HA-K-Ras181A, HA-K-Ras181D y HA-K-RasV12/181E, realizándose una inmunocitoquímica con anticuerpo anti-HA como primario y un secundario conjugado a Alexa 594. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal

## II.8 Los mutantes K-Ras181A y K-Ras181D son capaces de activarse por factores de crecimiento.

Por tal de averiguar si la fosforilación podía afectar de alguna manera a la activación normal de K-Ras por factores de crecimiento, decidimos realizar un ensayo de unión a RBD de lisados tras activar las células con 10% de FCS.

Células de las líneas que expresaban de forma estable K-Ras, K-Ras181A y K-Ras181D fueron privadas de suero durante 24 horas y posteriormente activadas durante 5 min con medio rico en factores de crecimiento. Los lisados celulares se sometieron a un ensayo de RBD para analizar la activación de Ras. La fracción unida al RBD y una décima parte del lisado se analizaron por Western Blot mediante un anticuerpo anti-HA para identificar la forma transfectada.

Como observamos en la figura II.8, ambos mutantes K-Ras181A y K-Ras181D, se activan de igual forma que K-Ras por una elevada concentración de factores de crecimiento.



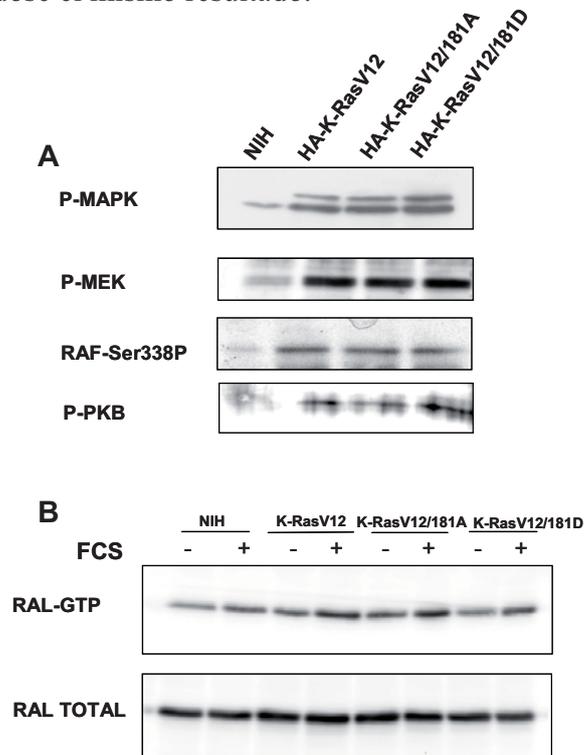
**Figura II.8 Activación de HA-K-Ras181A y HA-K-Ras181D por factores de crecimiento.** Células que expresan de forma estable HA-K-Ras o los mutantes de fosforilación HA-K-Ras181A o HA-K-Ras181D fueron privadas de suero durante 24 h. Posteriormente se trataron con medio al 10% de FCS y los lisados celulares se incubaron con GST-RBD acoplado a Glutaciona-Sefarosa. Una décima parte del lisado (L) y la fracción unida (B) fueron analizadas por Western Blot mediante un anticuerpo anti-HA.

## II.9 Los mutantes K-RasV12/181A y K-RasV12/181D son capaces de activar los mismos efectores que K-RasV12

Era interesante averiguar si la fosforilación estaba modulando la activación de alguno de los efectores de Ras. Para este estudio utilizamos las líneas celulares que expresaban de forma estable K-RasV12, K-RasV12/181A y K-RasV12/181D. Escogimos la forma oncogénica ya que al estar constitutivamente activa, si privábamos a las células de suero, detectaríamos la señalización proveniente del K-RasV12 y no de la forma endógena.

De esta forma nos dispusimos analizar la activación de la vía Raf/MEK/MAPK, PI3K y RalGDS. Para detectar la activación de la vía Raf/MEK/MAPK analizamos los lisados celulares con anticuerpos específicos que reconocen las formas fosforiladas, y por tanto las formas activas, de Raf, MEK y MAPK. Para analizar la activación de la vía PI3K, estudiamos la fosforilación y activación de su principal sustrato PKB. Por último, para detectar la activación de otro efector de Ras, RalGDS, utilizamos un método indirecto (ver materiales y métodos) en el que detectamos la activación de Ral.

Estos Westerns Blots se recogen en la figura II.9. La conclusión a estos experimentos es que, al menos por lo que respecta a los efectores estudiados y a las condiciones en las que se han realizado, no existen diferencias de activación entre los mutantes de fosforilación y K-RasV12. Parece ser que la fosforilación no está modulando la activación de los efectores estudiados. El mismo experimento y el mismo análisis de efectores se realizó en células que expresaban los mutantes de forma transitoria, obteniéndose el mismo resultado.



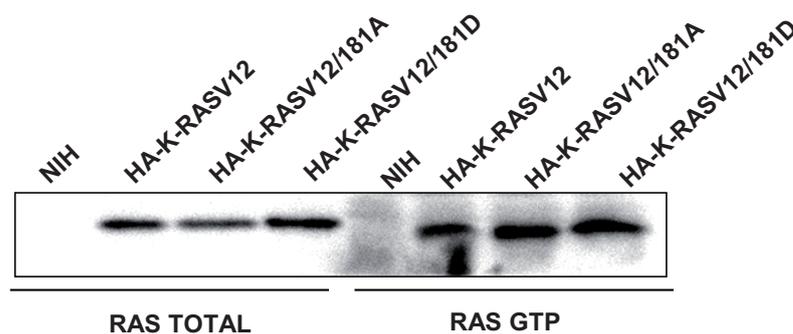
**Figura II.9 Activación de la vía Raf/MEK/MAPK, PI3K y RalGDS en células que expresan K-RasV12, K-RasV12/181A y K-RasV12/181D.** (A) Las células que expresaban de forma estable los mutantes y el control y las células NIH3T3, fueron privadas de suero durante 24 h. 30µg de proteína fueron analizados por Western Blot mediante anticuerpo phospho-S338Raf, phospho-MEK, phospho-MAPK y phospho-PKB. (B) Células NIH y células de las líneas K-RasV12, K-RasV12/181A y K-RasV12/181D fueron privadas de suero durante 24 h y posteriormente activadas durante 10 min con 10% FCS. Los lisados se sometieron a un ensayo de unión con el “Ral Binding Domain” de RalBP1 para precipitar el Ral-GTP. La fracción unida y una fracción de los lisados fueron analizadas por Western Blot mediante anticuerpo anti-Ral.

## II.10 La fosforilación de K-Ras no favorece la unión a RBD

Otra de las cuestiones que quisimos resolver fue si la fosforilación confería una mayor afinidad del K-Ras por RBD y por consiguiente una mayor afinidad por Raf. Cuando tratábamos las células con TPA y W13 se estaba fosforilando K-Ras y lo que se observaba era una activación. Puede ser que tuviésemos más Ras-GTP o que este incremento fuese debido a que el Ras fosforilado presentaba una mayor afinidad por el RBD “in vitro” o lo que “in vivo” sería una mayor afinidad por Raf.

Para demostrar o descartar este efecto realizamos dos aproximaciones. Por un lado si el K-Ras fosforilado era más afín a RBD, esto podría reflejarse en que el mutante de pseudo fosforilación también lo fuera. Por otro lado si el aumento de unión de K-Ras a RBD cuando tratábamos las células con TPA y W13 era porque se producía una cantidad de Ras fosforilado que se unía con más afinidad, un tratamiento de la fracción unida a RBD con fosfatasa debería disminuir la unión.

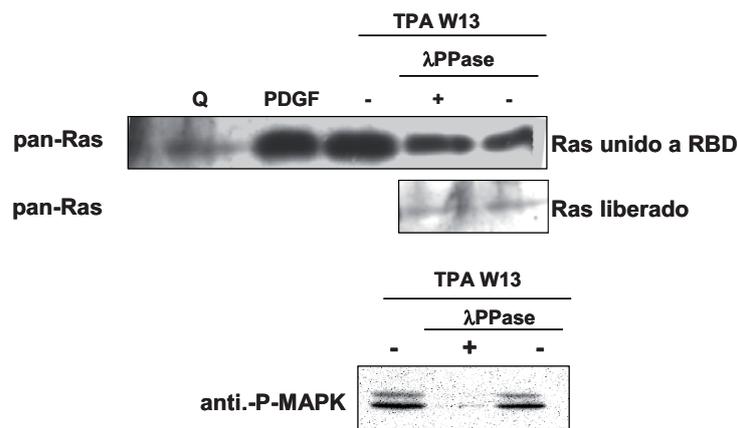
En cuanto la primera aproximación el experimento fue el siguiente: lisados normalizados por cantidad de proteína de células NIH3T3 control, y de células transfectadas con la misma cantidad de DNA de K-RasV12 control o K-RasV12/181A y K-RasV12/181D, se incubaron con RBD-GST unido a Glutaciona-Sefarosa. Para este experimento se escogió la forma oncogénica de Ras porque esta mutación hace que Ras no hidrolize el GTP y quede así permanentemente unido a este nucleótido. De esta manera nos asegurábamos que los mutantes y el control estuviesen igual de unidos a GTP. Tras el ensayo de unión la fracción unida y una alícuota de lisado se analizaron por Western Blot mediante un anticuerpo anti-HA (figura II.10.A)



**Figura II.10.A K-RasV12/181A y K-RasV12/181D tienen la misma afinidad por RBD que K-RasV12.** Células NIH3T3 fueron transfectadas con HA-K-RasV12, HA-K-RasV12/181A y HA-K-RasV12/181D. Sus lisados fueron normalizados por proteína y se incubaron con RBD-GST unido a Glutaciona-Sefarosa. Una alícuota de lisado y la fracción unida se analizaron mediante WB mediante un anticuerpo anti-HA.

Para abordar la segunda aproximación, células NIH3T3 privadas de suero durante 24 horas con medio 0.5% FCS seguidas de unas 2 horas con 0% FCS, fueron tratadas con PDGF o con TPA más W13 y se procedió a realizar el ensayo de unión a RBD. Posteriormente dos de las muestras tratadas con TPA y W13 se sometieron al tratamiento con fosfatasa: las dos fueron incubadas a 30°C durante 30 min, pero a una se le añadió fosfata y a la otra no. Las fracciones unidas al RBD se analizaron por Western Blot mediante un anticuerpo anti-HA. Una alícuota de lisado se analizó con anticuerpo anti-MAPK fosforilada como control de que el ensayo fosfatasa funcionaba.

El resultado de este experimento se observa en la figura II.10.B. Observamos que la activación de Ras con TPA más W13 sin añadir la fosfatasa, es casi igual que a la que se observa con PDGF. Por otra parte en las muestras incubadas durante 30 min a 30°C, disminuye algo la cantidad de Ras unido a RBD, pero no se observa diferencias entre la muestra tratada con fosfatasa y sin fosfatasa. Es decir, el tratamiento con fosfatasa de la muestra tratada con TPA y W13 no hace que disminuya la cantidad de Ras unido a RBD. La disminución que se observa respecto a la muestra sin ningún tratamiento es debido a las condiciones del ensayo en sí. La fosfatasa funciona correctamente pues observamos una disminución de los niveles de fosfo-MAPK.



**Figura II.10.B El tratamiento con fosfatasa del Ras-GTP formado por el tratamiento con TPA y W13, no disminuye la unión a RBD.** Células NIH3T3 después de pasar 24 horas privadas de suero, se trataron con PDGF (0.4nM) o con TPA(100nM) más W13(15µg/ml). Los lisados se incubaron con RBD-GST unido a glutationa-Sefarosa. El Ras-GTP precipitado de la condición tratada con TPA y W13 se incubó a 30°C durante 30 min en presencia o no de fosfatasa. La fracción unida al RBD, más una alícuota del medio de reacción del ensayo fosfatasa se analizaron por Western Blot mediante un anticuerpo pan-Ras. Como control positivo del funcionamiento de la fosfatasa, unos lisados se incubaron paralelamente en la reacción fosfatasa y se analizaron por Western Blot mediante anticuerpo anti-fosfoMAPK.

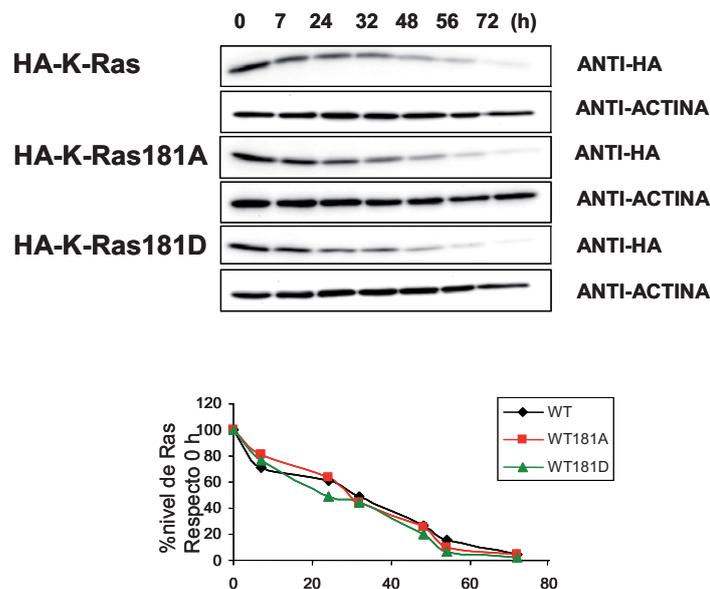
Por lo tanto, por los dos experimentos realizados, la fosforilación no produce en K-Ras un aumento de afinidad por RBD o lo que “in vivo” se podría traducir en un aumento de afinidad por Raf. Así pues, el aumento de K-Ras con capacidad de unión a GST-RBD tiene que ser debido a un aumento de la cantidad de Ras-GTP

## II.11 La fosforilación de K-Ras no afecta a la estabilidad de la proteína.

Ras es una proteína estable, tiene una vida media de 24 h (Ulsh, L. S. and Shih, T. Y. 1984) Poco o nada se sabe de la degradación de Ras. Nosotros quisimos averiguar si la fosforilación de la serina 181 podía afectar a la estabilidad de la proteína Ras.

Para ello, células NIH3T3 fueron transfectadas con HA-K-Ras control, HA-K-Ras181A y HA-K-Ras181D. Tras 24 h de expresión las células se trataron con cicloheximida (CHX), un inhibidor de la síntesis proteica. A partir de ese momento como no se sintetiza proteína de nuevo, se puede ir siguiendo la degradación de la que ya se había sintetizado en la célula. Los lisados celulares de los diferentes tiempos se normalizaron por cantidad de proteína y se analizaron Western Blot mediante un anticuerpo anti-HA.

Como se observa en la figura II.11, el tiempo de vida de los mutantes K-Ras181A y K-Ras181D no varía respecto el K-Ras sin mutar, siguiendo ambos una cinética de degradación igual a la del control.



**Figura II.11 La fosforilación del residuo 181 de Ras no afecta a la estabilidad de la proteína.** Células NIH3T3 fueron transfectadas con HA-K-Ras control, HA-K-Ras181A y HA-K-Ras181D. Tras 24 horas de expresión se trataron con cicloheximida 100µg/ml y se fueron recogiendo células a diferentes tiempos. La misma cantidad de proteína se analizó por Western Blot mediante un anticuerpo anti-HA y también con anticuerpo anti-actina como control de carga. Se cuantificaron tres experimentos diferentes y se muestra la gráfica en tanto por ciento de cantidad de Ras en cada tiempo, siendo 100 el nivel de Ras a tiempo 0.

### III. ESTUDIO DE LA POSIBLE IMPLICACIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE K-RAS EN TRANSFORMACIÓN.

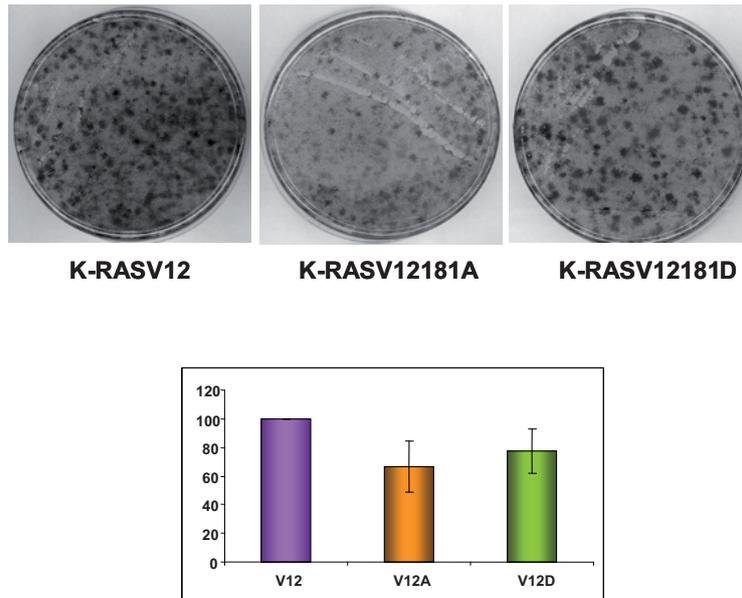
#### III.1 La fosforilación del residuo 181 es importante para la transformación de células NIH3T3: ensayo de formación de focus.

La forma oncogénica de K-Ras, K-RasV12, tiene la capacidad de transformar las células NIH3T3 “in vitro”. La capacidad transformante de éste y otros oncogenes en la línea NIH3T3 se mide por la capacidad de formación de focus. Esta línea, al ser una línea inmortal y por tanto presentar unas alteraciones genéticas de origen, se puede transformar tan solo con la introducción de un oncogén. Por ello se han convertido en una herramienta básica para la investigación de la transformación inducida por Ras y otros oncogenes (Bishop, J. M. 1987)

En cuanto demostramos la fosforilación de K-Ras por PKC, uno de los puntos más interesantes era averiguar si esta fosforilación podía afectar a la capacidad transformante de K-Ras. Si la fosforilación producía de alguna manera una activación de Ras, quisimos averiguar si el mutante no fosforilable K-RasV12/181A tenía una menor capacidad transformante y si el mutante constitutivamente fosforilado, K-RasV12/181D, por el contrario, tenía más.

Para ello realizamos ensayos de formación de focus, tal como se describe en el apartado de materiales y métodos. Transfectamos células NIH3T3 con K-RasV12, K-RasV12/181A y K-RasV12/181D. Tras quince días de cultivo se producía la formación de focos y se pasaba a la cuantificación.

En la figura III.1 se observa tres placas representativas transfectadas con K-RasV12, K-RasV12/181A y K-RasV12/181D, respectivamente. Tras los quince días de cultivo se observa la formación de focos. En la condición del K-RasV12/181A se aprecia un menor número de focos. Cuando pasamos a la representación del promedio de cuantificaciones de unos seis experimentos, sabiendo que en cada experimento se hacían cuatro réplicas de cada condición, observamos que las placas de células transfectadas con K-RasV12/181A presentan un 30% menos de focos. Podríamos decir que la no fosforilación de la serina 181A del K-RasV12 afecta su capacidad transformante disminuyéndola. Cabe comentar que una correcta fosforilación y defosforilación de la serina 181 parece ser importante en sí, ya que las células transfectadas con el mimético de fosforilación tienen tendencia a formar menos focos que el control.



**Figura III.1 La no fosforilación de la serina 181 afecta a la capacidad de transformación de K-RasV12.** Células NIH3T3 fueron transfectadas con K-RasV12, K-RasV12/181A y K-RasV12/181D y tras quince días de cultivo se cuantificaron los focos formados. En la izquierda se muestra tres placas representativas de cada condición y en la derecha se muestra la cuantificación de unos seis experimentos. Se representa el tanto por ciento de focos respecto los focos formados por K-RasV12 que se considera el 100.

