



Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

**Función de la Proteína Mediadora de
Respuesta a Colapsina (CRMP-2)
en cáncer de pulmón no microcítico**

Tesis Doctoral

Erik Wolfgang Oliemuller García

Pamplona, Marzo de 2011



Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

**Función de la Proteína Mediadora de
Respuesta a Colapsina (CRMP-2)
en cáncer de pulmón no microcítico**

Tesis Doctoral

Memoria presentada por D. Erik Wolfgang Oliemuller García
para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de Navarra

Erik Wolfgang Oliemuller García

Pamplona, Marzo de 2011

El presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección en el laboratorio de Microambiente Tumoral del Área de Oncología del Centro de Investigación Médica Aplicada y autorizo su presentación ante el tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, Marzo de 2011

Dra. Ana Rouzaut Subirá

El presente trabajo ha sido presentado en la
Facultad de Ciencias de la Universidad de Navarra
para optar al título de Doctor en Biología

Este trabajo ha sido realizado con las siguientes ayudas económicas:

UTE “proyecto CIMA”.

En primer lugar me gustaría agradecer a la Universidad de Navarra y al Área de Oncología del CIMA el haberme dado la oportunidad de realizar mi tesis doctoral en el laboratorio de Microambiente tumoral, del que he formado parte durante este tiempo.

Por supuesto, me gustaría agradecer a mi directora de tesis, la Dra. Ana Rouzaut, por su apoyo y confianza y por permitirme realizar la tesis doctoral bajo su dirección. Gracias también por el trabajo, el esfuerzo, el tiempo y las ganas invertidas en solventar los problemas y reveses que tiene esta carrera de obstáculos que es la tesis.

También deseo dar las gracias al Dr. Luis Montuenga, director del Área de Oncología del CIMA, y del Departamento de Histología y Anatomía Patológica, cuando esta tesis comenzó, por la oportunidad de pertenecer a ambos grupos y compaginar la ciencia con la docencia, campos en los que tanto he aprendido durante estos años. Me gustaría hacer extensivo el agradecimiento a la actual Directora del Departamento de Histología y Anatomía Patológica, la Dra. Pilar Sesma, por mantener la confianza, así como por el interés demostrado.

Gracias a mis compañeros del Laboratorio 1.03 por haber creado un inmejorable ambiente en el laboratorio lleno de trabajo pero también de tantas anécdotas, vivencias, cafés, conversaciones, cenas, etc., que haga que cada vez que piense en vosotros, lo haga con una sonrisa. A los que están, Álvaro, Lili, Rafa, Xabi y a los que, una vez que acabaron sus respectivas estancias, se fueron: Álvaro, Eva, María, Marta, Natalia, Sarah, Sergio y Silvia y especialmente a Saray; tanto por su inestimable ayuda técnica como por ser un pilar fundamental del laboratorio en el que tantas tareas y funciones se sustentan, pero también por convertirse en una amiga a quien confiar mis alegrías o disgustos personales. A Alicia, Elena y Juanjo, que debido a nuestras reuniones, durante años fuisteis como parte del grupo. A Dani, Iñaki, Ivan y Leticia, inmejorables protagonistas de una “invasión” pacífica de los despachos del 1.03. Gracias a Lorena, por enseñarme en mis principios muchas de las técnicas que luego tanto he usado a lo largo de estos años.

Teniendo en cuenta la cantidad de horas pasadas en la sala de cultivos, no puedo olvidarme de los compañeros del laboratorio 1.02 a la hora de agradecer. Gracias a Carolina, David, Diego, Igor, Iker, Karmele, Nacho y Susana por el tiempo pasado espalda con espalda y por la calidad de este tiempo. Otra parte importante de tiempo la he pasado en el Departamento de Histología, por lo que me gustaría agradecer a todos los miembros del departamento todas las cosas que he aprendido de ellos, y especialmente a los PIF del departamento y a Javi, por el tiempo pasado juntos entre clases, prácticas y exámenes.

A lo largo de los años de aprendizaje, he necesitado la ayuda de mucha gente, especialmente para aprender a utilizar aparatos cuyo uso me era desconocido en su momento, para lo cual he necesitado ayuda profesional tanto al principio como para resolver problemas posteriores. Gracias a la Dra. Maribel Zudaire, por su información y sus datos a cerca del número de copias y LOH de la región cromosómica donde se sitúa el gen de CRMP-2 en las líneas celulares estudiadas. Gracias a los Drs. Manuel Serrano y Susana Llanos del CNIO por su generosa donación del vector de expresión y del shRNA de CRMP-2. Por supuesto, gracias también al Laboratorio de Imagen, y en especial a Ainhoa, Cristina y David por enseñarme o ayudarme a usar los diversos microscopios; y a Miguel, por instalarme en todos los ordenadores posibles ese programa de análisis que aún a día de hoy carece de nombre. Gracias a aquellos miembros de Imagen que también se levantaron de sus sillas para ayudarme con alguna duda surgida con esos ordenadores y microscopios que tanto he usado y que con lo cual han dado más de un problema. A Eva Bandrés, por enseñarme a usar el citómetro de flujo cuando éste todavía era un completo desconocido para mí. Gracias también a aquellos compañeros que sin ser encargados de un aparato en concreto, ayudaron a resolver un problema por que “él trabaja mucho con”, “él sabe mucho sobre” o simplemente por que “pasaban por ahí”; puede que sólo fueran unos minutos, pero en ocasiones salvaron experimentos importantes.

Aunque no os nombre uno por uno, gracias a todos los demás miembros de los otros laboratorios del área, a los que estáis y a los que estuvisteis, vosotros sabéis quienes sois. Si estás leyendo esto, ten por seguro que me he acordado de ti a la hora de escribir estos agradecimientos, mi memoria me impide olvidarte. Gracias especialmente a aquellos que fueron compañeros dentro y fuera del trabajo, con los que compartí alegrías y desilusiones, momentos de estrés y de relajación, partidos de fútbol de squash o de frontenis, días y noches, viajes y fines de semana... gracias también a las personas de otras áreas o departamentos que participaron de estos planes, entre todos habéis contribuido a que vivir en una ciudad que no es la mía sea agradable y trabajar en el CIMA algo ilusionante. Especial mención a aquellas personas que de tantas experiencias vividas juntas acabaron abriéndome las puertas de su casa, su vida y su corazón; y a las que espero haber devuelto lo mismo que me dieron.

