

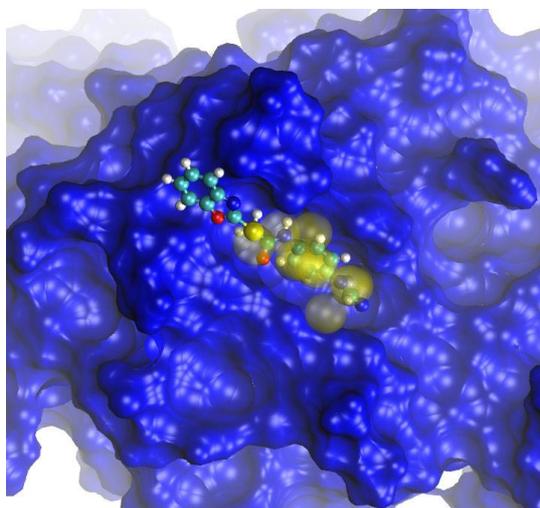


MÁSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOMEDICINA

Curso 2012 - 2013

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

*Las interacciones entre las proteínas scaffold y la ruta
Ras-ERK como diana antitumoral*



AUTOR: Rocío García Gómez

DIRECTOR: Piero Crespo Baraja

CONTACTO: rociogarciagomez1988@gmail.com

ÍNDICE

	Página
INTRODUCCIÓN	1
1. La Familia de las MAP quinasas	2
1.1. Clasificación de las MAP quinasas en mamíferos	2
1.2. Las MAP quinasas se activan mediante cascadas de señalización	3
2. La ruta de señalización Ras-ERK	4
2.1. Activación de la cascada de ERK1/2 desde la superficie celular	4
2.2. Proteínas Ras	5
2.3. Isoformas de Raf	6
2.4. MEK1 y MEK2	7
2.5. ERK1 y ERK2	8
2.5.1. Estructura	8
2.5.2. Activación e inactivación	8
2.5.3. Sustratos	9
3. Proteínas moduladoras de la ruta Ras-ERK	9
3.1. Proteínas adaptadoras o “Scaffolds”	10
3.1.1. IQGAP	12
3.1.2. KSR	14
4. Importancia de la ruta Ras-ERK en la carcinogénesis	16
OBJETIVOS	18
MATERIALES Y MÉTODOS	20
1. Cultivos celulares	21
1.1. Métodos de transfección	21
1.1.1. Transfecciones transitorias	21
1.1.2. Obtención de sublíneas transfectantes estables	22
2. Análisis de proteínas	22
2.1. Análisis mediante Western blot	22
2.2. Análisis de inmunoprecipitación de proteínas	24
3. Ensayo de proliferación celular	24
4. Cuantificación de apoptosis por activación de la proteína Caspasa 3	24
5. Ensayo de desarrollo tumoral en membrana corioalantoidea (CAM) de embrión de pollo	25

6. Herramientas informáticas	25
6.1. Análisis de western blot	25
6.2. Análisis estadístico y procesamiento de los datos	25
RESULTADOS	26
1. El patrón de expresión de las proteínas scaffold de ERK1/2 varía en función del tejido (sano/tumoral) y de las mutaciones existentes	27
1.1. Patrón de expresión de las proteínas scaffold de ERK1/2 en tejido colorrectal sano y tumoral	27
1.2. Patrón de expresión de IQGAP2 en líneas colorrectales tumorales en función de las mutaciones existentes	28
1.3. Patrón de unión de las proteínas scaffold a ERK1/2 en líneas celulares transfectadas con vectores de expresión para K-Ras y B-Raf	29
2. El silenciamiento de las proteínas scaffold IQGAP1, IQGAP2 y KSR2 incrementa la tasa de proliferación celular	31
2.1. El silenciamiento de IQGAP1 incrementa la tasa de proliferación celular.....	31
2.2. El silenciamiento de IQGAP2 incrementa la tasa de proliferación celular y su sobreexpresión induce apoptosis.....	32
2.3. El silenciamiento de KSR2 incrementa la tasa de proliferación celular.....	33
2.4. Ensayo de desarrollo tumoral en CAM de embriones de pollo.....	33
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES	38
PERSPECTIVAS FUTURAS	40
BIBLIOGRAFÍA	42

INTRODUCCIÓN

Las quinasas son un tipo de proteínas con actividad enzimática que transfieren grupos fosfato desde moléculas donadoras, como el ATP, a sustratos específicos; siendo conocido este proceso como fosforilación. Uno de los grupos más amplios de quinasas, son las proteínas quinasas o proteín quinasas, que actúan sobre proteínas específicas, modificando su actividad. Estas proteínas se encuentran involucradas en múltiples procesos celulares, algunos de ellos tan relevantes como la expresión génica, la dinámica citoesquelética y el metabolismo energético, entre otros mecanismos esenciales para la proliferación, diferenciación y supervivencia celular.

Una célula es capaz de responder a estímulos externos a pesar de estar está aislada del medio por una membrana, pudiendo desencadenar en su interior respuestas a estos estímulos tan variadas como transcripción, traducción, proliferación y apoptosis mediante un proceso conocido como transducción de señales. Numerosos estímulos extracelulares dan lugar a la activación de rutas de transducción que propagarán la señal al interior de la célula. Un papel principal en estas redes de señalización intracelulares lo llevan a cabo una clase de proteínas quinasas específicas; las denominadas proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Pearson et al., 2001).

El hecho de que estas MAP quinasas intervengan en procesos tan importantes dentro de la célula, subyace que alteraciones en los genes que codifican estas proteínas estén íntimamente relacionadas con enfermedades tan importantes como el cáncer (Hanahan and Weinberg, 2011).

1. LA FAMILIA DE LAS MAP QUINASAS

1.1. Clasificación de las MAP quinasas en mamíferos

Las MAP quinasas presentan una serie de características comunes: (1) están activadas por cascadas de proteín quinasas, con al menos dos quinasas previas en la cascada; (2) requieren fosforilación en residuos de tirosina y treonina para activarse por completo y la acción de fosfatasas para inactivarse; (3) fosforilan generalmente residuos de serina o treonina seguidos de prolina; (4) sus sustratos suelen contener dominios de interacción o “docking domains” que se requieren para una unión de alta afinidad con el enzima y (5) las cascadas de señalización se encuentran organizando complejos multiproteicos de señalización en los que intervienen proteínas adaptadoras o “scaffolds”.

Las MAP quinasas de mamífero se pueden dividir en cuatro subfamilias:

-ERKs (Extracellular signal-Regulated Kinases) que se activan principalmente por mitógenos.

-SAPK/JNKs (Stress-Activated Protein Kinases/ Jun N-terminus Kinases) que se activan mayoritariamente por estímulos de estrés, citoquinas, ciertos ligandos de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y agentes que interfieren en las síntesis de DNA y proteínas.

-p38 que responden fundamentalmente a estímulos de estrés (como choque osmótico o choque térmico), a hormonas, a estimulación de GPCRs y a citoquinas inflamatorias.

-ERK5/BMK (Big mitogen-activated protein kinase) que se activan potentemente por mitógenos aunque también se ha descrito su activación por factores de estrés celular.

1.2. Las MAP quinasas se activan mediante cascadas de señalización

Tal y como se ha comentado anteriormente, las MAP quinasas se activan por cascadas de proteínas quinasas citoplasmáticas. La quinasa que fosforila directamente a las MAPKs es un miembro de la familia de la MAP quinasa quinasa (MEK o MKK). Estas son enzimas de especificidad dual que pueden fosforilar el hidroxilo de cadenas laterales de serina/treonina y tirosina en sus sustratos. A pesar de su habilidad para fosforilar proteínas tanto en cadenas alifáticas como aromáticas en el contexto apropiado, la especificidad de sustratos conocidas para las MEKs conocidas es muy estrecha: cada MEK fosforila una o unas pocas MAP quinasas (Pearson et al., 2001).

Las MEKs son activadas por las MEK quinasas (MEKKs), también por fosforilación de dos residuos, serina o treonina, en sus loops de activación; siendo su especificidad de fosforilación muy alta (similar a la de las MEKs) (Pearson et al., 2001).

Existen numerosas características de las MAP quinasas que resultan de su activación por cascadas de quinasas; siendo una de ellas la amplificación. La amplificación puede ocurrir si cada quinasa sucesiva en la cascada es más abundante que su activador. Esto se da en uno o dos pasos dentro de un módulo de MAP quinasas; y en el caso de la ruta de ERK1/2, ocurre en el paso Raf-MEK (dado que MEK1 es mucho más abundante que Raf) (Pearson et al., 2001).

Otra característica de las cascadas de MAP quinasas deriva de la doble fosforilación de la MAP quinasa por la MEK; así, en el caso de ERK 1/2, las quinasas son fosforiladas en tirosina antes que en treonina tanto *in vitro* como *in vivo*. Las proteínas fosforiladas en tirosina no son activas y se van acumulando hasta llegar a un umbral; una vez se ha alcanzado este umbral se fosforila la treonina, tras lo cual las quinasas pasan rápidamente a su estado totalmente activo. También cabe destacar que los elementos que forman una cascada de MAP quinasas son capaces de

detectar contribuciones de otras rutas para aumentar o suprimir la señalización hacia la MAP quinasa (Pearson et *al.*, 2001).

2. LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN RAS-ERK

2.1. Activación de la cascada Ras-ERK desde la superficie celular

La cascada de ERK1/2 es una de las mejor caracterizadas desde su inicio. Tras su activación, esta cascada juega un papel muy importante en procesos celulares tan importantes como la proliferación, la diferenciación, el desarrollo, la supervivencia celular, la migración, la apoptosis, la determinación morfológica o la transformación oncogénica (Roskoski, R., 2012).

La ruta Ras-ERK se activa por estímulos mediados por distintos tipos de receptores de membrana entre los que se encuentran los receptores tirosín quinasa (RTK) y los receptores acoplados a proteínas G (GPCR).

Uno de los primeros pasos de esta cascada de señalización es la activación de la proteína G monomérica Ras. Esta se produce gracias al reclutamiento de proteínas adaptadoras (como Shc y Grb2) hacia el receptor mediante interacciones entre los dominios SH2 de estas proteínas y los residuos de fosfotirosina presentes en el receptor. El factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) Son of Sevenless (Sos), entre otros, se une al complejo e induce en Ras el intercambio de GDP por GTP. Cuando Ras se encuentra unido a GTP es capaz de interactuar con sus efectores (incluidas las distintas isoformas de la serina/treonina kinasa Raf) (Pearson et *al.*, 2001).

La unión de Ras a Raf provoca en esta MAPKKK una serie de cambios conformacionales que incrementan su actividad quinasa; contribuyendo a la propagación de la señal a través del módulo MEK-ERK (Pearson et *al.*, 2001).

Tras su activación, ERK puede actuar sobre sus sustratos desencadenando una respuesta celular consecuente. En el caso de la MAP quinasa se han descubierto una gran variedad de sustratos, aproximadamente 200, de naturaleza tanto nuclear como citoplasmática (Yoon and Seger, 2006).

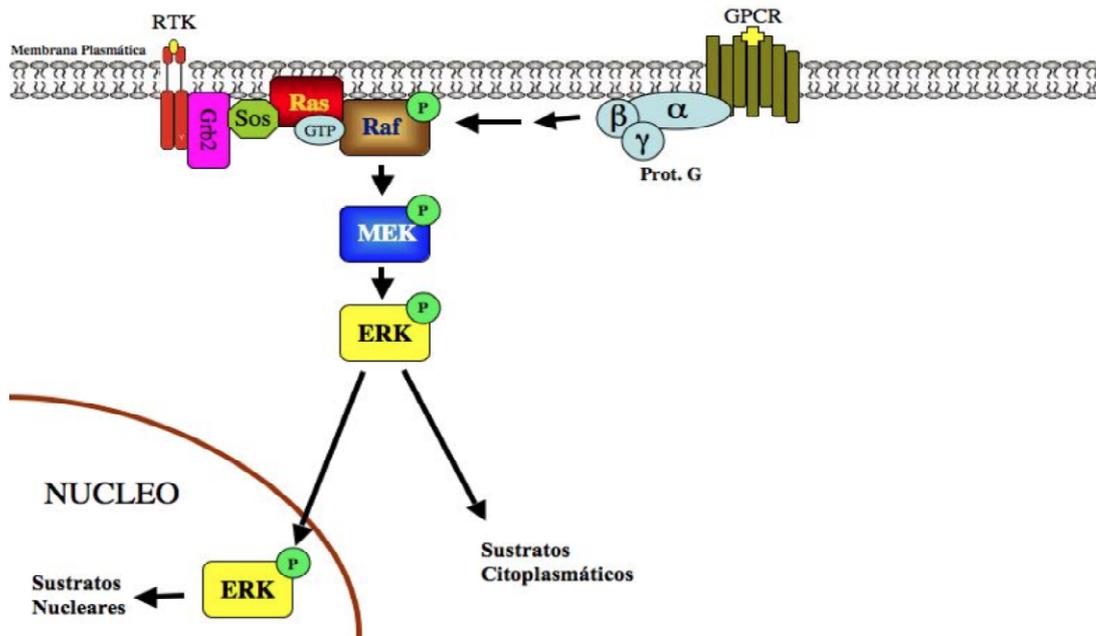


Figura 1. Activación de la ruta de señalización Ras-ERK desde la superficie celular. La unión de un determinado ligando a un receptor tirosín quinasa (RTK), o acoplado a proteínas G (GPCR), desencadena la activación de la cascada de MAP quinasa. Tras esto, ERK se activa, pudiendo ejercer su acción sobre sus sustratos nucleares o citoplasmáticos (Esquema cedido por Adán Pinto Fernández).