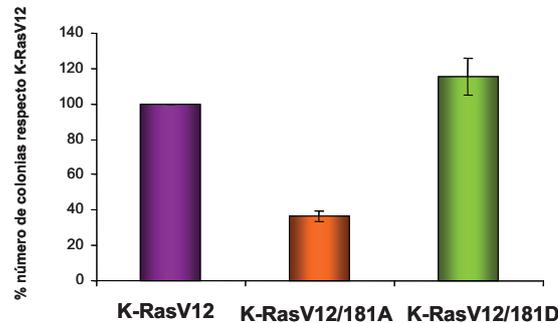
### III.2 Las células transfectadas con el K-RasV12/181A presentan un menor crecimiento en suspensión.

Otro hecho que se relaciona con la transformación de las células es la adquisición de la capacidad de proliferar en suspensión, sin necesidad de adhesión al sustrato. Quisimos averiguar si las células NIH3T3 transfectadas con K-RasV12 o con los mutantes K-RasV12/181A y K-RasV12/181D presentaban diferencias a la hora de crecer en suspensión y para ello realizamos un ensayo de crecimiento en agar blando. En este ensayo, las células transfectadas con estas construcciones se sembraron en una solución de agar al 0,3% sobre una capa de agar al 0,5%, impidiéndose así que se adhiriesen a la placa y obligándolas a que crecieran en suspensión.

Tras tres semanas creciendo en estas condiciones, se observa a simple vista la formación de colonias que no son más que agrupaciones de células que han sido capaces de proliferar en suspensión. Para una mejor y más fácil cuantificación de las colonias se realizaron fotos de las placas observadas a través de una lupa.

La figura III.2 representa la media de la cuantificación realizada, en tres experimentos diferentes, del número de colonias observada en cada condición. Los

valores han sido expresados en forma de porcentaje respecto al número de colonias observado en la condición de células transfectadas con el K-RasV12 (siendo éste el 100%).



**Figura III.2** Crecimiento en suspensión de las células NIH3T3 transfectadas con K-RasV12, K-RasV12/181A o K-RasV12/181D. Células NIH3T3 transfectadas con K-RasV12, K-RasV12/181A o K-RasV12/181D fueron sembradas en placas de 35mm en una suspensión de agar tal como se explica en el apartado de materiales y métodos. Tras esperar tres semanas, se tomaron imágenes con una cámara acoplada a una lupa y se contaron las colonias formadas en cada condición. La gráfica representa el porcentaje de número de colonias formadas respecto el número de colonias de las células transfectadas con el K-RasV12

Observamos como el mutante K-RasV12/181A, que no se puede fosforilar, transfectado en células NIH3T3 provoca una menor formación de colonias en el ensayo de agar blando, por lo que la fosforilación podría ser importante para el crecimiento de las células en suspensión.

### III.3 Estudio de la proliferación de células de las líneas estables en cultivo que expresan KRasV12, KRasV12/181A, KRasV12/181D

Dado el resultado anterior, pasamos a estudiar el porqué esas células que expresaban el mutante no fosforilable K-RasV12/181A transformaban menos las células NIH3T3. Una de las primeras cuestiones que quisimos resolver fue si estas células proliferaban más lentamente. Para ello realizamos diferentes experimentos que se detallan a continuación. En este primer apartado las células del cultivo estaban o ciclando o eran sincrónicas pero no estaban sometidas a ningún factor “extra” como sí se verá en apartados posteriores.

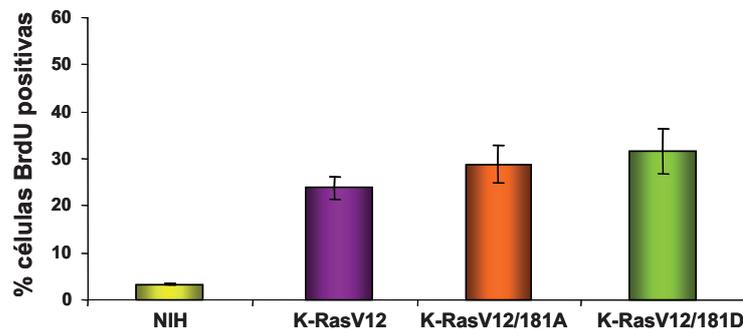
### III.3.1 Estudio del número de células en fase S en las líneas que expresan K-RasV12, K-RasV12/181A o K-RasV12/181D.

La Bromodeoxiuridina, al ser un análogo de la timidina, se incorpora al DNA de las células cuando éstas realizan la fase S del ciclo celular. Posteriormente al realizar una inmunocitoquímica con anticuerpo específico anti-BrdU, detectaremos aquellas células que hayan duplicado su material genético.

Una manera de saber como ciclan las células de un cultivo asincrónico es haciendo un pulso de incorporación de BrdU durante un tiempo corto. El número de células en fase S que se contabiliza después de ese tiempo respecto a un control nos puede dar una idea de si las células tienen un ciclo acelerado o enlentecido.

Así que con nuestras líneas estables K-RasV12, K-RasV12/181A y K-RasV12/181D realizamos una incorporación de BrdU durante una hora. Tras ese tiempo se fijaron y se realizó la inmunocitoquímica anti-BrdU. Posteriormente por campo visual en el microscopio se cuantificó los núcleos positivos para BrdU y el total de células que se observaba. En la figura III.3.1 se muestra la cuantificación promedio de varios experimentos y el resultado se expresa en tanto por ciento de células BrdU positivas respecto el total de células contadas.

En la figura III.3.1 observamos que, como era de esperar, todas las línea K-RasV12 presentan un mayor número de células en fase S que las NIH3T3, pero que entre ellas, no existen diferencias significativas. Por este método empleado no parece que haya diferencias de proliferación entre las líneas K-RasV12, K-RasV12/181A y K-RasV12/181D.



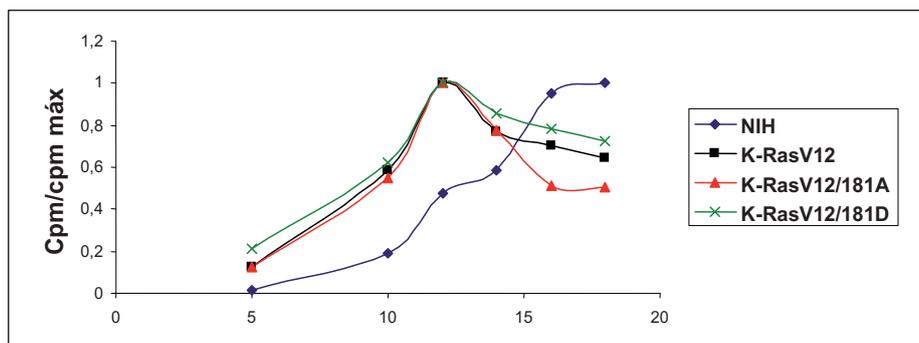
**Figura III.3.1 Incorporación de BrdU durante dos horas de las líneas estables.** Células NIH3T3 control y células de las líneas estables K-RasV12, K-RasV12/181A y K-RasV12/181D ciclantes se incubaron durante 2 horas con BrdU. Se realizó la inmunocitoquímica con anticuerpo anti-HA y se contabilizaron los núcleos positivos respecto el total de células observadas.

### III.3.2 Estudio de la duración de la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular de las líneas estables K-RasV12, K-RasV12/181A o K-RasV12/181D.

Las NIH3T3 es una línea celular que cicla cada 24 horas. La fase S ocurre a las 18 horas aproximadamente. Si una línea celular ciclase más rápidamente se observaría un adelanto de la fase S. Así que quisimos comparar nuestras líneas estables entre sí para ver si alguna de ellas presentaba la fase S a un tiempo diferente.

La forma de estudiar el momento de síntesis de DNA es a través de la incorporación de timidina triada (T-H<sup>3</sup>) a diferentes tiempos. La línea NIH3T3, K-RasV12, K-RasV12/181A Y K-RasV12/181D fueron privadas de suero durante 24 horas. Tras tener las células quiescentes se activaron con medio rico en factores de crecimiento (10%) y se fueron recogiendo células a diferentes tiempos (5, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 h) previa incubación durante una hora con la T-H<sup>3</sup>. Tras el procesado de las muestras tal como se explica en el apartado de materiales y métodos se cuentan las cpm de cada muestra.

En la gráfica de la figura III.3.2 se representan los valores de cpm de cada punto corregidos por el valor máximo al que se le da el valor de 1. Como se observa en la gráfica las tres líneas estables presentan el punto máximo de incorporación de timidina, o lo que es lo mismo, el punto máximo de síntesis de DNA adelantado, respecto a las NIH3T3. Entre ellas en cambio no existen diferencias, todas tienen el punto máximo a las 12 horas aproximadamente.



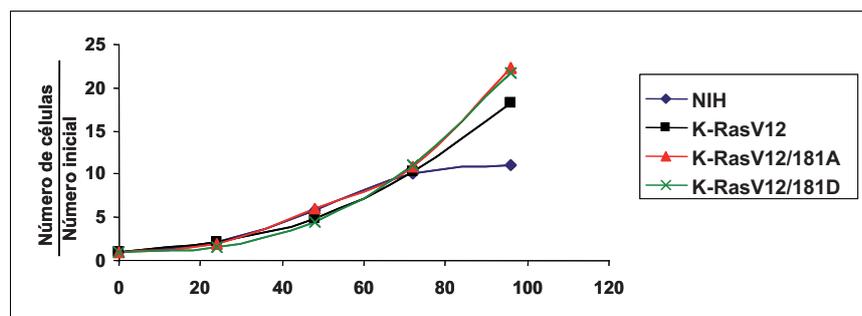
**Figura III.3.2 Incorporación de timidina triada en las líneas estables activadas a diferentes tiempos después de 24 horas de privación.** Las células NIH3T3 y las líneas estables K-RasV12, K-RasV12/181A y K-RasV12/181D se privaron de suero durante 24 horas y transcurrido este tiempo se activaron con medio al 10% de factores de crecimiento. Se recogieron células a diferentes tiempos de activación, incubándolas previamente una hora con timidina triada. Se representan los valores de las cpm corregidas por el valor máximo siendo éste 1.

### III.3.3 Tasa de proliferación de las líneas estables K-RasV12, K-RasV12/181A o K-RasV12/181D.

Otra manera aproximativa de saber si existían diferencias de proliferación entre nuestras líneas estables, era contando el número de células conociendo el número inicial. Este es un método poco fino y que puede dar bastante variabilidad, pero que, en el caso de que existieran diferencias claras se observarían.

En pocillos de 35mm sembrábamos unas 50.000 células y lo hacíamos por triplicado para disminuir la variabilidad. Contábamos un tiempo 0 para corregir por el número de células que realmente habíamos sembrado y a partir de ahí, íbamos tripsinizando las células y contándolas con la cámara de Neubauer, tal como se explica en el apartado de materiales y métodos, cada 24 horas.

En la gráfica de la figura III.3.3 se representa la media de tres cuantificaciones, cada punto está corregido por su número inicial de células para normalizar. Se contaron células hasta las 96 horas. Como se aprecia en la gráfica, se observan diferencias entre las líneas estables y las células NIH3T3. Éstas a las 72 ya llegan a un nivel de confluencia y el cultivo no se divide, en cambio las líneas estables siguen creciendo. Pero no se aprecian diferencias significativas entre la línea K-RasV12, K-RasV12/181A y K-RasV12/181D, llegando las tres a los cuatro días a un número de células bastante similar



**Figura III.3.3 Cuantificación del número de células durante cuatro días de células NIH3T3 y de las líneas estables.** Se sembraron 50.00 células por pocillo de 35mm por triplicado. Las células se tripsinizaron y contaron con la cámara de Neubauer cada 24 horas. La gráfica representa el promedio de tres cuantificaciones diferentes.

En este apartado III.3 hemos estudiado la proliferación de las líneas que expresan K-RasV12/181A y K-RasV12/181D, comparando con las NIH3T3 y la línea K-RasV12, en condiciones normales de cultivo es decir, sin que la confluencia y los factores de crecimiento fueran factores limitantes. Así que, en estas condiciones de cultivo sin limitaciones y por las técnicas utilizadas, incorporación de bromodeoxiuridina y de timidina triada y cuantificación del número de células, podríamos decir que no se han encontrado diferencias de proliferación entre las líneas K-RasV12, K-RasV12/181A y K-RasV12/181D, destacando que estos métodos son válidos para observar las diferencias que sabemos que existen entre las líneas que expresan K-Ras oncogénico y las NIH3T3

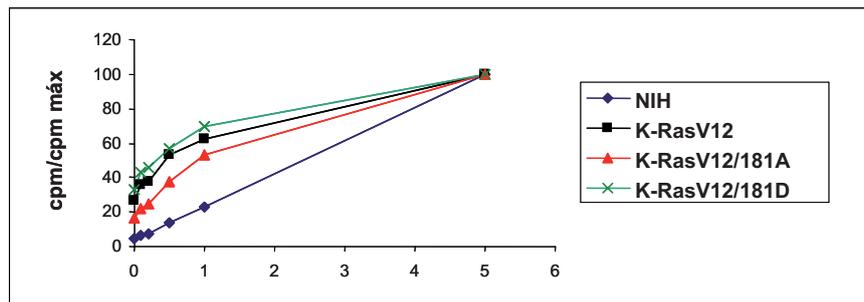
En los apartados siguientes si que se estudia la proliferación de estas líneas celulares bajo unas condiciones de cultivo determinadas.

#### **III.4 La línea celular que expresa el mutante KRasV12/181A prolifera menos en condiciones bajas de factores de crecimiento**

Con el siguiente experimento se quiso estudiar si las líneas K-RasV12/181A y K-RasV12/181D presentaban diferencias con respecto a la línea K-RasV12 a la hora de proliferar en condiciones bajas de suero.

Para ello, células NIH3T3 y células de las líneas K-RasV12, K-RasV12/181A y K-RasV12/181D se incubaron 24 horas con diferentes medios que contenían diferentes concentraciones de suero: 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 5%. Transcurridas las 24h se realizó un ensayo de incorporación de timidina triada durante una hora para analizar cuántas células estaban sintetizando DNA y por tanto cuántas células proliferaban en cada condición.

El resultado se observa en la gráfica de la figura III.4. Cada punto se ha corregido por su valor máximo de incorporación de timidina al que se le ha dado valor 100. Observamos como las células NIH presentan unos niveles muy bajos de incorporación de timidina a bajas concentraciones de factores de crecimiento y como las líneas estables presentan unos valores mayores de incorporación. Comparando las líneas estables entre sí, la línea K-RasV12/181A presentó unos valores de timidina incorporada más bajas que las líneas K-RasV12/181D o la línea K-RasV12, pareciendo pues, que esta línea proliferaba menos a cantidades bajas de factores de crecimiento en el medio.



**Figura III.4. Incorporación de timidina triada de las líneas K-RasV12, K-RasV12/181A y K-RasV12/181D.** Estas células se incubaron durante 24 horas con medio al 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1 o 5% de FCS. Tras ese tiempo se hizo una incorporación de timidina triada de una hora y se contabilizaron las cpms. Se presenta la gráfica promedio de dos experimentos. Los valores de cada punto están corregidos por el valor máximo de incorporación al que se le da valor 100.

### III.5 La línea estable que expresa el K-RasV12/181A, tiene una supervivencia menor en confluencia: ensayos de MTS.

Nos interesó investigar si las líneas estables que expresan K-RasV12, K-RasV12/181A y K-RasV12/181D presentaban diferente capacidad de proliferar en condiciones de confluencia. Para ello realizamos ensayos de viabilidad con MTS bajo estas condiciones. Éste es un método colorimétrico, que mide la reducción del MTS por las deshidrogenasas de las células vivas a un compuesto cuya absorbancia se mide a 490nm.

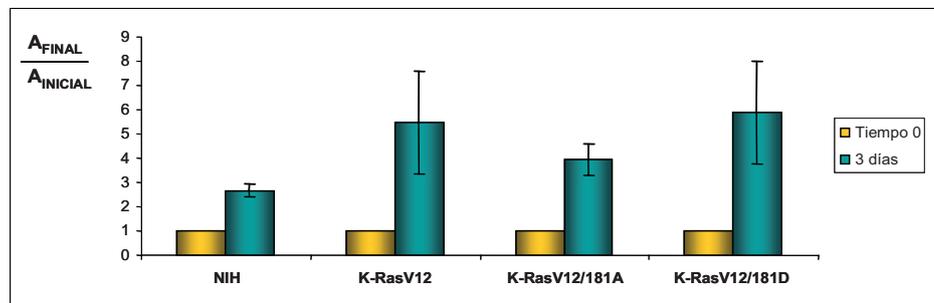
Este es un sistema saturable, en el que hasta cierto número de células hay una proporcionalidad entre la cantidad de células y la absorbancia a 490nm, pero que a partir de un número ya no existe esta proporcionalidad. Así que, antes de empezar los experimentos realizamos una curva con células control para saber entre qué cantidades de células podíamos observar diferencias de absorbancia y además determinar un número de células entre estas cantidades en el que las células estuviesen confluentes.

El resultado de este experimento control se muestra en la tabla III.5.1. Se sembraron 2500, 6250, 12500, 25000 células y se hizo una lectura inicial y una al cabo de tres días. De la tabla se deduce que el sistema no permite evaluar absorbancias que provengan de más de 25000 células. Para movernos en ese rango decidimos plantar unas 1500 células por pocillo de placa de 96 y por la superficie de estos pocillos sabemos que a los tres días de cultivo las células empiezan a estar confluentes.

cels replantadas	2500	6250	12500	25000
día 0	782,25	1426	1881	2083,5
día 3	1664	1723,75	1815,5	1847

**Figura III.5.1.** Tabla control de número de células sembradas y la absorbancia del MTS tras una lectura inicial y una lectura después de 3 días

Pasamos a realizar el ensayo de viabilidad con las líneas estables K-RasV12, K-RasV12/181A, K-RasV12/181D y usando como control la línea NIH3T3. En la figura III.5.2 se presenta el resultado de forma que la absorbancia de cada línea a los tres días está corregida por su valor de absorbancia en el día inicial al que se le ha dado valor 1. Observamos como el método permite ver la inhibición de las células NIH3T3 debido a la confluencia, ya que a los tres días tienen una viabilidad menor que la línea K-RasV12. El resultado es que la línea K-RasV12/181A presenta menor viabilidad en confluencia que las líneas K-RasV12 y K-RasV12/181D por lo que parece ser que la no fosforilación del K-RasV12, podría afectar a su capacidad de conferir a las células aptitudes para proliferar en condiciones de confluencia.



**Figura III.5.2** La línea celular K-RasV12/181A presenta menor viabilidad en condiciones de confluencia. Se sembraron 1500 células de cada línea celular NIH3T3, K-RasV12, K-RasV12/181A y K-RasV12/181D tal como se ha explicado en el apartado de materiales y métodos. Tras añadir el MTS e incubar 1 h se realizó una lectura de la absorbancia a 490nm en el día 0 y tres días más tarde. La gráfica representa la media de cuatro experimentos diferentes. El valor de absorbancia al tercer día está corregido por el valor de la absorbancia del día 0.

