

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Biología Molecular



**Especificidad espacio temporal de
las señales Ras-ERK en la
determinación de respuestas
biológicas**

Tesis Doctoral presentada por
Ana Herrero Mier
para optar al grado de Doctor en Bioquímica
por la Universidad de Cantabria
Diciembre 2012
Santander

D. PIERO CRESPO BARAJA, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en el Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC) asociado al Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria y Tutor de esta Tesis

CERTIFICA:

Que Ana Herrero Mier ha realizado bajo su dirección el presente trabajo de Tesis Doctoral titulado:

**ESPECIFICIDAD ESPACIO TEMPORAL DE LAS SEÑALES Ras-ERK
EN LA DETERMINACIÓN DE RESPUESTAS BIOLÓGICAS**

Que considera que dicho trabajo se encuentra terminado y reúne los requisitos necesarios para su presentación como Memoria de Doctorado al objeto de poder optar al grado de Doctor en Bioquímica.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, expide el presente certificado en Santander, en Diciembre de 2012.

Fdo. Piero Crespo Baraja

El presente trabajo ha sido realizado en el
Departamento de Biología Molecular
de la Facultad de Medicina de la Universidad de
Cantabria, desde el año 2007 hasta 2012.

El autor de esta Tesis ha disfrutado de una beca de
Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio
de Educación durante el período de realización de la misma.

*Para mis padres
Para mi hermano*

AGRADECIMIENTOS

Lo primero que aparece en la tesis, y lo último en ser escrito, pero no siempre lo urgente es lo importante. Y aunque aquellas personas que realmente son importantes para mi día a día no necesitan que se lo recuerde, deben estar presentes en este trabajo, ya que en parte ha sido gracias a ellos:

Al Dr. Piero Crespo, por darme la oportunidad de formar parte de su grupo, por depositar su confianza en mi y obligarme poco a poco a ser cada vez mejor en mi trabajo. Por las ideas, reflexiones y discusiones que sin duda me han enseñado a mejorar día a día.

Thanks to Walter Kolch's group, which gave me the opportunity to stay there, and to learn a little more. Especially, thanks to Alex for teaching me, and David, for making my stay more enjoyable. I'll see you.

A todo el Departamento de Biología Molecular, desde los jefes de grupo hasta los becarios y técnicos, todos en algún momento han aportado algo, aunque sólo haya sido una sonrisa en un cruce de pasillos, esos pequeños detalles que pueden mejorar el día. Por no hablar de los favores que he tenido que pedir a lo largo de estos años, y que siempre han sido bien recibidos.

Sobre todo al laboratorio de Bioquímica, no sé que haríamos sin vosotros. Una mención especial al Dr. Javier León, la Dra. Dolores Delgado, y Dr. Jose Carlos Rodríguez, que me han dado siempre la confianza de poder entrar en su laboratorio casi como si fuera el mío. Y sobre todo agradecerles el hecho de permitir que su grupo haya estado y esté formado por personas tan especiales. Los que ya han terminado pero siempre recordaré, porque me ayudaron a sentirme más cómoda en mis comienzos: Manu, Juan y sobre todo a Gabi, por aquellos trayectos compartidos, porque 90 kilómetros diarios daban para hablar de todo, y porque creo que eres grande, que te mereces lo mejor y estoy convencida de que lo tendrás. Y a la nueva generación, que chicas más majas: Mari Carmen, aún sabiendo tu nombre siempre serás la Maña, eso sí, con mayúsculas porque eres genial, a María, sí, ya lo sé, siempre estoy pidiendo, cualquier excusa es buena para echar una parlada... a Andrea, por fin salió la senescencia, espero que te vaya todo bien, ánimo, a Fonso que si verde, rojo o azul... la historia era pedir os opinión, a Javi por las sentadas a la entrada después de comer, tantas conversaciones y al final no arreglamos el mundo, y a Lucía que espero que jamás borres la sonrisa, aún recuerdo el día que te conocí y pensé "que niña más sosa" y qué equivocada estaba. Y al resto de personal, a Rosa y Pilar que siempre echan una mano si lo he necesitado. A todos ellos, gracias!

A nuestros vecinos de laboratorio, creo que no ha pasado ni un solo día sin que haya tenido que cruzar vuestra puerta, aunque fuera para calentar leche en vuestro microondas! A Natalia, Iván y sobre todo a María que en más de una ocasión nos ha echado un cable, a Maigüi, ya no queda nada, mucho ánimo, a ver si coincidimos para celebrarlo juntas, a Marcos que compartí contigo el viaje que más me ha marcado y eso jamás lo olvidaré, a Jorge porque nunca voy a olvidar a mi compi de cursos de doctorado, empezamos juntos la tesis y casi la terminamos al tiempo, mucho ánimo!!, a Fer mucha suerte en lo que queda, seguro que sale todo bien, a Thais, Juanje y Pilar, que aunque llegaron más tarde no son menos importantes, siempre es agradable que los "nuevos" también sean de ayuda.

Al laboratorio de Farma, porque siempre soy bien recibida, aunque sea cuando voy a pedir! A las chicas, Helena, Rebeca, Ali, Vero y sobre todo a Bea que últimamente no hago más que cogerte TG, lo recompensaré. A Pepi, por los chocolates, los caramelos y los consejos, y por escuchar mis lamentos de vez en cuando. A Fuencis, por los

momentos dentro y fuera de la facultad, espero que todo te salga bien. A Elsa, algún día terminaremos el paper y saldrá el Ras! Y sobre todo a Re, por ocuparse de los ratoncicos, tan bien como lo hace, merecerá la pena! Por ayudarme con la estadística, por recibirme en vuestra casa sin ningún problema hace tres años, y por hacerme sentir una más en vuestro grupo. Estoy segura que todo saldrá bien porque lo mereces!

A la parte de Genética-Micro-Matxalen-Zabala: sois muchos como para nombraros a todos, y tengo miedo de olvidarme a alguien! Gracias a Val, por sus visitas, aunque sean para ver a Pau pero siempre se agradece la visita, que paciencia tienes majo!! Gracias a Esther, porque eres un encanto, siempre dispuesta para echar una mano, piensa que a lo mejor nos plantamos de visita cuando estés ya con el postdoc.

A los del piso de arriba: Nacho, te acuerdas las risas del frigo-mono? Ojalá todo vaya bien! A Lolo, salieron los wb y ahora sólo queda escribir, estancia y defender, ya casi lo tienes! Suerte! A María Rissoto, no coincidimos mucho pero te agradezco tu naturalidad, no cambies! Y apoya mucho a Pau ahora!! Y a la gente del labo de Lafarga y de Marian Ros, sobre todo a Patri, mi vecina, ánimo con la tesis, y con el agua en el edificio!!

A las chicas de la limpieza!! Raquel y Loli, que animan con sus historias, hay conversaciones que son para recordar. Raquel recuerda que somos tu labo favorito, y que yo tengo una estrella de limpieza! Gracias!

A la parte más importante, las personas con las que he convivido seis años, muchas horas juntos para crear lazos, y conoceros en profundidad, cuando se trabaja codo con codo se llega a conocer a la gente en todas sus facetas. A Fer, que te deseo lo mejor, aunque sé que lo tendrás porque vales mucho, sé que seguiremos en contacto! A Berta, otra vez de vuelta, la primera tesis a la que fui fue la tuya, y mira tú por donde aquí está la mía! Mucha suerte! A Lore, gracias por invertir parte de tu tiempo en mis comienzos, seis años después aquí están las curvas! A Pinto, mi compañero de poyata, vales mucho y sé que te irá todo muy bien, aún recuerdo la primera vez que os vi y pensé que seguro que me iba a llevar una buena amistad. A Javi, volveremos a ser compañeros de trabajo y seguiré sorprendiéndome de lo mucho que vales. A Paulica, después de ser compañeras de clase tuvimos que esperar a trabajar juntas para conocernos, gracias por ser mi compañera de viajes, por tantas conversaciones en todo este tiempo, y sobre todo por ser mi apoyo este año, no lo olvidaré nunca, gracias a ti ha sido todo más fácil. Ánimo, que cuando te quieras dar cuenta estás terminando, y verás cuantos éxitos! Vendré de visita y por supuesto a tu tesis, lo prometo! A Iñaky, que por fin empiezas!! Vendrá bien un sople de aire fresco en el labo, pórtate bien, y trabaja mucho, verás como va a merecer la pena la espera. A Rocío, por ser tan buena “alumna” para tan mala “profesora”, en nada no necesitarás explicaciones! A Jabo, visita fugaz pero como dejaste huella... Gracias por regalarnos un mes de tu humor. Algún día te haremos otra visita!! Y aunque ya no esté en el labo, gracias a Chipi, porque fueron muchas risas y muchos momentos, es difícil que volvamos a coincidir en el mismo labo pero me llevo un recuerdo de ti inmejorable! Cuídate mucho Puchi!!

A mis amigos, a cada uno de ellos que en un momento u otro me han ayudado durante estos años, salir del trabajo y desconectar siempre es importante. Pero sobre todo a mi hermana Mery, con quien compartí tanto durante la carrera, que me enseñó a ser mejor persona, y a ver la vida más fácil. Que aunque no hablemos mucho siempre estás presente. Y al pequeño Bruno que ha tenido la suerte de tener a una madre muy generosa, y va a ser muy feliz con sus papis.

Y por supuesto, gracias a mi Javi, es lo mejor que me llevo de esta etapa, gracias por ayudarme, gracias por darme la fuerza que a veces no tengo, lo que hace que esta tesis en parte sea tuya, gracias por estar siempre a mi lado a pesar de la distancia, gracias por comprenderme, y sobre todo gracias por quererme. Eres lo mejor que nunca

imaginé y seguiremos nuestro camino juntos porque... son pocas las veces que ocurre, a veces una no más en toda una vida, en que alguien se cruza en tu camino, y sin pretenderlo, se viste con la forma de un *para siempre*.

Gracias, un millón de gracias, a mi familia, a quien dedico este trabajo, porque ellos han dedicado su trabajo, su esfuerzo y su cariño a mi en muchas ocasiones. Gracias porque sé que vosotros siempre me apoyáis, y queréis lo mejor para mi. Gracias, porque sin vuestro apoyo no lo hubiera conseguido, así que esta tesis es para mi madre, mi padre y mi hermano, que os quiero. Gracias a mi madre porque tus consejos siempre son los mejores, y por confiar en mí. Gracias a mi padre porque siempre ha sido un ejemplo de responsabilidad y trabajo. Gracias a mi hermano, por demostrarme que hay que vivir la vida y ser feliz. Y gracias a los tres por quererme como soy y por apoyarme estos años. Y aunque en breve estaré un poco más lejos, sabéis que estaré siempre a vuestro lado, y eso es lo importante. Y a los que ya no están pero siguen presentes, que sé que se sentirían orgullosos de mi igual que yo lo estoy de ellos.

i. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

i. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

| | |
|-------------------|--|
| 4OH-TMX | 4-Hidroxitamoxifeno |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| AP1 | Proteína activadora 1 |
| Arg (A) | Arginina |
| ATF2 | <i>Activating transcription factor 2</i> |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| BSA | Albúmina de suero bovino |
| CAAX | Secuencia de aminoácidos: Cisteína-Alifático-Alifático-Cualquiera |
| cAMP | Adenosina monofosfato cíclico |
| CD | <i>Common docking</i> . Sitio común de unión presente en MAPK |
| CDK | <i>Cycline dependent kinase</i> o quinasa dependiente de ciclinas |
| cDNA | DNA complementario |
| CS | Suero de ternera |
| C-terminal | Carboxilo-terminal |
| Cys (C) | Cisteína |
| D domain | Región de los sustratos de MAPK que interacciona con el dominio CD |
| DAG | Diacilglicerol |
| DBP | <i>DEF binding pocket</i> . Motivo de MAPKs, que interacciona con DEF |
| DEF | <i>Docking site for ERK FXF</i> . Región presente en algunos sustratos de MAPK |
| DMEM | Medio esencial mínimo de Eagle, modificado por Dulbecco/Vogt |

| | |
|----------------|---|
| DMSO | Dimetil sulfóxido |
| DTT | Dithiothreitol |
| DUSPs | Fosfatasas de especificidad dual |
| ECL | Quimioluminiscencia ampliada |
| ED | <i>Exchange docking site</i> . Región de MAPK implicada en la interacción con distintos sustratos |
| EDTA | N´N´N´N´-Etilen-diamino tetra- acetato disódico |
| EGTA | <i>Ethylene glicol tetraacetic acid</i> |
| EGF | Factor de crecimiento epidérmico |
| EGFR | Receptor del factor de crecimiento epidérmico |
| ERK | <i>Extracellular regulated kinase</i> |
| Elk1 | <i>ETS (E-twenty six) like gene 1</i> |
| G418 | Geneticina |
| GAP | Proteínas activadoras de la actividad GTPasa |
| GDP | Nucleótido bifosfato de guanina |
| GEF | Factor de intercambio de nucleótidos |
| Gln (Q) | Glutamina |
| Glu (E) | Ácido Glutámico |
| Gly (G) | Glicina |
| GPCR | Receptor acoplado a proteína G |
| Grb2 | Proteína de unión a receptores de factores de crecimiento |
| GRF | <i>Guanine nucleotide releasing factor</i> |
| GRP | <i>Guanyl releasing factor</i> |
| GST | <i>Glutathione S-transferase</i> |
| GTP | Nucleótido trifosfato de guanina |

| | |
|----------------------|---|
| GTPasa | Proteína con capacidad intrínseca de catalizar la hidrólisis de GTP |
| HA | Hemaglutinina |
| HGF | Factor de crecimiento de hepatocitos |
| His (H) | Histidina |
| H/N -/- | Mefs o ratones sin expresión de HRas ni NRas |
| HRG/NRG | Heregulina |
| HSF1 | <i>Heat shock transcription factor 1</i> |
| HVR | Región hipervariable de Ras |
| Iso (I) | Isoleucina |
| JNK | Quinasa amino-terminal de c-Jun |
| kb | Kilobase |
| kDa | Kilodalton |
| KO | <i>Knockout</i> |
| KSR | <i>Kinase supressor of Ras</i> |
| Leu (L) | Leucina |
| LB | Medio de Luria-Bertani |
| LPA | Ácido lisofosfatídico |
| LT | Lisado total |
| mA | mili-Amperios |
| MAPK (MK) | Proteína quinasa activada por mitógenos |
| MAPKK (MKK) | Quinasa que fosforila MAPK |
| MAPKKK (MKKK) | Quinasa que fosforila MAPKK |
| MAPKAPK | Sustratos de MAPKs que a su vez son MAPK |
| MEK | Quinasa de MAPK/ERK |
| MEF | Fibroblasto embrionario de ratón |

| | |
|-------------------|---|
| MKPs | Fosfatasa inhibidora de las MAPKs |
| MP1 | Proteína <i>scaffold</i> : <i>MEK partner 1</i> |
| N-terminal | Amino-terminal |
| NES | Señal de exportación nuclear |
| NF1 | Neurofibromina 1 |
| NGF | <i>Nerve Growth Factor</i> o Factor de crecimiento nervioso |
| NLS | Señal de localización nuclear |
| NP-40 | <i>Nonidet-40</i> |
| PAK1 | <i>p21 activated kinase</i> |
| PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida |
| pb | Par de bases (de nucleótidos) |
| PBS | Solución salina tamponada de fosfato |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PD | <i>Pull down</i> |
| PDGF | <i>Platelet derived growth factor</i> o Factor de crecimiento derivado de plaquetas |
| Phe (F) | Fenilalanina |
| PI3K | Fosfatidil-inositol 3 quinasa |
| PKA | Proteína quinasa dependiente de AMP cíclico |
| PKC | Proteína quinasa C |
| PLC | Fosfolipasa C |
| Pro (P) | Prolina |
| PTPs | Tirosin fosfatasas |
| RBD | <i>Ras Binding Domain</i> o dominio de unión a Ras |
| rpm | Revoluciones por minuto |

| | |
|----------------|--|
| RSK | Quinasas que fosforilan a la proteína ribosomal S6 |
| RTK | Receptores con actividad tirosina quinasa |
| S/T PPs | Serin/Treonin fosfatasas |
| SDS | Dodecil sulfato sódico |
| Ser (S) | Serina |
| Sef | <i>Similar expression of FGF protein</i> |
| SF | Suero fetal bovino |
| SH2 | <i>Src homology 2</i> |
| Sos | <i>Son of sevenless</i> |
| ST | <i>Starved</i> (privación de suero) |
| STAT3 | <i>Signal transducer and activator transcription 3</i> |
| TAE | <i>Tris-acetate-EDTA</i> |
| TBS-T | Salino tamponado con Tris-Tween |
| Thr (T) | Treonina |
| Tm | Temperatura <i>melting</i> o unión de oligonucleotidos |
| TPA | 2-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate |
| Tyr (Y) | Tirosina |
| UV | Ultravioleta |
| V | Voltios |
| V12 | Formas constitutivamente activas de Ras |
| Val | Valina |
| VEGF | Factor de crecimiento endotelial vascular |
| WB | <i>Western blot</i> |
| wt | <i>Wild type</i> o forma salvaje de una proteína |
| ZEO | Zeocina |

ii. ÍNDICE

ii. ÍNDICE

| | Página |
|--|--------|
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.- TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN EL CONTEXTO CELULAR | 3 |
| 2.- FAMILIA DE LAS MAP QUINASAS | 4 |
| 2.1.- Proteínas quinasas | 4 |
| 2.2.- Características de las MAPKs..... | 5 |
| 2.3.- Identificación y clasificación de las MAPKs | 7 |
| ○ ERK1 y ERK2..... | 7 |
| ○ JNKs..... | 7 |
| ○ p38 MAPK..... | 8 |
| ○ ERK5/BMK1..... | 8 |
| ○ ERK3/4..... | 9 |
| ○ NLK | 9 |
| ○ ERK7/8..... | 9 |
| 2.4.- Activación y regulación de cascadas de MAPKs | 10 |
| 2.4.1.- Activación de cascadas de MAPKs..... | 10 |
| 2.4.2.- Regulación de la cascada de las MAPKs | 13 |
| 2.4.2.1.- Regulación mediada por fosfatasa | 13 |
| 2.4.2.2.- Regulación mediada por motivos de interacción de las MAPKs | 14 |
| 3.- RUTA DE SEÑALIZACIÓN RAS-ERK | 17 |
| 3.1.- Receptores de membrana..... | 18 |
| • Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)..... | 18 |
| • Receptores con actividad tirosina quinasa (RTKs) | 19 |
| 3.1.1.- Activación de la ruta Ras-ERK por TPA y LPA..... | 20 |
| 3.1.2.- Activación de la ruta Ras-ERK por EGF y HRG. Receptores ErbB | 20 |
| 3.2.- Proteínas Ras..... | 23 |
| 3.2.1.- Estructura de las proteínas Ras | 24 |
| 3.2.2.- Diferencias entre las isoformas de Ras:HRas, NRas y KRas (4B)..... | 26 |
| 3.2.3.- Modificaciones post-traduccionales y localización de las isoformas de Ras | 27 |
| 3.2.4.- Señalización de Ras desde las localizaciones subcelulares..... | 30 |
| 3.3.- Proteínas ERK1/2..... | 31 |
| 3.3.1.- Estructura | 31 |
| 3.3.2.- Activación y desactivación..... | 32 |
| 3.3.3.- Dimerización..... | 34 |
| 3.3.4.- Translocación al núcleo | 35 |
| 3.4.- Sustratos de ERK | 38 |
| 3.4.1.- Sustratos citoplasmáticos..... | 38 |
| 3.4.2.- Sustratos nucleares | 39 |
| 3.5.- Regulación espacio-temporal y determinación de la especificidad de la señal | 39 |
| 4.- MODELOS COMPUTACIONALES DE LA DINAMICA DE LA CASCADA DE ERKS ... | 48 |

| | |
|--|----|
| II. OBJETIVOS | 53 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 57 |
| 1.- ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DEL ADN | 59 |
| 1.1.- Purificación de ADN plasmídico | 59 |
| 1.2.- Amplificación de fragmentos de ADN por PCR | 60 |
| 1.3.- Digestión con endonucleasas de restricción y purificación de fragmentos de ADN en geles de agarosa | 60 |
| 1.4.- Clonación de ADN en vectores plasmídicos..... | 61 |
| 1.5.- Plásmidos | 62 |
| 1.5.1.- Vectores generados para la realización de la tesis..... | 62 |
| 1.5.2.- Vectores utilizados en la realización de la tesis | 64 |
| 2.- CULTIVOS CELULARES | 66 |
| 2.1.- Métodos de transfección | 66 |
| 2.1.1.- Precipitación con fosfato de calcio | 66 |
| 2.1.2.- Transfección con DEAE-DEXTRANO..... | 67 |
| 2.1.3.- Transfección con el reactivo FuGene | 67 |
| 2.1.4.- Transfección con Lipofectamina | 68 |
| 2.2.- Obtención de sublíneas estables | 68 |
| 2.3.- Líneas celulares utilizadas..... | 69 |
| 2.4.- Tratamiento para las líneas celulares | 69 |
| 3.- ANÁLISIS DE PROTEÍNAS | 70 |
| 3.1.- Detección de proteínas por western blot | 70 |
| 3.2.- Detección de proteínas por inmunofluorescencia..... | 72 |
| 3.3.- Obtención de proteínas recombinantes para los ensayos de unión “in vitro” | 73 |
| 3.4.- Ensayo in vitro “pull down” | 74 |
| 3.5.- Detección de dímeros de ERK en condiciones nativas..... | 75 |
| 3.6.- Fraccionamiento de la membrana plasmática en gradiente de sacarosa con Tritón-X100 | 75 |
| 3.7.- Fraccionamiento retículo endoplasmático-membrana plasmática | 76 |
| 3.8.- Fraccionamiento núcleo-citoplasma..... | 76 |
| 3.9.- Ensayo de proliferación: curvas de crecimiento | 77 |
| 3.10.- Ensayo de formación de colonias de proliferación | 77 |
| 3.11.- Tinción de lípidos con OilRed..... | 78 |
| 4.- ANÁLISIS INFORMÁTICO | 79 |
| 4.1.- Análisis de los western blot | 79 |
| 4.2.- Gráficos y diseños | 79 |
| 4.3.- Análisis estadístico..... | 79 |
| 4.4.- Bibliografía | 79 |
| IV. RESULTADOS | 81 |
| 1.- EL ESPACIO COMO REGULADOR DE LA SEÑAL RAS-ERK INDUCIDA POR EGF . | 83 |
| 1.1.- Análisis de las cinéticas de fosforilación de ERK desde las distintas localizaciones subcelulares de Ras..... | 83 |
| 1.2.- Modelo de la contribución espacial a la señal Ras-ERK | 87 |

| | |
|--|------------|
| 2.- EVALUACIÓN DEL MODELO SIMAP EN OTRA LÍNEA CELULAR | 91 |
| 2.1.- Análisis de las cinéticas de fosforilación de ERK en membrana plasmática... | 94 |
| 2.2.- Análisis de las cinéticas de fosforilación de ERK bajo estimulación con TPA | 96 |
| 2.3.- Análisis de las cinéticas de fosforilación de ERK bajo estimulación con LPA . | 98 |
| 3.- EL ESPACIO COMO REGULADOR DE LAS FUNCIONES BIOLÓGICAS | 100 |
| 4.- ESPACIO Y TIEMPO COMO REGULADORES DE FUNCIONES BIOLÓGICAS | 104 |
| 4.1.- Análisis de las cinéticas de fosforilación y dimerización de ERK bajo diferentes estímulos: EGF y HRG..... | 104 |
| 4.2.- Análisis de las cinéticas de activación de Ras tras estimulación con EGF y HRG | 106 |
| 4.3.- Análisis de la activación de otros componentes de la cascada de señalización y estudio del comportamiento cito-nuclear de la señal | 108 |
| 4.4.- El espacio como regulador de la señalización Ras-ERK | 111 |
| 4.5.- El tiempo como regulador de la respuesta biológica | 115 |
| | |
| V. DISCUSIÓN | 119 |
| 1.- ESPACIO COMO REGULADOR DE LA SEÑAL RAS-ERK INDUCIDA POR EGF | 121 |
| 1.1.- Análisis de las cinéticas de fosforilación de ERK desde las distintas localizaciones de Ras..... | 121 |
| 1.2.- Comprobación del modelo de señalización de la ruta de ERK en otra línea celular..... | 124 |
| 2.- ESPACIO COMO REGULADOR DE LA SEÑALIZACIÓN RAS-ERK EN LA DETERMINACIÓN DE RESPUESTAS BIOLÓGICAS | 128 |
| 2.1.- Análisis de la capacidad de rescate proliferativo de Ras desde sus localizaciones subcelulares | 130 |
| 3.- TIEMPO Y ESPACIO EN LA REGULACIÓN DE FUNCIONES BIOLÓGICAS | 131 |
| | |
| VI. CONCLUSIONES | 137 |
| | |
| VII. BIBLIOGRAFÍA | 141 |

iii. LISTA DE FIGURAS

iii. LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|---|--------|
| I. INTRODUCCIÓN | |
| Figura 1.1. Esquema de la integración de las diferentes rutas de señalización en la célula..... | 4 |
| Figura 1.2. Clasificación de la familia de las MAPKs..... | 5 |
| Figura 1.3. Representación de la activación de MAPKs y la reacción enzimática de fosforilación reversible de los sustratos..... | 6 |
| Figura 1.4. Esquema de la cascada de señalización en la que participan ERK1/2..... | 7 |
| Figura 1.5. Esquema de la cascada de señalización en la que participan las proteínas JNK..... | 7 |
| Figura 1.6. Esquema de la cascada de señalización en la que participa las proteínas quinasas de la familia de p38..... | 8 |
| Figura 1.7. Esquema de la cascada de señalización en la que participa la quinasa ERK5..... | 8 |
| Figura 1.8. Esquema de la estructura de las MAPKs humanas, tanto clásicas como atípicas..... | 10 |
| Figura 1.9. Resumen de las diferentes proteínas MAPKKK..... | 11 |
| Figura 1.10. Esquema de la interacción entre una MAPK activa y MKP..... | 14 |
| Figura 1.11. Mecanismos de unión entre los componentes de las cascadas de señalización..... | 16 |
| Figura 1.12. Esquema de la ruta de transducción de señales Ras-ERK..... | 17 |
| Figura 1.13. Esquema de la activación de ERK mediada por GPCRs y RTKs..... | 19 |
| Figura 1.14. Representación de los ligandos específicos para cada uno de los receptores de la familia ErbB así como alguna de las uniones más frecuentes entre los receptores..... | 22 |
| Figura 1.15. Representación de los homo/heterodímeros formados bajo estimulación con EGF y HRG..... | 23 |
| Figura 1.16. Representación esquemática de la secuencia de las isoformas de Ras..... | 25 |
| Figura 1.17. Cambio conformacional de la estructura de Ras en función de su estado de activación..... | 25 |
| Figura 1.18. Relación de la frecuencia de mutaciones presentes en distintos tipos tumorales humanos en función de la isoforma de Ras responsable..... | 26 |
| Figura 1.19. Esquema de las modificaciones post-traduccionales sufridas durante la maduración de las proteínas Ras y de las posibles localizaciones subcelulares de las tres isoformas más abundantes..... | 29 |
| Figura 1.20. Representación del cambio conformacional de ERK2 durante su activación..... | 33 |
| Figura 1.21. Estructura del dímero de ERK2..... | 35 |

| | |
|---|----|
| Figura 1.22. Representación de los posibles modelos de translocación de ERK al núcleo | 37 |
| Figura 1.23. Representación de alguna de las proteínas <i>scaffold</i> implicadas en la señalización mediada por la ruta Ras-ERK | 42 |
| Figura 1.24. Esquema simplificado de los diferentes niveles de la cascada de señalización de Ras-ERK | 43 |
| Figura 1.25. Interpretación molecular de la duración de la señal de ERK | 44 |
| Figura 1.26. Esquema simplificado de una célula sometida a dos estímulos diferentes | 47 |
| Figura 1.27. Esquema de la cascada de MAPKs estimulada por EGF según el modelo de Schoeberl y colaboradores | 50 |

III. MATERIALES Y MÉTODOS

| | |
|--|----|
| Tabla 3.1. Resumen de los plásmidos generados durante la tesis..... | 63 |
| Tabla 3.2. Resumen de los plásmidos utilizados durante la tesis | 65 |
| Tabla 3.3. Resumen de las líneas celulares utilizadas en el trabajo..... | 69 |
| Tabla 3.4. Resumen de los tratamientos utilizados en el trabajo..... | 70 |
| Tabla 3.5. Resumen de los anticuerpos utilizados para la detección de proteínas | 72 |

IV. RESULTADOS

| | |
|--|----|
| Figura 4.1. Análisis de la distribución de Ras en la membrana plasmática de células HeLa | 84 |
| Figura 4.2. Análisis de la intensidad en la fosforilación de ERK tras la estimulación con EGF en células transfectadas con NF1 total, M1-NF1, LCK-NF1 y KDEL-NF1 | 85 |
| Figura 4.3. Análisis de las cinéticas de fosforilación de ERK, tras la estimulación con EGF en células HeLa expresando la proteína NF1, dirigidas específicamente a localizaciones subcelulares | 86 |
| Figura 4.4. Análisis de la cinética de activación de Ras, tras la estimulación con EGF, en células HeLa | 87 |
| Figura 4.5. Modelo de simulación de la vía de ERK | 90 |
| Figura 4.6. Análisis de la cinética de fosforilación de ERK, cuando Ras está liberado de su anclaje a membrana plasmática por la acción de APT1 | 91 |
| Figura 4.7. Comprobación de la eliminación de la expresión de las isoformas de Ras y su efecto biológico | 93 |
| Figura 4.8. Análisis de la intensidad en la fosforilación de ERK tras la estimulación con EGF en células MEFs wt, MEFs H/N -/- y MEFs sin expresión de Ras (Ras null). | 94 |
| Figura 4.9. Análisis de las cinéticas de la fosforilación de ERK tras la estimulación con EGF en células MEFs wt, MEFs H/N -/- y MEFs sin expresión de Ras (Ras null). | 96 |

| | |
|--|-----|
| Figura 4.10. Análisis de las cinéticas de la fosforilación de ERK tras la estimulación con TPA en células MEFs wt, MEFs H/N -/- y MEFs sin expresión de Ras (Ras null)..... | 98 |
| Figura 4.11. Análisis de las cinéticas de la fosforilación de ERK tras la estimulación con LPA en células MEFs wt, MEFs H/N -/- y MEFs sin expresión de Ras (Ras null)..... | 99 |
| Figura 4.12. Análisis del rescate de la proliferación de H-Ras, N-Ras y K-Ras, tanto en su forma silvestre como en su forma constitutivamente activa | 102 |
| Figura 4.13. Análisis de la capacidad de rescate proliferativo de N-Ras y K-Ras desde cada una de las localizaciones subcelulares..... | 104 |
| Figura 4.14. Comparación de las cinéticas de fosforilación de ERK, tras la estimulación de células MCF7 con EGF y HRG..... | 105 |
| Figura 4.15. Análisis de las cinéticas de activación de Ras tras la estimulación de células MCF7 con EGF y HRG | 107 |
| Figura 4.16. Comparación de la intensidad de activación de Ras en tiempos cortos de estimulación con EGF y HRG..... | 107 |
| Figura 4.17. Comparación de las cinéticas de activación de Ras, MEK y ERK en células MCF7..... | 108 |
| Figura 4.18. Análisis de las cinéticas de fosforilación de sustratos nucleares y citoplasmáticos de ERK tras la estimulación de células MCF7 con EGF y HRG | 109 |
| Figura 4.19. Análisis de las cinéticas de fosforilación de ERK en el núcleo y en el citoplasma de células MCF7 estimuladas con EGF y HRG..... | 111 |
| Figura 4.20. Fraccionamientos subcelulares y determinación de la expresión endógena de HRas en endomembranas y membrana plasmática | 112 |
| Figura 4.21. Análisis de la activación de Ras en el retículo endoplasmático de células MCF7 tras estimulación con EGF y HRG..... | 113 |
| Figura 4.22. Análisis de la activación de Ras en el Aparato de Golgi de células MCF7 tras estimulación con EGF y HRG | 114 |
| Figura 4.23. Análisis de la activación de Ras en membrana desordenada de células MCF7 tras estimulación con EGF y HRG..... | 115 |
| Figura 4.24. Detección de la diferenciación de las células MCF7 por tinción con OilRed | 116 |
| Figura 4.25. Prolongación de la cinética de ERK1/2 por sobre-expresión de HRas..... | 116 |
| Figura 4.26. Ensayo de diferenciación de células MCF7 sobre-expresando HRas, MEK y EGFR..... | 118 |

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN EL CONTEXTO CELULAR

Las células de cualquier organismo se encuentran en continua comunicación con su entorno extracelular, así como con otras células. Los mecanismos que permiten a la célula la comunicación, se podrían englobar en un único concepto como señalización celular o transducción de señales, bien sea bioquímica o biofísica. Un hecho que nos puede parecer tan sencillo, como la comunicación con el entorno, conlleva una maquinaria de alta precisión, de gran complejidad y con multitud de elementos. La regulación de las funciones celulares depende de la transmisión de la información del exterior de la célula a su interior, respondiendo así de una forma correcta al dinámico entorno en el que se encuentra. En este mecanismo participan diferentes rutas de transducción de señales, en las que las proteínas son los principales efectores. Las rutas de señalización están muy reguladas e interconectadas entre sí, frecuentemente formando una compleja red de interacciones y reacciones enzimáticas, que permiten finalmente regular procesos biológicos como proliferación, metabolismo, movimiento, diferenciación o muerte celular (Jordan et al.,2000)(Figura 1.1).

Las rutas de señalización mejor caracterizadas están desencadenadas por receptores asociados a proteínas G heterotriméricas o bien por receptores con actividad tirosina quinasa, y afectan a múltiples rutas efectoras como las mediadas por, por ejemplo, la proteína quinasa C (PKC), fosfolipasa C (PLC), proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA), fosfatidil-inositol 3 quinasa (PI3K) o proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), entre otras. Las rutas de señalización mediadas por MAPKs son de las más estudiadas y mejor caracterizadas.

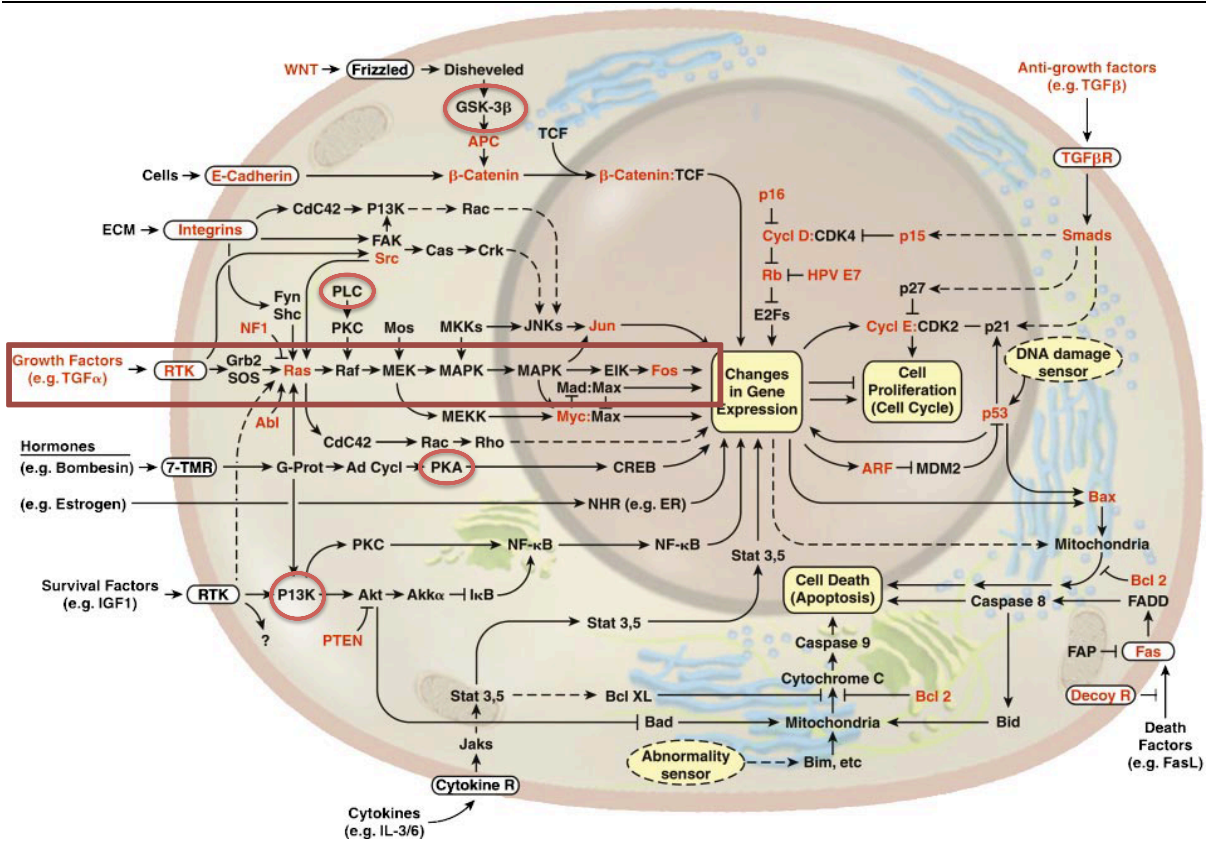


Figura 1.1. Esquema de la integración de las diferentes rutas de señalización en la célula. Se representan tanto los estímulos extracelulares como las proteínas que forman las cascadas de señalización. Se destaca la ruta de las MAPKs, encuadrada en rojo, y alguna de las proteínas más importantes que componen la red de interacciones, destacadas en círculo rojo. Se utiliza la letra de color rojo para aquellas proteínas que están implicadas en alteraciones oncogénicas. Destacadas en amarillo, los procesos biológicos que pueden regular cada una de ellas. *Adaptado de Hanahan and Weinberg, 2000.*

2. FAMILIA DE LAS MAP QUINASAS

2.1. Proteínas quinasas

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAP quinasas o MAPKs) pertenecen a la superfamilia de proteínas quinasas, y se encuadran dentro del grupo CMGC que también incluye a la familia de la glicógeno sintasa 3 (GSK3), la familia de las quinasas dependientes de ciclinas y la familia Clk (*Cdk-like kinase*). La función de las proteínas quinasas es catalizar la transferencia reversible del fosfato y del ATP, al grupo hidroxilo de residuos de tirosina, treonina o serina de las proteínas sustrato. La fosforilación de las proteínas sustrato, junto a la desfosforilación de las mismas llevada a cabo por proteínas fosfatasas específicas, permiten modular su actividad, regulando así distintos procesos biológicos en función de su actividad enzimática, la interacción con otras proteínas o moléculas, su localización

subcelular o su estabilidad (Hanks and Hunter, 1995; Johnson and Lapadat, 2002; Yaffe and Elia, 2001). De tal manera que la desregulación de las proteínas quinasas supone en muchos casos desordenes fisiológicos y enfermedades tan importantes como el cáncer (Hanahan and Weinberg, 2000; Kim and Choi, 2010; Kolch, 2000).

Es de gran importancia, por lo tanto, la correcta regulación de la actividad de las proteínas quinasas, manteniendo el correcto patrón de fosforilación de las proteínas sustrato. De hecho, el 30% de las proteínas humanas están fosforiladas, por lo que la actividad quinasa es muy frecuente. Hoy en día se sabe que el 2% de los genes humanos codifican para proteínas quinasas, habiéndose identificado 518 proteínas quinasas diferentes, englobadas en el denominado *kinoma* humano, como complemento a la secuenciación del genoma humano (Manning et al., 2002).

2.2. Características de las MAPKs

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos o MAPKs recibieron dicho acrónimo por su capacidad de fosforilar la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP-2) (Ray and Sturgill, 1988), sin embargo, su nombre actual se asignó tras la búsqueda de sustratos activados por mitógenos realizada a principios de los años 80, encontrándose que eran activadas por factores de crecimiento (Rossomando et al., 1989).

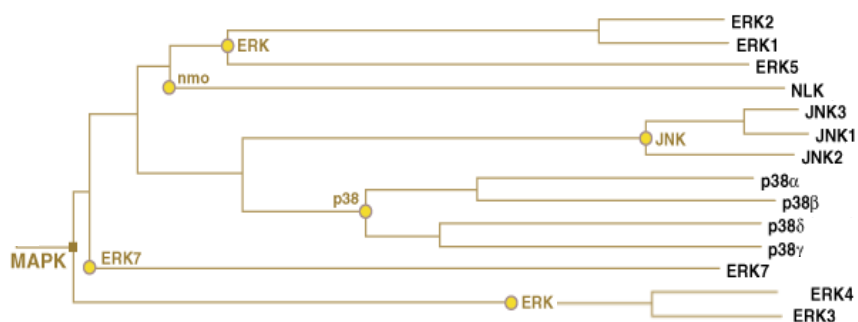


Figura 1.2. Clasificación de la familia de las MAPKs. Cada una de las proteínas quinasas se representan en negro, indicando la subfamilia a la que pertenecen. (Adaptado de *Cell Signaling Technologies*).

Se trata de una familia de proteínas muy conservada en plantas, hongos y animales. Todas ellas poseen once subdominios en su región catalítica, con un 40 % de identidad en

esta región, por lo que las estructuras y actividades catalíticas son muy similares entre ellas (Taylor et al., 1993). En mamíferos se conocen cerca de 20 MAPKs, y en humanos, se han identificado 14 genes que codifican para MAPKs formando parte de 7 vías de señalización diferentes (Coulombe and Meloche, 2007; Pearson et al., 2001) (Figura 1.2).

Las MAPKs constituyen una familia de serina/treonina proteínas quinasas que convierten estímulos extracelulares en un amplio rango de respuestas celulares. Estas proteínas son activadas mediante cascadas de fosforilación, transmitiendo así las señales extracelulares al interior celular, integrando estímulos y convirtiéndolos en respuestas bioquímicas. De hecho, todas las células eucariotas poseen múltiples vías de MAPKs que regulan, de manera coordinada, distintos procesos como la expresión génica, mitosis, metabolismo, motilidad, supervivencia, apoptosis y diferenciación.

Para su completa activación, las proteínas MAPKs requieren la fosforilación en residuos de tirosina y treonina (Payne et al., 1991; Robbins et al., 1993). Por otra parte, para la desactivación de las MAPKs se necesita la acción de fosfatasas específicas, que eliminen los grupos fosfato necesarios para la activación. Con todo esto, las MAPKs forman parte de cascadas de señalización, teniendo al menos dos quinasas previas en la cascada y, una vez activas, son capaces de fosforilar sus sustratos en residuos de serina o treonina (seguidos de prolina)(Figura 1.3). Además, las MAPKs suelen encontrarse formando parte de complejos multiproteicos junto a otras quinasas o proteínas reguladoras (Cobb, 1999; Kolch, 2000).

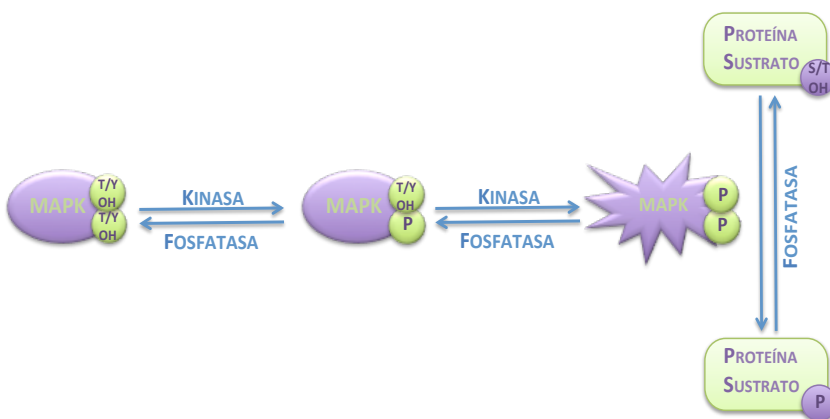


Figura 1.3. Representación de la activación de MAPKs y la reacción enzimática de fosforilación reversible de los sustratos. Las MAPKs son activadas tras la fosforilación de residuos de treonina (T) y tirosina (Y). Para su desactivación es necesaria la acción de fosfatasas específicas que eliminen uno o los dos grupos fosfato (P) de dichos residuos. Una vez activa, la MAPK es capaz de fosforilar las proteínas sustrato en residuos de serina (S) o treonina (T).

2.3. Identificación y clasificación de las MAPKs

Existen cuatro subfamilias de MAP quinasas “clásicas”:

- **ERK1 y ERK2 (*Extracellular Regulated Kinases*):** ERK1 fue la primera MAPK caracterizada en mamíferos, y se encontró por ser fosforilada en respuesta a factores de crecimiento (Ray and Sturgill, 1988). Además, también puede ser activada por otros estímulos como ésteres de forbol, y en menor medida, por citoquinas y estrés osmótico. Las quinasas ERK1 y ERK2 componen esta subfamilia, compartiendo un 83% de homología en la secuencia de aminoácidos. También pertenecen a este grupo las isoformas ERK1b (Yung et al., 2000), ERK1c (Aebersold et al., 2004) y la denominada ERK2b (Gonzalez et al., 1992), que son isoformas generadas por *splicing* alternativo a partir de los genes ERK1 y ERK2. El motivo de fosforilación de todas ellas corresponde a Thr-Glu-Tyr (TEY).

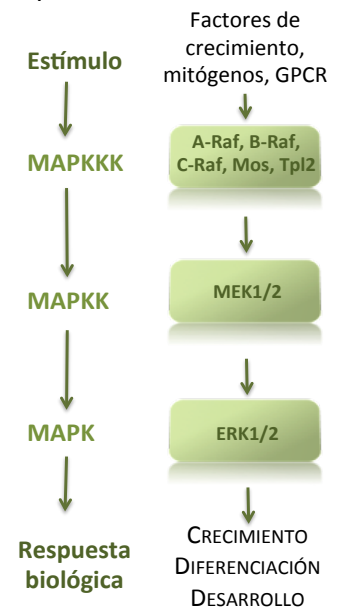


Figura 1.4. Esquema de la cascada de señalización en la que participan ERK1/2. La cascada de señalización Raf-MEK-ERK puede ser activada por diferentes mitógenos y participa en diversas respuestas celulares.

- **JNKs (*c-jun N-terminal Kinases*):** También llamadas SAPKs (*Stress Activated Protein Kinases*), por su capacidad de ser activadas en respuesta a estrés ambiental y estrés oxidativo, además de citoquinas y ciertos ligandos de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (Bogoyevitch et al., 2010). A esta subfamilia pertenecen proteínas codificadas por tres genes distintos (JNK1, JNK2 y JNK3), y más de 10 isoformas generadas por *splicing* alternativo (Kyriakis and Avruch, 2001). Su motivo de fosforilación es Thr-Pro-Tyr (TPY), y una vez fosforiladas y activas son capaces de fosforilar sustratos como c-jun, p53, Elk1, c-myc, junB, ATF2, HSF1 y STAT3 (Johnson and Lapadat, 2002; Raman et al., 2007). De esta manera pueden regular la actividad transcripcional de las células según la estimulación recibida, tras la formación del complejo AP1.

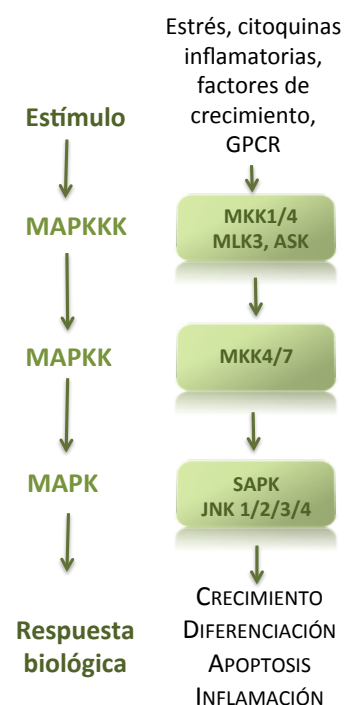
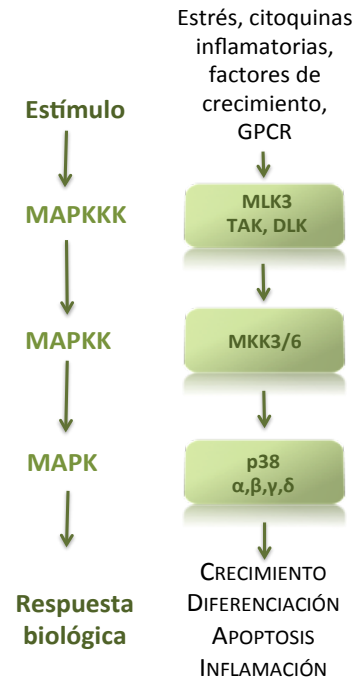


Figura 1.5. Esquema de la cascada de señalización en la que participan las proteínas JNKs. La cascada de señalización de JNK puede ser activada por diferentes mitógenos y participa en diversas respuestas celulares, con un papel importante en apoptosis y procesos inflamatorios.

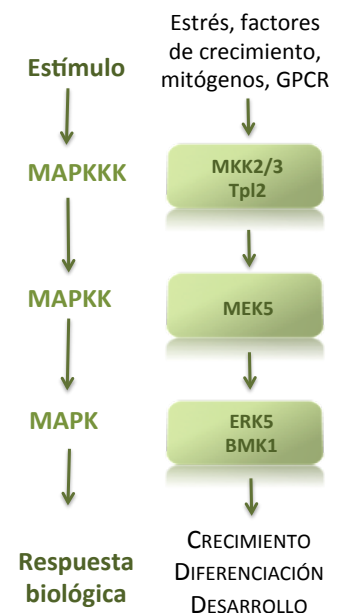
○ **p38 MAPK:** también conocida como CSBP, mHOG1, RK y SAPK2. Esta subfamilia de MAPK responde a estímulos de estrés, como el choque osmótico y térmico, así como a hormonas y citoquinas inflamatorias (Han et al., 1994; Lee et al., 1994; Rouse et al., 1994). Este grupo comprende cuatro isoformas codificadas por cuatro genes distintos: p38 α , p38 β , p38 γ y p38 δ (Kyriakis and Avruch, 2001). Además existen otras isoformas generadas por *splicing* alternativo a partir de p38 α como CSBP1 (Lee et al., 1994), Mxi2 (Zervos et al., 1995) y Exip (Sudo et al., 2002). Su motivo de fosforilación es Thr-Gly-Tyr (TGY) y están implicadas en la inducción de apoptosis y en la regulación de la respuesta inmune (Cuadrado and Nebreda, 2010; Martín-Blanco, 2000), por lo que tienen un papel muy importante en diferentes enfermedades humanas, como el asma o enfermedades autoinmunes (Johnson and Lapadat, 2002). La mayoría de los estímulos que activan p38 también son capaces de estimular a JNK.

Figura 1.6. Esquema de la cascada de señalización en la que participan las proteínas quinastas de la familia de p38. La cascada de señalización de p38 responde a estímulos de estrés, regulando respuestas biológicas como apoptosis y procesos de inflamación.



○ **ERK5/BMK1 (*Big Mitogen-Activated Protein Kinase 1*):** Es una MAPK descubierta en 1995 con un tamaño mucho mayor que el resto de las MAPKs, radicando esta diferencia en el extremo carboxilo terminal (Lee et al., 1995). Se han identificado tres isoformas, generadas por *splicing* alternativo, denominadas ERK5a, ERK5b y ERK5c (Yan et al., 2001). Su activación es dependiente de mitógenos y de estrés celular (Kamakura et al., 1999). Al igual que ERK1/2, su sitio de fosforilación es Thr-Glu-Tyr (TEY), aunque no es necesaria su activación para su translocación al núcleo (Borges et al., 2007; Raviv et al., 2004) ya que en su dominio carboxilo terminal presenta una secuencia de localización nuclear o NLS (Buschbeck and Ullrich, 2005).

Figura 1.7. Esquema de la cascada de señalización en la que participa la quinasa ERK5. La proteína ERK5 participa en cascadas de señalización estimuladas por diferentes mitógenos y factores de estrés, con implicación en respuestas asociadas al crecimiento o diferenciación.



Además de las MAPK clásicas, también se han caracterizado otras MAPKs atípicas como es el caso de:

- **ERK3/4:** ERK3 fue clonado en 1991 por homología con la secuencia de ERK1, al igual que ERK4 (García et al., 1996; Gonzalez et al., 1992). Estas quinasas poseen un sitio de activación Ser-Glu-Gly (SEG), por lo cual tienen únicamente un residuo aceptor de grupos fosfato (Figura 1.8). A diferencia del resto de las MAPKs clásicas, la fosforilación de activación de ERK3 puede ser constitutiva en condiciones de ausencia de factores de crecimiento o estrés químico (Déléris et al., 2008). Aunque se conoce poco del papel biológico de ERK4, si se sabe que ERK3 participa en procesos como proliferación celular, progresión del ciclo celular y diferenciación (Coulombe et al., 2003; Julien et al., 2003).

- **NLK (Nemo Like Kinase):** Esta quinasa fue descubierta en mamíferos como proteína homóloga de la proteína Nemo de *Drosophila melanogaster* (Brott et al., 1998). Presenta un 45% de homología con el dominio catalítico de ERK2. Esta quinasa puede ser activada por estímulos de la vía de señalización de Wnt y algunas citoquinas (Kanei-Ishii et al., 2004; Kojima et al., 2005) pudiendo regular la ruta de la β -catenina en respuesta a la estimulación por Wnt. Presenta extensiones en el dominio amino y carboxilo terminal, que no están presentes en las MAPKs clásicas. Además, contiene un único residuo de fosforilación dentro del motivo de activación Thr-Gln-Glu (TQE) (Figura 1.8).

- **ERK7/8:** La quinasa ERK7 fue identificada mediante amplificación por PCR de una librería de cDNA de rata, usando oligonucleótidos de ERK1 degenerados. Posteriormente se identificó su ortólogo humano, ERK8 (Abe et al., 1999; Coulombe and Meloche, 2007). Se activa en respuesta a estrés oxidativo y a factores mitogénicos, y parece estar implicada en la degradación del receptor de estrógenos (Henrich et al., 2003). ERK7 contiene un motivo de fosforilación Thr-Glu-Tyr (TEY) al igual que ERK1/2 (Figura 1.8) pero la fosforilación parece estar catalizada por la propia ERK7, y no por otra proteína quinasa (Abe et al., 2001). Por otro lado, se sabe que ERK8 presenta altos niveles de expresión en pulmón y riñón (Abe et al.,

2002), se desconoce su papel fisiológico aunque se ha descrito su capacidad por fosforilar a MBP (*myelin basic protein*) (Klevernic et al., 2006).