2.2. Proteínas Ras

Los genes *ras* son una familia de oncogenes estrechamente relacionados. Inicialmente se aislaron en virus de sarcomas murinos altamente oncogénicos y, posteriormente se detectaron también en tumores humanos y en células normales, en este caso, en su forma protooncogénica. Los genes *ras* son tres: H, K y N-*ras*, se expresan en todos los tejidos y tipos de células (aunque en distintas proporciones) y codifican cuatro proteínas de 21 kDa (H-Ras, K-Ras4A, K-Ras4B y N-Ras) con una homología del 85% (Malumbres and Barbacid, 2003).

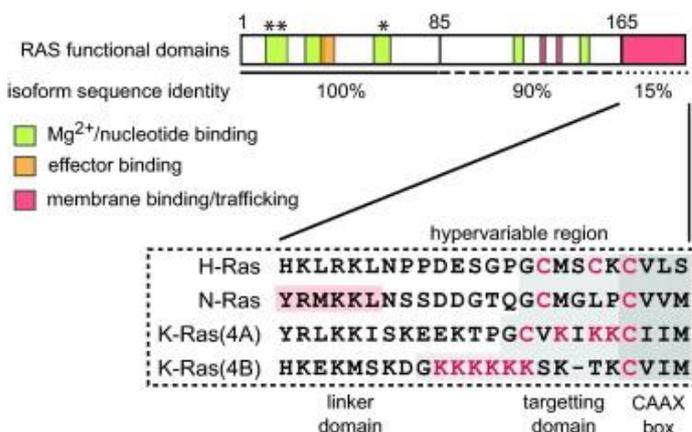


Figura 2. La región hipervariable de Ras (HVR) determina las diferencias funcionales existentes entre sus isoformas. Las secuencias de las isoformas de Ras son idénticas en las regiones que regulan su activación y la interacción con sus efectores. HVR se modifica postraduccionalmente para permitir interacciones con la membrana y localizaciones diferenciales (en rosa están resaltados los residuos clave para permitir la localización correcta). Los asteriscos indican los lugares donde se producen mutaciones oncogénicas en los codones 12, 13 y 61 (Prior, A. I., and Hancock, J. F., 2012).

Las proteínas Ras se encuentran unidas a la cara interna de la membrana plasmática, lugar en el que interacciona con sus activadores y sus efectores. Dicha unión se realiza mediante adiciones lipídicas post-traduccionales en el extremo carboxilo terminal (en el motivo denominado CAAX box). En esta región, todas las proteínas Ras sufren una farnesilación. Además un segundo anclaje es necesario para localizarlas eficazmente en membranas, dicha señal la proporciona la palmitilación en el caso de H y N-Ras, o una secuencia polibásica, en el caso de K-Ras (Prior, A. I., and Hancock, J. F., 2012).

Las proteínas Ras unen nucleótidos de guanina y actúan como interruptores moleculares. En función del nucleótido unido, estas proteínas ciclan entre un estado inactivo, unidas a GDP, y un estado activado, al intercambiar el GDP por GTP. En condiciones normales, el ciclo activación-desactivación está íntimamente controlado por, al menos, dos tipos de proteínas: factores de intercambio (GEFs), que catalizan el intercambio GDP a GTP, y proteínas GAPs (GTPase activating proteins) potenciadoras de la actividad GTPasa de Ras. En el caso de las proteínas Ras oncogénicas, estas portan mutaciones, generalmente en los codones 12 o 61, que suprimen su sensibilidad hacia las GAPs manteniéndolas siempre unidas a GTP y por ende constantemente activadas (Prior, A. I., and Hancock, J. F., 2012).

2.3. Isoformas de Raf

La proteína Raf se identificó originalmente como un oncogén retroviral (v-Raf) con actividad serín/treonín quinasa. Posteriormente, se identificó el gen homólogo a v-Raf en humanos, c-Raf o Raf-1; describiéndose además otras dos isoformas: A-Raf y B-Raf.

Raf-1 es ubicuo; la mayor expresión de B-Raf se da en testículos y tejido neuronal; y A-Raf aparece principalmente en tejido genitourinario (Pearson *et al.*, 2001).

Cada isoforma contiene tres regiones conservadas, denominadas CR1, CR2 y CR3. Las dos primeras se localizan en el extremo amino y se han relacionado con la regulación del dominio catalítico de Raf; así su delección crea un mutante que posee constitutivamente alta actividad (de forma independiente de Ras). En el dominio CR1 se encuentra la región involucrada en la unión a Ras-GTP, que incluye al dominio de unión a Ras (RBD) y la región rica en cisteínas (CRD). El dominio quinasa se encuentra en CR3 (Leicht, D. T., *et al.*, 2007).

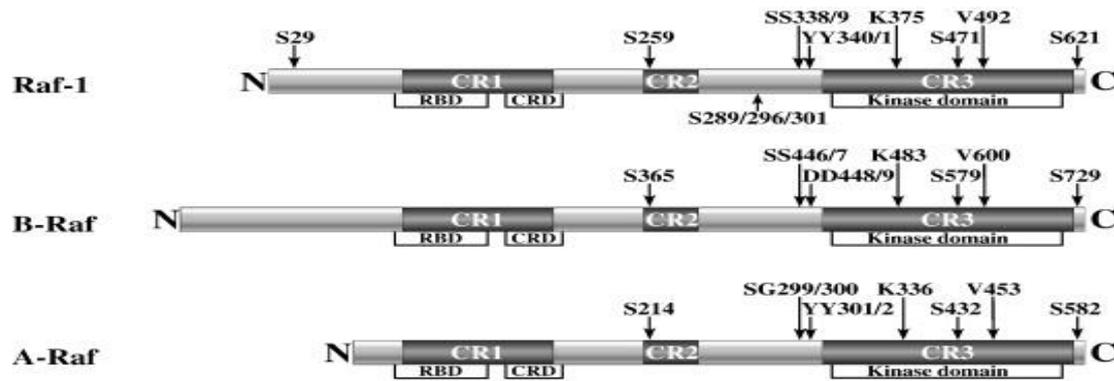


Figura 3. Alineamiento estructural de las isoformas de Raf. Se muestra el alineamiento de las isoformas humanas de Raf; C-Raf (Raf-1 o c-Raf-1), B-Raf y A-Raf. Se indican las posiciones de las regiones conservadas (CR) 1, 2 y 3, el dominio de unión a Ras (RBD), el dominio rico en cisteínas (CRD) y el dominio quinasa. Además, se indican los sitios de fosforilación conocidos en C-Raf y sus correspondientes sitios en las otras isoformas de Ras (A-Raf y B-Raf), la posición del sitio de unión a ATP (K375) y la posición de la mutación V600 de B-Raf encontrada en muchos tipos cáncer (Leicht, D. T., et al., 2007).

Raf forma parte de un complejo multiproteico compuesto por Raf-1 o B-Raf, la proteína de choque térmico (hsp90), p50 y un número indeterminado de proteínas 14-3-3. Parece que 14-3-3 estabiliza a Raf-1 (tanto en estados conformacionales de baja como de alta actividad) y que también sirve para regular la especificidad de la señal mediante el reclutamiento de Raf-1 hacia complejos multiproteicos (Pearson et al., 2001).

2.4. MEK1 y MEK2

Las proteínas MEK (MEK1 y MEK2) contienen un dominio catalítico rodeado por un dominio regulador N-terminal y un dominio C-terminal más corto. Su activación tiene lugar por fosforilación de las serinas (218 y 222, en MEK1) en su lazo de activación; estando regulada dicha activación por la interacción de sus activadores a una región de MEK, denominada dominio para anclaje versátil (DVD) (Bromberg-White, J. L. et al., 2012). Esta activación puede ser inhibida por retrofosforilación de la treonina 292 de MEK1 por ERK y principalmente por la rápida acción defosforiladora de una Ser/Thr fosfatasa en las serinas 218 y 222 (Eblen et al., 2004).

Además de la activación de ERK1 y ERK2, otra función propuesta para las proteínas MEK es la de actuar como un anclaje citoplasmático para ERK1/2. Así, MEK entra al núcleo en respuesta a la activación de la ruta, pero rápidamente es exportada al citoplasma gracias a una secuencia NES situada en su extremo N-terminal, arrastrando a ERK al citoplasma y actuando así como transportador (Bromberg-White, J. L. et al., 2012). Por falta de evidencia de lo contrario, se ha asumido que los únicos sustratos de MEK1/2 son ERK1/2.

2.5. ERK1 y ERK2

ERK1 y ERK2 son proteínas de 44 y 42 KDa, respectivamente, muy similares estructuralmente, activadas por las mismas MEKs (MEK1 y MEK2) y que se expresan de forma ubicua (aunque su abundancia relativa es variable en función del tejido). Se podría pensar que son dos proteínas redundantes, pero el fenotipo de los ratones knockout para cada una de las isoformas es bastante diferente lo que sugiere que sus funciones no son solapantes (Roskoski, R., 2012).

2.5.1. Estructura

Las proteínas ERK están formadas por una pequeña región N-terminal y un dominio de mayor tamaño en el extremo C-terminal, conectados por una región conectora o “linker”. El ATP se une en el interior de un bolsillo que se encuentra en la interfaz de los dos dominios; mientras que los sustratos se unen en la superficie de este bolsillo. El lazo de activación permanece en la apertura del centro activo; produciéndose su reorganización conformacional tras la fosforilación de los residuos de activación de forma que se permite la unión del sustrato a la enzima y la generación de un centro catalítico funcional (Roskoski, R., 2012).

Se ha descubierto por análisis mutacional una región situada en el extremo C-terminal de ERK (aminoácidos 312-320 en ERK2) denominada dominio común de acoplamiento (CD) que es importante para la interacción con el llamado dominio D presente en el extremo N-terminal de MEK y con numerosas proteínas (Roskoski, R., 2012).

2.5.2 Activación e inactivación

Las ERKs son activadas por doble fosforilación en sus residuos reguladores Thr y Tyr y esta fosforilación parece estar mediada únicamente por MEK. Así, estudios de cristalización han mostrado que la unión del dominio D de MEK al dominio CD de ERK induce un cambio conformacional que expone sus Thr y Tyr reguladoras al entorno, y por lo tanto permite la fosforilación por parte de MEK (Roskoski, R., 2012).

La duración y amplitud de la activación de las MAP quinasas representa el balance entre la señal activadora y los mecanismos de inactivación (ambos influenciados por mecanismos de retroinhibición).

La inactivación de ERK se produce por la eliminación de los fosfatos, bien de uno o de los dos residuos de Thr y Tyr (Roskoski, R., 2012). Además de la inhibición por fosfatasas, ERK parece estar involucrado en numerosos eventos de retroinhibición que resultan de gran

importancia para la reducción de su actividad en etapas posteriores a la estimulación; estos mecanismos incluyen la fosforilación inhibitoria del factor de intercambio SOS, de Raf y de MEK (Roskoski, R., 2012).

2.5.3. Sustratos

Hasta la fecha se han descrito más de 220 sustratos de ERK distribuidos en distintos compartimentos celulares, incluidos: factores de transcripción nucleares (Myc, Elk y otros de la familia Ets); receptores y otras proteínas de membrana (ENaC, Syk, GAB2); proteínas citoplasmáticas de variada naturaleza (Rsk, STAT5, PLA2, COX2); componentes del citoesqueleto (calponina, paxilina); proteínas mitocondriales (Bcl-2)... (Yoon, S., et *al.*, 2006). De forma que, mediante la activación de estos sustratos ERK lleva a cabo su papel regulador de un sinnúmero de procesos biológicos.

También se ha visto que ERK fosforila proteínas involucradas en su propia cascada de señalización, como el receptor de EGF, SOS, c-Raf y MEK1, definiendo mecanismos de retroinhibición para esta ruta (Seger, R., and Krebs, E. G., 1995).

3. PROTEÍNAS MODULADORAS DE LA RUTA RAS-ERK

En los últimos años se ha cuestionado la simplicidad y linealidad con que se representaba clásicamente la ruta de ERK en la literatura. En realidad, existen numerosas evidencias que muestran interacciones proteicas complejas que influyen en la función y regulación de esta ruta (Kolch, W., 2005). Además, cada vez que se atribuye una nueva función a esta ruta o se describen nuevos sustratos, la visión simplista de una ruta de señalización lineal se tambalea. Estos hallazgos están dando pie al concepto de rutas de señalización como redes de comunicación que procesan e integran la señal, con nodos compuestos por complejos multiproteicos (Kolch, W., 2005).