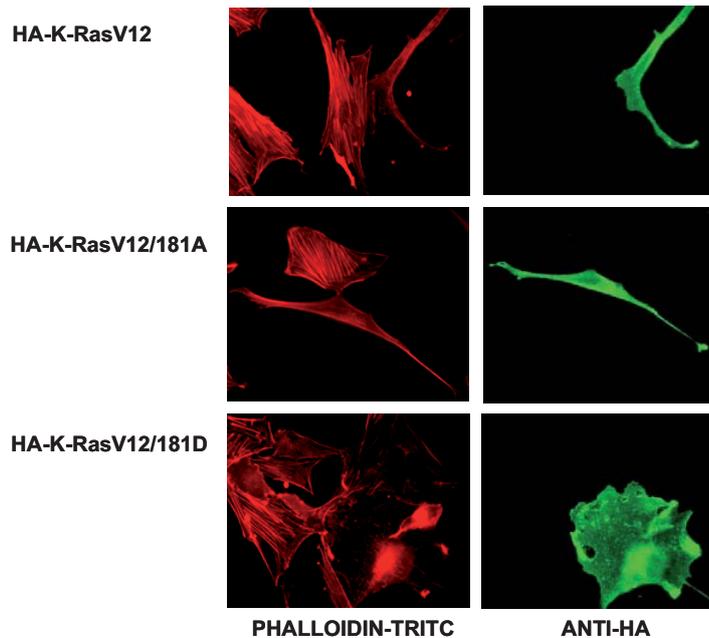
Los experimentos representados en la gráfica anterior han sido realizados con “pools” de las líneas estables K-RasV12, K-RasV12/181A y K-RasV12/181D. Pero estos mismos ensayos de viabilidad se han realizado con diferentes clones de estas líneas celulares con el mismo resultado; los clones que expresan K-RasV12/181A presentan una menor viabilidad en condiciones de confluencia.

### **III. 6 K-RasV12, K-RasV12/181A y K-RasV12/181D transfectados en células NIH3T3 desestabilizan las fibras de estrés.**

Las células que expresan de forma prolongada y sostenida K-RasV12 no poseen fibras de estrés. La formación de las fibras de estrés corre a cargo de la proteína RhoA. Las células transformadas con K-RasV12 a pesar de no tener fibras de estrés tienen una elevada actividad Rho. Esta actividad Rho, en estas células transformadas, se relaciona con una disminución de los niveles de p21, de manera que las células puedan proliferar. RasV12 a través de Raf/MEK estaría inhibiendo al efector de Rho, ROCK, que se encarga de la formación de las fibras de estrés. De esta manera células transformadas con RasV12 tienen una elevada actividad Rho, unos bajos niveles de p21 y no tienen fibras de estrés (Sahai, E. et al. 2001).

Nos interesó averiguar si nuestros mutantes de K-RasV12, K-RasV12/181A y K-RasV12/181D, eran capaces de desestabilizar las fibras de estrés. Para ello transfectamos células NIH3T3 con las tres construcciones y dejamos un tiempo de expresión largo, unas 72 horas. Transcurridos ese tiempo realizamos una inmunocitoquímica anti-HA, para detectar las células que expresaban nuestras proteínas HA, y una incubación con Phalloidin-TRITC, una toxina que se une a la F-actina polimerizada y como está conjugada con TRITC, detectamos directamente con el microscopio de fluorescencia las fibras de estrés.

En la figura III.6 observamos como tanto las células transfectadas con K-RasV12, K-RasV12/181A y K-RasV12/181D, presentan una despolimerización de las fibras de estrés. De esta forma, cuantificando cuántas células transfectadas no presentan fibras de estrés, no se han observado diferencias en cuanto este efecto sobre la actina entre los mutantes y el control.



**Figura III.6. Los mutantes K-RasV12/181A y K-RasV12/181D desestabilizan igual que K-RasV12 las fibras de estrés.** Células NIH3T3 fueron transfectadas con K-RasV12, K-RasV12/181A y K-RasV12/181D. Tras 72 h de expresión se realizó una inmunocitoquímica con anticuerpo anti-HA primaria y uno secundario conjugado a Alexa488. Durante la incubación con el secundario también se realizó una incubación con Phalloidin-TRITC.

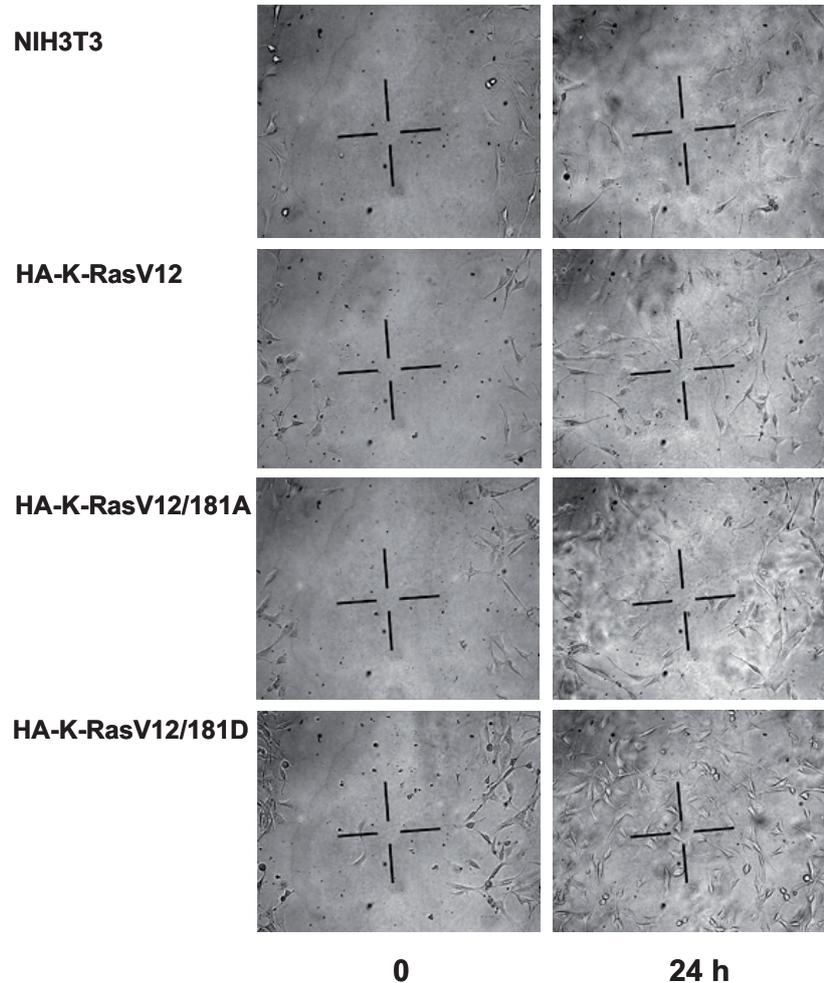
Estas mismas observaciones de las fibras de estrés en células transfectadas, se realizó en células de las líneas estables que expresan K-RasV12, K-RasV12/181A y K-RasV12/181D de forma constitutiva, con el mismo resultado: las tres líneas celulares no presentaban fibras de estrés.

### **III.7 No se observan diferencias en la capacidad migratoria entre las líneas celulares que expresan K-RasV12, K-RasV12/181A o K-RasV12/181D.**

La expresión de K-RasV12 en las células se relaciona con un aumento de la motilidad celular y por tanto de la migración celular. Nos interesó investigar si nuestros mutantes podían conferir diferentes propiedades al respecto. Para ello se realizó un “wound assay” o ensayo de reconstitución de la monocapa celular tras realizar una “herida” en ella. Sembramos en p60 células NIH3T3 y células de las líneas estables K-RasV12, K-RasV12/181A y K-RasV12/181D. Tras rasgar la capa de células se capturan imágenes inmediatamente después de producir la “herida” y 24 h después.

En la figura III.7 observamos como tras estas 24 h las células han ido migrando para “cerrar la herida” y reconstituir la monocapa celular. Este método nos permite observar diferencias entre las células NIH3T3 control y las que expresan K-RasV12 ya que éstas últimas, como era de esperar, migran más rápidamente y a las 24 h la herida

está más cerrada. No se observan, sin embargo, diferencias entre las líneas K-RasV12, K-RasV12/181A y K-RasV12/181D, por lo que parece ser que, al menos por este método empleado, no existen diferencias de migración entre estas tres líneas celulares, hecho relacionado con que las tres desestabilizan igual las fibras de estrés, como hemos visto en el apartado anterior.



**Figura III.7** Las líneas K-RasV12, K-RasV12/181A y K-RasV12/181D no presentan diferencias en migración. Se siembran células NIH3T3 control y células de las líneas K-RasV12, K-RasV12/181A y K-RasV12/181D y se realiza una “herida” en la monocapa con una punta amarilla de pipeta. Al momento se toman fotos de una zona y 24 h después la misma zona es fotografiada de nuevo







## **Dominio de unión de Ras a CaM.**

Trabajos anteriores del grupo (Villalonga, Priam et al. 2001) demostraron que K-Ras4B es una proteína de unión a CaM o “Calmodulin binding protein” (CaBMP). Esta unión de K-Ras a CaM se produce tanto a partir de lisados celulares como a partir de las proteínas purificadas, por lo que esta interacción es directa. Otra característica de esta unión, es que se produce cuando K-Ras está unido al nucleótido GTP es decir, cuando K-Ras se encuentra en la forma activa. A raíz de estos resultados, en el presente estudio hemos querido averiguar cuál/es son los dominios y los aminoácidos de Ras implicados en la interacción con CaM.

Como la unión a CaM era específica de la conformación activa de Ras y como en esta conformación, Ras presenta unas diferencias en el dominio efector, quisimos investigar si mutaciones en este dominio impedían la interacción entre estas dos proteínas. Este dominio efector o Switch I comprende la región entre los aminoácidos 32 y 40 y cambia de conformación cuando Ras está unido a GTP. Para evaluar si esta región intervenía en la unión, utilizamos unos mutantes, ampliamente usados en la bibliografía, que presentan una mutación puntual en esta zona provocando que Ras, de los efectores Raf, PI3K y RalGDS, active a uno sólo de éstos y no a los otros dos. Los ensayos de unión con estos mutantes revelaron que estas mutaciones no afectaban a la interacción entre Ras y CaM. Si CaM no reconoce a Ras-GTP por este dominio efector, todavía queda por averiguar como sensa el estado en el que se encuentra Ras, si unido a GDP o a GTP. Cabe decir que nosotros hemos estudiado tres mutaciones puntuales y concretas de este dominio, por lo que no sabemos si otras mutaciones interferirían en la unión entre las dos proteínas o si existe otro factor fuera de este dominio efector que ayude a que Ras-GTP sea reconocido selectivamente por CaM.

Dado que la unión de Ras a CaM es específica de isoforma, H-Ras, N-Ras y K-Ras4A no unen CaM, y donde difieren estas proteínas con K-Ras4B es en el extremo C-terminal, la primera aproximación para averiguar el dominio de unión fue investigar si el dominio hipervariable participaba en la interacción. Analizamos la unión a CaM de, por un lado, GST-K-Ras1-166 expresado en bacterias y purificado y, por otro, la unión a partir de lisados celulares de HA-K-Ras1-166 expresado en NIH3T3. Sorprendentemente, mientras el primero se unía a CaM, el K-Ras sin el dominio hipervariable no unía CaM a partir de los lisados celulares. Así pues, la región hipervariable era esencial para la interacción de K-Ras y CaM en un contexto celular, pero no para la interacción de la proteína purificada. Cabe, pues, la posibilidad de que a parte de un dominio de unión en la región hipervariable, haya también otro dominio en la región globular. Quizá esta región quede menos expuesta en K-Ras expresado en células y por eso en un contexto más celular esta región no es suficiente para la

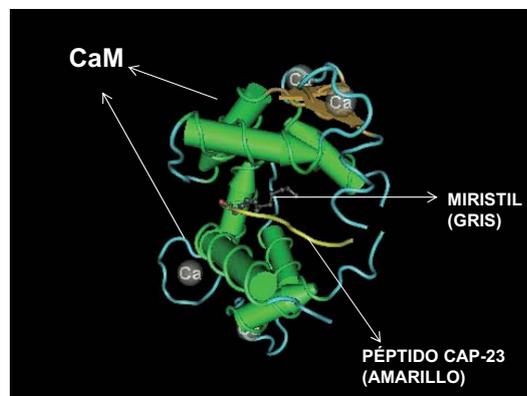
interacción. Quizá también la unión de alguna otra proteína celular a este dominio secundario podría explicar que éste no participe en la interacción con CaM.

Para averiguar que región “secundaria” estaba implicada en la interacción entre K-Ras purificado y CaM, deleccionamos la  $\alpha$ -hélice comprendida entre los aminoácidos 150-166. Al comprobar entonces que este mutante K-Ras1-150 perdía la unión a CaM, concluimos que, seguramente, esta  $\alpha$ -hélice era la responsable de la interacción de la proteína purificada. Pasamos a realizar mutaciones puntuales en esta hélice para, si bien a partir de los lisados celulares esta región no era suficiente, averiguar si de alguna forma colaboraba o incluso ser esencial. Las mutaciones que diseñamos tenían como finalidad disminuir la basicidad de la hélice (mutantes QQQ, DDD, 161D, 164D, 165D) o desestabilizar la  $\alpha$ -hélice (mutante PREP). En el análisis hemos visto como, a excepción del mutante QQQ, si bien la unión a CaM quedaba afectada, también lo hacía la unión de estas proteínas con la membrana plasmática, quedando localizadas citoplasmáticamente. Por lo tanto, no podíamos concluir que estas mutaciones afectaran directamente a la unión a CaM porque quizás estaban afectando a las modificaciones post-traduccionales de la región hipervariable.

En la profundización del papel del dominio hipervariable de K-Ras en la interacción con CaM, quisimos investigar cómo participaban el grupo farnesil y la secuencia de lisinas. Del ensayo de unión con CaM del mutante K-Ras185A, el cual tiene la cisteína que se farnesila sustituida por una alanina que no se puede modificar, concluimos que la farnesilación es esencial para la interacción, ya que este mutante perdía completamente su capacidad de interactuar con CaM. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el trabajo de Fivaz et al (Fivaz, M. and Meyer, T. 2005), en el que muestran que sólo la cola de K-Ras con la cisteína mutada a alanina, afecta a la unión a CaM. No realizaban los estudios con la proteína completa, por lo que quedaba por demostrar si algún otro dominio podía suplir al grupo farnesil en la unión de K-Ras con CaM.

Por otro lado, la secuencia de lisinas estaría estabilizando la unión, ya que la delección de una sola lisina disminuye drásticamente la interacción entre las dos proteínas. Recordemos que CaM establece interacciones hidrofóbicas con las CaMBP pero también se ayuda de aminoácidos básicos que se unen a sus aminoácidos ácidos y que ayudan en la interacción. De esta forma, CaM estaría interactuando hidrofóticamente con el grupo farnesil de K-Ras y a la vez establecería contacto electrostático con la secuencia adyacente de lisinas. Esto podría explicar porqué H y N-Ras a pesar de estar farnesiladas no unen CaM: estas isoformas no poseen la secuencia polibásica que estabiliza la unión. En el caso de estas dos proteínas, que se palmitoilan en cisteínas muy próximas a la cisteína que se farnesila, pudiera ser que este grupo palmitoil interfiriera estéricamente impidiendo así la unión de CaM.

Hasta hace poco estaba establecido que CaM interaccionaba con las CaMBP a través de regiones peptídicas exclusivamente. Pero recientemente se ha descrito para la CaMBP CAP-23/NAP, que CaM interacciona con ella a través de su grupo miristil. Al resolver la estructura del péptido miristilado de CAP/NAP-23 con CaM, se ha observado como CaM rodea al grupo miristil y como aminoácidos básicos cercanos a este grupo interaccionan con grupos ácidos de CaM (Figura 1). Algo muy similar parece estar ocurriendo en el caso de la interacción entre K-Ras y CaM. Como se discutirá más adelante, la interacción entre la GTPasa Ral y CaM también ocurre a través del grupo isoprenoide, por lo que parece que estamos ante un nuevo tipo de dominio de unión a CaM, a parte de los hasta ahora descritos,  $\alpha$ -hélices anfipáticas, secuencias polibásicas con aminoácidos hidrofóbicos o los dominios IQ.



**Figura 1. Estructura cristalográfica del péptido N-terminal miristoilado de CAP-23/NAP-22 con  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM.** En amarillo, el péptido de CAP-23 N-terminal que interaccionaría electrostáticamente con residuos ácidos de CaM y, en gris, el grupo miristil que queda acogido por CaM.

Sabiendo que la farnesilación era esencial para la interacción de K-Ras y CaM, ¿los mutantes de la región 150-166 que no unían CaM y que además no se localizaban en la membrana plasmática se farnesilaban? Para averiguarlo decidimos realizar un ensayo de partición en Tritón-X114 y ver como se distribuían nuestros mutantes respecto el K-Ras que se farnesila y el K-Ras185A que no se puede farnesilar. Este experimento nos aclaró que los mutantes que habíamos obtenido de la región 150-166 no unían CaM ni se localizaban correctamente en la membrana plasmática porque no estaban farnesilados. Pero, aquí se abre una nueva incógnita: porqué mutaciones en esta región y más concretamente, porqué la mutación puntual de la arginina 161 impide la farnesilación de K-Ras. Éste es un hecho curioso porque nada se sabe de la implicación de esta zona en el procesamiento de K-Ras. Se sabe que la farnesiltransferasa (el enzima que cataliza la adición del grupo farnesil) reconoce el motivo CAAX de la

proteína a ser farnesilada. El mismo motivo CAAX en sí mismo confiere especificidad del enzima ya que si X es una metionina o serina la proteína será farnesilada y si es una leucina será geranilizada. El tipo de aminoácido de la posición A también influye en la farnesilación, no en cuanto a especificidad si no en cuanto eficiencia de la reacción. Pero aunque parezca que el motivo CAAX contenga en sí mismo todos los determinantes para una eficaz y selectiva prenilación, no se puede descartar que otros aminoácidos puedan influir. Se sabe que los aminoácidos N-terminales a la cisteína pueden influir en la eficiencia de la reacción (Moore, S. L. et al. 1991) y que la secuencia polibásica del K-Ras4B es la responsable de que la farnesiltransferasa se le una con más afinidad que H-Ras y que además pueda ser sustrato de la geranilgeraniltransferasa (James, G. L. et al. 1995). Por estos motivos, pudiera ser que los aminoácidos básicos de la zona 150-166 y entre ellos la arginina 161, aún estando alejados del dominio CAAX, pudiesen participar de alguna forma aún desconocida en la farnesilación de K-Ras.

Existen otras GTPasas de la superfamilia Ras que unen CaM: Ric (Wes, P. D. et al. 1996), Kir/Gem (Fischer, R. et al. 1996), Rin (Lee, Ching Hsien et al. 1996), Rad (Moyers, J. S. et al. 1997), Ral (Wang, K. L. et al. 1997) y Rab3A (Park, J. B. et al. 1997) (Tabla 1).

	MODIFICACIÓN LIPÍDICA	DOMINIO DE UNIÓN A CaM	DEPENDENCIA DEL NUCLEÓTIDO	DEPENDENCIA PRENILACIÓN
<b>Ric</b>	No CAAX	Secuencia C-terminal 20 aa básicos e hidrofóbicos	?	-
<b>Kir/Gem</b>	No CAAX	Secuencia C-terminal 30 aa básicos e hidrofóbicos	?	-
<b>Rin</b>	No CAAX	Secuencia C-terminal 25 aa básicos e hidrofóbicos	?	-
<b>Rad</b>	No CAAX	Secuencia C-terminal 30 aa básicos e hidrofóbicos ( $\alpha$ -hélice?)	Más a RadGDP	-
<b>RalA</b>	Si, 2 geranil	$\alpha$ -hélice anfipática antes del dominio CAAX	SI	SI
<b>Rab3A</b>	Si, 2 geranil	$\alpha$ -hélice anfipática N-terminal	Más a Rab3AGTP	SI

De estas GTPasas, Ric, Kir/Gem, Rin y Rad no presentan motivo CAAX y no se han encontrado modificadas lipídicamente, aunque Kir/Gem y Rad tienen una cisteína C-terminal. Para estas proteínas el dominio de unión a CaM es una secuencia C-terminal entre 20 y 30 aminoácidos con carácter básico o hidrofóbico. De estas proteínas sólo se ha descrito para Rad una preferencia de CaM por el estado GDP. La función de la unión a CaM de estas GTPasas depende de cada una de ellas. En Ric, CaM estaría inhibiendo su señalización (Harrison, S. M. et al. 2005) en el desarrollo de Drosophila. En el caso de Kir/Gem, CaM inhibe la unión del GTP (Fischer, R. et al. 1996) y más

recientemente se ha visto que CaM podría participar en la localización de la GTPasa (Beguin, P. et al. 2005). Para Rin se ha descrito que junto con CaM estaría regulando vías de señalización neuronales (Hoshino, Mitsunobu and Nakamura, Shun 2003). Por último, la unión de CaM a Rad estaría regulando su localización (Beguin, P. et al. 2006).