Gracias a mis amigos de la carrera: Ana Albéniz, Ana Pardo, Charly, Garbiñe, Iñaki, Migueltxo, Nacho, Miren, Oroz, Patxi, y Victor con los que los años trascurridos desde el fin de la carrera o la distancia no ha mermado la amistad si no que la ha hecho más fuerte, y la ha colmado de experiencias, viajes, risas, cenas y un sin fin de momentos divertidos que han llenado de felicidad mi vida y me han permitido afrontar y terminar esta larga y dura carrera.

A ti, Ana Pardo, por ser doblemente compañera durante carrera y tesis, el agradecimiento es doble; a ti, te debería escribir unos agradecimientos aparte en respuesta a los tuyos. A mis amigos de San Sebastián: Álvaro, Ángel, Charly, Enrique, Javi, Juan, Lorena, Lores y Rebeca. Por comprender mis ausencias prolongadas, mi incomparecencia a eventos importantes para ellos debido al trabajo, por continuar avisándome de los planes a pesar de tantas negativas y por seguir acogiéndome como uno más cuando volvía. Gracias también a Amaya y Judith y al resto del grupo de segovianas y viguesas por sus ánimos, su interés y por el enriquecimiento cultural que ha supuesto cada uno de nuestras aventuras.

Quería dedicar un pequeño hueco de estos agradecimientos a mis compañeros de piso en estos años por haber sabido aguantar mis manías y haber hecho tan agradable la convivencia. Gracias a Alberto, Diego y Pablo, especialmente a estos dos últimos por ser doblemente compañeros en el trabajo y en el piso, y saber cuando era conveniente seguir hablando de ciencia en casa o cuando era mejor cambiar de tema.

Muchas gracias a mi familia: a mi padre Hans, a mi hermana Laida, a mi abuela Piedad y especialmente a mi madre Pili, por todo el inmenso apoyo, comprensión y amor que he recibido de ellos a lo largo de estos años y durante el resto de mi vida, y de los que el tiempo me sigue enseñando que debería escuchar más y mejor sus consejos. A vosotros os debo todo lo que soy. El esfuerzo y compromiso mostrado hace que parte de esta tesis también sea vuestra.

Finalmente, me gustaría dar las gracias a Ali, por convertirme desde que llegaste en la persona que caminó a mi lado en los momentos en los que el camino se puso cuesta arriba. Gracias por haber sido la voz que me animó a seguir, la mirada que vio las cosas de otro color, el brazo en el que me agarré cuando tropecé e incluso la mano que me levantó las veces que caí. Por haberte convertido, día a día, en la razón para seguir y sonreír.

Abreviaturas

A

AD: Adenocarcinoma

AJCC: Comité Americano unificado sobre el cáncer (del inglés, *American Joint Committee on Cancer*)

aMTs: Microtúbulos astrales

ANOVA: Análisis de la varianza (del inglés, *Analysis of Variance*)

AP-2: Proteína activadora 2 (del inglés, *Activator Protein 2*)

APC: Poliposis Adenomatosa del colon (del inglés, *Adenomatous polyposis of the colon*)

APC/C: Complejo promotor de la anafase/ ciclosooma (del inglés, *Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*)

ATCC: Colección de Cultivos Celulares Americana (del inglés, *American Type Culture Collection*)

ATP: Adenosin trifosfato

B

BCA: Ácido bicinconínico (del inglés, *Bicinchoninic Acid*)

BDNF: Factor neurotrópico derivado de cerebro (del inglés, *Brain Derived Neurotrophic Factor*)

BEAS: Células bronquioepiteliales (del inglés, *Bronchial Epithelial Airway Cells*)

BEBM: Medio basal de células bronquioepiteliales (del inglés, *Bronchial Epithelial Cell Basal Medium*)

BEGM: Medio de crecimiento de células bronquioepiteliales (del inglés, *Bronchial Epithelial Cell Growth Medium*)

BSA: Seroalbumina bovina (del inglés, *Bovine Serum Albumin*)

C

C: confluencia

Cc: Concentración crítica

Cdc42: Proteína de control de la división celular 42 (del inglés, *Cycle division control protein 42*)

CDKs: Ciclinas dependientes de quinasa (del inglés, *Cyclin Dependent Kinases*)

CDK5PA: Proteína asociada a CDK5

CDK5R: Subunidad reguladora de CDK5

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

CEA: antígeno carcinoembrionario (del inglés, *Carcinoembryonic Antigen*)

CENP: Proteína centromérica (del inglés, *Centromeric Protein*)

CG: Carcinoma de células grandes

CIN: Inestabilidad cromosómica (del inglés, *Chromosomal Instability*)

CKI: Inhibidores de CDKs (del inglés, *CDK Inhibitors*)

CLASP: Proteína asociada a CLIP (del inglés, *CLIP associated Protein*)

CLIP-170: Proteína conectora citoplasmática-170 (del inglés, *Cytoplasmic Linker Protein 170*)

Col I: Colágeno tipo I

Col IV: Colágeno Tipo IV

COMTs: Centros organizadores de microtúbulos

CRMP-2: Proteína mediadora de respuesta a colapsina 2 (del inglés, *Collapsin Response Mediator Protein 2*)

CRMPs: Proteínas mediadoras de respuesta a colapsina

CRP: Proteína C reactiva (del inglés, *C Reactive Protein*)

CT: Tomografía axial computarizada (del inglés, *Computed Tomography*)

CXCL: Ligando de Quimioquina con motivo C-X-C (del inglés, Chemokine C-X-C motif Ligand)