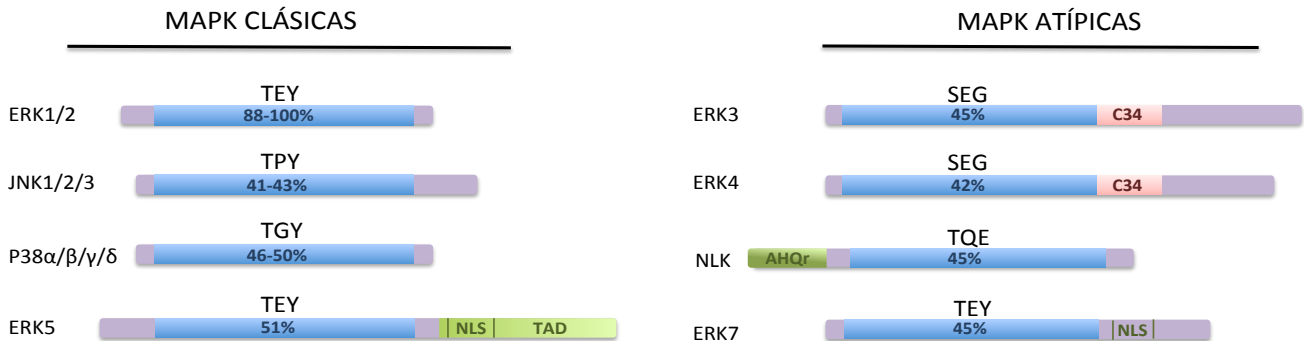


Figura 1.8. Esquema de la estructura de las MAPKs humanas, tanto clásicas como atípicas. Las proteínas MAPKs están formadas por un dominio quinasa (en azul) flanqueada por extremos amino y carboxilo terminal que pueden tener longitudes variables. Dentro del dominio quinasa se representa el porcentaje de homología con respecto a ERK1, y mediante la abreviatura de los aminoácidos se indica el sitio de activación. TAD: dominio de transactivación; C34: región conservada en ERK3/4; AHQr: dominio rico en alanina (A), histidina (H) y glutamina (Q). *Adaptado de Coulombe et al., 2007.*

2.4. Activación y regulación de cascadas de MAPKs

2.4.1. Activación de cascadas de MAPKs

La señalización celular, utilizando cascadas de quinasas, no es un proceso único de mamíferos, de hecho se identificó en primer término en levaduras, donde las cascadas moleculares transmiten señales desde la superficie celular controlando finalmente diversos procesos, entre los que destacan el apareamiento, biosíntesis de la pared celular y la osmorregulación. Pero existe una gran diferencia entre la señalización en levaduras y la señalización en mamíferos: mientras que en levaduras la respuesta a un determinado estímulo actúa mediante la activación de una única ruta (Pearson et al., 2001), en mamíferos se pueden activar varias rutas de señalización de forma simultánea como respuesta a un único estímulo (Raman and Cobb, 2003).

Cada uno de los grupos de MAPKs clásicas está compuesto por un conjunto de quinasas, conservadas evolutivamente, que actúan de manera secuencial en una cascada de fosforilaciones. La vía de señalización puede dividirse en dos fases, por una parte, la

señalización a nivel de membrana, donde un receptor es activado por factores de crecimiento, que puede implicar la activación de proteínas pequeñas de unión a GTP, mediado por proteínas adaptadoras. En una segunda fase, a nivel citosólico, se produce la estimulación del módulo de proteínas quinasas citoplasmáticas, constituido por: una proteína MAPK, una proteína MAPK quinasa (MAPKK) y una proteína MAPKK quinasa (MAPKKK), aunque en algunos casos se encuentran quinasas adicionales por encima de este módulo de tres quinasas.

Las proteínas **MAPKKK**, también denominadas MEKK o MKKK, son por lo tanto, el primer componente de la cascada de señalización de las MAPKs. Son proteínas serina/treonina quinasas, que normalmente son activadas por fosforilación, y/o como resultado de su interacción con proteínas G pequeñas, como pueden ser Ras, Rac y Rap1. Su activación puede iniciarse en respuesta a la estimulación extracelular desde la membrana plasmática, aunque también puede iniciarse por la acción de otras enzimas. Este tipo de quinasas se caracterizan por su gran variabilidad estructural entre sus miembros, y por tener motivos de regulación diferentes al resto de los componentes de la cascada. Pueden presentar dominios de unión a proteínas G y secuencias de dimerización por cremalleras de leucina (Chen et al., 2001; Johnson et al., 2005; Rubinfeld and Seger, 2005). Dentro de este grupo de quinasas podemos destacar las proteínas detalladas en la siguiente tabla:

| MAPKKK | Activador | Efector | Implicación |
|--------------|------------------------|--|---|
| PACKs | -p21 -Rac -Cdc42 | -MKK3/4 -ERK | -Organización del citoesqueleto -supervivencia/apoptosis -transcripción |
| MLK | | -JNK (por MKK4) -p38 (por MKK4) | |
| RAF | -Ras | -ERK | -Proliferación -Apoptosis |
| MEKK1 | | -ERK -JNK (mediante MEK1 y MKK3/4) | -Apoptosis -Migración |
| MEKK2 | | -MEK1/2 -MKK4 | -Producción de citoquinas |
| MEKK3 | | -ERK -JNK -p38 (mediante MKK4 y MKK1) | -Bloqueo de la proliferación |

Figura 1.9. Resumen de las diferentes proteínas MAPKKK en relación a sus activadores, efectores y posibles implicaciones biológicas. PACKs (*γp21 activated kinase*), MLK (*Mixed-Lineage Kinase*), Raf (*Ras Activated Protein*), MEKK (MAPKKK).

La activación de las MAPKKs conlleva la fosforilación y activación de una MAPK con una alta especificidad.

Las **MAPKK** también denominadas MEK o MKK, son enzimas con especificidad dual que pueden fosforilar tanto residuos de serina/treonina como residuos de tirosina. A pesar de su capacidad de fosforilar tanto las cadenas laterales de los aminoácidos alifáticos como las de los aminoácidos aromáticos, según el contexto celular, la especificidad de los sustratos es muy limitada. De tal manera que cada MAPKK fosforila una MAPK o unas pocas MAPKs, y lo hacen siempre en los motivos de fosforilación específicos de cada MAPK, pudiendo ser TEY, TPY o TGY (siendo la secuencia consenso TXY). Se han descrito 7 proteínas pertenecientes a este grupo (además de algunas formas generadas por *splicing* alternativo a partir de alguna de ellas), cada una de ellas con sustratos específicos: MEK1/2 (o MKK1/2) que son capaces de fosforilar y activar a ERK1/2, las quinasas MKK3 y MKK6 que activan la quinasa p38 (Raignaud et al., 1996), la proteína quinasa MKK4 que es capaz de fosforilar tanto p38 y JNK (Dérijard et al., 1995), la quinasa MKK7 que también es capaz de activar la vía de JNK fosforilando en el residuo de treonina de su sitio de activación (Fleming et al., 2000), y por último, la quinasa MKK5 que fosforila de manera muy específica a ERK5 (Zhou et al., 1995).

Como ya se ha dicho, las **MAPKs** son activadas tras la fosforilación de los residuos de treonina y tirosina dentro del dominio conservado TXY. Esta doble fosforilación es esencial para su actividad enzimática y su capacidad de fosforilar distintos sustratos (Robbins et al., 1993). Todas las MAPKs pertenecen a la familia de proteínas quinasas dirigidas a prolina, es decir, fosforilan residuos de serina y treonina que presentan un residuo de prolina en posición +1/-1. La localización subcelular de los sustratos puede variar dependiendo de la estimulación o de los mecanismos de regulación de la ruta. Así, los sustratos pueden encontrarse en diferentes compartimentos celulares, como por ejemplo, citoplasma, mitocondria, Golgi, retículo endoplasmático o núcleo (Yao and Seger, 2009; Yoon and Seger, 2006). Finalmente, la señal llega al núcleo, donde se modula la expresión y actividad de factores de transcripción o proteínas de remodelación de cromatina, lo cual conlleva la inducción y regulación de la expresión génica (Clark et al., 2009; Whitmarsh, 2007).

Una de las ventajas que confieren las cascadas de señalización, es el fenómeno de amplificación de la señal, de tal manera, que si cada quinasa sucesiva en la cascada es más abundante que la quinasa anterior, la señal se irá amplificando. Además, la existencia de

diferentes isoformas en cada uno de los niveles de la cascada, parece ser esencial para la variabilidad en la transmisión de la señal (Yoon and Seger, 2006), y por lo tanto, la determinación de la especificidad, todo ello con una fina regulación.

2.4.2. Regulación de la cascada de las MAPKs

2.4.2.1. Regulación mediada por fosfatasas

En la modulación de la actividad de las proteínas quinasas es tan importante la fosforilación de las proteínas como la desfosforilación de las mismas. De hecho, la duración y amplitud de la señal mediada por las MAPKs, representa el equilibrio existente entre la señal activadora de los componentes previos de la cascada de señalización, y los mecanismos de inactivación. La inactivación de las MAPKs puede llevarse a cabo por la eliminación del grupo fosfato de alguno de los dos residuos fosforilados, necesarios para la activación de la MAPK, o bien por la eliminación de ambos al tiempo. De hecho, las proteínas fosfatasas se clasifican en tres grupos, en función de la capacidad de desfosforilar los distintos fosfo-residuos:

- Serina/Treonina Fosfatasas (S/T PPs): Son proteínas fosfatasas con capacidad de eliminar el grupo fosfato del residuo de serina o treonina del motivo de fosforilación de la proteína diana. Se ha descrito su capacidad de desfosforilar principalmente en el núcleo, controlando procesos como control del ciclo celular, regulación del crecimiento y división celular (Wang et al., 2008).

- Tirosina Fosfatasas (PTPs): Son enzimas capaces de eliminar el grupo fosfato de residuos de tirosina. Esta familia de fosfatasas están consideradas como los reguladores más importantes de la familia de ERKs, con un papel principalmente citoplasmático. Su actividad se detecta en fases tempranas tras la estimulación mitogénica. Algunas de estas proteínas son PTP-SL (*Step like PTP*), STEP (*striatum enriched phosphatase*) (Pulido et al., 1998) y HePTP (*hematopoietic PTP*) (Saxena et al., 1998).

- Fosfatasas con actividad dual (DUSPs): También llamadas MKPs (fosfatasas de MAPK). Son proteínas fosfatasas con capacidad de desfosforilar tanto residuos de treonina como residuos de tirosina. En su dominio N-terminal se encuentra una secuencia de aminoácidos hidrofóbicos, denominada MKB (*MAPK binding*), mediante la cual interacciona de forma específica con la MAPK (Kondoh and Nishida, 2007). Tras la interacción de la

fosfatasa con la MAPK específica, se produce un cambio conformacional de la estructura de la fosfatasa (Figura 1.10), que favorece el aumento de su actividad catalítica (residente en el dominio C-terminal) (Farooq et al., 2003). Su actividad puede ser inducida tanto por factores de crecimiento y estrés, como es el caso de las proteínas MKP1, MKP2, PAC1 o B23, o puede que su actividad esté regulada a nivel post-transcripcional, como en el caso de MKP3 (Bermudez et al., 2011). Existe una gran especificidad de las diferentes MKPs para los distintos miembros de la familia de las MAPK. La fosfatasa MKP1 es capaz de desfosforilar ERKs, JNKs y p38 (Chu et al., 1996), mientras que la fosfatasa MKP3 es capaz de desfosforilar únicamente a ERK (Muda et al., 1996).

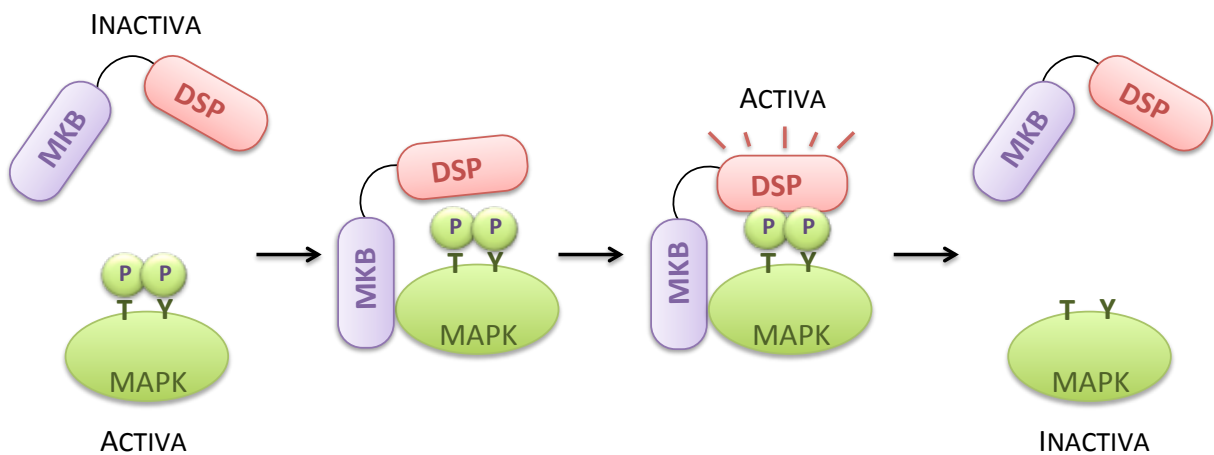


Figura 1.10. Esquema de la interacción entre una MAPK activa y una fosfatasa con actividad dual (MKB-DSP). Tras la interacción, mediante los dominios hidrofóbicos (MKB), se produce un cambio conformacional de la fosfatasa con actividad dual. El dominio fosfatasa de especificidad dual (DUSP) sufre un aumento en la actividad catalítica, desfosforilando e inactivando a la MAPK. (Adaptado de Kondoh & Nishida, 2007)

2.4.2.2. Regulación mediada por motivos de interacción de las MAPKs

La regulación de la actividad de los componentes de las cascadas de señalización y, por lo tanto, de la transmisión de la señal, es posible también por las interacciones de alta afinidad existentes, a diferentes niveles, dentro de la ruta. Dentro de la estructura de las MAPKs podemos encontrar diferentes regiones que modulan las interacciones con alta especificidad, llamados *docking motifs* o sitios de unión. Estos sitios de unión pueden ser lugares de interacción tanto con activadores como con fosfatasas inactivadoras, que puede llevar a la activación o desactivación respectivamente. Además, también se pueden encontrar algunos

docking motifs en proteínas efectoras o sustratos. Alguno de estos motivos de unión o *docking motifs* son:

- **Dominio D**; presente en la mayoría de las proteínas reguladoras de las MAPKs y en sus sustratos. Se trata de una secuencia de aminoácidos básicos (dos o más) seguido de una serie de residuos hidrofóbicos (Leu, Iso o Val) [(K/R)₂₋₃-X₁₋₆-Φ_{L,I,V}-X-Φ_{L,I,V}]. Fue identificado inicialmente en la proteína c-Jun y posteriormente en otros factores de transcripción (Elk-1) y proteínas relacionadas con MAPKs (MEK1/2, PTPs) (Sharrocks et al., 2000b). Aunque puede ser reconocidos, a veces, por más de un grupo de MAPKs, están diseñadas para aumentar la especificidad y eficacia de la señalización, de tal manera, que ligeras diferencias en la secuencia pueden ser responsables de la especificidad de la interacción.

- **Dominio DEF** (*Docking site for ERK, FXFP*); se trata de una secuencia identificada en ciertos sustratos de ERK (Phe-X-Phe-Pro, FXFP), que puede funcionar, en combinación o no, con el dominio D (Fantz et al., 2001). Esta secuencia se encuentra próximo al sitio de fosforilación y es esencial para la eficiente unión de ERK al sustrato (Lee et al., 2004). El dominio DEF interacciona con el dominio **DBP** (*DEF motif binding pocket*) presente en la MAPK. El dominio DBP se encuentra en una hendidura hidrofóbica que solamente es accesible cuando la MAPK se encuentra fosforilada. Se ha encontrado sitios DEF en factores de transcripción (c-Fos y Elk-1), quinasas (KSR y A-Raf) y fosfatasa de actividad dual (MKP-1 y DUSP4) (Jacobs et al., 1999). Aunque es común para los sustratos de ERK también se han encontrado en algunos sustratos de p38, como es el caso de SAP-1 (Galanis et al., 2001).

- **Dominio CD** (*C-terminal common docking domain*); se trata de una región de residuos ácidos e hidrofóbicos que se encuentra fuera de la región catalítica de algunas MAPKs como ERK, p38 y JNK. Esta región permite la interacción de la MAPK con un determinado sustrato, mediante la interacción con su dominio D. De esta manera, los aminoácidos básicos del dominio D interaccionan electrostáticamente con los residuos ácidos del dominio CD, y por otra parte, también se produce interacción de los residuos hidrofóbicos presente en ambos dominios (Enslin and Davis, 2001). El dominio CD colabora en la eficiencia de las fosforilaciones de las MAPKs a sus sustratos, así como en el reconocimiento molecular.

○ **Dominio ED** (*Exchange Docking site*); se trata de una secuencia presente en el extremo N-terminal de algunas MAPKs, compuesto por dos aminoácidos neutros, como Thr-Thr en el caso de ERK. Forma parte de una hendidura formada junto al dominio CD, una vez que la MAPK se activa. De hecho, el dominio CD en solitario, en algunos casos, no es suficiente para determinar la especificidad de la señal, y se necesita que ambos dominios formen una cavidad en la estructura, aumentando así la especificidad y la afinidad de la unión de MAPK a los sustratos (Tanoue et al., 2001).

Las interacciones de una MAPK con otras proteínas como MAPKK, sustratos y fosfatasa son excluyentes, por lo que la MAPK sólo puede interactuar con otras proteínas de una en una. Se ha propuesto un mecanismo de acción (Figura 1.11), según el cual en primer lugar tendría lugar la activación de la MAPK mediada por su unión a MAPKK. Una vez activa, se produce la fosforilación del sustrato. Y por último, la unión a fosfatasa que implica la inactivación de la MAPK (Tanoue et al., 2001).

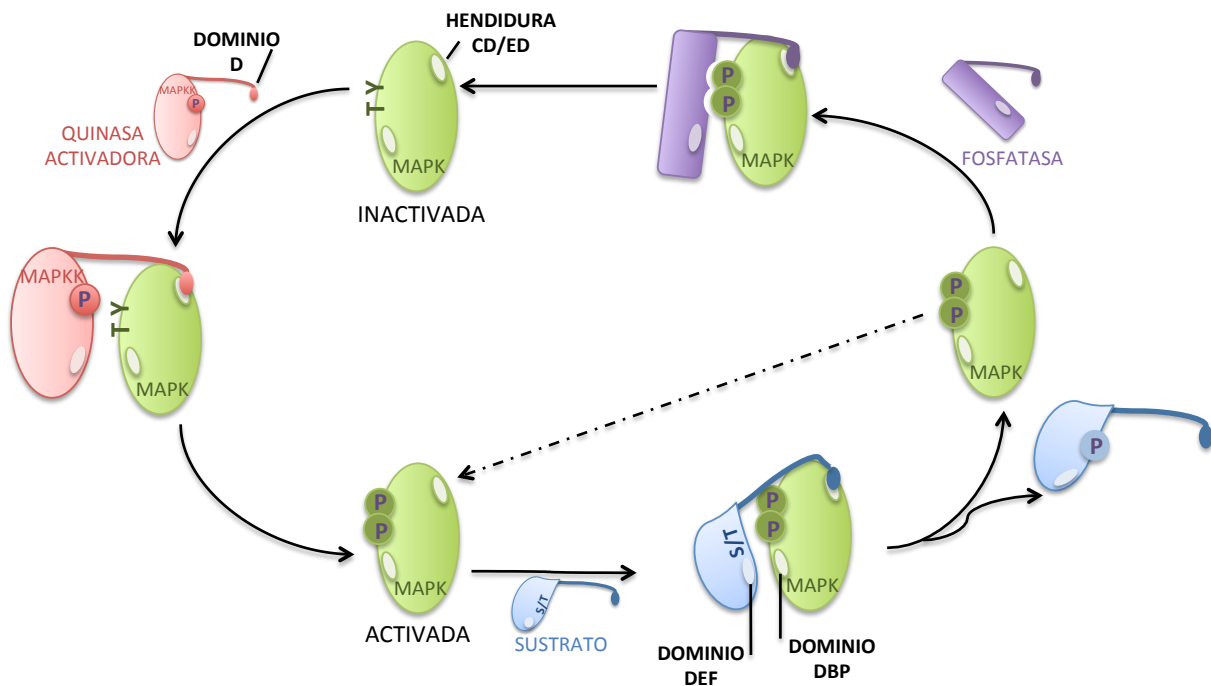


Figura 1.11. Mecanismos de unión entre los componentes de las cascadas de señalización. Una MAPKK, mediante su dominio D, interacciona con la hendidura formada por los dominios ED/CD de la MAPK. Al lado opuesto del dominio CD/ED se encuentra el dominio DBP que permite la interacción con el dominio DEF de algunas proteínas como sustratos o fosfatasa. Una vez activa, la MAPK se disocia de su unión con la MAPKK, pudiendo ahora interactuar con algún sustrato. Se produce entonces la fosforilación del sustrato y la disociación de éste. Posteriormente, la MAPK puede ser diana de fosfatasa específicas que catalizan la desfosforilación de los sitios de activación. El sitio de unión (CD/ED) para quinasas, sustratos y fosfatasa es común, y estas uniones son mutuamente excluyentes.

3. RUTA DE SEÑALIZACIÓN RAS-ERK

Una de las vías de señalización mejor caracterizada, basada en la activación de MAPKs, es la ruta de ERK tras la activación de Ras. Es una ruta muy estudiada, entre otros motivos, por estar involucrada en procesos biológicos tan importantes como proliferación, desarrollo, supervivencia y migración. De hecho, es la ruta considerada prototipo de las cascadas de señalización, con más de seis niveles moleculares de activación secuencial, que permiten finalmente la amplificación y regulación de la señalización desde la membrana celular hasta el núcleo.

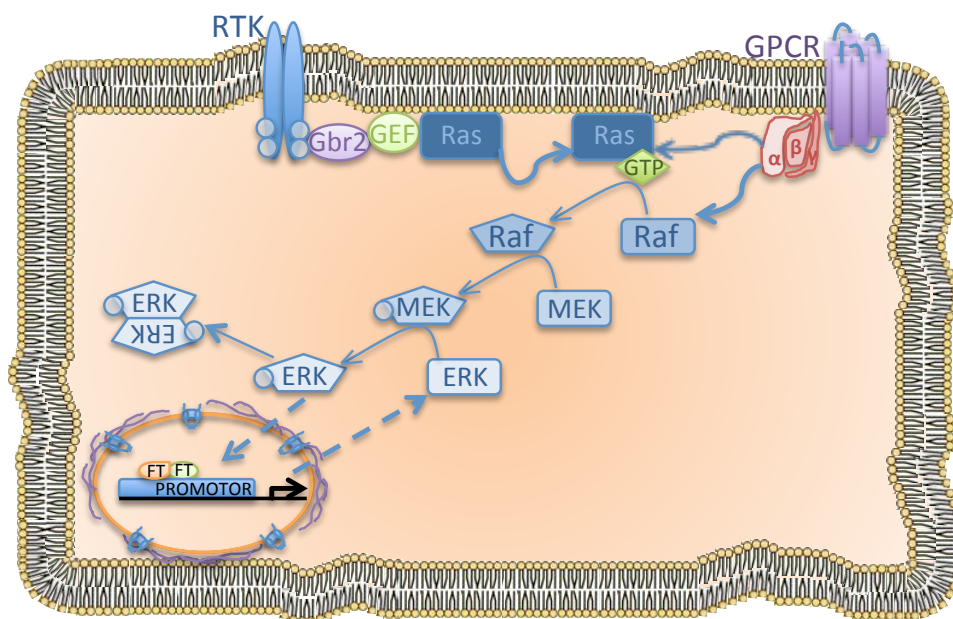


Figura 1.12. Esquema de la ruta de transducción de señales Ras-ERK. La cascada de señalización comienza con la activación de los receptores (RTK o GPCR) en presencia de determinados estímulos. Como consecuencia se desencadena una serie de activaciones y fosforilaciones en cascada, dando lugar finalmente a la fosforilación de ERK. Una vez fosforilado, ERK puede quedarse en el citoplasma donde presenta algunos sustratos, o bien translocarse al núcleo para activar los sustratos nucleares.

La activación de la ruta Ras-ERK comienza con la unión de un determinado ligando o factor mitogénico a su receptor de membrana específico, iniciando así una serie de eventos celulares que resultan en la activación de la cascada de ERK. En primer lugar se activa la proteína G pequeña denominada Ras, gracias a la acción de una serie de proteínas adaptadoras y proteínas activadoras. Una vez Ras es activada, es capaz de activar una MAPKKK, que en esta ruta puede ser una isoforma de la familia de proteínas Raf (Howe et al.,

1992; Kyriakis et al., 1992), o bien otras quinasas como es el caso de Mos (Nebreda et al., 1993) o Tpl-2 (Salmeron et al., 1996). La MAPKKK activa fosforila en un residuo de serina a una determinada MAPKK pudiendo ser en esta cascada MEK1 o MEK2, que finalmente podrán fosforilar en residuos de treonina y tirosina, activando así a las quinasas ERK1 o ERK2. Una vez activas, ERK1/2 puede quedarse en el citoplasma, o ser translocada al núcleo, donde puede fosforilar diferentes sustratos como factores de transcripción, implicándose de esta manera en la regulación de la expresión génica (Figura 1.12).

3.1. Receptores de membrana

La ruta Ras-ERK es activada, en primer término, por diferentes hormonas, citoquinas o factores de crecimiento, como es el caso de PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), EGF (*Epidermal Growth Factor*) y NGF (*Nerve Growth Factor*). Aunque también puede ser activada por citoquinas, estrés osmótico y desorganización de microtúbulos. Existe, por lo tanto, una gran variedad de estímulos extracelulares e intracelulares que activan la ruta Ras-ERK, y cada uno de esos estímulos pueden mediarse por determinados receptores de la membrana plasmática. Estos receptores pueden clasificarse en dos grandes familias:

- Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs): son receptores a los que se unen ligandos como citoquinas, hormonas y mitógenos o también pueden ser estimulados por estrés osmótico. Se trata de receptores con siete dominios transmembrana, que tras su activación sufren un cambio conformacional y se unen a proteínas G heterotriméricas. Con esta unión se consigue la activación de la proteína G y la disociación de sus subunidades α y β/γ (Bourne, 1997; Gudermann et al., 1997). Normalmente, la activación de receptores acoplados a proteínas G conlleva la estimulación de algunas enzimas como son la adenilato ciclasa o la fosfolipasa C. Se produce entonces la generación de segundos mensajeros como AMP cíclico o DAG (diacilglicerol), que finalmente activan a algunas proteínas, como PKC (proteína quinasa C) o PKA (proteína quinasa A). Estas enzimas pueden iniciar alguna cascada de señalización, entre ellas la vía Ras-ERK (Figura 1.13). Además, hoy en día se sabe que la señal generada por este tipo de receptores puede alimentar a diferentes niveles la ruta de señalización Ras-ERK (Caunt et al., 2006). De hecho, una vez activada la proteína

heterotrimérica y producida la disociación de sus subunidades, el dímero formado por las subunidades β/γ es capaz de activar a la proteína quinasa Src. Así se inicia la activación del receptor de EGF, activando así la ruta Ras-ERK (Luttrell et al., 1997).

- Receptores con actividad tirosina quinasa (RTKs): son receptores de membrana formados por tres dominios bien diferenciados; un dominio extracelular (N-terminal) implicado en la interacción con los ligandos específicos, un dominio intracelular responsable de la actividad tirosina quinasa (C-terminal) además de regiones reguladoras, y un dominio transmembrana formado por una única hélice transmembrana. Los receptores RTKs son activados por unión de un ligando a su dominio extracelular, esta unión favorece la dimerización de los receptores y su activación (Ullrich and Schlessinger, 1990), tras la autofosforilación/transfosforilación del dominio tirosina quinasa. Además, también se produce fosforilación de otras tirosinas reguladoras que favorecen la unión a proteínas adaptadoras, sirviendo de puente en la ruta de señalización.

Los receptores RTKs son responsables del inicio de muchas vías de señalización (MAPK, PI3K, STAT), y más de la mitad de los receptores RTKs están implicados en cáncer humano cuando se encuentran mutados o sobre-expresados (Forbes et al., 2010). Además de ser responsables de otras enfermedades como la diabetes o la inflamación.

Dentro de este grupo se encuentran los receptores para diferentes factores de crecimiento como EGF, HGF, HRG, VEGF y PDGF entre otros.

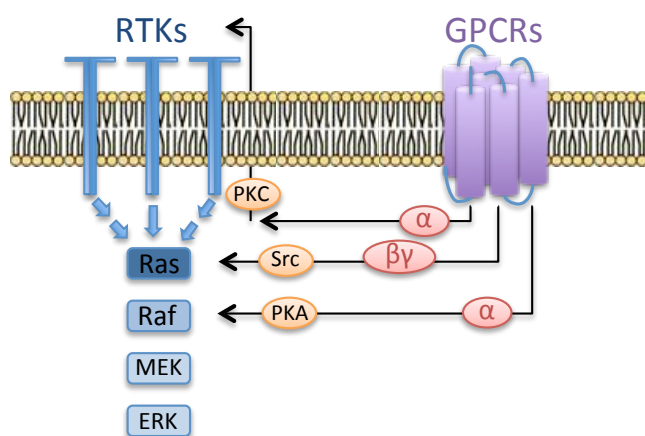


Figura 1.13. Esquema de la activación de ERK mediada por GPCRs y RTKs. La señalización desde GPCRs puede converger con las señales generadas por RTKs, participando en la transducción de señales. La interconexión entre ambos receptores es dependiente de otras proteínas como PKC, PKA o Src que participan en distintos niveles de la cascada de las MAPK. (Adaptado de Caunt et al., 2006)

3.1.1. Activación de la ruta Ras-ERK por TPA y LPA

TPA (*2-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate*) es un éster de forbol, que funciona como análogo de la molécula de DAG (Diacilglicerol), mimetizando alguna de sus funciones. Se sabe que TPA es capaz de activar la proteína PKC (proteína quinasa C), uniéndose a su dominio C1 donde presenta un sitio de unión para DAG y análogos. Una vez activa, PKC es capaz de iniciar cascadas de señalización, activando potentes activadores de la transcripción génica, aumentando la expresión de algunos oncogenes (Yamasaki et al., 2009). Las funciones de PKC muchas veces son dependientes de la vía de señalización Ras-ERK. Por ejemplo, se ha demostrado, en fibroblastos 3T3, que tras la estimulación de las células con TPA se produce un aumento de la proliferación dependiente de la ruta Ras-ERK, tras la activación de PKC (Schönwasser et al., 1998).

Por otra parte, el ácido lisofosfatídico o **LPA** a través de su interacción con receptores acoplados a proteína G, es capaz también de activar la ruta Ras-ERK. LPA es considerado el ligando prototipo de los receptores acoplados a proteína G, y es capaz de mediar la activación de diferentes enzimas como PLC, adenilato ciclasa o la activación de GTPasas pequeñas como Ras, Rho o Rac. Los receptores de LPA se dividen en 4 tipos: LPA₁, LPA₂, LPA₃ y LPA₄ (que pueden unir múltiples proteínas G heterotriméricas), aunque son los receptores LPA₁ y LPA₃ los que median la activación de Ras, regulando principalmente la proliferación celular (Radeff-Huang et al., 2004). Está descrito que LPA puede mimetizar a EGF en la estimulación rápida de Ras dependiendo del tipo celular (van Corven et al., 1993). Se cree que el receptor GPCR tipo Gi puede estimular la actividad tirosina quinasa de algún intermediario, que conlleve finalmente la activación de Ras. Como candidatos a estos intermediarios se encuentra la proteína Src (Luttrell et al., 1995) y el receptor de EGF, que se puede activar por transactivación (Daub et al., 1996).

3.1.2. Activación de la ruta Ras-ERK por EGF y HRG. Familia de receptores ErbB

La familia de receptores tirosina quinasa (RTKs) está formada, en humanos, por 20 subfamilias de receptores, entre los cuales podemos encontrar los receptores: ErbB, PDGFR y VEGFR entre otros. La subfamilia **ErbB** consta de 4 miembros:

- EGFR; también llamado ErbB1/HER1
- ErbB2/Neu/HER2
- ErbB3/HER3
- ErbB4/HER4

Se trata de una familia de receptores de gran importancia en la transducción de señales, responsables de iniciar muchas de las cascadas de señalización celulares. De hecho, la desregulación de su expresión, sobre todo en el caso de ErbB1 y ErbB2, tiene graves consecuencias como el desarrollo de numerosos tumores humanos (Borg et al., 1994; Lemmon and Schlessinger, 2010; Muss et al., 1994).

El mecanismo por el cual ciertos ligandos activan a sus receptores específicos no está muy claro. En función del tipo de receptor, el mecanismo puede ser diferente. Dentro de la familia de receptores ErbB, se cree que la unión de los ligandos específicos al dominio extracelular del receptor, induce la homo- o hetero- dimerización de forma indirecta, es decir, cuando el ligando se une al dominio extracelular, induce un cambio conformacional de la molécula de receptor. De esta manera, se exponen sitios de dimerización favoreciendo la formación de homo/hetero-dímeros (Burgess et al., 2003).

Todos ellos, salvo ErbB3, son capaces de homodimerizar, transactivarse e iniciar cascadas de señalización por sí mismos, aunque es frecuente encontrar heterodímeros, formados por cualquiera de los tipos de receptor ErbB, dependiendo del estímulo extracelular (Figura 1.14). Además, los ligandos de los receptores ErbB, portan un dominio *EGF like* que confiere la especificidad de unión a los receptores (Tzahar et al., 1997). El único receptor que no tiene un ligando específico conocido es ErbB2, sin embargo, este receptor participa en la formación de heterodímeros, favoreciendo la diversidad de la señal (Figura 1.14). De hecho, es el compañero preferido para la dimerización (Olayioye et al., 2000; Tzahar et al., 1996) funcionando como potenciador de la señal del resto de receptores ErbB (Graus-Porta et al., 1995; Karunagaran et al., 1996). Los heterodímeros formados por ErbB2 presentan una tasa de endocitosis más lenta, y una tasa de reciclaje a la superficie celular más rápida.

En la siguiente figura se muestran los ligandos específicos para cada uno de los receptores y los dímeros formados preferentemente:

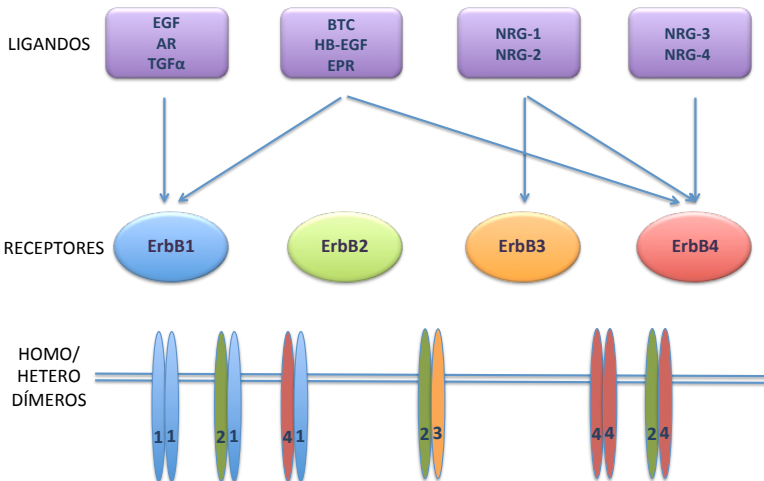
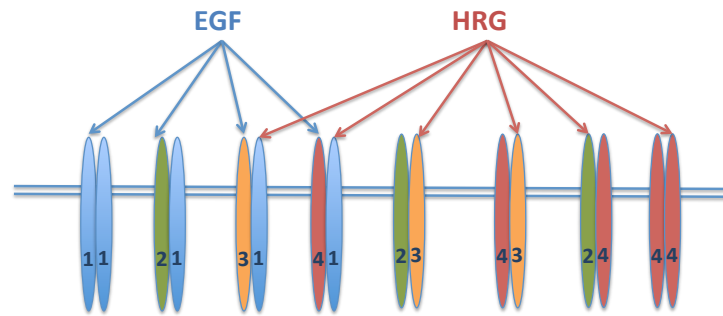


Figura 1.14. Representación de los ligandos específicos para cada uno de los receptores de la familia ErbB así como alguna de las uniones más frecuentes entre los receptores. El receptor ErbB2 no tiene ningún ligando conocido, pero es el compañero preferido para la formación de heterodímeros. El homodímero de ErbB3 no señaliza, ya que su actividad quinasa es deficiente. EGF (*Epidermal Growth Factor*); AR (*amphiregulin*); TGFα (*Transforming Growth Factor-α*); BTC (*Betacellulin*); HB-EGF (*Heparin-Binding EGF*); EPR (*Epiregulin*); NRG (*Neu differentiation factor*).

A pesar de la gran homología existente entre los distintos receptores de esta familia, y que los sitios de unión a diferentes proteínas son similares, la red de señalización que desemboca cada uno de ellos es muy específica. De tal manera que, dos ligandos diferentes como puede ser EGF y NRG-1 (también llamado heregulina o HRG), pueden estimular la dimerización de los receptores de distinta manera (Figura 1.15). Como consecuencia se produce distintos patrones de señalización, que se traducen en una regulación de la expresión génica diferente. Esto es así, por ejemplo, en las células de cáncer de mama, MCF7, que expresan de manera endógena todos los receptores de la familia ErbB, en las que la estimulación con EGF se traduce en una inducción de la proliferación celular, mientras que, si las células son estimuladas con HRG, éstas se diferencian, observándose un cambio morfológico en ellas como consecuencia de una acumulación lipídica (Nagashima et al., 2007). Esto puede ser explicado en base a la afinidad de cada uno de los ligandos por determinados receptores: EGF muestra mayor afinidad por el receptor ErbB1 mientras que HRG tiene mayor afinidad de unión a ErbB3 y ErbB4, además de transactivar a ErbB2, todo ello con la posibilidad de formar heterodímeros ErbB2/ErbB3, que es la unidad más oncogénica a este nivel (Carraway and Cantley, 1994; Carraway et al., 1994).

Figura 1.15. Representación de los homo/heterodímeros formados bajo estimulación con EGF y HRG. En células MCF7 la estimulación con EGF o HRG genera diferentes patrones de expresión génica y como consecuencia las células proliferan o se diferencian respectivamente.



Una vez se produce la activación de los receptores, las tirosinas fosforiladas de sus dominios intracelulares, sirven de sitio de unión para **proteínas adaptadoras** que portan en su secuencia los motivos SH2 (*Src homology 2*) o PTB (*PhosphoTyrosin Binding*). A este grupo pertenecen proteínas como Shc (*SH2 domain-containing protein*) o Grb2 (Growth factor Receptor Binding protein 2) (van der Geer et al., 1995). La proteína Grb2, además del motivo SH2, también tiene dos motivos SH3 (*Src homology 3*) que le facilitan la interacción con proteínas como, por ejemplo, los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs) reconociendo secuencias ricas en prolina (Lowenstein et al., 1992). Un ejemplo de GEF, muy caracterizado dentro de esta ruta, es la proteína SOS (*son of sevenless*), que tiene un dominio PH que le permite la interacción con los lípidos de la membrana, un dominio catalítico (GEF) y el sitio de unión a Grb2. Como resultado de la unión con Grb2, Sos es reclutada a la cara citosólica de la membrana plasmática, desde donde es capaz de ejercer su función. El papel de este tipo de proteína consiste en favorecer el intercambio de GDP por GTP, activando de este modo las GTPasas diana. En este caso, Sos será el responsable de la activación de la proteína Ras, que pasará a tener unido GTP en lugar de GDP (Chardin et al., 1993). La formación del complejo Grb2/Sos puede ser un punto de control de la señal, pudiendo ser reguladas por retroalimentación negativa por ERK o desde el propio receptor (Chen et al., 1996; Holt et al., 1996) modulando así las cinéticas de activación del resto de componentes de la cascada.

3.2. Proteínas Ras

La familia Ras es una familia de proteínas formadas por cuatro isoformas: H-Ras, N-Ras, K-Ras4A y K-Ras4B. Pertenecen a la superfamilia de proteínas pequeñas de unión a GTP (o GTPasas), funcionando como interruptores moleculares. Juegan un papel muy importante en

diferentes procesos biológicos como proliferación, diferenciación, apoptosis, supervivencia y adhesión entre otros (Malumbres and Barbacid, 2003). De hecho, la importancia en la fisiología de la célula se pone de manifiesto cuando su función está desregulada, dando lugar a diferentes patologías. Se ha estimado que un 30% de los tumores en humanos muestran alguna mutación en Ras (Roberts and Der, 2007).

Alguna de las características comunes en estas proteínas son:

- tienen un sitio de unión para nucleótidos de guanina.
- poseen actividad hidrolítica de GTP intrínseca.
- deben estar unidas a membranas para realizar su función.

Las proteínas de la familia Ras pueden ciclar entre un estado activo o unido a GTP, y un estado inactivo o unido a GDP. Este ciclo se encuentra regulado por dos tipos de proteínas:

- **GEFs** o factores de intercambio de nucleótidos de guanina: que favorecen el intercambio de GDP a GTP, activando así a Ras (Figura 1.17). Dentro de esta familia podemos encontrar a Sos, Ras GRF y Ras GRP.

- **GAPs** o proteínas activadoras de la actividad GTPasa: que potencian la actividad GTPasa intrínseca de Ras, hidrolizando el GTP en GDP más fosfato, pasando a la forma inactiva de la proteína (Figura 1.17). Dentro de esta familia de proteínas se encuentran p120GAP o NF1-GAP (Neurofibromina 1).

3.2.1. Estructura de las proteínas Ras

Existen tres genes que codifican para proteínas Ras, *h-ras*, *n-ras* y *k-ras*, que codifican para cuatro proteínas: H-Ras, N-Ras, K-Ras4A y K-Ras4B, estas dos últimas se generan por *splicing* alternativo del gen *k-ras*. Estas 4 proteínas son idénticas en los primeros 86 aminoácidos, y presentan una homología del 80% en los siguientes 78 residuos. Es en el extremo C-terminal donde presentan diferencias estructurales, recibiendo por ello el nombre de región hipervariable (HVR) (Figura 1.16).

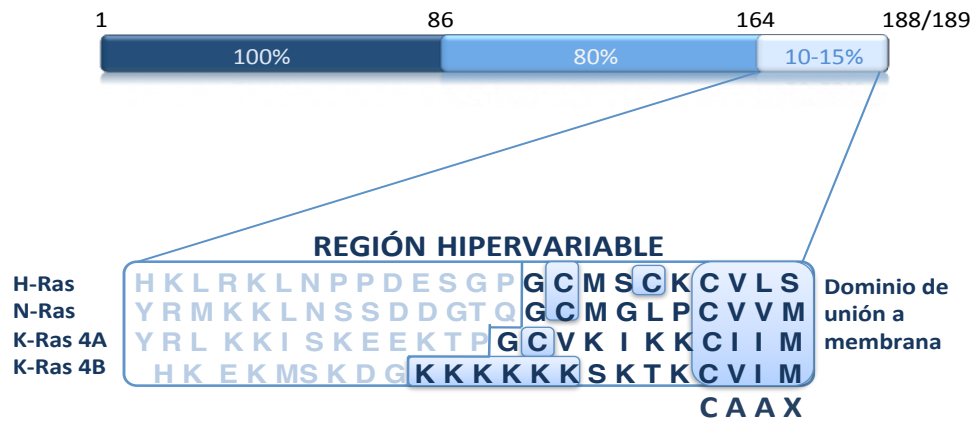


Figura 1.16. Representación esquemática de la secuencia de las isoformas de Ras. En detalle se representa el extremo carboxilo terminal donde reside la región hipervariable (HVR) y la secuencia consenso CAAX. Cada una de las letras corresponde a la abreviatura de los aminoácidos correspondientes.

Estructuralmente, Ras contiene una serie de segmentos discontinuos que comprenden los residuos 5-63, 77-92 y 109-123, esenciales para su función, y además un dominio efector (en la región comprendida por los residuos 32-40) que es donde reside su actividad biológica. Por otra parte, Ras presenta dos regiones denominadas *switch* I (del aminoácido 30 al 38) que es responsable de la unión al efector y a proteínas GAPs, y *switch* II (del aminoácido 60 al 76) implicado en la interacción con proteínas GEFs. Estas dos regiones son de gran importancia para su activación y su función, encontrándose cercanas al fosfato y del GTP. En función del nucleótido de guanina unido a Ras, las regiones *switch* I y II exhiben diferentes conformaciones estructurales, afectando a la unión de proteínas reguladoras y efectoras (Ma and Karplus, 1997; Malumbres and Pellicer, 1998) (Figura 1.17).

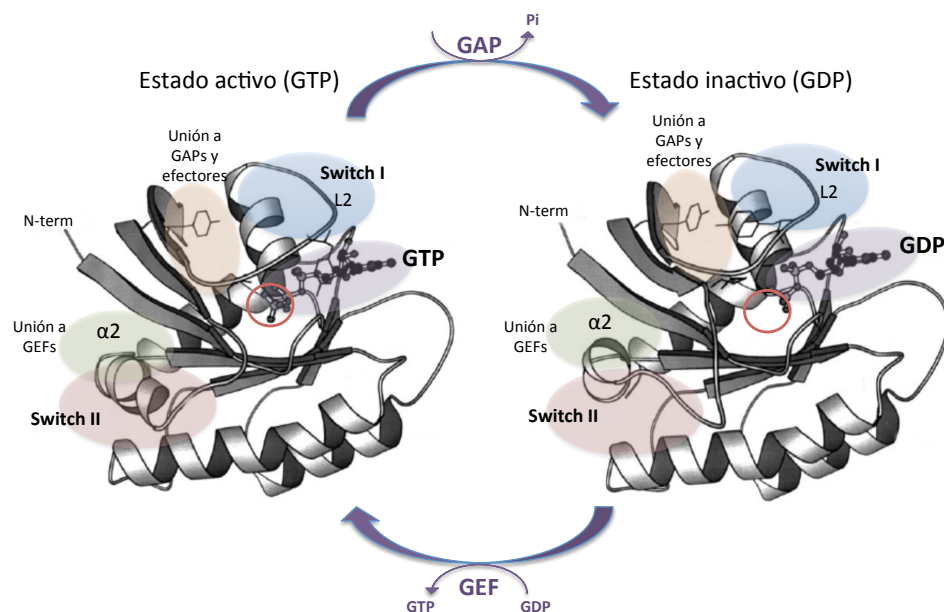


Figura 1.17. Cambio conformacional de la estructura de Ras en función de su estado de activación. Se indican los sitios de unión para el nucleótido de guanina (morado), GEFs (verde) y GAPs y efectores (naranja). Además de las regiones *switch* I y II (azul y rojo respectivamente). (Modificado de Ma & Karplus, 1997).

3.2.2. Diferencias entre las isoformas de Ras: H-Ras, N-Ras y K-Ras(4B)

A pesar de las homologías estructurales, y de compartir algunos reguladores y efectores, se ha comprobado en varias ocasiones que las funciones de las distintas isoformas de Ras no son redundantes. De hecho, uno de los datos más relevantes a este respecto se trata de la frecuencia de mutaciones de alguna de las isoformas de Ras en diferentes tumores humanos

| Tipo Tumor | Frecuencia | Isoforma |
|---------------------------|------------|----------|
| Páncreas | 90 | K |
| Tiroides | 55-60 | H, K, N |
| Colon | 50 | K |
| Testículo | 45 | K, N |
| Pulmón | 35 | K |
| Hígado | 30 | N |
| Leucemia Mieloide Crónica | 30 | N |
| Piel | 15 | H, N |
| Riñón | 10 | H |
| Vejiga | 10 | H |

Downward, 2003
Dhillon et al., 2007

(Figura 1.18). Por ejemplo, las mutaciones en la isoforma K-Ras son más frecuentes en tumores de pulmón, colon o páncreas, mientras que las mutaciones en H-Ras aparecen más frecuentemente en tumores del tracto urinario o a nivel oral. Además, las leucemias y melanomas muestran una mayor tasa de mutaciones en la isoforma N-Ras (Dhillon et al., 2007; Karnoub and Weinberg, 2008).

Figura 1.18. Relación de la frecuencia de mutaciones presentes en distintos tipos tumorales humanos en función de la isoforma de Ras responsable. La frecuencia es representada como el porcentaje de casos en los cuales una o varias de las isoformas de Ras es responsable de cada tipo tumoral. K: K-Ras; N: N-Ras; H: H-Ras.

Además de las mutaciones implicadas en el desarrollo de ciertos tumores, también existen diferencias en cuanto a la reprogramación génica generada en función de la señalización de las isoformas de Ras. Por ejemplo, se ha observado que en fibroblastos transformados, N-Ras se encuentra regulando la adhesión celular, mientras que K-Ras coordina la movilidad de las mismas (Fotiadou et al., 2007). Esto nos indica que, aunque las diferencias se hacen evidentes mucho más tarde, es en los estadios tempranos de la carcinogénesis donde las isoformas de Ras parecen estar jugando diferentes papeles.

Otra de las diferencias funcionales entre las isoformas de Ras, se basa en la sensibilidad a la actividad de las proteínas GEFs y GAPs. Por ejemplo, el factor de intercambio de nucleótidos de guanina, SMG, funciona de forma específica sobre la isoforma K-Ras y no lo hace sobre H-Ras y N-Ras (Mizuno et al., 1991). Y por otra parte, se sabe que las proteínas GAP también pueden presentar diferentes afinidades en función de la isoforma de Ras, por ejemplo, la proteína NF1-GAP es cuatro veces más efectiva en la regulación de H-Ras que en

la de N-Ras (Bollag and McCormick, 1991). También existen diferencias en cuanto a los efectores de las isoformas de Ras, por ejemplo, el grupo de Hancock ha demostrado que K-Ras muestra mayor afinidad y actividad sobre Raf-1 que la isoforma H-Ras, mientras que H-Ras tiene mayor potencial de activación sobre PI3K que K-Ras (Yan et al., 1998).

Pero, sin duda, una de las mayores evidencias en cuanto a las diferencias funcionales entre las isoformas Ras, tiene lugar durante el desarrollo. Se sabe que existen diferencias en los patrones de expresión durante el desarrollo de ratón, de tal manera que, mientras H-Ras apenas modifica su expresión desde el día 10 hasta el día 19 de desarrollo, N-Ras y K-Ras disminuyen su expresión drásticamente (Leon et al., 1987). Las diferencias entre las isoformas de Ras durante el desarrollo se pone de manifiesto al deleccionar alguno de los genes *ras* en ratones: los embriones de ratones *knockout* de K-Ras4B mueren a los 12,5 días de desarrollo (Koera et al., 1997), mientras que los ratones *knockout* de N-Ras, K-Ras4A y H-Ras son capaces de desarrollarse con normalidad (Plowman et al., 2003; Umanoff et al., 1995) incluso en deleciones combinadas de H-Ras y N-Ras (Esteban et al., 2001). Aunque la ausencia de las isoformas H-Ras y N-Ras tienen consecuencias en el ratón adulto: la ausencia de N-Ras en los ratones afecta, en parte, al desarrollo del sistema inmune y de los linfocitos T (Pérez de Castro et al., 2003); y la deleción del gen *hras* disminuye la formación de tumores cuando se induce carcinogénesis de piel (Ise et al., 2000).

Todas estas diferencias funcionales serían difíciles de explicar en base a los dominios catalíticos de Ras, ya que sus secuencias son idénticas en los sitios que marcan las interacciones con efectores y reguladores (*switch I y II*). Es en el extremo C-terminal donde residen las mayores diferencias estructurales, en la denominada región hipervariable (HVR). La región HVR es diana de diferentes modificaciones post-traduccionales que marcarán la distinta ubicación de las isoformas Ras dentro de la célula tanto a nivel de la membrana plasmática como de los microdominios subcelulares.

3.2.3. Modificaciones post-traduccionales y localización subcelular de las isoformas de Ras

Hace unos años se pensaba que Ras señalizaba únicamente desde la membrana plasmática. Hoy en día se sabe que pueden ocupar diferentes microdominios, y que se puede

encontrar también en endomembranas, desde donde es capaz de señalar. Las modificaciones post-traduccionales, que permiten anclar a Ras a las membranas lipídicas, son las responsables de la existencia de Ras en diferentes sitios de la célula.

Las proteínas Ras son sintetizadas en ribosomas libres como proteínas hidrofílicas, portando en el extremo C-terminal un motivo conservado denominado caja CAAX, que está formado por la cisteína en posición 186 (C), dos aminoácidos alifáticos (A) y un aminoácido cualquiera (X). La cisteína de este motivo es la primera diana de las modificaciones, ya que es reconocida por una farnesil-transferasa o geraniltransferasa que cataliza la unión de un grupo farnesilo o geranilo (Zhang and Casey, 1996), aumentando así la hidrofobicidad y permitiendo la asociación transitoria al retículo endoplasmático (Zhang et al., 1997). Una vez prenilada, la enzima Rce1 (*Ras converting enzyme-1*) proteoliza los residuos AAX (Boyartchuk et al., 1997; Kim et al., 1999; Otto et al., 1999). A continuación, la cisteína 186 es metilada por Icmt (*Isoprenylcysteine carboxyl methyl-transferase*) (Casey, 1995; Dai et al., 1998). Todos estos procesos post-traduccionales aumentan la hidrofobicidad de las proteínas y son suficientes para poder estar ancladas a membranas lipídicas pero, para una asociación más estable, las proteínas Ras necesitan una segunda señal. En el caso de H-Ras, N-Ras y K-Ras4A, una vez en el aparato de Golgi, la enzima DHHC9 cataliza la unión de grupos palmitoil en la cisteína 184 (y en el caso de H-Ras también en la Cys181) (Mitchell et al., 2006; Swarthout et al., 2005), que aumentará la afinidad de Ras por las membranas permitiendo un anclaje más estable (Figura 1.19). En el caso de la proteína K-Ras4B, la segunda señal está proporcionada por la región polibásica del extremo C-terminal. En su región carboxilo terminal presenta una secuencia rica en lisinas, que aportan una carga positiva que permite una interacción electrostática con los fosfolípidos de la membrana plasmática (Hancock et al., 1990) (Figura 1.19). Una vez procesada la región hipervariable, H-Ras, N-Ras y K-Ras4A se dirigen a la membrana plasmática mediante vesículas generadas en el Aparato de Golgi (Chiu et al., 2002a; Prior and Hancock, 2001; Prior et al., 2001; Wolfman, 2001), mientras que K-Ras4B utiliza la red de microtúbulos (Chen et al., 2000; Thissen et al., 1997).

Tras todo el proceso de modificaciones podemos encontrar proteínas Ras en regiones distintas de la membrana plasmática. Por una parte, H-Ras puede encontrarse tanto en membrana desordenada (regiones fluidas ricas en fosfolípidos insaturados) como en balsas lipídicas o *lipid rafts* (regiones enriquecidas en colesterol y glicosfingolípidos) caveolares y no

caveolares (Prior et al., 2001). En el caso de N-Ras, puede encontrarse tanto en membrana desordenada como en balsas lipídicas no caveolares (Matallanas et al., 2003). Tras la eliminación de colesterol de la membrana plasmática y observando que la activación de H-Ras se veía afectada y sin embargo la actividad de K-Ras no lo hacía, se determinó que K-Ras se encuentra sólo en membrana desordenada (Roy et al., 1999) pudiendo migrar fácilmente por ella (Niv et al., 2002). Además, durante su procesamiento hacia la membrana plasmática, las proteínas Ras pueden señalizar desde las endomembranas por dónde pasan (Bivona et al., 2003; Gomez and Daniotti, 2007; Roy et al., 2002). Pero no todas las poblaciones de Ras en endomembranas son transitorias, también se han encontrado poblaciones estables y funcionales tanto en Golgi como en el retículo endoplasmático (Chiu et al., 2002a).