La organización espacial de las quinasas y de sus sustratos determina qué señal va a ser transmitida y recibida en los distintos sitios de acción. La dotación de proteínas de señalización junto con las particularidades de la célula, determinan la distribución de las MAP quinasas y otras moléculas de señalización, de tal forma que pueden ser reguladas de forma diferencial por estímulos extracelulares. Existen distintas poblaciones de una MAP quinasa que pueden actuar sobre dianas restringidas, esto puede ocurrir a través de: la formación de complejos altamente especializados, la concentración de una MAP quinasa en su sitio de acción o la compartimentalización de una población de MAP quinasas en un sitio con difusión limitada (como puede ser una vesícula o el núcleo).

3.1. Proteínas adaptadoras o “scaffolds”

Se ha descubierto que las señales que se propagan a través de las rutas de señalización, están moduladas por distintas clases de proteínas reguladoras, las proteínas adaptadoras o scaffolds. Estas proteínas se unen a distintos componentes de una cascada de señalización, creando un complejo multienzimático gracias al cual la señal se regula de una manera más fina y libre de interferencias moleculares indeseadas.

Las proteínas scaffold presentan una localización celular determinada, y actúan ensamblando módulos de señalización desde esa determinada localización; provocando que el módulo de señalización actúe únicamente sobre los sustratos accesibles a esa región. También se ha visto que la formación de estos módulos es capaz de influir en la duración e intensidad de la señal propagada a través de una ruta de señalización dada (Kolch, W., 2005). Por lo tanto, suponen una vía de estudio muy interesante para explicar por qué la señal de ERK está involucrada en tantos procesos diferentes, algo imposible de explicar con una simple ruta de señalización con tres quinasas en serie.

El modelo que postula una difusión libre de los componentes de señalización presenta varias desventajas; dado que la probabilidad de que dos quinasas consecutivas se encuentren en el citosol es bastante baja, por lo que la señalización basada en la difusión sería extremadamente ineficiente (Meister, M., et al., 2013).

En cambio, las proteínas de andamiaje apoyan la señalización de sus parejas propagando su señal y dirigiéndola a la localización celular correcta. Así, los scaffolds ponen a las parejas de señalización en estrecha proximidad entre sí, enlazándolas en complejos multienzimáticos y facilitando de este modo su interacción funcional. Dentro de este complejo, las quinasas se protegen de la desactivación llevada a cabo por las fosfatasas y se minimiza la interferencia con otras cascadas de señalización. Dado que no todos los estímulos resultan en la misma respuesta celular, las diferentes proteínas scaffold anclan los módulos de señalización, con la ayuda de varias proteínas adaptadoras, a regiones subcelulares específicas y mejoran la señalización, ya que proporcionan una plataforma para la interacción con sus respectivos sustratos (Meister, M., et al., 2013).

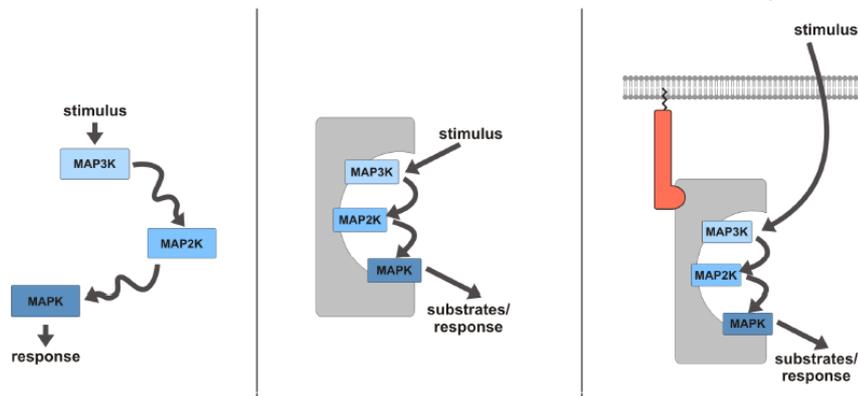


Figura 4. Características de las proteínas scaffold. (A la izquierda) El modelo que postula una difusión libre de las proteínas de señalización no es capaz de explicar suficientemente la eficiencia de la señalización. (En el medio) Las proteínas de andamiaje contienen varios dominios para la unión de sus parejas y sirven como plataformas para la transducción eficiente de señales. (A la derecha) Existen adaptadores locales que funcionan como anclajes subcelulares específicos para las proteínas de andamiaje y sus parejas a subcompartimentos celulares, tales como la membrana plasmática o los endosomas (Meister, M., et al., 2013).

Una característica principal de estas proteínas es la inhibición combinatoria que describe la estequiometría del propio scaffold y de sus parejas de señalización. Así, si la concentración de una proteína scaffold es demasiado baja, la unión de la quinasa y su sustrato no se da y, por lo tanto, la de señalización estará por debajo de su óptimo. Por el contrario, si hay un exceso de proteína scaffold, cada quinasa y su sustrato se unen a un scaffold diferente; por lo que la señalización aguas abajo se altera en ausencia de una interacción productiva (Meister, M., et al., 2013).

En concreto, para la ruta Ras-ERK, se han identificado al menos trece proteínas scaffold; sin embargo, este trabajo se centra solamente en dos de ellas IQGAP y KSR (y más concretamente en IQGAP1, IQGAP2 y KSR2).

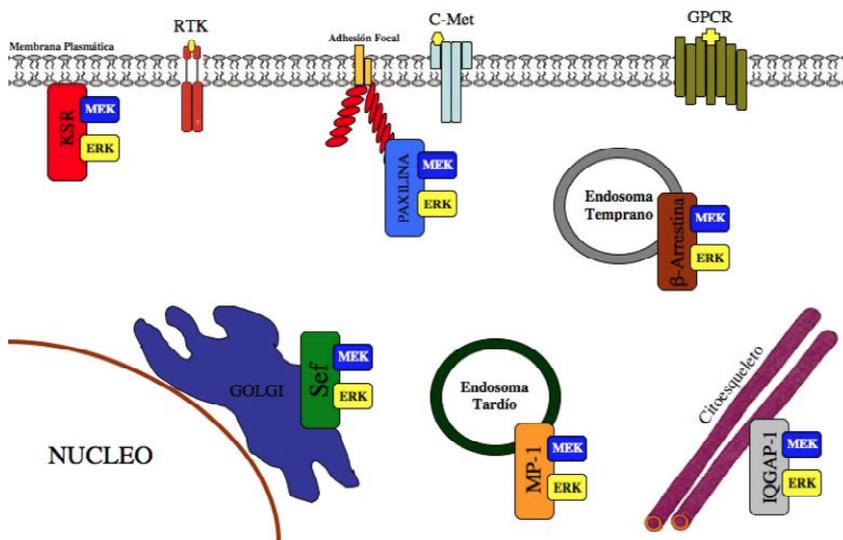


Figura 5. Modulación de la ruta Ras-ERK por moléculas adaptadoras o scaffolds. Esquema que indica cómo los scaffolds forman módulos de señalización con componentes de la ruta Ras-ERK y dirigen la señal a determinados compartimentos celulares (Esquema cedido por Adán Pinto Fernández).

3.1.1. IQGAP

Las proteínas IQGAP (IQ motif containing GTPase-activating proteins) son una familia de proteínas multidominio presentes en un gran número de organismos. En humanos hay tres miembros de esta familia: IQGAP1, IQGAP2 (que presenta una similitud de un 62% con IQGAP1) y un tercer miembro aislado recientemente, IQGAP3. IQGAP1 es la isoforma más estudiada, pesa 190 KDa y se le han asociado funciones relacionadas con el citoesqueleto y con señalización celular (White, D. C., et al., 2009).

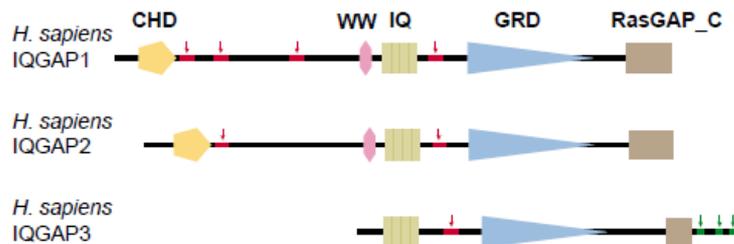


Figura 6. Diagrama esquemático que representa la familia de proteínas IQGAP humanas. Las líneas rojas horizontales denotan potenciales coiled coils y las líneas verdes indican tramos de baja complejidad estructural. CHD, dominio de homología con la calponina, WW, dominio de unión a residuos de poli-prolina (lugar donde se encuentra la región de unión a ERK); IQ, motivo de unión a calmodulina; GRD, dominio relacionado con GAP (proteína activadora de la GTPasa Ras); RasGAP_C, secuencia carboxi-terminal que se encuentra en miembros de la familia IQGAP (Briggs, W. M. and Sacks, B. D., 2003).

La expresión tisular de las distintas isoformas de IQGAP varía bastante. IQGAP1 es ubicua; mientras que IQGAP2 se encuentra principalmente en el hígado, pero también abunda en próstata, riñón, tiroides, estómago, testículos, plaquetas y glándulas salivares. IQGAP3 está presente en cerebro, pulmón, testículos, intestino delgado y colon (White, D.C., et al., 2009).

IQGAP1 actúa como scaffold de la ruta Ras-ERK y se une directamente a B-Raf, MEK y ERK modulando sus funciones. De hecho, la proteína IQGAP1 es necesaria para la activación de B-Raf por factores de crecimiento y regula la activación de MEK y ERK. Por otro lado, la estimulación con EGF modula diferencialmente la asociación de los componentes de la ruta de a IQGAP1. Así, las células derivadas del ratón knockout para IQGAP1 tienen un B-Raf insensible a la estimulación con EGF. B-Raf cuando se encuentra unido a IQGAP1 tiene mayor actividad quinasa que B-Raf libre. ERK se encuentra unido constitutivamente a IQGAP1 y la unión es insensible a EGF; mientras que la unión con MEK1 aumenta y con MEK2 disminuye tras la estimulación. Se ha sugerido que MEK1 promueve proliferación y MEK2 diferenciación; por lo tanto, parece que IQGAP1 modula la respuesta celular de ERK, aumentando la tasa de proliferación y disminuyendo la diferenciación; procesos relacionados con la neoplasia (White, D.C., et al., 2009).

La proliferación celular no controlada es una característica fundamental de la transformación neoplásica. Estudios recientes han demostrado que las proteínas IQGAP son importantes reguladores de la respuesta proliferativa; así por ejemplo, la sobreexpresión de IQGAP1 aumenta la proliferación de las células MCF-7 (White, D.C., et *al.*, 2009).

En consonancia con esto, se ha observado que los niveles de expresión de los genes IQGAP y sus mRNAs están normalmente alterados en la neoplasia. Así, IQGAP1 se encuentra sobreexpresado frecuentemente en cáncer, mientras que la expresión de IQGAP2 es reducida en algunos neoplasmas. De hecho, IQGAP1 se ha propuesto como un oncogén al comprobarse que es capaz de estimular la proliferación y favorecer la transformación tumoral en células epiteliales de cáncer humano. IQGAP1 se encuentra sobreexpresado en muchos tumores, incluyendo pulmón, mama, colon, oligodendroglioma, astrocitoma y carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello. Por otra parte, los niveles de expresión de IQGAP1 en los adenocarcinomas ováricos agresivos son más altos; mientras que la falta de expresión de IQGAP1 se asocia con un pronóstico favorable del cáncer gástrico.

Sin embargo, poco se ha publicado en relación con la expresión de IQGAP2 en neoplasia. Un estudio, publicado recientemente, aborda este tema y demuestra que la expresión de IQGAP2 se pierde en el 61% de tejido de carcinoma gástrico humano, pero se detecta en el 100% de mucosa gástrica normal. De forma que esta observación es consistente con el papel postulado para IQGAP2 como un supresor tumoral (White, D.C., et *al.*, 2009).

Las evidencias acumuladas implican a las proteínas IQGAP en cáncer; de forma que además de presentar niveles alterados en los tumores, estas proteínas parecen contribuir a la tumorigénesis. Además, la implicación de muchas proteínas de unión a IQGAP en múltiples etapas de la transformación neoplásica y la metástasis, junto con la participación de estas proteínas scaffold en diversas vías de señalización que se encuentran desreguladas en el cáncer (como la ruta Ras-ERK), hacen de estas proteínas objetivos conceptualmente atractivos como quimioterapéuticos. Por todo ello, es necesario seguir trabajando para determinar los mecanismos moleculares por los cuales la expresión de IQGAP1 e IQGAP2 se encuentra alterada en la neoplasia.