D

DAB: Diaminobencidina

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DEPC: Di-etil-piro-carbonato

DMSO: Di-metil-sulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP's: Desoxirribonucleótidos

DPX: Distireno-tricresilfosfato-xileno

DPYSL: Proteína similar a la dihidropirimidinasasa (del inglés, *Dihydropyrimidinase-like*)

DRP: Proteína relacionada a dihidropirimidinasasa (del inglés, *Dihydropyrimidinase Related Protein*)

DTT: Di-tio-treitol

E

E2F1: Factor de Transcripción E2F tipo 1

EB1: Proteína de unión al extremo 1 (del inglés, *End-Binding protein 1*)

EDTA: Ácido etilen-diamino-tetra-acético

EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (del inglés, *Epidermal Growth Factor Receptor*)

EMT: Transición epitelio mesénquima (del inglés, *Epithelial Mesenchymal Transition*)

Eph: Efrina (del inglés, *Ephrine*)

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares (del inglés, *Extracellular signal-regulated kinase*)

F

FAK: Quinasa de adhesions focales (del inglés, *Focal Adhesion Kinase*)

FC: FetalClone III (Suero sintético)

Fer: Tirosina quinasa relacionada con Fps/Fes (del inglés, *Fps/Fes-Related tyrosine kinase*)

Fib: Fibrinógeno

Fps/Fes: Oncogen del sarcoma viral aviar de Fujinami/Sarcoma viral felino (del inglés, *Feline Sarcoma viral/Fujinami avian Sarcoma viral oncogene*)

G

GDP: Guanosin difosfato

GDNF: Factor neurotrópico derivado de la glía (del inglés, *Glial cell line Derived Neurotrophic Factor*)

GFP: Proteína verde fluorescente (del inglés, *Green Fluorescent Protein*)

GRP: Péptido liberador de gastrina (del inglés, *Gastrin-Releasing Polypeptide*)

GS: Glucógeno sintasa

GSK: Quinasa de la glucógeno sintasa (del inglés, *Glycogen Synthase Kinase*)

GTP: Guanosintrifosfato

H

HBEC: Células bronquio epiteliales humanas (del inglés, *Human Bronchial Epithelial Cells*)

hEGF: Factor de crecimiento epitelial humano (del inglés, *human Epithelial Growth Factor*)

HEPES: Ácido hidroxietilpiperacinoetano-sulfónico

HER: Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (del inglés, *Human Epidermal growth factor Receptor*)

Het: Heterocigótico

Hom: Homocigótico

HRP: Peroxidasa de rábano (del inglés, *Horseradish Peroxidase*)

hTERT: Transcriptasa reversa de la telomerasa humana (del inglés, *human Telomerase Reverse Transcriptase*)

I

ICQ: Inmunocitoquímica

IgG: Inmunoglobulina G

INCENP: Proteína centromérica interior (del inglés, *Inner Centromere Protein*)

ipMTs: Microtúbulos interpolares

IPTG: Isopropiltiogalactopiranosido

ISCIH: Instituto de Salud Carlos III

K

KLC: Cadena ligera de quinesina (del inglés, *Kinesin Light Chain*)

kMTs: Microtúbulos asociados a cinetocoro (del inglés, *Kinetochores Microtubules*)

L

L1CAM: Molécula de adhesión celular L1 (del inglés, *L1 Cell Adhesion Molecule*)

LOH: Pérdida de heterocigosidad (del inglés, *Loss Of Heterozygosity*)

M

- Mad:** Proteína de dimerización de Max (del inglés, *Max Dimerization protein*)
- MAP:** Proteína asociada a microtúbulos (del inglés, *Microtubule Associated Protein*)
- MAPK:** Quinasa de proteínas asociadas a microtúbulos (*Microtubule Associated Protein Kinase*)
- Max:** Factor X asociada a Myc (del inglés, *Myc-Associated Factor X*)
- MC:** Confluencia media
- MCC:** Complejo del punto de control de la mitosis (del inglés, *Mitosis Control Complex*)
- MDM2:** Proteína doble minuto murino (del inglés, *Mouse Double Minute 2*)
- MEK:** Quinasa de MAPK/ERK (del inglés, *MAPK/ERK Kinase*)
- Mklp1:** Proteína similar a quinesinas mitóticas (del inglés, *Mitotic Kinesin-Like Protein 1*)
- MMLV-RT:** Transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (del inglés, *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*)
- MTs:** Microtúbulos
- MTT:** Bromuro de (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
- Myc:** Oncogén de la Mielocitomatosis viral aviar (del inglés, *avian Myelocytomatosis viral oncogene*)

N

- NCBI:** Centro nacional de información biotecnológica (del inglés, *National Center for Biotechnology Information*)
- NCI:** Instituto nacional del cáncer de los EEUU (del inglés, *National Cancer Institute*)
- NHBE:** Células broquiepiteliales humanas normales (del inglés, *Normal Human Bronchio Epithelial cells*)
- NLS:** Señal de localización nuclear (del inglés, *Nuclear Localization Signal*)
- Noc:** Nocodazol
- NP-40:** Octilfenoxipolietoxiletanol
- NSCLC:** Cáncer de pulmón no microcítico (del inglés, *Non Small Cell Lung Cancer*)
- NSE:** Enolasa específica de neuronas (del inglés, *Neuron Specific Enolase*)
- NT-3:** Neurotropina-3
- NUMA:** Proteína del aparato mitótico nuclear (del inglés, *Nuclear Mitotic Apparatus protein*)

Q

OMS: Organización Mundial de la Salud

P

P: Indica fosforilación

p: Probabilidad

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida (del inglés, *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

Pax-3: (del inglés, *Paired box gene*)

Pb: Pares de bases

PBS: Tampón salino de fosfato (del inglés, *Phosphate Buffered Saline*)

PC: Proteínas citoplasmáticas

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, *Polymerase Chain Reaction*)

PET: Tomografía por emisión de positrones (del inglés, *Positron emission tomography*)