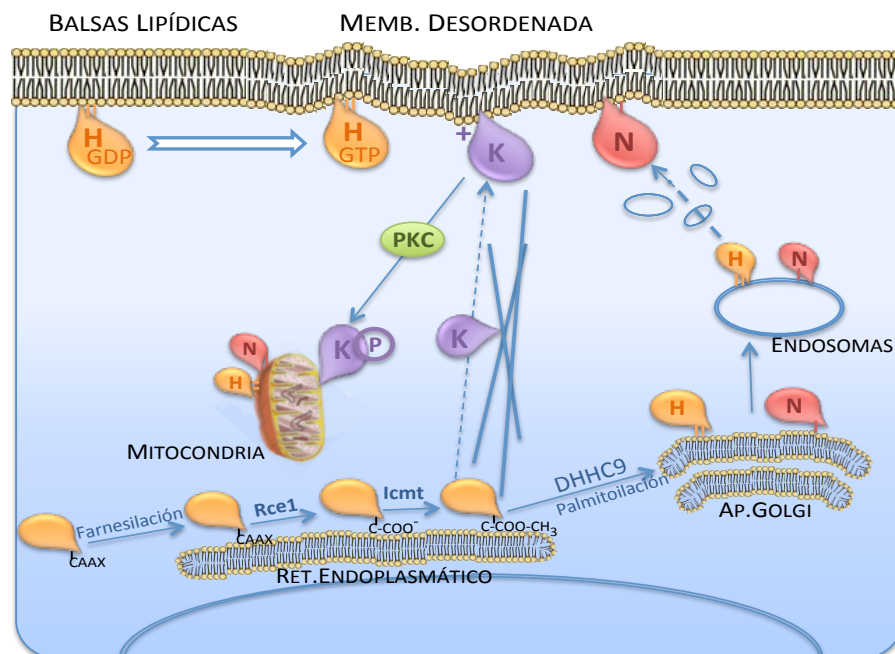


Figura 1.19. Esquema de las modificaciones post-traduccionales sufridas durante la maduración de las proteínas Ras y de las posibles localizaciones subcelulares de las tres isoformas más abundantes. Tras la prenilación, proteólisis y metilación de la cisteína 186 en el retículo endoplasmático, las isoformas H (naranja) y N (rojo) pasan por el Ap.Golgi donde son palmitoiladas en la cisteína 184 (la isoforma H puede tener palmitoilada la cisteína 181 también), terminando en la membrana plasmática a través de endosomas. En el caso de K-Ras (morado), su región polibásica sirve de interacto electrostático con los fosfolípidos de membrana plasmática. Además puede ser encontrada en mitocondria tras ser fosforilada por PKC (verde). Por otra parte, existe tráfico entre microdominios de membrana plasmática en función del estado de activación.

No sólo las modificaciones post-traduccionales condicionan la ubicación de las isoformas de Ras, sino que el estado de activación de Ras también afecta a la distribución dentro de la

membrana plasmática. Si Ras se encuentra unido a GDP, en su estado inactivo, presenta mayor afinidad por la región de membrana plasmática menos fluida (*lipid rafts*) y tras la activación de la proteína, con el consecuente cambio conformacional, la proteína se encuentra preferentemente anclada a la membrana plasmática desordenada (Figura 1.19). Según esto, los sitios *switch* I y II también pueden intervenir en la unión a la membrana plasmática, o bien que el cambio conformacional que tiene lugar en la proteína tras su activación, puede favorecer más la unión a membrana plasmática desordenada (Prior et al., 2001).

3.2.4. Señalización de Ras desde localizaciones subcelulares

En función de la localización subcelular de Ras, los mecanismos de activación y regulación son específicos, y puede hacer que Ras sea responsable de una gran variabilidad en señalización y en funciones biológicas. Ras puede ser regulada por diferentes GEFs en función de la localización: mientras que Ras-GRP es específico en la activación de Ras desde el Aparato de Golgi (Bivona et al., 2003; Caloca et al., 2003), Ras-GRF y Sos lo son desde retículo endoplasmático (Arozarena et al., 2004). Es más, en función del estímulo extracelular recibido, la activación de Ras puede localizarse en distintos sitios celulares. Este el caso de la activación de Ras en células T del sistema inmune, donde Ras es activado en el aparato. de Golgi de una manera dependiente de PLC γ y de calcio, mientras que si la activación es en respuesta a DAG, la activación de Ras ocurre en la membrana plasmática (Mor et al., 2007).

También es de gran importancia la especificidad a la hora de desactivar Ras en los diferentes sitios en función del contexto celular, existiendo proteínas GAP con localización específica (Grewal et al., 2005; Sharma, 1998) y otras ubicuas (Nordlund et al., 1993; Roudebush et al., 1997).

Uno de los motivos de la variabilidad de la señalización se debe a la diferente disponibilidad de efectores dependiendo de la localización subcelular. En nuestro laboratorio se demostró que cuando H-Ras se encuentra en estado activo utiliza Raf, PI3K y RalGDS como efectores desde el retículo endoplasmático y *lipid rafts*, mientras que si lo hace desde la membrana desordenada la señalización hacia PI3K es mucho menor. La señalización desde el aparato de Golgi es básicamente a través del efector RalGDS y no de ERK (Matallanas et al.,

2006). En concreto, dentro de la ruta de señalización Ras-ERK, la disponibilidad de Raf, en las diferentes localizaciones subcelulares, afecta a la señalización mediada por Ras en distintos microdominios.

3.3. Proteínas ERK1/2

La familia de proteínas ERK está constituida principalmente por dos proteínas quinasas: ERK1 (44KDa) y ERK2 (42KDa). Además, también se han descrito otras formas alternativas de *splicing* como por ejemplo ERK1b (Yung et al., 2000), ERK1c (Aebersold et al., 2004) y ERK2b (Gonzalez et al., 1992). Estas MAPKs son consideradas el centro de la cascada de señalización de la ruta Ras-ERK, siendo el siguiente nivel de transducción de la señal, tras su activación mediada por MEKs.

Existe una gran homología en las secuencias de ERK1 y ERK2 (90%), comparten muchos de los sustratos y mecanismos de regulación, y son expresados en todos los tejidos (Miyata and Nishida, 1999), por lo que en un principio se consideró que eran proteínas redundantes. Sin embargo, existen diferencias entre ellas como su diferente patrón de expresión en función del tejido, así como el efecto observado tras deleccionar la expresión de cada uno de sus correspondientes genes y la generación de los respectivos ratones *knockout*. Los ratones *knockout* para ERK1 crecen con normalidad y son fértiles, aunque muestran alterado el aprendizaje, la maduración de timocitos y la diferenciación preadipocítica (Bost et al., 2005; Mazzucchelli et al., 2002; Pagès et al., 1999), mientras que los ratones *Erk2* *-/-* resultan letales embrionarios, a consecuencia de defectos durante la formación de la placenta (Saba-El-Leil et al., 2003; Yao et al., 2003), de lo que se deduce que sus funciones no son del todo solapantes. Pero por otro lado, también son isoformas redundantes en ciertos aspectos, ya que la ausencia de ERK1 en, al menos, dos especies de vertebrados (*Gallus gallus* y *Xenopus tropicalis*) puede ser compensada por ERK2 (Lefloch et al., 2008).

3.3.1. Estructura

Las proteínas ERKs, de forma similar a otras proteínas quinasas, son proteínas globulares formadas por dos lóbulos bien definidos: un gran lóbulo C-terminal compuesto fundamentalmente por hélices α , y un pequeño lóbulo N-terminal rico en láminas β y dos

hélices α , unidos por una región que comprende el centro activo de la proteína. La región de activación reside en el lóbulo C-terminal y consta del sitio de unión a magnesio y un sitio de fosforilación, cuya secuencia consenso es TEY (T183-Y185), que recibe el nombre de lazo de activación o *activation loop*. Además, fuera de la región catalítica pero dentro del lóbulo C-terminal, se encuentran sitios de unión a los sustratos y proteínas reguladoras, como los dominios CD y DBP. Por otra parte, en el lóbulo N-terminal, la estructura forma una hendidura, a modo de bolsillo, que participa en la interacción con el anillo de adenina del ATP. En este mismo lóbulo también se encuentra el dominio de unión a sustratos ED, formado por dos aminoácidos neutros (Thr-Thr).

Una vez activa, la proteína sufre un reordenamiento estructural, la región DBP es accesible a otras proteínas reguladoras y a sustratos específicos, y el nuevo plegamiento de la proteína permite la proximidad de los dominios CD y ED, formando una hendidura que determina la especificidad y la afinidad en la unión de la enzima a sus sustratos (Figura 1.20).

3.3.2. Activación y desactivación

El siguiente nivel de la transmisión de la señal en la ruta Ras-ERK, tras la activación de MEK, se trata de la doble fosforilación de los residuos localizados en el lazo de activación (motivo TEY) de la quinasa ERK (Payne et al., 1991). Esta fosforilación es mediada únicamente por MEK, que tras la interacción del dominio D de MEK con el dominio CD de ERK, se produce un cambio conformacional en la estructura de ERK (Figura 1.20), exponiendo así los residuos Thr183 y Tyr185, que son susceptibles de ser fosforilados por MEK (Canagarajah et al., 1997; Zhou et al., 2006).

En la asociación de MEK y ERK participan varias regiones de estas moléculas, tanto en el extremo amino terminal como en el carboxilo terminal (Wilsbacher et al., 1999), como por ejemplo, los aminoácidos 19-25 de ERK (Eblen et al., 2001) y los residuos 312-320 (Rubinfeld et al., 1999). Estas regiones pertenecen a diferentes áreas dentro de la estructura tridimensional de ERK, por lo que parece evidente que todos esos residuos no pueden interactuar con una única molécula de MEK al tiempo. Posiblemente, la participación de ciertas proteínas adaptadoras median la interacción de MEK y ERK, como es el caso de la proteína MP1 (*MEK partner 1*) (Schaeffer et al., 1998).

Una vez activa, la estructura de ERK sufre un cambio conformacional, exponiendo en el dominio catalítico, una región en forma de bolsillo rodeada de residuos hidrofóbicos. Este bolsillo se denomina zona de reconocimiento de las regiones P+1 de los sustratos, ya que será la responsable de la unión a la secuencia fosfoaceptora de los sustratos (caracterizada por presentar una prolina en posición +1/-1 respecto a la serina o treonina susceptible de ser fosforilada) (Clark-Lewis et al., 1991).

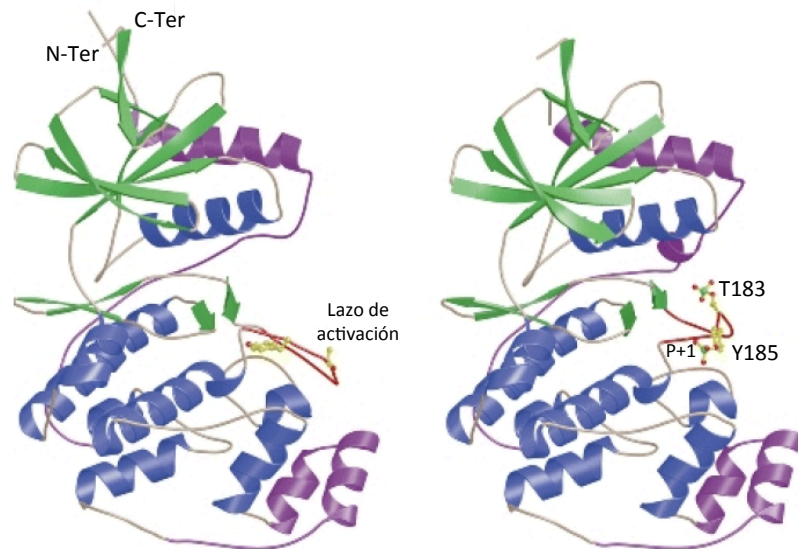


Figura 1.20. Representación del cambio conformacional de ERK2 durante su activación. Se representa el dominio amino terminal (N-Ter) formado por láminas β (verde) y dos hélices α (azul), y el dominio carboxilo terminal (C-Ter) formado por hélices α . En detalle se muestra el sitio catalítico, y cómo el lazo de activación (rojo) sufre un cambio conformacional exponiendo la treonina 183 (T183) y la tirosina 185 (Y185), así como el sitio P+1 de unión a los sustratos. *Modificado de Canagarajah et al., 1997*

En la regulación de la señal mediada por ERK, es tan importante la activación como la inactivación de su potencial catalítico. Teniendo en cuenta que es necesaria la fosforilación tanto en el residuo de treonina como en el residuo de tirosina, la acción de las fosfatasas de treonina o de tirosina es suficiente para la inactivación de ERK. En la inactivación pueden participar Ser/Thr fosfatasas (PPs) (Alessi et al., 1995), Tyr fosfatasas (PTPs) (Pulido et al., 1998) o por fosfatasas de especificidad dual (MKPs) (Sun et al., 1993). Estas fosfatasas pueden eliminar uno o dos de los residuos fosforilados responsables de la activación de ERK, siendo suficiente para la inactivación de la enzima. La especificidad de la enzima depende, entre otras cosas, del tipo de estimulación y de la localización de ERK.

Además de la inactivación por fosfatasas, la señalización mediada por ERK puede ser bloqueada por un mecanismo de retroinhibición mediada por la misma proteína ERK.

Después de la activación de ERK, además de fosforilar determinados sustratos, la proteína quinasa puede fosforilar proteínas que participan en los niveles iniciales de la cascada, inhibiéndolos y bloqueando así la continuidad de la señalización. Se han descrito fosforilaciones inhibitorias para el factor Sos (Corbalan-Garcia et al., 1996), para las diferentes isoformas de Raf (Dougherty et al., 2005) y para las proteínas MEK (Slack-Davis et al., 2003), que pueden explicar estos mecanismos de retroinhibición mediada por la ruta de ERK.

3.3.3. Dimerización

La proteína ERK, una vez fosforilada, es capaz de formar homodímeros. Aunque en menor grado puede ocurrir la dimerización entre ERK fosforilado y ERK no fosforilado, la unión más frecuente es aquella que ocurre entre dos moléculas de ERK fosforilado, de tal manera que cuando ERK se fosforila y activa, pasa a formar parte de un dímero con otra molécula en su mismo estado (Khokhlatchev et al., 1998). La interacción entre dos moléculas de ERK2 activo está basada en una red de interacciones electrostáticas en las que participan el lazo de activación y una zona del lóbulo C-terminal, denominada L16 (de la Pro309 a la Arg358). El mecanismo de dimerización afecta en primer lugar al lazo de activación, que una vez fosforilado en los dos residuos necesarios, se desplaza 25 Å respecto a su posición en ERK2 no fosforilado, de tal manera que tres residuos de leucina (Leu333, Leu336 y Leu344) situadas en L16 quedan más expuestas al solvente. Además la His176 del lazo de fosforilación se estabiliza con el residuo Glu343 de la región L16 de la otra molécula del dímero, formando un par iónico (Figura 1.21). Finalmente, en la formación del dímero participan 12 residuos de cada molécula de ERK2 en las interacciones hidrofóbicas e iónicas, aproximando a los monómeros de ERK2 a menos de 3,9 Å. Como resultado de todas estas interacciones, se forma un dímero de ERK2 simétrico y con los centros activos totalmente accesibles (Khokhlatchev et al., 1998).

Los dímeros de ERK, tras la estimulación mitogénica, pueden formarse utilizando proteínas adaptadoras como plataformas, siendo entonces capaces de interactuar y activar los sustratos citoplasmáticos. Además, se ha demostrado que evitando el proceso de dimerización de ERK, pero sin afectar a su actividad quinasa, se puede inhibir procesos

implicados en el desarrollo de algunos tumores. Por lo que la dimerización de ERK podría ser una posible diana en el desarrollo de fármacos antitumorales (Casar et al., 2008).

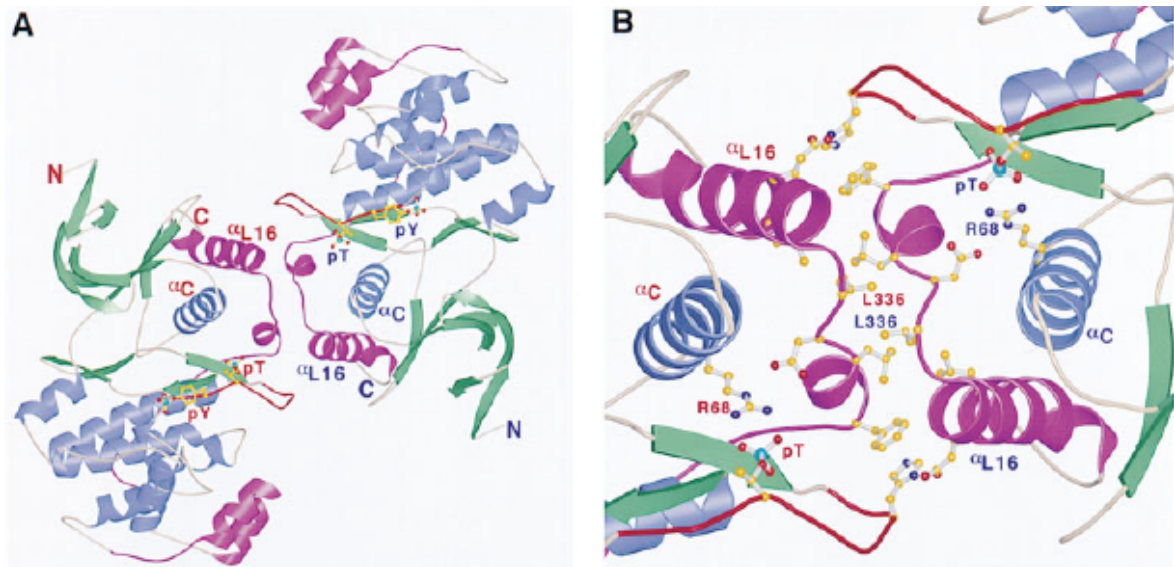


Figura 1.21. Estructura del dímero de ERK2. **A)** Representación del dímero simétrico de ERK con los sitios activos y el sitio de unión a sustrato accesibles. Se muestran las láminas β en verde, las hélices α en azul y la región L16 y el sitio catalítico en magenta. Los residuos T183 y Y185 están representados como p-T y p-Y, en amarillo. **B)** Representación de la cremallera hidrofóbica formada por los residuos de Leu 333, 336 y 344 de cada molécula de ERK. Además del par iónico formado por el residuo H176 del lazo de activación (en rojo) de una molécula, con el residuo E343 de la región L16 de la otra molécula. Adaptado de Khokhlatchev et al., 1998.

3.3.4. Translocación al núcleo

La localización celular de ERK depende fundamentalmente del estado de activación de la proteína, de tal manera que en condiciones de reposo, o en ausencia de factores mitogénicos, ERK se encuentra en el citoplasma (Chuderland and Seger, 2005). Se sabe que la localización citoplasmática de ERK es dependiente, en gran medida, de ciertos anclajes citoplasmáticos, como por ejemplo las proteínas MEKs (Fukuda et al., 1997), ciertas proteínas adaptadoras o *scaffold* como MP1, y el propio citoesqueleto (Reszka et al., 1995). El 65-75% de estas interacciones son reversibles (Zehorai et al., 2010), de tal manera que bajo estimulación mitogénica, ERK sufre un cambio conformacional en la región del lazo de activación, liberándose así de su anclaje citoplasmático y pudiendo translocarse al núcleo. La translocación de ERK al núcleo es imprescindible para el progreso del ciclo celular, de tal manera que la retención de ERK en el citoplasma no afecta ni a su actividad catalítica ni a la

fosforilación de los sustratos citoplasmáticos, pero la transcripción y proliferación dependiente de ERK se ven bloqueadas (Brunet et al., 1999).

El paso de ERK del citoplasma al núcleo puede darse por dos mecanismos: difusión pasiva, o por transporte activo asociado a gasto energético y a interacción con el complejo del poro nuclear (NPC). La proteína ERK carece de secuencia de localización nuclear por lo que necesita de otros mecanismos para su entrada al núcleo. La difusión pasiva de ERK al núcleo es dependiente de la interacción de ERK con el motivo FXFG de algunas proteínas del complejo del poro nuclear, como es el caso de las nucleoporinas (Matsubayashi et al., 2001; Whitehurst et al., 2004). Pero ERK también puede translocarse al núcleo dependiendo de gasto energético (proveniente de la GTPasa Ran) mediante la unión a proteínas con secuencias NLS (*Nuclear Localization Sequence*) (Terry et al., 2007) (Figura 1.22). Algunas de las proteínas a las que se puede unir ERK para ser translocado al núcleo son: Importina 7 (Lorenzen et al., 2001) y Mxi2 (Casar et al., 2007).

En cuanto a la importancia de la dimerización de ERK en el proceso de translocación al núcleo, poco se sabe. Por una parte, se ha descrito un papel importante para los dímeros de ERK en la entrada al núcleo dependiente de gasto energético, ya que proteínas mutantes de ERK deficientes en dimerización se acumulan en el citoplasma (Khokhlatchev et al., 1998). Mientras que otros autores sugieren que la entrada de ERK al núcleo es independiente de su estado de dimerización (Adachi et al., 1999; Burack and Shaw, 2005; Lidke et al., 2010). Nuestro grupo ha descrito que ERK es translocado al núcleo como monómero principalmente, pero por otra parte también se ha demostrado que es posible la dimerización nuclear de ERK después de la estimulación mitogénica, aunque poco se sabe acerca del papel de los dímeros de ERK en el núcleo, ya que los factores de transcripción se unen exclusivamente a monómeros de ERK (Casar et al., 2008).

Una vez en el núcleo, ERK tiene diferentes sustratos nucleares como ciertos factores de transcripción a los que es capaz de fosforilar, o bien interaccionando con enzimas que remodelan la estructura de la cromatina. Finalmente, se modifica la expresión génica y se pueden generar respuestas biológicas diferentes, en función del estímulo y la regulación de la ruta. La actividad de ERK en el núcleo es regulada por la acción de fosfatasas específicas, que desfosforilan la proteína permitiendo la asociación de ERK a MEK y su translocación al citoplasma (Figura 1.22). La regulación de las fosfatasas muchas veces es llevada a cabo por

la propia actividad de ERK (Volmat and Pouyssegur, 2001). La proteína MEK tiene, como ya se ha indicado, una secuencia de exportación nuclear (NES), impidiendo su retención en el núcleo, de tal manera que funciona como un transportador de ERK al citoplasma, una vez que es inactivado (Adachi et al., 2000; Fukuda et al., 1997). La entrada de MEK al núcleo suele ser independiente de ERK, y puede ir asociada a un mecanismo rápido de transporte dependiente del estímulo (Jaaro et al., 1997), o por difusión pasiva (Yao et al., 2001).

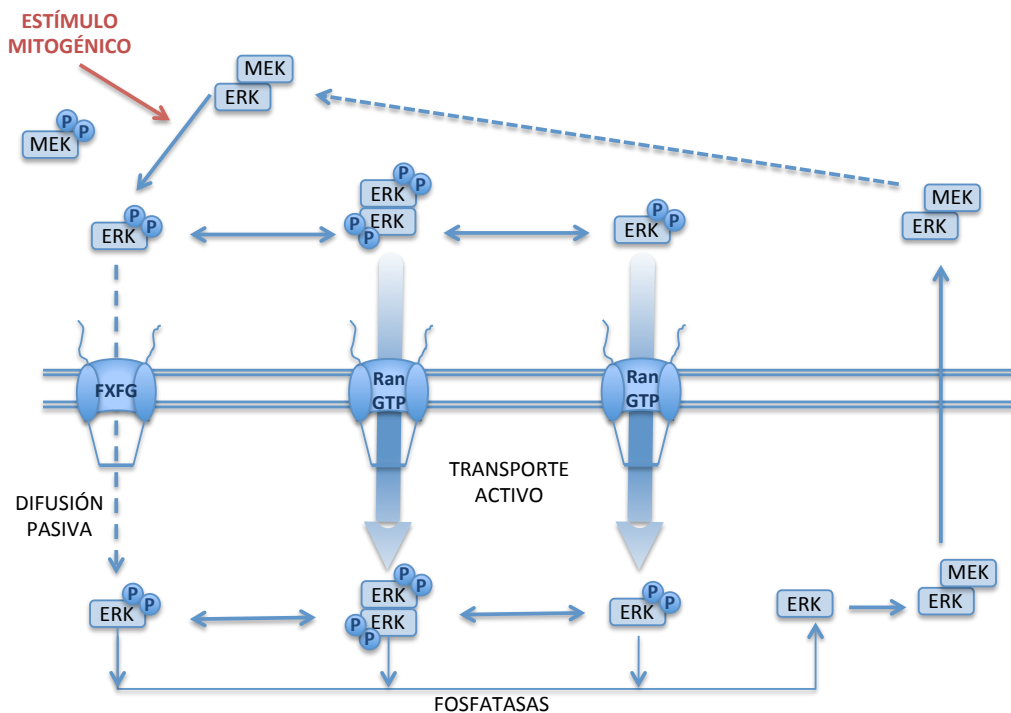


Figura 1.22. Representación de los posibles modelos de translocación de ERK al núcleo. En condiciones de reposo, ERK es retenido en el citoplasma mediante anclajes citoplasmáticos como es el caso de MEK. Tras su fosforilación, se libera del anclaje y puede ser capaz de translocarse al núcleo por difusión pasiva interaccionando con las nucleoporinas del complejo del poro (FXFG). Por otro lado se ha descrito la posible translocación de ERK al núcleo como dímero, asociado a un gasto energético dependiente de la GTPasa Ran, aunque la proteína monomérica también podría utilizar este transporte. El papel de los dímeros en el núcleo está poco claro, aunque la dimerización nuclear es posible. Una vez en el núcleo, y después de fosforilar los sustratos nucleares, ERK es desfosforilado por fosfatasas específicas, y entonces tras la interacción con proteínas que portan una secuencia de exportación nuclear, como MEK, es translocada nuevamente al citoplasma.

La localización celular de ERK es de gran importancia en la especificidad de los sustratos que va a fosforilar o con los que va a interactuar. En función de su estado de activación y de su localización, así como la duración de la señal nuclear, la reprogramación celular tras la estimulación mitogénica puede ser diferente. Un ejemplo de la importancia de la localización de ERK sucede en las células PC12, en las cuales se ha descrito que la translocación de ERK al núcleo es imprescindible para la diferenciación de estas células, asociado a la estimulación

con NGF que promueve una fosforilación de ERK mantenida en el tiempo (von Kriegsheim et al., 2009).

3.4. Sustratos de ERK

Una vez que ERK es fosforilado y activado, es capaz de fosforilar un amplio rango de proteínas sustrato. Las proteínas sustrato de ERK presentan un motivo de fosforilación formado por residuos de serina o treonina, con una prolina en posición +1/-1. Es necesaria una interacción entre el motivo fosfoceptor y la región catalítica de ERK para la fosforilación del sustrato. En esta interacción colaboran las regiones de unión, descritas previamente, que estabilizan dicha interacción: dominio D y dominio DEF por parte del sustrato, y el dominio CD y dominio DBP por parte de la MAPK.

La especificidad de los sustratos viene determinada, fundamentalmente, por la localización celular que depende en muchas ocasiones del estado de activación de ERK. Además, también puede afectar a la especificidad, la presencia de los distintos componentes de la cascada y proteínas reguladoras en las distintas sublocalizaciones celulares.

Los sustratos de ERK se pueden dividir en dos grandes grupos:

3.4.1. Sustratos citoplasmáticos

Muchos de los sustratos citoplasmáticos de ERK son a su vez proteínas quinasas, que pueden ser consideradas un nivel más dentro de la cascada de señalización, denominado MAPKAPKs. Este es el caso de las proteínas RSK (*Ribosomal S6 Kinase*) que una vez fosforilada puede translocarse al núcleo donde regula eventos transcripcionales, MSK (*Mitogen and Stress activated protein Kinase*) y MNK (MAPK-interacting protein) (Deak et al., 1998; Sturgill et al., 1988; Waskiewicz et al., 1997). Otro de los sustratos citoplasmáticos es la fosfolipasa A2 citosólica (cPLA2), incrementando su actividad enzimática cuando es fosforilada (Lin et al., 1993). Además, también puede fosforilar proteínas que forman parte del citoesqueleto como por ejemplo Tau, MAP-2 y paxilina.

A parte de estos sustratos, se han descrito algunos casos donde las proteínas diana de ERK pertenecen a niveles superiores de la cascada de señalización de ERK, y muchas veces,

estas fosforilaciones forman parte de un mecanismo de regulación por retroinhibición. Este es el caso de proteínas como el receptor de EGF, Sos, c-Raf y MEK1 (Brunet et al., 1994; Seger and Krebs, 1995).

3.4.2. Sustratos nucleares

El modo de regulación de la expresión génica por parte de ERK, es dependiente de la fosforilación de factores de transcripción, o bien, mediante la activación de otras proteínas (RSKs o MNKs) que pueden modular la transcripción. Alguno de los sustratos nucleares de ERK son: los factores de transcripción de la familia AP-1 (*Activating Protein-1*) como c-Fos (Chen et al., 1996) y c-Jun (Morton et al., 2003). También puede fosforilar factores de transcripción como c-myc (Murphy et al., 2004) y Elk-1 (Davis, 1995) aunque este factor de transcripción también puede ser activado por JNK y p38.

Dentro de un mismo modelo celular, la inducción de factores de transcripción puede ser específica en función del estímulo. Así en las células MCF7, los ligandos de los receptores ErbB, como EGF o HRG, pueden dar patrones de expresión específicos de ligando, dando muestra de la gran diversidad en la señalización que desencadenan y pudiendo ser la causa de las diferentes respuestas biológicas generadas (Amin et al., 2005; Nagashima et al., 2007; Sweeney et al., 2001). Sin embargo, en otros estudios se ha demostrado que algunos factores de transcripción son inducidos de manera redundante aunque con diferencias en los niveles de expresión (Fambrough et al., 1999; Nagashima et al., 2007).

Se podría incluir dentro de este grupo de sustratos la interacción directa de las proteínas ERKs con el DNA, funcionando como un factor de transcripción (Hu et al., 2009).

3.5. Regulación espacio-temporal y determinación de la especificidad de la señal

A pesar de que la cascada de señalización de ERK es una ruta de señalización lineal, está implicada en una gran variedad de respuestas biológicas y en la regulación de muchos procesos celulares, ante diversos estímulos extracelulares. Una de las preguntas que mantienen a muchos grupos de investigación ocupados es qué es lo que determina la especificidad de las señales de ERK.

Numerosos ejemplos dan cuenta de la gran variabilidad funcional de la proteína quinasa ERK. Incluso dentro del mismo modelo celular, la misma ruta de señalización puede generar respuestas muy distintas en función del estímulo recibido o incluso de la concentración del mismo estímulo.

Uno de los aspectos a tener en cuenta, es que la cascada de ERK no funciona independientemente, sino que forma parte de una **red de señalización multidimensional** junto a otras rutas de transducción de señales y otros componentes celulares. De hecho, determinados sustratos pueden ser activados por todas las MAPKs conocidas (p38, JNK...) como es el caso de el factor de transcripción Elk-1 (Cavigelli et al., 1995), incluso algún sustrato debe ser activado simultáneamente tanto por ERK como por p38, éste es el caso de PLA2 en neutrófilos humanos (Hazan-Halevy and Levy, 2000). Por otra parte, otras rutas pueden fosforilar componentes de la cascada de señalización de Ras-ERK, por ejemplo la ruta Rac1-PAK1 puede desencadenar una fosforilación de MEK1, sin inducir su activación pero favoreciendo su interacción con ERK1/2 (Frost et al., 1997). En muchos casos la activación de los receptores ErbB, citados anteriormente, va acompañada a por la activación de otras vías de señalización como Shc-ERK o PI3K-Akt. Además, estas vías frecuentemente interaccionan entre sí de manera positiva o negativa dando lugar a la activación de diferentes factores de transcripción en función del receptor desencadenante de la señal (Moelling et al., 2002; Mograbi et al., 2001). Recientemente, se ha descrito en células humanas de tumor de mama (MCF-7 y T47D), una interconexión entre las rutas Ras/MAPK y PI3K/Akt, que hacen a las células T47D (con mutación activadora en PI3K) resistentes a los inhibidores de MEK, presentando niveles altos de ERK activo, y por lo tanto un crecimiento descontrolado. Posiblemente alguna proteína quinasa, por debajo de Akt, es responsable de la activación de ERK, independientemente del estado de activación de MEK (Aksamitiene et al., 2010).

Otro mecanismo que participa en la determinación de la especificidad de la señal de ERK es la compartimentalización de la misma, mediada básicamente por la presencia de **proteínas de andamiaje o scaffold**. Estas proteínas permiten el ensamblaje de los componentes de la cascada, en sitios subcelulares concretos, facilitando la propagación eficiente de la señal y modulando la cinética de la activación de las MAPKs. Las proteínas *scaffold* presentan una localización determinada (Figura 1.23) y ensamblan módulos de señalización sobre sustratos específicos, pudiendo influir en la intensidad y duración de la

señal (Brown and Sacks, 2009; Casar et al., 2009; Kolch, 2005; Morrison and Davis, 2003; Ramos, 2008). El mecanismo de regulación mediado por proteínas *scaffold* está muy conservado a lo largo de la evolución, siendo Ste5 la primera proteína identificada con esta función en levaduras (Choi et al., 1994). En mamíferos, se han identificado al menos trece proteínas *scaffold* para ERK (Kolch, 2005), entre las que destacan:

- **KSR** (*Kinase supressor of Ras*), por su alto grado de similitud con c-Raf, en un principio se pensó que se trataba de una quinasa, pero dicha actividad quinasa no está clara todavía, demostrándose posteriormente su función como proteína *scaffold* (Morrison, 2001). Se une a MEK de forma constitutiva y a Raf y ERK de forma dependiente de la activación de Ras (Cacace et al., 1999; Denouel-Galy et al., 1998; Therrien et al., 1996). Su sobreexpresión afecta a la señalización de ERK, así en células PC12 mantiene la fosforilación de ERK, llevando a las células a un estado de diferenciación bajo estimulación con EGF (Müller et al., 2000). Es importante también su papel como plataforma de dimerización de ERK, que permite la fosforilación de sustratos citosólicos (Casar et al., 2008).

- **Sef** (*Similar expression of FGF protein*), se une a formas activas de MEK, bloqueando la disociación del complejo MEK-ERK, de tal manera que retiene a ERK en el citoplasma (asociado al aparato de Golgi) sin afectar a su actividad (Torii et al., 2004). La retención de ERK en el citoplasma inhibe la diferenciación de células PC12 tras la estimulación con NGF (Xiong et al., 2003).

- **Paxilina**, localizada en adhesiones focales, asociada a Raf y a ERK tras la estimulación con HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), y a MEK de manera constitutiva (Ishibe et al., 2003). Tras la estimulación, ERK fosforila a la paxilina permitiendo la regulación de la activación de FAK (proteína tirosina quinasa) y Rac (GTPasa) en las adhesiones focales (Ishibe et al., 2004).

- **IQGAP** (*Ras GTPase-activating-like protein*), que a pesar de tener gran homología con proteínas activadoras de GTPasa (GAP), la proteína IQGAP no presenta dicha actividad. Se trata de una familia formada por tres miembros: IQGAP1, IQGAP2 y IQGAP3, siendo IQGAP1 la más estudiada, con funciones relacionadas con la regulación del citoesqueleto y con señalización celular (Brandt and Grosse, 2007; Briggs and Sacks, 2003; Brown and Sacks, 2006). IQGAP1 tiene una distribución citoplasmática y participa en la modulación de la ruta Ras-ERK uniéndose directamente a B-Raf, MEK1 y ERK (Ren et al., 2007; Roy et al., 2004) tras

la estimulación con EGF, promoviendo la proliferación celular (Roy et al., 2005; Ussar and Voss, 2004).

- **MP1** (*MEK partner 1*), se une a MEK1 y a ERK1 potenciando la activación de ERK1 cuando MP1 es sobreexpresada. Es una proteína que se asocia a la proteína p14 (Wunderlich et al., 2001), que está asociada a endosomas tardíos, por lo que MP1 puede regular espacialmente la señalización de ERK. Además, regula tanto la intensidad como la duración de la activación de ERK, siendo ambas magnitudes disminuidas cuando se pierde la localización de MP1-p14 (Kolch, 2005; Teis et al., 2002).

- **β -arrestina**, existen dos isoformas: β -arrestina1 y β -arrestina2, ambas implicadas en la señalización a través de GPCRs, bloqueando la asociación de un GPCR a su proteína G (Lefkowitz and Shenoy, 2005; Moore et al., 2007). Tras la estimulación del receptor GPCR se forman complejos que comprenden la β -arrestina y distintos componentes de la ruta de ERK. Como consecuencia, se obtienen cinéticas de activación de ERK más mantenidas en el tiempo, localizando a ERK en endosomas tempranos (Ahn et al., 2004; Tohgo et al., 2002).

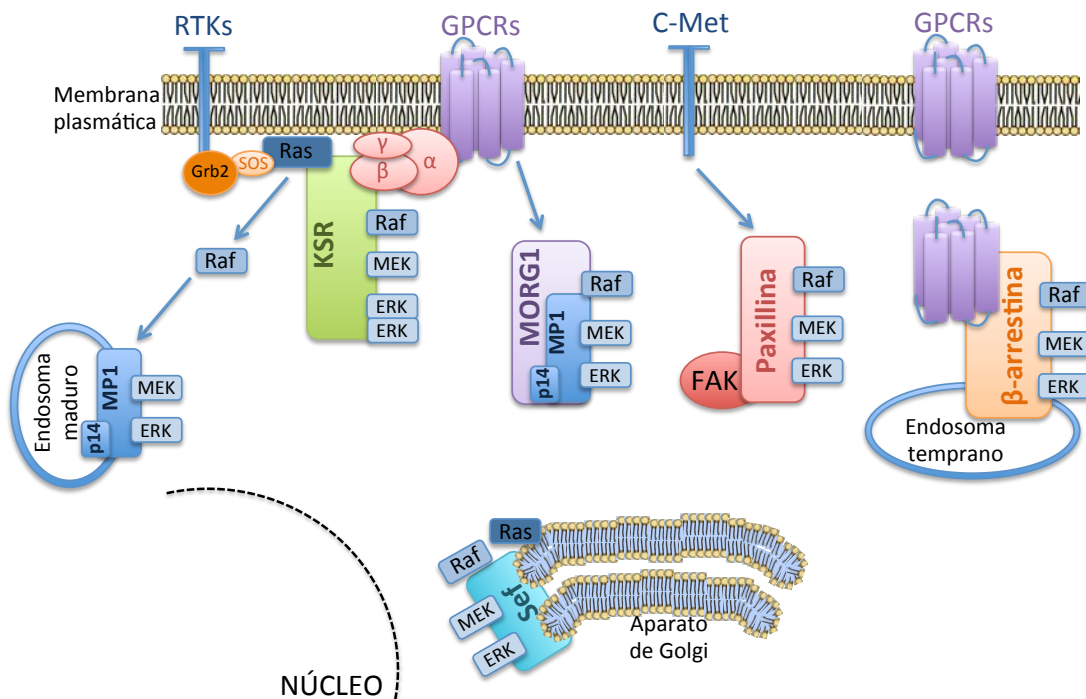


Figura 1.23. Representación de alguna de las proteínas scaffold implicadas en la señalización mediada por la ruta Ras-ERK. Se muestra la señalización desde la membrana plasmática, tanto desde receptores RTKs como GPCRs. La proteína KSR vincula la señalización desde ambos receptores dirigiéndolo hacia los diferentes módulos de la cascada de ERK. La proteína MORG está específicamente relacionada con la señalización desde GPCRs. El complejo MP1-p14 puede interaccionar tanto con MORG1 como con el receptor RTK dirigiendo la señal al módulo MEK-ERK. Las proteínas paxilina y β -arrestina están involucradas en la señalización desde diferentes compartimentos celulares.

En trabajos previos en nuestro laboratorio, se demostró la gran importancia que tienen estas plataformas de señalización en la especificidad de los sustratos de ERK1/2. Así, tras la estimulación de células con EGF se observó que PLA₂ era regulado desde balsas lipídicas con la participación de KSR1 y desde el retículo plasmático con la participación de Sef, mientras que desde balsas lipídicas también se activaba EGFR, pero regulado por IQGAP1 (Casar et al., 2009).

Además, la presencia de **distintos tipos de quinasas en cada nivel de la cascada** de señalización supone otro mecanismo de regulación de la especificidad de la señal, ya que cada una de las distintas quinasas, dentro de cada nivel, puede ser activada bajo diferentes condiciones, y puede estar sometida a distintos mecanismos de regulación (Figura 1.24). Un claro ejemplo lo encontramos en el nivel de MAP3K de la ruta, en el que pueden participar A-Raf, B-Raf, Raf-1, c-Mos, TPL2, MEKK1 o PAK (Rubinfeld and Seger, 2005) en función de las condiciones en las que se encuentra la célula. Incluso podemos encontrar variabilidad de isoformas a nivel de los sustratos de ERK, como es el caso de RSK. Finalmente, se pueden encontrar un amplio rango de proteínas sustrato, susceptibles de fosforilación por ERK, con diferentes funciones biológicas (Bodart, 2010).

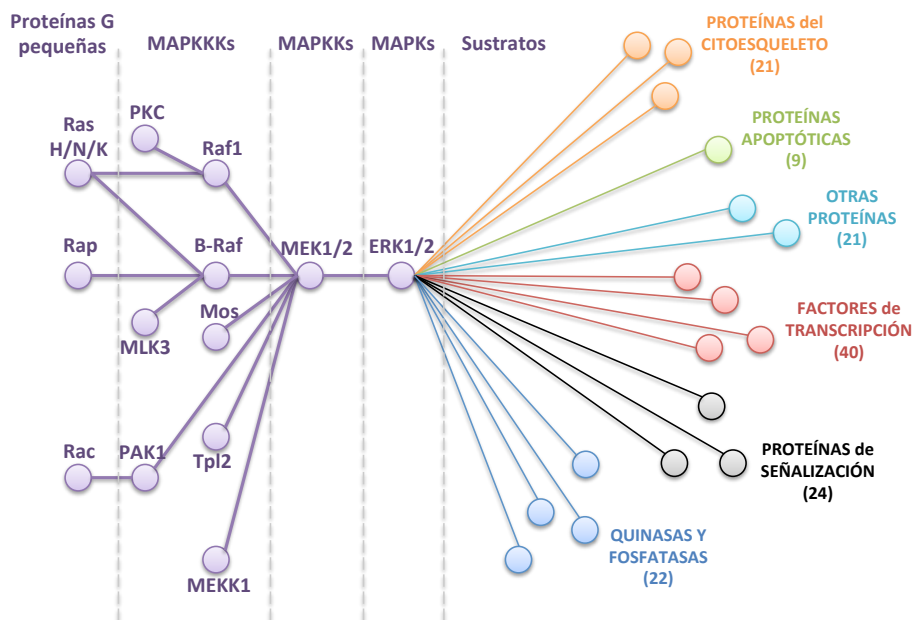


Figura 1.24. Esquema simplificado de los diferentes niveles de la cascada de señalización de Ras-ERK. Para cada nivel de señalización pueden existir varias isoformas, con sus respectivos mecanismos de regulación. Incluso a nivel de los sustratos existe una gran variabilidad, con más de 160 proteínas susceptibles de ser fosforiladas por ERK. Los sustratos se representan agrupados por función biológica, indicando entre paréntesis el número de proteínas identificadas en cada grupo. *Adaptado de Bodart, 2010.*

Todos estos mecanismos, de una forma u otra, influyen en la **duración y la intensidad de la señal** pudiendo determinar la variabilidad de los procesos mediados por ERK.

Un claro ejemplo de cómo dos estímulos diferentes dan lugar a dos respuestas celulares distintas, utilizando la misma ruta de señalización, sucede en las células de feocromocitoma de rata, PC12, en las cuales la estimulación con NGF (*Nerve Growth Factor*) da lugar a una activación sostenida de ERK, lo que lleva a las células a la diferenciación a neuronas. Por otra parte, cuando las células son estimuladas con EGF (*Epidermal Growth Factor*) la activación de ERK es transitoria y las células sufren un aumento en la proliferación (Marshall, 1995; Nguyen et al., 1993; Peraldi et al., 1993). Parece evidente que la duración de la señal de ERK en este modelo celular es determinante en la respuesta biológica.

En las células PC12, cuando se expresa de manera exógena el receptor de EGF, y se consigue mantener la actividad de ERK, se observa diferenciación celular a pesar de estar bajo estimulación con EGF. Esto demuestra la importancia de la duración de la señal generada por diferentes estímulos (Traverse et al., 1994).

Hoy en día se sabe, que la sostenibilidad de la señal por parte de NGF, en células PC12, es dependiente también de la activación de Rap-1 (además de Ras-Raf1) que induce la activación de B-Raf permitiendo una fosforilación de ERK más sostenida. La activación de ERK tras la estimulación con EGF es dependiente únicamente de la activación de Ras (Grewal et al., 1999; York et al., 1998) y por ello más corta de duración. Además, el NGF permite la disociación de proteínas RasGAP (NF1) de complejos Ras-ERK, de tal manera que se produce la activación de Ras y ERK más sostenida en el tiempo (von Kriegsheim et al., 2009).

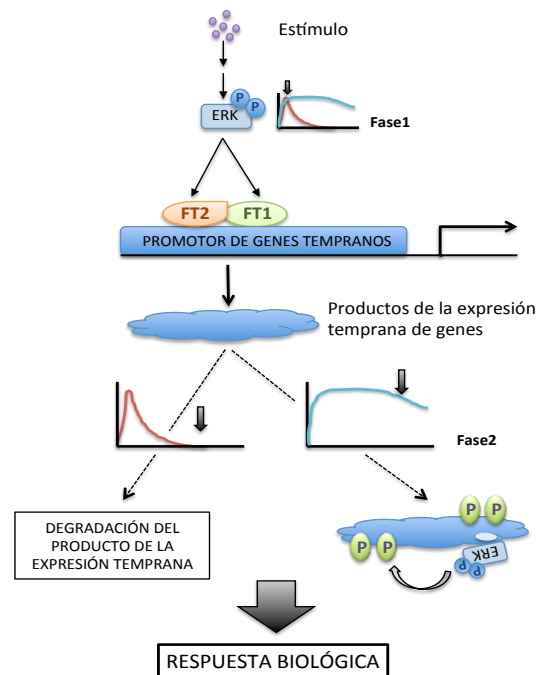


Figura 1.25. Interpretación molecular de la duración de la señal de ERK. Los estímulos extracelulares causan activación de ERK, resultando en una inducción transcripcional de genes de respuesta inmediata, tras la unión o fosforilación de ciertos factores de transcripción (FT). La duración de la señal de ERK es interpretada por los productos de la expresión temprana de genes, que contienen dominios DEF de unión a ERK. De tal manera que en la segunda fase de activación, si ésta es mantenida se produce una fosforilación (y a consecuencia estabilización en muchos casos), mientras que si es transitoria los productos de expresión temprana pueden ser degradados. De esta manera la duración de la señal de ERK podría alterar la actividad biológica de la célula.

Esto supone la fosforilación de ERK y su entrada en el núcleo, desencadenando una respuesta transcripcional, de tal manera que se activa el factor de transcripción Elk1 (Marais et al., 1993) por interacción (Sharrocks et al., 2000a) y se induce la expresión de genes tempranos, como c-Fos, y posteriormente de genes tardíos, como la ciclina D. Se ha demostrado que c-Fos está muy implicado en los procesos de proliferación y diferenciación (Eferl and Wagner, 2003). Cinéticas de activación de ERK sostenidas permiten la fosforilación y estabilización de c-Fos, mientras que las cinéticas más transitorias únicamente permiten su expresión (Figura 1.25).

Parece ser que la estabilización de otras proteínas como c-myc o Fra1 también dependen de la cinética de fosforilación de ERK (Murphy et al., 2004). Así, en función del tipo de cinética de activación de ERK que el estímulo desencadene, la respuesta biológica que se desarrolla puede ser diferente (Torii et al., 2006).

Por último, cabe destacar la importancia de la **localización de los componentes de la cascada de ERK1/2** en compartimentos específicos de la célula, y como pueden cambiar su localización después de una determinada estimulación. Cuando las células están en reposo, los componentes de la ruta se localizan en el citoplasma principalmente, debido a la interacción con las proteínas *scaffold* o de anclaje (Chuderland and Seger, 2005). Al recibir un estímulo, las proteínas Raf son reclutadas a la membrana plasmática y otras endomembranas tras la activación de Ras. Tanto MEK1/2, ERK1/2 y RSKs son liberados, en parte, de sus anclajes citoplasmáticos y así, la mayor parte de ERK1/2, MEK1/2 y Raf pueden migrar a otros orgánulos celulares o puede translocarse al núcleo (Yao and Seger, 2009). En la localización citoplasmática de ERK1/2, tras la estimulación, participan de distinta manera algunas proteínas *scaffold* como MP1 (que dirige a ERK1 a endosomas) (Wunderlich et al., 2001) o Sef (que lo dirige a Golgi) (Torii et al., 2004), así como elementos del citoesqueleto, pudiendo interactuar entonces con sustratos específicos de dichas localizaciones subcelulares. Por otra parte, una vez ERK es liberado de sus anclajes es capaz de regular algunos procesos como la transcripción en el núcleo o en la mitocondria (Galli et al., 2009; Mebratu and Tesfaigzi, 2009) así como la regulación de la fragmentación del Aparato de Golgi (Shaul and Seger, 2006).

No sólo la localización de ERK es importante, sino que otros componentes de la cascada juegan un papel fundamental en la determinación de la especificidad de la señal, en función

de su localización subcelular. Es el caso de las proteínas Ras, que pueden presentar diferente localización, y pueden desencadenar respuestas biológicas distintas según su sitio de activación. De hecho, la compartimentación de la señalización está conservada en la evolución tal y como se ha comprobado en levaduras. En este caso, desde la superficie celular Ras regula el apareamiento, mientras que desde endomembranas Ras está controlando la morfología (Onken et al., 2006). En eucariotas se han descrito diferentes cinéticas de activación de Ras en función de la localización, de tal manera que la señal generada es muy rápida y transitoria desde la membrana plasmática, mientras que si la señal parte de endomembranas es más lenta y sostenida en el tiempo. (Chiu et al., 2002b; Eungdamrong and Iyengar, 2007). Existen también diferencias en cuanto a la determinación de una respuesta en función del sitio de activación de Ras, tal y como se comprobó en fibroblastos murinos, con construcciones plasmídicas que dirigen Ras a cada una de las localizaciones subcelulares analizadas. En este modelo la señalización de Ras desde retículo endoplasmático regula positivamente la proliferación, transformación y supervivencia, mientras que la señalización desde mitocondria estimula la entrada en apoptosis (Bivona et al., 2006; Matallanas et al., 2006) posiblemente debido a la disponibilidad de distintos efectores desde cada sitio celular. También se ha descrito de la capacidad de Ras de inducir senescencia en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) cuando la señal es dirigida desde balsas lipídicas con la participación de la proteína *scaffold* KSR1, y no desde membrana desordenada (Casar et al., 2009).

En resumen, una misma ruta de señalización puede dar lugar a diferentes respuestas biológicas cuando es activada por distintos estímulos. Son varios los mecanismos de regulación que participan en la determinación de la especificidad, y parece evidente la importancia que tiene la regulación espacio-temporal de la señal en un proceso biológico (Figura 1.26).

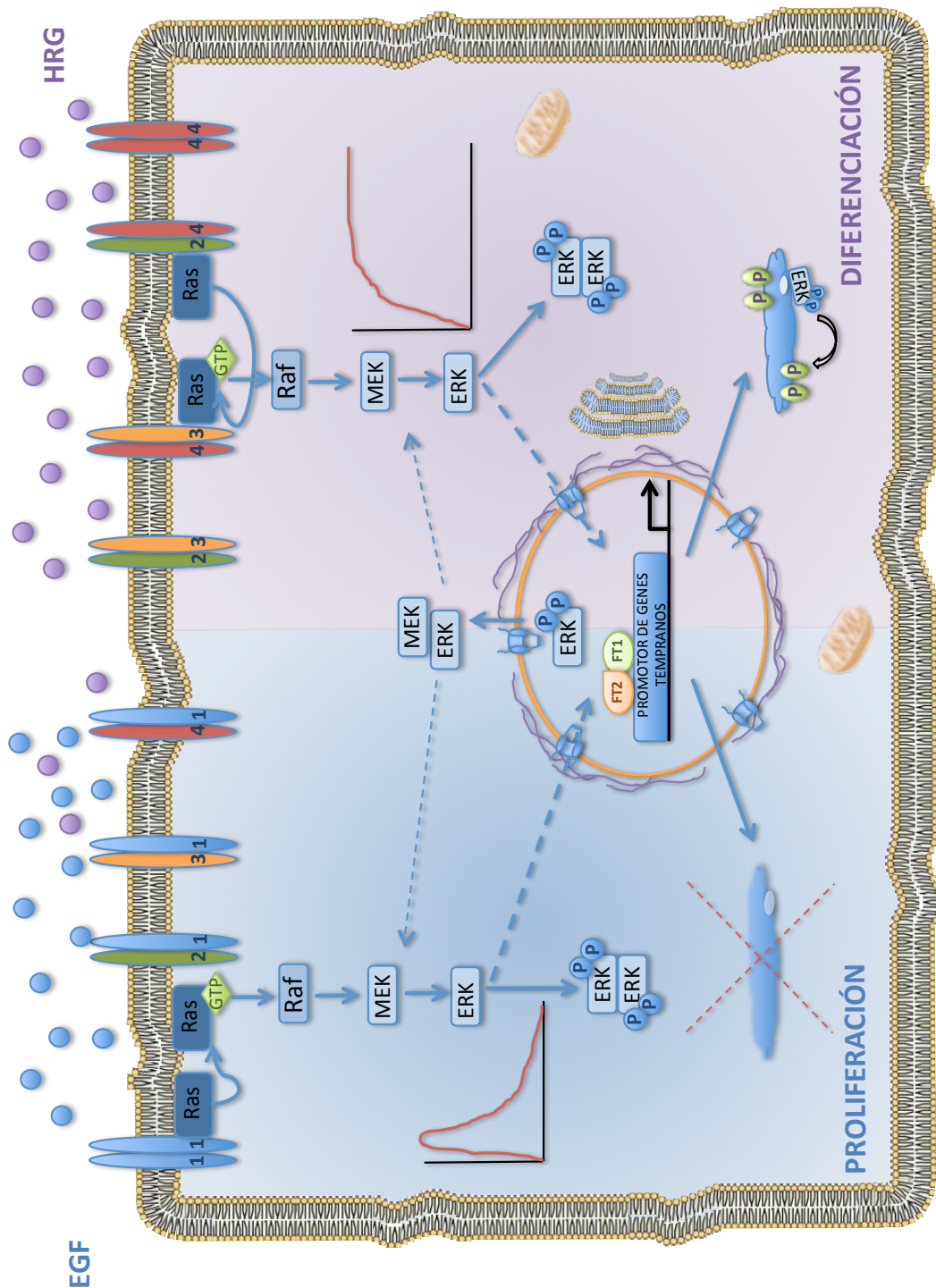


Figura 1.26. Esquema simplificado de una célula sometida a dos estímulos diferentes. Se representa la estimulación de una célula por EGF (azul) y HRG (morado) uniéndose a sus receptores específicos y desencadenando una cascada de señalización que comprende la activación de Ras, Raf, MEK y ERK de manera consecutiva. Una vez ERK está activo puede entrar al núcleo donde fosforila y activa factores de transcripción (FT), lo que permite la transcripción de genes tempranos. En función de cómo es la cinética de fosforilación de ERK, el producto de la transcripción temprana será degradado (cinética transitoria) o fosforilado y estabilizado (cinética sostenida), de tal manera que la respuesta generada por la célula es diferente en cada caso. La actividad de ERK es regulada por fosfatasa, permitiendo su reciclaje al citoplasma utilizando para ello anclajes citoplasmáticos como es el caso de MEK.