3.1.2 KSR

La proteína KSR (quinasa supresora de Ras) fue identificada inicialmente en *Drosophila* y en *Caenorhabditis elegans* (Meister, M., et al., 2013). En el caso de la proteína de mamífero tiene un peso molecular de 105 KDa y presenta, entre otros, dominios de unión a componentes de la ruta ERK (Kolch, W., 2005). Existen dos isoformas: KSR1 y KSR2 (siendo KSR1 la isoforma más estudiada). KSR1 es una proteína normalmente citoplasmática, pero sufre una translocación parcial a la membrana en presencia de Ras activado (Michaud et al., 1997).

Estudios de interacción con componentes de la ruta de ERK revelaron que KSR1 se une a MEK de forma constitutiva y a Raf y ERK tras la activación de la ruta por factores de crecimiento (Meister, M., et al., 2013). En concreto se une a ERK a través de una secuencia presente en su dominio CA4 (Kolch W., 2005). Por otro lado se vio que KSR1 era capaz de favorecer la fosforilación de MEK por Raf tras la activación de la ruta por Ras.

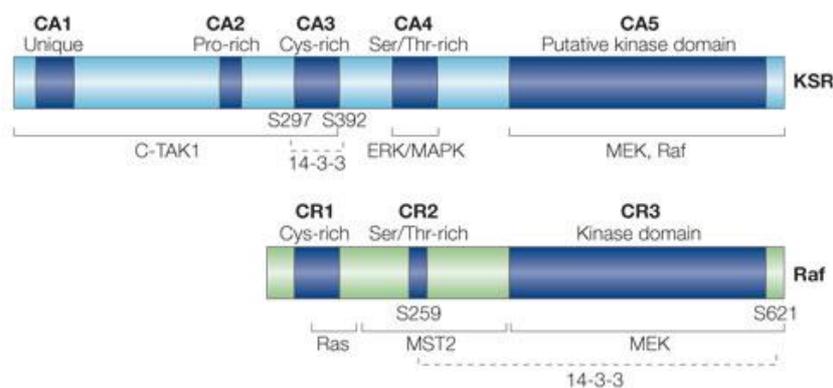


Figura 7. La proteína quinasa supresora de Ras (KSR) presenta cinco dominios conservados: CA1, único para KSR1 y ausente en KSR2; CA2, un dominio rico en prolina; CA3, un dominio rico en cisteína que media interacciones con los lípidos de membrana; CA4, una región rica en serina/treonina que se une a ERK; y CA5, el dominio quinasa. Se indican los sitios de unión para algunas proteínas con las que interactúa. C-TAK1 se une a la región N-terminal y fosforila los sitios S297 y S392 de unión a 14-3-3. MEK y Raf se unen a la región C-terminal que contiene al dominio CA5.

Las quinasas Raf comparten tres regiones conservadas: CR1, un dominio rico en cisteína que contiene parte del dominio de unión a Ras y que también interactúa con los lípidos de membrana; CR2, una región rica en serina/treonina que forma parte de la región de unión a MST2; y CR3, el dominio quinasa que puede unirse a MEK. La unión de las proteínas 14-3-3 a S392 en KSR o S259 en Raf-1 secuestran a KSR1 y Raf-1 en el citosol. MTS2, mammalian sterile-twenty-like-2 (Kolch W., 2005).

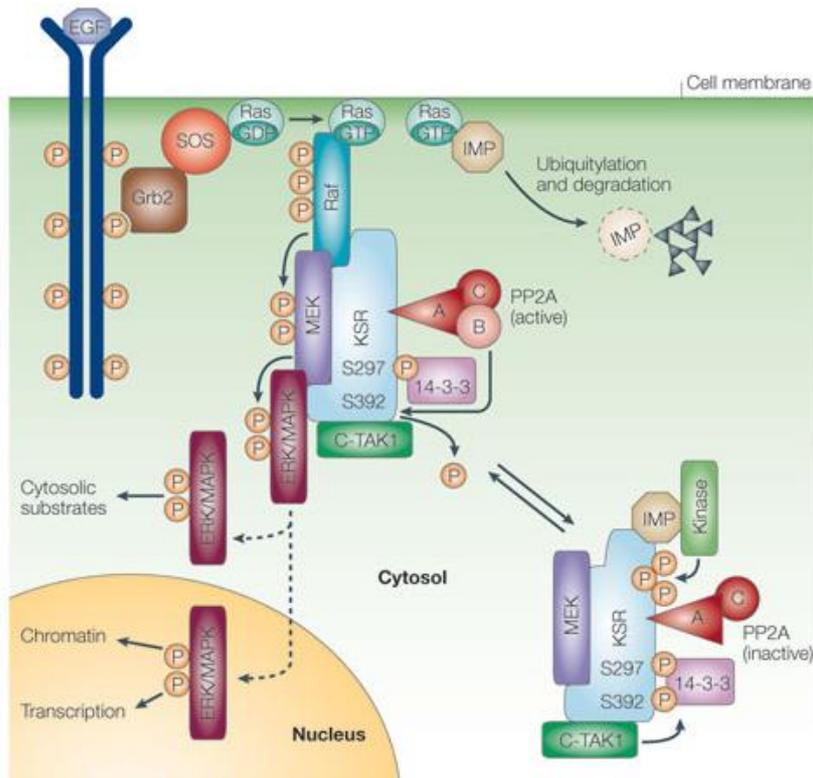


Figura 8. Mecanismo de acción de KSR

La kinasa supresora de Ras (KSR) inactiva es secuestrada en el citosol mediante la unión a 14-3-3 y por la fosforilación inducida por la proteína IMP (Impedes mitogenic signal propagation). Tras la estimulación por mitógenos como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), los receptores activos reclutan factores de intercambio de nucleótidos de guanina de Ras, tales como Son of sevenless (SOS) a través de la proteína adaptadora Grb2 (Growth-factor-receptor-bound-2), que induce la activación de Ras. Ras activo (unido a GTP) induce la desfosforilación del residuo S392 de KSR mediante la estimulación de la unión de la subunidad B de la proteína fosfatasa 2A (PP2A) a sus subunidades A y C, que se encuentran asociadas constitutivamente con KSR. Esto da como resultado la liberación de 14-3-3 de su sitio de unión en KSR y la translocación de KSR a la membrana celular.

La unión de Ras activo a IMP desencadena su autoubiquitilación y su posterior degradación. KSR facilita la fosforilación de MEK por Raf, y promueve la activación de ERK / MAPK que es capaz de fosforilar tanto sustratos nucleares y como no nucleares.

La inactivación de KSR implica su fosforilación inducida por Ras, la re-fosforilación del residuo S392 de KSR (el sitio de unión de 14-3-3) por C-TAK1 o Nm23, y, presumiblemente, la reasociación de KSR con IMP y la fosforilación por una quinasa desconocida que es reclutada por IMP (Kolch, W., 2005).

En *C. elegans* tanto KSR1 como KSR2 están involucradas en distintas fases del desarrollo y el doble knockout es letal. En ratón, el knockout de KSR1 causa defectos en la proliferación de linfocitos T; pero quizás lo más destacable es que éste ratón es menos susceptible a la formación de tumores inducidos por oncogenes (Kolch, W., 2005). Además, se ha visto que en las células de estos animales la activación de ERK no se mantiene en el tiempo y que poseen un elevado nivel de apoptosis en células epiteliales de colon (Nguyen et al., 2002).

4. IMPORTANCIA DE LA RUTA RAS-ERK EN LA CARCINOGENESIS

Tal y como se ha tratado con anterioridad, la ruta de señalización Ras-ERK está implicada en la transmisión y control de señales mitogénicas dentro de la célula y desempeña un papel esencial en la regulación de procesos fisiológicos clave como la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Por ello, fallos en la regulación de esta ruta, contribuyen significativamente a la transformación celular y están involucrados en numerosos tipos de cáncer, además de en otras patologías. Por esta razón, durante las últimas décadas, la ruta Ras-ERK ha sido sujeto de intensas investigaciones, con el propósito de identificar componentes susceptibles de ser utilizados como dianas terapéuticas en el tratamiento del cáncer.

La implicación de Ras en la carcinogénesis está comprobada desde hace décadas. Así, esta proteína se encuentra activada mutacionalmente en aproximadamente el 30% de los tumores humanos; destacando los de páncreas (90%), colon (50%), tiroides (50%), pulmón (30%) y melanoma (25%) (Malumbres and Barbacid, 2003). Estos genes mutados codifican proteínas que portan sustituciones en un solo aminoácido (principalmente en G12 o Q61) y que resultan insensibles a las proteínas reguladoras GAP; de forma que Ras se encuentra unido de forma constitutiva a GTP y, por ende, constantemente activo. Esto da lugar a una activación permanente de sus rutas efectoras, incluida la cascada Raf-MEK-ERK (Malumbres and Barbacid, 2003).

Además de Ras, también se ha confirmado la implicación directa de otros elementos de la ruta Ras-ERK en procesos tumorales. Tal es el caso de la serín/treonín kinasa Raf. La importancia de este componente en la oncogénesis, ya se sospechaba al ser identificado como un potente oncogen retroviral. Posteriormente, la generación de mutantes constitutivamente activos de Raf, y también de MEK, demostró su potencial transformante en fibroblastos murinos y otros tipos de células (Schreck, R., et al., 2006). Más recientemente, se ha encontrado B-Raf activado mutacionalmente, fundamentalmente provocado por el cambio de un ácido glutámico en posición 600 por una valina (B-Raf^{v600}), en diversos tumores humanos y se ha observado que la activación mutacional de Ras y de B-Raf aparece de manera no solapada en: melanomas, carcinomas colorrectales, de ovario, pulmón y tiroides.

En los últimos años, también se han descrito activaciones mutacionales de H-Ras, K-Ras, B-Raf y MEK 1 y 2, en la línea germinal en pacientes que presenten una serie de desórdenes del desarrollo asociados con una mayor incidencia de tumores de distinto tipo (Aoki, Y., et al., 2008).

En conjunto, se estima que hasta un 50% de los tumores humanos podrían albergar mutaciones en alguno de los componentes de la ruta Ras-ERK. Por lo que todos estos datos ponen en evidencia el potencial terapéutico que el bloqueo de la señalización a través de la ruta Ras-ERK puede suponer en el tratamiento del cáncer.

Al margen de los principales componentes de la ruta, hasta la fecha no se han descrito alteraciones presentes en tumores humanos entre los distintos tipos de proteínas reguladoras. No obstante, en algunos casos se ha demostrado que sus funciones son esenciales su activación; así por ejemplo, la función de KSR es crítica para la activación de Raf por Ras y las células deficientes en esta proteína scaffold son resistentes a la transformación por Ras. Además, la supresión de KSR mediante RNA de interferencia impide el crecimiento de células tumorales humanas portadoras de mutaciones en Ras (Kortum, R. L., et al., 2006); lo que apunta a KSR, en particular, y a las proteínas de andamiaje en general, como potenciales dianas antitumorales.

Uno de los debates de actualidad, es si, siendo el cáncer un proceso que requiere la alteración progresiva de muchos factores, el tratamiento mediante inhibidores dirigidos hacia una diana específica, es más efectivo que la utilización de inhibidores de amplio espectro. Cabe esperar que un tratamiento contra el cáncer realmente efectivo, se dirija hacia corregir/inhibir a la vez varios de los sistemas que funcionan aberrantemente; siendo ésta la esencia de la quimioterapia combinada. Reflexiones aparte, lo que parece estar claro es que siempre serán necesarias terapias dirigidas hacia la inhibición de las rutas de señalización mitogénica descontroladas.

OBJETIVOS

Tal y como se ha explicado anteriormente, las señales transmitidas por la ruta Ras-ERK regulan la activación de múltiples sustratos a través de los cuales se regulan mecanismos esenciales para la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular. Un alto porcentaje de cánceres presentan alteraciones en la estimulación de ésta ruta producidas por la activación mutacional de algunos de sus componentes; sin embargo, hasta ahora, los resultados de los esfuerzos realizados para inhibir la actividad de estas MAPKs endógenas son reducidos; y esto es debido al hecho de que estas quinasas se requieren para la viabilidad en mamíferos.

Sin embargo, la ruta de señalización Ras-ERK no es una mera cascada de fosforilaciones; sino que consta de una serie de proteínas adaptadoras o scaffolds que modulan su intensidad poniendo en contacto diferentes componentes de la ruta en distintas localizaciones celulares, ejerciendo así una restricción espacial de la señal.

La hipótesis de este trabajo consiste en que las diferencias en el uso de las proteínas scaffold pueden ser la base de las divergencias bioquímicas, biológicas y clínicas mostradas por tumores del mismo tipo pero impulsados por diferentes lesiones oncogénicas dentro de la vía de Ras-ERK, tales como las provocadas por mutaciones en K-Ras o en B-Raf. Por lo que el objetivo principal es demostrar este postulado mediante el estudio de las proteínas scaffold de ERK1/2 en células tumorales que presenten una firma oncogénica definida con respecto a la vía de Ras-ERK, con el propósito de identificar andamios esenciales para el mantenimiento del fenotipo oncogénico, que puedan servir como dianas para futuros agentes terapéuticos dirigidos a modular estos complejos de interacción. Así, la modulación de la interacción entre el scaffold y la quinasa actuaría por un mecanismo distinto de la inhibición directa de la quinasa; por lo que podría ser una estrategia novedosa para inhibir la activación constitutiva de la cascada en algunos tipos de cáncer.