PI: Yoduro de propidio (del inglés, *Propidium Iodure*)

PI3K: Quinasa de Fosfatidilinositol 3 (del inglés, *Phosphoinositide 3 Kinase*)

PIP3: Fosfatidilinositol(3,4,5)trifosfato

PKC: Protein quinasa C (del inglés, *Protein Kinase C*)

PLD2: Fosfolipasa D2 (del inglés, *Phospholipase D2*)

Plk1: Quinasa similar a Polo (del inglés, *Polo Like Kinase 1*)

PN: Proteínas nucleares

PP/PPP: Proteína fosfatasa (del inglés *Protein Phosphatase*)

PRC1: Proteína Reguladora de la Citocinesis 1

PT: Proteínas totales

PTEN: Homólogo de fosfatasa y tensina (del inglés, *Phosphatase and Tensin Homolog*)

R

Rassf1A: Proteína asociada (del inglés, *Ras association domain Family 1A*)

Rb: Retinoblastoma

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

RNA: Ácido ribonucleico

ROCK1: Quinasa Rho (del inglés, *Rho Kinase 1*)

ROK: Quinasa de Rho (del inglés, *Rho Kinase*)

Rpm. Revoluciones por minuto

RT: Retrotranscripción

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (del inglés, *Real Time Polymerase Chain Reaction*)

S

SAC: Punto de control de ensamblaje del huso mitótico (del inglés, *Spindle Assembly Checkpoint*)

SCC: Carcinoma escamoso (del inglés, *Squamous-Cell Carcinoma*)

SC: Subconfluencia

SCLC: Cáncer de pulmón microcítico (del inglés, *Small Cell Lung Cancer*)

SDS: Dodecilsulfatosódico

Sema: Semaforina

Ser: Serina

SFB: Suero fetal bovino

SFM: Medio sin suero

shRNA: RNA corto de horquilla (del inglés *small hairpin RNA*)

siRNA: RNA corto de interferencia (del inglés, *small interference RNA*)

SNC: Suero normal de cabra

SNP: Polimorfismo de un único nucleótido (del inglés, *Single Nucleotide Polymorphism*)

SOC: Medio de crecimiento super óptimo con represión de catabolitos (del inglés, *Super Optimal broth with Catabolite repression*)

Sp1: Proteína de especificación 1 (del inglés, *Specificity protein 1*)

T

TAE: Tris-Acetato-EDTA

TBS: Tampón salino de tris (del inglés, *Tris Buffer Saline*)

TEM: Transición Epitelio Mesénquima

Thr: Treonina

Tm: Temperatura de hibridación del inglés, *Melting Temperature*)

TOAD: Activada tras la división (del inglés, *Turned On After Division*)

TP53: Proteína tumoral 53 (del inglés, *Tumor Protein 53*)

Tris: (hidroximetil)aminometano

TSA: Ácido siálico total (del inglés, *Total Sialic Acid*)

Tub: Tubulina

TUC: Toad/Ulip/CRMP

TXP2:

Tyr: Tirosina

U

UICC: Unión Internacional Contra el Cáncer

Ulip: Proteína similar a Unc-33 (del inglés, *Unc-33 Like Protein*)

UTP: Uridin trifosfato

UV: Ultravioleta

W

WB: Western blot

WT: Expression normal (del inglés, *Wildtype*)

X

X-Gal: Bromocloroindolilgalactopiranosido

XMAP215: Proteína asociada a microtúbulos 215 kDa de *Xenopus laevis* (del inglés, *Xenopus Microtubule Associated Protein 215 kDa*)

Y

Yes: Oncogén del sarcoma de Yamaguchi (del inglés, *Yamaguchi Sarcoma Oncogene*)

Z

ZO-1: Zona Occludens 1

Índice

INTRODUCCIÓN	1
1. Microtúbulos	3
1.1 Centrosoma	4
1.2 Dinámica de los microtúbulos	5
1.3 Función de los microtúbulos durante la mitosis	8
1.4 Función de los microtúbulos en la migración celular	15
1.5 Dinámica de los microtúbulos como diana terapéutica en Oncología	16
2. CRMPs: Proteínas mediadoras de respuesta a colapsina	17
2.1 CRMP-2: Proteína mediadora de respuesta a colapsina 2	18
2.1.1 Estructura del gen y de la proteína	18
2.1.2 Función de CRMP-2	19
2.1.3 Fosforilación de CRMP-2	21
2.1.4 Implicación de CRMP-2 en diversas patologías	23
3. Cáncer de pulmón	25
3.1 Definición y características generales	25
3.2 Epidemiología del cáncer de pulmón	26
3.3 Clasificación histológica de los tumores de pulmón	27
3.4 Estadificación del cáncer de pulmón	29
3.5 Factores de riesgo	29
3.6 Alteraciones moleculares frecuentes en el cáncer de pulmón	30
3.7 Detección del cáncer de pulmón	33
3.8 Tratamiento	34
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	37
MATERIAL Y MÉTODOS	41
1. Cultivos celulares	43
1.1 Células utilizadas	43
1.2 Medios de cultivo	45
1.3 Tripsinización	45
1.4 Cultivos congelados	46
1.5 Tratamientos a los que se sometieron las células	46
1.5.1 Incubación en medio carente de factores de crecimiento	46
1.5.2 Irradiación con luz ultravioleta (UV)	46
1.5.3 Sincronización de las células en prometafase con Nocodazol	47