4. MODELOS COMPUTACIONALES DE LA DINÁMICA DE LA CASCADA DE ERKS

La biología de sistemas se basa en el estudio de sistemas biológicos en términos de su estructura de red, en vez de considerar a sus componentes individualmente. Se trata, por lo tanto, de una traducción de un sistema biológico a un modelo matemático, para posteriormente realizar una simulación informática y su análisis. Por un lado, la base de un modelo es la descripción topológica de sus componentes y sus interacciones, y por otra parte, es la descripción del comportamiento dinámico del sistema lo que aporta poder predictivo al sistema (Kolch et al., 2005). Es importante destacar que un modelo no es una representación real, o exacta, del sistema biológico, es más bien una descripción simplificada para ayudar en el análisis y comprender mejor las reacciones biológicas. De esta manera, un modelo biológico puede ser utilizado para generar nuevas ideas, hacer predicciones comprobables, así como identificar los componentes y procesos clave del sistema.

Uno de los métodos más utilizados en los modelos biológicos es el basado en ecuaciones diferenciales (ODEs). Una ecuación diferencial describe cómo una propiedad de interés, como puede ser la concentración o la actividad de uno de los componentes, cambia con el tiempo.

En los últimos años, los modelos computacionales de sistemas biológicos han tomado mucha fuerza. Dada la gran importancia de la cascada de ERKs en la señalización celular, se han desarrollado varios modelos de la ruta Ras-ERK que han proporcionado nuevos conocimientos y predicciones de cómo este sistema funciona.

El primer modelo data de 1996 en el cual se dedujo una gran sensibilidad de la ruta de ERK, que aumentaba a lo largo de la cascada con una curva de activación sigmoidal (Huang and Ferrell, 1996). Este estudio fue seguido por otros dos, mostrándose que MEK fosforila a ERK en uno de los sitios primero, para disociarse y volver a unirse después, fosforilándola en el segundo sitio. Así se genera una gran cantidad de moléculas de ERK monofosforiladas, facilitando que se produzca la doble fosforilación más rápida, con una pendiente de la curva de activación mucho más abrupta (Burack and Sturgill, 1997; Ferrell and Bhatt, 1997). Durante la última década se han desarrollado un gran número de modelos de la cascada de ERK cada vez más complejos.

Actualmente, hay más de 30 modelos matemáticos que de alguna manera incorporan la

cascada de ERK. Estos modelos han servido para estudiar diversos aspectos de los sistemas biológicos como por ejemplo la retroalimentación inhibitoria (Brightman and Fell, 2000), los bucles autocrinos (Maly et al., 2004; Shvartsman et al., 2002), la función de proteínas de andamiaje o scaffold (Levchenko et al., 2000; Somsen et al., 2002), la internalización del receptor de membrana (Schoeberl et al., 2002) y su tráfico (Hendriks et al., 2003; Resat et al., 2003), la especificidad de la señal (Swain and Siggia, 2002), la relación con otras vías de señalización (Hatakeyama et al., 2003) o la activación de Ras (Markevich et al., 2004) entre otros procesos.

Hasta el momento, uno de los modelos más completos propuesto para la ruta de las MAPKs, es el desarrollado por Schoeberl y colaboradores. En su trabajo, se desarrolló un modelo matemático, basado en ecuaciones diferenciales, para describir los procesos dinámicos de la ruta de transducción de señales de EGF. Este modelo permite investigar los efectos de la internalización del receptor EGFR, así como la relación entre la unión de EGF a su receptor con la activación de proteínas que están en los siguientes niveles de la cascada de la señalización. En el modelo de Schoeberl se calcula el cambio de concentración de 94 componentes después de la estimulación con EGF, mediante 125 reacciones (Figura 1.27). La mayoría de los parámetros cinéticos y concentraciones iniciales están basados en la literatura científica o en trabajo de laboratorio.

Como conclusión principal se obtiene que la tasa inicial de activación del EGFR es determinante para la respuesta celular a EGF, más que el pico de activación máxima, estando la velocidad de activación condicionada por la concentración de EGF y sus cinéticas de unión al receptor. Además, la internalización del receptor tiene doble papel en función de la concentración de EGF, de tal manera que a concentraciones altas de EGF se produce una atenuación de la señal, por protección contra una prolongada estimulación, mientras que a concentraciones bajas de EGF se produce una amplificación de la señal después de la internalización del receptor (Schoeberl et al., 2002). La activación de Ras, Raf, MEK y ERK presentan perfiles similares, presentando una activación temprana y dependiente de la concentración de EGF, de tal manera que la célula mantiene una alta sensibilidad a un rango amplio de concentración de EGF, permitiendo una respuesta fisiológica máxima.

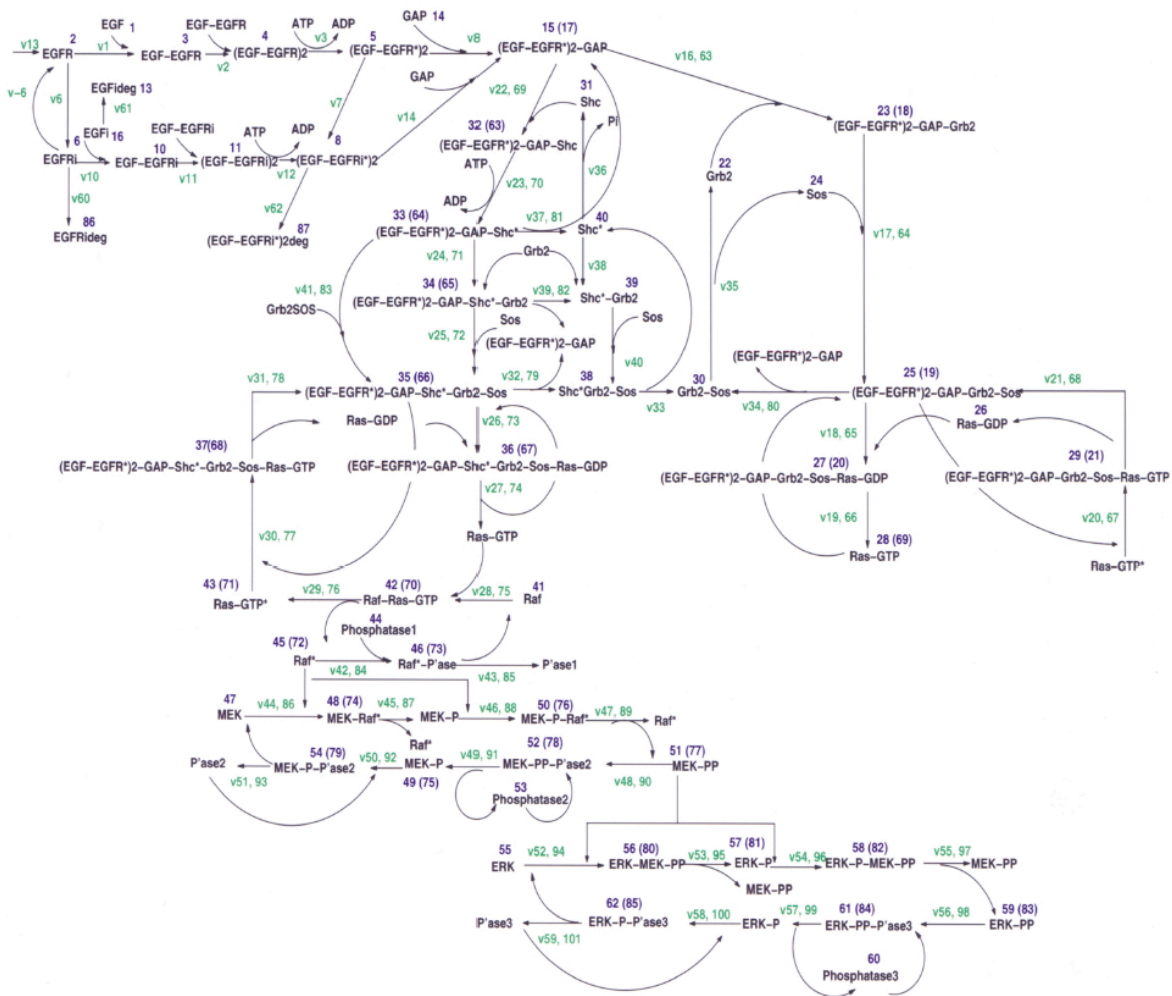


Figura 1.27. Esquema de la cascada de MAPKs estimulada por EGF según el modelo de Schoeberl y colaboradores. La cascada de las MAPKs puede ser iniciada por manera dependiente o independiente de la activación de Shc. Cada componente de la cascada es identificado por un número azul, siendo específico tras la internalización del receptor cuando aparece entre paréntesis. Las flechas representan las reacciones que ocurren a lo largo de la cascada, y están caracterizadas por tasas de reacción en números verdes, apareciendo en segundo lugar los valores correspondientes a los procesos posteriores a la internalización del receptor.

Se trata de un modelo muy completo y robusto, en el que se tiene en cuenta algunos procesos muy importantes como la internalización del receptor de EGF por endocitosis, los complejos que forma y la activación de Ras tanto de forma dependiente como independiente de Shc.

Sin embargo, este modelo presenta algunos errores que no se han tenido en cuenta a la hora de elaborarlo, como el hecho de no considerar la retroalimentación negativa de fosfo-ERK sobre Sos. Además se muestra una activación transitoria de ERK causada por un erróneo

modelamiento de las reacciones de activación/desactivación de Ras. Y por último, no se tiene en consideración el microambiente en el que se desarrolla la cascada Ras-ERK y los mecanismos de regulación a los que la cascada Ras-ERK se expone en función del sitio subcelular de señalización.

El propósito de este trabajo es incorporar el espacio al modelo de activación de la ruta Ras-ERK inducida por EGF. Y determinar cómo las variaciones espaciales inciden en dicha señal.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

La ruta de señalización Ras-ERK es de gran importancia en muchos procesos biológicos, y está implicada en un alto porcentaje de los tumores humanos. Conocer los mecanismos de activación que engloba, así como su regulación, es de gran importancia en el campo de la biomedicina. Por ello, el objetivo principal de esta tesis ha sido tratar de obtener más información en cuanto a la activación y la regulación de la ruta Ras-ERK.

En concreto, los objetivos de esta tesis han sido:

- Considerar la localización subcelular de Ras en el desarrollo de un modelo matemático de activación de ERK.
- Caracterizar la importancia de las distintas localizaciones subcelulares de Ras en la determinación de una respuesta biológica.
- Analizar la determinación de la respuesta biológica en función de la especificidad espacio temporal de la señal Ras-ERK.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DEL ADN

1.1. Purificación de ADN plasmídico

La purificación de ADN plasmídico se llevó a cabo a partir de cultivos bacterianos derivados de cepas transformadas de *Escherichia coli* DH5 α . Los cultivos bacterianos se crecieron en un volumen total de 400 ml de medio de cultivo *Luria Broth* (LB) durante 12 horas, a una temperatura de 37 °C en presencia del antibiótico de selección adecuado a la resistencia proporcionada por el plásmido (generalmente ampicilina o kanamicina) a una concentración de 50 μ g/ml.

Tras ese periodo, los cultivos bacterianos se centrifugaron durante 10 minutos a 6.000 rpm. El sedimento celular se resuspendió en 10 ml de un tampón de resuspensión (50 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM EDTA, 10 μ g/ml RNasa A), y se lisó con 10 ml de un tampón de lisis (200 mM NaOH y 1% SDS), mezclándolo por inversión e incubándolo durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió 10 ml de una solución de neutralización que contiene 3 M de acetato potásico a un pH 5.5, y se incubó durante 5 minutos en hielo. Transcurrido ese tiempo, la mezcla se centrifugó en una centrifuga refrigerada (4°C) durante 20 minutos a 10.000 rpm, o bien se pasó por una jeringa con filtro. Finalmente, el sobrenadante se pasó por columnas de intercambio de *Qiagen*, siguiendo las instrucciones del fabricante (*QIAfilter Plasmid Maxi Kit*). Al eluido obtenido se le añadió 15 ml de isopropanol frío, dejando precipitar el ADN durante cinco minutos a temperatura ambiente. Para obtener el ADN precipitado, se centrifugó la mezcla durante 30 minutos a 10.000 rpm y a 4°C. A continuación se realizó un lavado del precipitado utilizando etanol al 70%, se secó y se resuspendió en un volumen de 300 μ l de agua destilada estéril. El ADN purificado se guardó a una temperatura de -20°C para su posterior uso tanto en transfecciones celulares como en clonajes.

También se realizaron purificaciones a pequeña escala de ADN plasmídico, partiendo de 5 ml de cultivo bacteriano y siguiendo las instrucciones recomendadas por *Macherey-Nagel*,

fabricante del kit de extracción de ADN plasmídico *NucleoSpin Plasmid*. Este kit también consiste en un primer paso de resuspensión del sedimento del cultivo, procedido de una lisis durante un minuto y una neutralización. A continuación, la mezcla neutralizada se pasó por una columna de intercambio, sobre la cual se realizaron una serie de lavados. Por último, el ADN plasmídico se resuspendió en un volumen final de 40 µl, almacenándose a -20°C, para su posterior uso para clonajes.

1.2. Amplificación de fragmentos de ADN por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Para la amplificación de fragmentos de ADN, siempre se buscó alta fidelidad en la polimerización usando polimerasas oportunas (Roche).

Las condiciones usadas para llevar a cabo la PCR variaron en función de los oligonucleótidos empleados y del ADN molde en cuestión. Normalmente, la técnica comienza con un primer paso de 95 °C durante 3 minutos para desnaturalizar la doble hebra de ADN, seguido de 30-35 ciclos de [1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 54-58 °C para la óptima hibridación de los oligonucleótidos, 1 minuto a 72°C para elongar la hebra naciente] y por último 72 °C durante 10 minutos, con el que se completa la elongación de los fragmentos. Las reacciones se hicieron en un volumen de 50 µl y las concentraciones de los reactivos se eligieron según la recomendación de cada fabricante. Para calcular la temperatura de hibridación se escogió la T_m más baja de los dos cebadores y se restaron 5 °C a esta temperatura. Una vez terminada la amplificación se mantienen indefinidamente las muestras a 4 °C. Según el tamaño de PCR obtenido se corre la muestra en geles de agarosa variando el porcentaje en función del tamaño de inserto.

1.3. Digestión con endonucleasas de restricción y purificación de fragmentos de ADN en geles de agarosa

Para la realización de clonajes y subclonajes, uno de los abordajes más empleados ha sido mediante digestiones realizadas con endonucleasas de restricción. Las digestiones de los plásmidos se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones de la casa comercial correspondiente (Fermentas o Invitrogen) en función de la enzima utilizada.

Tanto los fragmentos originados en las digestiones, como aquellos originados tras realizar una PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa (Pronadisa) en un tampón

TAE (0.09 M Tris-acetato, 2 mM EDTA), utilizando *SYBR Safe* (Invitrogen) como agente intercalante de tinción de ADN. Se añadió a las muestras un tampón de carga (0.005% (w/v) de azul de bromofenol y 30% de glicerol), y se sometieron a un campo eléctrico de 70-80V en un gel de agarosa de concentración variable en función del tamaño del inserto que queramos analizar. Como marcadores de peso molecular se usó *1Kb DNA ladder* y *100 pb DNA ladder* de Invitrogen.

La banda correspondiente al fragmento de ADN que se desea purificar se recortó del gel de agarosa. Posteriormente, se extrajo el ADN de la agarosa mediante *kits* especiales de purificación de ADN en gel, como es el caso de *JETquick* o *GeneClean*. Ambos se basan en la fusión de la banda de gel que contiene el ADN de interés, a continuación se deben pasar por una columna de intercambio o incubarse con una resina de intercambio, respectivamente. Por último, se realizaron lavados de las muestras y se eluyeron en un volumen de 20 μ l.

1.4. Clonación de ADN en vectores plasmídicos

Los fragmentos digeridos o amplificados por PCR y posteriormente digeridos, se incubaron junto a los vectores plasmídicos digeridos con las mismas enzimas de restricción, bajo una reacción catalizada por la enzima T4 ligasa (Promega) en un tampón de ligación (300 mM Tris-HCl pH 7.8, 100 mM $MgCl_2$, 10 mM ATP, 100 mM DTT). Las reacciones se hicieron utilizando 20 unidades enzimáticas en un volumen de 20 μ l e incubándolas mínimo 3 horas a temperatura ambiente.

Posteriormente, las ligaciones se utilizaron para transformar la cepa bacteriana DH5 α de *Escherichia coli* (Invitrogen). Para ello, se añadió 2 μ l de la mezcla de ligación a una alícuota de bacterias competentes. Se mantuvieron durante 30 minutos en hielo, a continuación se les sometió a un choque térmico de 1 minuto a 42 $^{\circ}C$, y por último 5 minutos de hielo. Tras el choque térmico, durante una hora se mantienen las células en un medio de cultivo permisivo SOC (Invitrogen), carente de antibióticos, con el fin de dar tiempo a las células a que expresen resistencia al antibiótico codificado por el plásmido incorporado. Por último, la mezcla se siembra en una placa de LB-Agar con 1.5% de agar y 50 μ g/ml de ampicilina o kanamicina en función del antibiótico de selección necesario. Se obtuvieron, a las 24 horas, colonias de bacterias con expresión del plásmido clonado. Estas colonias de bacterias pueden

ser trasladadas a un medio de cultivo líquido para la posterior purificación de ADN plasmídico.

1.5. Plásmidos

A continuación se detallan los plásmidos utilizados en este trabajo, tanto los generados expresamente para la realización de la tesis como otros pertenecientes al banco de ADNs del laboratorio:

1.5.1. Vectores generados para la realización de la tesis

| Plásmido | Descripción |
|-----------------------------|---|
| pCEFLzeo | Se usó para igualar las concentraciones de DNA de cada transfección realizada, así como control en los ensayos de formación de colonias. Confiere resistencia a zeocina |
| pCEFLzeo HA HRas wt | Expresa la proteína silvestre de HRas etiquetada con el epítipo HA, junto al gen de resistencia a zeocina |
| pCEFLzeo NRas wt | Expresa la proteína silvestre de NRas, junto al gen de resistencia a zeocina |
| pCEFLzeo KRas wt | Expresa la proteína silvestre de KRas junto al gen de resistencia a zeocina |
| pCEFLzeo HRas V12 | Expresa la proteína constitutivamente activa de HRas, junto al gen de resistencia a zeocina |
| pCEFLzeo NRas D12 | Expresa la proteína constitutivamente activa de NRas, junto al gen de resistencia a zeocina |
| pCEFLzeo KRas V12 | Expresa la proteína constitutivamente activa de KRas, junto al gen de resistencia a zeocina. |
| pCEFLzeo HA HRas V12 | Expresa la proteína constitutivamente activa de HRas etiquetada con el epítipo HA, junto al gen de resistencia a zeocina |
| pCEFLzeo HA KRas V12 | Expresa la proteína constitutivamente activa de KRas etiquetada con el epítipo HA, junto al gen de resistencia a zeocina |
| pCEFLzeo HA NRas D12 | Expresa la proteína constitutivamente activa de NRas etiquetada con el epítipo HA, junto al gen de resistencia a zeocina |

| Plásmido | Descripción |
|------------------------------------|--|
| pCEFLzeo M1 HA Hras wt SS | Expresa la proteína de HRas en su forma silvestre (wt), etiquetada con el epítipo HA, dirigida al retículo endoplasmático, junto al gen de resistencia a zeocina |
| pCEFLzeo LCK HA HRas wt SS | Expresa la proteína silvestre de HRas etiquetada con el epítipo HA, dirigida a balsas lipídicas, junto al gen de resistencia a zeocina |
| pCEFLzeo CD8 HA Hras wt SS | Expresa la proteína silvestre de HRas etiquetada con el epítipo HA, dirigida a membrana plasmática desordenada, junto al gen de resistencia a zeocina |
| pCEFLzeo KDEL HA HRas wt SS | Expresa la proteína silvestre de HRas etiquetada con el epítipo HA, dirigida al Aparato de Golgi, junto al gen de resistencia a zeocina |
| pCEFLzeo M1 HA NRas wt S | Expresa la proteína silvestre de NRas etiquetada con el epítipo HA, dirigida al retículo endoplasmático, junto al gen de resistencia a zeocina |
| pCEFLzeo LCK HA NRas wt S | Expresa la proteína silvestre de NRas etiquetada con el epítipo HA, dirigida a las balsas lipídicas, junto al gen de resistencia a zeocina |
| pCEFLzeo CD8 HA NRas wt S | Expresa la proteína silvestre de NRas etiquetada con el epítipo HA, dirigida a la membrana plasmática desordenada, junto al gen de resistencia a zeocina. |
| pCEFLzeo KDEL HA NRas wt S | Expresa la proteína NRas, en su forma silvestre, etiquetada con el epítipo HA, dirigida al Aparato de Golgi, junto al gen de resistencia a zeocina. |
| pCEFLzeo M1 HA KRas wt EE | Expresa la proteína silvestre de KRas etiquetada con el epítipo HA, dirigida al retículo endoplasmático, junto al gen de resistencia a zeocina. |
| pCEFLzeo CD8 HA KRas wt EE | Expresa la proteína silvestre de KRas etiquetada con el epítipo HA, dirigida a la membrana plasmática desordenada, junto al gen de resistencia a zeocina |

Tabla 3.1. Resumen de los plásmidos generados durante la tesis. Se detallan los plásmidos generados expresamente para la realización de la tesis junto a una breve descripción de los mismos.

1.5.2. Vectores utilizados en la realización de la tesis

| Plásmido | Descripción |
|----------------------------------|---|
| pCDNA3 | Se usó este vector para igualar las concentraciones de DNA de cada transfección realizada. Confiere expresión para la resistencia a geneticina (G418). |
| pCEFL | Se usó este vector para igualar las concentraciones de DNA de cada transfección realizada. Confiere expresión para la resistencia a geneticina (G418). |
| pCEFL HA | Se usó este vector vacío para realizar los subclonajes. Éstos se realizaron para etiquetar con epítomos adecuados las proteínas necesarias en cada experimento |
| pGEX 4T3 | Se usó este vector vacío para realizar los subclonajes. Éstos se realizaron para obtener proteínas de fusión |
| pCEFL HA HRas wt; | Expresa la proteína silvestre HRas, etiquetada con el epítomo HA. |
| pCEFL CD8 HA HRas wt SS; | Expresa la proteína silvestre HRas, etiquetada con el epítomo HA, dirigida a membrana plasmática (CD8). |
| pCEFL KDEL HA HRas wt SS; | Expresa la proteína silvestre HRas, etiquetada con el epítomo HA, dirigida al Aparato de Golgi (KDEL). |
| pCitFP-HRAS-PTP | Expresa la proteína HRas en su forma silvestre, dirigida a retículo endoplasmático, junto al fluoróforo CFP (<i>Cian Fluorescent Protein</i>). Proporcionado por P. Bastiaens |
| pCEFL HA NF1; | Expresa la proteína neurofibromatosis tipo 1, como activadora de la actividad GTPasa de Ras, etiquetada con el epítomo HA. |
| pCEFL M1 HA NF1; | Expresa la proteína NF1 dirigida a retículo endoplasmático (M1), etiquetada con el epítomo HA |
| pCEFL LCK HA NF1 | Expresa la proteína NF1 dirigida a balsas lipídicas (LCK), etiquetada con el epítomo HA |
| pCEFL KDEL HA NF1 | Expresa la proteína NF1 dirigida a aparato de Golgi (KDEL), etiquetada con el epítomo HA. |
| pCEFL Flag APT1 | Expresa la proteína acilo-tioesterasa 1 (APT1) etiquetada con el epítomo FLAG. |

| Plásmido | Descripción |
|------------------------|--|
| pKH3 HA RasGRF1 | Expresa la proteína RasGRF1 junto al epítipo HA, como activadora de Ras en retículo endoplasmático. Proporcionado por R.Mattingly |
| pCEFL RasGRP | Expresa la proteína RasGRP, como activadora de Ras en el aparato de Golgi. |
| pJM30 EGFR | Expresa el receptor de EGF en su forma <i>wild-type</i> . Proporcionado por Y.Yarden. |
| pCEFL Flag MEK1 | Expresa la proteína MEK1 junto al epítipo Flag en su forma <i>wild-type</i> . |
| pGEX2T RBD | Plásmido de expresión en bacterias que codifica la proteína de fusión entre GST y el dominio <i>Ras Binding Protein</i> (RBD) de Raf desde el aminoácido 1 al aminoácido 149. Suministrado por el S.J. Taylor. |
| pGEX-2TH RBD | Plásmido de expresión en bacterias que codifica la proteína de fusión entre GST y el dominio <i>Ras Binding Protein</i> (RBD) de Raf desde el aminoácido 51 al aminoácido 131. Proporcionado por A. Burgess. |

Tabla 3.2. Resumen de los plásmidos utilizados durante la tesis. Se detallan los plásmidos utilizados para la realización de la tesis junto a una breve descripción de los mismos. Algunos de ellos han sido cedidos por otros investigadores, especificando su nombre. El resto pertenecen al banco de ADNs del laboratorio de Piero Crespo.

De forma común en muchas de estas construcciones se utilizan epítopos y señales que dirigen a las proteínas a determinadas localizaciones subcelulares, así como determinadas mutaciones en las isoformas de Ras. A continuación se detalla en qué consiste cada una de ellas:

- **HA:** epítipo derivado de la región interna de la proteína hemaglutinina, presente en la superficie del virus de la gripe. Este epítipo se sitúa en la región amino terminal de las proteínas y nos permite reconocerlo con un anticuerpo específico.
- **SS:** mutaciones realizadas en la región carboxilo terminal de la proteína Ras, dentro de la región hipervariable, de tal manera que se impide la palmitilación de dicha proteína. Afectan a las cisteínas 181 y 184 de HRas, y a la cisteína 181 de NRas, que son sustituidas por serinas.

Así se puede dirigir la proteína a la localización subcelular deseada, usando para ello una serie de señales que se detallan a continuación.

- **EE:** mutaciones realizadas en la región carboxilo terminal de la proteína KRas, dentro de su región hipervariable, de tal manera que se sustituyen dos lisinas (175 y 179) por dos glutámicos. Con estas mutaciones se evita su anclaje natural a las membranas, permitiendo su ubicación en los sitios subcelulares deseados.
- **M1:** se trata de una señal (de 66 aminoácidos) de unión al retículo endoplasmático, procedente del virus de la bronquitis aviar M1 (Swift and Machamer, 1991).
- **LCK:** señal de miristilación de LCK (proteína quinasa residente en las balsas lipídicas de la membrana).
- **CD8:** se trata de la secuencia (de 210 aminoácidos) del receptor humano CD8 α , de unión a la membrana plasmática desordenada (Littman et al., 1985).
- **KDEL:** secuencia del receptor de la proteína KDELr, con la mutación D193N que lo hace permanecer de manera estable en el Aparato de Golgi, impidiendo su tránsito con el retículo endoplasmático (Townsend et al., 1993).

2. CULTIVOS CELULARES

2.1. **Métodos de transfección**

2.1.1. Precipitación con fosfato de calcio

Las células fueron plaqueadas el día previo a la transfección con una densidad de 3×10^6 células en cada placa de 60 mm. Al día siguiente, para cada placa se prepararon dos mezclas de transfección consistentes en:

- solución 1: HEPES 50 mM/NaCl 280 mM; pH 7.1 (490 μ l) y Na₂HPO₄ 70 mM; pH 7.1 (11.2 μ l)
- solución 2: CaCl₂ 0.25 M (502,5 μ l) y la cantidad apropiada de cada ADN (1 μ g de cada plásmido)

El contenido de la solución 2 se mezcló, gota a gota, con el contenido de la solución 1, al tiempo que se burbujea suavemente. A continuación, se dejó reposar durante media hora, tras lo cual se agregó el precipitado a las placas. La cantidad total de ADN fue igualada en todas las muestras con el vector vacío. Al día siguiente las células fueron lavadas con PBS 1X y

se les puso medio DMEM suplementado con un 10% de suero. Se dejó un tiempo oportuno para el crecimiento de las células y la expresión de la proteína exógena (1 ó 2 días).

2.1.2. Transfección con DEAE-DEXTRANO

Este método de transfección fue utilizado principalmente para la transfección de células COS-7, plaqueadas el día previo a la transfección en condiciones de baja confluencia. Al día siguiente se preparó la mezcla de transfección consistente en: 2,5 ml de medio DMEM sin suero, 2 μ l de sulfato de dextrano (10 mg/ml en PBS 1X), 10 μ l de cloroquina (60 mg/ml en PBS 1X) y el ADN del ensayo en cuestión. Previamente a añadir esta mezcla de transfección a las células, éstas fueron lavadas con PBS 1X. Se incubaron las células con la mezcla durante 2 horas a 37°C, al cabo de ese tiempo, se retiró la mezcla de transfección y se sometieron las células a un choque con dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% (en PBS 1X) durante 2 minutos. Posteriormente, se lavaron las células con PBS 1X y se añadió 3 ml de medio de cultivo suplementado con suero y antibióticos. Por lo general las células fueron incubadas 48 horas y más tarde sometidas a los tratamientos pertinentes.

2.1.3. Transfección con el reactivo FuGene

Este método de transfección aporta la ventaja de que las células pueden ser pasadas en el mismo momento de la transfección, sin necesidad de plaquear las células el día antes. En contra, su eficiencia es muy baja por lo que puede ser buen método para la generación de sublíneas estables. Además también se puede usar para las células que vayan a ser procesadas para inmunofluorescencia, ya que es el método que menos señal de fondo genera.

En primer lugar se realizó una mezcla con 3 μ l del reactivo FuGene y 97 μ l de medio de cultivo DMEM. Se agitó la mezcla y se dejó reposar durante 5 minutos. Posteriormente se añadió la cantidad de ADN necesario, agitando de nuevo y dejándolo 20 minutos más de reposo. A continuación, la mezcla generada se añadió a las células encima de su medio de cultivo completo. Las células permanecieron con la mezcla el tiempo necesario para la expresión de la proteína, normalmente 1 ó 2 días.

2.1.4. Transfección con Lipofectamina

Se empleó este método para transfectar aquellas células que requerían una eficiencia de transfección alta. Se usó tanto en solitario, como en combinación con el reactivo Plus para aumentar aún más la eficiencia. Se añadieron cada uno de los reactivos en un volumen determinado de medio DMEM sin suplementar (los volúmenes recomendados por el fabricante) por separado. Después de 15 minutos, se juntaron las dos mezclas y se dejaron otros 15 minutos más de incubación. La mezcla se echó sobre las células, previamente lavadas con PBS 1X, dejándolas en medio DMEM sin suplementar y la mezcla generada. Después de 5 horas, el medio de las células fue completado hasta dejarlo con una concentración de suero de 10%. Se dejaron las células 24-48 horas con el fin de que expresaran la proteína exógena.

Posteriormente a cada tipo de técnica de transfección empleada y una vez sometidas a las condiciones deseadas en cada experimento, las células se recogieron en hielo, o a temperatura ambiente, con el tampón de lisis adecuado para cada experimento en concreto.

2.2. Obtención de sublíneas estables

A partir de las células parentales se transfectaron diferentes vectores, en función de la sublínea que se pretendía generar, siguiendo distintos métodos de transfección, generalmente Lipofectamina o FuGene. Todos los vectores usados llevan un gen de resistencia a algún antibiótico que permite seleccionar las células transfectadas con la concentración óptima de dicho antibiótico. Los antibióticos utilizados para la realización de dicha tesis han sido la geneticina (0.75 µg/µl) o zeocina (300 µg/ml).

Tras, aproximadamente, 10 ó 15 días en presencia del antibiótico se obtuvieron colonias puntuales, que permitieron ser aisladas para continuar su crecimiento por separado utilizando para ello discos de tripsina. En otros casos, los clones de colonias transfectadas se mezclaron obteniendo un *pool* de sublíneas, resultantes de la misma transfección. La expresión ectópica de cada línea fue comprobada mediante la técnica de *western blot*, utilizando para su detección un anticuerpo frente a la proteína sobreexpresada, o bien un anticuerpo para un epítipo en el caso de que la proteína lo portara.

2.3. Líneas celulares utilizadas

| <u>LINEA CELULAR</u> | <u>ORIGEN</u> | <u>MEDIO DE PROPAGACIÓN</u> |
|-----------------------------|---|-----------------------------|
| HEK 293T | Células embrionarias de riñón humano. Antígeno T positivas | DMEM 10% SF |
| COS 7 | Fibroblastos de riñón de mono verde africano | DMEM 10% SF |
| NIH 3T3 | Fibroblastos embrionarios murinos | DMEM 10% CS |
| MEFs | Fibroblastos embrionarios murinos | DMEM 10% SF |
| MEFS H/N-RAS -/- | Fibroblastos embrionarios murinos | DMEM 10% SF |
| MCF-7 | Células epiteliales mamarias humanas | DMEM 10% SF |
| HeLa | Células epiteliales de endometrio humanas | DMEM 10% SF |

Tabla 3.3. Resumen de las líneas celulares utilizadas en el trabajo. Se detallan las diferentes líneas celulares que se han utilizado para la realización de este trabajo.

Todas las líneas fueron mantenidas a una temperatura de 37 °C, 5% de CO₂ y una humedad de 95%.

2.4. Tratamientos para las líneas celulares

En muchos casos, durante este trabajo, se han utilizado ciertos tratamientos o fármacos con el fin de estimular las células en función del experimento a realizar. En todas las cinéticas de activación de los distintos componentes de la cascada de las MAPKs, las células eran privadas de suero durante 16 horas y posteriormente se procedía a la estimulación con los distintos tratamientos. Los tiempos de estimulación están indicados en cada experimento.

Posteriormente, las células eran lisadas en el tampón de lisis adecuado y se procedía a su análisis por diferentes técnicas. Los tratamientos empleados y sus concentraciones son:

| <u>TRATAMIENTO</u> | <u>CONCENTRACIÓN</u> | <u>CÉLULAS ESTIMULADAS</u> |
|--------------------|----------------------|----------------------------|
| EGF | 50 ng/ml | MEFs, MCF-7, HeLa |
| EGF | 5 ng/ml, 1 ng/ml | HeLa |
| TPA | 10 μ M | MEFs |
| LPA | 10 μ M | MEFs |
| HRG | 30 ng/ml | MCF-7 |

Tabla 3.4. Resumen de los tratamientos utilizados en el trabajo. Se detallan los estímulos utilizados durante la realización de la tesis, detallando la concentración y la línea celular en la que se utilizaron.

3. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

3.1. Detección de proteínas por western blot

Para la obtención de los extractos totales de proteína proveniente de cultivos celulares, después del tratamiento oportuno si fuera necesario, se eliminó el medio de cultivo de las placas, y se lisaron con el volumen adecuado de un tampón de lisis apropiado. Para los experimentos con la líneas de MEFs y MCF-7 se usó un tampón de lisis constituido por: 20 mM HEPES pH 7.5, 10 mM EGTA, 40 mM β -glicerofosfato, 1% detergente no iónico NP40, 2.5 mM $MgCl_2$, 1mM ortovanadato, 1mM DTT y extemporáneamente 10 μ g/ml aprotinina y 10 μ g/ml leupeptina. Para la obtención de lisados en los experimentos con la línea HeLa se usó un tampón constituido por: 20 mM Tris pH 7.4, 137 mM NaCl, 10% glicerol, 0.1% SDS, 1% Tritón X-100, 0.5% deoxicolato sódico, 2 mM EDTA, 10 μ g/ml aprotinina y 10 μ g/ml leupeptina. Las células se recogieron y se centrifugaron a 13.000 rpm, durante 7 minutos y a 4 $^{\circ}$ C, para su clarificación. Se separaron los extractos de proteínas del resto de componentes de las células y se procedió a la cuantificación de la concentración proteica de cada lisado. Para la determinación de la cantidad de proteína se usó el método de Bradford (Bradford, 1975), empleando la albúmina de suero bovino (BSA) para establecer una recta patrón, y se realizó la medida a una longitud de onda de 620 nm en un aparato de ELISA.

Se tomaron aproximadamente 50 μ g de proteína, a los que se añadió tampón Laemli 5X (100 mM Tris pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 20 mM DTT y 0.005% azul de bromofenol). Tras hervir las muestras durante cinco minutos, se sometieron a electroforesis en un gel vertical de poliacrilamida (29:1)-SDS (dodecil sulfato sódico) de un porcentaje adecuado al tamaño de

la proteína a analizar. Se usó un porcentaje del 12% de acrilamida para las proteínas menores de 45 kDa, del 10% para detectar proteínas entre 45 y 100 kDa, y del 8% para proteínas de gran peso molecular. La electroforesis vertical se llevó a cabo en un tampón con 25 mM Trizma base, 192 mM glicina y 0.1% SDS. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa fijando el amperaje en 400 mA durante el tiempo apropiado en función del tamaño de la proteína, en un tampón de Trizma base 25 mM y 192 mM Glicina, o bien en membranas de PVDF a un voltaje constante de 100 V durante una hora en un tampón Trizma base 25 mM, 192 mM glicina y 10% metanol.

Finalizada la transferencia, las membranas se incubaron durante una hora, a temperatura ambiente y con agitación, en una solución de TBS-T (*Tris Buffered Saline-Tween*; 20 mM Tris pH 7.5, 137 mM NaCl y 0.05% de Tween 20) con un 4% de BSA, para bloquear los sitios inespecíficos. Tras ello, los filtros fueron incubados con el anticuerpo primario (0.2-0.4 µg/ml o las concentraciones indicadas por la casa comercial, en cada caso concreto) diluido en BSA al 4% en TBS-T durante una hora como mínimo. Se realizaron dos lavados con TBS-T durante un total de quince minutos, tras los cuales se incubaron los filtros con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa, diluido 1:5.000 o 1:10.000 en leche al 0.4% en TBS-T durante una hora a temperatura ambiente. Se realizaron de nuevo dos lavados con TBS-T y se procedió a la detección de la proteína por quimioluminiscencia utilizando el *kit* ECL™. Se realizó una autorradiografía de los filtros con películas Kónica que nos permitió detectar una banda allí donde el anticuerpo primario había reconocido de forma específica la proteína de interés.

| ANTICUERPO | ESPECIFICIDAD | DILUCIÓN | CASA COMERCIAL |
|-------------------|----------------------|-----------------|-----------------------|
| Anti-HA | Monoclonal de ratón | 1:1.000 | Santa Cruz; sc-7392 |
| Anti-Flag | Monoclonal de ratón | 1:1.000 | Stratagene; 200472-21 |
| Anti-HRas | Policlonal de conejo | 1:1.000 | Santa Cruz; sc-520 |
| Anti-NRas | Policlonal de conejo | 1:1.000 | Santa Cruz; sc-519 |
| Anti-KRas | Policlonal de conejo | 1:500 | Santa Cruz; sc-521 |
| Anti-panRas | Monoclonal de ratón | 1:1.000 | Calbiochem; op-41 |
| Anti-pERK | Monoclonal de ratón | 1:1.000 | Santa Cruz; sc-7383 |

| ANTICUERPO | ESPECIFICIDAD | DILUCIÓN | CASA COMERCIAL |
|------------------------------------|----------------------|-----------------|-----------------------|
| Anti-ERK2 | Policlonal de conejo | 1:1.000 | Santa Cruz; sc-154 |
| Anti-ERK2 | Monoclonal de ratón | 1:1.000 | Santa Cruz; sc-1647 |
| Anti-pRSK1 | Policlonal de conejo | 1:1.000 | Cell Signaling; 9344S |
| Anti-RSK1 | Policlonal de conejo | 1:1.000 | Santa Cruz; sc-231 |
| Anti-pElk1 | Monoclonal de ratón | 1:1.000 | Santa Cruz; sc-8406 |
| Anti-Elk1 | Policlonal de conejo | 1:1.000 | Santa Cruz; sc-355 |
| Anti-pMEK | Policlonal de conejo | 1:500 | Cell Signaling; 9121S |
| Anti-MEK | Monoclonal de ratón | 1:1.000 | Cell Signaling; 4694S |
| Anti-ErbB2 | Monoclonal de ratón | 1:1.000 | Calbiochem; op-15 |
| Anti-RhoGDI | Policlonal de conejo | 1:1.000 | Santa Cruz; sc-360 |
| Anti-laminA/C | Policlonal de conejo | 1:1.000 | Santa Cruz; sc-20680 |
| Anti-transferrina | Monoclonal de ratón | 1:1.000 | ZYMED; 13-6890 |
| Anti-calreticulina | Monoclonal de ratón | 1:1.000 | BDBiosciences; 612136 |
| Anti-EGFR | Policlonal de conejo | 1:1.000 | Santa Cruz; sc-03 |
| Anti-caveolina | Monoclonal de ratón | 1:1.000 | BDBiosciences; 610057 |
| Anti-MOUSE-HRP (IgG de ratón) | Cabra | 1:5.000 | Biorad; 170-5047 |
| Anti-RABBIT-HRP (IgG de conejo) | Cabra | 1:5.000 | Biorad; 170-5046 |

Tabla 3.5. Resumen de los anticuerpos utilizados para la detección de proteínas. Se detallan los diferentes anticuerpos utilizados, tanto primarios como secundarios, detallando la casa comercial, la referencia del producto así como la concentración a la cual se han utilizado.

3.2. Detección de proteínas por inmunofluorescencia

Las células se crecieron hasta subconfluencia sobre cubreobjetos de vidrio de 10 mm de diámetro, que previamente habían sido esterilizados. En el momento de hacer la inmunofluorescencia, las células se lavaron con PBS 1X y se fijaron con una solución al 3.7% de paraformaldehído en PBS 1X, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras la fijación de las células, se realizaron dos lavados con PBS 1X, cinco minutos cada lavado, seguido por un lavado con 0.1 M de glicina y tres lavados con PBS 1X. En el caso en el que las células tuvieran que ser permeabilizadas, se incubaron durante 15 minutos con una dilución 0.1 M

de glicina, 0.5% de Tritón X-100 en PBS, seguido por tres lavados de PBS 1X de cinco minutos cada uno. A continuación, las células se incubaron con el anticuerpo primario necesario a una concentración 1/75 o 1/100, durante una hora en una cámara húmeda. Tras tres lavados con PBS, de cinco minutos cada uno, se añadió el anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo: FITC (Conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína) o bien Texas Red, incubándolo durante 45-50 minutos en una cámara húmeda y en oscuridad. Transcurrido ese tiempo, se realizaron dos nuevos lavados, de cinco minutos cada uno, con PBS 1X.

En el caso de los ensayos de doble marcaje por inmunofluorescencia, el anticuerpo primario de cada una de las proteínas debe ser de diferente especie para poder detectar cada uno de ellos con un fluoróforo diferente.

Por último, se añadió sobre un portaobjetos una gota de medio de montaje *Vectashield*, y posteriormente se colocó encima el cubre con las células tratadas previamente. Las células se examinaron mediante microscopía de fluorescencia (fotomicroscopio Axiophot, Carl Zeiss). Las imágenes se digitalizaron y procesaron utilizando el paquete informático de *Adobe Photoshop*.

3.3. Obtención de proteínas recombinantes para los ensayos de unión “in vitro”

El sistema de fusión génica GST (*Glutathione S-transferase*) es un método muy útil para la purificación de proteínas producidas en *E.coli* como proteínas fusión con GST de *Schistosoma japonicum*. Los plásmidos pGEX están diseñados para obtener elevados niveles de expresión inducible.

Se utilizaron para la obtención de las proteínas recombinantes fusionadas dos tipos de cepas bacterianas procedentes de *E.coli*: DH5 α y Rossetta. Se inoculó un cultivo de 50 ml de medio LB durante 16 horas aproximadamente, a una temperatura de 37 °C. Al día siguiente el inóculo se diluyó en medio LB fresco, llevándolo a un volumen de 400 ml y se creció durante 4 horas más a 37 °C. La inducción de la expresión de las proteínas se realizó añadiendo IPTG (isopropil- β -Dtiogalactopiranosido) a una concentración de 0.1 mM, incubándolo durante 4 horas más a 37 °C.

En el momento de recoger las bacterias, se centrifugó a 6.000 rpm durante 10 minutos y se resuspendieron en 10 ml de tampón I: PBS 1X, 1% NP40, 10 μ g/ml aprotinina y 10 μ g/ml

leupeptina. Posteriormente se sonicó durante 7 minutos a una amplitud de 80% y 0,9 ciclos. El extracto del sonicado se centrifugó a 3.500 rpm durante 30 minutos a 4 °C, recogiendo posteriormente el sobrenadante al que se le añadió 500 µl de *Glutation-Sepharose* 4B que nos permite recuperar la proteína GST, para lo cual se incubó 3 horas a 4 °C en agitación orbital. La matriz de *Glutation-Sepharose* 4B con la proteína de fusión asociada, se lavó tres veces con el tampón I, anteriormente usado para la resuspensión, dos veces más con PBS frío y una última vez con el tampón MLB: 25 mM Hepes pH 7.5, 150 mM de NaCl, 1% Nonidet-P40, 10% glicerol, 25 mM NaF, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, y 1 mM ortovanadato sódico. La matriz de *Glutation-Sepharose* 4B se diluyó con este último tampón en una relación 1:1 para su conservación a 4 °C.

En algunos de los ensayos se utilizó una proteína recombinante comercial para ERK2, fusionada con GST en el extremo amino terminal, obtenida tras la expresión en *E.coli* y tras la activación con MEK1.

3.4. Ensayo in vitro pull-down

El ensayo in vitro *pull-down* se usó para medir la tasa de intercambio de nucleótidos o lo que es lo mismo para medir la actividad de las GTPasas estudiadas en este trabajo. Las células, una vez cultivadas y tratadas según el experimento, se lavaron con PBS 1X y se lisaron con el tampón MLB (descrito anteriormente en el apartado sobre la obtención de proteínas recombinantes) junto a inhibidores de proteasas. Los lisados se centrifugaron durante 10 minutos a 13.000 rpm para poder recoger el sobrenadante con la fracción proteica. De dicho sobrenadante se guardó una pequeña parte (40 µl) y el resto se incubó durante una hora con la proteína fusión GST-Raf-RBD en agitación orbital a 4 °C. Contamos con dos plásmidos que codifican para esta proteína que difieren en el tamaño de Raf-RBD fusionado a GST, el dominio RBD de Raf es reconocido por Ras en su estado activo uniéndose a esa región.

Tras la incubación de los lisados con la proteína fusión, se realizaron dos lavados con el tampón MLB, recogiendo en la última centrifugación los precipitados que contenían la matriz de *glutation* a la cual estaba unida la proteína GST-RBD y a la cual se une Ras en su estado activo. Por último, se realizó el *western blot* tanto de los precipitados como de los lisados totales, de tal manera que se determinó la cantidad de Ras activo tras cuantificar la cantidad

de Ras detectado en los precipitados en relación a la cantidad total de Ras detectado en los lisados separados de los sobrenadantes en los primeros pasos del protocolo.

3.5. Detección de dímeros de ERK en condiciones nativas

Para la detección de los dímeros de ERK en condiciones nativas se prepararon los lisados totales de las proteínas en iguales condiciones que los procesados en condiciones desnaturalizantes. Sin embargo el tampón de carga (2X) que se utilizó se basa en una solución de 0.126 M Tris-HCl pH 6.8, 20% glicerol y 0.02% azul de bromofenol.

Los lisados se separaron por electroforesis en condiciones nativas, esto es en un tampón de electroforesis Trizma base 25 mM y 192 mM Glicina, y en geles de poliacrilamida (29:1) sin SDS, a un porcentaje del 8%. Posteriormente, se transfirieron los geles a membranas de nitrocelulosa a un amperaje constante de 400 mA durante 80 minutos. Por último se procedió a la detección de ERK con un anticuerpo específico para ERK2.

3.6. Fraccionamiento de la membrana plasmática en gradiente de sacarosa con Tritón-X100

Se crecieron las células en placas de 100 mm hasta tener una confluencia aproximadamente del 80%, en el momento de realizar el fraccionamiento se recogieron las células con PBS 1X frío y se centrifugaron durante 5 minutos a 1.500 rpm. El precipitado de las células se resuspendió en 500 µl de tampón TNET: 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.25% Tritón X-100, 10 µg/ml aprotinina, 10 µg/ml leupeptina y 1 mM PMSF. Para facilitar su solubilidad se pasaron los lisados por jeringuillas de 1 ml con agujas de 25G y posteriormente se incubaron durante 30 minutos a 4 °C en un agitador orbital. Posteriormente, se añadieron 500 µl de sacarosa al 90%, quedando la mezcla al 45%, la cual la colocamos sobre en el fondo de un tubo Beckman blando de 5 ml. Sobre esta muestra se añadieron 3.4 ml de sacarosa al 35% y 1 ml de sacarosa al 16% (todas las soluciones de sacarosa se disolvieron en el tampón TNET). Los tubos se llevaron a ultracentrifugación en un rotor SW 65 ó MLS-50 a 41000 rpm durante 16-18 horas a 4 °C.

Cuando se sacan los tubos de la ultracentrífuga se puede observar un gradiente continuo, en el que la parte superior corresponde a la muestra menos concentrada en sacarosa y en el fondo del tubo queda la mayor concentración de muestra. Se recogieron 12 fracciones de

400 µl cada una en orden creciente de concentración. Una parte de cada lisado se utilizó para realizar el western blot, añadiéndole el tampón de carga LAEMLI, y separándolo en geles de poliacrilamida (29:1)-SDS.

3.7. Fraccionamiento retículo endoplasmático-membrana plasmática

Se necesitaron una gran cantidad de células para realizar el fraccionamiento y purificación de retículo endoplasmático, de tal manera que se prepararon 4 placas de 100 mm a una confluencia al 80%. En el momento de realizar el fraccionamiento, en primer lugar, se lavaron las células con PBS 1X, y se lisaron las células durante 10 minutos con el tampón de lisis hipotónico (10 mM HEPES pH 7.3, 1.5 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 1 mM e inhibidores de proteasas). A continuación se homogeneizaron los lisados realizando 20 pases por un homogeneizador *Dounce* (8,010 mm de diámetro y 5 µm de hueco), centrifugando después a 700 g durante 3 minutos a 4 °C. Se tomó el sobrenadante resultante, que contenía el citosol y las membranas, y se procedió a una nueva centrifugación a 40.000 g durante 30 minutos a 4 °C. Las membranas celulares se localizaron en el precipitado resultante, y se lavaron una vez con el tampón de lisis hipotónico usado anteriormente para la lisis inicial. Una vez lavadas las membranas, se resuspendieron en un 500 µl de tampón de homogeneizar (0.25 M sacarosa, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 25 mM KCl y 5 mM MgCl₂).

Por otra parte, se preparó un gradiente discontinuo de iodixanol del 2.5%-30% (a partir de una solución al 60% en tampón de homogeneizar). De tal manera que en un tubo Beckman blando de 5 ml se depositaron el fondo 500 µl de la solución de iodixanol al 30%, posteriormente se añadió suavemente 4 ml de la solución al 2.5% de iodixanol, y por último se añadió 500 µl de la muestra. Se procedió a la ultracentrifugación de la muestra a una velocidad de 100.000 g durante 5-6 horas, recogiendo los tubos nada más terminar la centrifugación para que el gradiente no se deshaga. Se recogieron fracciones de 100 µl cada una para proceder a su análisis por *western blot*.

3.8. Fraccionamiento núcleo-citoplasma

Para separar los diferentes compartimentos celulares: núcleo y citoplasma, se recogieron las células en el tampón A (50 mM β-glicerofosfato pH 7.3, 1.5 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM VO₄, 50 µg/ml PMF, 10 µg/ml aprotinina y leupeptina) mediante centrifugación a

12.000 rpm a 4 °C durante 5 minutos. Las células se lisaron en el tampón B (40 mM HEPES pH 7.5, 0.1% NP-40, 5 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM benzamidina, 1 mM VO₄, 50 µg/ml PMF, 10 µg/ml aprotinina y leupeptina) para obtener la fracción citoplasmática en el sobrenadante tras una nueva centrifugación. El pellet se resuspendió en el tampón C (50 mM β-glicerofosfato pH7.3, 420 nM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, 25% glicerol) y se sonicó en hielo a 40W, 2 veces durante 5 segundos; mediante centrifugación a 12.000 rpm se obtuvo la fracción nuclear (en el sobrenadante). El análisis de la expresión o actividad de cada proteína se hizo por *western blot* con los anticuerpos adecuados en cada caso.

3.9. Ensayo de proliferación: curvas de crecimiento

Como primer paso, las células de cada tipo celular con las que se iba a realizar el ensayo fueron tripsinizadas y recogidas para ser contadas mediante la cámara de Neubauer o el empleo del *Nucleocounter* (técnica basada en la tinción con ioduro de propidio del DNA de los núcleos). Posteriormente, tras realizar las diluciones oportunas, las células fueron sembradas en igual número inicial, utilizando para cada punto un mínimo de dos réplicas.

A cada tiempo estimado en el experimento (normalmente 24 horas) las células eran recogidas en tripsina, a la que se añadía medio con suero con el fin de inactivarla, realizando el conteo en cada punto con cualquiera de los dos métodos descritos previamente, repitiendo este procedimiento hasta el tiempo máximo requerido.

3.10. Ensayo de formación de colonias de proliferación

Para estudiar la capacidad proliferativa de las células en diferentes condiciones, se sembraron las células (MEFs) a muy baja densidad, y se transfectaron con los ADNs de interés con lipofectamina y el reactivo plus.

Una vez transfectadas, se añadió al medio de cultivo el antibiótico de selección en función del gen de resistencia que portaban los plásmidos utilizados. En nuestro caso se utilizó la zeocina a una concentración de 100 mg/ml. Al cabo de 10-15 días, aquellas células transfectadas y con capacidad proliferativa habían dado lugar a una colonia formada por células procedentes de la célula transfectada originalmente.

Para su observación y determinación se tiñeron las placas con una solución al 5% de GIEMSA en PBS 1X durante un mínimo de dos horas, una vez que las células habían sido fijadas con metanol durante 10 minutos. Esto nos permitió contar las células en cada caso.

El rescate proliferativo de las proteínas expresadas se calcula según el número de colonias obtenido en ausencia de la expresión endógena de Ras (en presencia de 4OH-TMX) relativizado con el número de colonias obtenido cuando de manera endógena se está expresando la isoforma K-Ras (en ausencia de 4OH-TMX), expresado como porcentaje.

3.11. Tinción de lípidos con OilRed

Para estudiar la acumulación de lípidos característica de las células diferenciadas a fenotipo adipocítico en diferentes condiciones, se sembraron las células (MCF7) a muy alta densidad, y se transfectaron con los ADNs de interés con lipofectamina.