Así, como objetivos específicos nos planteamos:

- 1) Estudiar las proteínas scaffold asociadas a ERK1/2 en respuesta a señales oncogénicas de tipo K-Ras y B-Raf.
- 2) Investigar si los oncogenes K-Ras y B-Raf alteran el patrón de expresión de las proteínas de andamiaje.
- 3) Identificar las proteínas scaffold esenciales para el mantenimiento del fenotipo oncogénico en líneas celulares que albergan mutaciones K-Ras y B-Raf.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES

Las líneas celulares utilizadas para la realización de este trabajo, su origen y su medio de cultivo se recogen en la tabla que se presenta a continuación.

LÍNEA CELULAR	ORIGEN	MEDIO DE CULTIVO
HEK 293T	Riñón de embrión humano	DMEM10F
RKO	Cáncer de colon humano (B-Raf mutado)	DMEM10F
RKO IQGAP1 ^{-/-*}	Cáncer de colon humano (B-Raf mutado)	DMEM10F
RKO IQGAP2 ^{-/-*}	Cáncer de colon humano (B-Raf mutado)	DMEM10F
RKO KSR2 ^{-/-*}	Cáncer de colon humano (B-Raf mutado)	DMEM10F

Tabla 1. Listado de las células en cultivo utilizadas; se incluye la información de su origen y el medio de propagación empleado.

*Sublíneas celulares establecidas en el laboratorio

1.1. Métodos de transfección

1.1.1. Transfecciones transitorias

- Transfección con Lipofectamina LTX (Invitrogen):

Se empleó este método de transfección (especialmente indicado para aquellas células que transfectan con dificultad, cuando se requiere una gran sobreexpresión génica o cuando se transfecta siRNA) siguiendo las especificaciones del fabricante.

- Vectores de expresión utilizados: pCEFL

pCDNA3 IQGAP2

pCEFL HA KRasV12

pCDNA FLAG BRafV600E

(Los plásmidos utilizados en este trabajo pertenecen al banco de ADN del Dr. Piero Crespo).

1.1.2. Obtención de sublíneas transfectantes estables

Las células parentales se transfectaron con los vectores y siRNAs oportunos usando lipofectamina LTX (Invitrogen). Los vectores utilizados portan el gen de resistencia a geneticina, mientras que los siRNAs proporcionan resistencia a puomicina; lo que permite seleccionar las células transfectadas. De este modo, tras 10-15 días aproximadamente en presencia del antibiótico de selección (0.75 µg/µl de geneticina o 2.5 µg/µl de puomicina en cada caso) se tripsinizaron los clones y se mezclaron obteniendo sublíneas celulares transfectantes estables. Posteriormente, en cada línea obtenida se comprobó la expresión ectópica mediante Western blot.

(Los siRNAs utilizados frente a las distintas proteínas scaffold son de Sigma-Aldrich).

2. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

2.1. Análisis mediante Western blot

Para la obtención de los extractos proteicos totales procedentes de los cultivos celulares, se recogieron las células en hielo una vez eliminado el medio de cultivo y lavadas con PBS; procediendo a su lisis mediante la adición de 200-500 µl de tampón de lisis de alta astringencia constituido por: 20 mM HEPES pH 7.5, 10 mM EGTA, 40 mM β-glicerolfosfato, 1 % de detergente no iónico NP40, 2.5 mM MgCl₂, 2 mM ortovanadato, 1 mM DTT (ditiotreitól) y extempóreamente, los inhibidores de proteasas: 10 µg/ml apoproteína y 10 µg/ml leupeptina. Tras 5 minutos en hielo, se clarificaron los lisados por centrifugación a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente, se recogió el sobrenadante resultante de la centrifugación y se midió la concentración proteica de los lisados por colorimetría según el método de Bradford (Bradford, CH. 1975), empleando seroalbúmina bovina para establecer una recta patrón de calibración y utilizándose un aparato de ELISA para medir las concentraciones de proteína. Se tomaron aproximadamente 50 µg de proteína, a los que se les añadió tampón de carga Laemli (100 mM Tris pH 6.8, 4 % SDS, 20 % glicerol, 20 mM DTT y 0.005 % azul de bromofenol). Las proteínas se calentaron a 95 °C durante 5 minutos y se sometieron a electroforesis vertical en geles de poliacrilamida (29:1)-SDS (dodecil sulfato sódico), de un porcentaje adecuado al tamaño de la proteína a analizar. La electroforesis vertical se llevó a cabo en aparatos Mini-protean (Bio-Rad) con un tampón 25 mM Trizma base, 192 mM Glicina, 0.1 % SDS. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore) durante 60 minutos a un voltaje constante de 100V, en un tampón 25mM Trizma base, 192 mM Glicina y 10 % Metanol.

Finalizada la transferencia, las membranas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación en una solución bloqueante TBS-T (Tris Buffer Saline Tween 20: 20mM Tris base pH 7.5, 137mM NaCl, y 0.05 % de Tween 20) con un 4 % de BSA (seroalbúmina bovina, SIGMA) para bloquear la unión de los anticuerpos a sitios inespecíficos. Seguidamente se incubaron las membranas con anticuerpo primario (200 µg/ml) diluido en BSA al 4 % en TBS-T durante 1 hora como mínimo y en agitación continua. Se realizaron 2 lavados con TBS-T de 15 minutos cada uno a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente se incuban las membranas con anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa a una dilución 1:10.000 en una solución TBS-T con 2 % leche bloqueante (GE Healthcare), durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Después, se realizaron un par de lavados con TBS-T de 15 minutos cada uno y se detectó la proteína por quimioluminiscencia utilizando el kit ECL™ (Amersham). Las membranas se autorradiografiaron en películas Kónica-Minolta.

Para poder reincubar las membranas con otros anticuerpos, se lavaron con una solución 0,15 M glicina pH 2,5, 0,4 % SDS, durante 15 minutos y posteriormente se lavaron sucesivamente con TBS-T durante tiempos prolongados.

A continuación se adjunta una tabla con los anticuerpos utilizados en este trabajo, tanto para western-blot, como para inmunoprecipitación.

ANTICUERPO	ESPECIFICIDAD	DILUCIÓN	PROCEDENCIA
Anti-Caspasa 3 activa	Monoclonal de conejo	1:1000	5A1E, Cell Signalling
Anti-BRaf	Monoclonal de ratón	1:1000	sc-5284, Santa Cruz
Anti-ERK2	Policlonal de conejo	1:1000	sc-154, Santa Cruz
Anti-ERK2	Monoclonal de ratón	1:1000	sc-1647, Santa Cruz
Anti-pERK	Monoclonal de ratón	1:1000	sc-7383, Santa Cruz
Anti-IQGAP1	Monoclonal de ratón	1:1000	610611, BD Bioscience
Anti-IQGAP2	Monoclonal de ratón	1:1000	sc-17835, Santa Cruz
Anti-KSR2	Policlonal de conejo	1:1000	72753, ABCAM
Anti-Pan-Ras	Monoclonal de ratón	1:1000	Op41-100UG, Calbiochem

Tabla 2. Listado de anticuerpos utilizados, mostrando la especie, dilución utilizada, referencia y casa comercial.

2.2. Análisis de inmunoprecipitación de proteínas

Se lavaron las células con PBS y se lisaron con la solución de lisado: Hepes pH 7.5, 25 mM EGTA, 1mM EDTA, 1mM DTT, 10% glicerol, 0.2% Tween 20, 1 mM ortovanadato, 10 µg/ml apoprotinina, 10 µg/ml leupeptina, 1mM PMSF. Los lisados totales se clarificaron mediante centrifugación a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, tras lo cual se guardaron 40 µl de lisado total ya clarificado y al resto se le añadieron 0,2 µg del anticuerpo necesario para inmunoprecipitar la proteína específica. Se incubaron las muestras con el anticuerpo a 4°C durante 3 horas. Posteriormente, se añadieron 15 µl de proteína Glutathion-Sepharosa 4B (GE Healthcare, 17-0756-01), y se mantuvieron las muestras incubando a 4°C, girando durante 30 minutos. La proteína G-Sepharosa se une a la región F_C de las inmunoglobulinas, lo que permite precipitar los inmunocomplejos por centrifugación durante unos segundos. Estos inmunoprecipitados se lavaron 2 veces con la solución de lisis. Finalmente, se resuspendieron en 25 µl de tampón Laemli 5x y se incubaron 5 minutos a 95°C. Las proteínas resultantes del inmunoprecipitado se resolvieron mediante electroforesis en un gel de acrilamida-SDS, se transfirieron y se expusieron en películas Konica-Minolta.

3. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR

Se sembraron 30.000 células en una placa de 6 pocillos (T6) en medio DMEM con 10% de suero fetal y se contaron las células cada 24 horas durante 4 días empleando una cámara de Neubauer.

4. CUANTIFICACIÓN DE LA APOPTOSIS POR ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA CASPASA 3

Se recogieron las células y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, una vez eliminado el medio de cultivo y lavadas las células con PBS; se procedió a su lisis mediante la adición de 200-500 µl de tampón de lisis de alta astringencia constituido por: 20 mM HEPES pH 7.5, 10 mM EGTA, 40 mM β-glicerolfosfato, 1 % de detergente no iónico NP40, 2.5 mM MgCl₂, 2 mM ortovanadato, 1 mM DTT (ditiotreitól) y extempóreamente, los inhibidores de proteasas: 10 µg/ml apoprotinina y 10 µg/ml leupeptina y se clarificaron los lisados por centrifugación (13000 rpm, 10', 4°C). Por último, se analizó por Western blot la integridad de la proteína indicadora de apoptosis Caspasa 3.

5. ENSAYO DE DESARROLLO TUMORAL EN MEMBRANA CORIOALANTOIDEA (CAM) DE EMBRIÓN DE POLLO

Los huevos fertilizados (Granja Gibert Tarragona, España) se mantuvieron durante 10 días a 38°C en un incubador rotatorio humidificado (con un 60% de humedad). Transcurrido este tiempo, la membrana corioalantoidea (CAM) se desprendió de la cáscara tal y como como describen Zijlstra, A. et al. Posteriormente, se prepararon suspensiones celulares con aproximadamente 1×10^6 células tumorales RKO en 25 μ l de DMEM libre de suero y se inocularon sobre la CAM desprendida. Los embriones se mantuvieron durante 7 días en un incubador estacionario humidificado a 38°C y pasado este periodo los tumores primarios se extirparon y se pesaron.

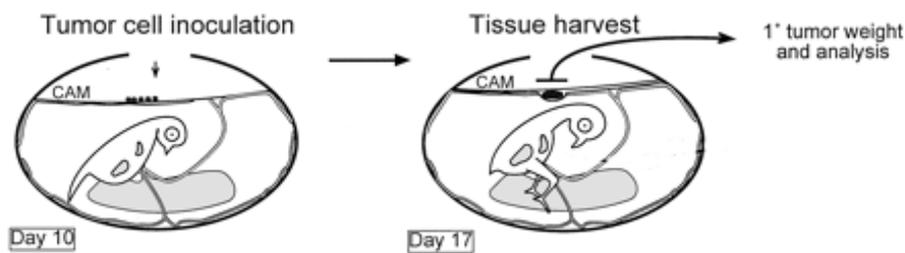


Figura 9. Modelo de desarrollo tumoral en embrión de pollo. En el modelo de desarrollo tumoral, se inoculan células tumorales humanas en la CAM de embriones de pollo en décimo día de desarrollo embrionario y se permite la formación del tumor durante 7 días mediante la incubación a 38°C de los huevos inoculados. En el día embrionario 17, se extirpan los tumores y se pesan (Adaptado de Zijlstra A. et al., 2002).

6. HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS

6.1. Análisis de Western blot

Las películas con los distintos Western blot fueron escaneadas mediante el programa Adobe Photoshop 8.0

6.2. Análisis estadístico y procesamiento de los datos

Todas las cuantificaciones, gráficas, diagramas y diseños presentados en este trabajo se han realizado empleando el software presente en el paquete Microsoft Office 2010 y GraphPad Prism 5.

A menos que se indique lo contrario, se utilizó un test Two-way ANOVA seguido de un post-test de Bonferroni para establecer los valores de P y determinar las diferencias existentes entre los conjuntos de datos experimentales; de ésta forma $P < 0,05$ se considera como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

1. EL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS SCAFFOLD DE ERK1/2 VARÍA EN FUNCIÓN DEL TEJIDO (SANO/TUMORAL) Y DE LAS MUTACIONES EXISTENTES

1.1. Patrón de expresión de las proteínas scaffold de ERK1/2 en tejido colorrectal sano y tumoral

Con anterioridad a mi llegada, en el laboratorio analizó mediante western blot el patrón de expresión de distintas proteínas scaffold de ERK1/2 en tejido sano y tumoral de siete pacientes con cáncer de colón. Esto permitió empezar a demostrar que las diferencias en el uso de las proteínas scaffold podrían ser la base de las divergencias bioquímicas, biológicas y clínicas mostradas por tumores del mismo tipo (es decir, la hipótesis de éste trabajo).