2. Obtención y manipulación del RNA	47
2.1 Extracción de RNA	47
2.2 Retrotranscripción (RT)	48
2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) semicuantitativa	48
2.4 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (RT-PCR)	49
2.5 Electroforesis de DNA en geles horizontales de agarosa	50
3. Obtención y manipulación de proteínas	51
3.1 Extracción de proteínas	51
3.1.1 Extracción de proteínas totales	51
3.1.2 Extracción de proteínas citosólicas y nucleares	51
3.2 Determinación de la concentración de proteínas	52
3.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS	53
3.5 Inmunoprecipitación	56
4. Vectores de sobreexpresión y shRNA de CRMP-2	56
4.1 Mutagénesis dirigida	58
4.2 Generación del vector pEGFP-C1-CRMP-2	59
5. Transformación de células competentes y purificación de DNA plasmídico (miniprep y maxiprep)	62
6. Transfección transitoria de células tumorales	62
6.1 Sobreexpresión de CRMP-2 en las líneas de NSCLC A549 y H1299 y en células inmortalizadas BEAS	63
6.2 Atenuación de la expresión de CRMP-2 en la líneas de NSCLC A549 y H1299	63
7. Obtención de clones celulares establemente transfectados	64
8. Estudio del ciclo celular mediante citometría de flujo	65
9. Ensayos proliferación con rojo neutro	66
10. Inmunofluorescencia de células crecidas en porta	67
11. Microscopía confocal in vivo	68
12. Medida de la inducción de la apoptosis	69
13. Ensayos de migración celular	70
14. Adhesión de células a matriz extracelular	71
15. Ensayos de formación de colonias en agar blando	71
16. Experimentación con modelos animales	72

<i>17. Inmunocitoquímica de tejidos en cortes de parafina</i>	73
<i>18. Análisis estadístico de los datos</i>	75
RESULTADOS	77
<i>1. Estudio de la expresión de la proteína CRMP-2 en células epiteliales primarias de pulmón, células inmortalizadas no transformadas y líneas celulares de cáncer de pulmón</i>	79
1.1 Expresión del RNAm del gen CRMP-2.....	79
1.2 Expresión de la proteína CRMP-2.....	83
<i>2. Localización subcelular de la proteína CRMP-2 en líneas celulares</i>	84
2.1 Determinación mediante Western blot.....	84
2.2 Determinación mediante inmunofluorescencia.....	85
<i>3. Estudio de la fosforilación de CRMP-2</i>	87
<i>4. Expresión de CRMP-2 en el ciclo celular</i>	89
4.1 Estudio de la fosforilación de CRMP-2 en células A549 atendiendo al grado de confluencia celular.....	93
<i>5. Estudio del comportamiento celular en clones que expresan establemente una forma fosfomimética o fosfodefactiva de CRMP-2</i>	95
5.1 Mutagénesis dirigida y obtención de clones.....	95
5.2 Caracterización de los clones que sobreexpresan las formas fosfodefactiva y fosfomimética de CRMP-2.....	97
5.2.1 Estudio de la viabilidad celular de los clones obtenidos en la línea de NSCLC A549 y H1299.....	97
5.2.2 Estudio fenotípico.....	99
5.2.3 Estudio mediante inmunocitoquímica de la expresión de moléculas de adhesión.....	101
5.3 Descripción funcional.....	103
5.3.1 Estudio de la proliferación celular.....	103
5.3.2 Supervivencia en ausencia de factores de crecimiento.....	103
5.3.3 Análisis de la mortalidad celular mediante ensayos de detección de Anexina/PI.....	105
5.3.4 Adhesión de los distintos clones a proteínas de la matriz extracelular.....	106
5.3.5 Migración hacia factores de crecimiento.....	107
5.3.6 Ensayos de formación de colonias en agar blando.....	108

6. Estudio de la función de CRMP-2 en modelos de Xenograft de NSCLC en ratones inmunodeficientes	109
7. Relación entre la fosforilación de CRMP-2 y la muerte celular	115
7.1 Relación entre la fosforilación de CRMP-2 y p53	116
7.2 Estudio de la fosforilación de CRMP-2 en células irradiadas con luz UV	117
7.3 Activación de p53 en células privadas de suero	119
8. Estudio de la función de CRMP-2 en la mitosis	120
8.1 Co-localización de la proteína CRMP-2 y tubulina durante la mitosis	121
8.2 Interacción con tubulina y duración de la mitosis en células transfectadas con las formas fosfodefactivas y fosfomiméticas de CRMP-2	123
8.2.1 Co-localización con tubulina de las formas fosfomimética y fosfodefactiva de CRMP-2 durante la mitosis	123
8.2.2 Estudio mediante inmunoprecipitación de la interacción de las formas mutadas de CRMP-2 con tubulina durante la mitosis	125
8.2.3 Relación entre el estado de fosforilación de CRMP-2 y la duración de la mitosis	126
8.3 Estudio de la duración de la mitosis mediante microscopía confocal <i>in vivo</i>	128
DISCUSIÓN	135
1. CRMP-2 como marcador tumoral	138
1.1 Expresión de CRMP-2 en NSCLC	139
1.2 Fosforilación CRMP-2 en NSCLC	141
1.2.1 Fosforilación en el residuo Serina 522 de CRMP-2	141
1.2.2 Fosforilación en los residuos Treonina 509, Treonina 514 y Serina 518 de CRMP-2	143
2. CRMP-2 y tumorigénesis	148
2.1 Experimentación <i>in vitro</i>	148
2.2 Experimentación <i>in vivo</i>	152
3. Intervención de CRMP-2 en la mitosis	153
3.1 Localización de CRMP-2 en la mitosis	156
3.2 Alteraciones en la duración de la mitosis	158
4. Desfosforilación de CRMP-2 y muerte celular	161
5. Expresión y función de una forma proteolizada de CRMP-2 de 58 kDa	163

CONCLUSIONES	165
BIBLIOGRAFÍA	171
ANEXOS	193

Introducción

1. Microtúbulos

El citoesqueleto es una compleja red de filamentos que actúa como soporte interno celular y que determina el tamaño y la forma de la célula. Además, se trata de una estructura dinámica que regula los movimientos celulares, ancla las estructuras internas, colabora en el movimiento de los orgánulos y otras estructuras citoplasmáticas, y participa en la división celular (Desai y Mitchison 1997; Rodríguez *et al.* 2003). Está compuesto por tres tipos de filamentos distintos: filamentos de actina, filamentos intermedios y microtúbulos de tubulina. Estos, tienen la capacidad de unirse a la membrana plasmática, a los orgánulos y entre sí mediante proteínas adaptadoras (Kamal y Goldstein 2002).