A las 24 horas de la transfección, se pusieron las células en condiciones de ayuno durante 16 horas. Pasado ese tiempo se añadió HRG como control positivo de diferenciación, y EGF a cada una de las condiciones para analizar. Se dejaron las células en esas condiciones durante 7 días, cambiando el medio a los 3-4 días. El último día se fijaron las células durante 45 minutos con paraformaldehído al 10%, seguido de un lavado con agua y otro lavado con isopropanol al 60%. La tinción se llevó a cabo con una dilución 60:40 en agua de una solución *stock* de OilRed preparada el día anterior a una concentración de 75 mg/ml. Después de 1 hora se quita la solución de tinción y se lava 3 veces con agua. Tras tomar las fotografías oportunas, se procede a la extracción del rojo con isopropanol durante 10 minutos y se recoge para determinar la absorbancia a 510-540 nm. A continuación, las células se lisaron con un tampón de lisis constituido por 20 mM HEPES pH 7.5, 10 mM EGTA, 40 mM β -glicerofosfato, 1% detergente no iónico NP40, 2.5 mM $MgCl_2$ y 1 mM ortovanadato. Los lisados obtenidos se utilizaron para la cuantificación de proteína por el método Bradford, cuyos datos se usaron para relativizar los datos obtenidos de la lectura del rojo. En las gráficas de los resultados se representa la tasa de diferenciación como Abs 540/Abs 620.

4. ANÁLISIS INFORMÁTICO

4.1. Análisis de los western blot

Las bandas obtenidas en las películas tras realizar los western blot, fueron escaneadas mediante el programa *Adobe Photoshop CS4*. Para cuantificar la intensidad de las bandas se usó el *software Image J*.

4.2. Gráficas y diseños

Todas las gráficas, diagramas y diseños de este trabajo se han realizado empleando el *software GraphPad Prism 5* y el *PowerPoint2011*.

4.3. Análisis estadístico

Para el análisis del nivel de confianza o significancia de los distintos experimentos se empleó el *software GraphPad Prim 5*.

4.4. Bibliografía

La bibliografía presente en este trabajo se realizó usando el *software EndNote X5*.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. EL ESPACIO COMO REGULADOR DE LA SEÑAL RAS-ERK INDUCIDA POR EGF

Hasta el momento, el modelo matemático elaborado en el trabajo de Schoeberl et al, es uno de los más completos de todos los propuestos para la ruta de las MAPKs. Sin embargo, en este modelo, no se considera el microambiente en el que Ras señala, ni los mecanismos de regulación a los que Ras se expone en función del sitio subcelular de señalización.

Tomando como base este modelo, dentro del proyecto europeo SIMAP (*Simulation Modelling of the MAP kinase Pathway*), se ha desarrollado un modelo completo y sólido de la vía de las MAPKs corrigiendo alguno de los errores que el anterior modelo mostraba. En el modelo de SIMAP se han obtenido los parámetros cinéticos de la literatura científica y de trabajos experimentales, creando predicciones cualitativas y verificándolas con experimentos independientes con la participación de diferentes grupos de investigación.

Por nuestra parte, de manera colaborativa, hemos aportado los datos de la señalización de Ras desde las diferentes localizaciones subcelulares a este modelo, que permite al modelo SIMAP corregir la ausencia de este dato en el modelo de Schoeberl et al.

1.1. Análisis de las cinéticas de fosforilación de ERK desde las distintas localizaciones subcelulares de Ras

Hoy en día se sabe que Ras es capaz de señalar desde distintas localizaciones subcelulares como membrana plasmática (tanto membrana desordenada como balsas lipídicas), retículo endoplasmático o Aparato de Golgi entre otras. Además, se sabe que el sitio desde el cual Ras señala puede ser determinante para desencadenar una respuesta u otra. Por todo ello, era necesario saber cómo la señalización de Ras desde cada una de las localizaciones subcelulares puede regular la fosforilación de ERK, tanto en intensidad como en duración de la señal, para añadirlo al modelo matemático del proyecto SIMAP.

De manera consensuada entre todos los grupos de investigación que participan en el proyecto SIMAP, se estableció realizar los experimentos en la línea celular HeLa (células humanas epiteliales de endometrio). Esta línea celular fue seleccionada por ser una de las más usadas en el estudio de la transducción de señales, lo que permite encontrar gran parte de los parámetros cinéticos en la literatura científica. Además, permite utilizar como base el modelo de Schoeberl et al, en el que se utiliza también HeLa como línea celular.

Con el fin de analizar la señalización de Ras desde diferentes localizaciones subcelulares, bloqueamos la actividad de Ras específicamente en sublocalizaciones determinadas, mediante el empleo de plásmidos que expresaban la proteína NF1-GAP (neurofibromatosis tipo 1) unida a los epítomos que permiten dirigirla a las localizaciones deseadas: M1 para retículo endoplasmático, LCK para membrana plasmática y KDEL para Aparato de Golgi. Esta proteína pertenece al grupo de proteínas activadoras de GTPasas (proteínas GAP), que favorecen la hidrólisis de GTP, inactivando de esta manera a Ras. La contribución de Ras desde membrana plasmática es estudiada sólo con el epítomo LCK, que lo dirige a las balsas lipídicas, y no se estudia la contribución desde membrana desordenada ya que se comprobó que, de manera endógena, Ras está localizado de manera predominante en balsas lipídicas (Figura 4.1).

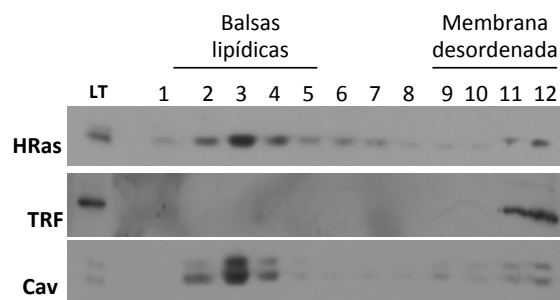


Figura 4.1. Fraccionamiento de la membrana plasmática en células HeLa Las células HeLa fueron lisadas y procesadas según el protocolo descrito para la separación de los dominios de la membrana plasmática en gradiente de sacarosa con Tritón X-100, separando las balsas lipídicas de la membrana desordenada, y determinando, mediante *western blot*, la presencia de H-Ras en balsas lipídicas. TFR: receptor de transferrina; Cav: caveolina.

Así es posible bloquear la actividad de Ras en cada una de sus localizaciones subcelulares, y analizar el efecto sobre la fosforilación de ERK en cuanto a intensidad y

duración en cada uno de los casos, analizando de esta manera la contribución de las distintas sublocalizaciones a la señal total.

Se hizo un primer abordaje, estimulando las células con EGF (5 ng/ml) durante 5 minutos y analizando los niveles de fosfo-ERK fruto del bloqueo de Ras en cada localización subcelular. Para cuantificar en términos absolutos los niveles de ERK fosforilado, utilizamos un patrón de cantidades conocidas de una proteína recombinante GST-ERK. Observamos que, el bloqueo de la actividad de Ras, tanto desde membrana plasmática como desde retículo endoplasmático, conlleva una reducción de los niveles de ERK fosforilado hasta niveles similares al control de células sin estimular, mientras que la inhibición de Ras desde el Aparato de Golgi reduce la señalización pero de manera menos pronunciada (Figura 4.2).

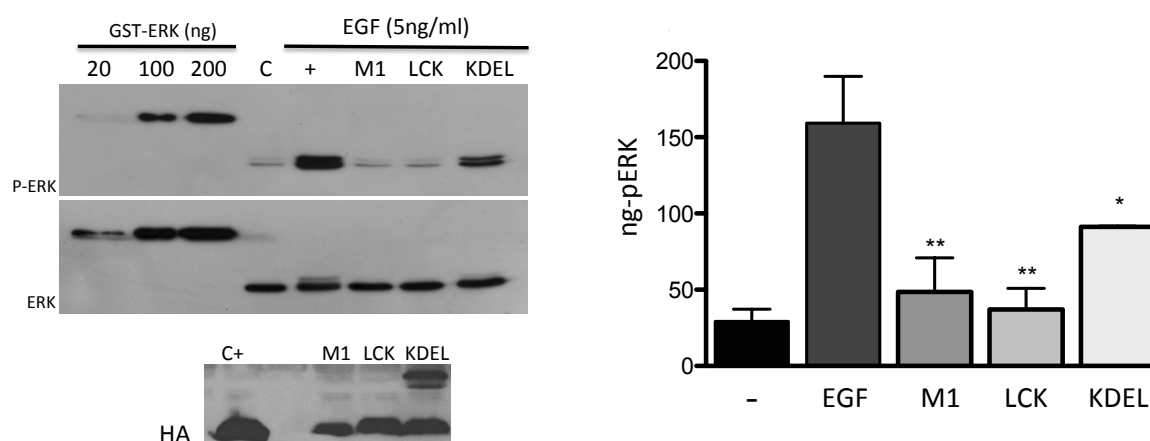


Figura 4.2. Análisis de la intensidad en la fosforilación de ERK tras la estimulación con EGF en células transfectadas con NF1 total, M1-NF1, LCK-NF1 y KDEL-NF1. Células HeLa transfectadas con pCEFL (+), M1-NF1 (M1), LCK-NF1 (LCK) y KDEL-NF1 (KDEL), fueron privadas de suero (16 horas) y estimuladas con EGF (5 ng/ml) durante 5 minutos, lisadas y sometidas a electroforesis. Se realizó un western blot para analizar la cantidad de ERK fosforilado utilizando como patrón cantidades conocidas de ERK activo. Análisis estadístico mediante el *test t* de *student*; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$, relativo a las células tratadas con EGF.

Sabiendo además que la duración de la señal es de gran importancia en la determinación de una respuesta celular, tal y como se demostró en las células PC12 bajo estimulación con EGF y NGF (Marshall, 1995), quisimos analizar cómo eran las cinéticas de fosforilación de ERK en función del bloqueo de las distintas subseñales al ser bloqueadas por el correspondiente NF1. En primer lugar, se transfectaron células con los distintos plásmidos: M1-NF1, LCK-NF1 y KDEL-NF1, se estimularon (previamente privadas de suero durante 16 horas) con EGF a una

concentración de 5 ng/ml y se lisó a los tiempos indicados. Se analizaron los niveles de ERK fosforilado en cada caso y se estimó la cantidad exacta comparando con el patrón de cantidades conocidas de ERK activo (Figura 4.3).

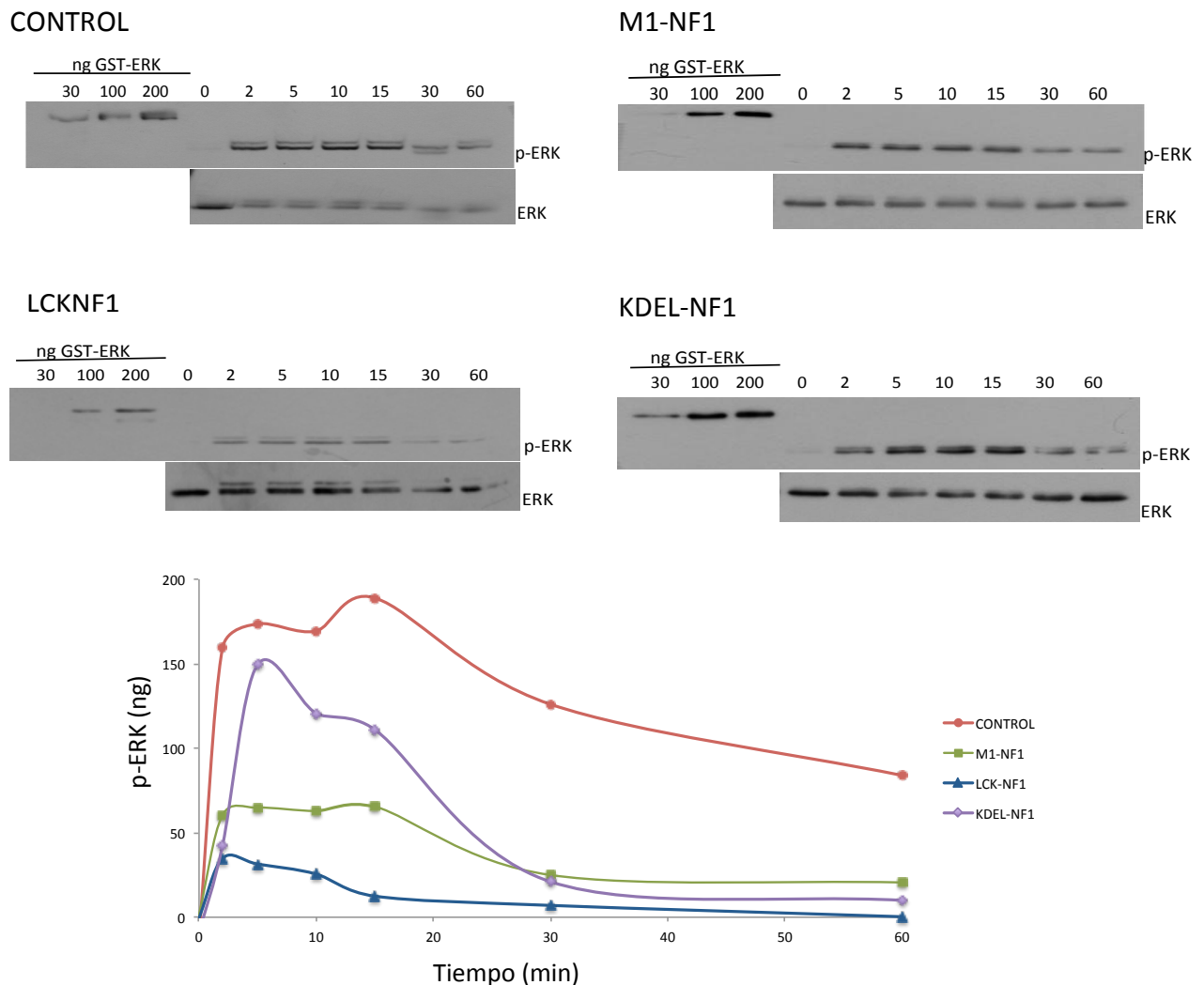


Figura 4.3. Análisis de las cinéticas de fosforilación de ERK, tras la estimulación con EGF en células HeLa expresando la proteína NF1, dirigidas específicamente a localizaciones subcelulares. Tras la estimulación con EGF (5 ng/ml), las células previamente privadas de suero (16 horas) fueron lisadas a los distintos tiempos indicados, para cada una de las líneas. Se separaron por electroforesis y se realizó un western blot para la detección de fosfo-ERK y se cuantificó la intensidad de cada banda, relativizándolo con sus correspondientes cantidades de ERK detectado, utilizando como patrón de cantidad de ERK activo, una proteína recombinante GST-ERK en cantidades conocidas.

Observamos que, las células transfectadas con la construcción LCK-NF1, donde el componente de la membrana plasmática está bloqueado, la intensidad de la fosforilación de ERK es mucho más baja que en las células transfectadas con vector vacío, utilizado como

control del experimento. Se observó una activación rápida a los dos minutos pero poco intensa, que va decayendo paulatinamente con el transcurso del tiempo. En el caso del bloqueo de Ras en retículo endoplasmático, utilizando una construcción que expresaba M1-NF1, pudimos observar también un descenso en la fosforilación de ERK con respecto al control, aunque algo mayor que lo observado en el caso de LCK-NF1. La fosforilación es sostenida desde los 2 minutos hasta los 15, disminuyendo posteriormente. Por último, cuando las células fueron transfectadas con la construcción KDEL-NF1 bloqueando Ras en el Aparato de Golgi, sólo se observó un pequeño descenso en el pico de activación con respecto al control, aunque la señal decayó más pronunciadamente (Figura 4.3).

1.2. Modelo de la contribución espacial a la señal Ras-ERK

Con estos datos de las distintas cinéticas de fosforilación de ERK tras el bloqueo de la actividad de Ras en diferentes localizaciones subcelulares, se elaboró el modelo de activación de Ras-ERK dependiente de la sublocalización.

En primer lugar, se necesitó una cinética control de la actividad de Ras endógena, como control de la señalización total de Ras en células HeLa. Para ello se realizó la técnica de *pull-down*, tras lo cual observamos que se producía una activación inicial de Ras a los 2 minutos que duraba hasta los 5 minutos disminuyendo posteriormente hasta niveles casi basales (Figura 4.4).

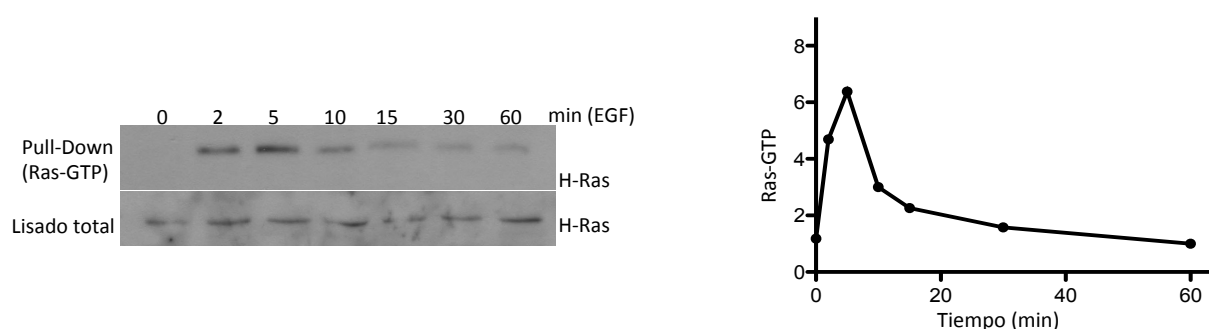


Figura 4.4. Análisis de la cinética de activación de Ras, tras la estimulación con EGF, en células HeLa. Tras la estimulación con EGF (5 ng/ml), las células previamente privadas de suero (16 horas) fueron lisadas a los distintos tiempos indicados. Tras la técnica de pull-down y tras separar una pequeña parte de lisado total, las muestras se separaron por electroforesis y se realizó un western blot para la detección de H-Ras-GTP y se cuantificó la intensidad de cada banda, relativizándolo con sus correspondientes cantidades de HRas total.

Con los datos de las cinéticas de fosforilación de ERK tras bloquear a Ras en determinadas localizaciones subcelulares, y con la cinética de activación de Ras endógeno, se procedió al análisis bioinformático y a la elaboración del modelo de simulación con el soporte informático adecuado. Debido a su gran extensión, los datos relativos a los análisis de sensibilidad del modelo, así como los análisis estocásticos de las diferentes variables consideradas, se presentan adjunto a este trabajo como archivo digital (*Algorithms for model solution, analysis and initial hypothesis*). El modelo de la contribución de las sublocalizaciones de Ras a la señal se ha elaborado asumiendo que: 1) Ras se distribuye en tres poblaciones, tanto en su forma activa como inactiva, 2) las tres poblaciones de Ras-GTP activa la misma población de Raf, y 3) cada población de Ras está determinada por tres parámetros: la cantidad total de Ras, la tasa de activación de Ras y la tasa de desactivación de Ras.

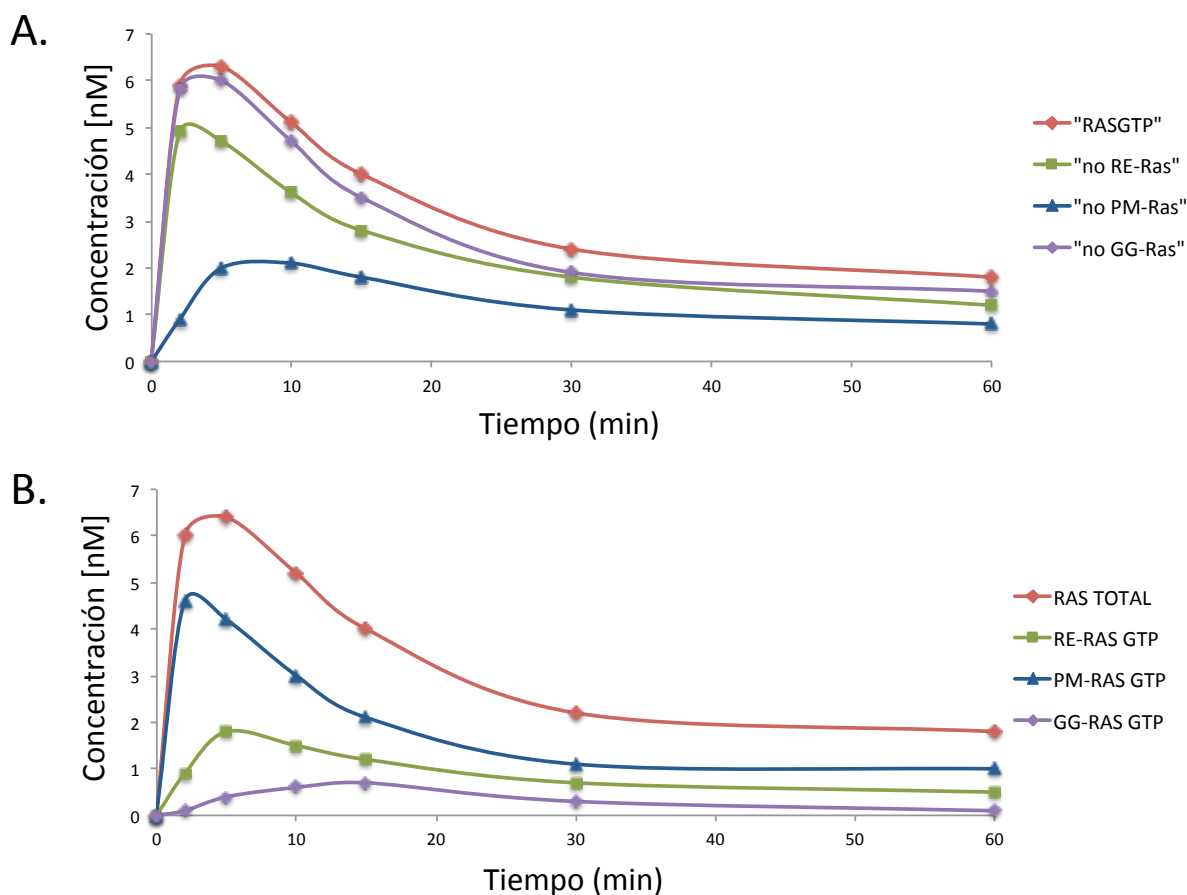
Según el modelo generado, el bloqueo de la actividad de Ras desde el Aparato de Golgi, no contribuye mucho a la cinética de activación de ERK total, mientras que si se bloquea la activación de Ras desde membrana plasmática se produciría un descenso muy significativo afectando no sólo a la intensidad sino también a la cinética de activación de ERK, siendo la activación mucho más lenta y tres veces menor, aunque más mantenida en el tiempo (Figura 4.5.A).

Al comparar la cinética de activación de ERK en las células control con la de las células sin señal desde retículo endoplasmático, también encontramos un descenso en la fosforilación de ERK, aunque de forma menos pronunciada que cuando bloqueamos desde membrana plasmática, y con una cinética similar a la de las células control en cuanto a la duración de la misma. Las mayores diferencias, según este modelo, aparecen en la activación de ERK obtenida si bloqueáramos la actividad de Ras en membrana plasmática, tras lo cual obtendríamos una cinética de activación más lenta y más sostenida en el tiempo (Figura 4.5.A).

Además, se simularon tres situaciones en las cuales la señalización en dos localizaciones son inhibidas al tiempo, proporcionando una predicción para el caso de doble *knockout*, donde dos poblaciones específicas de moléculas Ras-GAP fueran empleadas simultáneamente para dirigirlas a un par de sublocalizaciones, dejando sólo una localización activa. Es decir, la cinética estipulada para la activación de ERK desde membrana plasmática sería la consecuente del doble bloqueo en el retículo endoplasmático y Aparato de Golgi.

Según este modelo, la activación de ERK desde la membrana plasmática sería rápida al igual que la desactivación. Sin embargo, cuando Ras está activo desde el retículo endoplasmático la activación de ERK sería también rápida (aunque no tanto como desde membrana plasmática) pero con una desactivación más lenta. En el caso de la actividad de ERK en el Aparato de Golgi se estipula una activación muy lenta con un leve mantenimiento en el tiempo (Figura 4.5.B).

En cuanto a la contribución de la señal desde las localizaciones estudiadas, podríamos decir que Ras desde membrana plasmática contribuiría más intensamente que desde retículo endoplasmático, siendo Ras desde Aparato de Golgi quien menos contribuye. Teniendo en cuenta que la desactivación en el retículo endoplasmático es más lenta, según la predicción del modelo SIMAP, se deduce que Ras en el retículo endoplasmático contribuye a una cinética de activación de ERK sostenida en el tiempo, al contrario que la contribución de Ras en la membrana plasmática que conlleva a una activación de ERK transitoria. Por lo tanto, la contribución de Ras en la membrana plasmática afecta a los tiempos cortos tras la estimulación con EGF mientras que Ras en el retículo endoplasmático contribuye a los tiempos largos de la activación de ERK.



C.

| COMPONENTE | K_{ON} (1/M*s) | K_{OFF} (1/s) |
|------------|------------------|-----------------|
| PM-RasGTP | $6 \cdot 10^5$ | 0,18 |
| ER-RasGTP | $1 \cdot 10^5$ | 0,006 |
| GG-RasGTP | $7 \cdot 10^3$ | 0,001 |

Figura 4.5. Modelo de simulación de la vía de ERK. **A.** Simulación de cómo sería la cinética de activación de ERK, si estuviera bloqueada en cada una de las localizaciones estudiadas. **B.** Simulación de la contribución de Ras en cada una de las localizaciones estudiadas a la activación de ERK total. **C.** Datos de las constantes de activación y desactivación en cada una de las localizaciones subcelulares. **RE:** retículo endoplasmático; **PM:** membrana plasmática; **GG:** Ap. de Golgi; **K_{ON} :** Constante de activación; **K_{OFF} :** Constante de desactivación; **M:** número de moléculas; **S:** segundos

El modelo requería ser corroborado de alguna manera, y un abordaje que planteamos fue transfectar células HeLa con un plásmido que nos permitiera expresar de manera exógena la proteína APT1. Se trata de una proteína acilo-tioesterasa 1, cuya función es eliminar los grupos palmitoil que permiten el anclaje de ciertas proteínas, como el caso de Ras, a la membrana plasmática (Duncan and Gilman, 1998). H-Ras tiene dos grupos palmitoil en los grupos Cys181 y Cys184, por lo que APT1 es capaz de eliminar uno de ellos o los dos, permitiendo liberar a H-Ras de la membrana plasmática, incrementando la concentración de Ras en endomembranas. De esta manera, podríamos comparar la cinética de activación de ERK cuando se bloquea Ras en la membrana plasmática, con la cinética de las células transfectadas con APT1 que impiden las funciones de Ras desde la membrana plasmática.

Al transfectar las células con APT1 (que se marcó con un epítipo *flag* para su reconocimiento por *western blot*), observamos una fosforilación de ERK rápida y de menos intensidad a la de las células control, sin embargo, la desactivación es mucho más lenta y como consecuencia, la cinética de fosforilación de ERK más mantenida, lo que corrobora la predicción del modelo matemático (Figura 4.6).

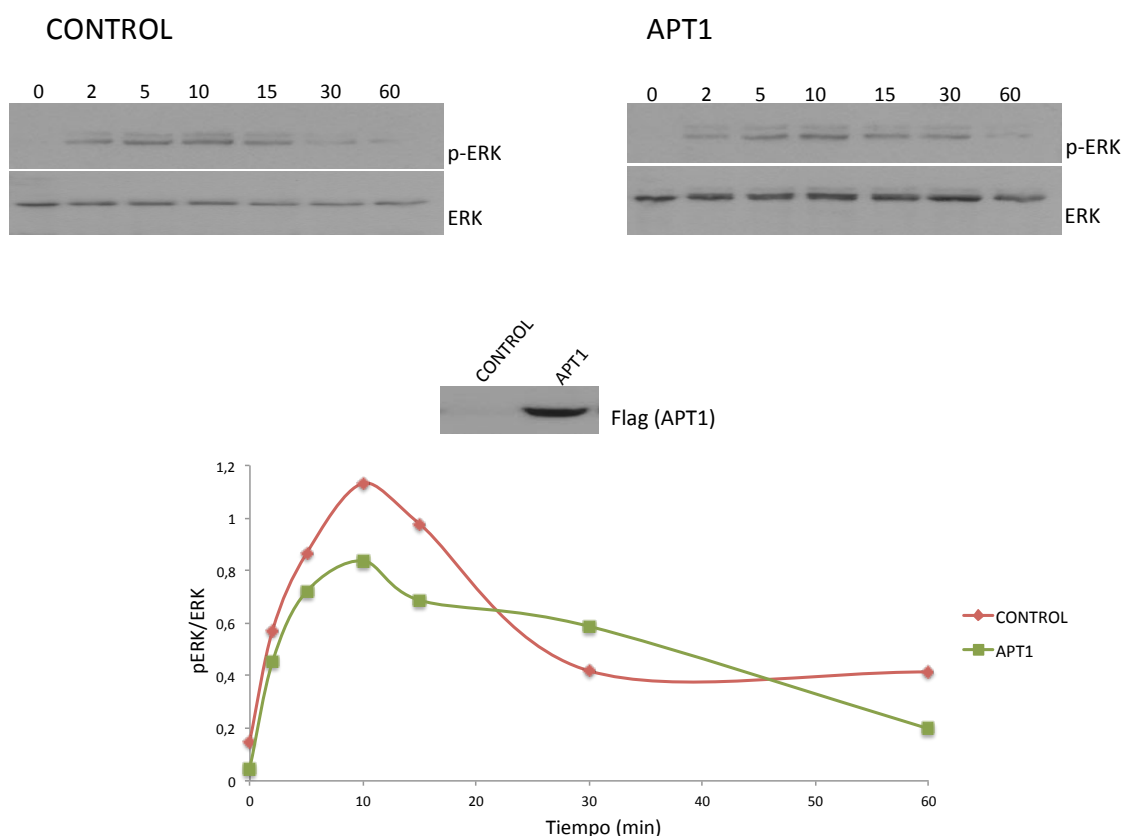


Figura 4.6. Análisis de la cinética de fosforilación de ERK, cuando Ras está liberado de su anclaje a membrana plasmática por la acción de APT1. Células HeLa fueron transfectadas con un plásmido portador de APT1, privadas de suero por 16 horas, estimuladas con EGF (5ng/ml) y lisadas a los tiempos indicados. Por western blot, se inmunodetectó los niveles de ERK fosforilado, relativizándolo con la cantidad de ERK total en cada punto.

2. EVALUACIÓN DEL MODELO SIMAP EN OTRA LÍNEA CELULAR

En el modelo anterior, se propone que la activación de ERK ocurre sobre todo desde membrana plasmática, generando una respuesta rápida y transitoria, mientras que desde endomembranas la contribución es mucho menor siendo ésta más tardía y sostenida en el tiempo.

Se realizó una validación del modelo en las células HeLa utilizando como estrategia la sobreexpresión de Apt1, con lo que se concentró H-Ras en endomembranas, y se observó que ciertamente la señalización de ERK desde endomembranas era algo más tardía y sostenida en el tiempo.

Llegados a este punto, estimamos determinar la validez del modelo en otras líneas celulares, y por otros medios, por lo que nos propusimos evaluar el modelo SIMAP en una situación en la que tuviésemos Ras exclusivamente en la membrana plasmática.

Hoy en día, es bien sabido que las diferentes isoformas de Ras (H-Ras, N-Ras y K-Ras) presentan un procesamiento post-traducciona l diferente, y por ello la localización de las mismas es distinta dentro de la célula. Mientras que H-Ras y N-Ras pueden encontrarse en diferentes dominios celulares, la isoforma K-Ras se localiza principalmente en membrana plasmática, aunque existen poblaciones residuales en retículo endoplasmático aunque con menor importancia funcional.

Para afrontar esta cuestión era imprescindible un modelo celular que nos permitiera eliminar la expresión de H-Ras y N-Ras, de tal manera que la única isoforma presente fuera K-Ras y toda la señalización de Ras fuera desde la membrana plasmática. En colaboración con el grupo liderado por el Dr. Mariano Barbacid hemos podido utilizar, con este fin, fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) modificados, donde la expresión endógena de H-Ras y N-Ras había sido eliminada, por lo tanto expresaban sólo la isoforma K-Ras, necesaria para su proliferación, pero expresándolo de una manera condicional (Drosten et al., 2010). Esto nos permite eliminar también la expresión de K-Ras, utilizándolo como control negativo, ya que podremos saber si toda la fosforilación de ERK obtenida es consecuencia de la activación de K-Ras en este modelo celular.

Los fibroblastos K-Ras *knockout* condicionales presentan el gen *k-ras* flanqueado por secuencias *loxP*, de tal manera que tras el suministro de hidroxitamoxifeno (4OH-TMX), se induce la expresión de la recombinasa Cre, de manera específica en estas células, con lo que se reconocen las secuencias *loxP* y se produce la recombinación de dichos sitios, con la consecuente eliminación del gen *k-ras*. De esta manera, utilizando el tamoxifeno a una concentración de 600 nM durante 7-10 días éramos capaces de eliminar la expresión de K-Ras (Figura 4.7.A).

En primer lugar realizamos una comprobación del modelo, para corroborar que tras la administración de hidroxitamoxifeno se producía la eliminación de la expresión de K-Ras. Igualmente, comprobamos que la eliminación de las isoformas de Ras afectaba a la proliferación celular, observando una parada proliferativa en los fibroblastos mantenidos con

hidroxitamoxifeno durante 10 días, asociándose a la ausencia de H-Ras, N-Ras y K-Ras (Figura 4.7.B).

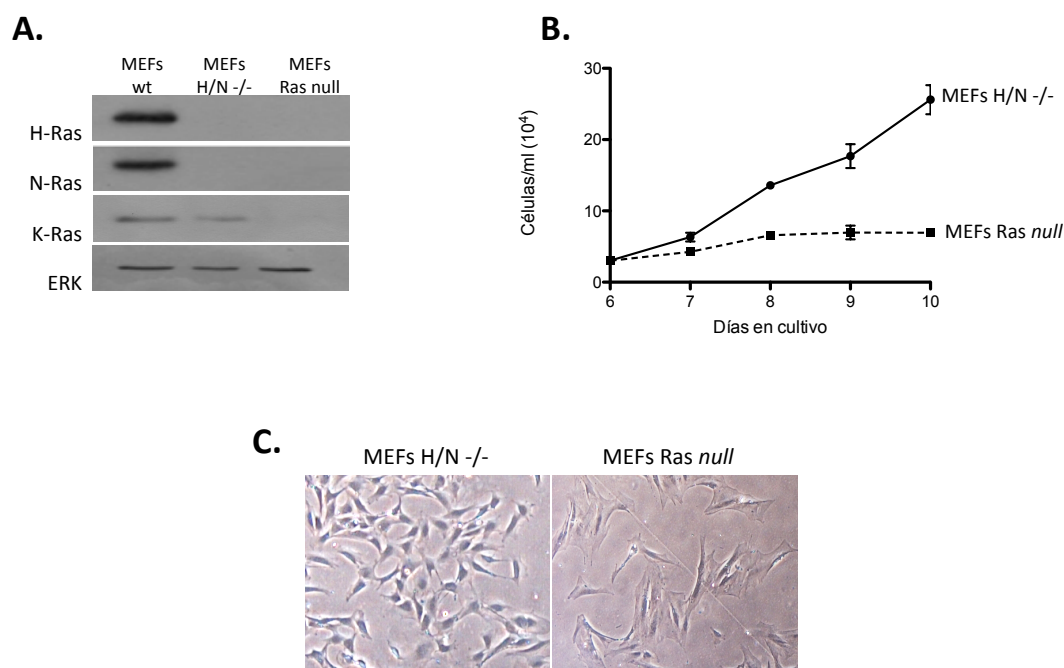


Figura 4.7. Comprobación de la eliminación de la expresión de las isoformas de Ras y su efecto biológico. **A.** Mediante la técnica de western blot se inmunodetectó la presencia de H-Ras, N-Ras y K-Ras en los MEFs wt. Se comprobó igualmente que los MEFs H/N -/- expresan tan sólo la isoforma K-Ras, mientras que estos MEFs K-ras -/- condicionales, mantenidos con hidroxitamoxifeno (600nM) en el medio durante 10 días, presentan niveles muy bajos de K-Ras. **B.** Se realizaron curvas de proliferación de MEFs H/N -/- mantenidos con hidroxitamoxifeno durante 10 días en comparación con el mismo tipo celular en ausencia de hidroxitamoxifeno. Se observó una parada en la tasa proliferativa de los MEFs que tras el tratamiento no expresaban ninguna de las isoformas de Ras. **C.** Se tomaron fotos a los 10 días de crecimiento de los MEFs H/N -/- *knockout* condicionales para K-Ras, en ausencia y presencia de hidroxitamoxifeno para comprobar el cambio morfológico consecuente de la eliminación de la expresión de K-Ras de las células.

Como consecuencia, también se observa un cambio fenotípico de las células, mientras que los fibroblastos crecidos en ausencia de tamoxifeno crecen con normalidad (Figura 4.7.C), los fibroblastos crecidos en presencia de tamoxifeno, y por lo tanto carentes de Ras, cambian su morfología. Los MEFs *Ras null* muestran un tamaño mucho mayor que los MEFs H/N -/-, con una morfología típica de células senescentes pero sin presentar marcadores propios de senescencia según lo descrito (Drosten et al., 2010), se trata simplemente de una parada proliferativa.

2.1. Análisis de las cinéticas de fosforilación de ERK en membrana plasmática

Teniendo en cuenta que K-Ras se expresa principalmente en membrana plasmática y que K-Ras es la única isoforma presente en los fibroblastos MEFs *knockout* para H-Ras y N-Ras, analizamos la activación de ERK fruto de la activación desde esta localización subcelular.

Comparamos la intensidad de la señal en fibroblastos *wild-type* que expresaban H-Ras, N-Ras y K-Ras, en fibroblastos que sólo expresaban K-Ras (H/N $-/-$) y en fibroblastos que no expresaban ninguna de las isoformas de Ras (Ras *null*), estimulando las células con el factor de crecimiento epidérmico (EGF) a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ a dos tiempos diferentes (2 y 30 minutos). Se utilizó como patrón de fosforilación una proteína recombinante de GST-ERK activo, cargando en el gel cantidades crecientes de esta proteína que nos permitió estimar los niveles de fosforilación de ERK en términos absolutos.

Comprobamos que K-Ras por sí sólo es capaz de desencadenar la activación de la cascada de ERK, obteniendo niveles similares de fosforilación de ERK a los obtenidos en células que también expresan H-Ras y N-Ras, incluso mayores tras 30 minutos de estimulación. Al mismo tiempo, comprobamos que tras la estimulación con EGF en MEFs Ras *null*, donde las tres isoformas de Ras están ausentes, no se detectó ERK fosforilado en ninguno de los tiempos analizados, por lo tanto K-Ras es la única proteína responsable de la fosforilación de ERK en los MEFs H/N $-/-$ (Figura 4.8).

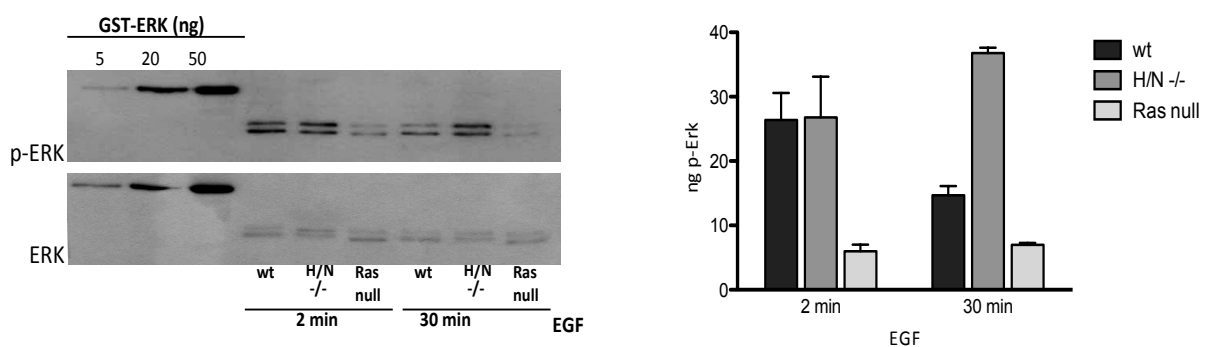


Figura 4.8. Análisis de la intensidad en la fosforilación de ERK tras la estimulación con EGF en células MEFs wt, MEFs H/N $-/-$ y MEFs sin expresión de Ras (Ras *null*). Células privadas de suero durante 16 horas se estimularon con EGF (50 $\mu\text{g/ml}$) durante 2 minutos y 30 minutos, se analizó la fosforilación de ERK mediante western blot y se cuantificó usando para ello un patrón de activación de ERK (GST-ERK).

Una vez verificado que K-Ras es el único activador de ERK en los MEFs H/N $-/-$, analizamos las cinéticas de fosforilación de ERK cuando Ras está activo únicamente en membrana plasmática, y si la cinética se ajusta al modelo SIMAP. Para ello estimulamos las células, privadas previamente de suero, con EGF a distintos tiempos y analizamos mediante western blot los niveles de fosforilación de ERK en cada punto, así como la cantidad total de ERK. Como controles utilizamos el análisis de la fosforilación de ERK1/2 en células que expresan también H-Ras y N-Ras (MEFs wt), y en células que no expresan Ras (MEFs Ras *null*).

Observamos que en función de si se expresaban todas las isoformas o solamente K-Ras, las cinéticas de fosforilación de ERK eran muy distintas (Figura 4.9). En MEFs wt, donde todas las isoformas de Ras se expresan, la estimulación con EGF deriva en una respuesta transitoria en la fosforilación de ERK, con un pico máximo de fosforilación entre los 2 y 5 minutos, tiempo a partir del cual la señal decae hasta niveles basales. Por el contrario, en aquellos MEFs donde la expresión de H-Ras y N-Ras había sido eliminada, y por lo tanto es K-Ras la responsable de la señalización, encontramos una respuesta a la estimulación con EGF más mantenida en el tiempo, llegando incluso hasta las dos horas, donde la fosforilación de ERK es casi tres veces mayor que los niveles basales de las células sin estimular. Cuando se elimina por completo la expresión de proteínas Ras (isoformas H, N, y K) los niveles de fosforilación de ERK eran mínimos. Por lo tanto, la activación de K-Ras, o lo que es lo mismo, de Ras exclusivamente en membrana, deriva en una fosforilación sostenida de ERK. Según estos datos, la señalización desde membrana plasmática, en este modelo celular, determina una señalización prolongada en el tiempo, mientras que si participan el resto de localizaciones subcelulares en la señalización total (MEFs wt) la cinética de fosforilación de ERK es transitoria.

Estos datos, nos indican que el anterior modelo matemático generado en células HeLa, en el cual se describe una activación de ERK transitoria cuando Ras es activado desde la membrana plasmática, y sostenida si la señalización se desencadena desde endomembranas, no es válido para explicar lo que sucede en MEFs

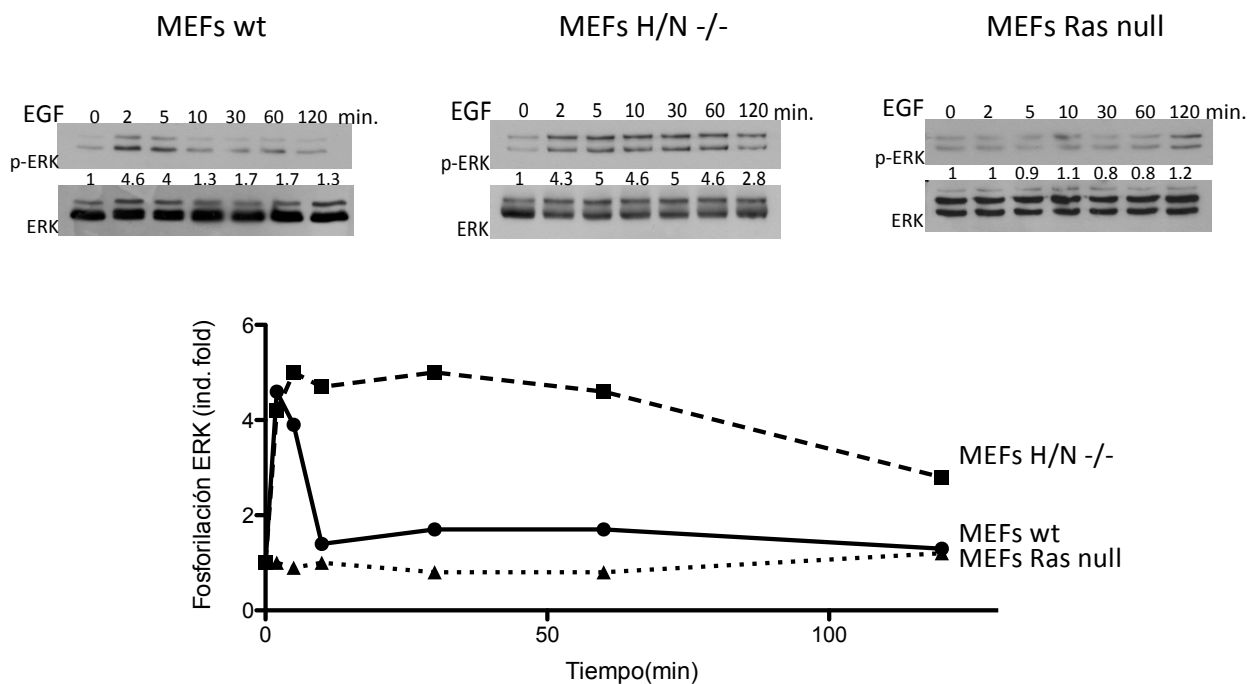


Figura 4.9. Análisis de las cinéticas de la fosforilación de ERK tras la estimulación con EGF en células MEFs wt, MEFs H/N -/- y MEFs sin expresión de Ras (Ras null). Tras la estimulación con EGF (50 µg/ml), las células previamente privadas de suero (16 horas) fueron lisadas a los distintos tiempos indicados. Se realizó un western blot para la detección de fosfo-ERK y se cuantificó la intensidad de cada banda, relativizándolo con sus correspondientes cantidades de ERK detectado.

Una posible explicación podría ser que en las células HeLa, en las que nos hemos basado para el desarrollo del modelo, las isoformas H-Ras y N-Ras sean las predominantes, y no tanto K-Ras, por lo que la regulación de la activación de la ruta Ras-ERK no sería la misma, o bien que los mecanismos de regulación de la señal Ras-ERK sea diferentes en función de la línea, probablemente como consecuencia de distintos niveles o identidades de GEFs o GAPs. Con lo que este parámetro habría que tenerlo en consideración en futuras correcciones del modelo matemático.

2.2. Análisis de las cinéticas de fosforilación de ERK bajo estimulación con TPA

Tras analizar las cinéticas de fosforilación de ERK bajo estimulación con EGF, en la que vimos cómo variaba la cinética de la señal cuando K-Ras se encontraba en colaboración o no con H-Ras y N-Ras, analizamos también la señalización de K-Ras cuando las células son estimuladas con otros agonistas como es el caso de TPA (*12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*) y si la ausencia de H-Ras y N-Ras afectaba a la fosforilación de ERK. La molécula TPA

es un análogo de DAG (Diacilglicerol) que mimetiza alguna de sus funciones. Se sabe que TPA es capaz de activar la proteína PKC (proteína quinasa C) que activa la vía de señalización Ras-ERK (Schönwasser et al., 1998).

Nuevamente, estimulamos las tres líneas celulares: MEFs wt, MEFs H/N -/- y MEFs Ras *null* con el factor mitogénico (TPA) a una concentración de 10 μ M, y recogimos los lisados a los distintos tiempos indicados con el fin de estudiar la cinética de estimulación con TPA. Analizamos los niveles de fosforilación de ERK en las tres líneas celulares, relativizando en cada punto con la cantidad de ERK total inmunodetectada.

Las cinéticas de fosforilación de ERK obtenidas eran algo distintas en función del genotipo de Ras presente. De tal manera que en los MEFs wt se observa una fosforilación inicial a los dos minutos que se mantiene hasta los 10 minutos en unos niveles similares, bajando posteriormente de manera paulatina hasta niveles similares al control (correspondiente a células privadas de suero, sin estimular). En el caso de los MEFs H/N -/- obtuvimos una respuesta más mantenida en el tiempo, llegando incluso hasta las dos horas después de la estimulación con TPA, al igual que ocurría cuando éstas células eran estimuladas con EGF. En el caso de los MEFs que no expresan ninguna de las isoformas de Ras, presentan cierto nivel de fosforilación de ERK, pero mucho menor que en presencia de Ras, pero igualmente mantenida en el tiempo (Figura 4.10).

Por lo tanto, bajo estimulación con TPA, también existen diferencias tanto en la intensidad como en la duración de la señal, siendo K-Ras capaz de generar una cascada de señalización que mantiene a ERK fosforilada durante más tiempo, y que cuando H-Ras y N-Ras están expresándose la señal se acorta siendo más transitoria en el tiempo con un pico máximo entre los 2 y 10 minutos. Por lo tanto, K-Ras también se activa en respuesta a TPA siendo capaz de generar una respuesta sostenida en la activación de ERK, aunque en este caso esta fosforilación de ERK también puede ser mediada por alguna ruta independiente de Ras, posiblemente tras la activación de PKC, ya que en células carentes de Ras (Ras *null*) también se observa ciertos niveles de fosfo-ERK. Según los datos parece que la señalización de Ras desde endomembranas, tal y como se observa en los MEFs wt, contribuye a una fosforilación transitoria de ERK cuando las células son estimuladas con TPA.

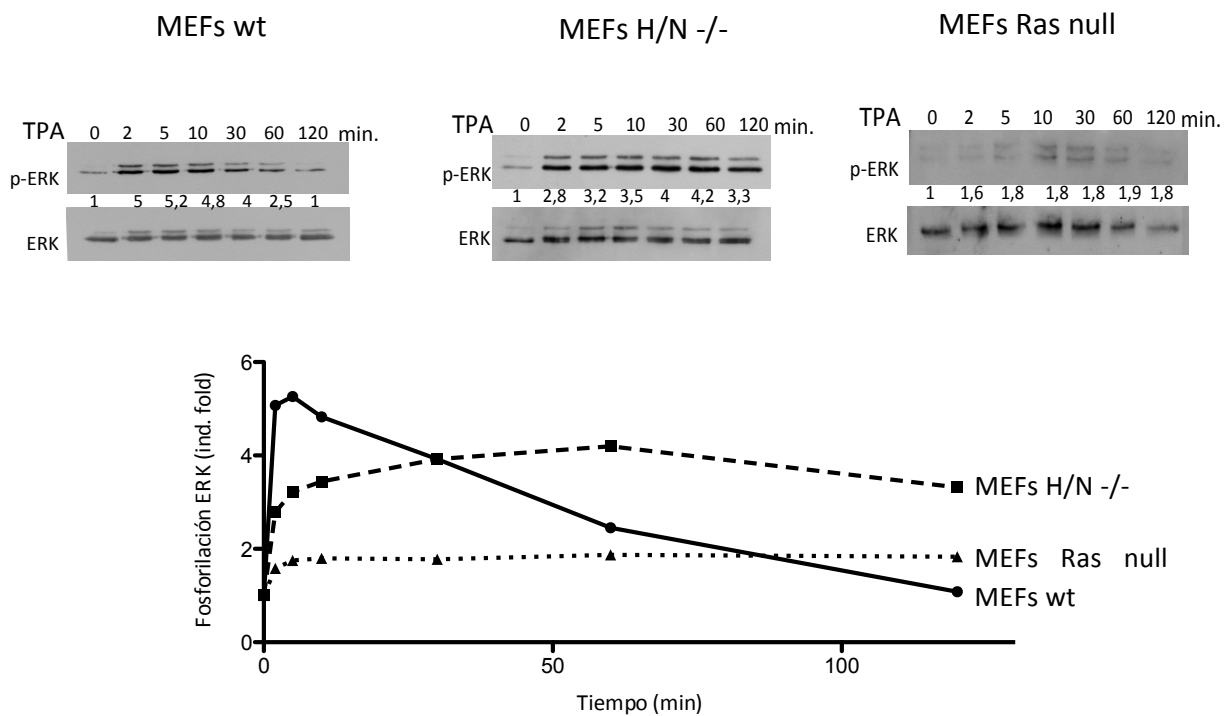


Figura 4.10. Análisis de las cinéticas de la fosforilación de ERK tras la estimulación con TPA en células MEFs wt, MEFs H/N -/- y MEFs sin expresión de Ras (Ras null). Tras la estimulación con TPA (10 μ M), las células previamente privadas de suero (16 horas) fueron lisadas a los distintos tiempos indicados. Cantidades iguales de proteína de cada punto se cargaron en un gel SDS-PAGE y se sometió a electroforesis para su separación. Se realizó un western blot para la detección de fosfo-ERK y se cuantificó la intensidad de cada banda, relativizándolo con sus correspondientes cantidades de ERK detectado.

2.3. Análisis de las cinéticas de fosforilación de ERK bajo estimulación con LPA

Por último, quisimos analizar también las cinéticas de fosforilación de ERK bajo estimulación con LPA (ácido lipofosfatídico). El ácido lipofosfatídico es capaz de activar la ruta Ras-ERK a través de receptores acoplados a proteína G, pudiendo mimetizar el efecto mitogénico de EGF en función del contexto celular (van Corven et al., 1993).

Como en los casos anteriores, realizamos la estimulación de las tres líneas celulares con LPA (10 μ M) a los distintos tiempos indicados. Se analizaron los niveles de fosforilación de ERK en cada uno de los casos relativizándolo nuevamente con la cantidad total de ERK.