En este caso, se muestra el patrón de expresión de los scaffolds IQGAP1, IQGAP2 y KSR2. Así, tal y como puede verse en la imagen de la izquierda (A) los niveles de expresión de IQGAP1 e IQGAP2 son menores en el tejido tumoral; mientras que los niveles de expresión de KSR2 no siguen un patrón claro y varían en función del paciente (es decir, son mayores en unos tumores y menores en otros).

En la imagen de la derecha (B) se muestra una repetición del análisis de expresión centrándose en el paciente número 3. Así, puede observarse que en éste caso los niveles de expresión IQGAP1 e IQGAP2 son menores en tejido tumoral, mientras que los niveles de KSR2 son mayores en este caso.

(Los lisados de tejido colorrectal sano y tumoral fueron proporcionados por el Dr. Javier León).

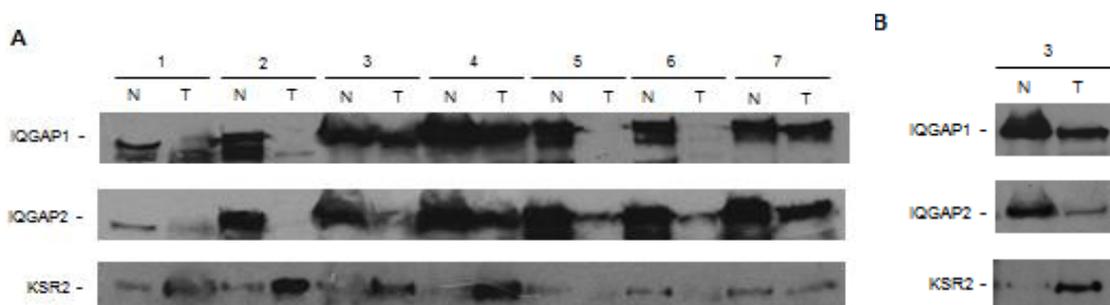


Figura 10. El patrón de expresión de las proteínas scaffold es diferente en tejido colorrectal sano y en tejido tumoral.

A: Western blot de IQGAP1, IQGAP2 y KSR2 en tejido colorrectal humano sano (N) y tumoral (T) de siete pacientes diferentes (1 a 7). Los niveles de expresión de las proteínas scaffold IQGAP1 e IQGAP2 son menores en el tejido tumoral; mientras que los niveles de expresión de KSR2 son mayores en unos tumores y menores en otros.

B: Western blot de IQGAP1, IQGAP2 y KSR2 en tejido colorrectal humano sano (N) y tumoral (T) del paciente número 3. Los niveles de expresión de las proteínas scaffold IQGAP1 e IQGAP2 son menores en el tejido tumoral; mientras que los niveles de expresión de KSR2 son mayores.

(Imágenes cedidas por Ana Herrero Mier)

1.2. Patrón de expresión de IQGAP2 en líneas tumorales colorrectales en función de las mutaciones existentes

Dadas las diferencias de existentes en la expresión de IQGAP2 en el tejido colorrectal tumoral respecto al sano (control); decidieron analizar su expresión en distintas líneas tumorales colorrectales que presentaban distintas alteraciones de la ruta Ras-ERK (mutaciones en B-Raf y K-ras) y compararla con su expresión en tejido colorrectal sano y en células tumorales colorrectales *wild type*.

Tal y como puede verse en la imagen superior (A), los niveles de IQGAP2 son menores en las líneas tumorales colorrectales que presentan mutaciones en B-Raf (si tomamos como control su patrón de expresión en el tejido sano); mientras que dichos niveles son similares en las líneas *wild type*. En el caso de las líneas que presentan mutaciones en K-Ras no puede sacarse ninguna conclusión al respecto, ya que en unos casos la expresión de IQGAP2 está disminuida (respecto el control) y en otros sigue un patrón similar al del tejido sano.

En la tabla inferior (B) se recogen las líneas celulares tumorales colorrectales utilizadas en cada caso.

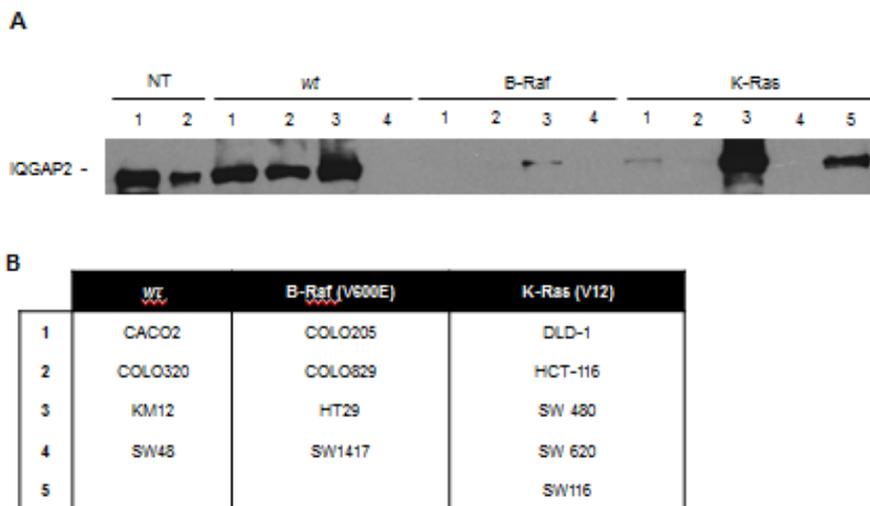


Figura 11. El nivel de expresión de IQGAP2 es menor en las líneas tumorales colorrectales mutadas en B-Raf.

A: Western blot de IQGAP2 en tejido colorrectal humano sano (N), líneas tumorales colorrectales *wild type* (*wt*) y líneas tumorales colorrectales mutadas en B-Raf y K-Ras (B-Raf/K-Ras). Los niveles de expresión de IQGAP2 son menores en las líneas tumorales colorrectales mutadas en B-Raf y similares al control en las líneas tumorales colorrectales *wild type*.

B: Tabla resumen de las células utilizadas. Líneas celulares tumorales colorrectales *wild type* (*wt*): CACO2, COLO320, KM12 y SW48. Líneas celulares tumorales colorrectales mutadas en B-Raf (B-Raf): COLO205, COLO829, HT29 y SW1417. Líneas celulares tumorales colorrectales mutadas en K-Ras (K-Ras): DLD-1, HCT-116, SW480, SW620 y SW116.

(Imágenes cedidas por Ana Herrero Mier)

1.3. Patrón de unión de las proteínas scaffold a ERK1/2 en líneas transfectadas con vectores de expresión para K-Ras y B-Raf

Dadas las diferencias de expresión de IQGAP2 observadas en las distintas líneas celulares; se procedió a transfectar células HEK293T con vectores de expresión para K-Ras y B-Raf e inmunoprecipitar p-ERK con el objetivo de ver si existían diferencias en la unión de los scaffolds de estudio en función de la mutación.

En las imágenes superiores (A y B) se muestran los western blot de expresión de K-Ras y B-Raf tras la trasfección de sus vectores en células HEK293T; observándose una clara sobreexpresión de ambos.

En el panel inferior (C) se muestra una inmunoprecipitación de pERK en células starvadas, estimuladas con EGF y transfectadas con vectores K-Ras y B-Raf; donde posteriormente mediante inmunoblotting se pone de manifiesto la proporción de proteínas scaffold unidas en cada caso.

Sin embargo, tal y como puede verse en la figura, no se observaron diferencias en el patrón de unión de los distintos scaffolds a ERK1/2. Aunque para poder afirmar esto con rotundidad debería repetirse el experimento; ya que como puede observarse en condiciones starvadas (de crecimiento de las células en condiciones de deprivación de suero) se produce la unión de los distintos scaffolds a ERK (cosa que no debería ocurrir en este caso al estar prácticamente inactiva la ruta de señalización). Esto puede ser debido a la unión inespecífica de los anticuerpos a las bolitas de Glutathion-Sepharosa empleadas para inmunoprecipitar; por lo que para descartar este hecho es necesario repetir el experimento con un control negativo (es decir, añadiendo al lisado celular solamente bolitas de Glutathion-Sepharosa).

Por otro lado, los niveles de expresión de ERK2 son similares en todos los casos (incluso en condiciones starvadas). Puesto que esta situación se ha repetido en los experimentos de inmunoprecipitación de algunos de mis compañeros de laboratorio; una posible explicación sería la contaminación con ERK2 de las bolitas de Glutathion-Sepharosa utilizadas para inmunoprecipitar. Por ello, habría de repetirse el experimento empleando gamma-bind nuevas para descartar una contaminación.

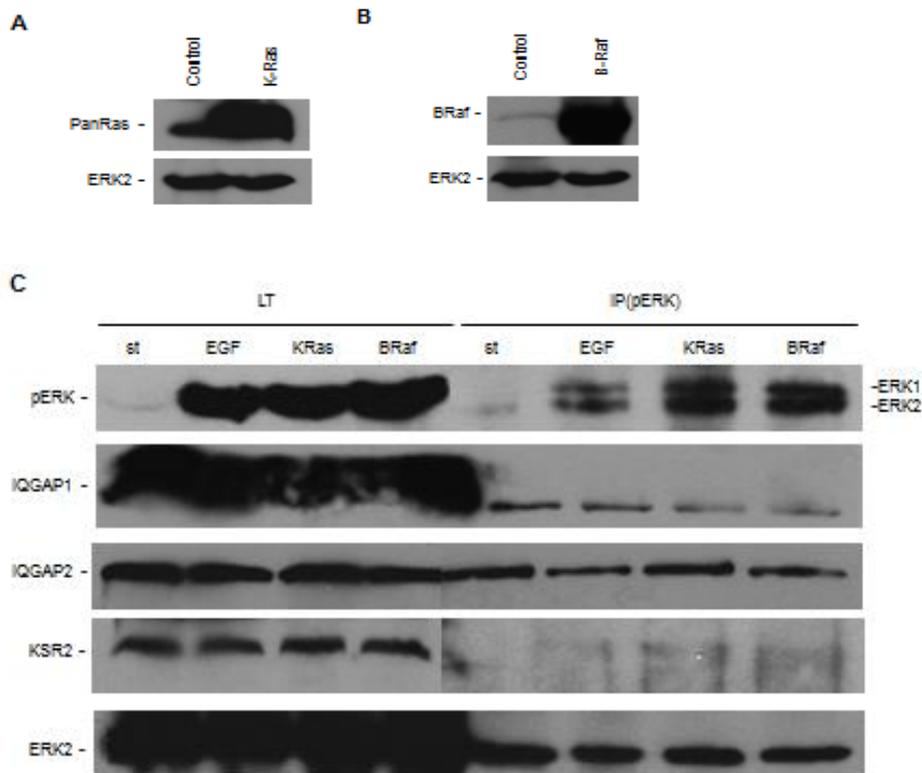


Figura 12. El patrón de unión de las proteínas scaffold a p-ERK en células HEK293T transfectadas con vectores de expresión para k-Ras y B-ras es similar.

A: Western blot para K-Ras y ERK2 en lisados celulares de HEK293T (control) y de HEK293T transfectadas con vectores de expresión para K-Ras (pCEFL HA KRasV12). El nivel de expresión de K-Ras es mayor en las células HEK293T transfectadas que en las células control.

B: Western blot para B-Raf y ERK2 en lisados celulares de HEK293T (control) y de HEK293T transfectadas con vectores de expresión para B-Raf (pCDNA3 FLAG BRafV600E). El nivel de expresión de B-Raf es mayor en las células HEK293T transfectadas que en las células control.

C: Inmunoprecipitación de pERK en células HEK293T (starvadas, estimuladas con EGF y transfectadas con K-Ras/B-Raf). Posteriormente se revelaron los scaffolds asociados (IQGAP1, IQGAP2 y KSR2) por inmunoblotting.

2. EL SILENCIAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS SCAFFOLD IQGAP1, IQGAP2 Y KSR2 INCREMENTA LA TASA DE PROLIFERACIÓN CELULAR

Con el objetivo de identificar las proteínas scaffold esenciales para el mantenimiento del fenotipo oncogénico en líneas celulares que albergan mutaciones en B-Raf se llevaron a cabo ensayos de proliferación celular en condiciones de ausencia, o cantidades disminuidas, de scaffolds. Para ello se transfectaron células RKO con una batería de ARN interferente pequeño (*small interfering RNA* o siRNA) contra algunos scaffolds de la ruta Ras-ERK. El ARN interferente pequeño es una clase de ARN bicatenario con 20 a 25 nucleótidos de longitud altamente específico para la secuencia de nucleótidos de su ARN mensajero diana, uniéndose a él e interfiriendo con la expresión del gen respectivo. Se utilizaron siRNAs contra IQGAP1, IQGAP2 y KSR2; comprobándose mediante western blot que eran eficaces disminuyendo la expresión proteica de sus genes diana (tal y como puede verse en las figuras 13A, 14A y 15A).