La unión de CaM a las otras dos GTPasas, Ral y Rab3A, quizá se aproxima más a la unión entre CaM y K-RasB. Ral y Rab3A presentan un motivo CAAX y ambas proteínas se geranilizan en dos cisteínas C-terminales. Lo similar al caso de K-RasB, es que la unión de ambas proteínas con CaM depende del estado nucleotídico y de la modificación lipídica. Para Ral está mejor demostrado que CaM estaría interaccionando con el grupo geranil que se adiciona a la cisteína del motivo CAAX (Sidhu, R. S. et al. 2005). Para ambas proteínas se ha descrito que CaM/Ca<sup>2+</sup> provoca la disociación de RalA y Rab3A de las membranas de vesículas sinápticas. Esta disociación podría ser debida a que la unión de CaM al extremo C-terminal de la proteína, en el caso de RalA a la unión al grupo isoprenil, modifique su interacción con membranas. ¿Estaríamos en el caso de K-RasB ante una situación similar?

Existe un trabajo de Sidhu et al ((Sidhu, R. S. et al. 2003) en el que observaron que el tratamiento del pellet de membranas de células MCF-7 con CaM/Ca<sup>2+</sup> provocaba la elución de K-RasB de esta fracción, de forma similar a lo que ocurre en el caso de Ral y Rab3A. Aún más recientemente se publicó un trabajo de Fivaz M y Meyer T (Fivaz, M. and Meyer, T. 2005) en el que demostraban una translocación de K-Ras desde la membrana plasmática a endomembranas en neuronas de hipocampo. Esta disociación de K-Ras de la membrana respondía a una señal de aumento de Ca<sup>2+</sup>, por el tratamiento de las células con glutamato, y está regulada por la unión de CaM a K-Ras en respuesta a esa subida de Ca<sup>2+</sup>. Estos autores postulan que CaM secuestraría la región C-terminal de K-RasB, interfiriendo así con los puntos de interacción con la membrana plasmática, y muy probablemente esto lo llevaría a cabo uniéndose al grupo prenil, ya que demuestran que la cola C-terminal de K-Ras mutada en la cisteína, impidiéndose así la farnesilación, no une CaM. Este proceso es totalmente reversible, ya que al alcanzarse de nuevo los niveles basales de Ca<sup>2+</sup>, K-RasB volvería a la membrana plasmática.

En nuestro estudio, aún determinando que el dominio de unión de K-Ras a CaM es el grupo farnesil siendo además las seis lisinas también necesarias, no hemos observado este fenómeno. Es más, hemos demostrado que K-Ras y CaM colocalizan de forma muy mayoritaria en la membrana plasmática, por lo que la interacción entre estas dos proteínas “in vivo” tiene lugar en este compartimento celular. Si en nuestro modelo celular la unión de CaM a K-Ras provocase su translocación e internación a otros compartimentos celulares, se hubiera puesto de manifiesto la colocalización de estas

proteínas en estas zonas. Además, al realizar estos experimentos, la sola sobreexpresión de CaMCFP no produce el desplazamiento de K-Ras de la membrana plasmática.

Sí que creemos que CaM puede estar modulando la interacción de K-Ras con la membrana plasmática. El hecho de que CaM interactúe con el grupo farnesil, que se inserta en la bicapa, junto con el hecho de que se ayude interactuando con las lisinas de la cola polibásica, seguramente está afectando a como K-Ras se une a la membrana plasmática. Quizá la unión a CaM retenga a K-Ras en unos microdominios de membrana diferentes a los que se encuentra cuando la presencia de CaM desaparece. Pudiera ser que CaM en este caso actuase como Galectina-3 con K-Ras o Galectina-1 con H-Ras (Paz, A. et al. 2001) (Elad-Sfadia, G. et al. 2002) (Elad-Sfadia, G. et al. 2004). En el caso de H-Ras, Galectina-1 se une cuando éste está en forma GTP y es importante en su señalización y diverge esta señal hacia Raf a expensas de PI3K. Para H-Ras está muy bien descrita la diferente localización que presenta dentro de los microdominios de membrana cuando está en forma GTP o GDP. H-Ras-GDP se ancla en “dominios raft” y cuando se activa se mueve y localiza en “dominios non raft” de membrana plasmática. Los autores, dado que H-Ras y Galectina-1 colocalizan en “dominios non raft” y junto con el hecho de que Galectina-1 estabiliza la forma GTP de H-Ras, postulan que la unión de Galectina-1 a la GTPasa sirve de anclaje a estos microdominios non raft, donde H-Ras puede permanecer más tiempo activo. En el caso de Galectina-3 y K-Ras, a pesar de que esta movilidad entre microdominios de membrana no está definida para esta isoforma, se observa que Galectina-3 se asocia selectivamente a la forma activa de K-Ras estabilizando la forma GTP y por ello suponen que en este caso también ocurra algo parecido al caso de Galectina-1/H-Ras. Lo interesante de todo esto es que, si bien no se ha demostrado que las galectinas interactúen con las dos isoformas Ras por el grupo farnesil, sí que parece que la interacción dependa del grupo prenil, hecho que es perfectamente factible, ya que se ha identificado una cavidad hidrofóbica en la estructura de Galectina-1 que podría albergar cómodamente el grupo farnesil. Así que, estamos ante un ejemplo de cómo la interacción entre una proteína (Galectina) y el grupo prenil de Ras modula la interacción de este último con la membrana plasmática, afianzándolo en un determinado dominio sin provocar su liberación.

Por ello, pudiera ser que CaM actúe con K-Ras de una forma similar: su interacción a través del grupo farnesil y la cola polibásica modularía la unión de K-Ras con la membrana plasmática de alguna forma todavía desconocida y por investigar, sin que ello suponga un desprendimiento e internación de la GTPasa.

Además, el complejo formado por la unión de las dos proteínas podría permitir todavía la interacción con la membrana plasmática. Aunque el grupo farnesil atrapado por CaM y parte de las lisinas queden también enmascaradas, puede ser que la CaM a



se activaban las isoformas H y N-Ras. La interacción entre CaM y K-Ras estaba íntimamente relacionada con una regulación también específica de isoforma.

Lo siguiente que nos interesó fue averiguar cómo PKC activaba a K-Ras y para ello investigamos si podía ser a través de una fosforilación directa de la quinasa sobre la GTPasa. Existía un precedente del año 1987 de fosforilación de K-Ras por PKC (Ballester, R. et al. 1987). Este grupo demostró que el tratamiento de células de la línea Y1 (una línea de células adrenocorticales murinas que expresan grandes cantidades de K-Ras) con TPA inducía la fosforilación de K-Ras y aventuraban que el residuo de fosforilación era la serina 181.

Nosotros hemos demostrado que la fosforilación “in vitro” de K-Ras por PKC es inhibida por CaM. También hemos demostrado que el tratamiento de células NIH3T3 con TPA y W13 induce la fosforilación de K-Ras o dicho de otra forma, K-Ras se fosforila “in vivo” por PKC cuando inhibimos la CaM. En cuanto al residuo de fosforilación, hemos comprobado “in vitro”, frente a otros posibles, que es la serina 181. De forma indirecta hemos demostrado que el residuo de fosforilación “in vivo” es también la serina 181, ya que hemos visto como la fosforilación de la serina 181 es clave para la activación de K-Ras por TPA y W13, ya que esta activación desaparece al mutar esta serina a alanina, impidiéndose así la fosforilación.

Existen otras proteínas reguladas por PKC y CaM y en estos casos existe mutua exclusión: cuando la proteína está unida a CaM no se puede fosforilar por PKC y, por el contrario, la fosforilación impide la interacción con CaM. Algunos ejemplos de proteínas que a la vez son efectoras de CaM y PKC son p21<sup>CIP/KIP</sup> (Rodríguez-Vilarrupla, A. et al. 2005), MARCKS (Aderem, A. 1992), neuromodulina (Apel, E. D. et al. 1990), EGFR (Li, H. and Villalobo, A. 2002) y en el caso de estas proteínas suele coincidir que el dominio de unión a CaM incluya el/los residuo/s de fosforilación por PKC. Un ejemplo clásico de esta interacción competitiva es la proteína MARCKS. MARCKS es una proteína esencial en el desarrollo del sistema nervioso central y que fue identificada como el mayor sustrato de la PKC en células de este sistema y macrófagos. En el medio de la proteína se encuentra una secuencia básica anfílica franqueada por lisinas. Esta secuencia es el dominio de unión a CaM y a la vez contiene diversos residuos de fosforilación por PKC. Esta secuencia básica también interacciona con fosfolípidos de membrana y con actina. En el caso de MARCKS, la unión de CaM a esta región básica y la fosforilación por PKC, si bien son excluyentes, provocan el mismo efecto en la localización de MARCKS: MARCKS pasa de estar unida a la membrana plasmática por el grupo miristil a ser una proteína citosólica. Se han sugerido algunas hipótesis para esta doble regulación. MARCKS podría actuar como un reservorio de CaM en células del sistema nervioso en condiciones de no actividad de PKC y cuando se produce la activación de PKC y la consecuente fosforilación de

MARCKS, CaM sería liberada (Blackshear, P. J. 1993). Algo similar se ha sugerido en células de la musculatura lisa (Gallant, C. et al. 2005). Otra hipótesis es que, en el caso que PKC se activara primero, MARCKS sería fosforilada y no uniría CaM de manera que, cuando CaM se activara se produciría una mayor activación de los otros sustratos, dado que MARCKS ya no competiría. Por el contrario, si CaM se activara primero y permaneciese unida a MARCKS, PKC fosforilaría a otros sustratos en mayor proporción (Chakravarthy, B. et al. 1999).

K-Ras pasaría a engrosar esta lista de proteínas que presentan una doble y excluyente regulación por CaM y PKC: hemos demostrado como la fosforilación por PKC está regulada por CaM, como el residuo de fosforilación (serina 181) en este caso también coincide con el dominio de unión a CaM (dominio hipervariable) y cómo se da la exclusión entre PKC y CaM. Esta exclusión entre PKC y CaM se refleja, por un lado en como la fosforilación por PKC está inhibida por la unión de K-Ras a CaM y por otro en que K-Ras fosforilado (representado por el mutante mimético de fosforilación) no une CaM.

Hasta este punto hemos visto como en la activación de K-Ras por TPA y W13 se produce por la fosforilación de la serina 181 por PKC y ésta es necesaria, ya que el mutante K-Ras181A no se activa. Para la activación del mutante alanina por TPA y W13, la sola inhibición de CaM no es suficiente, hace falta la activación de la PKC. A la pregunta de cómo la fosforilación hace que tengamos una activación de K-Ras, o dicho de otra manera, hace que tengamos más K-Ras unido a RBD inicialmente nos planteamos dos hipótesis representadas en la figura 3. (1) La fosforilación inhibiría la desactivación de K-Ras por las GAPs o (2) la fosforilación provocaría un aumento de la afinidad por Raf, por ejemplo, hecho que se traduciría en una mayor afinidad por el RBD-Raf-1 y por ello encontraríamos más Ras-GTP unido a RBD tras el tratamiento con TPA y W13.

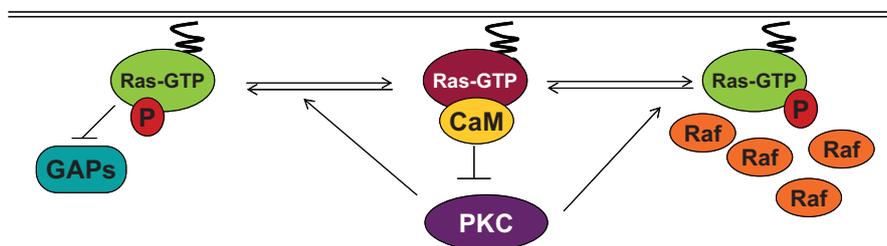


Figura 3. Representación de las dos hipótesis iniciales de trabajo.

Por lo que hemos investigado, sabemos que no es debido a una mayor afinidad de K-Ras fosforilado por GTP. Esta hipótesis la hemos descartado tanto porque los

mutantes K-RasV12/181A y K-RasV12/181D presentan la misma unión a RBD, como porque el tratamiento con fosfatasa de K-Ras activado con TPA y W13 no afecta a la unión de RBD. Sabemos también por el trabajo en el que se describió por primera vez la fosforilación de K-Ras por PKC (Ballester, R. et al. 1987), que la fosforilación no afecta ni a la afinidad de K-Ras por GTP, ni a su actividad GTPasa intrínseca. Por lo tanto, ante estas evidencias, de alguna manera con el tratamiento con TPA y W13 lo que provocamos es un aumento de Ras-GTP. Una cuestión aún por resolver es porqué tenemos más Ras-GTP. Quizá K-Ras fosforilado presente de alguna manera una menor desactivación por GAPs. Ya que CaM se une a K-Ras-GTP y al inhibirla se produce la fosforilación de K-Ras, es de suponer que la forma GTP es la que se fosforila. Quizá la fosforilación estabiliza esta forma GTP, porque confiere a K-Ras una menor afinidad por las GAPs o porque provoca un cambio de microlocalización a un lugar donde estas GAPs son menos accesibles. En definitiva, cualquiera de estas dos hipótesis llevaría a una menor desactivación de K-Ras por GAPs y a un acúmulo de Ras-GTP.

Por lo hasta ahora expuesto, hemos resuelto uno de los objetivos de nuestro trabajo, averiguar cuál es la función de la interacción de CaM con K-Ras: la unión previene la fosforilación y activación de K-Ras por PKC. ¿En qué condiciones fisiológicas puede ser esencial este mecanismo? Quizá estamos ante un mecanismo de seguridad desarrollado por la célula para evitar la activación de Ras por PKC, en condiciones en que necesita cierta actividad PKC, pero no le interesa tener actividad Ras. Un escenario posible sería el final de la fase G1 temprana. La actividad Ras coincide con un pico a los 10-30 minutos de la adición de mitógenos y un segundo pico entre las 2-4 horas. En cambio la actividad PKC se alarga un poco más: un primer pico después de la adición de mitógenos y un segundo pico más tardío a las 2-6 h. Es decir, al final de la G1 temprana PKC puede mantenerse activa durante un tiempo más prolongado que Ras. Quizá en esta situación la unión a CaM es la responsable de impedir que K-Ras pudiera volverse a activar habiendo actividad PKC, hecho que llevaría a una activación sostenida de Ras, MAPK y por consiguiente, una elevación de los niveles de p21 que podrían causar la parada del ciclo. Ya hemos visto en trabajos anteriores como CaM es necesaria para “down-regular” la señal de MAPK (Bosch, M. et al. 1998). Otro escenario posible sería en condiciones de bajas concentraciones de suero. En estas condiciones puede existir cierta actividad PKC basal sin que ello comporte una activación de Ras y por ello CaM estaría impidiéndolo. Por otro lado, sería interesante averiguar si en condiciones fisiológicas en algún momento se consigue realmente la activación de K-Ras mediante la inhibición de CaM y activación de PKC.

A partir de aquí, nos planteamos investigar si la fosforilación de K-Ras tenía alguna función específica a parte de conseguir su activación.

Durante la escritura de esta tesis, fue publicado un trabajo en el que implicaban la fosforilación de K-Ras con una internación de la proteína desde la membrana plasmática hacia endomembranas, entre ellas mitocondrias (Bivona, T. G. et al. 2006). Una vez en este compartimento K-Ras fosforilado induce apoptosis.

Precisamente, una de las primeras cosas que nos interesó, fue averiguar si la fosforilación de K-Ras afectaba a su localización celular. Según nuestros resultados el mutante mimético de fosforilación, K-Ras181D o K-RasV12/181D, expresado tanto de forma transitoria como estable en células NIH3T3 se localiza en la membrana plasmática de forma mayoritaria, igual que la forma salvaje. Si hay una pequeña cantidad que se encuentra disociada de la membrana plasmática, nosotros no la hemos apreciado.

Para el estudio de la funcionalidad de la fosforilación nos ha sido muy útil la construcción de líneas de células NIH3T3 que expresan de forma estable K-Ras, K-Ras181A y K-Ras181D, así como sus respectivas formas oncogénicas V12. A diferencia de lo observado por Bivona et al, nuestras líneas celulares que expresan el mimético de fosforilación proliferan y sobreviven, no produciéndose la muerte del cultivo. De igual manera no se ha observado apoptosis en células que expresan el mimético de fosforilación de forma transitoria.

Hemos investigado si la activación de K-Ras por mitógenos se podría ver modificado por la fosforilación. Hemos demostrado que tanto el mutante no fosforilable (K-Ras181A) como el mimético de fosforilación (K-Ras181D) se activan de igual forma que el K-Ras por concentraciones mitogénicas de factores de crecimiento.

También hemos estudiado la capacidad de los diferentes mutantes para activar algunos efectores de Ras (Raf/MEK/MAPK, RalGDS, PI3K). Este estudio lo hemos realizado en células quiescentes que expresan tanto de manera estable como transitoria las formas oncogénicas del mutante mimético de fosforilación y el no fosforilable. De esta forma captábamos sólo la activación proveniente de nuestras formas oncogénicas y no de la forma endógena. Según este experimento y de la manera realizada, no hemos apreciado diferencias de activación de los efectores estudiados entre las líneas que expresan K-RasV12, K-RasV12/181A o K-RasV12/181D.

## **Efectos de la fosforilación de K-RasV12 en transformación.**

Paralelamente a la investigación de cómo la fosforilación activaba y afectaba a la forma “wild-type” de K-Ras, quisimos estudiar si la fosforilación podía modular de alguna forma la actividad de la forma oncogénica de K-Ras, K-RasV12, en cuanto a transformación.

El primer ensayo que realizamos fue el ensayo de formación de focus con el fin de evaluar la capacidad transformante en células NIH3T3 de los mutantes de fosforilación, K-RasV12/181A y K-RasV12/181D, respecto a K-RasV12, cuya capacidad de transformar y de formar focus en las células NIH3T3 ya es bien conocida. El resultado fue que el impedir la fosforilación del residuo 181, la capacidad de formación de focus de K-RasV12 disminuye en un 40% aproximadamente. Cabe comentar, que el mimético de fosforilación también tiene disminuida su capacidad, por lo que parece que una correcta fosforilación-defosforilación del residuo 181 es importante para la transformación de Ras.

Para contrastar este ensayo de formación de focus, realizamos un ensayo de crecimiento en agar blando, que evaluaría la capacidad de los mutantes de conferir a las células capacidad de crecer en suspensión, hecho que se relaciona con transformación celular. En este caso, las células que expresaban el mutante no fosforilable K-RasV12/181A formaban un 60% menos de colonias en agar blando que el K-RasV12. En este ensayo, las células que expresaban el mimético de fosforilación se comportaban igual que el K-RasV12, formando prácticamente el mismo número de colonias. Tras estos ensayos se puso de nuevo en evidencia que la fosforilación de la serina 181 parecía ser importante para la transformación de las células NIH3T3.