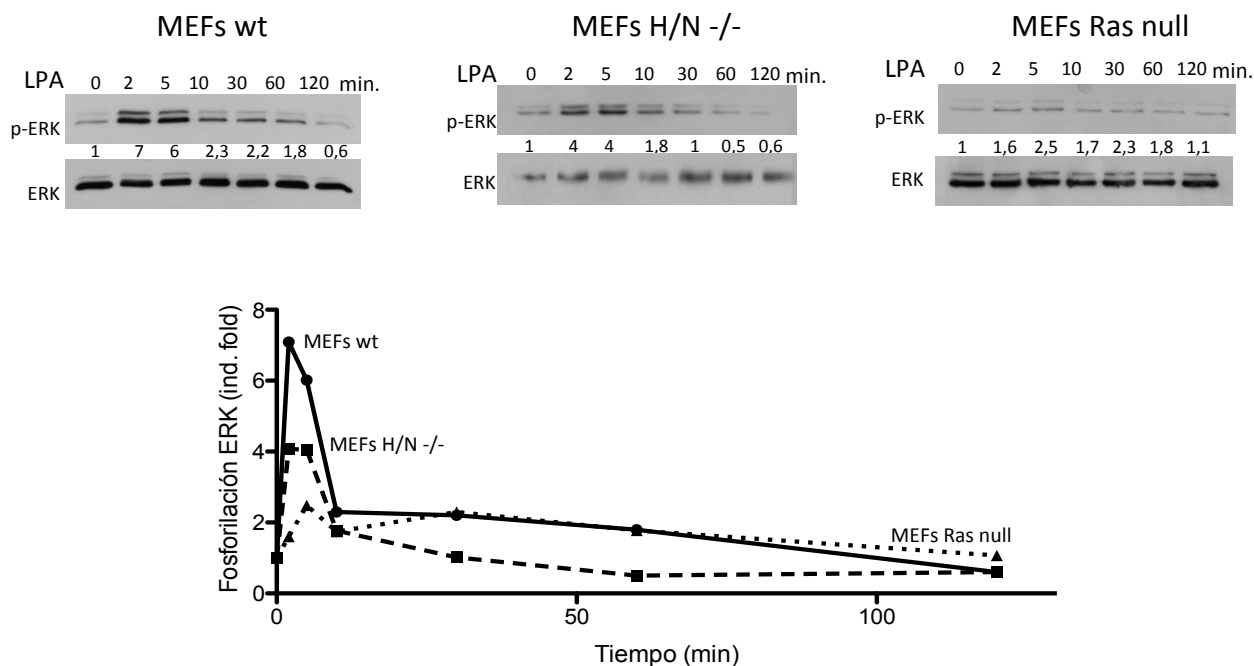


Figura 4.11. Análisis de las cinéticas de la fosforilación de ERK tras la estimulación con LPA en células MEFs wt, MEFs H/N -/- y MEFs sin expresión de Ras (Ras null). Tras la estimulación con LPA (10 μ M), las células previamente privadas de suero (16 horas) fueron lisadas a los distintos tiempos indicados. Se separaron por electroforesis y se realizó un western blot para la detección de fosfo-ERK y se cuantificó la intensidad de cada banda, relativizándolo con sus correspondientes cantidades de ERK

Al estimular con LPA los MEFs Ras *null*, se observó niveles mínimos de fosforilación de ERK (con un máximo a los 5 minutos) que se mantiene hasta los 60 minutos decayendo finalmente hasta niveles basales, que indican una posible participación de otras rutas de señalización (Figura 4.11). En cuanto a la señalización de K-Ras, según los datos obtenidos, parece no ser determinante en la duración de la fosforilación de ERK, ya que se ha observado que las diferencias entre MEFs wt y MEFs H/N -/- radicaban únicamente en la intensidad de la señal, ya que en ambos casos obtuvimos una cinética de fosforilación de ERK transitoria con un pico máximo a los 2-5 minutos, siendo esta señal mucho más intensa en los MEFs que expresan todas las isoformas de Ras con respecto a los MEFs que sólo expresan la isoforma K-Ras. Es posible que la localización de Ras, cuando el factor mitogénico utilizado es LPA y los receptores activados son receptores acoplados a proteínas G, no es determinante en la señalización total.

3. EL ESPACIO COMO REGULADOR DE LAS FUNCIONES BIOLÓGICAS

Una vez comprobado que la localización subcelular de Ras puede afectar a la cinética de fosforilación de ERK, nos interesó averiguar en que grado la localización de Ras determinaba la respuesta biológica, tal y como ocurre en otros modelos celulares (Bivona et al., 2006; Matallanas et al., 2006; Onken et al., 2006).

Una de las características más importantes de K-Ras, y más conflictivas para su estudio, es que su expresión es esencial durante el desarrollo, de tal manera que los ratones *knockout* (KO) de K-Ras resultan letales embrionarios (Koera et al., 1997). Tal y como se ha descrito en el capítulo anterior, los MEFs KO condicionales para K-Ras crecen con normalidad, y tras añadir 4OH-TMX durante 10 días se eliminó la expresión de K-Ras y como consecuencia se produce una parada proliferativa. Si mantenemos los MEFs KO condicionales para K-Ras en ausencia de tamoxifeno, éstos crecen con normalidad. Por otra parte, si transfectamos los fibroblastos con alguna de las isoformas de Ras, y al mismo tiempo eliminamos la expresión endógena de K-Ras, podremos analizar la capacidad de rescatar la proliferación que tiene la isoforma de Ras exógena, ya que únicamente serán capaces de crecer y formar colonias, aquellas células que expresan la isoforma transfectada.

Para analizar si el espacio puede ser un regulador de la proliferación inducida por Ras, se clonó una batería de plásmidos que expresaban cada una de las isoformas de Ras (H-Ras, N-Ras y K-Ras) tanto en su forma silvestre (wt) como en su forma constitutivamente activa (V12), y además una serie de plásmidos que permiten la expresión de las isoformas de Ras dirigidas a determinados compartimentos subcelulares (retículo endoplasmático, Aparato de Golgi, balsas lipídicas y membrana desordenada), todas ellas con resistencia a zeocina, que se utilizó como antibiótico de selección de los clones celulares que expresaban cada plásmido. Así, se transfectó por duplicado cada una de esas construcciones, manteniendo una de ellas en condiciones normales y la otra mantenida con 4OH-TMX, y ambas con zeocina para la selección de las colonias. Después de 10-15 días, cuando la expresión endógena de K-Ras ha sido eliminada y el tamaño de las colonias formadas era cuantificable, se analizó el número de colonias generadas en cada caso mediante la tinción de las placas con cristal violeta.

En primer lugar se calculó la capacidad proliferativa de cada una de las isoformas de Ras como el número de colonias obtenidas cuando no hay expresión de K-Ras (con 4OH-TMX en el medio) frente al número de colonias obtenidas cuando no se elimina la expresión de K-Ras (sin 4OH-TMX en el medio), expresado como porcentaje de rescate proliferativo.

Observamos que todas las isoformas de Ras, eran capaces de rescatar la proliferación en los MEFs que no expresaban Ras endógeno, pero lo hacían con distinto potencial (Figura 4.12). De tal manera que, N-Ras y K-Ras son las isoformas que confieren a las células mayor capacidad proliferativa, con un 52% y 55% de rescate respectivamente, mientras que H-Ras mostró un 19% de rescate. Estos datos son distintos cuando las proteínas expresadas son las constitutivamente activas, es decir, aquellas que en el residuo 12 cambia la glicina por una valina. En este caso, K-Ras presenta un alto potencial proliferativo mostrando un rescate del 71%, mientras que N-Ras sigue manteniendo un rescate similar al mostrado en su forma silvestre. En el caso de H-Ras obtuvimos un descenso en el número de colonias de proliferación cuando se expresa su forma constitutivamente activa, siendo el rescate producido por H-RasV12 inferior al 4%, mientras que en su variante silvestre era casi del 20%.

Una vez que comprobamos que las isoformas de Ras confieren distinto potencial proliferativo, analizamos la capacidad de rescatar la viabilidad celular en función de su localización subcelular. Centrándonos en las isoformas que mayor rescate proliferativo confieren, es decir, analizando la capacidad de rescate proliferativo de N-Ras y K-Ras en función de su localización subcelular.

Realizamos ensayos de formación de colonias, de tal manera que se transfectaron por duplicado en MEFs KO condicionales para K-Ras cada una de las construcciones que permiten la expresión localizada de Ras: M1 (retículo endoplasmático), LCK (balsas lipídicas), CD8 (membrana desordenada) y KDEL (Aparato de Golgi). Una de las placas fue tratada con 4OH-TMX para eliminar la expresión endógena de K-Ras, y la otra no. En ambos casos se crecieron en presencia de zeocina que se utilizó como antibiótico de selección de las colonias que expresaban las construcciones transfectadas. Después de 10 días se procedió al análisis del número de colonias en cada placa, y se calculó la capacidad de rescate proliferativo de Ras desde cada una de las localizaciones como porcentaje del número de colonias obtenidas en presencia de 4OH-TMX frente al número total de colonias en ausencia de 4OH-TMX.

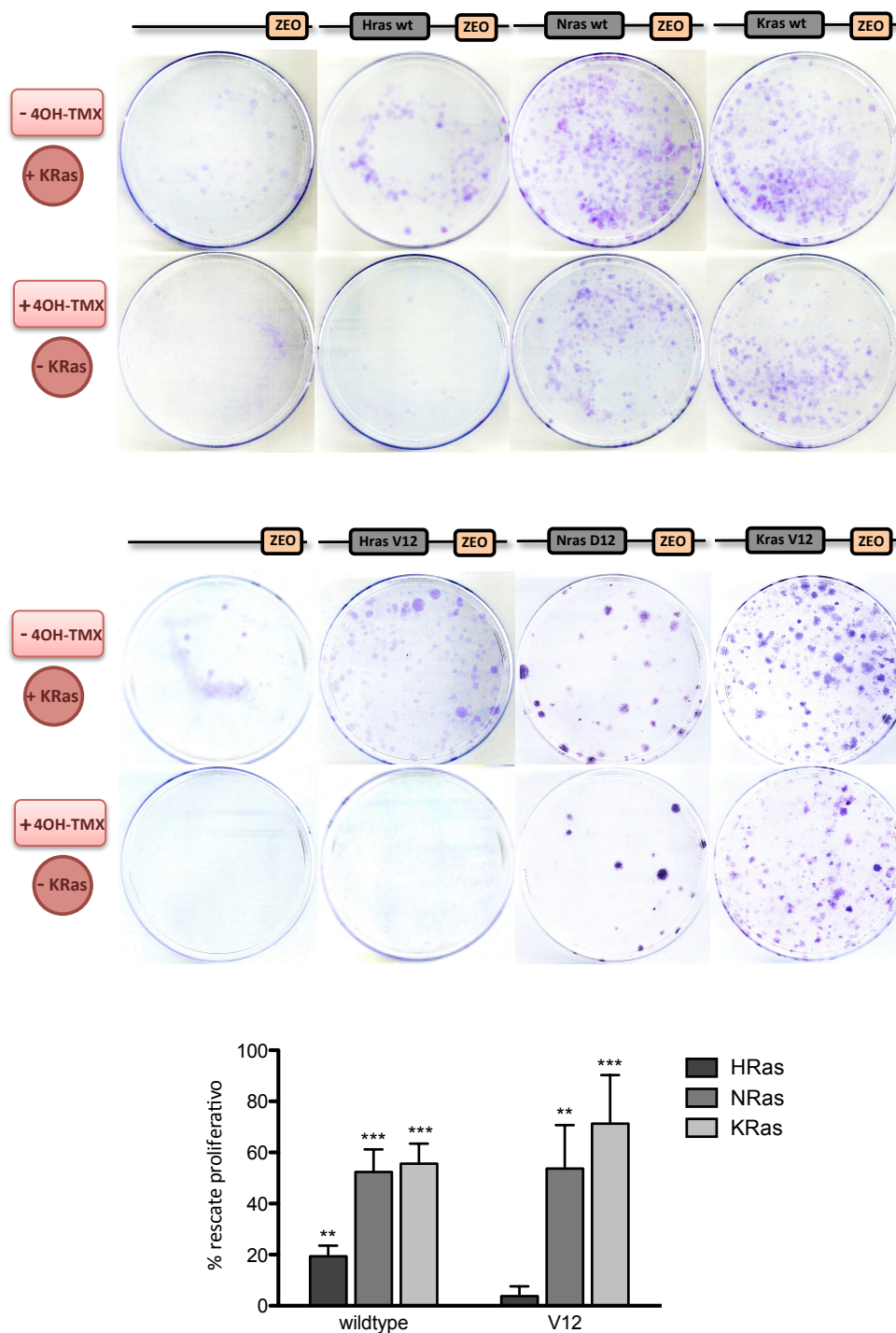
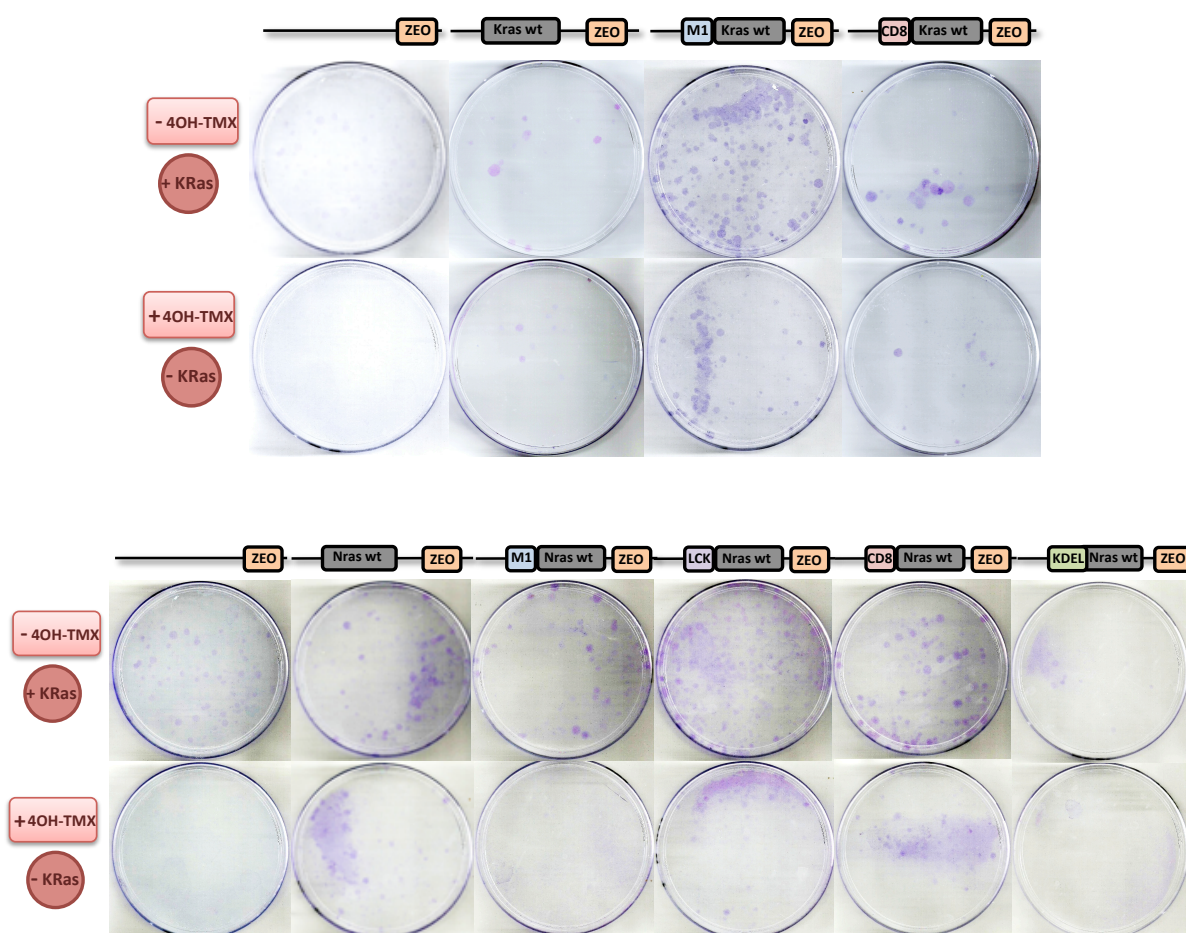


Figura 4.12. Análisis de la capacidad proliferativa de H-Ras, N-Ras y K-Ras, tanto en su forma silvestre como en su forma constitutivamente activa. MEFs KO condicionales para K-Ras fueron transfectados con 1 ug de cada una de las construcciones empleadas, añadiendo 4OH-TMX (600 nM) para eliminar la expresión endógena de K-Ras, así como zeocina (100 mg/ml) como selección de células portadoras de la construcción. Tras 10 días, los fibroblastos fueron lavados, fijados y teñidos para el conteo de colonias de proliferación. Los resultados se expresan como porcentaje de rescate de proliferación (n° colonias K-/ n° colonias K+). Análisis estadístico mediante el *test t* de *student* (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0,001$ con respecto al control de células transfectadas con el vector vacío.

En el caso de la isoforma K-Ras observamos que tenía la misma capacidad de rescate proliferativo desde cada una de las localizaciones estudiadas: retículo endoplasmático (M1) y membrana plasmática desordenada (CD8), que son las dos localizaciones donde K-Ras se encuentra normalmente de manera endógena, aunque es cierto que predominantemente se encuentra en membrana plasmática parece ser que la señalización desde retículo endoplasmático tiene un papel muy importante en el rescate proliferativo (Figura 4.13). Sin embargo, en el caso de N-Ras pudimos comprobar que su potencial proliferativo dependía mucho de su localización subcelular, así obtuvimos un bajo porcentaje de rescate cuando expresamos N-Ras en el Aparato de Golgi (KDEL), mientras que desde membrana desordenada (CD8) fue desde donde más capacidad de rescate mostró tener N-Ras, seguida en magnitud por la señalización desde balsas lipídicas (LCK) y algo menor en el caso de retículo endoplasmático (M1). Por lo tanto la señalización de N-Ras desde membrana plasmática confiere a los MEFs una capacidad para revertir la parada proliferativa mayor que la observada desde endomembranas (Figura 4.13).



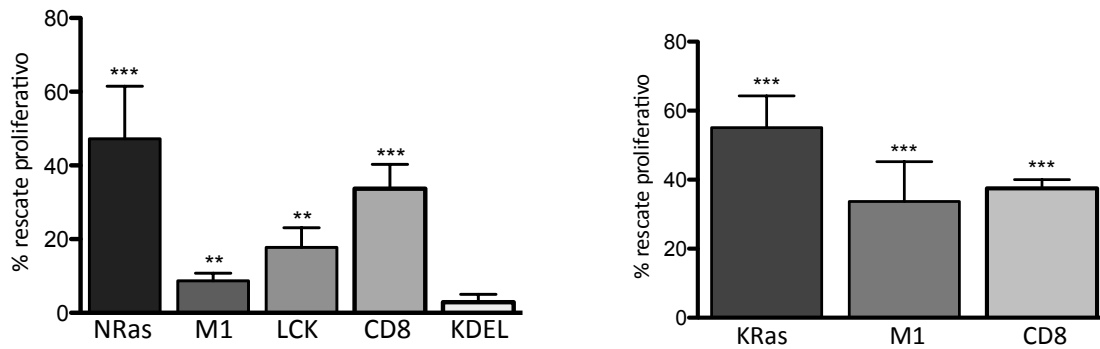


Figura 4.13. Análisis de la capacidad de rescate proliferativo de N-Ras y K-Ras desde cada una de las localizaciones subcelulares. MEFs KO condicionales para K-Ras fueron transfectados con 1 ug de cada una de las construcciones empleadas, añadiendo 4OH-TMX (600 nM) para eliminar la expresión endógena de K-Ras, así como zeocina (100 mg/ml) como selección de células portadoras de la construcción. Tras 10 días, los fibroblastos fueron lavados, fijados y teñidos para el conteo de colonias de proliferación. Los resultados se expresan como porcentaje de rescate de proliferación (n° colonias K-/ n° colonias K+). Análisis estadístico mediante el *test t* de *student* (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0,001$ con respecto al control de células transfectadas con el vector vacío

4. ESPACIO Y TIEMPO COMO REGULADORES DE FUNCIONES BIOLÓGICAS

4.1. Análisis de las cinéticas de fosforilación y dimerización de ERK bajo diferentes estímulos: EGF y HRG

A lo largo de este trabajo se ha demostrado que el espacio es un parámetro regulador de la señalización de la ruta Ras-ERK, y que la activación de Ras desde diferentes compartimentos celulares puede desencadenar la fosforilación de ERK con distintas cinéticas. Tal y como se ha visto en otros trabajos, la duración de la activación de ERK es de gran importancia en la determinación de respuestas biológicas, como se ha demostrado en otros modelos celulares (Murphy et al., 2004; Nagashima et al., 2007; Yamamoto et al., 2006).

Así, uno de los puntos clave de esta tesis consiste en intentar entender cómo una única vía de señalización es capaz de generar distintas respuestas biológicas en función de la localización desde la que Ras señala y la duración de la actividad de ERK.

Se sabe que las células derivadas de cáncer de mama, MCF7, responden de distinta forma a dos estímulos como son el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y la heregulina (HRG) que inducen proliferación y diferenciación respectivamente aunque ambos señalizan a través del mismo tipo de receptores (Nagashima et al., 2007).

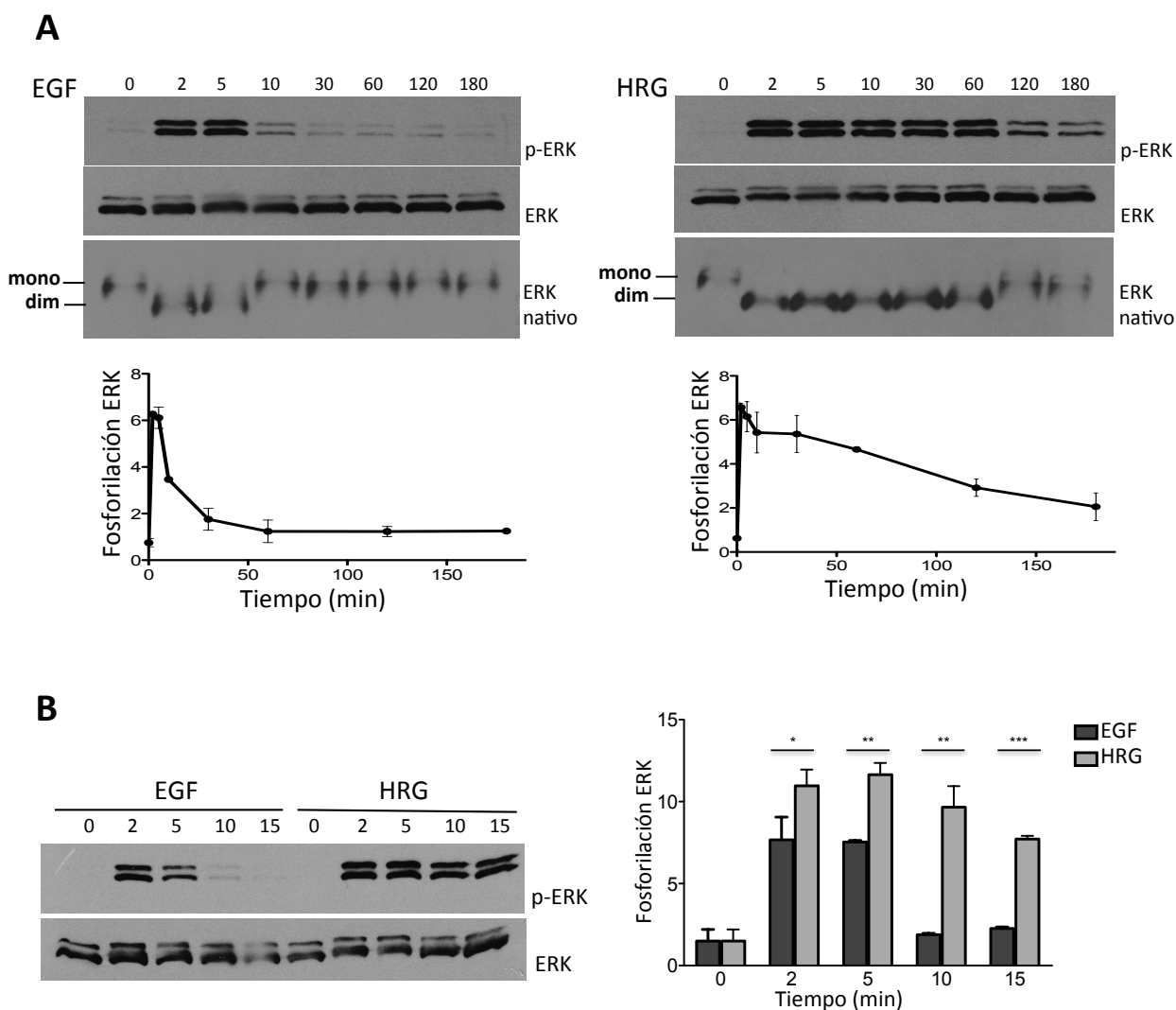


Figura 4.14. Comparación de las cinéticas de fosforilación de ERK, tras la estimulación de células MCF7 con EGF y HRG. Células MCF7 previamente privadas de suero (16 horas) fueron estimuladas con EGF o con HRG a los tiempos indicados. Por *western blot*, se inmunodetectó los niveles de ERK fosforilado, relativizándolo con la cantidad de ERK total en cada punto. **A.** Se analizó las cinéticas de fosforilación de ERK desde los 2 minutos hasta los 180 minutos comparando la activación/desactivación de ERK en función del estímulo, así como la dimerización de ERK mediante un *western blot* tras la electroforesis en condiciones no desnaturizantes o nativas **B.** Comparación de la intensidad de fosforilación de ERK en tiempos cortos de estimulación con EGF y HRG en un único gel. Estadística según el *test t de student* (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; comparando los valores en cada uno de los puntos.

Comprobamos que las cinéticas de fosforilación de ERK son distintas en función del estímulo utilizado, de tal manera que la inducción con EGF resulta en una respuesta transitoria en la fosforilación de ERK, con un pico máximo de fosforilación entre los dos y cinco minutos, seguido de una desfosforilación muy rápida. Por otra parte, la estimulación con HRG resulta en una fosforilación de ERK más mantenida en el tiempo, con un pico máximo de actividad entre dos y cinco minutos y una desactivación mucho más lenta,

llegando incluso hasta los 60 minutos tras la estimulación (Figura 4.14.A). No existen diferencias sólo en cuanto a la cinética de fosforilación/desfosforilación de ERK, sino también en cuanto a la intensidad de los niveles de ERK fosforilado (Figura 4.14.B). Comprobamos que los niveles de fosfo-ERK son mayores al estimular con HRG que al estimular con EGF, y particularmente a tiempos más largos (hasta 15 minutos).

Se sabe que la fosforilación y activación de ERK va ligada a un proceso de dimerización de dos moléculas de ERK, así que realizamos un análisis de la dimerización de ERK, con el fin de determinar si también existen diferencias en función del estímulo utilizado. Observamos que las cinéticas de dimerización de ERK, analizadas en electroforesis en condiciones nativas, eran muy distintas en función de si las células eran estimuladas con EGF o con HRG, siendo los dímeros de ERK estables durante más tiempo cuando las células son estimuladas con HRG, correlacionándose con la fosforilación de ERK.

4.2. Análisis de las cinéticas de la activación de Ras tras estimulación con EGF y HRG

Una vez analizadas las diferencias en cuánto a duración e intensidad de fosforilación de ERK, así como las diferencias en el proceso de dimerización de ERK en función del estímulo mitogénico utilizado, quisimos analizar cómo era la activación de otros componentes de la cascada de señalización de las MAPKs. Comenzamos por analizar la activación de Ras mediante un ensayo de *pulldown*, detectando mediante *western blot* la cantidad de Ras en su estado activo, o unido a GTP, frente a la cantidad total de Ras.

Observamos que, las cinéticas de activación de Ras son diferentes en función del estímulo mitogénico utilizado (Figura 4.15), de tal manera que cuando las células MCF7 son estimuladas con EGF detectamos una sutil activación a los dos minutos, mientras que cuando las células son estimuladas con HRG obtuvimos una cinética de activación de Ras transitoria aunque un poco más sostenida que con EGF, con un pico máximo de señal a los dos minutos, disminuyendo de manera rápida, con lo que a los 10 minutos apenas se detectó Ras activo.

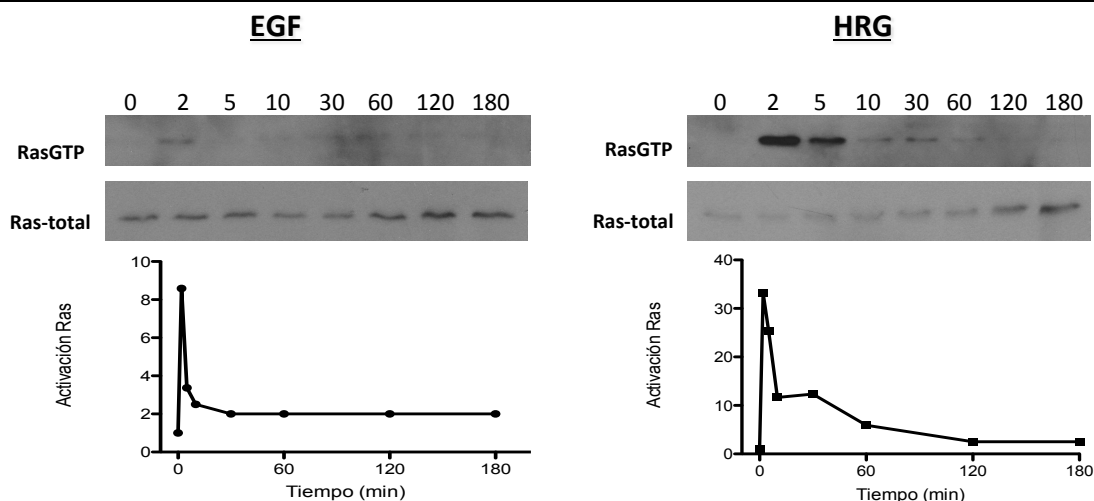


Figura 4.15. Análisis de las cinéticas de activación de Ras tras la estimulación de células MCF7 con EGF y HRG. Células MCF7 previamente privadas de suero (16 horas) fueron estimuladas con EGF o con HRG a los tiempos indicados. Empleando la técnica de pulldown se separó Ras unido a GTP de la población total de Ras, tras lo cual se sometió a electroforesis y western blot para la detección de Ras activo, comparando con la cantidad total de Ras existente en los lisados celulares a sus correspondientes tiempos.

En ambos casos obtenemos una cinética de activación transitoria, sin embargo parece que existe una diferencia en cuanto a la intensidad de activación. Para corroborarlo comparamos las cinéticas en un único gel para evitar posibles errores inherentes a correr dos geles por separado (Figura 4.16).

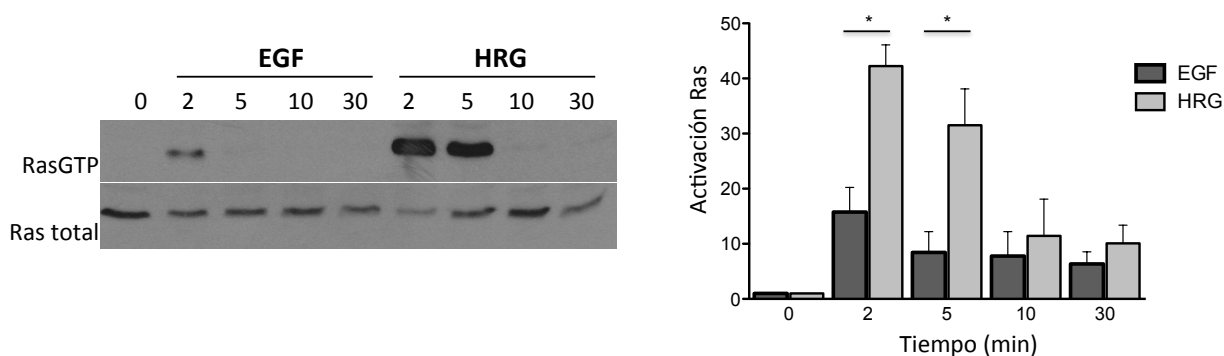


Figura 4.16. Comparación de la intensidad de activación de Ras en tiempos cortos de estimulación con EGF y HRG. Células MCF7 fueron privadas de suero durante 16 horas y posteriormente estimuladas con EGF o HRG, según el caso, a los tiempos indicados. Empleando la técnica de pulldown se separó Ras activo (o unido a GTP) de la población total de Ras. Se sometió a electroforesis, en un único gel, y se realizó un western blot para detectar Ras activo, en comparación al Ras total detectado en los lisados totales de cada punto. Estadística según el *test t* de *student* (*) $p < 0,05$; comparando los valores en cada uno de los puntos.

4.3. Análisis de la activación de otros componentes de la cascada de señalización y estudio del comportamiento cito-nuclear de la señal

Una vez analizadas las cinéticas de fosforilación de ERK y las cinéticas de activación de Ras, nos llamó la atención la diferencia existente en cuanto a la duración de la señal cuando las células son estimuladas con HRG a estos dos niveles de la cascada. Mientras que la cinética de Ras activo es transitoria y decae rápidamente, la cinética de fosforilación de ERK se mantiene más en el tiempo llegando incluso a las tres horas. Por lo que nos planteamos que pudiera existir algún tipo de mecanismo de regulación entre esos dos niveles de la cascada de la señalización.

En este punto analizamos la cinética de fosforilación de MEK, el componente de la cascada intermediario entre Ras y ERK. Para ello, estimulamos células MCF7, privadas de suero durante 16 horas, tanto con EGF como con HRG a tiempos cortos con el fin de comparar la intensidad de la señal a este nivel.

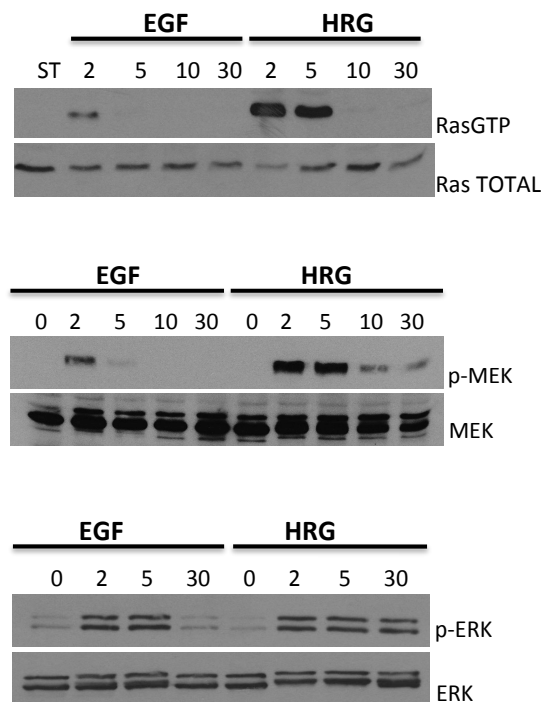


Figura 4.17. Comparación de las cinéticas de activación de Ras, MEK y ERK en células MCF7. Las células MCF7 tratadas con HRG muestran una cinética de fosforilación de ERK más mantenida en el tiempo en comparación con las cinéticas de activación de Ras y MEK.

Pudimos observar, que tanto con EGF como con HRG las cinéticas de fosforilación de MEK eran transitorias en el tiempo, con un pico máximo a los 2-5 minutos decayendo rápidamente, de manera similar a las cinéticas de Ras (Figura 4.17). En cuanto a la intensidad de la señal, los niveles de fosfo-MEK son mayores en las células estimuladas con HRG que en las células estimuladas con EGF. Con todo ello, se puede decir, que la fosforilación de MEK presenta unas características más similares a la activación de Ras, que a la fosforilación por ERK, por lo que, de existir un mecanismo de regulación, éste sería posterior a la activación de MEK.

Sabemos que ERK puede ser funcional tanto en el citoplasma como en el núcleo y los posibles mecanismos de regulación de su activación pueden ser tanto citoplasmáticos como nucleares. Con el fin de definir el sitio de regulación de la activación de ERK analizamos la fosforilación de un sustrato nuclear (Elk1) y un sustrato citoplasmático (RSK).

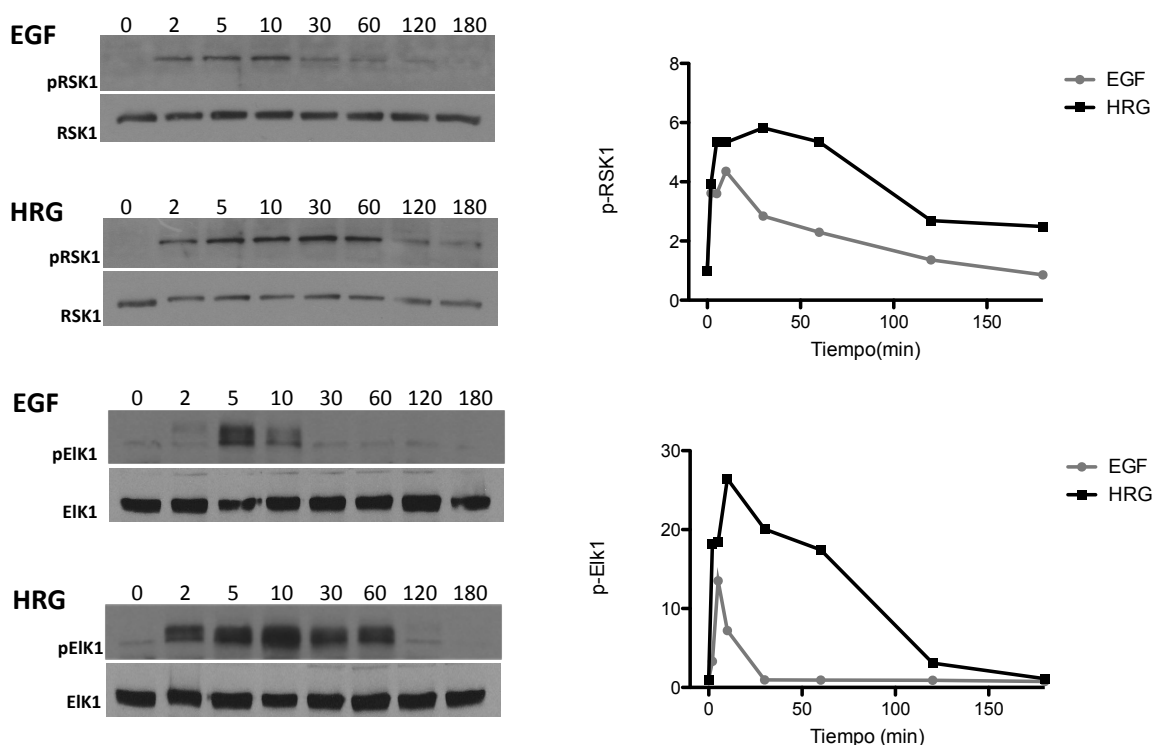


Figura 4.18. Análisis de las cinéticas de fosforilación de sustratos nucleares y citoplasmáticos de ERK tras la estimulación de células MCF7 con EGF y HRG. Células MCF7 previamente privadas de suero (16 horas) fueron estimuladas con EGF o con HRG a los tiempos indicados. Se analizó mediante western blot las cinéticas de fosforilación de Elk1 como sustrato nuclear y de RSK como sustrato citoplasmático.

Las cinéticas de fosforilación obtenidas nos muestran una respuesta transitoria tanto en el núcleo como en el citoplasma cuando las células son estimuladas con EGF, mientras que cuando estimulamos las células con HRG en ambos casos obtuvimos una respuesta más mantenida en el tiempo (Figura 4.18). Estas cinéticas de fosforilación se correlacionan con lo observado cuando analizamos las cinéticas de fosforilación de ERK. El hecho de que la cinética de fosforilación de RSK, como sustrato citoplasmático, sea transitoria tras estimulación con EGF y mantenida cuando se estimula con HRG nos desvela que la regulación de la activación de ERK ocurre en el citoplasma, y que algún mecanismo de regulación debe estar presente en el citoplasma para convertir una respuesta inicial transitoria, como la observada en la activación de Ras y de MEK, en una respuesta mantenida como la observada en la fosforilación de ERK y RSK, en las células estimuladas con HRG.

Para terminar de corroborar como eran las cinéticas de ERK tanto en el núcleo como en el citoplasma, utilizamos la técnica de fraccionamiento núcleo-citoplasma y analizamos mediante *western blot* los niveles de ERK fosforilado en ambas localizaciones, tras la estimulación con EGF y HRG a distintos tiempos. Como marcadores de cada localización se usó el anticuerpo para la lamina A para detectar las fracciones nucleares y el anticuerpo para la proteína RhoGDI como marcador de citoplasma. Pudimos corroborar que las cinéticas de fosforilación de ERK son similares en el núcleo y en el citoplasma en cada caso, por lo que el mecanismo de regulación de la cinética de activación de ERK, desencadenado por la HRG, tendría lugar previo a la translocación al núcleo (Figura 4.19.A). Al mismo tiempo analizamos los niveles de fosforilación de Elk1 en el núcleo al estimular las células con EGF y con HRG, durante dos minutos. Y pudimos observar que la intensidad de la fosforilación de Elk1 era mucho mayor en las células estimuladas con HRG que en las estimuladas con EGF, a pesar de presentar los mismos niveles de ERK fosforilado, con lo que se puede decir que la señal desencadenada por HRG en el núcleo es mucho más potente que la desencadenada por EGF (Figura 4.19.B).

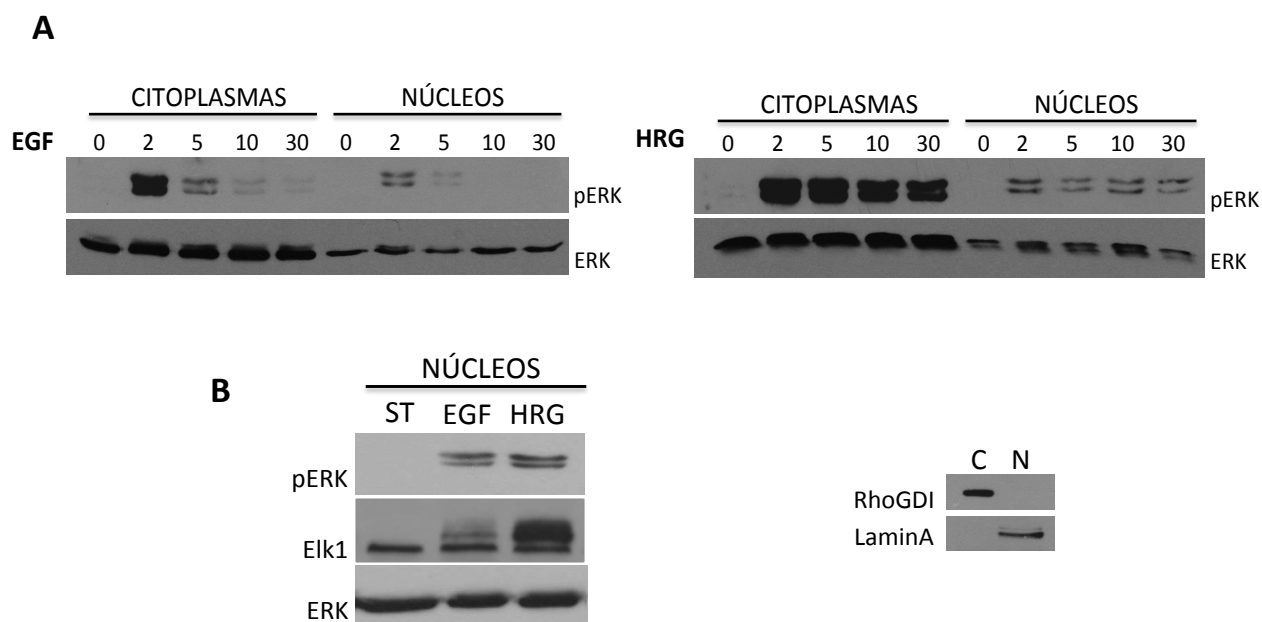


Figura 4.19. Análisis de las cinéticas de fosforilación de ERK en el núcleo y en el citoplasma de células MCF7 estimuladas con EGF y HRG. Células MCF7 previamente privadas de suero (16 horas) fueron estimuladas con EGF o con HRG a los tiempos indicados. Las células se lisaron según el protocolo de fraccionamiento núcleo-citoplasma y se sometieron a electroforesis. **A.** Se analizó mediante western blot las cinéticas de fosforilación de ERK tanto en el citoplasma como en el núcleo. **B.** Se detectó por western blot los niveles de p-Elk1 de células estimuladas (2 minutos) con EGF y HRG en comparación con células privadas de suero durante 16 horas (ST). Utilizando como marcador de citoplasma (C) la proteína RhoGDI y como marcador de núcleo (N) la proteína lamina A.

4.4. El espacio como regulador de la señalización Ras-ERK

Tal y como se demostró anteriormente, el sitio o localización subcelular desde la cual Ras señala es de gran importancia. En función de la sublocalización de Ras, los niveles de fosforilación ERK pueden ser diferentes, y además también puede ser la causa de cinéticas de distinta duración. Es decir, el sitio desde el cual Ras está señalizando podría ser una explicación para las diferentes cinéticas obtenidas al estimular las células MCF7 con EGF o con HRG. Con este fin analizamos el lugar desde el cual Ras está señalizando en este modelo celular, tanto con EGF como con HRG.

En primer lugar, estudiamos si las MCF7 contenían Ras tanto en retículo endoplasmático como en membrana plasmática, siendo éstos los sitios de más importancia para la señalización. Para ello, separamos mediante gradientes de iodixanol distintas fracciones que contenían lisados ricos en retículo endoplasmático y membrana plasmática. Mediante *western blot*, utilizando un anticuerpo que reconoce la proteína calreticulina, pudimos

detectar las fracciones ricas en retículo endoplasmático. Utilizando un anticuerpo que reconoce el receptor de transferrina, detectamos fracciones que contenían un alto contenido en membrana plasmática. Así, al realizar un *western blot* para la proteína H-Ras, determinamos que podemos encontrar esta proteína en ambas localizaciones subcelulares (Figura 4.20.A).

Dentro de la membrana plasmática se pueden definir dos tipos de regiones: balsas lipídicas y membrana desordenada. Por ello, era necesario hacer una separación de estos dos dominios de la membrana, para saber si H-Ras se ubicaba de manera endógena en ambas regiones. Se realizó un fraccionamiento de membrana plasmática en gradiente de sacarosa y Tritón X-100, que nos permitió separar ambos dominios de la membrana en función de su densidad. Se obtuvieron 12 fracciones, siendo las 5-6 primeras menos densas y correspondiendo a las balsas lipídicas o *lipid rafts*, y otras más densas (de la fracción 7 a la 12) contenían los dominios de membrana desordenada. Para su detección se usó un marcador para cada uno de los dominios: el receptor de la transferrina para la membrana desordenada y la caveolina para las balsas lipídicas. Pudimos comprobar que H-Ras se localizaba en membrana desordenada, sin embargo no detectamos Ras endógeno en las balsas lipídicas (Figura 4.20.B).

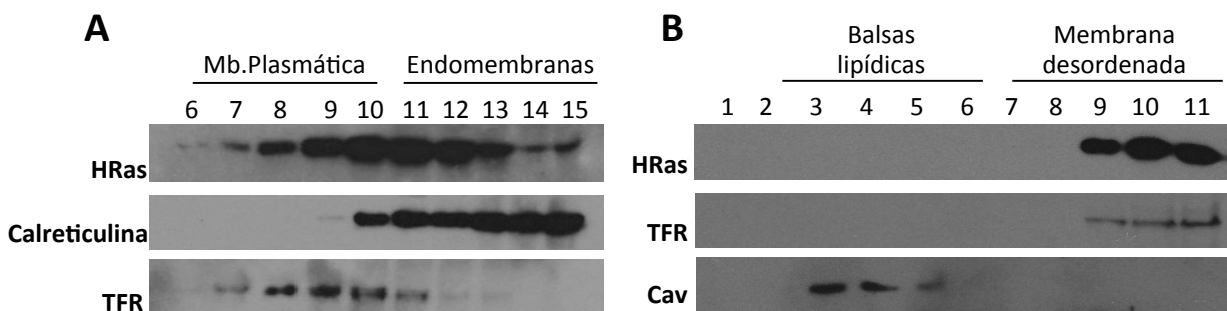


Figura 4.20. Fraccionamientos subcelulares y determinación de la expresión endógena de HRas en endomembranas y membrana plasmática. **A.** Las células MCF7 fueron lisadas y procesadas según el protocolo descrito para la purificación de retículo endoplasmático. Las diferentes fracciones obtenidas se sometieron a electroforesis y mediante la técnica de western blot se detectó las fracciones ricas en retículo y en membrana, comprobando que Ras se expresaba en ambas localizaciones subcelulares. **B.** Las células MCF7 fueron lisadas y procesadas según el protocolo descrito para la separación de los dominios de la membrana plasmática en gradiente de sacarosa con Tritón X-100, separando las balsas lipídicas de la membrana desordenada, y determinando, mediante western blot, la ausencia de HRas en balsas lipídicas. TFR: receptor de transferrina; Cav: caveolina.

Por lo tanto, a la hora de analizar la activación de Ras en las diferentes localizaciones subcelulares, no analizamos la actividad desde balsas lipídicas ya que no hay Ras en este tipo de membrana. Comenzamos por analizar la activación de Ras en retículo endoplasmático, transfectando H-Ras con un epítipo que restringe la expresión de la proteína al retículo, se trata de un dominio de la fosfatasa PTP que se localiza en dicho compartimento (Frangioni et al., 1992). No fuimos capaces de detectar Ras activo en retículo al estimular con EGF o HRG. Utilizamos como control positivo RasGRF1 que, como ya fue demostrado en nuestro laboratorio, es capaz de activar Ras de manera específica en el retículo (Arozarena et al., 2004). Así, cotransfectamos RasGRF1 y PTP-HRas y realizamos un ensayo de *pulldown*, corroborando que RasGRF1 es capaz de activar a PTPHRas. Al mismo tiempo, analizamos la posible activación de PTPHRas tras la estimulación con EGF o HRG, sin tener activación de Ras en el retículo bajo nuestras condiciones de experimentación (Figura 4.21).

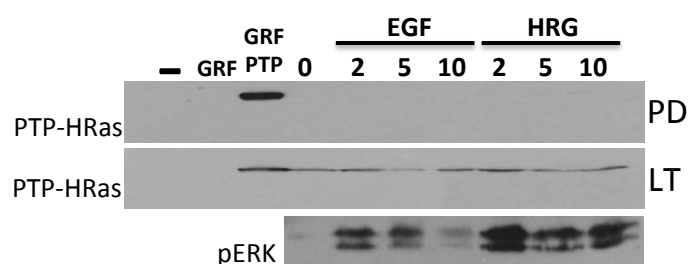


Figura 4.21. Análisis de la activación de Ras en el retículo endoplasmático de células MCF7 tras estimulación con EGF y HRG. Las células MCF7 fueron transfectadas con el plásmido PTP-HRas para la expresión de Ras localizado en retículo, a las 24 horas fueron privadas de suero durante 16 horas y posteriormente se procedió a la estimulación con EGF o HRG según el caso, a los tiempos indicados. Como control positivo se utilizó la activación de PTP-HRas con RasGRF1. Tras la técnica de pull-down y el posterior western blot se determinó que en células MCF7 no se observa activación de Ras en retículo endoplasmático.

Por otra parte, analizamos también la activación de Ras en el Aparato de Golgi tras estimular las células con EGF o con HRG. Con este fin, transfectamos las células con un plásmido que nos permitió expresar H-Ras en el Aparato de Golgi por llevar el epítipo KDEL que dirige a la proteína a esta localización. Además, se transfecó RasGRP, sirviendo como control positivo de la actividad de Ras en el Aparato de Golgi (Bivona et al., 2003; Caloca et al., 2003). Tras 24 horas después de la transfección, privamos las células de suero durante 16

horas. Se estimularon las células a distintos tiempos tanto con EGF como con HRG, a continuación se realizó el ensayo de *pulldown* y los correspondientes *western blots*. Pudimos así comprobar que las células MCF7 no presentan tampoco actividad de Ras en el Aparato de Golgi, bajo ninguno de los estímulos estudiados (Figura 4.22).

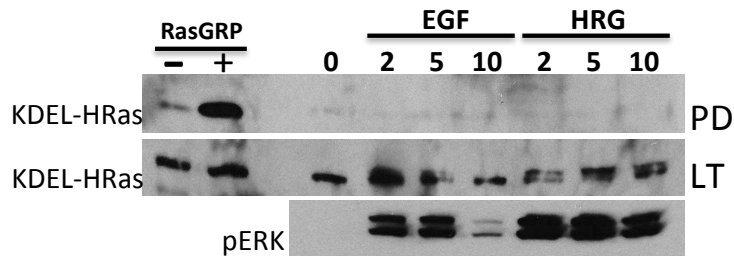


Figura 4.22. Análisis de la activación de Ras en el Aparato de Golgi de células MCF7 tras estimulación con EGF y HRG. Las células MCF7 fueron transfectadas con el plásmido KDEL-HRas para la expresión de Ras localizado en Aparato de Golgi, a las 24 horas fueron privadas de suero durante 16 horas y posteriormente se procedió a la estimulación con EGF o HRG según el caso, a los tiempos indicados. Como control positivo se utilizó la activación de PTP-HRas con RasGRP. Tras la técnica de *pulldown* y el posterior *western blot* se determinó que en células MCF7 no se observa activación de Ras en el Aparato de Golgi.

Por último, analizamos la activación de Ras en la membrana desordenada. Para ello, generamos una línea de MCF7 que expresaba de manera estable CD8-HA-HRaswt. Privamos a las células de suero durante 16 horas, y estimulamos con cada uno de los estímulos. Realizamos, nuevamente, la técnica de *pulldown*, con la que separamos la población de Ras activo de la población total de Ras. Mediante un *western blot*, utilizando un anticuerpo para detectar la proteína H-Ras, fuimos capaces de detectar la activación de CD8-HA-HRas en el caso de la estimulación con HRG, obteniendo una cinética de activación de Ras con un pico máximo de activación a los dos minutos, al igual que veíamos al analizar los niveles de Ras endógeno, que después va decayendo hasta niveles casi basales (Figura 4.23).

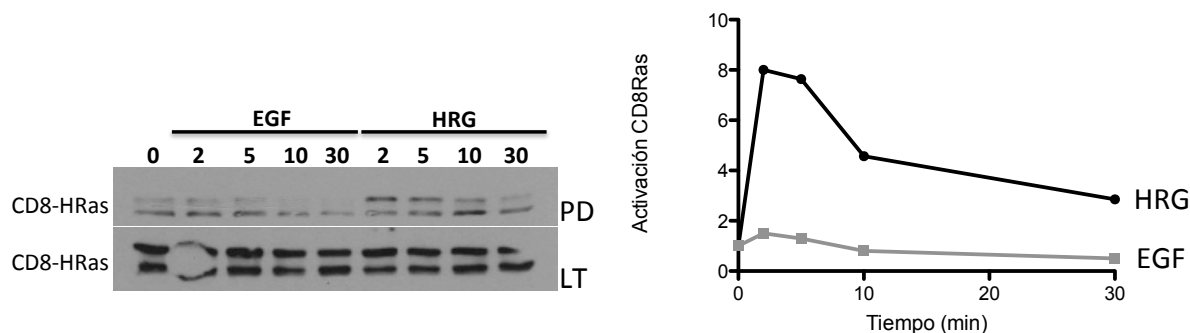


Figura 4.23. Análisis de la activación de Ras en membrana desordenada de células MCF7 tras estimulación con EGF y HRG. Las células MCF7 fueron transfectadas con el plásmido CD8-HA-HRas para la expresión de Ras localizado en la membrana plasmática desordenada, obteniendo clones que expresaban de manera estable dicha proteína. Las células fueron privadas de suero durante 16 horas y posteriormente se procedió a la estimulación con EGF o HRG según el caso, a los tiempos indicados. Tras la técnica de pulldown y el posterior western blot se determinó que, en células MCF7, HRas se activa desde membrana plasmática desordenada a niveles detectables únicamente tras la estimulación con HRG.

4.5. El tiempo como regulador de la respuesta biológica

Tal y como se ha comprobado en esta tesis, en las células MCF7 tras la estimulación con el factor de crecimiento EGF, se induce la fosforilación transitoria de ERK. Por otra parte, si las células son estimuladas con heregulina (HRG) se obtiene una cinética de fosforilación más sostenida en el tiempo.

Además, según el trabajo publicado por otros grupos, la estimulación con EGF y con HRG induce efectos fenotípicos diferentes (Nagashima et al., 2007), el EGF lleva las células a un estado proliferativo mientras que la estimulación con HRG induce la diferenciación celular hacia células adipocíticas. Dicha diferenciación está caracterizada por presentar una acumulación de lípidos en su interior. De tal manera que dos estímulos diferentes, utilizando la misma ruta de señalización, son capaces de provocar respuestas biológicas muy diferentes.