Los microtúbulos (MTs) son polímeros dinámicos de tubulina que forman una red organizada de filamentos tubulares polarizados. Están constituidos por heterodímeros α/β de tubulina que se ordenan en una disposición cabeza-cola para formar protofilamentos. Normalmente, trece de estos protofilamentos se unen lateralmente para formar una estructura cilíndrica hueca de 25nm de diámetro exterior y 12nm de diámetro interior denominada microtúbulo. Su longitud puede variar entre varios nanómetros hasta varias micras (Weisenberg 1972).

El hecho de estar formado por dos subunidades distintas proporciona polaridad a los MTs y una velocidad de crecimiento distinta en ambos polos. Al extremo de mayor velocidad de crecimiento se le conoce como extremo (+) y comienza con un monómero β -tubulina, y al de menor se le denomina extremo (-) y concluye en un monómero α -tubulina (Allen y Borisy 1974).

Además de conferir tamaño y forma a la célula, los MTs participan en otras funciones celulares como:

- *Transporte* de proteínas, orgánulos y vesículas de secreción a lo largo de los MTs mediante la asociación con proteínas motoras como quinesina (transporte anterógrado, desde el extremo (-) al (+) del MT) y dineína (transporte retrógrado desde el extremo (+) al (-) del MT) (Hirokawa 1998).

- *Motilidad celular*: los MTs son necesarios para la formación de pseudópodos, y constituyen la base estructural de orgánulos como los cilios y los flagelos (Honore *et al.* 2005).

- *Adquisición de una polaridad celular* gracias a la estabilización de los MTs, que colabora a la diferenciación entre una zona apical y otra zonal basal, por ejemplo en

células epiteliales, y en la formación de estructuras especiales en zonas determinadas como por ejemplo los axones neuronales (Fukata *et al.* 2002).

- *Formación del huso mitótico o acromático* que participa, mediante su formación y acortamiento, en la segregación cromosómica durante la mitosis celular (Hyman y Karsenti 1996).

1.1 Centrosoma

En las células animales, los MTs tienen su origen en el centrosoma o Centro Organizador de Microtúbulos (COMTs). El centrosoma es un orgánulo celular compuesto por dos centriolos pareados embebidos en una matriz proteica que se denomina “material pericentriolar” (Fukasawa 2007; Nigg 2007). Los centriolos están formados por 9 tripletes de MTs, que además se relacionan y pueden interconvertirse con los MTs existentes en los cuerpos basales que forman los cilios y flagelos. Entre las más de 100 proteínas que componen la materia pericentriolar la que se halla en mayor concentración es la proteína γ -tubulina (Andersen *et al.* 2003).

La función primaria de los centriolos consiste en la condensación y el anclaje de los MTs, por lo que de forma genérica estas estructuras se denominan COMTs. Los centrosomas desarrollan una función importante en el establecimiento de la red de MTs en interfase y del huso mitótico durante la mitosis. Durante el final de la fase de síntesis de DNA del ciclo celular y en momentos previos al inicio de la mitosis, el centrosoma se duplica (Sluder y Nordberg 2004) y durante la profase, cada uno de ellos se dirige a polos opuestos de la célula ayudados por las proteínas motoras asociadas a los MTs, para formar el huso acromático. En una célula en división, en cada extremo del huso mitótico se encuentra un centrosoma, compuesto por dos centriolos posicionados en un ángulo de 90°, que alineará los cromosomas en la placa ecuatorial en la metafase. En el periodo de anafase los MTs de la zona intermedia, y no unidos a las cromátidas, ensanchan la célula y contribuyen a la separación de los cromosomas y a la división del citoplasma. De esta forma, al final de la mitosis, cada célula resultante recibirá un centrosoma con dos centriolos (Tsou y Stearns 2006).

Ya a finales del siglo XIX, Theodor Boveri, que fue quien descubrió éste orgánulo, observó la existencia de alteraciones centrosomales en células tumorales. Esta observación inicial se ha extendido posteriormente a muchos tipos de tumores humanos

(Nigg 2002). Las alteraciones de los centrosomas pueden ser de dos tipos, estructurales o numéricas, aunque ambas pueden encontrarse simultáneamente.

Las aberraciones estructurales aparecen generalmente debido a la expresión descontrolada de componentes del centrosoma, o bien por modificaciones post-traduccionales inadecuadas de dichos componentes. Estas alteraciones pueden provocar variaciones en el tamaño de los centrosomas debido a una acumulación excesiva de material pericentriolar. Además, debido a la propensión de las proteínas centrosómicas a formar agregados, a menudo se observan cuerpos relacionados con el centrosoma en sitios ectópicos (Casenghi *et al.* 2003), variando mucho su capacidad de nucleación de MTs (Lingle *et al.* 2002), lo que afecta a la forma, polaridad y motilidad de las células tumorales implicadas.

La presencia de un número inadecuado de centrosomas a menudo coexiste con la inestabilidad genómica y la pérdida de diferenciación tisular (Ghadimi *et al.* 2000; Lingle *et al.* 2002). De hecho, se ha detectado un número alto de centrosomas en la mayor parte de los tumores humanos y se ha observado que la carencia de la proteína supresora de tumores p53 eleva el número de centrosomas (Fukasawa *et al.* 1996).

1.2 Dinámica de los microtúbulos

La polimerización de los MTs es dependiente de que en el citoplasma celular exista una concentración determinada de precursores denominada “concentración crítica” (Cc), si bien dista mucho de consistir en la adición simple de dímeros de tubulina a una estructura preformada. El mecanismo de polimerización de tubulina fue descrito en profundidad en la década de los 70 (Weisenberg 1972). Los dímeros de α/β -tubulina se encuentran unidos a GTP, de forma que, mientras que en los monómeros de α -tubulina este nucleótido se mantiene como un componente estructural, el GTP unido a las subunidades de β -tubulina puede sufrir una hidrólisis, lo que conlleva la liberación de un ion fosfato.