¿Cómo la fosforilación afecta a la señalización de K-RasV12? Sabemos que la fosforilación produce una activación de la forma no oncogénica de K-Ras y que posteriormente K-Ras fosforilado podría tener una función específica. En el caso de K-RasV12, puesto que siempre está en forma activa, la fosforilación no producirá una mayor activación y, los efectos que hemos observado de una menor formación de focus y una menor formación de colonias en agar blando, se deberán a un efecto específico de la fosforilación. A partir de aquí nos propusimos investigar cómo la fosforilación favorecía la capacidad transformante de K-RasV12, puesto que la no fosforilación producía una pérdida de este potencial. Hemos estudiado tres posibles explicaciones: que las células que expresan K-RasV12/181A posean una menor tasa de proliferación ya en condiciones normales, que estas células tengan un mayor requerimiento de factores de crecimiento o que sean capaces de proliferar menos en condiciones de confluencia.

Para descartar diferencias en proliferación en condiciones favorables de cultivo, hemos realizado un estudio del número de células en fase S (incorporación a tiempos cortos de BrdU), un estudio de la duración de la fase G1 de las diferentes líneas celulares (con la incorporación de timidina a diferentes tiempos) y hemos investigado la tasa de proliferación de estas líneas (cuantificación del número de células en el tiempo). Los resultados de estos experimentos descartaron diferencias de proliferación entre las líneas que expresaban K-RasV12 y entre las que expresaban los mutantes de fosforilación.

Posteriormente, pasamos a evaluar como se comportaban estas líneas celulares en condiciones más limitantes: a bajas concentraciones de factores de crecimiento y en condiciones de confluencia. Para investigar la proliferación a bajas concentraciones de suero realizamos un ensayo de incorporación de timidina en esas condiciones. Las tres líneas presentaban una proliferación mayor, en esas condiciones, que la línea control NIH3T3. Pero comparando estas tres líneas entre sí, la línea que expresa el mutante no fosforilable presenta un mayor requerimiento de concentraciones de suero, presentando casi un 50% menos de células en fase S respecto las que presenta la línea K-RasV12 o K-RasV12/181D. De igual forma, cuando realizamos un ensayo de viabilidad (con MTS) de las líneas celulares en condiciones de confluencia, la línea que expresaba el mutante alanina presentaba menor viabilidad.

Así que parece ser que la menor capacidad del mutante no fosforilable de transformar células NIH3T3 pudiera estar relacionada con la menor capacidad de las células que expresan este mutante para proliferar en condiciones de bajas concentraciones de suero o de proliferar en condiciones de confluencia. Cabe decir que, aunque los experimentos hasta ahora realizados parecen indicar que así es, nos gustaría evaluar esta menor capacidad del mutante no fosforilable de crecer en confluencia o a bajas concentraciones de suero con otras técnicas. Así mismo, sería interesante investigar si en estas condiciones los mutantes presentan un patrón de activación de efectores diferente a las células transformadas con K-RasV12.

Por lo hasta ahora observado, la fosforilación de K-Ras no sólo juega un papel en su activación (válido para la forma glicina 12), si no que además la fosforilación de la serina es importante en sí para mediar algunos efectos celulares debidos a la expresión de K-RasV12. Como comentamos anteriormente, otros autores han propuesto que la función de la fosforilación de K-RasV12 es producir una internación de la proteína a endomembranas, entre ellas las mitocondrias, desde donde K-RasV12 fosforilado puede mediar apoptosis a través de su asociación con BclX<sub>L</sub> (Bivona, T. G. et al. 2006). Si bien nosotros no hemos observado estos efectos, quizá porque CaM es clave para impedir que suceda en estas células o nuestras células presentan un patrón de expresión

de BclX<sub>L</sub> diferente, este trabajo apoya la idea de que la fosforilación del residuo 181 tiene otra función más que activar a la proteína.

A pesar de que nosotros no hayamos observado esta liberación de K-Ras fosforilado de la membrana, si tenemos en cuenta los resultados de cómo CaM se une a K-Ras (a través del grupo farnesil), que K-Ras fosforilado no une CaM, junto con que la fosforilación podría afectar a la interacción de K-Ras con la membrana plasmática, si que proponemos que esta doble regulación puede estar afectando a la microlocalización de K-Ras dentro de la misma membrana plasmática. La introducción de una carga negativa en este residuo próximo a la región polibásica, junto con la pérdida de unión a CaM, modificaría la microlocalización de K-Ras que pasaría a una zona donde estuviera más activo y, en base a nuestros resultados, quizá K-Ras fosforilado se situara entonces en un zona donde fuera menos accesible a las GAPs. En esta nueva zona K-Ras fosforilado podría acceder a unos efectores determinados que harían posible los efectos observados de mediar proliferación a bajas concentraciones de suero o en confluencia. La no fosforilación del residuo impediría este desplazamiento y por consiguiente estos efectos. Como hemos discutido en párrafos anteriores, este desplazamiento puede ser que ocurra en estas condiciones fisiológicas, o puede ser que no ocurra, precisamente porque CaM actuaría como un anclaje para evitarlo.

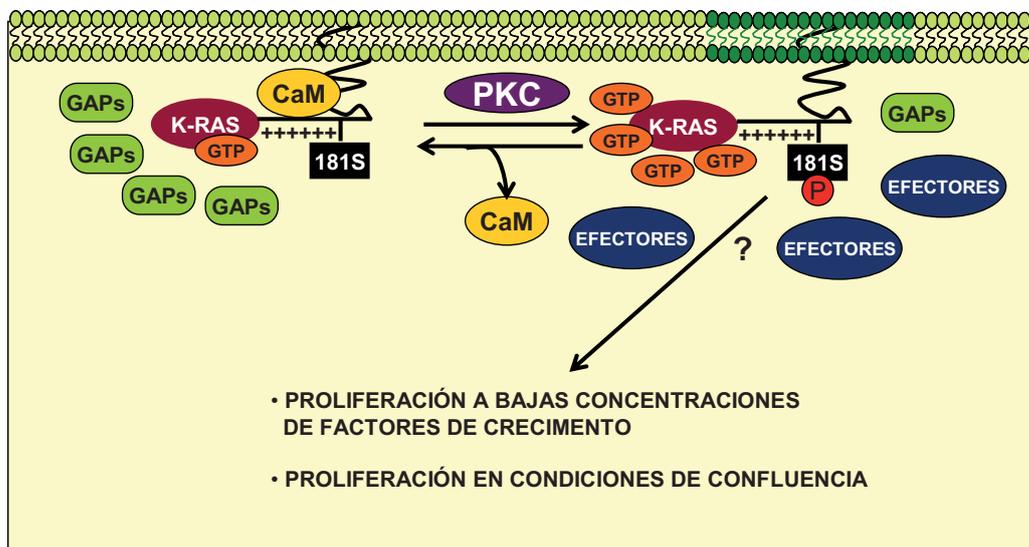


Figura 5. Modelo propuesto para la regulación de K-Ras por unión a CaM y fosforilación por PKC.

Dentro de la maraña que supone todos los mecanismos que activan o desactivan a Ras, los mecanismos que lo regulan y las vías que él mismo puede activar, este trabajo aporta un nuevo mecanismo de regulación de Ras por interacción con otra proteína: CaM. Dentro de todo este entramado de vías de regulación, CaM estaría regulando negativamente a Ras, impidiendo su activación y fosforilación por PKC. Sólo K-Ras presenta esta doble regulación por interacción con CaM y por fosforilación por PKC, siendo por tanto éste un mecanismo muy específico. Esta especificidad y los efectos que controla esta regulación se suman a la lista de las diferencias existentes entre las isoformas Ras. ¿Existen tumores en los que este mecanismo esté desajustado? Si pensamos que la fosforilación del K-RasV12 es importante para mediar algunos procesos que intervienen en la transformación de las células, ¿existen mutaciones de esta serina en tumores humanos? El grupo de M. Phillips propone que la activación de la PKC en tumores que expresan K-RasV12 sería beneficioso puesto que en estas células se induciría apoptosis. Pero existe otro trabajo que propone lo contrario, estando más de acuerdo con nuestras hipótesis. En este trabajo estudiaron varias líneas tumorales que expresan K-RasV12 y en ellas observaron que si se inhibía la actividad PKC, estas células entraban en apoptosis (Liou, J. S. et al. 2004). Puede ser que esto suceda porque K-RasV12 utilice vías efectoras dependientes de PKC para activar procesos importantes en transformación o en inhibición de la apoptosis o puede ser que lo observado sea una consecuencia directa por inhibir la fosforilación de K-RasV12. Estos trabajos, aunque esté por aclarar cómo, comparten con nosotros la importancia de PKC en la regulación de K-Ras, pero en nuestra historia existe otro personaje central, CaM, que regulará que PKC pueda actuar en determinados momentos (en condiciones bajas de suero o en confluencia) o que no pueda actuar jamás.



**CONCLUSIONES**

---



## CONCLUSIONES

1. El dominio hipervariable de K-Ras es esencial “in vivo” para la interacción con CaM
2. Para la interacción con CaM son esenciales el grupo farnesil y la secuencia polibásica de lisinas de K-Ras.
3. K-Ras y CaM colocalizan en mayor grado en la membrana plasmática.
4. La arginina 161 de K-Ras es importante para el procesamiento de la proteína.
5. K-Ras es la única isoforma que se activa por TPA y W13.
6. La fosforilación de K-Ras por PKC, tanto “in vitro” como “in vivo”, se inhibe por CaM
7. El residuo de fosforilación de K-Ras “in vitro” es la serina 181.
8. Para la activación “in vivo” de K-Ras por TPA y W13 es necesaria la fosforilación de la serina 181.

A través del uso del mutante no fosforilable (K-Ras181A) y del mutante mimético de fosforilación (K-Ras181D), podemos concluir:

9. K-Ras fosforilado en la serina 181 no une CaM
10. K-Ras fosforilado en la serina 181 se localiza en la membrana plasmática. La fosforilación no afecta a la localización subcelular de la proteína en células NIH3T3 de forma sustancial.
11. La fosforilación provoca un aumento de K-Ras-GTP.
12. La fosforilación no afecta a la proliferación en condiciones favorables
13. La no fosforilación de la serina 181 de K-RasV12 provoca una menor formación de focus y una menor formación de colonias en agar blando en células NIH3T3.
14. Las células que expresan el mutante no fosforilable de K-RasV12 presentan un mayor requerimiento de factores de crecimiento para proliferar.
15. La no fosforilación de la serina 181 de K-RasV12 dificulta el crecimiento de las células a densidades elevadas.







En el apartado de resultados, capítulo II, se demuestra la fosforilación “in vivo” del K-Ras a través de la incorporación de fósforo radioactivo. Pero antes de demostrar la fosforilación por este método, utilizamos otras dos técnicas. Por un lado, a través de Western Blot mediante un anticuerpo que reconociera específicamente el K-Ras fosforilado, y por otro lado mediante técnicas de electroforesis bidimensional.

Aunque con estas dos técnicas no conseguimos demostrar la fosforilación “in vivo” del K-Ras, fue bastante el tiempo empleado en demostrarla por estas dos vías, además de ser dos técnicas interesantes en si, y por ello se detallan en este Anexo.

## **I ANÁLISIS DE LA FOSFORILACIÓN “IN VIVO” DE K-RAS MEDIANTE EL ANTICUERPO ANTI-FOSFO-K-RAS (Ser181).**

El anticuerpo lo diseñamos para que reconociera el K-Ras endógeno de ratón fosforilado y dado que nuestro modelo celular son las células NIH3T3, el anticuerpo debía reconocer la secuencia murina de K-Ras. El inmunopéptido fue el siguiente:

**SKDGKKKKKKS(phospho)RT**  
**181**

Probamos la eficacia de los sueros antes de purificar el anticuerpo. Por Dot Blott analizamos si el suero reconocía específicamente el péptido K-Ras fosforilado (P-K-Ras). Como se observa en la figura I.1 el suero reconoce el péptido P-K-Ras, no reconoce el péptido K-Ras ni una proteína cualquiera, en este caso un péptido de la proteína p21 fosforilado o no, y la proteína CiclinaA.

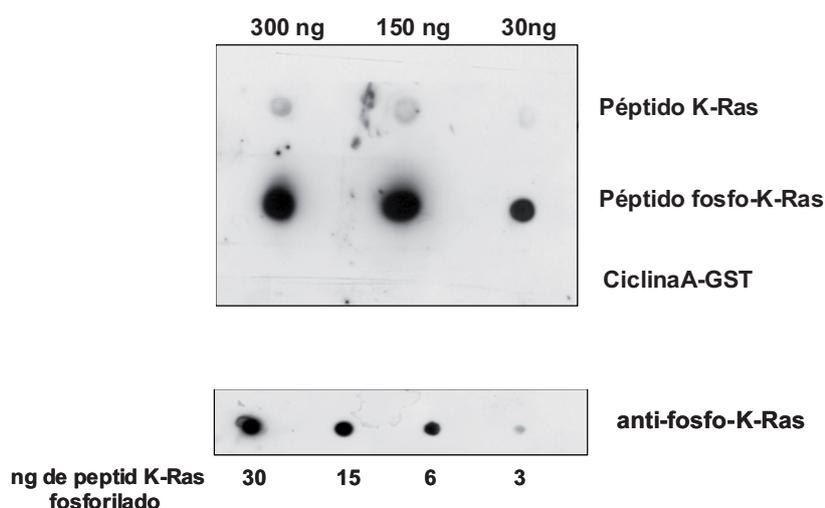
Posteriormente pasamos a probar si por Western Blott el suero reconocía el P-K-Ras a partir de lisados de células NIH3T3 ciclantes. El resultado fue que el suero reconocía multitud de bandas inespecíficas haciendo imposible identificar si alguna correspondía al K-Ras fosforilado, así que decidimos purificar el anticuerpo del suero.

El suero disuelto en PBS se pasó por una columna de péptido de K-Ras fosforilado y la fracción no unida se recogía para un posterior control. El volumen de columna era lavado con unos 20 volúmenes de PBS y luego procedíamos a la elución. Primero se eluía con Glicina 100mM pH 2.5 y se recogía diferentes eluidos que iban

siendo neutralizados con Tris 1M pH8. Luego se procedía a una segunda elución con 100mM Glicina pH 2.5 más Urea 4M recogiendo también varios eluidos que también se neutralizaban. Posteriormente se procedía a comprobar la purificación. Por Dot Blott se cargaba unos 3, 1.5 y 0.03  $\mu\text{g}$  tanto de péptido fosforilado y no fosforilado y de GST-CiclinaA y se incubaba con la fracción no unida y los eluidos para determinar la eficacia de la purificación.

Una vez comprobado que en los eluidos teníamos el anticuerpo anti-fosfo-K-Ras procedimos a pasarlos por una columna de péptido anti- K-Ras no fosforilado para aumentar la especificidad de los eluidos. En este caso nos quedamos con la fracción unida y después de dializarla en PBS, pasamos a comprobar el anticuerpo por Dot Blott.

Como se observa en la figura I.2, estos eluidos reconocían específicamente el péptido K-Ras fosforilado y no el no fosforilado ni la GST-CiclinaA. Como se muestra en la parte inferior de la figura el anticuerpo era capaz de reconocer hasta 3 ng de péptido.



**Figura I.2 Comprobación de los eluidos de la purificación del anticuerpo.** En la parte superior se muestra el Dot blot de comprobación de los eluidos. Se absorben unos 3 $\mu\text{l}$  de cada muestra en una membrana de nitrocelulosa y se procede a la incubación con el anticuerpo anti-fosfo-K-Ras y anticuerpo secundario policlonal. En la parte inferior, comprobación de la sensibilidad del anticuerpo. Se carga por Dot Blott diferentes cantidades de péptido fosforilado de K-Ras y se incuba la membrana con anti-fosfo-K-Ras

Una vez obtuvimos el anticuerpo purificado pasamos a analizar si reconocía al K-Ras fosforilado en los lisados celulares. Lo abordamos de las siguientes formas:

- Detección en lisados de células ciclantes
- Detección en la fracción unida a GST-RBD acoplado a glutatona a partir de lisados de células tratadas con TPA y W13. También se usó RBD purificado y unido covalentemente Sefarosa.
- Inmunoprecipitación con anticuerpo pan-Ras y posterior Western Blott con el anti-fosfo-K-Ras
- Inmunoprecipitación con anticuerpo anti-fosfo-K-Ras y Western Blott con pan-Ras
- Tratamiento de las células con inhibidores de fosfatasas, NaF y Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, para potenciar las fosforilaciones y así enriquecer la muestra con K-Ras fosforilado.
- Detección del K-Ras fosforilado por inmunofluorescencia.

En cada uno de estos abordajes el resultado fue negativo. El mayor problema con el que nos encontrábamos era, quizá, la poca cantidad de K-Ras endógeno fosforilado en los lisados celulares y la poca sensibilidad del anticuerpo. Para ello, pasamos a trabajar con la proteína transfectada. Como las construcciones para transfectar que teníamos contenían el K-Ras humano primero obtuvimos y clonamos el murino. Realmente las dos proteínas se diferencian en esta región en tres aminoácidos solamente pero uno de ellos esta a continuación de la serina 181 y quizá esto podía interferir al reconocimiento por parte del anticuerpo. También construimos el K-Ras murino con la mutación por alanina de la serina 181 para así tener el control.



**Figura I.3. Comparativa de la secuencia de K-Ras humana y murina.** En negro se señala la secuencia del péptido inmunógeno y en rojo los aminoácidos diferentes entre ambas secuencias.

Transfectamos las células con el K-Ras y K-Ras181A murinos y tratamos de identificar el K-Ras fosforilado de las siguientes formas:

- Inmunoprecipitación con anticuerpo anti-HA a partir de lisados de células asincrónicas y Western Blot anti-fosfo-K-Ras
- Inmunoprecipitación con anticuerpo anti-HA a partir de lisados de células tratadas con TPA y W13 y Western Blot anti-fosfo-K-Ras
- Precipitación con GST-RBD unido a Glutathione del Ras activado con TPA y W13 y Western Blot anti-fosfo-K-Ras

De ninguna de estas formas conseguimos detectar el K-Ras fosforilado. A parte de ir probando diferentes técnicas, también íbamos probando diferentes condiciones de Western Blot sin ningún resultado positivo.

## **II ANÁLISIS DE LA FOSFORILACIÓN “IN VIVO” DE K-RAS A TRAVÉS DE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL**

Con la electroforesis bidimensional las proteínas se separan por peso molecular y por punto isoelectrico (pI). Esta técnica permite así, diferenciar proteínas del mismo peso molecular, diferentes isoformas de una proteína o modificaciones post-traduccionales que en geles de una sola dimensión no sería posible. En general permite visualizar modificaciones de una proteína que provoquen un cambio en su pI. Por lo tanto es una técnica que se usa para identificar la fosforilación de proteínas, ya que la adición del fosfato al ser una carga negativa modifica el pI de la proteína y eso se visualizará en el gel bidimensional.

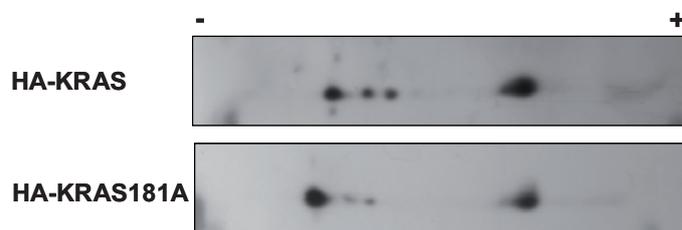
K-RasB tiene un pI de 8.24 debido a la basicidad de su extremo carboxi-terminal, cosa que le diferencia de las otras isoformas K-RasA, H-Ras y N-Ras que tienen unos pI de 6.33, 5.16 y 5.01 respectivamente. Para analizar la fosforilación a través de geles bidimensionales hemos trabajado con la proteína transfectada K-Ras conjugada al epítipo HA. Debido a la acidez de este “tag” K-Ras pasa de un pI de 8.24 a uno teórico de 6.44 y es ahí donde corre aproximadamente en las tiras de gradiente de pH de 3-10.