Nos propusimos investigar como la cinética de activación de ERK afecta a la respuesta en MCF7. Para empezar mantuvimos las células MCF7 durante 7 días en presencia de HRG y EGF. Tras el tratamiento, las células fueron fijadas y teñidas con *OilRed* que marca el interior de las células de rojo, allí donde se ha producido acumulación de lípidos (Figura 4.24).

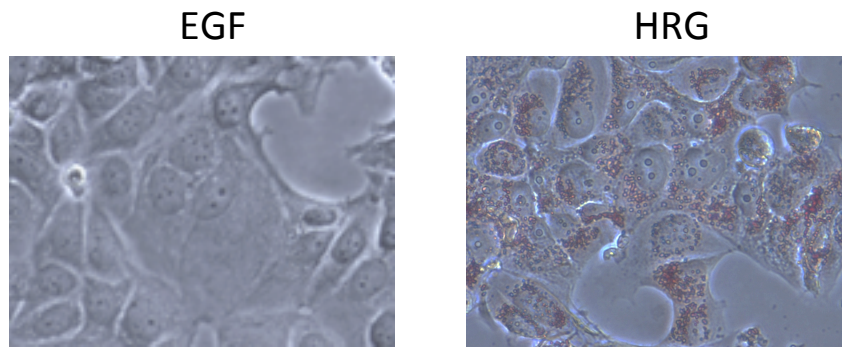


Figura 4.24. Detección de la diferenciación de las células MCF7 por tinción con OilRed. Células MCF7 fueron mantenidas en medio en ausencia de suero durante 16 horas para, posteriormente, inducir su diferenciación administrando HRG en el medio. Como control se utilizó el tratamiento con EGF en las mismas condiciones. Tras 7 días en estas condiciones de cultivo se procedió a la tinción con OilRed para detectar las acumulaciones de lípidos.

Una vez verificado el modelo, analizamos si la activación diferencial de ERK observada tras la estimulación con EGF y con HRG, era la base de la respuesta diferencial observada a ambos estímulos en las células MCF7. Con este fin prolongamos la cinética de activación de ERK bajo estimulación con EGF mediante la sobre-expresión de H-RAS, de esta manera la cinética de fosforilación de ERK era más sostenida, mimetizando la respuesta obtenida cuando las células eran estimuladas con HRG (Figura 4.25).

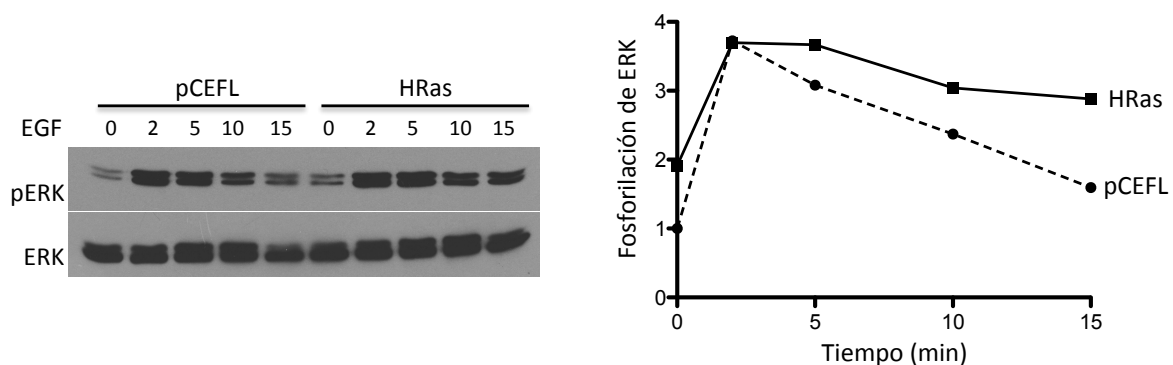
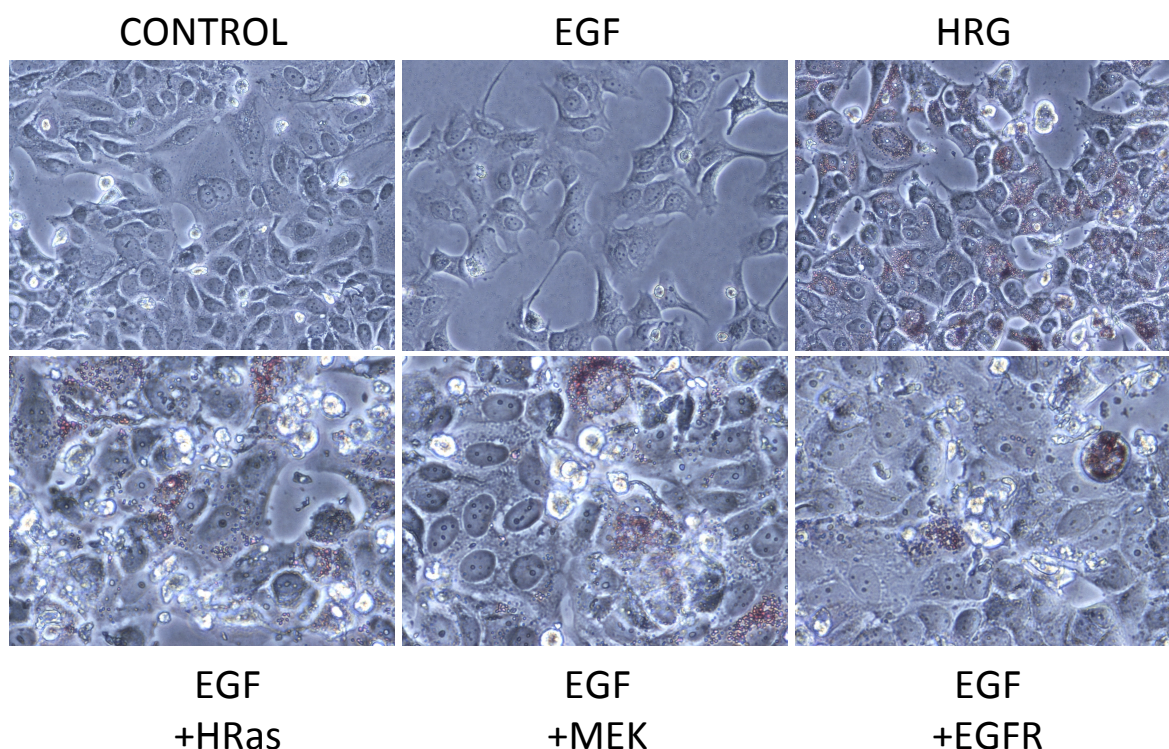


Figura 4.25. Prolongación de la cinética de ERK1/2 por sobre-expresión de HRas. Células MCF7 fueron transfectadas con un plásmido de expresión de HRas y con un vector vacío como control del experimento. Tras 16 horas de privación de suero, las células fueron estimuladas con EGF (100ug/ml) y lisadas a los tiempos indicados. Mediante western blot se detectó la proteína ERK fosforilada utilizando la cantidad de ERK total como control de carga.

En este punto, era necesario comprobar si la prolongación “artificial” de la señal, aún en presencia de EGF, era suficiente para inducir una diferenciación celular, así como lo hacía la HRG. Dicho de otra manera, quisimos analizar si éramos capaces de simular la señalización inducida por HRG, sobre-expresando H-Ras y en presencia de EGF.

Realizamos el experimento de diferenciación celular, utilizando como controles las células estimuladas con EGF y con HRG, para analizar la capacidad de diferenciación que confiere la sobre-expresión de Ras manteniendo los niveles de fosforilación de ERK durante más tiempo. Además, estudiamos si la respuesta era similar si se sobre-expresaban otros componentes de la cascada de señalización de EGF. Así, también analizamos la diferenciación en células transfectadas con MEK *wild-type* y con el receptor de EGF (EGFR). Observamos que las células también diferenciaban en presencia de EGF si se sobre-expresaban H-Ras, MEK y EGFR (Figura 4.26). Aunque no se consiguieron niveles de diferenciación tan altos como en las células tratadas con HRG, la tendencia estaba clara, observando incluso que la tasa de diferenciación era mayor cuanto más cantidad de H-Ras, MEK o EGFR (0,5 μ g, 1 μ g y 2 μ g de ADN) era sobre-expresado, indicando la dependencia de la diferenciación en MCF7 de la duración de la activación de la ruta Ras-ERK.



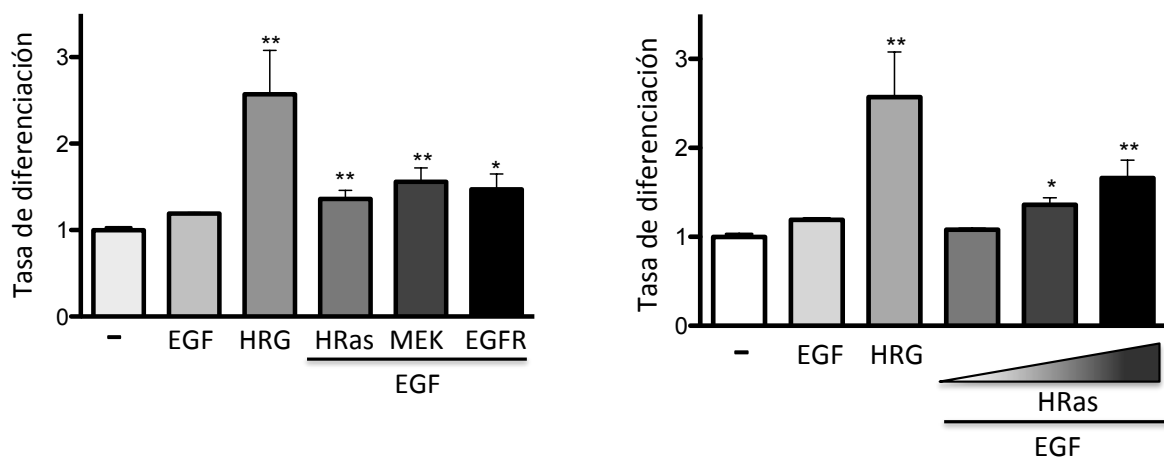


Figura 4.26. Ensayo de diferenciación de células MCF7 sobre-expresando HRas, MEK y EGFR. Células MCF7 fueron transfectadas con un plásmido de expresión de HRas, MEK, EGFR (1ug de plásmido) y con un vector vacío como control del experimento. Tras 16 horas de privación de suero se añadió a las células HRG como control positivo de diferenciación y EGF en las condiciones experimentales. Tras 7 días en estas condiciones de cultivo, las células fueron fijadas y teñidas según el protocolo de tinción con OilRed. Se tomaron fotografías de las células en las diferentes condiciones y a continuación se procedió a la extracción con isopropanol del colorante para realizar una lectura de la absorbancia a 510-540 nm.

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

1. ESPACIO COMO REGULADOR DE LA SEÑAL Ras-ERK INDUCIDA POR EGF

1.1. **Análisis de las cinéticas de fosforilación de ERK desde las distintas localizaciones de Ras**

Dada su importancia, en los últimos años se han desarrollado varios modelos matemáticos de la cascada de las MAPKs. Estos modelos han proporcionado nuevos conocimientos y predicciones de cómo el sistema funciona, gracias a la descripción topológica, las interacciones que tienen lugar, así como el análisis del comportamiento dinámico del sistema (Kolch et al., 2005).

Hasta el momento, uno de los modelos más completos propuestos para la señalización de las MAPKs es el desarrollado por Schoeberl y colaboradores. En su modelo matemático, basado en ecuaciones diferenciales, se describen los mecanismos moleculares de la ruta de activación de la ruta ERK por EGF (Schoeberl et al., 2002). Se trata de un modelo muy robusto que tiene en consideración muchos aspectos importantes de la regulación de la ruta de ERK desencadenada por EGF, sin embargo presenta algunos errores (Orton et al., 2005). Por ejemplo, no se considera cómo afecta la localización subcelular de Ras a la señalización celular, ni los distintos mecanismos de regulación que actúan sobre Ras en función de su localización dentro de la célula.

Son varios los trabajos que muestran la gran importancia que tiene la localización de Ras en la señalización celular, demostrando que la determinación de una respuesta biológica puede ser diferente en función de la localización subcelular de Ras (Bivona et al., 2006; Casar et al., 2009; Matallanas et al., 2006). Por lo que consideramos que este aspecto debía tenerse en cuenta a la hora de diseñar un modelo matemático que describiera la señalización de Ras-ERK, tras la estimulación con EGF.

Con este fin, y tomando como base el modelo de Schoeberl y colaboradores, se ha desarrollado un modelo más completo y sólido, en el que se corrige algunos de los errores que el anterior modelo mostraba, como por ejemplo introducir Ras-GAP como inhibidor de la

ruta Ras-ERK, en lugar de activador como estaba considerado en el anterior modelo, así como eliminar el estado ficticio Ras-GTP* posterior a la unión Ras-Raf, introduciendo un paso de desactivación de RasGTP a RasGDP catalizado por RasGAP. Además se consideró la contribución de las sublocalizaciones de Ras, que el anterior modelo no tenía en cuenta. El nuevo modelo del proyecto SIMAP (*Simulation Modelling of the MAP kinase Pathway*) ha creado nuevas predicciones cualitativas, verificándose con experimentos llevados a cabo por diferentes grupos de investigación de forma independiente. Participamos en este proyecto europeo con el análisis de la señalización de Ras desde diferentes localizaciones subcelulares, aportando los datos de las cinéticas de activación de ERK fruto de inactivar a Ras en determinados lugares dentro de la célula.

Con este fin, se bloqueó la señal de Ras en las diferentes ubicaciones subcelulares, y se obtuvo una reducción de la actividad de Ras en diferente grado. Al bloquear la señal desde retículo endoplasmático y desde membrana plasmática se obtuvo una reducción de la fosforilación de ERK con respecto al control de células sin bloquear Ras, siendo los niveles de fosforilación de ERK similares a las células sin estimular. Sin embargo la inhibición no fue tan pronunciada cuando se bloqueó la señal desde el aparato de Golgi, estando este dato en concordancia con el hecho de que H-Ras en Golgi activa mayoritariamente otros efectores como RalGDS y no tanto ERK (Matallanas et al., 2006), y que puede ser explicado también en base a los GEFs y GAPs disponibles en los diferentes localizaciones subcelulares (Arozarena et al., 2004; Bivona et al., 2003; Caloca et al., 2003) De hecho, varios estudios sugieren que la actividad GAP es más pronunciada en el interior celular que en la membrana plasmática (Mochizuki et al., 2001; Ohba et al., 2003), lo que está en relación con los trabajos que indican que la membrana plasmática es la ubicación predominante para las funciones de Ras (Augsten et al., 2006). Estos trabajos previos apoyan nuestros datos en los que observamos que existe mayor inhibición de la fosforilación de ERK cuando la actividad de Ras es bloqueada en la membrana plasmática.

Pero además de estudiar cómo la localización de Ras está afectando la intensidad de la señal, también analizamos cómo eran las cinéticas de fosforilación de ERK, en cuanto a duración, siendo de gran importancia en la determinación de respuestas biológicas tal y como se ha demostrado en varios modelos celulares (Marshall, 1995; Nagashima et al., 2007). Se analizaron para ello las cinéticas de fosforilación de ERK en función del sitio de

bloqueo de Ras y se observó que la activación de ERK era dependiente de la localización de Ras en cuanto a la duración de la señal.

Una vez realizado el análisis bioinformático, y generado el modelo de simulación, se pudo observar cómo serían las cinéticas de activación de ERK en ausencia de la señalización de Ras en determinadas sublocalizaciones celulares, así como las cinéticas de activación de ERK fruto del sitio desde el cual Ras señala. Según lo que nuestro modelo predice la activación de ERK desde membrana plasmática sería transitoria mientras que la señalización de Ras desde endomembranas deriva en una activación de ERK sostenida. La predicción del modelo encaja con los datos de otros trabajos en los que se describe una activación rápida y transitoria de Ras en membrana plasmática, y más sostenida en endomembranas (Chiu et al., 2002), así como con el hecho de que proteínas como PLC ϵ , que puede funcionar como proteína *scaffold* reteniendo Ras en Golgi, disminuye la cantidad de RasGTP en membrana plasmática y hace que las señales transitorias de Ras se conviertan en sostenidas en el aparato de Golgi (Eungdamrong and Iyengar, 2007).

Con el fin de corroborar el modelo obtenido, analizamos cómo sería la señal cuando Ras es desplazado de la membrana plasmática, para ello transfectamos un plásmido para la expresión de la proteína Apt1, que elimina los grupos palmitoil de Ras y puede permitir su liberación de la membrana plasmática y su enriquecimiento en endomembranas (Duncan and Gilman, 1998). Obtuvimos un cambio en la cinética de fosforilación de ERK, de tal manera que la cinética de activación obtenida era más sostenida en el tiempo, mostrando una desactivación de ERK mucho más lenta cuando Ras se encuentra predominantemente en endomembranas.

Corroboramos, por lo tanto, que el mantenimiento de la señal de ERK puede ser diferente en función de la localización subcelular desde la cual Ras está señalizando. Y que, Ras desde membrana plasmática contribuye a la desactivación rápida de ERK, lo que permite una respuesta de cinética transitoria en el tiempo. En cuanto a la intensidad de la señal, no fuimos capaces de corroborar exactamente los datos estimados por el modelo matemático, ya que en las células que expresan de manera ectópica Apt1 se obtiene una fosforilación de ERK de menos intensidad en el pico máximo de activación, mientras que el modelo predice una disminución de la fosforilación de ERK mucho más drástica. Posiblemente, se trata de un problema en la eficiencia de eliminación de los grupos palmitoil, que no siempre es completa,

y puede haber un pequeño porcentaje de Ras anclado a membrana plasmática. Además, H-Ras puede estar localizado en otras ubicaciones no estudiadas en este modelo, y que pueden estar contribuyendo a la señal total de H-Ras y modificando las cinéticas obtenidas. Con todo ello, se podría concluir que Ras desde membrana plasmática sería responsable de la activación de la ruta en tiempos cortos, y que desde retículo endoplasmático y aparato de Golgi se estaría contribuyendo al mantenimiento de la señal a tiempos más largos.

1.2. Comprobación del modelo de señalización de la ruta de ERK en otra línea celular

Tal y como propone el modelo del proyecto SIMAP, la activación de ERK desde membrana plasmática es más rápida mientras que la señalización desde endomembranas resulta en una activación de ERK más lenta y sostenida en el tiempo en las células HeLa, siendo corroborado mediante la expresión ectópica de Apt1 que desplaza la población de Ras a endomembranas.

Pero llegados a este punto, era necesario comprobar si los datos que se proponen con este modelo son válidos para otras líneas celulares. Para ello utilizamos un modelo celular que únicamente expresara Ras desde membrana plasmática y comprobamos cómo era la cinética de fosforilación de ERK tras la estimulación con EGF.

De todos los miembros de la familia de proteínas de Ras, KRas es la que presenta menor homología, presentando en la región hipervariable del extremo carboxilo terminal una secuencia de lisinas que hacen que su procesamiento post-traducciona sea diferente al del resto de los miembros de la familia Ras (Chen et al., 2000; Hancock et al., 1990; James et al., 1995). Tras el procesamiento post-traducciona de K-Ras este se localiza únicamente en retículo endoplasmático y membrana plasmática, siendo la membrana la localización más predominante de K-Ras. Por lo tanto, un modelo celular que exprese sólo K-Ras era el idóneo para nuestro objetivo.

En el grupo de investigación del Dr. Mariano Barbacid, se ha conseguido generar unos ratones *knockout* condicionales para K-Ras que a su vez son *knockout* para H-Ras y N-Ras, de los cuales se ha podido establecer una línea de MEFs que sólo expresan KRas y de manera condicional (Drosten et al., 2010; Esteban et al., 2001; Guerra et al., 2003). Con este modelo celular podemos analizar las cinéticas de fosforilación de ERK derivada de la activación únicamente de K-Ras utilizando como control células *wild-type*, así como células Ras *null*, que

no expresan ninguna de las isoformas de Ras ya que tras el suministro de 4OH-TMX se elimina la expresión de K-Ras. Este modelo celular soluciona uno de los principales problemas, que hasta hace un tiempo existía, en relación al estudio del papel funcional y bioquímico de la isoforma KRas, como es la imposibilidad de eliminar su expresión o de generar un modelo celular carente de KRas, siendo los ratones *knockout* de KRas letales embrionarios (Koera et al., 1997).

Como primer abordaje comenzamos por analizar las cinéticas de fosforilación de ERK, tras la estimulación con EGF, en células *wild-type*, células que tan sólo expresan K-Ras y células que no expresan Ras. Observamos que la cinética de activación de ERK se mantiene durante más tiempo en células que sólo tienen K-Ras, en comparación con células que también expresan H-Ras y N-Ras. Es decir, la señalización desde membrana plasmática, en este modelo celular, presenta una desactivación más lenta en comparación con la señalización total. Por lo tanto, el modelo matemático desarrollado a partir de resultados obtenidos en células HeLa no se puede extrapolar a este modelo celular. Se sabe que, de las tres isoformas estudiadas, K-Ras es la que presenta mayores diferencias estructurales en su región carboxilo terminal, y una de las principales consecuencias de estas diferencias es su localización en la célula, y por lo tanto los mecanismos regulatorios a los que se somete. Es posible que en las células HeLa la proporción de las tres isoformas de Ras estudiadas sea desigual, y este podría ser uno de los motivos por los que no se puede comparar los datos modelados a partir de células HeLa con el modelo celular de Barbacid. Teniendo en cuenta que las diferentes proteínas Ras son reguladas por diferentes mecanismos, y pueden presentar distinta afinidad por ciertos GEFs, no es sorprendente encontrar que células que sólo expresan K-Ras se comporten de diferente manera a células que expresen H-Ras, N-Ras y K-Ras. Por ejemplo, se ha descrito que RasGRF1 es capaz de activar H-Ras pero N-Ras y K-Ras (Jones and Jackson, 1998; Matallanas et al., 2003), mientras que RasGRP2 es capaz de activar N-Ras y K-Ras pero no H-Ras (Clyde-Smith et al., 2000). Otros GEFs como el ubicuo Sos, es capaz de activar las tres isoformas de Ras: H-Ras, N-Ras y K-Ras, pero con diferente eficiencia siendo H-Ras la isoforma más regulada por Sos, y K-Ras la menos influenciada por la presencia de Sos (Jaumot et al., 2002). En concreto, se han descrito ya algunos factores de intercambio de nucleótidos de guanina específicos para KRas como es el caso de SMG (Mizuno et al., 1991), así como la mayor afinidad de KRas para la activación sobre Raf1 o Rac en comparación con

HRas (Walsh and Bar-Sagi, 2001; Yan et al., 1998). Se sabe que la proteína NF1GAP es cuatro veces más efectiva sobre HRas y NRas que sobre KRas (Bollag and McCormick, 1991), de tal manera que la inactivación de la ruta, en las células en las que sólo señala KRas, sería menos efectiva. Con todo ello, después de intentar corroborar el modelo matemático desarrollado, a partir de datos generados en células Hela, en un modelo celular en el que sólo está expresándose K-Ras, encontramos que los datos no son validados en dichas condiciones, lo que puede corroborar que las isoformas de Ras no son redundantes funcionalmente, y que los mecanismos reguladores de sus funciones son diferentes. En este punto, se debería pensar en otra estrategia que nos permita extrapolar los datos que se predicen en la simulación y corroborar cómo es la cinética de fosforilación de ERK cuando Ras señala únicamente en membrana plasmática.

Por otra parte, al analizar las cinéticas de fosforilación de ERK en presencia únicamente de K-Ras nos resultó interesante el hecho de que, al eliminar la expresión de H-Ras y N-Ras, la cinética de fosforilación de ERK pasa de ser transitoria a ser sostenida. En relación a esto es interesante reseñar que, en fibroblastos dobles *knockout* para HRas y NRas, se ha observado una mayor activación de Ras (KRas) (Martinez-Salgado et al., 2006), esto podría desencadenar una activación de la cascada más sostenida. Además, mediante el análisis del transcriptoma de los fibroblastos *knockout* de HRas se descubrió la sobre-expresión de neuronatina (Nnat) (Castellano et al., 2007), que está implicada en la fosforilación del factor de transcripción CREB, y favorece la fosforilación de ERK (Mzhavia et al., 2008).

Disponiendo de este modelo celular, una vez analizadas las cinéticas de fosforilación de ERK tras la estimulación con EGF, seguimos con el análisis de la fosforilación de ERK bajo otros estímulos, ya que uno de los paradigmas que más interés despierta en el campo de la señalización celular, es cómo una misma cascada de señalización es capaz de generar diferentes respuestas, utilizando los mismos elementos de la ruta, frente a diferentes estímulos. Por ello, quisimos comprobar como se comportaba nuestro modelo celular frente a otros estímulos como es el caso de TPA y LPA. Tras la estimulación de las células con TPA, obtuvimos datos similares a los obtenidos tras la estimulación con EGF, en los MEFs wt una respuesta transitoria aunque más mantenida que en las células tratadas con EGF, ya que a los 60 minutos aún detectamos ERK fosforilado mientras que en aquellas tratadas con EGF a los 10 minutos ya no había fosforilación de ERK. En cuanto a los MEFs H/N *-/-*, tras la activación

de K-Ras por TPA, obtuvimos una cinética de fosforilación sostenida en el tiempo, manteniéndose los niveles de fosfo-ERK hasta las 2 horas después del tratamiento. Sin embargo, observamos que en los MEFs *Ras null*, en los que también se había eliminado la expresión de KRas se producía una pequeña activación sostenida en el tiempo de ERK. Teniendo en cuenta que TPA es un análogo de la molécula de Diacilglicerol, y es capaz de activar a la proteína quinasa C (PKC) (Schönwasser et al., 1998), es posible que sea esta ruta la que esté compensando la ausencia de proteínas Ras en la activación de ERK, siendo capaz de activarlo a niveles mucho menores pero de manera sostenida. Sin embargo, tras la estimulación de las líneas celulares con ácido lisofosfatídico o LPA obtenemos en los tres casos una activación transitoria pero con diferente grado de intensidad. No es sorprendente sabiendo que LPA es capaz de mimetizar a EGF en la estimulación rápida de Ras mediante intermediarios como la proteína Src (Luttrell et al., 1995; van Corven et al., 1993), o bien utilizando otras proteínas como PLC o la adenilato ciclasa, en ausencia de proteínas Ras. Por otra parte, no es sorprendente que la estimulación con LPA no tenga los mismos efectos que la estimulación con EGF en células carentes de HRas y NRas, teniendo en cuenta la activación de otras rutas dependientes de la activación de receptores GPCR, como la activación de Rap1 en respuesta a la generación de AMP cíclico tras la estimulación de receptores acoplados a proteínas G (Gloerich and Bos, 2010; Kawasaki et al., 1998; Stork and Schmitt, 2002).

Con todo ello, y a pesar de que el concepto de linealidad de la cascada Ras-ERK, así como el de las MAPK en general estaba bastante extendido, hoy en día se sabe que existe conexión de la ruta Ras-ERK con otras cascadas, regulando conjuntamente la activación de ERK (Aksamitiene et al., 2010; Moelling et al., 2002; Mograbi et al., 2001). Poniéndose de manifiesto que las isoformas de Ras, a pesar de su gran homología, no son redundantes bioquímicamente, y que la función de K-Ras, posiblemente en relación a su ubicación celular, contribuye de diferente manera a la que lo hacen H-Ras y N-Ras.

2. ESPACIO COMO REGULADOR DE LA SEÑALIZACIÓN RAS-ERK EN LA DETERMINACIÓN DE RESPUESTAS BIOLÓGICAS

En estudios que datan de la década de los años 80 ya se demostró que Ras era esencial para el proceso proliferativo en fibroblastos de ratón (NIH-3T3) mediante dos estrategias diferentes en las que se bloqueaba la actividad de Ras, observando en ambos casos un descenso en la tasa proliferativa (Feig and Cooper, 1988; Mulcahy et al., 1985).

En este trabajo se demuestra que, por una parte, la eliminación de H-Ras, N-Ras y K-Ras supone una parada proliferativa total, y por otra parte, que dicha parada proliferativa supone un proceso reversible, mostrando además que no son imprescindibles para la supervivencia ya que no disminuye el número celular. Estos datos se encuentran en concordancia con lo recientemente publicado en este mismo modelo celular, en el que se estudia los posibles efectores de Ras capaces de compensar la ausencia de los miembros de la familia Ras (Drosten et al., 2010).

Tras la eliminación de las tres isoformas de Ras podemos observar como cada una de ellas es capaz de rescatar la proliferación en ausencia de las otras dos, revirtiendo la parada proliferativa fruto de la ausencia de Ras (en presencia de 4OH-TMX). Siendo N-Ras y K-Ras las que presentan un potencial de rescate mayor, entre el 50% y el 60%. Mientras que H-Ras también es capaz de sostener la proliferación celular en ausencia de N-Ras y K-Ras pero con un potencial menor, llegando alrededor del 20% del rescate proliferativo. Por otra parte, las formas constitutivamente activas de las isoformas de Ras se comportan de diferente manera, siendo K-Ras quien muestra un potencial de rescate mucho mayor, seguido por N-Ras. Sin embargo H-Ras en su forma oncogénica muestra una tasa de rescate proliferativo mucho más bajo. Aunque en su forma salvaje su tasa proliferativa era la menor de las tres isoformas estudiadas, nada tiene que ver con la baja tasa de proliferación observada en la forma constitutivamente activa, llegando apenas a un 4% de rescate proliferativo. Aunque, de manera general, la activación de la ruta de las MAPKs está asociada a procesos proliferativos tras la entrada de ERK al núcleo, también hay varios estudios que describen un papel apoptótico. De tal manera, que la determinación de una respuesta u otra estaría mediada por un balance de señales pro- y anti-apoptóticas en función de la intensidad y la duración de la señal (Pearson et al., 2001). Así podría ser, que el hecho de potenciar la señal con H-Ras en su forma constitutivamente activa puede suponer la inclinación de dicha balanza hacia las

señales pro-apoptóticas. Al aumentar la señalización desde H-Ras podría desembocar en una activación de ciertas proteínas citoplasmáticas que sirvan de retención de ERK en el citosol, así como ocurre en células HeLa estimuladas con IFN γ , que activa la quinasa DAPK (*Death Associated Protein Kinase*) y ésta secuestra a ERK en el citoplasma (Chen et al., 2005). En otros casos, la activación de Akt, tras la estimulación con TPA o EGF, lleva a la fosforilación de PEA-15 que retiene a ERK en el citoplasma, desregulando así la transcripción dependiente de Elk1 y la expresión de c-Fos (Gervais et al., 2006; Trecia et al., 2003). El hecho de que esto ocurra con H-Ras y no con las otras dos isoformas de Ras estudiadas puede ser explicado en base a la afinidad por los distintos efectores, ya que H-Ras, por ejemplo, tiene mayor potencial de activación sobre PI3K que K-Ras (Yan et al., 1998), lo que podría explicar una mayor activación de Akt. Por lo tanto, la expresión de altos niveles de HRasV12 en nuestro modelo celular podría estar dando lugar a un aumento de señales pro-apoptóticas, o simplemente a un descenso de las señales proliferativas, como consecuencia de la activación de otras proteínas efectoras y el posible secuestro de ERK en el citoplasma.

En comparación con los datos mostrados en la publicación realizada recientemente con este mismo modelo celular (Drosten et al., 2010), nuestros datos encajan con lo observado en sus experimentos salvo en el caso de la isoforma H-Ras. En este caso, y sobretodo cuando la forma utilizada es la constitutivamente activa encontramos grandes diferencias. En su caso, obtienen un rescate proliferativo del 80% mientras que en este trabajo se ha obtenido un 4%. Posiblemente, los niveles de sobre-expresión utilizados en su trabajo y en el nuestro sean bien distintos. Su sistema de sobre-expresión estaba basado en la infección con retrovirus mientras que el nuestro se basó en la transfección de construcciones plasmídicas con lipofectamina. Tanto la eficiencia como los niveles de sobre-expresión alcanzados con ambas técnicas son bien diferentes, siendo menor en su caso, y por ello, las consecuencias en los datos obtenidos son distintas. Nuevamente, en función de la intensidad de la señalización, la determinación de una respuesta puede ser diferente. En este caso, la señalización de N-Ras y K-Ras no se estaría viendo afectada por los niveles de expresión mientras que H-Ras muestra una dependencia de los niveles de proteínas, a lo mejor por estar más implicada en procesos pro-apoptóticos.

2.1. Análisis de la capacidad de rescate proliferativo de Ras desde sus localizaciones subcelulares

En base a los datos de rescate proliferativo obtenidos para cada una de las isoformas de Ras, y sabiendo que la localización desde la cual cada una de ellas puede señalizar puede ser determinante en la capacidad proliferativa, continuamos analizando cómo contribuían las diferentes localizaciones en el rescate de la viabilidad celular.

Se realizó los experimentos de rescate proliferativo utilizando sólo las formas silvestres o *wild-type* de las proteínas, con el fin de analizar la capacidad proliferativa en condiciones basales, sin potenciar la ruta. Intentamos, de esta manera, asemejarnos a lo que podría suceder de manera endógena, a excepción de los efectos propios de la sobre-expresión de proteínas como herramienta molecular.

En los datos obtenidos en el análisis de la capacidad de rescate proliferativo de K-Ras desde sus localizaciones habituales, se demuestra que desde membrana desordenada y retículo endoplasmático la contribución a la proliferación es similar. Según esto, se podría decir que la determinación de una respuesta por parte de K-Ras es independiente de su localización. Es posible, que la regulación a la que K-Ras se ve sometida en nuestro modelo celular sea la misma, independientemente de su sublocalización.

Por el contrario, pudimos observar que N-Ras presenta una actividad dependiente de su sitio de señalización. Destacando, claramente, el papel minoritario de N-Ras desde el Aparato de Golgi y la baja contribución que existe por parte de N-Ras localizado en el retículo endoplasmático, estos datos están en concordancia con los datos obtenidos al bloquear la actividad de Ras, en los que se muestra que los niveles de fosforilación de ERK no se ven muy afectados cuando la señalización de Ras desde Golgi se bloquea, por lo que las funciones proliferativas de ERK pueden ser diferentes en función de la localización subcelular desde la cual se desencadena la señalización. Según los datos obtenidos, el papel proliferativo de N-Ras radica en su actividad desde la membrana plasmática, tanto la membrana desordenada como las balsas lipídicas. Esto se puede explicar en base a la sensibilidad a las proteínas activadoras de la actividad GTPasa de Ras (RasGAP) en función de la localización de Ras. Podría ser que la actividad de RasGAP en el retículo endoplasmático y en el Aparato de Golgi

fuera mayor que la existente en la membrana plasmática, así como ocurre en otros modelos celulares como en las células COS (Ohba et al., 2003).

Uno de los aspectos que nos queda por analizar es saber cómo son las cinéticas de fosforilación de ERK cuando se potencia la señal desde cada una de las localizaciones para cada una de las isoformas. Se ha descrito en otros modelos celulares que la respuesta a factores de crecimiento, como el EGF, va acompañada de una activación rápida de Ras en la membrana plasmática seguido por una activación más sostenida y tardía en el Aparato de Golgi (Chiu et al., 2002), tal y como se ha comprobado en la elaboración del modelo matemático SIMAP. Esto está en concordancia con los datos que demuestran que las cinéticas de activación prolongadas pueden estar relacionadas con procesos de diferenciación, más que con eventos proliferativos tal y como ocurre en células PC12 (Traverse et al., 1994), en células MDCK (Liang and Chen, 2001) o en células MCF7 (Nagashima et al., 2007). Deberíamos comprobar si la activación de ERK desde membrana plasmática mediada por cada una de las isoformas de Ras, en este modelo celular, es transitoria o sostenida para poder asociar la capacidad proliferativa con la cinética de fosforilación de ERK.

Es posible, además, que la fracción de Ras existente en cada localización fuese diferente. Si la cantidad de Ras en endomembranas es menor, la contribución desde estos sitios será menos importante que la contribución desde la membrana plasmática. Por otra parte, hay que destacar el gran dinamismo existente en el Aparato de Golgi, que puede suponer la alta tasa de renovación de Ras en este orgánulo.

3. TIEMPO Y ESPACIO EN LA REGULACIÓN DE FUNCIONES BIOLÓGICAS

La especificidad de una señal en la determinación de una respuesta biológica puede ser explicada por la capacidad de los productos de la expresión génica temprana (IEGs) de responder a los cambios de las cinéticas de la actividad de ERK, dando lugar a la programación de una respuesta biológica apropiada. Por ello, es de gran importancia conocer las cinéticas de activación de ERK, así como los mecanismos regulatorios que están implicados, para entender las respuestas biológicas que se desencadenan. Conociendo los

procesos por los cuales una célula prolifera en lugar de diferenciarse, podremos intervenir en la regulación del proceso para impedir una proliferación a destiempo.

En este trabajo hemos comprobado que las cinéticas de ERK son diferentes dependiendo de si estimulamos con EGF o con HRG. Estos estímulos provocan respuestas biológicas diferentes en las células MCF7, por un lado la estimulación con EGF lleva a las células a un estado proliferativo mientras que la HRG provoca la diferenciación de estas células (Nagashima et al., 2007).

Como primer abordaje, analizamos las cinéticas de activación de Ras con ambos estímulos, para intentar saber si la activación diferencial de EGF y HRG se daba a este nivel de la cascada. Encontramos que en ambos casos la activación era transitoria aunque mucho mayor en células tratadas con HRG que en células tratadas con EGF. Por lo tanto, de existir un mecanismo de regulación, no era a nivel de Ras donde se producía.

Tal y como se ha citado en este trabajo anteriormente, la localización subcelular desde la cual Ras señala es de gran importancia en las cinéticas de fosforilación de ERK así como en la determinación de una respuesta específica. Por ello abordamos el análisis de la activación de Ras en sus distintas ubicaciones subcelulares. En primer lugar, analizamos la presencia endógena de Ras en los sitios que íbamos a analizar, sorprendentemente obtuvimos ausencia de Ras en balsas lipídicas de la membrana plasmática, con lo que la activación desde ese lugar quedó descartada. Analizamos entonces la activación desde el aparato de Golgi, retículo endoplasmático y la membrana desordenada. Únicamente se encontró activación de Ras en la membrana desordenada, y sólo pudimos detectar RasGTP bajo estimulación con HRG. No descartamos aún la existencia de activación de Ras bajo estimulación con EGF en esta misma localización, ya que si comparamos la intensidad de Ras activo endógeno en el tratamiento con EGF y HRG, observamos mayores niveles de RasGTP en células tratadas con HRG. Cuando analizamos la activación de Ras desde membrana plasmática tras la estimulación con HRG, los niveles detectados son mucho menores que cuando analizamos la activación de Ras endógeno en células tratadas con el mismo estímulo. Teniendo esto en cuenta, es posible que la activación de Ras desde membrana plasmática tras la estimulación con EGF no la estemos detectando, aunque pueda estar teniendo lugar. A partir de estos datos, concluimos que la determinación de la respuesta biológica a la estimulación con EGF o HRG no es consecuencia de la activación de Ras desde diferentes localizaciones subcelulares.

Es decir, el sitio desde el cual Ras es activado no afecta a la regulación de la señalización por EGF y HRG.

Sabiendo que no existen diferencias en las cinéticas de activación de Ras, aunque sí en intensidad, continuamos el análisis en el siguiente nivel de la cascada. Al analizar la fosforilación de MEK encontramos que la activación era transitoria en ambos casos, indicando que el punto de regulación se encontraba en la fosforilación y activación de ERK, siendo la cinética de fosforilación de ERK transitoria con EGF, y sostenida con HRG. En contra de nuestros resultados, existen datos de otro grupo de investigación que indican una fosforilación de MEK sostenida bajo estimulación con HRG. En este caso, bien por utilizar un clon celular diferente, o bien por realizar los experimentos en condiciones de cultivo distintas a las nuestras (con un medio suplementado al 5% de suero fetal), indican que el punto de regulación es previo a la fosforilación de MEK (Thottassery et al., 2004). Sin embargo, la activación de Ras que obtienen también es transitoria en el tratamiento con HRG. Sería interesante saber si existe una activación diferencial de otras rutas que den cuenta de la posterior fosforilación sostenida que se observa al estimular con HRG ya que existe controversia acerca de la dependencia de MEK en la activación de ERK en este modelo celular. En el anterior trabajo citado describen una activación de ERK independiente de MEK proponiendo una retroalimentación positiva de ERK con PLA2 y PKC. Por otra parte, existen otro trabajo en la literatura que indica la dependencia de MEK, ya que tras el tratamiento con inhibidores de MEK se bloquea la fosforilación de ERK hasta niveles basales (Aksamitiene et al., 2010).

Según nuestros datos, la estimulación con EGF o con HRG tiene diferentes consecuencias, en cuanto a cinéticas de activación al nivel de ERK. Por lo tanto, algún mecanismo de regulación debe estar activo en la activación de ERK por parte de MEK. Nos planteamos la posibilidad de que la regulación estuviera teniendo lugar en el núcleo, una vez ERK era fosforilado y transportado. Por ello realizamos los experimentos de fraccionamiento núcleo-citoplasma, así como el análisis de las cinéticas de fosforilación de dos sustratos de ERK: RSK (citoplasmático) y Elk1 (nuclear). Con ambas estrategias llegamos a la conclusión de que la regulación estaba teniendo lugar en el citoplasma, ya que la cinética de fosforilación de ERK en las fracciones citoplasmáticas es sostenida, así como la cinética de activación de los sustratos citoplasmáticos. Estos datos son contrarios a los presentados en el trabajo de

Nagashima (Nagashima et al., 2007), según los cuales las cinéticas de expresión de c-fos son similares con ambos estímulos, apareciendo las diferencias a nivel de estabilización de la proteína. En esta misma publicación describen un modelo en el cual HRG induce, en general, mayor nivel de expresión de genes, estando de acuerdo con nuestros datos en cuanto a los niveles de Elk1 fosforilado obtenidos tras estimulación con HRG. Con una tasa de transcripción más elevada se facilita una retroalimentación más potente y estable para estabilizar, posteriormente, la actividad de ERK1/2.

En este punto, sería interesante analizar algunos de los posibles procesos de regulación citoplasmáticos a los que está sometida ERK. Por una parte, la interacción con proteínas *scaffold* puede presentar distinta afinidad de unión en función del estímulo, así se podrían formar complejos proteicos que retuvieran en el citoplasma a ERK y permitieran una fosforilación más sostenida con HRG. Por otra parte, una de las formas más comunes de regulación de la fosforilación es la acción de fosfatasa específicas, tal y como ocurre en las células CL3 (cáncer de pulmón) al tratarlas con el carcinógeno Pb(II). En ese modelo se produce la activación sostenida de ERK sin participar para ello el resto de la cascada, sino por un proceso de retroalimentación positiva por el cual la activación de ERK conduce a la degradación de la fosfatasa MKP1 por ubiquitinación (Lin et al., 2003), de esta manera ERK deja de ser desfosforilada y permanece activa por más tiempo. Si analizásemos las cinéticas de expresión de algunas fosfatasas citoplasmáticas podríamos saber si alguna de ellas está interviniendo en la regulación de ERK en nuestro modelo celular. Otra posibilidad deriva de un reciente trabajo que describe la regulación de la expresión del receptor acoplado a proteína G, GPR30 (*G protein-coupled receptor 30*) (Ruan et al., 2012). Según este trabajo, la estimulación con HRG induce la expresión de GPR30 (Prossnitz et al., 2008), siendo esta regulación dependiente de la activación de la ruta de ERK. Sería interesante analizar si la expresión de GPR30, y sus efectores, son responsables de la fosforilación sostenida de ERK y de sus consecuencias, ya que se ha descrito un papel anti-proliferativo para GPR30 en células MCF7 (Ariazi et al., 2010), que encajaría con la respuesta diferenciadora provocada por HRG. O bien que sea la activación sostenida de ERK, inducida por HRG, responsable de la sobre-expresión de GPR30.

En último lugar, independientemente de lo qué está sucediendo en los niveles anteriores de ERK, quisimos determinar si la cinética de ERK era determinante para la respuesta

biológica observada bajo cada estímulo. Es decir, si la activación diferencial de ERK constituye la base de las diferentes respuestas de las células a EGF y HRG. Al sobre-expresar la proteína Ras y estimular las células con EGF conseguimos prolongar la cinética de fosforilación de ERK, simulando lo que ocurre con HRG. Bajo estas condiciones las células, al cabo de 7 días presentaban un fenotipo similar al de células cultivadas en medio con HRG. Al sobre-expresar algunos de los componentes de la cascada de señalización de ERK, como es el caso de MEK, observamos una tendencia a la diferenciación celular, aunque no se alcanza en ningún caso valores tan altos como en las células tratadas con HRG. Con respecto a este aspecto cabe destacar que, mientras las células con HRG están sometidas todas ellas al estímulo, las células transfectadas pueden presentar diferente grado de sobre-expresión, incluso la eficiencia de transfección no siempre es del 100%, por lo que no es extraño obtener niveles más bajos de diferenciación.

Estos resultados sugieren que los distintos efectos observados por EGF y HRG en células MCF7 pueden ser explicados en base a diferencias en la duración de la activación de ERK, sin implicar a otras rutas de señalización. De hecho, hemos comprobado que la tasa de diferenciación es mayor cuanta más proteína Ras hay sobre-expresada, reflejando que la diferenciación de células MCF7 es dependiente de la actividad de la ruta Ras-ERK. El hecho de que aumentando la cantidad de Ras podamos obtener más células diferenciadas encaja perfectamente con el hecho de que la cantidad de Ras activo es mucho mayor en las células estimuladas con HRG que con EGF. Así, si aumentamos la cantidad de Ras total, es posible que la cantidad de Ras unido a GTP sea mayor aún estando estimuladas por EGF.

Por lo tanto, si encontramos la forma de regulación de ERK, en condiciones proliferativas, podríamos modificar su cinética de activación dirigiendo a la célula a un proceso de diferenciación y evitando una sobre-proliferación. Con este fin, sería interesante averiguar el mecanismo de regulación de ERK en este modelo celular. ¿Están las proteínas *scaffold* implicadas en esta regulación? ¿Existe un cambio en la afinidad de ERK a las diferentes proteínas *scaffold* en función del estímulo utilizado? ¿Se trata a lo mejor de la regulación de la actividad de proteínas fosfatasa específicas? ¿Es posible que el tratamiento de HRG esté inhibiendo la actividad de alguna fosfatasa?

Estas son algunas de las preguntas sin resolver acerca de la regulación de la activación de ERK en las células MCF7. Son preguntas, que si se logran resolver, darán la respuesta al por qué de la fosforilación diferencial de ERK bajo estimulación con EGF o HRG.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. Según el modelo de simulación de la ruta de ERKs, considerando la localización de Ras en células HeLa, se predice una activación de la cascada rápida y transitoria desde la membrana plasmática y más sostenida desde endomembranas.
2. En el rescate de la viabilidad celular las isoformas N-Ras y K-Ras ejercen un papel más importante que H-Ras. La determinación de la respuesta proliferativa por parte de K-Ras es independiente de su localización subcelular. Sin embargo, la capacidad de rescate proliferativo de N-Ras radica en su actividad desde la membrana plasmática.
3. Existe una fosforilación diferencial de ERK, bajo estimulación con EGF y HRG. Esta activación diferencial de ERK constituye la base de las diferentes respuestas biológicas de las células MCF7 a EGF y HRG.

VII. BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abe MK, Kahle KT, Saelzler MP, Orth K, Dixon JE and Rosner MR (2001). **ERK7 is an autoactivated member of the MAPK family.** *J Biol Chem*;276(24):21272-9.
- Abe MK, Kuo WL, Hershenson MB and Rosner MR (1999). **Extracellular signal-regulated kinase 7 (ERK7), a novel ERK with a C-terminal domain that regulates its activity, its cellular localization, and cell growth.** *Mol Cell Biol*;19(2):1301-12. *PMCID: PMC116059.*
- Abe MK, Saelzler MP, Espinosa R, Kahle KT, Hershenson MB, Le Beau MM and Rosner MR (2002). **ERK8, a new member of the mitogen-activated protein kinase family.** *J Biol Chem*;277(19):16733-43.
- Adachi M, Fukuda M and Nishida E (1999). **Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer.** *EMBO J*;18(19):5347-58. *PMCID: PMC1171604.*
- Adachi M, Fukuda M and Nishida E (2000). **Nuclear export of MAP kinase (ERK) involves a MAP kinase kinase (MEK)-dependent active transport mechanism.** *J Cell Biol*;148(5):849-56. *PMCID: PMC2174544.*
- Aebersold DM, Shaul YD, Yung Y, Yarom N, Yao Z, Hanoch T and Seger R (2004). **Extracellular signal-regulated kinase 1c (ERK1c), a novel 42-kilodalton ERK, demonstrates unique modes of regulation, localization, and function.** *Mol Cell Biol*;24(22):10000-15. *PMCID: PMC525466.*
- Ahn S, Shenoy SK, Wei H and Lefkowitz RJ (2004). **Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor.** *J Biol Chem*;279(34):35518-25.
- Aksamitiene E, Kholodenko BN, Kolch W, Hoek JB and Kiyatkin A (2010). **PI3K/Akt-sensitive MEK-independent compensatory circuit of ERK activation in ER-positive PI3K-mutant T47D breast cancer cells.** *Cell Signal*;22(9):1369-78. *PMCID: 2893265.*
- Alessi DR, Gomez N, Moorhead G, Lewis T, Keyse SM and Cohen P (1995). **Inactivation of p42 MAP kinase by protein phosphatase 2A and a protein tyrosine phosphatase, but not CL100, in various cell lines.** *Curr Biol*;5(3):283-95.
- Amin DN, Tuck D and Stern DF (2005). **Neuregulin-regulated gene expression in mammary carcinoma cells.** *Exp Cell Res*;309(1):12-23.
- Ariazi EA, Brailoiu E, Yerrum S, Shupp HA, Slifker MJ, Cunliffe HE, Black MA, Donato AL, Arterburn JB, Oprea TI, Prossnitz ER, Dun NJ and Jordan VC (2010). **The G protein-**

- coupled receptor GPR30 inhibits proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells.** *Cancer Res*;70(3):1184-94. *PMCID*: 2879282.
- Arozarena I, Matallanas D, Berciano MT, Sanz-Moreno V, Calvo F, Munoz MT, 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(4):1516-30. *PMCID*: 344182.
- Augsten M, Pusch R, Biskup C, Rennert K, Wittig U, Beyer K, Blume A, Wetzker R, Friedrich K and Rubio I (2006). **Live-cell imaging of endogenous Ras-GTP illustrates predominant Ras activation at the plasma membrane.** *EMBO Rep*;7(1):46-51. *PMCID*: 1369223.
- Bermudez O, Jouandin P, Rottier J, Bourcier C, Pagès G and Gimond C (2011). **Post-transcriptional regulation of the DUSP6/MKP-3 phosphatase by MEK/ERK signaling and hypoxia.** *J Cell Physiol*;226(1):276-84.
- Bivona TG, Pérez De Castro I, Ahearn IM, Grana TM, Chiu VK, Lockyer PJ, Cullen PJ, Pellicer A, Cox AD and Philips MR (2003). **Phospholipase Cgamma activates Ras on the Golgi apparatus by means of RasGRP1.** *Nature*;424(6949):694-8.
- Bivona TG, Quatela SE, Bodemann BO, Ahearn IM, Soskis MJ, Mor A, Miura J, Wiener HH, Wright L, Saba SG, Yim D, Fein A, Pérez de Castro I, Li C, Thompson CB, Cox AD and Philips MR (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(4):481-93.
- Bodart JF (2010). **Extracellular-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase cascade: unsolved issues.** *J Cell Biochem*;109(5):850-7.
- Bogoyevitch MA, Ngoei KR, Zhao TT, Yeap YY and Ng DC (2010). **c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges.** *Biochim Biophys Acta*;1804(3):463-75.
- Bollag G and McCormick F (1991). **Differential regulation of rasGAP and neurofibromatosis gene product activities.** *Nature*;351(6327):576-9.
- Borg A, Baldetorp B, Ferno M, Killander D, Olsson H, Ryden S and Sigurdsson H (1994). **ERBB2 amplification is associated with tamoxifen resistance in steroid-receptor positive breast cancer.** *Cancer Lett*;81(2):137-44.
- Borges J, Pandiella A and Esparís-Ogando A (2007). **Erk5 nuclear location is independent on dual phosphorylation, and favours resistance to TRAIL-induced apoptosis.** *Cell Signal*;19(7):1473-87.
- Bost F, Aouadi M, Caron L, Even P, Belmonte N, Prot M, Dani C, Hofman P, Pagès G, Pouyssegur J, Le Marchand-Brustel Y and Binétruy B (2005). **The extracellular signal-**

regulated kinase isoform ERK1 is specifically required for in vitro and in vivo adipogenesis. *Diabetes*;54(2):402-11.

Bourne HR (1997). **How receptors talk to trimeric G proteins.** *Curr Opin Cell Biol*;9(2):134-42.

Boyartchuk VL, Ashby MN and Rine J (1997). **Modulation of Ras and a-factor function by carboxyl-terminal proteolysis.** *Science*;275(5307):1796-800.

Brandt DT and Grosse R (2007). **Get to grips: steering local actin dynamics with IQGAPs.** *EMBO Rep*;8(11):1019-23. *PMCID: PMC2247391*.

Briggs MW and Sacks DB (2003). **IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation.** *EMBO Rep*;4(6):571-4. *PMCID: PMC1319206*.

Brightman FA and Fell DA (2000). **Differential feedback regulation of the MAPK cascade underlies the quantitative differences in EGF and NGF signalling in PC12 cells.** *FEBS Lett*;482(3):169-74.

Brott BK, Pinsky BA and Erikson RL (1998). **Nlk is a murine protein kinase related to Erk/MAP kinases and localized in the nucleus.** *Proc Natl Acad Sci U S A*;95(3):963-8. *PMCID: PMC18639*.

Brown MD and Sacks DB (2006). **IQGAP1 in cellular signaling: bridging the GAP.** *Trends Cell Biol*;16(5):242-9.

Brown MD and Sacks DB (2009). **Protein scaffolds in MAP kinase signalling.** *Cell Signal*;21(4):462-9. *PMCID: PMC2668224*.

Brunet A, Pagès G and Pouyssegur J (1994). **Growth factor-stimulated MAP kinase induces rapid retrophosphorylation and inhibition of MAP kinase kinase (MEK1).** *FEBS Lett*;346(2-3):299-303.

Brunet A, Roux D, Lenormand P, Dowd S, Keyse S and Pouyssegur J (1999). **Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry.** *EMBO J*;18(3):664-74. *PMCID: 1171159*.

Burack WR and Shaw AS (2005). **Live Cell Imaging of ERK and MEK: simple binding equilibrium explains the regulated nucleocytoplasmic distribution of ERK.** *J Biol Chem*;280(5):3832-7.

Burack WR and Sturgill TW (1997). **The activating dual phosphorylation of MAPK by MEK is nonprocessive.** *Biochemistry*;36(20):5929-33.

Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, Lemmon MA, Sliwkowski MX, Ward CW and Yokoyama S (2003). **An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors.** *Mol Cell*;12(3):541-52.