La disminución de expresión de las proteínas scaffold (IQGAP1, IQGAP2 y KSR2) dio lugar a un incremento significativo en la tasa de proliferación celular (tal y como puede verse en las representaciones gráficas de las figuras 13B, 14B y 15B).

2.1. El silenciamiento del scaffold IQGAP1 incrementa la tasa de proliferación celular

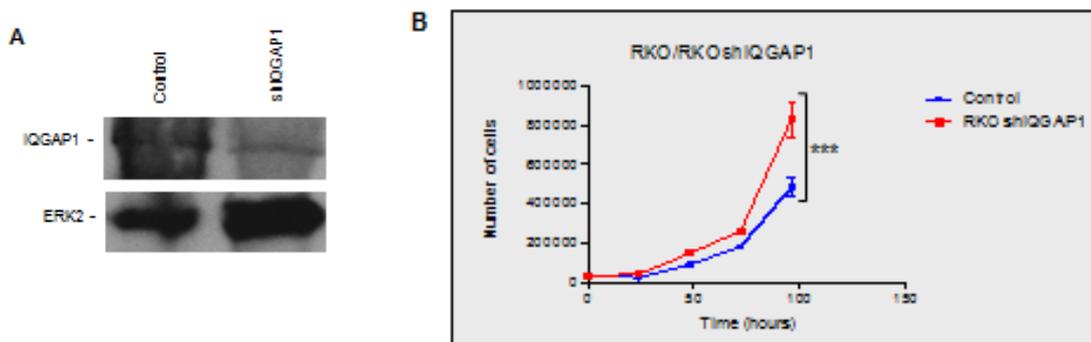


Figura 13. El silenciamiento de IQGAP1 provoca un incremento en la tasa de proliferación celular.

A: Western blot de IQGAP1 y ERK 1/2 total en lisados celulares de RKO (control) y de RKO que tienen silenciada de manera estable la proteína scaffold IQGAP1 (RKO shIQGAP1). Los niveles de expresión de la proteína scaffold IQGAP1 son menores en las células RKO-shIQGAP1 que en las células RKO sin transfectar.

B: Ensayo de proliferación celular *in vitro*. Las células se crecieron durante 96h y se contaron cada 24 horas mediante técnicas estándar de conteo celular (empleando una cámara de Neubauer). El silenciamiento de IQGAP1 promueve una tasa de proliferación mayor en las células RKO-shIQGAP1 en comparación con las células sin transfectar (control). La representación gráfica representa los datos obtenidos en los conteos celulares; expresándose como la media \pm SD (n=2). La significancia del ensayo se determinó mediante un test two-way ANOVA seguido de un post-test de Bonferroni; considerándose ***p<0,001.

2.2. El silenciamiento del scaffold IQGAP2 incrementa la tasa de proliferación celular y su sobreexpresión induce apoptosis

Además de silenciar las proteínas scaffold mediante la transfección de siRNAs; se intentaron establecer sublíneas celulares que sobreexpresasen IQGAP2 de manera estable, con el objetivo de llevar a cabo nuevos ensayos de proliferación y compararlos con aquellos realizados con las células que tenían el scaffold silenciado. Sin embargo, estas células morían; por lo que se realizó un análisis mediante western blot para determinar si la muerte celular se producía por la puesta en marcha de un mecanismo de apoptosis.

A la vista de los resultados representados en la figura 14C, puede afirmarse que la sobreexpresión del scaffold induce apoptosis; ya que se observa una activación de la Caspasa 3 en aquellas células que fueron transfectadas con el vector de expresión de IQGAP2.

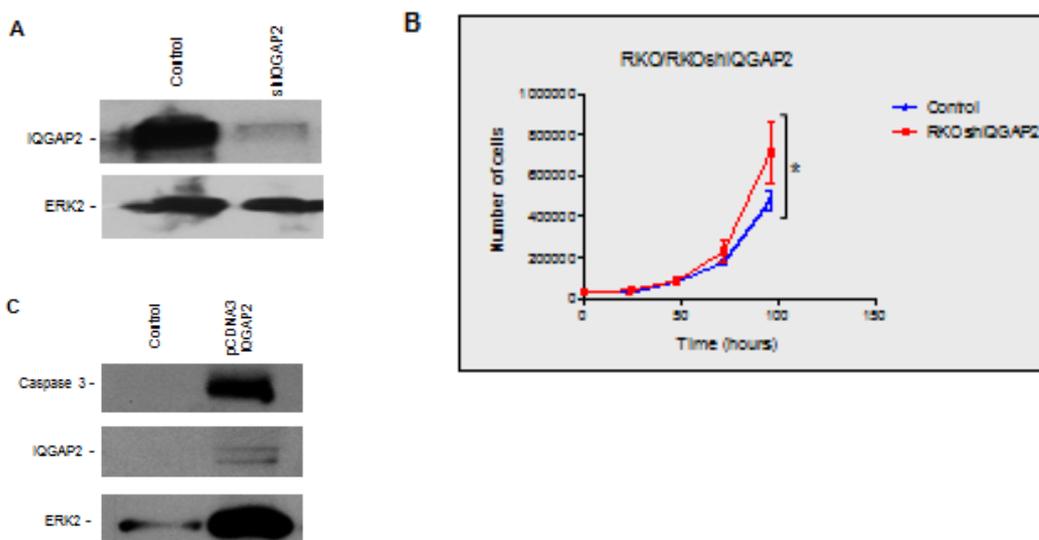


Figura 14. El silenciamiento de IQGAP2 provoca un incremento en la tasa de proliferación celular y su sobreexpresión induce apoptosis.

A: Western blot de IQGAP2 y ERK 1/2 total en lisados celulares de RKO (control) y de RKO que tienen silenciada de manera estable la proteína scaffold IQGAP2 (RKO shIQGAP2). Los niveles de expresión de la proteína scaffold IQGAP2 son menores en las células RKO-shIQGAP2 que en las células RKO sin transfectar.

B: Ensayo de proliferación celular *in vitro*. Las células se crecieron durante 96h y se contaron cada 24 horas mediante técnicas estándar de conteo celular (empleando una cámara de Neubauer). El silenciamiento de IQGAP2 promueve una tasa de proliferación mayor en las células RKO-shIQGAP2 en comparación con las células sin transfectar (control). La representación gráfica representa los datos obtenidos en los conteos celulares; expresándose como la media \pm SD (n=3). La significancia del ensayo se determinó mediante un test two-way ANOVA seguido de un post-test de Bonferroni; considerándose $*p < 0,05$.

C: Western blot de Caspasa 3 activa, IQGAP2 and ERK 1/2 total en lisados celulares de RKO transfectados con pCEFL (control) y pCDNA3 IQGAP2. Los niveles de expresión de la Caspasa 3 activa son mayores en las células RKO transfectadas con pCDNA3 IQGAP2 que en las células control.

2.3. El silenciamiento del scaffold KSR2 incrementa la tasa de proliferación celular

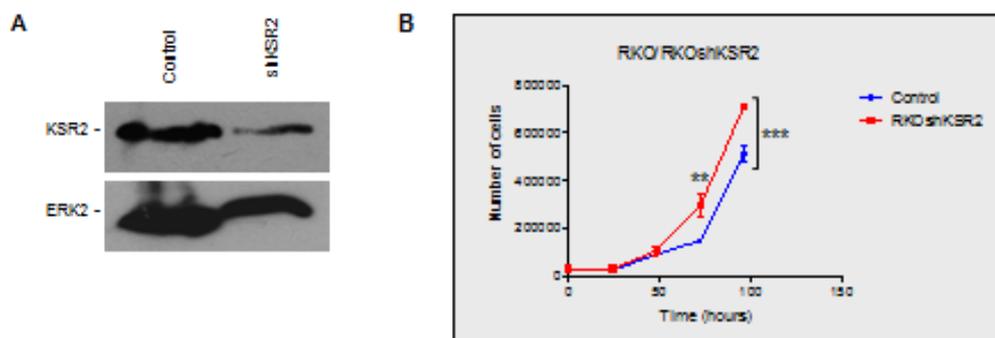


Figura 15. El silenciamiento de KSR2 provoca un incremento en la tasa de proliferación celular.

A: Western blot de KSR2 y ERK 1/2 total en lisados celulares de RKO (control) y de RKO que tienen silenciada de manera estable la proteína scaffold KSR2 (RKO shKSR2). Los niveles de expresión de la proteína scaffold KSR2 son menores en las células RKO-shKSR2 que en las células RKO sin transfectar. B: Ensayo de proliferación celular *in vitro*. Las células se crecieron durante 96h y se contaron cada 24 horas mediante técnicas estándar de conteo celular (empleando una cámara de Neubauer). El silenciamiento de KSR2 promueve una tasa de proliferación mayor en las células RKO-shKSR2 en comparación con las células sin transfectar (control). La representación gráfica representa los datos obtenidos en los conteos celulares; expresándose como la media \pm SD (n=2). La significancia del ensayo se determinó mediante un test two-way ANOVA seguido de un post-test de Bonferroni; considerándose *** $p < 0,001$ y ** $p < 0,001$.

2.4 Ensayo de desarrollo tumoral en CAM de embriones de pollo

Por último, para ver si estas diferencias observadas en la proliferación celular se mantenían *in vivo*, se llevó a cabo un ensayo de desarrollo tumoral en la membrana corioalantoidea (CAM) de embriones de pollo. Para ello, se inocularon sobre la membrana corioalantoidea 25 μ l de una suspensión celular que contenía alrededor de 1×10^6 células RKO (control) y RKO con el scaffold IQGAP2 silenciado (RKO shIQGAP2). Una vez transcurridos 10 días se extrajeron los tumores primarios desarrollados y se pesaron para determinar si existían diferencias en su tamaño.

Así, en las representaciones gráficas de la figura 16B se muestran las diferencias de tamaño existentes entre los embriones inoculados con células RKO (Control) y aquellos que fueron inoculados con células RKO que tenían IQGAP2 silenciado (shIQGAP2); siendo mayores en éste último caso. Sin embargo, estas diferencias no son significativas, por lo que para poder hacer esta afirmación con rotundidad habría que repetir el experimento con un mayor número de muestras.

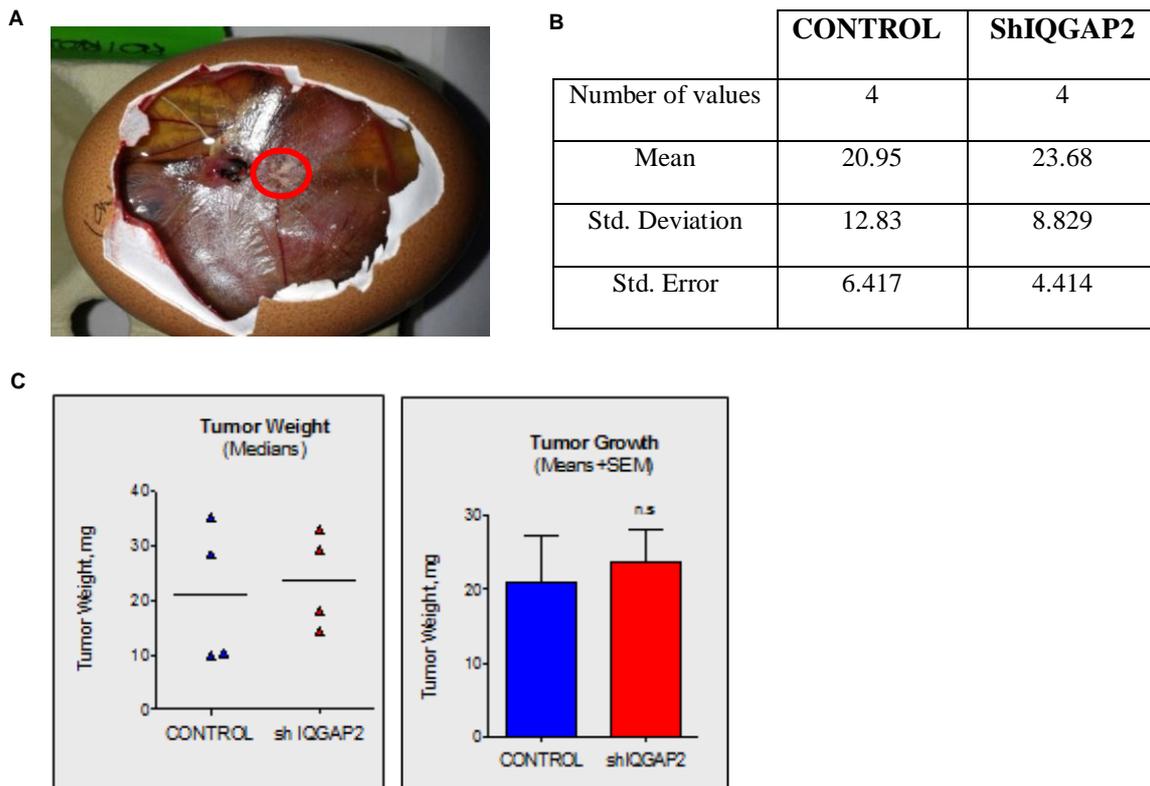


Figura 16. Ensayo de desarrollo tumoral en CAM de embriones de pollo.