En materiales y métodos ya se ha detallado como obteníamos la muestra, se corría la primera dimensión y como se corría la segunda. Para analizar la fosforilación las muestras tenían diferentes orígenes:

- Lisados de células ciclantes transfectadas con el HA-K-Ras o el HA-K-Ras181A
- Lisados de células transfectadas con el HA-K-Ras o HA-K-Ras181A privadas de suero durante 24 horas y tratadas o no con TPA y W13.
- Lisados de células transfectadas con el HA-K-Ras o HA-K-Ras181A y tratadas o no durante 24 horas con TPA 100nM para depleccionar la PKC.
- Lisados de células transfectadas con el HA-K-Ras o HA-K-Ras181A y tratados o no con fosfatasa.

En los dos últimos puntos, el tratamiento crónico de las células con TPA y el tratamiento de la muestra con fosfatasa tenían como finalidad demostrar si los puntos que aparecían en las muestras sin tratar se correspondían en realidad a una movilidad diferente del HA-K-Ras por fosforilación.

En la figura II.1 se observa el patrón bidimensional que obteníamos con muestras provenientes de células ciclantes que expresaban HA-K-Ras o HA-K-Ras181A. Cabe decir que, si bien el patrón de puntos es reproducible, las diferencias de intensidad de los puntos que corren más hacia los pH ácidos (+) entre el HA-K-Ras o HA-K-Ras181A no. Por esa variabilidad existente no hemos llegado a una conclusión clara a través de este método.



**Figura II.1 Bidimensional de HA-K-Ras y HA-K-Ras181A.** Las muestras provienen de células ciclantes transfectadas con HA-K-Ras o con HA-K-Ras181A. Se rehidrató en la primera dimensión unos 200µg de proteína. El Western Blott se realizó con anticuerpo anti-HA.



## **BIBLIOGRAFÍA**

---



- Aderem,A.** (1992) The MARCKS brothers: a family of protein kinase C substrates. *Cell* 71:713-716.
- Amsen,E.M., Pham,N., Pak,Y., and Rotin,D.** (2006) The guanine nucleotide exchange factor CNrasGEF regulates melanogenesis and cell survival in melanoma cells. *J Biol.Chem.* 281:121-128.
- Aoyama,Y., Avruch,J., and Zhang,X.F.** (2004) Nore1 inhibits tumor cell growth independent of Ras or the MST1/2 kinases. *Oncogene* 23:3426-3433.
- Apel,E.D., Byford,M.F., Au,D., Walsh,K.A., and Storm,D.R.** (1990) Identification of the protein kinase C phosphorylation site in neuromodulin. *Biochemistry* 29:2330-2335.
- Arozarena,I., Aaronson,D.S., Matallanas,D., Sanz,V., Ajenjo,N., Tenbaum,S.P., Teramoto,H., Ighishi,T., Zabala,J.C., Gutkind,J.S., and Crespo,P.** (2000) The Rho family GTPase Cdc42 regulates the activation of Ras/MAP kinase by the exchange factor Ras-GRF. *J Biol.Chem.* 275:26441-26448.
- Arozarena,I., Matallanas,D., and Crespo,P.** (2001) Maintenance of CDC42 GDP-bound state by Rho-GDI inhibits MAP kinase activation by the exchange factor Ras-GRF. evidence for Ras-GRF function being inhibited by Cdc42-GDP but unaffected by CDC42-GTP. *J Biol.Chem.* 276:21878-21884.
- Arozarena,I., Matallanas,D., Berciano,M.T., Sanz-Moreno,V., Calvo,F., Munoz,M.T., Egea,G., Lafarga,M., and Crespo,P.** (2004) Activation of H-Ras in the endoplasmic reticulum by the RasGRF family guanine nucleotide exchange factors. *Mol.Cell Biol.* 24:1516-1530.
- Baass,P.C., Di Guglielmo,G.M., Authier,F., Posner,B.I., and Bergeron,J.J.** (1995) Compartmentalized signal transduction by receptor tyrosine kinases. *Trends Cell Biol.* 5:465-470.
- Ballester,R., Furth,M.E., and Rosen,O.M.** (1987) Phorbol ester- and protein kinase C-mediated phosphorylation of the cellular Kirsten ras gene product. *J Biol.Chem.* 262:2688-2695.
- Basso,A.D., Kirschmeier,P., and Bishop,W.R.** (2006) Lipid posttranslational modifications. Farnesyl transferase inhibitors. *J Lipid Res* 47:15-31.
- Beguin,P., Mahalakshmi,R.N., Nagashima,K., Cher,D.H., Ikeda,H., Yamada,Y., Seino,Y., and Hunziker,W.** (2006) Nuclear sequestration of beta-subunits by Rad and Rem is controlled by 14-3-3 and calmodulin and reveals a novel mechanism for Ca<sup>2+</sup> channel regulation. *J Mol.Biol.* 355:34-46.
- Beguin,P., Mahalakshmi,R.N., Nagashima,K., Cher,D.H., Takahashi,A., Yamada,Y., Seino,Y., and Hunziker,W.** (2005) 14-3-3 and calmodulin control subcellular distribution of Kir/Gem and its regulation of cell shape and calcium channel activity. *J Cell Sci* 118:1923-1934.

- Bernards,A. and Settleman,J.** (2004) GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol.* 14:377-385.
- Bernards,A. and Settleman,J.** (2005) GAPs in growth factor signalling. *Growth Factors* 23:143-149.
- Berridge,M.J., Lipp,P., and Bootman,M.D.** (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 1:11-21.
- Bhattacharya,M., Anborgh,P.H., Babwah,A.V., Dale,L.B., Dobransky,T., Benovic,J.L., Feldman,R.D., Verdi,J.M., Rylett,R.J., and Ferguson,S.S.** (2002) Beta-arrestins regulate a Ral-GDS Ral effector pathway that mediates cytoskeletal reorganization. *Nat.Cell Biol.* 4:547-555.
- Bishop,A.L. and Hall,A.** (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochemical Journal* 348:241-355.
- Bishop,J.M.** (1987) The molecular genetics of cancer. *Science* 235:305-311.
- Bivona,T.G., Perez,d.C., I, Ahearn,I.M., Grana,T.M., Chiu,V.K., Lockyer,P.J., Cullen,P.J., Pellicer,A., Cox,A.D., and Philips,M.R.** (2003) Phospholipase Cgamma activates Ras on the Golgi apparatus by means of RasGRP1. *Nature* 424:694-698.
- Bivona,T.G., Quatela,S.E., Bodemann,B.O., Ahearn,I.M., Soskis,M.J., Mor,A., Miura,J., Wiener,H.H., Wright,L., Saba,S.G., Yim,D., Fein,A., Perez,d.C., I, Li,C., Thompson,C.B., Cox,A.D., and Philips,M.R.** (2006) PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis. *Mol.Cell* 21:481-493.
- Blackshear,P.J.** (1993) The MARCKS family of cellular protein kinase C substrates. *J Biol.Chem.* 268:1501-1504.
- Boguski,M.S. and McCormick,F.** (1993) Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366:643-654.
- Bollag,G. and McCormick,F.** (1991a) Differential regulation of rasGAP and neurofibromatosis gene product activities. *Nature* 351:576-579.
- Bollag,G. and McCormick,F.** (1991b) Regulators and effectors of ras proteins. *Annu.Rev.Cell Biol.* 7:601-632.
- Bonfini,L., Karlovich,C.A., Dasgupta,C., and Banerjee,U.** (1992) The Son of sevenless gene product: a putative activator of Ras. *Science* 255:603-606.
- Bordier,C.** (1981) Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J Biol.Chem.* 256:1604-1607.

- Bos, J.L.** (2005) Linking Rap to cell adhesion. *Current opinion in cell biology* 17(2):123-8:123-128.
- Bos, J.L., de Bruyn, K., Enserink, J., Kuiperij, B., Rangarajan, S., Rehmann, H., Riedl, J., de Rooij, J., van Mansfeld, F., and Zwartkruis, F.** (2003) The role of Rap1 in integrin-mediated cell adhesion. *Biochemical Society Transactions* 31:83-86.
- Bosch, M., Gil, J., Bachs, O., and Agell, N.** (1998) Calmodulin inhibitor W13 induces sustained activation of ERK2 and expression of p21(cip1). *J Biol.Chem.* 273:22145-22150.
- Boyartchuk, V.L., Ashby, M.N., and Rine, J.** (1997) Modulation of Ras and a-factor function by carboxyl-terminal proteolysis. *Science* 275:1796-1800.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72:248-254.
- Brusca, J.S. and Radolf, J.D.** (1994) Isolation of integral membrane proteins by phase partitioning with Triton X-114. *Methods Enzymol.* 228:182-193.
- Buday, L. and Downward, J.** (1993) Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* 73:611-620.
- Burke, P., Schooler, K., and Wiley, H.S.** (2001) Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by endocytosis and intracellular trafficking. *Mol.Biol.Cell* 12:1897-1910.
- Carafoli, E.** (2002) Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 99:1115-1122.
- Catling, A.D., Reuter, C.W., Cox, M.E., Parsons, S.J., and Weber, M.J.** (1994) Partial purification of a mitogen-activated protein kinase kinase activator from bovine brain. Identification as B-Raf or a B-Raf-associated activity. *J Biol.Chem.* 269:30014-30021.
- Chakravarthy, B., Morley, P., and Whitfield, J.** (1999) Ca<sup>2+</sup>-calmodulin and protein kinase Cs: a hypothetical synthesis of their conflicting convergences on shared substrate domains. *Trends Neurosci.* 22:12-16.
- Chelsky, D., Ruskin, B., and Koshland, D.E., Jr.** (1985) Methyl-esterified proteins in a mammalian cell line. *Biochemistry* 24:6651-6658.
- Chen, H.J., Rojas-Soto, M., Oguni, A., and Kennedy, M.B.** (1998) A synaptic Ras-GTPase activating protein (p135 SynGAP) inhibited by CaM kinase II. *Neuron* 20:895-904.

- Cheung,W.Y.** (1970) Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. Demonstration of an activator. *Biochem.Biophys.Res Commun.* 38:533-538.
- Chin,D. and Means,A.R.** (2000) Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol.* 10:322-328.
- Chiu,V.K., Bivona,T., Hach,A., Sajous,J.B., Silletti,J., Wiener,H., Johnson,R.L., Cox,A.D., and Philips,M.R.** (2002) Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nat.Cell Biol.* 4:343-350.
- Chong,H., Lee,J., and Guan,K.L.** (2001) Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation. *EMBO J* 20:3716-3727.
- Choy,E., Chiu,V.K., Silletti,J., Feoktistov,M., Morimoto,T., Michaelson,D., Ivanov,I.E., and Philips,M.R.** (1999) Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell* 98:69-80.
- Chuang,T.H., Xu,X., Quilliam,L.A., and Bokoch,G.M.** (1994) SmgGDS stabilizes nucleotide-bound and -free forms of the Rac1 GTP-binding protein and stimulates GTP/GDP exchange through a substituted enzyme mechanism. *Biochem.J* 303 ( Pt 3):761-767.
- Clarke,S., Vogel,J.P., Deschenes,R.J., and Stock,J.** (1988) Posttranslational modification of the Ha-ras oncogene protein: evidence for a third class of protein carboxyl methyltransferases. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 85:4643-4647.
- Clyde-Smith,J., Silins,G., Gartside,M., Grimmond,S., Etheridge,M., Apolloni,A., Hayward,N., and Hancock,J.F.** (2000) Characterization of RasGRP2, a plasma membrane-targeted, dual specificity Ras/Rap exchange factor. *J Biol.Chem.* 275:32260-32267.
- Cooper,J.A. and Kashishian,A.** (1993) In vivo binding properties of SH2 domains from GTPase-activating protein and phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol.Cell Biol.* 13:1737-1745.
- Corbalan-Garcia,S., Yang,S.S., Degenhardt,K.R., and Bar-Sagi,D.** (1996) Identification of the mitogen-activated protein kinase phosphorylation sites on human Sos1 that regulate interaction with Grb2. *Mol.Cell Biol.* 16:5674-5682.
- Cully,M., You,H., Levine,A.J., and Mak,T.W.** (2006) Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat.Rev.Cancer* 6:184-192.
- Dai,Q., Choy,E., Chiu,V., Romano,J., Slivka,S.R., Steitz,S.A., Michaelis,S., and Philips,M.R.** (1998) Mammalian prenylcysteine carboxyl methyltransferase is in the endoplasmic reticulum. *J Biol.Chem.* 273:15030-15034.

- Das,B., Shu,X., Day,G.J., Han,J., Krishna,U.M., Falck,J.R., and Broek,D.** (2000) Control of intramolecular interactions between the pleckstrin homology and Dbl homology domains of Vav and Sos1 regulates Rac binding. *J Biol.Chem.* 275:15074-15081.
- de Rooij,J. and Bos,J.L.** (1997) Minimal Ras-binding domain of Raf1 can be used as an activation-specific probe for Ras. *Oncogene* 14:623-625.
- Di Guglielmo,G.M., Baass,P.C., Ou,W.J., Posner,B.I., and Bergeron,J.J.** (1994) Compartmentalization of SHC, GRB2 and mSOS, and hyperphosphorylation of Raf-1 by EGF but not insulin in liver parenchyma. *EMBO J* 13:4269-4277.
- Downward,J., Graves,J.D., Warne,P.H., Rayter,S., and Cantrell,D.A.** (1990) Stimulation of p21ras upon T-cell activation. *Nature* 346:719-723.
- Dumaz,N., Light,Y., and Marais,R.** (2002) Cyclic AMP blocks cell growth through Raf-1-dependent and Raf-1-independent mechanisms. *Mol.Cell Biol.* 22:3717-3728.
- Egea,J., Espinet,C., and Comella,J.X.** (1999) Calcium influx activates extracellular-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway through a calmodulin-sensitive mechanism in PC12 cells. *J Biol.Chem.* 274:75-85.
- Elad-Sfadia,G., Haklai,R., Balan,E., and Kloog,Y.** (2004) Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity. *J Biol.Chem.* 279:34922-34930.
- Elad-Sfadia,G., Haklai,R., Ballan,E., Gabius,H.J., and Kloog,Y.** (2002) Galectin-1 augments Ras activation and diverts Ras signals to Raf-1 at the expense of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol.Chem.* 277:37169-37175.
- Ellis,C., Moran,M., McCormick,F., and Pawson,T.** (1990) Phosphorylation of GAP and GAP-associated proteins by transforming and mitogenic tyrosine kinases. *Nature* 343:377-381.
- Ellis,R.W., Defeo,D., Shih,T.Y., Gonda,M.A., Young,H.A., Tsuchida,N., Lowy,D.R., and Scolnick,E.M.** (1981) The p21 src genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses originate from divergent members of a family of normal vertebrate genes. *Nature* 292:506-511.
- Esteban,L.M., Fernandez-Medarde,A., Lopez,E., Yienger,K., Guerrero,C., Ward,J.M., Tessarollo,L., and Santos,E.** (2000) Ras-guanine nucleotide exchange factor sos2 is dispensable for mouse growth and development. *Mol.Cell Biol.* 20:6410-6413.,
- Esteban,L.M., Vicario-Abejon,C., Fernandez-Salguero,P., Fernandez-Medarde,A., Swaminathan,N., Yienger,K., Lopez,E., Malumbres,M., McKay,R., Ward,J.M., Pellicer,A., and Santos,E.** (2001) Targeted genomic disruption of H-ras and N-ras, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development. *Mol.Cell Biol.* 21:1444-1452.

- Etienne-Manneville,S. and Hall,A.** (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420:629-635.
- Fam,N.P., Fan,W.T., Wang,Z., Zhang,L.J., Chen,H., and Moran,M.F.** (1997) Cloning and characterization of Ras-GRF2, a novel guanine nucleotide exchange factor for Ras. *Mol.Cell Biol.* 17:1396-1406.
- Farnsworth,C.L., Freshney,N.W., Rosen,L.B., Ghosh,A., Greenberg,M.E., and Feig,L.A.** (1995) Calcium activation of Ras mediated by neuronal exchange factor Ras-GRF. *Nature* 376:524-527.
- Feig,L.A.** (2003) Ral-GTPases: approaching their 15 minutes of fame. *Trends Cell Biol.* 13:419-425.
- Feig,L.A. and Buchsbaum,R.J.** (2002) Cell signaling: life or death decisions of ras proteins. *Curr.Biol.* 12:R259-R261.
- Fincham,V.J., Chudleigh,A., and Frame,M.C.** (1999) Regulation of p190 Rho-GAP by v-Src is linked to cytoskeletal disruption during transformation. *J Cell Sci* 112 ( Pt 6):947-956.
- Fischer,R., Wei,Y., Anagli,J., and Berchtold,M.W.** (1996) Calmodulin binds to and inhibits GTP binding of the ras-like GTPase Kir/Gem. *J Biol.Chem.* 271:25067-25070.
- Fivaz,M. and Meyer,T.** (2005) Reversible intracellular translocation of KRas but not HRas in hippocampal neurons regulated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin. *J Cell Biol.* 170:429-441.
- Foster,R., Hu,K.Q., Lu,Y., Nolan,K.M., Thissen,J., and Settleman,J.** (1996) Identification of a novel human Rho protein with unusual properties: GTPase deficiency and in vivo farnesylation. *Mol.Cell.Biol.* 16:2689-2699.
- Friday,B.B. and Adjei,A.A.** (2005) K-ras as a target for cancer therapy. *Biochim.Biophys.Acta* 1756:127-144.
- Fujiwara,T., Ritchie,K., Murakoshi,H., Jacobson,K., and Kusumi,A.** (2002) Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane. *J Cell Biol.* 157:1071-1081.
- Gallant,C., You,J.Y., Sasaki,Y., Grabarek,Z., and Morgan,K.G.** (2005) MARCKS is a major PKC-dependent regulator of calmodulin targeting in smooth muscle. *J Cell Sci* 118:3595-3605.
- Genot,E. and Cantrell,D.A.** (2000) Ras regulation and function in lymphocytes. *Curr.Opin.Immunol.* 12:289-294.