- Buschbeck M and Ullrich A (2005). **The unique C-terminal tail of the mitogen-activated protein kinase ERK5 regulates its activation and nuclear shuttling.** *J Biol Chem*;280(4):2659-67.
- Cacace AM, Michaud NR, Therrien M, Mathes K, Copeland T, Rubin GM and Morrison DK (1999). **Identification of constitutive and ras-inducible phosphorylation sites of KSR: implications for 14-3-3 binding, mitogen-activated protein kinase binding, and KSR overexpression.** *Mol Cell Biol*;19(1):229-40. *PMCID: PMC83881*.
- Caloca MJ, Zugaza JL and Bustelo XR (2003). **Exchange factors of the RasGRP family mediate Ras activation in the Golgi.** *J Biol Chem*;278(35):33465-73.
- Canagarajah BJ, Khokhlatchev A, Cobb MH and Goldsmith EJ (1997). **Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation.** *Cell*;90(5):859-69.
- Carraway KL and Cantley LC (1994). **A new acquaintance for erbB3 and erbB4: a role for receptor heterodimerization in growth signaling.** *Cell*;78(1):5-8.
- Carraway KL, Sliwkowski MX, Akita R, Platko JV, Guy PM, Nuijens A, Diamonti AJ, Vandlen RL, Cantley LC and Cerione RA (1994). **The erbB3 gene product is a receptor for heregulin.** *J Biol Chem*;269(19):14303-6.
- Casar B, Arozarena I, Sanz-Moreno V, Pinto A, Agudo-Ibanez L, Marais R, Lewis RE, Berciano MT and Crespo P (2009). **Ras subcellular localization defines extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 substrate specificity through distinct utilization of scaffold proteins.** *Mol Cell Biol*;29(5):1338-53. *PMCID: 2643815*.
- Casar B, Pinto A and Crespo P (2008). **Essential role of ERK dimers in the activation of cytoplasmic but not nuclear substrates by ERK-scaffold complexes.** *Mol Cell*;31(5):708-21.
- Casar B, Sanz-Moreno V, Yazicioglu MN, Rodríguez J, Berciano MT, Lafarga M, Cobb MH and Crespo P (2007). **Mxi2 promotes stimulus-independent ERK nuclear translocation.** *EMBO J*;26(3):635-46. *PMCID: PMC1794381*.
- Casey PJ (1995). **Mechanisms of protein prenylation and role in G protein function.** *Biochem Soc Trans*;23(1):161-6.
- Castellano E, De Las Rivas J, Guerrero C and Santos E (2007). **Transcriptional networks of knockout cell lines identify functional specificities of H-Ras and N-Ras: significant involvement of N-Ras in biotic and defense responses.** *Oncogene*;26(6):917-33.
- Caunt CJ, Finch AR, Sedgley KR and McArdle CA (2006). **Seven-transmembrane receptor signalling and ERK compartmentalization.** *Trends Endocrinol Metab*;17(7):276-83.
- Cavigelli M, Dolfi F, Claret FX and Karin M (1995). **Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation.** *EMBO J*;14(23):5957-64. *PMCID: PMC394715*.

- Chardin P, Camonis JH, Gale NW, van Aelst L, Schlessinger J, Wigler MH and Bar-Sagi D (1993). **Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2.** *Science*;260(5112):1338-43.
- Chen CH, Wang WJ, Kuo JC, Tsai HC, Lin JR, Chang ZF and Chen RH (2005). **Bidirectional signals transduced by DAPK-ERK interaction promote the apoptotic effect of DAPK.** *EMBO J*;24(2):294-304. *PMCID: 545805.*
- Chen RH, Juo PC, Curran T and Blenis J (1996). **Phosphorylation of c-Fos at the C-terminus enhances its transforming activity.** *Oncogene*;12(7):1493-502.
- Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C and Cobb MH (2001). **MAP kinases.** *Chem Rev*;101(8):2449-76.
- Chen Z, Otto JC, Bergo MO, Young SG and Casey PJ (2000). **The C-terminal polylysine region and methylation of K-Ras are critical for the interaction between K-Ras and microtubules.** *J Biol Chem*;275(52):41251-7.
- Chiu VK, Bivona T, Hach A, Sajous JB, Silletti J, Wiener H, Johnson RL, 2nd, Cox AD and Philips MR (2002a). **Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi.** *Nat Cell Biol*;4(5):343-50.
- Chiu VK, Bivona T, Hach A, Sajous JB, Silletti J, Wiener H, Johnson RL, Cox AD and Philips MR (2002b). **Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi.** *Nat Cell Biol*;4(5):343-50.
- Choi KY, Satterberg B, Lyons DM and Elion EA (1994). **Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*.** *Cell*;78(3):499-512.
- Chu Y, Solski PA, Khosravi-Far R, Der CJ and Kelly K (1996). **The mitogen-activated protein kinase phosphatases PAC1, MKP-1, and MKP-2 have unique substrate specificities and reduced activity in vivo toward the ERK2 sevenmaker mutation.** *J Biol Chem*;271(11):6497-501.
- Chuderland D and Seger R (2005). **Protein-protein interactions in the regulation of the extracellular signal-regulated kinase.** *Mol Biotechnol*;29(1):57-74.
- Clark A, Dean J, Tudor C and Saklatvala J (2009). **Post-transcriptional gene regulation by MAP kinases via AU-rich elements.** *Front Biosci*;14:847-71.
- Clark-Lewis I, Sanghera JS and Pelech SL (1991). **Definition of a consensus sequence for peptide substrate recognition by p44mpk, the meiosis-activated myelin basic protein kinase.** *J Biol Chem*;266(23):15180-4.
- Clyde-Smith J, Silins G, Gartside M, Grimmond S, Etheridge M, Apolloni A, Hayward N and Hancock JF (2000). **Characterization of RasGRP2, a plasma membrane-targeted, dual specificity Ras/Rap exchange factor.** *J Biol Chem*;275(41):32260-7.
- Cobb MH (1999). **MAP kinase pathways.** *Prog Biophys Mol Biol*;71(3-4):479-500.

- Corbalan-Garcia S, Yang SS, Degenhardt KR 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(10):5674-82. PMID: PMC231567.
- Coulombe P and Meloche S (2007). **Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions.** *Biochim Biophys Acta*;1773(8):1376-87.
- Coulombe P, Rodier G, Pelletier S, Pellerin J and Meloche S (2003). **Rapid turnover of extracellular signal-regulated kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of mitogen-activated protein kinase regulation during cellular differentiation.** *Mol Cell Biol*;23(13):4542-58. PMID: PMC164847.
- Cuadrado A and Nebreda AR (2010). **Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling.** *Biochem J*;429(3):403-17.
- Dai Q, Choy E, Chiu V, Romano J, Slivka SR, Steitz SA, Michaelis S and Philips MR (1998). **Mammalian prenylcysteine carboxyl methyltransferase is in the endoplasmic reticulum.** *J Biol Chem*;273(24):15030-4.
- Daub H, Weiss FU, Wallasch C and Ullrich A (1996). **Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors.** *Nature*;379(6565):557-60.
- Davis RJ (1995). **Transcriptional regulation by MAP kinases.** *Mol Reprod Dev*;42(4):459-67.
- Deak M, Clifton AD, Lucocq LM and Alessi DR (1998). **Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB.** *EMBO J*;17(15):4426-41. PMID: PMC1170775.
- Déléris P, Rousseau J, Coulombe P, Rodier G, Tanguay PL and Meloche S (2008). **Activation loop phosphorylation of the atypical MAP kinases ERK3 and ERK4 is required for binding, activation and cytoplasmic relocalization of MK5.** *J Cell Physiol*;217(3):778-88.
- Denouel-Galy A, Douville EM, Warne PH, Papin C, Laugier D, Calothy G, Downward J and Eychène A (1998). **Murine Ksr interacts with MEK and inhibits Ras-induced transformation.** *Curr Biol*;8(1):46-55.
- Dérjard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ and Davis RJ (1995). **Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms.** *Science*;267(5198):682-5.
- Dhillon AS, Hagan S, Rath O and Kolch W (2007). **MAP kinase signalling pathways in cancer.** *Oncogene*;26(22):3279-90.
- Dougherty MK, Müller J, Ritt DA, Zhou M, Zhou XZ, Copeland TD, Conrads TP, Veenstra TD, Lu KP and Morrison DK (2005). **Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation.** *Mol Cell*;17(2):215-24.

- Drosten M, Dhawahir A, Sum EY, Urosevic J, Lechuga CG, Esteban LM, Castellano E, Guerra C, Santos E and Barbacid M (2010). **Genetic analysis of Ras signalling pathways in cell proliferation, migration and survival.** *EMBO J*;29(6):1091-104. PMID: 2845279.
- Duncan JA and Gilman AG (1998). **A cytoplasmic acyl-protein thioesterase that removes palmitate from G protein alpha subunits and p21(RAS).** *J Biol Chem*;273(25):15830-7.
- Eblen ST, Catling AD, Assanah MC and Weber MJ (2001). **Biochemical and biological functions of the N-terminal, noncatalytic domain of extracellular signal-regulated kinase 2.** *Mol Cell Biol*;21(1):249-59. PMID: PMC88798.
- Eferl R and Wagner EF (2003). **AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis.** *Nat Rev Cancer*;3(11):859-68.
- Enslin H and Davis RJ (2001). **Regulation of MAP kinases by docking domains.** *Biol Cell*;93(1-2):5-14.
- Esteban LM, Vicario-Abejón C, Fernández-Salguero P, Fernández-Medarde A, Swaminathan N, Yienger K, Lopez E, Malumbres M, McKay R, Ward JM, 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(5):1444-52. PMID: PMC86690.
- Eungdamrong NJ and Iyengar R (2007). **Compartment-specific feedback loop and regulated trafficking can result in sustained activation of Ras at the Golgi.** *Biophys J*;92(3):808-15. PMID: PMC1779960.
- Fambrough D, McClure K, Kazlauskas A and Lander ES (1999). **Diverse signaling pathways activated by growth factor receptors induce broadly overlapping, rather than independent, sets of genes.** *Cell*;97(6):727-41.
- Fantz DA, Jacobs D, Glossip D and Kornfeld K (2001). **Docking sites on substrate proteins direct extracellular signal-regulated kinase to phosphorylate specific residues.** *J Biol Chem*;276(29):27256-65.
- Farooq A, Plotnikova O, Chaturvedi G, Yan S, Zeng L, Zhang Q and Zhou MM (2003). **Solution structure of the MAPK phosphatase PAC-1 catalytic domain. Insights into substrate-induced enzymatic activation of MKP.** *Structure*;11(2):155-64.
- Feig LA and Cooper GM (1988). **Inhibition of NIH 3T3 cell proliferation by a mutant ras protein with preferential affinity for GDP.** *Mol Cell Biol*;8(8):3235-43. PMID: 363555.
- Ferrell JE, Jr. and Bhatt RR (1997). **Mechanistic studies of the dual phosphorylation of mitogen-activated protein kinase.** *J Biol Chem*;272(30):19008-16.
- Fleming Y, Armstrong CG, Morrice N, Paterson A, Goedert M and Cohen P (2000). **Synergistic activation of stress-activated protein kinase 1/c-Jun N-terminal kinase (SAPK1/JNK) isoforms by mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) and MKK7.** *Biochem J*;352 Pt 1:145-54. PMID: PMC1221441.

- Forbes SA, Tang G, Bindal N, Bamford S, Dawson E, Cole C, Kok CY, Jia M, Ewing R, Menzies A, Teague JW, Stratton MR and Futreal PA (2010). **COSMIC (the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer): a resource to investigate acquired mutations in human cancer.** *Nucleic Acids Res*;38(Database issue):D652-7. *PMCID: PMC2808858.*
- Fotiadou PP, Takahashi C, Rajabi HN and Ewen ME (2007). **Wild-type NRas and KRas perform distinct functions during transformation.** *Mol Cell Biol*;27(19):6742-55. *PMCID: PMC2099215.*
- Frangioni JV, Beahm PH, Shifrin V, Jost CA and Neel BG (1992). **The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence.** *Cell*;68(3):545-60.
- Frost JA, Steen H, Shapiro P, Lewis T, Ahn N, Shaw PE and Cobb MH (1997). **Cross-cascade activation of ERKs and ternary complex factors by Rho family proteins.** *EMBO J*;16(21):6426-38. *PMCID: 1170249.*
- Fukuda M, Gotoh I, Adachi M, Gotoh Y and Nishida E (1997). **A novel regulatory mechanism in the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade. Role of nuclear export signal of MAP kinase kinase.** *J Biol Chem*;272(51):32642-8.
- Galanis A, Yang SH and Sharrocks AD (2001). **Selective targeting of MAPKs to the ETS domain transcription factor SAP-1.** *J Biol Chem*;276(2):965-73.
- Galli S, Jahn O, Hitt R, Hesse D, Opitz L, Plessmann U, Urlaub H, Poderoso JJ, Jares-Erijman EA and Jovin TM (2009). **A new paradigm for MAPK: structural interactions of hERK1 with mitochondria in HeLa cells.** *PLoS One*;4(10):e7541. *PMCID: 2760858.*
- García JI, Zalba G, Detera-Wadleigh SD and de Miguel C (1996). **Isolation of a cDNA encoding the rat MAP-kinase homolog of human p63mapk.** *Mamm Genome*;7(11):810-4.
- Gervais M, Dugourd C, Muller L, Ardidie C, Canton B, Loviconi L, Corvol P, Chneiweiss H and Monnot C (2006). **Akt down-regulates ERK1/2 nuclear localization and angiotensin II-induced cell proliferation through PEA-15.** *Mol Biol Cell*;17(9):3940-51. *PMCID: 1593169.*
- Gloerich M and Bos JL (2010). **Epac: defining a new mechanism for cAMP action.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol*;50:355-75.
- Gomez GA and Daniotti JL (2007). **Electrical properties of plasma membrane modulate subcellular distribution of K-Ras.** *FEBS J*;274(9):2210-28.
- Gonzalez FA, Raden DL, Rigby MR and Davis RJ (1992). **Heterogeneous expression of four MAP kinase isoforms in human tissues.** *FEBS Lett*;304(2-3):170-8.
- Graus-Porta D, Beerli RR and Hynes NE (1995). **Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling.** *Mol Cell Biol*;15(3):1182-91. *PMCID: PMC230341.*

- Grewal SS, York RD and Stork PJ (1999). **Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons.** *Curr Opin Neurobiol*;9(5):544-53.
- Grewal T, Evans R, Rentero C, Tebar F, Cubells L, de Diego I, Kirchhoff MF, Hughes WE, Heeren J, Rye KA, Rinninger F, Daly RJ, Pol A and Enrich C (2005). **Annexin A6 stimulates the membrane recruitment of p120GAP to modulate Ras and Raf-1 activity.** *Oncogene*;24(38):5809-20.
- Gudermann T, Schöneberg T and Schultz G (1997). **Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors.** *Annu Rev Neurosci*;20:399-427.
- Guerra C, Mijimolle N, Dhawahir A, Dubus P, Barradas M, Serrano M, Campuzano V and Barbacid M (2003). **Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context.** *Cancer Cell*;4(2):111-20.
- Han J, Lee JD, Bibbs L and Ulevitch RJ (1994). **A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells.** *Science*;265(5173):808-11.
- Hanahan D and Weinberg RA (2000). **The hallmarks of cancer.** *Cell*;100(1):57-70.
- Hancock JF, Paterson H and Marshall CJ (1990). **A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane.** *Cell*;63(1):133-9.
- Hanks SK and Hunter T (1995). **Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification.** *FASEB J*;9(8):576-96.
- Hatakeyama M, Kimura S, Naka T, Kawasaki T, Yumoto N, Ichikawa M, Kim JH, Saito K, Saeki M, Shirouzu M, Yokoyama S and Konagaya A (2003). **A computational model on the modulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and Akt pathways in heregulin-induced ErbB signalling.** *Biochem J*;373(Pt 2):451-63. *PMCID: 1223496.*
- Hazan-Halevy I and Levy R (2000). **Activation of cytosolic phospholipase A2 by opsonized zymosan in human neutrophils requires both ERK and p38 MAP-kinase.** *Adv Exp Med Biol*;479:115-23.
- Hendriks BS, Opresko LK, Wiley HS and Lauffenburger D (2003). **Quantitative analysis of HER2-mediated effects on HER2 and epidermal growth factor receptor endocytosis: distribution of homo- and heterodimers depends on relative HER2 levels.** *J Biol Chem*;278(26):23343-51.
- Henrich LM, Smith JA, Kitt D, Errington TM, Nguyen B, Traish AM and Lannigan DA (2003). **Extracellular signal-regulated kinase 7, a regulator of hormone-dependent estrogen receptor destruction.** *Mol Cell Biol*;23(17):5979-88. *PMCID: PMC180983.*
- Holt KH, Waters SB, Okada S, Yamauchi K, Decker SJ, Saltiel AR, Motto DG, Koretzky GA and Pessin JE (1996). **Epidermal growth factor receptor targeting prevents uncoupling of the Grb2-SOS complex.** *J Biol Chem*;271(14):8300-6.

- Howe LR, Leever SJ, Gómez N, Nakielny S, Cohen P and Marshall CJ (1992). **Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf.** *Cell*;71(2):335-42.
- Hu S, Xie Z, Onishi A, Yu X, Jiang L, Lin J, Rho HS, Woodard C, Wang H, Jeong JS, Long S, He X, Wade H, Blackshaw S, Qian J and Zhu H (2009). **Profiling the human protein-DNA interactome reveals ERK2 as a transcriptional repressor of interferon signaling.** *Cell*;139(3):610-22. *PMCID: PMC2774939*.
- Huang CY and Ferrell JE, Jr. (1996). **Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade.** *Proc Natl Acad Sci U S A*;93(19):10078-83. *PMCID: 38339*.
- 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(26):2951-6.
- Ishibe S, Joly D, Liu ZX and Cantley LG (2004). **Paxillin serves as an ERK-regulated scaffold for coordinating FAK and Rac activation in epithelial morphogenesis.** *Mol Cell*;16(2):257-67.
- Ishibe S, Joly D, Zhu X and Cantley LG (2003). **Phosphorylation-dependent paxillin-ERK association mediates hepatocyte growth factor-stimulated epithelial morphogenesis.** *Mol Cell*;12(5):1275-85.
- Jaaro H, Rubinfeld H, Hanoch T and Seger R (1997). **Nuclear translocation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1) in response to mitogenic stimulation.** *Proc Natl Acad Sci U S A*;94(8):3742-7. *PMCID: 20511*.
- Jacobs D, Glossip D, Xing H, Muslin AJ and Kornfeld K (1999). **Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase.** *Genes Dev*;13(2):163-75. *PMCID: PMC316390*.
- James GL, Goldstein JL and Brown MS (1995). **Polylysine and CVIM sequences of K-RasB dictate specificity of prenylation and confer resistance to benzodiazepine peptidomimetic in vitro.** *J Biol Chem*;270(11):6221-6.
- Jaumot M, Yan J, Clyde-Smith J, Sluimer J and Hancock JF (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(1):272-8.
- Johnson GL, Dohlman HG and Graves LM (2005). **MAPK kinase kinases (MKKKs) as a target class for small-molecule inhibition to modulate signaling networks and gene expression.** *Curr Opin Chem Biol*;9(3):325-31.
- Johnson GL and Lapadat R (2002). **Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases.** *Science*;298(5600):1911-2.
- Jones MK and Jackson JH (1998). **Ras-GRF activates Ha-Ras, but not N-Ras or K-Ras 4B, protein in vivo.** *J Biol Chem*;273(3):1782-7.

- Jordan JD, Landau EM and Iyengar R (2000). **Signaling networks: the origins of cellular multitasking.** *Cell*;103(2):193-200.
- Julien C, Coulombe P and Meloche S (2003). **Nuclear export of ERK3 by a CRM1-dependent mechanism regulates its inhibitory action on cell cycle progression.** *J Biol Chem*;278(43):42615-24.
- Kamakura S, Moriguchi T and Nishida E (1999). **Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus.** *J Biol Chem*;274(37):26563-71.
- Kanei-Ishii C, Ninomiya-Tsuji J, Tanikawa J, Nomura T, Ishitani T, Kishida S, Kokura K, Kurahashi T, Ichikawa-Iwata E, Kim Y, Matsumoto K and Ishii S (2004). **Wnt-1 signal induces phosphorylation and degradation of c-Myb protein via TAK1, HIPK2, and NLK.** *Genes Dev*;18(7):816-29. *PMCID: PMC387421*.
- Karnoub AE and Weinberg RA (2008). **Ras oncogenes: split personalities.** *Nat Rev Mol Cell Biol*;9(7):517-31.
- Karunakaran D, Tzahar E, Beerli RR, Chen X, Graus-Porta D, Ratzkin BJ, Seger R, Hynes NE and Yarden Y (1996). **ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer.** *EMBO J*;15(2):254-64. *PMCID: PMC449940*.
- Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE and Graybiel AM (1998). **A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1.** *Science*;282(5397):2275-9.
- Khokhlatchev AV, Canagarajah B, Wilsbacher J, Robinson M, Atkinson M, Goldsmith E and Cobb MH (1998). **Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation.** *Cell*;93(4):605-15.
- Kim E, Ambroziak P, Otto JC, Taylor B, Ashby M, Shannon K, Casey PJ and Young SG (1999). **Disruption of the mouse Rce1 gene results in defective Ras processing and mislocalization of Ras within cells.** *J Biol Chem*;274(13):8383-90.
- Kim EK and Choi EJ (2010). **Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases.** *Biochim Biophys Acta*;1802(4):396-405.
- Kleevernic IV, Stafford MJ, Morrice N, Peggie M, Morton S and Cohen P (2006). **Characterization of the reversible phosphorylation and activation of ERK8.** *Biochem J*;394(Pt 1):365-73. *PMCID: PMC1386035*.
- 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(10):1151-9.

- Kojima H, Sasaki T, Ishitani T, Iemura S, Zhao H, Kaneko S, Kunimoto H, Natsume T, Matsumoto K and Nakajima K (2005). **STAT3 regulates Nemo-like kinase by mediating its interaction with IL-6-stimulated TGFbeta-activated kinase 1 for STAT3 Ser-727 phosphorylation.** *Proc Natl Acad Sci U S A*;102(12):4524-9. *PMCID: PMC555521.*
- Kolch W (2000). **Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions.** *Biochem J*;351 Pt 2:289-305. *PMCID: PMC1221363.*
- Kolch W (2005). **Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors.** *Nat Rev Mol Cell Biol*;6(11):827-37.
- Kolch W, Calder M and Gilbert D (2005). **When kinases meet mathematics: the systems biology of MAPK signalling.** *FEBS Lett*;579(8):1891-5.
- Kondoh K and Nishida E (2007). **Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases.** *Biochim Biophys Acta*;1773(8):1227-37.
- Kyriakis JM, App H, Zhang XF, Banerjee P, Brautigan DL, Rapp UR and Avruch J (1992). **Raf-1 activates MAP kinase-kinase.** *Nature*;358(6385):417-21.
- Kyriakis JM and Avruch J (2001). **Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation.** *Physiol Rev*;81(2):807-69.
- Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR and Landvatter SW (1994). **A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis.** *Nature*;372(6508):739-46.
- Lee JD, Ulevitch RJ and Han J (1995). **Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase.** *Biochem Biophys Res Commun*;213(2):715-24.
- Lee T, Hoofnagle AN, Kabuyama Y, Stroud J, Min X, Goldsmith EJ, Chen L, Resing KA and Ahn NG (2004). **Docking motif interactions in MAP kinases revealed by hydrogen exchange mass spectrometry.** *Mol Cell*;14(1):43-55.
- Lefkowitz RJ and Shenoy SK (2005). **Transduction of receptor signals by beta-arrestins.** *Science*;308(5721):512-7.
- Lefloch R, Pouyssegur J and Lenormand P (2008). **Single and combined silencing of ERK1 and ERK2 reveals their positive contribution to growth signaling depending on their expression levels.** *Mol Cell Biol*;28(1):511-27. *PMCID: 2223286.*
- Lemmon MA and Schlessinger J (2010). **Cell signaling by receptor tyrosine kinases.** *Cell*;141(7):1117-34. *PMCID: PMC2914105.*
- Leon J, Guerrero I and Pellicer A (1987). **Differential expression of the ras gene family in mice.** *Mol Cell Biol*;7(4):1535-40. *PMCID: PMC365242.*

- Levchenko A, Bruck J and Sternberg PW (2000). **Scaffold proteins may biphasically affect the levels of mitogen-activated protein kinase signaling and reduce its threshold properties.** *Proc Natl Acad Sci U S A*;97(11):5818-23. *PMCID: 18517.*
- Liang CC and Chen HC (2001). **Sustained activation of extracellular signal-regulated kinase stimulated by hepatocyte growth factor leads to integrin alpha 2 expression that is involved in cell scattering.** *J Biol Chem*;276(24):21146-52.
- Lidke DS, Huang F, Post JN, Rieger B, Wilsbacher J, Thomas JL, Pouyssegur J, Jovin TM and Lenormand P (2010). **ERK nuclear translocation is dimerization-independent but controlled by the rate of phosphorylation.** *J Biol Chem*;285(5):3092-102. *PMCID: PMC2823437.*
- Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A and Davis RJ (1993). **cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase.** *Cell*;72(2):269-78.
- Lin YW, Chuang SM and Yang JL (2003). **ERK1/2 achieves sustained activation by stimulating MAPK phosphatase-1 degradation via the ubiquitin-proteasome pathway.** *J Biol Chem*;278(24):21534-41.
- Lorenzen JA, Baker SE, Denhez F, Melnick MB, Brower DL and Perkins LA (2001). **Nuclear import of activated D-ERK by DIM-7, an importin family member encoded by the gene moleskin.** *Development*;128(8):1403-14.
- Lowenstein EJ, Daly RJ, Batzer AG, Li W, Margolis B, Lammers R, Ullrich A, Skolnik EY, Bar-Sagi D and Schlessinger J (1992). **The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling.** *Cell*;70(3):431-42.
- Luttrell LM, Della Rocca GJ, van Biesen T, Luttrell DK and Lefkowitz RJ (1997). **Gbetagamma subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation.** *J Biol Chem*;272(7):4637-44.
- Luttrell LM, van Biesen T, Hawes BE, Koch WJ, Touhara K and Lefkowitz RJ (1995). **G beta gamma subunits mediate mitogen-activated protein kinase activation by the tyrosine kinase insulin-like growth factor 1 receptor.** *J Biol Chem*;270(28):16495-8.
- Ma J and Karplus M (1997). **Molecular switch in signal transduction: reaction paths of the conformational changes in ras p21.** *Proc Natl Acad Sci U S A*;94(22):11905-10. *PMCID: PMC23651.*
- Malumbres M and Barbacid M (2003). **RAS oncogenes: the first 30 years.** *Nat Rev Cancer*;3(6):459-65.
- Malumbres M and Pellicer A (1998). **RAS pathways to cell cycle control and cell transformation.** *Front Biosci*;3:d887-912.

- Maly IV, Wiley HS and Lauffenburger DA (2004). **Self-organization of polarized cell signaling via autocrine circuits: computational model analysis.** *Biophys J*;86(1 Pt 1):10-22. PMID: 1303773.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T and Sudarsanam S (2002). **The protein kinase complement of the human genome.** *Science*;298(5600):1912-34.
- Marais R, Wynne J and Treisman R (1993). **The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain.** *Cell*;73(2):381-93.
- Markevich NI, Moehren G, Demin OV, Kiyatkin A, Hoek JB and Kholodenko BN (2004). **Signal processing at the Ras circuit: what shapes Ras activation patterns?** *Syst Biol (Stevenage)*;1(1):104-13.
- Marshall CJ (1995). **Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation.** *Cell*;80(2):179-85.
- Martín-Blanco E (2000). **p38 MAPK signalling cascades: ancient roles and new functions.** *Bioessays*;22(7):637-45.
- Martinez-Salgado C, Fuentes-Calvo I, Garcia-Cenador B, Santos E and Lopez-Novoa JM (2006). **Involvement of H- and N-Ras isoforms in transforming growth factor-beta1-induced proliferation and in collagen and fibronectin synthesis.** *Exp Cell Res*;312(11):2093-106.
- Matallanas D, Arozarena I, Berciano MT, Aaronson DS, Pellicer A, Lafarga M and Crespo P (2003). **Differences on the inhibitory specificities of H-Ras, K-Ras, and N-Ras (N17) dominant negative mutants are related to their membrane microlocalization.** *J Biol Chem*;278(7):4572-81.
- Matallanas D, Sanz-Moreno V, Arozarena I, Calvo F, Agudo-Ibáñez L, Santos E, Berciano MT and Crespo P (2006). **Distinct utilization of effectors and biological outcomes resulting from site-specific Ras activation: Ras functions in lipid rafts and Golgi complex are dispensable for proliferation and transformation.** *Mol Cell Biol*;26(1):100-16. PMID: PMC1317613.
- Matsubayashi Y, Fukuda M and Nishida E (2001). **Evidence for existence of a nuclear pore complex-mediated, cytosol-independent pathway of nuclear translocation of ERK MAP kinase in permeabilized cells.** *J Biol Chem*;276(45):41755-60.
- Mazzucchelli C, Vantaggiato C, Ciamei A, Fasano S, Pakhotin P, Krezel W, Welzl H, Wolfer DP, Pagès G, Valverde O, Marowsky A, Porrazzo A, Orban PC, Maldonado R, Ehrengruber MU, Cestari V, Lipp HP, Chapman PF, Pouysségur J and Brambilla R (2002). **Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory.** *Neuron*;34(5):807-20.
- Mebratu Y and Tesfagzi Y (2009). **How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer?** *Cell Cycle*;8(8):1168-75. PMID: 2728430.

- Mitchell DA, Vasudevan A, Linder ME and Deschenes RJ (2006). **Protein palmitoylation by a family of DHHC protein S-acyltransferases.** *J Lipid Res*;47(6):1118-27.
- Miyata Y and Nishida E (1999). **Distantly related cousins of MAP kinase: biochemical properties and possible physiological functions.** *Biochem Biophys Res Commun*;266(2):291-5.
- 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(15):6442-6. *PMCID: PMC52101*.
- 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(6841):1065-8.
- Moelling K, Schad K, Bosse M, Zimmermann S and Schweneker M (2002). **Regulation of Raf-Akt Cross-talk.** *J Biol Chem*;277(34):31099-106.
- Mograbi B, Boccardi R, Bourget I, Busca R, Rochet N, Farahi-Far D, Juhel T and Rossi B (2001). **Glia cell line-derived neurotrophic factor-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase and Akt activities exert opposing effects on the ERK pathway: importance for the rescue of neuroectodermic cells.** *J Biol Chem*;276(48):45307-19.
- Moore CA, Milano SK and Benovic JL (2007). **Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins.** *Annu Rev Physiol*;69:451-82.
- Mor A, Campi G, Du G, Zheng Y, Foster DA, Dustin ML and Philips MR (2007). **The lymphocyte function-associated antigen-1 receptor costimulates plasma membrane Ras via phospholipase D2.** *Nat Cell Biol*;9(6):713-9.
- Morrison DK (2001). **KSR: a MAPK scaffold of the Ras pathway?** *J Cell Sci*;114(Pt 9):1609-12.
- Morrison DK and Davis RJ (2003). **Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals.** *Annu Rev Cell Dev Biol*;19:91-118.
- Morton S, Davis RJ, McLaren A and Cohen P (2003). **A reinvestigation of the multisite phosphorylation of the transcription factor c-Jun.** *EMBO J*;22(15):3876-86. *PMCID: PMC169061*.
- Muda M, Theodosiou A, Rodrigues N, Boschert U, Camps M, Gillieron C, Davies K, Ashworth A and Arkinstall S (1996). **The dual specificity phosphatases M3/6 and MKP-3 are highly selective for inactivation of distinct mitogen-activated protein kinases.** *J Biol Chem*;271(44):27205-8.
- Mulcahy LS, Smith MR and Stacey DW (1985). **Requirement for ras proto-oncogene function during serum-stimulated growth of NIH 3T3 cells.** *Nature*;313(5999):241-3.

- Müller J, Cacace AM, Lyons WE, McGill CB and Morrison DK (2000). **Identification of B-KSR1, a novel brain-specific isoform of KSR1 that functions in neuronal signaling.** *Mol Cell Biol*;20(15):5529-39. PMID: PMC86003.
- Murphy LO, MacKeigan JP and Blenis J (2004). **A network of immediate early gene products propagates subtle differences in mitogen-activated protein kinase signal amplitude and duration.** *Mol Cell Biol*;24(1):144-53. PMID: PMC303364.
- Muss HB, Thor AD, Berry DA, Kute T, Liu ET, Koerner F, Cirrincione CT, Budman DR, Wood WC, Barcos M and et al. (1994). **c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer.** *N Engl J Med*;330(18):1260-6.
- Mzhavia N, Yu S, Ikeda S, Chu TT, Goldberg I and Dansky HM (2008). **Neuronatin: a new inflammation gene expressed on the aortic endothelium of diabetic mice.** *Diabetes*;57(10):2774-83. PMID: 2551689.
- Nagashima T, Shimodaira H, Ide K, Nakakuki T, Tani Y, Takahashi K, Yumoto N and Hatakeyama M (2007). **Quantitative transcriptional control of ErbB receptor signaling undergoes graded to biphasic response for cell differentiation.** *J Biol Chem*;282(6):4045-56.
- Nebreda AR, Hill C, Gomez N, Cohen P and Hunt T (1993). **The protein kinase mos activates MAP kinase kinase in vitro and stimulates the MAP kinase pathway in mammalian somatic cells in vivo.** *FEBS Lett*;333(1-2):183-7.
- Nguyen TT, Scimeca JC, Filloux C, Peraldi P, Carpentier JL and Van Obberghen E (1993). **Co-regulation of the mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase 1, and the 90-kDa ribosomal S6 kinase in PC12 cells. Distinct effects of the neurotrophic factor, nerve growth factor, and the mitogenic factor, epidermal growth factor.** *J Biol Chem*;268(13):9803-10.
- Niv H, Gutman O, Kloog Y and Henis YI (2002). **Activated K-Ras and H-Ras display different interactions with saturable nonraft sites at the surface of live cells.** *J Cell Biol*;157(5):865-72. PMID: 2173426.
- Nordlund M, Gu X, Shipley MT and Ratner N (1993). **Neurofibromin is enriched in the endoplasmic reticulum of CNS neurons.** *J Neurosci*;13(4):1588-600.
- Ohba Y, Kurokawa K and Matsuda M (2003). **Mechanism of the spatio-temporal regulation of Ras and Rap1.** *EMBO J*;22(4):859-69. PMID: 145447.
- Olayioye MA, Neve RM, Lane HA and Hynes NE (2000). **The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer.** *EMBO J*;19(13):3159-67. PMID: PMC313958.
- Onken B, Wiener H, Philips MR and Chang EC (2006). **Compartmentalized signaling of Ras in fission yeast.** *Proc Natl Acad Sci U S A*;103(24):9045-50. PMID: 1482563.

- Orton RJ, Sturm OE, Vyshemirsky V, Calder M, Gilbert DR and Kolch W (2005). **Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway.** *Biochem J*;392(Pt 2):249-61. *PMCID: 1316260.*
- Otto JC, Kim E, Young SG and Casey PJ (1999). **Cloning and characterization of a mammalian prenyl protein-specific protease.** *J Biol Chem*;274(13):8379-82.
- Pagès G, Guérin S, Grall D, Bonino F, Smith A, Anjuere F, Auberger P and Pouyssegur J (1999). **Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice.** *Science*;286(5443):1374-7.
- Payne DM, Rossomando AJ, Martino P, Erickson AK, Her JH, Shabanowitz J, Hunt DF, Weber MJ and Sturgill TW (1991). **Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase).** *EMBO J*;10(4):885-92. *PMCID: PMC452730.*
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K and Cobb MH (2001). **Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions.** *Endocr Rev*;22(2):153-83.
- Peraldi P, Scimeca JC, Filloux C and Van Obberghen E (1993). **Regulation of extracellular signal-regulated protein kinase-1 (ERK-1; pp44/mitogen-activated protein kinase) by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells: implication of ERK1 inhibitory activities.** *Endocrinology*;132(6):2578-85.
- Pérez de Castro I, Diaz R, Malumbres M, Hernández MI, Jagirdar J, Jiménez M, Ahn D and Pellicer A (2003). **Mice deficient for N-ras: impaired antiviral immune response and T-cell function.** *Cancer Res*;63(7):1615-22.
- Plowman SJ, Williamson DJ, O'Sullivan MJ, Doig J, Ritchie AM, Harrison DJ, Melton DW, Arends MJ, Hooper ML and Patek CE (2003). **While K-ras is essential for mouse development, expression of the K-ras 4A splice variant is dispensable.** *Mol Cell Biol*;23(24):9245-50. *PMCID: PMC309700.*
- Prior IA and Hancock JF (2001). **Compartmentalization of Ras proteins.** *J Cell Sci*;114(Pt 9):1603-8.
- Prior IA, Harding A, Yan J, Sluimer J, Parton RG and Hancock JF (2001). **GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity.** *Nat Cell Biol*;3(4):368-75.
- Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, Oprea TI, Sklar LA and Hathaway HJ (2008). **Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30.** *Annu Rev Physiol*;70:165-90.
- Pulido R, Zúñiga A and Ullrich A (1998). **PTP-SL and STEP protein tyrosine phosphatases regulate the activation of the extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 by association through a kinase interaction motif.** *EMBO J*;17(24):7337-50. *PMCID: PMC1171079.*

- Radeff-Huang J, Seasholtz TM, Matteo RG and Brown JH (2004). **G protein mediated signaling pathways in lysophospholipid induced cell proliferation and survival.** *J Cell Biochem*;92(5):949-66.
- Raingaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, Dérijard B and Davis RJ (1996). **MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway.** *Mol Cell Biol*;16(3):1247-55. *PMCID: PMC231107*.
- Raman M, Chen W and Cobb MH (2007). **Differential regulation and properties of MAPKs.** *Oncogene*;26(22):3100-12.
- Raman M and Cobb MH (2003). **MAP kinase modules: many roads home.** *Curr Biol*;13(22):R886-8.
- Ramos JW (2008). **The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells.** *Int J Biochem Cell Biol*;40(12):2707-19.
- Raviv Z, Kalie E and Seger R (2004). **MEK5 and ERK5 are localized in the nuclei of resting as well as stimulated cells, while MEKK2 translocates from the cytosol to the nucleus upon stimulation.** *J Cell Sci*;117(Pt 9):1773-84.
- Ray LB and Sturgill TW (1988). **Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo.** *Proc Natl Acad Sci U S A*;85(11):3753-7. *PMCID: PMC280296*.
- Ren JG, Li Z and Sacks DB (2007). **IQGAP1 modulates activation of B-Raf.** *Proc Natl Acad Sci U S A*;104(25):10465-9. *PMCID: PMC1965536*.
- Resat H, Ewald JA, Dixon DA and Wiley HS (2003). **An integrated model of epidermal growth factor receptor trafficking and signal transduction.** *Biophys J*;85(2):730-43. *PMCID: 1303198*.
- Reszka AA, Seger R, Diltz CD, Krebs EG and Fischer EH (1995). **Association of mitogen-activated protein kinase with the microtubule cytoskeleton.** *Proc Natl Acad Sci U S A*;92(19):8881-5. *PMCID: PMC41071*.
- Robbins DJ, Zhen E, Cheng M, Xu S, Vanderbilt CA, Ebert D, Garcia C, Dang A and Cobb MH (1993). **Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1, 2, and 3.** *J Am Soc Nephrol*;4(5):1104-10.
- Roberts PJ and Der CJ (2007). **Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer.** *Oncogene*;26(22):3291-310.
- Rossomando AJ, Payne DM, Weber MJ and Sturgill TW (1989). **Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase.** *Proc Natl Acad Sci U S A*;86(18):6940-3. *PMCID: PMC297966*.

- Roudebush M, Slabe T, Sundaram V, Hoppel CL, Golubic M and Stacey DW (1997). **Neurofibromin colocalizes with mitochondria in cultured cells.** *Exp Cell Res*;236(1):161-72.
- Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Hunt T and Nebreda AR (1994). **A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins.** *Cell*;78(6):1027-37.
- Roy M, Li Z and Sacks DB (2004). **IQGAP1 binds ERK2 and modulates its activity.** *J Biol Chem*;279(17):17329-37.
- Roy M, Li Z and Sacks DB (2005). **IQGAP1 is a scaffold for mitogen-activated protein kinase signaling.** *Mol Cell Biol*;25(18):7940-52. *PMCID: PMC1234344.*
- Roy S, Luetterforst R, Harding A, Apolloni A, Etheridge M, Stang E, Rolls B, Hancock JF and Parton RG (1999). **Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains.** *Nat Cell Biol*;1(2):98-105.
- Roy S, Wyse B and Hancock JF (2002). **H-Ras signaling and K-Ras signaling are differentially dependent on endocytosis.** *Mol Cell Biol*;22(14):5128-40. *PMCID: 139790.*
- Ruan SQ, Wang SW, Wang ZH and Zhang SZ (2012). **Regulation of HRG-beta1-induced proliferation, migration and invasion of MCF-7 cells by upregulation of GPR30 expression.** *Mol Med Report*;6(1):131-8.
- Rubinfeld H, Hanoch T and Seger R (1999). **Identification of a cytoplasmic-retention sequence in ERK2.** *J Biol Chem*;274(43):30349-52.
- Rubinfeld H and Seger R (2005). **The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling.** *Mol Biotechnol*;31(2):151-74.
- Saba-El-Leil MK, Vella FD, Vernay B, Voisin L, Chen L, Labrecque N, Ang SL and Meloche S (2003). **An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development.** *EMBO Rep*;4(10):964-8. *PMCID: PMC1326397.*
- Salmeron A, Ahmad TB, Carlile GW, Pappin D, Narsimhan RP and Ley SC (1996). **Activation of MEK-1 and SEK-1 by Tpl-2 proto-oncoprotein, a novel MAP kinase kinase kinase.** *EMBO J*;15(4):817-26. *PMCID: PMC450280.*
- Saxena M, Williams S, Gilman J and Mustelin T (1998). **Negative regulation of T cell antigen receptor signal transduction by hematopoietic tyrosine phosphatase (HePTP).** *J Biol Chem*;273(25):15340-4.
- Schaeffer HJ, Catling AD, Eblen ST, Collier LS, Krauss A and Weber MJ (1998). **MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade.** *Science*;281(5383):1668-71.

- Schoeberl B, Eichler-Jonsson C, Gilles ED and Muller G (2002). **Computational modeling of the dynamics of the MAP kinase cascade activated by surface and internalized EGF receptors.** *Nat Biotechnol*;20(4):370-5.
- Schönwasser DC, Marais RM, Marshall CJ and Parker PJ (1998). **Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isoforms.** *Mol Cell Biol*;18(2):790-8. PMID: PMC108790.
- Seger R and Krebs EG (1995). **The MAPK signaling cascade.** *FASEB J*;9(9):726-35.
- Sharma SV (1998). **Rapid recruitment of p120RasGAP and its associated protein, p190RhoGAP, to the cytoskeleton during integrin mediated cell-substrate interaction.** *Oncogene*;17(3):271-81.
- Sharrocks AD, Yang SH and Galanis A (2000a). **Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases.** *Trends Biochem Sci*;25(9):448-53.
- Sharrocks AD, Yang SH and Galanis A (2000b). **Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases.** *Trends Biochem Sci*;25(9):448-53.
- Shaul YD and Seger R (2006). **ERK1c regulates Golgi fragmentation during mitosis.** *J Cell Biol*;172(6):885-97. PMID: 2063732.
- Shvartsman SY, Hagan MP, Yacoub A, Dent P, Wiley HS and Lauffenburger DA (2002). **Autocrine loops with positive feedback enable context-dependent cell signaling.** *Am J Physiol Cell Physiol*;282(3):C545-59.
- Slack-Davis JK, Eblen ST, Zecevic M, Boerner SA, Tarcsafalvi A, Diaz HB, Marshall MS, Weber MJ, Parsons JT and Catling AD (2003). **PAK1 phosphorylation of MEK1 regulates fibronectin-stimulated MAPK activation.** *J Cell Biol*;162(2):281-91. PMID: PMC2172784.
- Somsen OJ, Siderius M, Bauer FF, Snoep JL and Westerhoff HV (2002). **Selectivity in overlapping MAP kinase cascades.** *J Theor Biol*;218(3):343-54.
- Stork PJ and Schmitt JM (2002). **Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation.** *Trends Cell Biol*;12(6):258-66.
- Sturgill TW, Ray LB, Erikson E and Maller JL (1988). **Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II.** *Nature*;334(6184):715-8.
- Sudo T, Yagasaki Y, Hama H, Watanabe N and Osada H (2002). **Exip, a new alternative splicing variant of p38 alpha, can induce an earlier onset of apoptosis in HeLa cells.** *Biochem Biophys Res Commun*;291(4):838-43.

- Sun H, Charles CH, Lau LF and Tonks NK (1993). **MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo.** *Cell*;75(3):487-93.
- Swain PS and Siggia ED (2002). **The role of proofreading in signal transduction specificity.** *Biophys J*;82(6):2928-33. *PMCID: 1302080.*
- Swarthout JT, Lobo S, Farh L, Croke MR, Greentree WK, Deschenes RJ and Linder ME (2005). **DHHC9 and GCP16 constitute a human protein fatty acyltransferase with specificity for H- and N-Ras.** *J Biol Chem*;280(35):31141-8.
- Sweeney C, Fambrough D, Huard C, Diamonti AJ, Lander ES, Cantley LC and Carraway KL, 3rd (2001). **Growth factor-specific signaling pathway stimulation and gene expression mediated by ErbB receptors.** *J Biol Chem*;276(25):22685-98.
- Tanoue T, Maeda R, Adachi M and Nishida E (2001). **Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions.** *EMBO J*;20(3):466-79. *PMCID: PMC133461.*
- Taylor SS, Knighton DR, Zheng J, Sowadski JM, Gibbs CS and Zoller MJ (1993). **A template for the protein kinase family.** *Trends Biochem Sci*;18(3):84-9.
- Teis D, Wunderlich W and Huber LA (2002). **Localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction.** *Dev Cell*;3(6):803-14.
- Terry LJ, Shows EB and Wentz SR (2007). **Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport.** *Science*;318(5855):1412-6.
- Therrien M, Michaud NR, Rubin GM and Morrison DK (1996). **KSR modulates signal propagation within the MAPK cascade.** *Genes Dev*;10(21):2684-95.
- Thissen JA, Gross JM, Subramanian K, Meyer T and Casey PJ (1997). **Prenylation-dependent association of Ki-Ras with microtubules. Evidence for a role in subcellular trafficking.** *J Biol Chem*;272(48):30362-70.
- Thottassery JV, Sun Y, Westbrook L, Rentz SS, Manuvakhova M, Qu Z, Samuel S, Upshaw R, Cunningham A and Kern FG (2004). **Prolonged extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation during fibroblast growth factor 1- or heregulin beta1-induced antiestrogen-resistant growth of breast cancer cells is resistant to mitogen-activated protein/extracellular regulated kinase kinase inhibitors.** *Cancer Res*;64(13):4637-47.
- Tohgo A, Pierce KL, Choy EW, Lefkowitz RJ and Luttrell LM (2002). **beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation.** *J Biol Chem*;277(11):9429-36.

- Torii S, Kusakabe M, Yamamoto T, Maekawa M and Nishida E (2004). **Sef is a spatial regulator for Ras/MAP kinase signaling.** *Dev Cell*;7(1):33-44.
- Torii S, Yamamoto T, Tsuchiya Y and Nishida E (2006). **ERK MAP kinase in G cell cycle progression and cancer.** *Cancer Sci*;97(8):697-702.
- Traverse S, Seedorf K, Paterson H, Marshall CJ, Cohen P and Ullrich A (1994). **EGF triggers neuronal differentiation of PC12 cells that overexpress the EGF receptor.** *Curr Biol*;4(8):694-701.
- Trencia A, Perfetti A, Cassese A, Vigliotta G, Miele C, Oriente F, Santopietro S, Giacco F, Condorelli G, Formisano P and Beguinot F (2003). **Protein kinase B/Akt binds and phosphorylates PED/PEA-15, stabilizing its antiapoptotic action.** *Mol Cell Biol*;23(13):4511-21. *PMCID: 164852.*
- Tzahar E, Pinkas-Kramarski R, Moyer JD, Klapper LN, Alroy I, Levkowitz G, Shelly M, Henis S, Eisenstein M, Ratzkin BJ, Sela M, Andrews GC and Yarden Y (1997). **Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signaling network.** *EMBO J*;16(16):4938-50. *PMCID: PMC1170129.*
- Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunagaran D, Lavi S, Ratzkin BJ and Yarden Y (1996). **A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor.** *Mol Cell Biol*;16(10):5276-87. *PMCID: PMC231527.*
- Ullrich A and Schlessinger J (1990). **Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity.** *Cell*;61(2):203-12.
- Umanoff H, Edelmann 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(5):1709-13. *PMCID: PMC42589.*
- Ussar S and Voss T (2004). **MEK1 and MEK2, different regulators of the G1/S transition.** *J Biol Chem*;279(42):43861-9.
- van Corven EJ, Hordijk PL, Medema RH, Bos JL and Moolenaar WH (1993). **Pertussis toxin-sensitive activation of p21ras by G protein-coupled receptor agonists in fibroblasts.** *Proc Natl Acad Sci U S A*;90(4):1257-61. *PMCID: PMC45851.*
- van der Geer P, Wiley S, Lai VK, Olivier JP, Gish GD, Stephens R, Kaplan D, Shoelson S and Pawson T (1995). **A conserved amino-terminal Shc domain binds to phosphotyrosine motifs in activated receptors and phosphopeptides.** *Curr Biol*;5(4):404-12.
- Volmat V and Pouyssegur J (2001). **Spatiotemporal regulation of the p42/p44 MAPK pathway.** *Biol Cell*;93(1-2):71-9.

- von Kriegsheim A, Baiocchi D, Birtwistle M, Sumpton D, Bienvenut W, Morrice N, Yamada K, Lamond A, Kalna G, Orton R, Gilbert D and Kolch W (2009). **Cell fate decisions are specified by the dynamic ERK interactome.** *Nat Cell Biol*;11(12):1458-64.
- Walsh AB and Bar-Sagi D (2001). **Differential activation of the Rac pathway by Ha-Ras and K-Ras.** *J Biol Chem*;276(19):15609-15.
- Wang B, Zhang P and Wei Q (2008). **Recent progress on the structure of Ser/Thr protein phosphatases.** *Sci China C Life Sci*;51(6):487-94.
- Waskiewicz AJ, Flynn A, Proud CG and Cooper JA (1997). **Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2.** *EMBO J*;16(8):1909-20. *PMCID: PMC1169794.*
- Whitehurst AW, Robinson FL, Moore MS and Cobb MH (2004). **The death effector domain protein PEA-15 prevents nuclear entry of ERK2 by inhibiting required interactions.** *J Biol Chem*;279(13):12840-7.
- Whitmarsh AJ (2007). **Regulation of gene transcription by mitogen-activated protein kinase signaling pathways.** *Biochim Biophys Acta*;1773(8):1285-98.
- Wilsbacher JL, Goldsmith EJ and Cobb MH (1999). **Phosphorylation of MAP kinases by MAP/ERK involves multiple regions of MAP kinases.** *J Biol Chem*;274(24):16988-94.
- Wolfman A (2001). **Ras isoform-specific signaling: location, location, location.** *Sci STKE*;2001(96):pe2.
- Wunderlich W, Fialka I, Teis D, Alpi A, Pfeifer A, Parton RG, Lottspeich F and Huber LA (2001). **A novel 14-kilodalton protein interacts with the mitogen-activated protein kinase scaffold mp1 on a late endosomal/lysosomal compartment.** *J Cell Biol*;152(4):765-76. *PMCID: PMC2195784.*
- Xiong S, Zhao Q, Rong Z, Huang G, Huang Y, Chen P, Zhang S, Liu L and Chang Z (2003). **hSef inhibits PC-12 cell differentiation by interfering with Ras-mitogen-activated protein kinase MAPK signaling.** *J Biol Chem*;278(50):50273-82.
- Yaffe MB and Elia AE (2001). **Phosphoserine/threonine-binding domains.** *Curr Opin Cell Biol*;13(2):131-8.
- Yamamoto T, Ebisuya M, Ashida F, Okamoto K, Yonehara S and Nishida E (2006). **Continuous ERK activation downregulates antiproliferative genes throughout G1 phase to allow cell-cycle progression.** *Curr Biol*;16(12):1171-82.
- Yamasaki T, Takahashi A, Pan J, Yamaguchi N and Yokoyama KK (2009). **Phosphorylation of Activation Transcription Factor-2 at Serine 121 by Protein Kinase C Controls c-Jun-mediated Activation of Transcription.** *J Biol Chem*;284(13):8567-81. *PMCID: PMC2659215.*

- Yan C, Luo H, Lee JD, Abe J and Berk BC (2001). **Molecular cloning of mouse ERK5/BMK1 splice variants and characterization of ERK5 functional domains.** *J Biol Chem*;276(14):10870-8.
- Yan J, Roy S, Apolloni A, Lane A and Hancock JF (1998). **Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase.** *J Biol Chem*;273(37):24052-6.
- Yao Y, Li W, Wu J, Germann UA, Su MS, Kuida K and Boucher DM (2003). **Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation.** *Proc Natl Acad Sci U S A*;100(22):12759-64. PMID: PMC240691.
- Yao Z, Flash I, Raviv Z, Yung Y, Asscher Y, Pleban S and Seger R (2001). **Non-regulated and stimulated mechanisms cooperate in the nuclear accumulation of MEK1.** *Oncogene*;20(52):7588-96.
- Yao Z and Seger R (2009). **The ERK signaling cascade--views from different subcellular compartments.** *Biofactors*;35(5):407-16.
- Yoon S and Seger R (2006). **The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions.** *Growth Factors*;24(1):21-44.
- York RD, Yao H, Dillon T, Ellig CL, Eckert SP, McCleskey EW and Stork PJ (1998). **Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor.** *Nature*;392(6676):622-6.
- Yung Y, Yao Z, Hanoch T and Seger R (2000). **ERK1b, a 46-kDa ERK isoform that is differentially regulated by MEK.** *J Biol Chem*;275(21):15799-808.
- Zehorai E, Yao Z, Plotnikov A and Seger R (2010). **The subcellular localization of MEK and ERK--a novel nuclear translocation signal (NTS) paves a way to the nucleus.** *Mol Cell Endocrinol*;314(2):213-20.
- Zervos AS, Faccio L, Gatto JP, Kyriakis JM and Brent R (1995). **Mxi2, a mitogen-activated protein kinase that recognizes and phosphorylates Max protein.** *Proc Natl Acad Sci U S A*;92(23):10531-4. PMID: PMC40645.
- Zhang FL and Casey PJ (1996). **Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences.** *Annu Rev Biochem*;65:241-69.
- Zhang FL, Kirschmeier P, Carr D, James L, Bond RW, Wang L, Patton R, Windsor WT, Syto R, Zhang R and Bishop WR (1997). **Characterization of Ha-ras, N-ras, Ki-Ras4A, and Ki-Ras4B as in vitro substrates for farnesyl protein transferase and geranylgeranyl protein transferase type I.** *J Biol Chem*;272(15):10232-9.
- Zhou G, Bao ZQ and Dixon JE (1995). **Components of a new human protein kinase signal transduction pathway.** *J Biol Chem*;270(21):12665-9.
- Zhou T, Sun L, Humphreys J and Goldsmith EJ (2006). **Docking interactions induce exposure of activation loop in the MAP kinase ERK2.** *Structure*;14(6):1011-9.