A: Fotografía en la que se indica con un círculo rojo el tumor desarrollado en la membrana corioalantoidea 10 días después de la inoculación. Posteriormente, los tumores primarios se extirparon y se pesaron.

B: Tabla en la que se representan los valores estadísticos obtenidos tras el pesaje de los tumores primarios extirpados.

C: Representación gráfica de los datos obtenidos en los pesajes de los tumores; la mediana se muestra en la figura de la izquierda y la media \pm SD en la imagen de la derecha ($n=1$). La significancia del ensayo se determinó mediante un test two-way ANOVA seguido de un post-test de Bonferroni; considerándose $p>0,05$ como no significativo (n.s).

En un futuro, podría resultar interesante determinar si existen diferencias en la capacidad metastásica de estas células. Por ello, se extrajeron y congelaron el hígado y la membrana corioalantoidea distal de los embriones inoculados; con la finalidad de analizar mediante qPCR la proporción de células humanas existente.

DISCUSIÓN

La ruta de señalización Ras-ERK está constituida por una cascada de MAP quinasas y desempeña papeles muy importantes en la regulación de procesos celulares clave como la proliferación, la diferenciación, la apoptosis o la transformación oncogénica. La gran variedad de respuestas que genera esta ruta, muchas de ellas opuestas, implican la utilización de mecanismos de regulación precisos para conferir especificidad a esta ruta. Por ello, la formación de complejos multiproteicos con proteínas scaffold se ha mostrado como una vía muy interesante para regular la organización espacial de estas quinasas y de sus sustratos, proporcionando especificidad de respuesta a esta ruta (Kolch *et al.*, 2005).

En este trabajo se ha continuado con la caracterización de los mecanismos de regulación de la ruta Ras-ERK por las proteínas scaffold. Así, se ha visto que el patrón de expresión de estas proteínas varía en función del tejido (tumoral/sano) y de las mutaciones existentes. Atendiendo al tipo de tejido, existe un patrón de expresión diferencial de las proteínas scaffold IQGAP1 e IQGAP2, siendo menor en el tejido colorrectal tumoral respecto al tejido control sano; mientras que en el caso de KSR2 la expresión resulta mayor en unos casos y menor en otros (no pudiendo establecerse un esquema de expresión).

Centrándonos en el tipo de lesión oncogénica dentro de la vía Ras-ERK, cabe destacar una expresión disminuida del scaffold IQGAP2 en líneas celulares tumorales colorrectales portadoras de mutaciones en B-Raf. Sin embargo, no se encontraron diferencias de expresión respecto al control (líneas tumorales colorrectales *wild type* y tejido colorrectal sano) en las líneas portadoras de mutaciones en K-Ras estudiadas.

En consonancia con todo esto, al reducir la concentración de las proteínas scaffold de estudio (IQGAP1, IQGAP2 y KSR2) en células tumorales colorrectales mediante el uso de siRNAs, se producía un incremento en la tasa de proliferación; demostrándose la influencia de estos scaffolds en la modulación de la ruta de señalización Ras-ERK.

En otros estudios también se ha observado una alteración en los niveles de expresión de los genes IQGAP y sus mRNAs en la neoplasia (White, D.C., *et al.*, 2009). Sin embargo, en estos casos IQGAP1 frecuentemente se encuentra sobreexpresado; mientras que la expresión de IQGAP2 está disminuida. De hecho, IQGAP1 se ha propuesto como un oncogén; mientras que poco se ha publicado en relación con la expresión de IQGAP2 en neoplasia, aunque estudios recientes postulan un papel para IQGAP2 como un supresor tumoral (Jin, S. H., *et al.*, 2008).

En este trabajo se ha visto que la expresión de las proteínas scaffold IQGAP1 e IQGAP2 se encuentra disminuida en el tejido tumoral (más concretamente en el tejido colorrectal tumoral) y que induciendo una disminución en su expresión se incrementa la tasa proliferativa de células tumorales colorrectales; por lo que en este caso ambos estarían actuando como supresores tumorales. Aunque se haya propuesto al scaffold IQGAP1 como un oncogén dada su

expresión tisular ubicua, pudiera ocurrir que en función del tejido ejerza una función promotora de la proliferación celular o la contraria; por lo que es necesario continuar con esta vía de estudio.

A modo de conclusión resaltar las evidencias acumuladas que implican a las proteínas scaffold en cáncer; de forma que además de presentar niveles alterados en los tumores, estas proteínas parecen contribuir a la tumorigénesis. Además, la implicación de muchas proteínas de unión a IQGAP y KSR en múltiples etapas de la transformación neoplásica y la metástasis, junto con la participación de estas proteínas scaffold en diversas vías de señalización que se encuentran desreguladas en el cáncer (como la ruta Ras-ERK), hacen de ellas objetivos conceptualmente atractivos como quimioterapéuticos. Por todo ello, es necesario seguir trabajando para determinar los mecanismos moleculares por los cuales la expresión de estas proteínas scaffold se encuentra alterada en la neoplasia.

CONCLUSIONES

Como conclusión del trabajo realizado, puede decirse que:

1. El patrón de expresión de las proteínas scaffold de ERK1/2 es diferente en tejido colorrectal sano y tumoral. Así, mientras la expresión de las proteínas IQGAP1 e IQGAP2 es menor en el tejido tumoral; los niveles de expresión de KSR2 varían en función del paciente (es decir, en unos tumores son más altos y más bajos en otros).
2. Los niveles de expresión de la proteína IQGAP2 son menores en líneas tumorales colorrectales que portan mutaciones en B-Raf.
3. El patrón de expresión de las proteínas scaffold de ERK1/2 son similares en las células estimuladas con EGF y en las transfectadas con K-Ras y B-Raf. Aunque como se dijo anteriormente, hay que repetir el experimento para poder hacer esta afirmación con seguridad.
4. El silenciamiento de las proteínas scaffold IQGAP1, IQGAP2 y KSR provoca un incremento de la proliferación celular en RKO.
5. La sobreexpresión de IQGAP2 induce apoptosis en RKO.
6. Los tumores desarrollados en la membrana corialantoidea de los embriones de pollo son mayores en el caso de aquellos que fueron inoculados con células RKO que tenían silenciado IQGAP2. Pero estas diferencias no son significativas, por lo que habría que repetir el experimento con un mayor número de muestras para poder hacer esta afirmación con rotundidad.

PERSPECTIVAS FUTURAS

En cuanto a los abordajes que queremos llevar a cabo en un futuro próximo para tratar de esclarecer el papel de las proteínas scaffold en la ruta Ras-ERK cabe destacar:

1. El genotipado de los tumores colorrectales analizados para determinar si son *wild type* o presentan mutaciones en K-Ras o B-Raf. Esto podría ayudar a establecer un patrón de expresión de los scaffolds de ERK1/2 en función de la presencia/ausencia de estas mutaciones.
2. Realizar nuevos ensayos de proliferación celular con células tumorales colorrectales *wild type* y mutadas en K-Ras que tengan silenciado de manera estable IQGAP1, IQGAP2 o KSR2. Esto permitirá realizar una comparación con los ensayos realizados en células RKO (mutadas en B-Raf) y establecer si estos scaffolds promueven o atenúan el fenotipo oncogénico.
3. Desarrollar sublíneas que sobreexpresen de manera estable IQGAP1, IQGAP2 y KSR2 con el fin de realizar ensayos de proliferación y compararlos con aquellos obtenidos para las sublíneas que tienen estos scaffolds silenciados (RKO IQGAP1^{-/-}, RKO IQGAP2^{-/-} y RKO KSR2^{-/-}).
4. Inocular nuevos huevos fertilizados con suspensiones de células control (RKO) y de células que tienen IQGAP2 silenciado (RKO IQGAP2^{-/-}); con el objetivo de determinar si aumentando el número de muestras existen diferencias significativas en el tamaño de los tumores que inducen. Y en tal caso, hacer el mismo tipo de ensayo para el resto de sublíneas desarrolladas con otros scaffolds silenciados (RKO IQGAP1^{-/-} y RKO KSR2^{-/-}).
5. Analizar si existen metástasis en otros tejidos del pollo (principalmente en el hígado y la membrana corioalantoidea distal); con el fin de comparar la capacidad metastásica de las células control (RKO) y de aquellas que tenían IQGAP2 silenciado (RKO IQGAP2^{-/-}). Para detectar la existencia/ausencia de metástasis, se realizarán qPCR que permitan comparar la proporción de células humanas con respecto a las células de pollo existentes.
6. Desarrollar células RKO mutantes para el dominio WW de IQGAP2; de manera que la interacción IQGAP2-ERK1/2 se verá impedida. Mediante esta aproximación podrá determinarse si éste es el mecanismo por el que la ausencia de IQGAP2 (en las sublíneas RKO IQGAP2^{-/-}) promueve la proliferación celular.

BIBLIOGRAFÍA

- Aoki, Y., Niihori, T., Narumi, Y., Kure, S., and Matsubara, Y. (2008). The RAS/MAPK syndromes: novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders. *Hum Mutat.* 29, 992-1006.
- Bradford, C. H. (1975). Countway happenings. John Warren. *N Engl J Med.* 292, 1283-1284.
- Briggs, W. M., and Sacks, B. D. (2003). IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation. *EMBO Rep.* 4(6), 571-574.
- Bromberg-White, J. L., Andersen, N. J., and Duesbery, N. S. (2012). MEK genomics in development and disease. *Briefings in functional genomics* 11 (4), 300-310.
- Eblen, S. T., Slack-Davis, J. K., Tarcsafalvi, A., Parsons, J. T., Weber, M. J., and Catling, A. D. (2004). Mitogen-activated protein kinase feedback phosphorylation regulates MEK1 complex formation and activation during cellular adhesion. *Mol Cell Biol.* 24(6), 2308-2317.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). The hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 144, 646–674.
- Jin, S. H., Akiyama, Y., Fukamachi, H., Yanagihara, K., Akashim, T., and Yuasa, Y. (2008). IQGAP2 inactivation through aberrant promoter methylation and promotion of invasion in gastric cancer cells. *Int J Cancer* 122, 1040–1046.
- Kolch, W. (2005). Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6, 827-837.
- Kortum, R. L., Johnson, H. J., Costanzo, D. L., Volle, D. J., Razidlo, G. L., Fusello, A. M., Shaw, A. S., and Lewis, R. E. (2006). The molecular scaffold kinase suppressor of Ras 1 is a modifier of RasV12-induced and replicative senescence. *Mol Cell Biol.* 26, 2202-2214.
- Leicht, D. T., Balan, V., Kaplun, A., Singh-Gupta, V., Kaplun, L., Dobson, M., and Tzivion, G. (2007). Raf kinases: Function, regulation and role in human cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1773, 1196–1212.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer.* 3, 459–465.
- Meister, M., Tomascovic, A., Banning, A., and Tikkanen, R. (2013). Mitogen-activated protein (MAP) kinase scaffolding proteins: A recount. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 4854-4884.
- Michaud, N. R., Therrien, M., Cacace, A., Edsall, L. C., Spiegel, S., Rubin, G. M., and Morrison, D. K. (1997). KSR stimulates Raf-1 activity in a kinase-independent manner. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94, 12792–12796.

- Nguyen, A., Burack, W. R., Stock, J. L., Kortum, R., Chaika, O.V., Afkarian, M., Muller W. J., Murphy K. M., Morrison, D. K., Lewis, R. E., McNeish, J. and Shaw, A. S. (2002). Kinase suppressor of Ras (KSR) is a scaffold which facilitates mitogen-activated protein kinase activation in vivo. *Mol Cell Biol.* 22, 3035–3045.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M. H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 22 (2), 153-183.
- Prior, A. I., and Hancock, J. F. (2012). Ras trafficking, localization and compartmentalized signaling. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23 (2), 145-153.
- Roskoski, R. (2012). ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research* 66, 105–143.
- Schreck, R., and Rapp, U. R. (2006). Raf kinases: oncogenesis and drug discovery. *Int J Cancer* 119, 2261-2271.
- Seger, R., and Krebs, E. G. (1995). The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 9, 726-735.
- White, C., Brown, D., and Sacks, D. (2009). IQGAPs in cancer: A family of scaffold proteins underlying tumorigenesis. *FEBS Lett.* 583 (12), 1817-1824.
- Yoon, S., and Seger, R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24, 21-44.
- Zijlstra, A., Mellor, R., Panazarella, G., Aimes, R. T., Marchenko, N. D., and Quigley, J. (2002). A quantitative analysis of rate-limiting steps in the metastatic cascade using human-specific real-time polymerase chain reaction. *Cancer Res.* 62, 7083–92.