- Grewal,T., Evans,R., Rentero,C., Tebar,F., Cubells,L., de,D., I, Kirchhoff,M.F., Hughes,W.E., Heeren,J., Rye,K.A., Rinninger,F., Daly,R.J., Pol,A., and Enrich,C.** (2005) Annexin A6 stimulates the membrane recruitment of p120GAP to modulate Ras and Raf-1 activity. *Oncogene* 24:5809-5820.
- Guasch,R.M., Scambler,P., Jones,G.E., and Ridley,A.J.** (1998) RhoE Regulates Actin Cytoskeleton Organization and Cell Migration. *Mol.Cell.Biol.* 18:4761-4771.
- Guerrero,C., Rojas,J.M., Chedid,M., Esteban,L.M., Zimonjic,D.B., Popescu,N.C., Font,d.M., and Santos,E.** (1996) Expression of alternative forms of Ras exchange factors GRF and SOS1 in different human tissues and cell lines. *Oncogene* 12:1097-1107.
- Gutierrez,L., Magee,A.I., Marshall,C.J., and Hancock,J.F.** (1989) Post-translational processing of p21ras is two-step and involves carboxyl-methylation and carboxy-terminal proteolysis. *EMBO J* 8:1093-1098.
- Gutkind,J.S.** (1998) Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. *Oncogene* 17:1331-1342.
- Hagemann,C. and Rapp,U.R.** (1999) Isotype-specific functions of Raf kinases. *Exp.Cell Res* 253:34-46.
- Hahn,W.C., Counter,C.M., Lundberg,A.S., Beijersbergen,R.L., Brooks,M.W., and Weinberg,R.A.** (1999) Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400:464-468.
- Hamad,N.M., Elconin,J.H., Karnoub,A.E., Bai,W., Rich,J.N., Abraham,R.T., Der,C.J., and Counter,C.M.** (2002) Distinct requirements for Ras oncogenesis in human versus mouse cells. *Genes Dev.* 16:2045-2057.
- Hamilton,M., Liao,J., Cathcart,M.K., and Wolfman,A.** (2001) Constitutive association of c-N-Ras with c-Raf-1 and protein kinase C epsilon in latent signaling modules. *J Biol.Chem.* 276:29079-29090.
- Hancock,J.F., Paterson,H., and Marshall,C.J.** (1990) A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell* 63:133-139.
- Harrison,S.M., Rudolph,J.L., Spencer,M.L., Wes,P.D., Montell,C., Andres,D.A., and Harrison,D.A.** (2005) Activated RIC, a small GTPase, genetically interacts with the Ras pathway and calmodulin during *Drosophila* development. *Dev.Dyn.* 232:817-826.
- Harvey,JJ.** (1964) An unidentified virus which causes the rapid production of tumours in mice. *Nature* 204:1104-1105.
- Hatzfeld,M.** (1999) The armadillo family of structural proteins. *Int.Rev.Cytol.* 186:179-224.

- Hoeflich,K.P. and Ikura,M.** (2002) Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. *Cell* 108:739-742.
- Hofer,F., Berdeaux,R., and Martin,G.S.** (1998) Ras-independent activation of Ral by a Ca(2+)-dependent pathway. *Curr.Biol.* 8:839-842.
- Hoshino,M. and Nakamura,S.** (2003) Small GTPase Rin induces neurite outgrowth through Rac/Cdc42 and calmodulin in PC12 cells. *J.Cell Biol.* 163:1067-1076.
- Hoshino,M., Yoshimori,T., and Nakamura,S.** (2005) Small GTPase Proteins Rin and Rit Bind to PAR6 GTP-dependently and Regulate Cell Transformation. *J.Biol.Chem.* 280:22868-22874.
- Hrycyna,C.A., Sapperstein,S.K., Clarke,S., and Michaelis,S.** (1991) The *Saccharomyces cerevisiae* STE14 gene encodes a methyltransferase that mediates C-terminal methylation of a-factor and RAS proteins. *EMBO J* 10:1699-1709.
- Hu,C.D., Kariya,K.i., Okada,T., Qi,X., Song,C., and Kataoka,T.** (1999) Effect of Phosphorylation on Activities of Rap1A to Interact with Raf-1 and to Suppress Ras-dependent Raf-1 Activation. *J.Biol.Chem.* 274:48-51.
- Huang,Y., Rangwala,F., Fulkerson,P.C., Ling,B., Reed,E., Cox,A.D., Kamholz,J., and Ratner,N.** (2004) Role of TC21/R-Ras2 in enhanced migration of neurofibromin-deficient Schwann cells. *Oncogene* 23:368-378.
- Ise,K., Nakamura,K., Nakao,K., Shimizu,S., Harada,H., Ichise,T., Miyoshi,J., Gondo,Y., Ishikawa,T., Aiba,A., and Katsuki,M.** (2000) Targeted deletion of the H-ras gene decreases tumor formation in mouse skin carcinogenesis. *Oncogene* 19:2951-2956.
- Jaffe,A.B. and Hall,A.** (2005) RHO GTPASES: Biochemistry and Biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21:247-269.
- Jaiswal,R.K., Moodie,S.A., Wolfman,A., and Landreth,G.E.** (1994) The mitogen-activated protein kinase cascade is activated by B-Raf in response to nerve growth factor through interaction with p21ras. *Mol.Cell Biol.* 14:6944-6953.
- James,G.L., Goldstein,J.L., and Brown,M.S.** (1995) Polylysine and CVIM sequences of K-RasB dictate specificity of prenylation and confer resistance to benzodiazepine peptidomimetic in vitro. *J Biol.Chem.* 270:6221-6226.
- Jaumot,M. and Hancock,J.F.** (2001) Protein phosphatases 1 and 2A promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3 interactions. *Oncogene* 20:3949-3958.
- Jaumot,M., Yan,J., Clyde-Smith,J., Sluimer,J., and Hancock,J.F.** (2002) The linker domain of the Ha-Ras hypervariable region regulates interactions with exchange factors, Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol.Chem.* 277:272-278.

- Jeong,H.W., Nam,J.O., and Kim,I.S.** (2005) The COOH-terminal End of R-Ras Alters the Motility and Morphology of Breast Epithelial Cells through Rho/Rho-Kinase. *Cancer Res* 65:507-515.
- Jiang,X. and Sorkin,A.** (2002) Coordinated traffic of Grb2 and Ras during epidermal growth factor receptor endocytosis visualized in living cells. *Mol.Biol.Cell* 13:1522-1535.
- Johnson,L., Greenbaum,D., Cichowski,K., Mercer,K., Murphy,E., Schmitt,E., Bronson,R.T., Umanoff,H., Edelman,W., Kucherlapati,R., and Jacks,T.** (1997) K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes Dev.* 11:2468-2481.
- Joyal,J.L., Burks,D.J., Pons,S., Matter,W.F., Vlahos,C.J., White,M.F., and Sacks,D.B.** (1997) Calmodulin activates phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol.Chem.* 272:28183-28186.
- Kakiuchi,S. and Yamazaki,R.** (1970) Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PAF) from brain studies on cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase (3). *Biochem.Biophys.Res Commun.* 41:1104-1110.
- Kashige,N., Carpino,N., and Kobayashi,R.** (2000) Tyrosine phosphorylation of p62dok by p210bcr-abl inhibits RasGAP activity. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 97:2093-2098.
- Kazlauskas,A., Ellis,C., Pawson,T., and Cooper,J.A.** (1990) Binding of GAP to activated PDGF receptors. *Science* 247:1578-1581.
- Kelley,G.G., Reks,S.E., Ondrako,J.M., and Smrcka,A.V.** (2001) Phospholipase C(epsilon): a novel Ras effector. *EMBO J* 20:743-754.
- Kikuchi,A., Kaibuchi,K., Hori,Y., Nonaka,H., Sakoda,T., Kawamura,M., Mizuno,T., and Takai,Y.** (1992) Molecular cloning of the human cDNA for a stimulatory GDP/GTP exchange protein for c-Ki-ras p21 and smg p21. *Oncogene* 7:289-293.
- Kinbara,K., Goldfinger,L.E., Hansen,M., Chou,F.L., and Ginsberg,M.H.** (2003) Ras GTPases:integrin's friends o foes? *Nature Reviews Cell Biology* 4:767-776.
- Kirsten,W.H. and Mayer,L.A.** (1969) Malignant lymphomas of extrathymic origin induced in rats by murine erythroblastosis virus. *J Natl.Cancer Inst.* 43:735-746.
- Kishida,S., Koyama,S., Matsubara,K., Kishida,M., Matsuura,Y., and Kikuchi,A.** (1997) Colocalization of Ras and Ral on the membrane is required for Ras-dependent Ral activation through Ral GDP dissociation stimulator. *Oncogene* 15:2899-2907.
- Kitayama,H., Sugimoto,Y., Matsuzaki,T., Ikawa,Y., and Noda,M.** (1989) A ras-related gene with transformation suppressor activity. *Cell* 56:77-84.

- Koera,K., Nakamura,K., Nakao,K., Miyoshi,J., Toyoshima,K., Hatta,T., Otani,H., Aiba,A., and Katsuki,M.** (1997) K-ras is essential for the development of the mouse embryo. *Oncogene* 15:1151-1159.
- Kortvely,E. and Gulya,K.** (2004) Calmodulin, and various ways to regulate its activity. *Life Sci* 74:1065-1070.
- Kotani,K., Kikuchi,A., Doi,K., Kishida,S., Sakoda,T., Kishi,K., and Takai,Y.** (1992) The functional domain of the stimulatory GDP/GTP exchange protein (smg GDS) which interacts with the C-terminal geranylgeranylated region of rap1/Krev-1/smg p21. *Oncogene* 7:1699-1704.
- Kranenburg,O., Verlaan,I., and Moolenaar,W.H.** (1999) Dynamin is required for the activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase by MAP kinase kinase. *J Biol.Chem.* 274:35301-35304.
- Kuriyama,M., Harada,N., Kuroda,S., Yamamoto,T., Nakafuku,M., Iwamatsu,A., Yamamoto,D., Prasad,R., Croce,C., Canaani,E., and Kaibuchi,K.** (1996) Identification of AF-6 and Canoe as Putative Targets for Ras. *J.Biol.Chem.* 271:607-610.
- Laemmli,U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lambert,J.M., Lambert,Q.T., Reuther,G.W., Malliri,A., Siderovski,D.P., Sondak,J., Collard,J.G., and Der,C.J.** (2002) Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3)K-independent mechanism. *Nat.Cell Biol.* 4:621-625.
- Lane,K.T. and Beese,L.S.** (2006) Structural biology of protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase type-I. *J Lipid Res.*
- Lanning,C.C., Ruiz-Velasco,R., and Williams,C.L.** (2003) Novel mechanism of the co-regulation of nuclear transport of SmgGDS and Rac1. *J Biol.Chem.* 278:12495-12506.
- Lee,C.H., Della,N.G., Chew,C.E., and Zack,D.J.** (1996) Rin, a Neuron-Specific and Calmodulin-Binding Small G-Protein, and Rit Define a Novel Subfamily of Ras Proteins. *J.Neurosci.* 16:6784-6794.
- Leever,S.J., Paterson,H.F., and Marshall,C.J.** (1994) Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature* 369:411-414.
- Li,H. and Villalobo,A.** (2002) Evidence for the direct interaction between calmodulin and the human epidermal growth factor receptor. *Biochem.J* 362:499-505.
- Li,H.Y., Cao,K., and Zheng,Y.** (2003) Ran in the spindle checkpoint: a new function for a versatile GTPase. *Trends in Cell Biology* 13:553-557.

- Liou, J.S., Chen, J.S., and Faller, D.V.** (2004) Characterization of p21Ras-mediated apoptosis induced by protein kinase C inhibition and application to human tumor cell lines. *J Cell Physiol* 198:277-294.
- Liu, W.S. and Heckman, C.A.** (1998) The sevenfold way of PKC regulation. *Cell Signal*. 10:529-542.
- Lockyer, P.J., Kupzig, S., and Cullen, P.J.** (2001) CAPRI regulates Ca(2+)-dependent inactivation of the Ras-MAPK pathway. *Curr.Biol.* 11:981-986.
- Lowy, D.R. and Willumsen, B.M.** (1993) Function and regulation of ras. *Annu.Rev.Biochem.* 62:851-891.
- Malliri, A., van der Kammen, R.A., Clark, K., van, d., V, Michiels, F., and Collard, J.G.** (2002) Mice deficient in the Rac activator Tiam1 are resistant to Ras-induced skin tumours. *Nature* 417:867-871.
- Marais, R., Light, Y., Mason, C., Paterson, H., Olson, M.F., and Marshall, C.J.** (1998) Requirement of Ras-GTP-Raf complexes for activation of Raf-1 by protein kinase C. *Science* 280:109-112.
- Marais, R., Light, Y., Paterson, H.F., and Marshall, C.J.** (1995) Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *EMBO J* 14:3136-3145.
- Margarit, S.M., Sondermann, H., Hall, B.E., Nagar, B., Hoelz, A., Pirruccello, M., Bar-Sagi, D., and Kuriyan, J.** (2003) Structural evidence for feedback activation by Ras.GTP of the Ras-specific nucleotide exchange factor SOS. *Cell* 112:685-695.
- Marinissen, M.J. and Gutkind, J.S.** (2001) G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol.Sci* 22:368-376.
- Martin-Nieto, J. and Villalobo, A.** (1998) The human epidermal growth factor receptor contains a juxtamembrane calmodulin-binding site. *Biochemistry* 37:227-236.
- Matsubara, K., Kishida, S., Matsuura, Y., Kitayama, H., Noda, M., and Kikuchi, A.** (1999) Plasma membrane recruitment of RalGDS is critical for Ras-dependent Ral activation. *Oncogene* 18:1303-1312.
- Mattingly, R.R. and Macara, I.G.** (1996) Phosphorylation-dependent activation of the Ras-GRF/CDC25Mm exchange factor by muscarinic receptors and G-protein beta gamma subunits. *Nature* 382:268-272.
- Memon, A.R.** (2004) The role of ADP-ribosylation factor and SAR1 in vesicular trafficking in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1664:9-30.
- Midgley, R.S. and Kerr, D.J.** (2002) Ras as a target in cancer therapy. *Crit Rev.Oncol.Hematol.* 44:109-120.

- Mitin,N., Rossman,K.L., and Der,C.J.** (2005) Signaling Interplay in Ras Superfamily function. *Current Biology* 15:563-564.
- Mizuno,T., Kaibuchi,K., Yamamoto,T., Kawamura,M., Sakoda,T., Fujioka,H., Matsuura,Y., and Takai,Y.** (1991) A stimulatory GDP/GTP exchange protein for smg p21 is active on the post-translationally processed form of c-Ki-ras p21 and rhoA p21. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 88:6442-6446.
- Mochizuki,N., Yamashita,S., Kurokawa,K., Ohba,Y., Nagai,T., Miyawaki,A., and Matsuda,M.** (2001) Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1. *Nature* 411:1065-1068.
- Moon,S.Y. and Zheng,Y.** (2003) Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends in Cell Biology* 13:13-22.
- Moore,S.L., Schaber,M.D., Mosser,S.D., Rands,E., O'Hara,M.B., Garsky,V.M., Marshall,M.S., Pompliano,D.L., and Gibbs,J.B.** (1991) Sequence dependence of protein isoprenylation. *J Biol.Chem.* 266:14603-14610.
- Moran,M.F., Polakis,P., McCormick,F., Pawson,T., and Ellis,C.** (1991) Protein-tyrosine kinases regulate the phosphorylation, protein interactions, subcellular distribution, and activity of p21ras GTPase-activating protein. *Mol.Cell Biol.* 11:1804-1812.
- Morrison,D.K.** (2001) KSR: a MAPK scaffold of the Ras pathway? *J Cell Sci* 114:1609-1612.
- Morrison,D.K. and Davis,R.J.** (2003) Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 19:91-118.
- Moyers,J.S., Bilan,P.J., Zhu,J., and Kahn,C.R.** (1997) Rad and Rad-related GTPases interact with calmodulin and calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol.Chem.* 272:11832-11839.
- Murase,K., Fujiwara,T., Umemura,Y., Suzuki,K., Iino,R., Yamashita,H., Saito,M., Murakoshi,H., Ritchie,K., and Kusumi,A.** (2004) Ultrafine membrane compartments for molecular diffusion as revealed by single molecule techniques. *Biophys.J* 86:4075-4093.
- Nielsen,K.H., Papageorge,A.G., Vass,W.C., Willumsen,B.M., and Lowy,D.R.** (1997) The Ras-specific exchange factors mouse Sos1 (mSos1) and mSos2 are regulated differently: mSos2 contains ubiquitination signals absent in mSos1. *Mol.Cell Biol.* 17:7132-7138.
- Nimnual,A.S., Yatsula,B.A., and Bar-Sagi,D.** (1998) Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos. *Science* 279:560-563.
- Nobes,C.D., Lauritzen,I., Mattei,M.G., Paris,S., Hall,A., and Chardin,P.** (1998) A New Member of the Rho Family, Rnd1, Promotes Disassembly of Actin Filament Structures and Loss of Cell Adhesion. *J.Cell Biol.* 141:187-197.

- Oehrl, W., Rubio, I., and Wetzker, R.** (2003) Serine 338 phosphorylation is dispensable for activation of c-Raf1. *J Biol.Chem.* 278:17819-17826.
- Ohba, Y., Kurokawa, K., and Matsuda, M.** (2003) Mechanism of the spatio-temporal regulation of Ras and Rap1. *EMBO J* 22:859-869.
- Ohta, Y., Suzuki, N., Nakamura, S., Hartwig, J.H., and Stossel, T.P.** (1999) The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 96:2122-2128.
- Orita, S., Kaibuchi, K., Kuroda, S., Shimizu, K., Nakanishi, H., and Takai, Y.** (1993) Comparison of kinetic properties between two mammalian ras p21 GDP/GTP exchange proteins, ras guanine nucleotide-releasing factor and smg GDP dissociation stimulation. *J Biol.Chem.* 268:25542-25546.
- Pak, Y., Pham, N., and Rotin, D.** (2002) Direct binding of the beta1 adrenergic receptor to the cyclic AMP-dependent guanine nucleotide exchange factor CNrasGEF leads to Ras activation. *Mol.Cell Biol.* 22:7942-7952.
- Parada, L.F., Tabin, C.J., Shih, C., and Weinberg, R.A.** (1982) Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature* 297:474-478.
- Park, J.B., Farnsworth, C.C., and Glomset, J.A.** (1997) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin causes Rab3A to dissociate from synaptic membranes. *J Biol.Chem.* 272:20857-20865.
- Parker, P.J. and Murray-Rust, J.** (2004) PKC at a glance. *J Cell Sci* 117:131-132.
- Pasqualato, S., Renault, L., and Cherfils, J.** (2002) Arf, Arl, Arp and Sar proteins: a family of GTP-binding proteins with a structural device for 'front-back' communication. *EMBO reports* 3:1035-1041.
- Paz, A., Haklai, R., Elad-Sfadia, G., Ballan, E., and Kloog, Y.** (2001) Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. *Oncogene* 20:7486-7493.
- Pereira-Leal, J.B. and Seabra, M.C.** (2001) Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *Journal of Molecular Biology* 313:901.
- Pham, N., Cheglakov, I., Koch, C.A., de Hoog, C.L., Moran, M.F., and Rotin, D.** (2000) The guanine nucleotide exchange factor CNrasGEF activates ras in response to cAMP and cGMP. *Curr.Biol.* 10:555-558.
- Plowman, S.J., Williamson, D.J., O'Sullivan, M.J., Doig, J., Ritchie, A.M., Harrison, D.J., Melton, D.W., Arends, M.J., Hooper, M.L., and Patek, C.E.** (2003) While K-ras is essential for mouse development, expression of the K-ras 4A splice variant is dispensable. *Mol.Cell Biol.* 23:9245-9250.