Esta hidrólisis de GTP modula la adición de nuevos dímeros. Así, si se une al extremo del MT un dímero unido a GTP, se favorece la polimerización; mientras que si se trata de tubulina unida a GDP se favorece la despolimerización de los MTs (Weisenberg y Deery 1976) (Figura I-1).

Los MTs, pueden crecer por ambos extremos o sólo por uno, dependiendo de la concentración de dímeros de α/β -tubulina que existan en las regiones próximas a los

extremos y de la concentración de dímeros en los que la subunidad de β -tubulina esté unida a GDP. Estos mecanismos de polimerización se han recogido en lo que se ha venido a llamar la “teoría de inestabilidad dinámica” propuesta por Mitchison y Kirschner en 1984. Según esta teoría, cada MT individualmente se encuentran en un estado de elongación o de acortamiento rápido, con cambios bruscos entre ambos estados y aparentemente aleatorios (Mitchison y Kirschner 1984). Como ya hemos comentado, estos cambios vienen determinados por la presencia de GTP o de GDP en la última subunidad del extremo (Figura I-1).

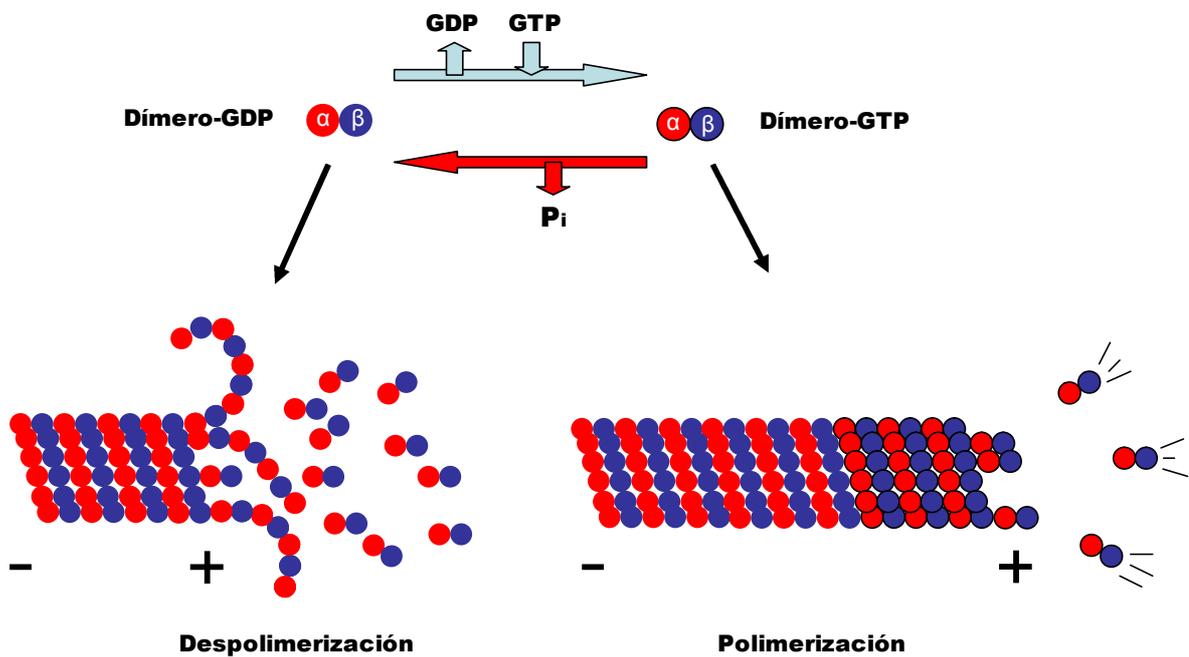


Figura I-1 Dinámica de microtúbulos.

La unión de los MTs con determinadas proteínas, conocidas como Proteínas Asociadas a Microtúbulos (MAPs), supone otro factor regulador de su dinámica tanto espacial como temporalmente. Proteínas como MAP-1 o Tau, se unen a los MTs estabilizándolos y promoviendo su ensamblaje. Otras proteínas como por ejemplo, la proteína mediadora de respuesta a colapsina 2 (CRMP-2) presenta mayor afinidad por los dímeros de tubulina favoreciendo su ensamblaje en el extremo (+) del MTs (Arimura *et al.* 2004) (Figura I-2).

Además de la “teoría de la inestabilidad dinámica”, existen otros dos aspectos de la dinámica de los MTs que merecen ser destacados. Por un lado, se ha descrito el denominado “efecto noria”, mediante el cual los dímeros que se retiran en un extremo