- Poole,A.W., Pula,G., Hers,I., Crosby,D., and Jones,M.L.** (2004) PKC-interacting proteins: from function to pharmacology. *Trends Pharmacol.Sci* 25:528-535.
- Posern,G., Weber,C.K., Rapp,U.R., and Feller,S.M.** (1998) Activity of Rap1 Is Regulated by Bombesin, Cell Adhesion, and Cell Density in NIH3T3 Fibroblasts. *J.Biol.Chem.* 273:24297-24300.
- Potenza,N., Vecchione,C., Notte,A., De Rienzo,A., Rosica,A., Bauer,L., Affuso,A., De Felice,M., Russo,T., Poulet,R., Cifelli,G., De Vita,G., Lembo,G., and Di Lauro,R.** (2005) Replacement of K-Ras with H-Ras supports normal embryonic development despite inducing cardiovascular pathology in adult mice. *EMBO Rep.* 6:432-437.
- Pouyssegur,J., Volmat,V., and Lenormand,P.** (2002) Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem.Pharmacol.* 64:755-763.
- Prior,I.A., Harding,A., Yan,J., Sluimer,J., Parton,R.G., and Hancock,J.F.** (2001) GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity. *Nat.Cell Biol.* 3:368-375.
- Prior,I.A., Muncke,C., Parton,R.G., and Hancock,J.F.** (2003) Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *J Cell Biol.* 160:165-170.
- Qian,X., Vass,W.C., Papageorge,A.G., Anborgh,P.H., and Lowy,D.R.** (1998) N terminus of Sos1 Ras exchange factor: critical roles for the Dbl and pleckstrin homology domains. *Mol.Cell Biol.* 18:771-778.
- Quilliam,L.A., Rebhun,J.F., and Castro,A.F.** (2002) A growing family of guanine nucleotide exchange factors is responsible for activation of Ras-family GTPases. *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.* 71:391-444.
- Rebollo,A., Perez-Sala,D., and Martinez,A.** (1999) Bcl-2 differentially targets K-, N-, and H-Ras to mitochondria in IL-2 supplemented or deprived cells: implications in prevention of apoptosis. *Oncogene* 18:4930-4939.
- Ridley,A.J.** (2001) Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends in Cell Biology* 11:471-477.
- Ridley,A.J., Self,A.J., Kasmi,F., Paterson,H.F., Hall,A., Marshall,C.J., and Ellis,C.** (1993) rho family GTPase activating proteins p190, bcr and rhoGAP show distinct specificities in vitro and in vivo. *EMBO J* 12:5151-5160.
- Riento,K., Guasch,R.M., Garg,R., Jin,B., and Ridley,A.J.** (2003) RhoE Binds to ROCK I and Inhibits Downstream Signaling. *Mol.Cell.Biol.* 23:4219-4229.
- Ringer,S.** (1883) *Journal Physiology* 4:29-43.

- Rocks,O., Peyker,A., Kahms,M., Verveer,P.J., Koerner,C., Lumbierres,M., Kuhlmann,J., Waldmann,H., Wittinghofer,A., and Bastiaens,P.I.** (2005) An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms. *Science* 307:1746-1752.
- Rodriguez-Viciana,P., Warne,P.H., Dhand,R., Vanhaesebroeck,B., Gout,I., Fry,M.J., Waterfield,M.D., and Downward,J.** (1994) Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 370:527-532.
- Rodriguez-Viciana,P., Warne,P.H., Khwaja,A., Marte,B.M., Pappin,D., Das,P., Waterfield,M.D., Ridley,A., and Downward,J.** (1997) Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell* 89:457-467.
- Rodriguez-Vilarrupla,A., Jaumot,M., Abella,N., Canela,N., Brun,S., Diaz,C., Estanyol,J.M., Bachs,O., and Agell,N.** (2005) Binding of calmodulin to the carboxy-terminal region of p21 induces nuclear accumulation via inhibition of protein kinase C-mediated phosphorylation of Ser153. *Mol.Cell Biol.* 25:7364-7374.
- Rong,R., He,Q., Liu,Y., Sheikh,M.S., and Huang,Y.** (2002) TC21 mediates transformation and cell survival via activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and NF-kappaB signaling pathway. *Oncogene* 21:1062-1070.
- Rotblat,B., Prior,I.A., Muncke,C., Parton,R.G., Kloog,Y., Henis,Y.I., and Hancock,J.F.** (2004) Three separable domains regulate GTP-dependent association of H-ras with the plasma membrane. *Mol.Cell Biol.* 24:6799-6810.
- Roy,S., Plowman,S., Rotblat,B., Prior,I.A., Muncke,C., Grainger,S., Parton,R.G., Henis,Y.I., Kloog,Y., and Hancock,J.F.** (2005) Individual palmitoyl residues serve distinct roles in H-ras trafficking, microlocalization, and signaling. *Mol.Cell Biol.* 25:6722-6733.
- Roy,S., Wyse,B., and Hancock,J.F.** (2002) H-Ras signaling and K-Ras signaling are differentially dependent on endocytosis. *Mol.Cell Biol.* 22:5128-5140.
- Rusanescu,G., Gotoh,T., Tian,X., and Feig,L.A.** (2001) Regulation of Ras signaling specificity by protein kinase C. *Mol.Cell Biol.* 21:2650-2658.
- Sahai,E., Olson,M.F., and Marshall,C.J.** (2001) Cross-talk between Ras and Rho signalling pathways in transformation favours proliferation and increased motility. *EMBO J* 20:755-766.
- San Jose,E., Benguria,A., Geller,P., and Villalobo,A.** (1992) Calmodulin inhibits the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *J Biol.Chem.* 267:15237-15245.

- Santos,E., Tronick,S.R., Aaronson,S.A., Pulciani,S., and Barbacid,M.** (1982) T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes. *Nature* 298:343-347.
- Sato,K.Y., Polakis,P.G., Haubruck,H., Fasching,C.L., Mc Cormick,F., and Stanbridge,E.J.** (1994) Analysis of the tumor suppressor activity of the K-rev-1 gene in human tumor cell lines. *Cancer Res* 54:552-559.
- Schmidt,A. and Hall,A.** (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev.* 16:1587-1609.
- Settleman,J., Albright,C.F., Foster,L.C., and Weinberg,R.A.** (1992a) Association between GTPase activators for Rho and Ras families. *Nature* 359:153-154.
- Settleman,J., Narasimhan,V., Foster,L.C., and Weinberg,R.A.** (1992b) Molecular cloning of cDNAs encoding the GAP-associated protein p190: implications for a signaling pathway from ras to the nucleus. *Cell* 69:539-549.
- Shao,H. and Andres,D.A.** (2000) A Novel RalGEF-like Protein, RGL3, as a Candidate Effector for Rit and Ras. *J.Biol.Chem.* 275:26914-26924.
- Shimizu,K., Goldfarb,M., Perucho,M., and Wigler,M.** (1983) Isolation and preliminary characterization of the transforming gene of a human neuroblastoma cell line. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 80:383-387.
- Shou,C., Wurmser,A., Suen,K.L., Barbacid,M., Feig,L.A., and Ling,K.** (1995) Differential response of the Ras exchange factor, Ras-GRF to tyrosine kinase and G protein mediated signals. *Oncogene* 10:1887-1893.
- Sidhu,R.S., Clough,R.R., and Bhullar,R.P.** (2003) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin binds and dissociates K-RasB from membrane. *Biochem.Biophys.Res Commun.* 304:655-660.
- Sidhu,R.S., Elsaraj,S.M., Grujic,O., and Bhullar,R.P.** (2005) Calmodulin binding to the small GTPase Ral requires isoprenylated Ral. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 336:105-109.
- Simon,M.A., Bowtell,D.D., Dodson,G.S., Lavery,T.R., and Rubin,G.M.** (1991) Ras1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the sevenless protein tyrosine kinase. *Cell* 67:701-716.
- Smotrys,J.E. and Linder,M.E.** (2004) Palmitoylation of intracellular signaling proteins: regulation and function. *Annu.Rev.Biochem.* 73:559-587.
- Sobering,A.K., Romeo,M.J., Vay,H.A., and Levin,D.E.** (2003) A novel Ras inhibitor, Eri1, engages yeast Ras at the endoplasmic reticulum. *Mol.Cell Biol.* 23:4983-4990.

- Soler,C., Beguinot,L., and Carpenter,G.** (1994) Individual epidermal growth factor receptor autophosphorylation sites do not stringently define association motifs for several SH2-containing proteins. *J Biol.Chem.* 269:12320-12324.
- Sommers,C.L., Samelson,L.E., and Love,P.E.** (2004) LAT: a T lymphocyte adapter protein that couples the antigen receptor to downstream signaling pathways. *Bioessays* 26:61-67.
- Sorkin,A., McClure,M., Huang,F., and Carter,R.** (2000) Interaction of EGF receptor and grb2 in living cells visualized by fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy. *Curr.Biol.* 10:1395-1398.
- Spencer,M.L., Shao,H., and Andres,D.A.** (2002) Induction of Neurite Extension and Survival in Pheochromocytoma Cells by the Rit GTPase. *J.Biol.Chem.* 277:20160-20168.
- Stahl,P.D. and Barbieri,M.A.** (2002) Multivesicular bodies and multivesicular endosomes: the "ins and outs" of endosomal traffic. *Sci STKE.* 2002:E32.
- Storck,P.J.** (2003) Does Rap1 deserve a bad Rap? *Trends in Biochemical Sciences* 28:267-275.
- Sugihara,K., Asano,S., Tanaka,K., Iwamatsu,A., Okawa,K., and Ohta,Y.** (2002) The exocyst complex binds the small GTPase RalA to mediate filopodia formation. *Nat.Cell Biol.* 4:73-78.
- Takai,Y., Sasaki,T., and Matozaki,T.** (2001) Small GTP-Binding Proteins. *Physiol.Rev.* 81:153-208.
- Taules,M., Rodriguez-Vilarrupla,A., Rius,E., Estanyol,J.M., Casanovas,O., Sacks,D.B., Perez-Paya,E., Bachs,O., and Agell,N.** (1999) Calmodulin binds to p21(Cip1) and is involved in the regulation of its nuclear localization. *J Biol.Chem.* 274:24445-24448.
- Teixeira,C., Stang,S.L., Zheng,Y., Beswick,N.S., and Stone,J.C.** (2003) Integration of DAG signaling systems mediated by PKC-dependent phosphorylation of RasGRP3. *Blood* 102:1414-1420.
- Tian,X., Rusanescu,G., Hou,W., Schaffhausen,B., and Feig,L.A.** (2002) PDK1 mediates growth factor-induced Ral-GEF activation by a kinase-independent mechanism. *EMBO J* 21:1327-1338.
- Tocque,B., Delumeau,I., Parker,F., Maurier,F., Multon,M.C., and Schweighoffer,F.** (1997) Ras-GTPase activating protein (GAP): a putative effector for Ras. *Cell Signal.* 9:153-158.
- Toker,A. and Newton,A.C.** (2000) Cellular signaling: pivoting around PDK-1. *Cell* 103:185-188.

- Toutenhoofd,S.L. and Strehler,E.E.** (2000) The calmodulin multigene family as a unique case of genetic redundancy: multiple levels of regulation to provide spatial and temporal control of calmodulin pools? *Cell Calcium* 28:83-96.
- Trahey,M., Wong,G., Halenbeck,R., Rubinfeld,B., Martin,G.A., Ladner,M., Long,C.M., Crosier,W.J., Watt,K., Koths,K., and .** (1988) Molecular cloning of two types of GAP complementary DNA from human placenta. *Science* 242:1697-1700.
- Tran,N.H. and Frost,J.A.** (2003) Phosphorylation of Raf-1 by p21-activated kinase 1 and Src regulates Raf-1 autoinhibition. *J Biol.Chem.* 278:11221-11226.
- Tzivion,G., Luo,Z., and Avruch,J.** (1998) A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. *Nature* 394:88-92.
- Ulsh,L.S. and Shih,T.Y.** (1984) Metabolic turnover of human c-rasH p21 protein of EJ bladder carcinoma and its normal cellular and viral homologs. *Mol.Cell Biol.* 4:1647-1652.
- Umanoff,H., Edelman,W., Pellicer,A., and Kucherlapati,R.** (1995) The murine N-ras gene is not essential for growth and development. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 92:1709-1713.
- Urano,T., Emkey,R., and Feig,L.A.** (1996) Ral-GTPases mediate a distinct downstream signaling pathway from Ras that facilitates cellular transformation. *EMBO J* 15:810-816.
- van der,G.P., Henkemeyer,M., Jacks,T., and Pawson,T.** (1997) Aberrant Ras regulation and reduced p190 tyrosine phosphorylation in cells lacking p120-Gap. *Mol.Cell Biol.* 17:1840-1847.
- Vanhaesebroeck,B. and Alessi,D.R.** (2000) The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem.J* 346 Pt 3:561-576.
- Vanhaesebroeck,B. and Waterfield,M.D.** (1999) Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp.Cell Res* 253:239-254.
- Vieira,A.V., Lamaze,C., and Schmid,S.L.** (1996) Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science* 274:2086-2089.
- Vikis,H.G., Stewart,S., and Guan,K.L.** (2002) SmgGDS displays differential binding and exchange activity towards different Ras isoforms. *Oncogene* 21:2425-2432.
- Villalonga,P., Guasch,R.M., Riento,K., and Ridley,A.J.** (2004) RhoE Inhibits Cell Cycle Progression and Ras-Induced Transformation. *Mol.Cell.Biol.* 24:7829-7840.

- Villalonga,P., Lopez-Alcala,C., Bosch,M., Chiloeches,A., Rocamora,N., Gil,J., Marais,R., Marshall,C.J., Bachs,O., and Agell,N.** (2001) Calmodulin Binds to K-Ras, but Not to H- or N-Ras, and Modulates Its Downstream Signaling. *Mol.Cell.Biol.* 21:7345-7354.
- Villalonga,P., Lopez-Alcala,C., Chiloeches,A., Gil,J., Marais,R., Bachs,O., and Agell,N.** (2002) Calmodulin Prevents Activation of Ras by PKC in 3T3 Fibroblasts. *J.Biol.Chem.* 277:37929-37935.
- Vogel,U.S., Dixon,R.A., Schaber,M.D., Diehl,R.E., Marshall,M.S., Scolnick,E.M., Sigal,I.S., and Gibbs,J.B.** (1988) Cloning of bovine GAP and its interaction with oncogenic ras p21. *Nature* 335:90-93.
- Vojtek,A.B., Hollenberg,S.M., and Cooper,J.A.** (1993) Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* 74:205-214.
- Vos,M.D., Martinez,A., Ellis,C.A., Vallecorsa,T., and Clark,G.J.** (2003) The pro-apoptotic Ras effector Nore1 may serve as a Ras-regulated tumor suppressor in the lung. *J Biol.Chem.* 278:21938-21943.
- Wang,K.L. and Roufogalis,B.D.** (1999) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin stimulates GTP binding to the ras-related protein ral-A. *J Biol.Chem.* 274:14525-14528.
- Wang,K.L., Khan,M.T., and Roufogalis,B.D.** (1997) Identification and characterization of a calmodulin-binding domain in Ral-A, a Ras-related GTP-binding protein purified from human erythrocyte membrane. *J Biol.Chem.* 272:16002-16009.
- Wang,Y., Waldron,R.T., Dhaka,A., Patel,A., Riley,M.M., Rozengurt,E., and Colicelli,J.** (2002) The RAS effector RIN1 directly competes with RAF and is regulated by 14-3-3 proteins. *Mol.Cell Biol.* 22:916-926.
- Ward,Y., Wang,W., Woodhouse,E., Linnoila,I., Liotta,L., and Kelly,K.** (2001) Signal pathways which promote invasion and metastasis: critical and distinct contributions of extracellular signal-regulated kinase and Ral-specific guanine exchange factor pathways. *Mol.Cell Biol.* 21:5958-5969.
- Warne,P.H., Viciano,P.R., and Downward,J.** (1993) Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. *Nature* 364:352-355.
- Weis,K.** (2003) Regulating Access to the Genome Nucleocytoplasmic Transport throughout the Cell Cycle . *Cell* 112:441-451.
- Wellbrock,C., Karasarides,M., and Marais,R.** (2004) The RAF proteins take centre stage. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 5:875-885.
- Wennerberg,K. and Der,C.J.** (2004) Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* 117:1301-1312.

- Wennerberg,K., Forget,M., Ellerbroek,S., Arthur,W., Burridge,K., Settleman,J., Der,C., and Hansen,S.** (2003) Rnd Proteins Function as RhoA Antagonists by Activating p190 RhoGAP. *Current Biology* 13:1106-1115.
- Wennerberg,K., Rossman,K.L., and Der,C.J.** (2005) The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 118:843-846.
- Wes,P.D., Yu,M., and Montell,C.** (1996) RIC, a calmodulin-binding Ras-like GTPase. *EMBO J* 15:5839-5848.
- White,M.A., Nicolette,C., Minden,A., Polverino,A., Van Aelst,L., Karin,M., and Wigler,M.H.** (1995) Multiple Ras functions can contribute to mammalian cell transformation. *Cell* 80:533-541.
- White,M.A., Vale,T., Camonis,J.H., Schaefer,E., and Wigler,M.H.** (1996) A role for the Ral guanine nucleotide dissociation stimulator in mediating Ras-induced transformation. *J Biol.Chem.* 271:16439-16442.
- Wiesmuller,L. and Wittinghofer,A.** (1992) Expression of the GTPase activating domain of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene in *Escherichia coli* and role of the conserved lysine residue. *J Biol.Chem.* 267:10207-10210.
- Wigler,M., Silverstein,S., Lee,L.S., Pellicer,A., Cheng,Y., and Axel,R.** (1977) Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells. *Cell* 11:223-232.
- Wohlgemuth,S., Kiel,C., Kramer,A., Serrano,L., Wittinghofer,F., and Herrmann,C.** (2005) Recognizing and defining true Ras binding domains I: biochemical analysis. *J Mol.Biol.* 348:741-758.
- Wolthuis,R.M., de Ruiter,N.D., Cool,R.H., and Bos,J.L.** (1997) Stimulation of gene induction and cell growth by the Ras effector Rlf. *EMBO J* 16:6748-6761.
- Wouters,F.S. and Bastiaens,P.I.** (1999) Fluorescence lifetime imaging of receptor tyrosine kinase activity in cells. *Curr.Biol.* 9:1127-1130.
- Wozniak,M.A., Kwong,L., Chodniewicz,D., Klemke,R.L., and Keely,P.J.** (2005) R-Ras Controls Membrane Protrusion and Cell Migration through the Spatial Regulation of Rac and Rho. *Mol.Biol.Cell* 16:84-96.
- Yaku,H., Sasaki,T., and Takai,Y.** (1994) The Dbl oncogene product as a GDP/GTP exchange protein for the Rho family: its properties in comparison with those of Smg GDS. *Biochem.Biophys.Res Commun.* 198:811-817.
- Yamanashi,Y., Tamura,T., Kanamori,T., Yamane,H., Nariuchi,H., Yamamoto,T., and Baltimore,D.** (2000) Role of the rasGAP-associated docking protein p62(dok) in negative regulation of B cell receptor-mediated signaling. *Genes Dev.* 14:11-16.

- Yang,J.Y., Michod,D., Walicki,J., Murphy,B.M., Kasibhatla,S., Martin,S.J., and Widmann,C.** (2004) Partial cleavage of RasGAP by caspases is required for cell survival in mild stress conditions. *Mol.Cell Biol.* 24:10425-10436.
- Yip-Schneider,M.T., Miao,W., Lin,A., Barnard,D.S., Tzivion,G., and Marshall,M.S.** (2000) Regulation of the Raf-1 kinase domain by phosphorylation and 14-3-3 association. *Biochem.J* 351:151-159.
- Zerial,M. and Mc Bride,H.** (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nature Reviews Cell Biology* 2:107-117.
- Zhang,Z., Vuori,K., Wang,H., Reed,J.C., and Ruoslahti,E.** (1996) Integrin activation by R-ras. *Cell* 85:61-69.
- Zheng,Y., Liu,H., Coughlin,J., Zheng,J., Li,L., and Stone,J.C.** (2005) Phosphorylation of RasGRP3 on threonine 133 provides a mechanistic link between PKC and Ras signaling systems in B cells. *Blood* 105:3648-3654.
- Zippel,R., Orecchia,S., Sturani,E., and Martegani,E.** (1996) The brain specific Ras exchange factor CDC25 Mm: modulation of its activity through Gi-protein-mediated signals. *Oncogene* 12:2697-2703.
- Zwartkruis,F.J., Wolthuis,R.M., Nabben,N.M., Franke,B., and Bos,J.L.** (1998) Extracellular signal-regulated activation of Rap1 fails to interfere in Ras effector signalling. *EMBO J* 17:5905-5912.