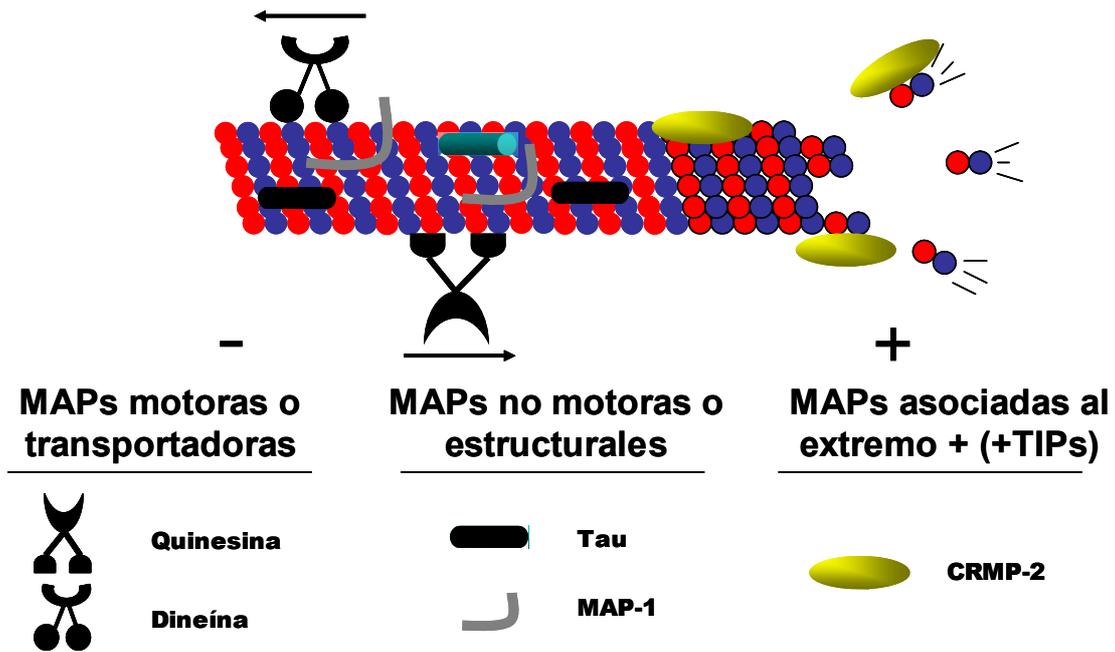


Figura I-2 Las MAPs desarrollan una función esencial en la estabilización de los MTs y en el transporte de proteínas, vesículas u otros orgánulos a través de estos.

son añadidos al extremo opuesto, lo que mantiene la masa del MT constante (Margolis y Wilson 1998). Por otra parte, los distintos MTs de una misma célula pueden encontrarse en estados distintos, de polimerización o despolimerización, en un determinado momento. La suma de todos estos factores y mecanismos establecen un equilibrio por el cual se estima que en condiciones normales, el 50% de la masa de tubulina se encuentra formando parte de MTs, mientras que el otro 50% se encuentra libre constituyendo una reserva citoplasmática. Estos porcentajes pueden variar atendiendo a la necesidad de la célula de formar estructuras especiales como axones durante la diferenciación neuronal o la formación del huso mitótico durante la mitosis (Muller-Sterl 2008).

Esta inestabilidad dinámica de los MTs permite explicar su plasticidad dentro del entorno celular y su capacidad de alcanzar e interaccionar con componentes muy diversos tanto del citoplasma como de la membrana celular. En la teoría denominada de “búsqueda y captura”, se explica cómo la inestabilidad dinámica de los MTs permite que estos vaguen por el citoplasma a la búsqueda de sitios de unión en el espacio intracelular (Holy y Leibler 1994; Desai *et al.* 1997). El encuentro de estos lugares por azar (Mitchison y Kirschner 1985), permite la formación de uniones semiestables, que facilitan generar movimiento mediante al alargamiento o acortamiento de los MTs (Goldstein y Philp 1999). De hecho, la unión de los MTs con determinadas zonas de la membrana es importante tanto para la formación del huso acromático, como para la

orientación del cono de crecimiento axonal, la polarización de las células T o el establecimiento de la polaridad apical en las células epiteliales (Drubin y Nelson 1996; Baas 1999). Por ejemplo, se ha observado un aumento de PIP₃ en las regiones de la membrana plasmática donde comenzará a crearse el huso acromático en células HeLa (Toyoshima *et al.* 2007).

1.3 Función de los microtúbulos durante la mitosis

La mitosis es el proceso por el cual una célula multiplica y divide su material genético de una manera equitativa en dos células “hijas”. Los MTs, desarrollan una función fundamental durante este proceso como formadores del huso mitótico. Dependiendo de la fase de la mitosis, los requisitos en la dinámica de los MTs varían, por lo que es necesaria una correcta dinámica de los MTs para realizar la mitosis. De hecho, la existencia de errores en la distribución del material genético pueden originar aneuploidías o alteraciones cromosómicas que pueden colaborar en la aparición de cáncer u otras enfermedades (Knoblich 2010; Thompson *et al.* 2010).

En la división celular se pueden distinguir tres tipos de MTs: los unidos a los cinetocoros de los cromosomas o kMTs; los MTs que provienen del centrosoma y no se unen a cromosomas (MTs interpolares o ipMTs) sino que se intercalan con otros ipMTs procedentes del centrosoma opuesto mediante la colaboración de proteínas entrecruzadoras; y un tercer grupo de MTs, denominados MTs astrales (aMTs), también con origen en el centrosoma pero que no forman parte del huso mitótico (Rieder 1990; Mastronarde *et al.* 1993; Brust-Mascher *et al.* 2004).

Durante la fase de síntesis del DNA, el centrosoma se duplica y justo al inicio de la mitosis, comienzan a atraer material adicional, aumentando su capacidad para reclutar los MTs. Por lo tanto, la extensa red de MTs, existente durante la interfase, comienza a despolimerizarse, lo que hace que la célula pierda su forma habitual de la interfase y que adquiera una forma esférica. Los centriolos de cada centrosoma alcanzan su longitud máxima en este momento. A medida que progresa la mitosis, los centrosomas se dirigen a los polos celulares para crear el huso mitótico (Mayor *et al.* 1999) (Figura I-3).

De esta forma, durante la prometafase, el huso de una célula mitótica tiene dos polos de los que emanan los MTs que exploran el centro celular en busca de los cromosomas, aprovechando la desaparición de la membrana nuclear. En este proceso de búsqueda, un MT puede localizar y capturar un cromosoma y unirse a él por su

cinetocoro (Kirschner y Mitchison 1986b; Holy y Leibler 1994). Los cromosomas que se unen por su cinetocoro a los MTs (kMTs) proceden a alinearse en el centro de la célula en lo que se denomina placa ecuatorial. La alineación de los cromosomas en esta placa ecuatorial requiere de procesos de polimerización y despolimerización por parte de los MTs unidos. Estos kMTs tienen unas propiedades especiales: son más estables y se reciclan mucho más despacio cuando se mantienen unidos a los cromosomas. Cualquier alteración en la dinámica de estos kMTs puede conducir a un incremento de la inestabilidad cromosómica (Nicklas 1985).

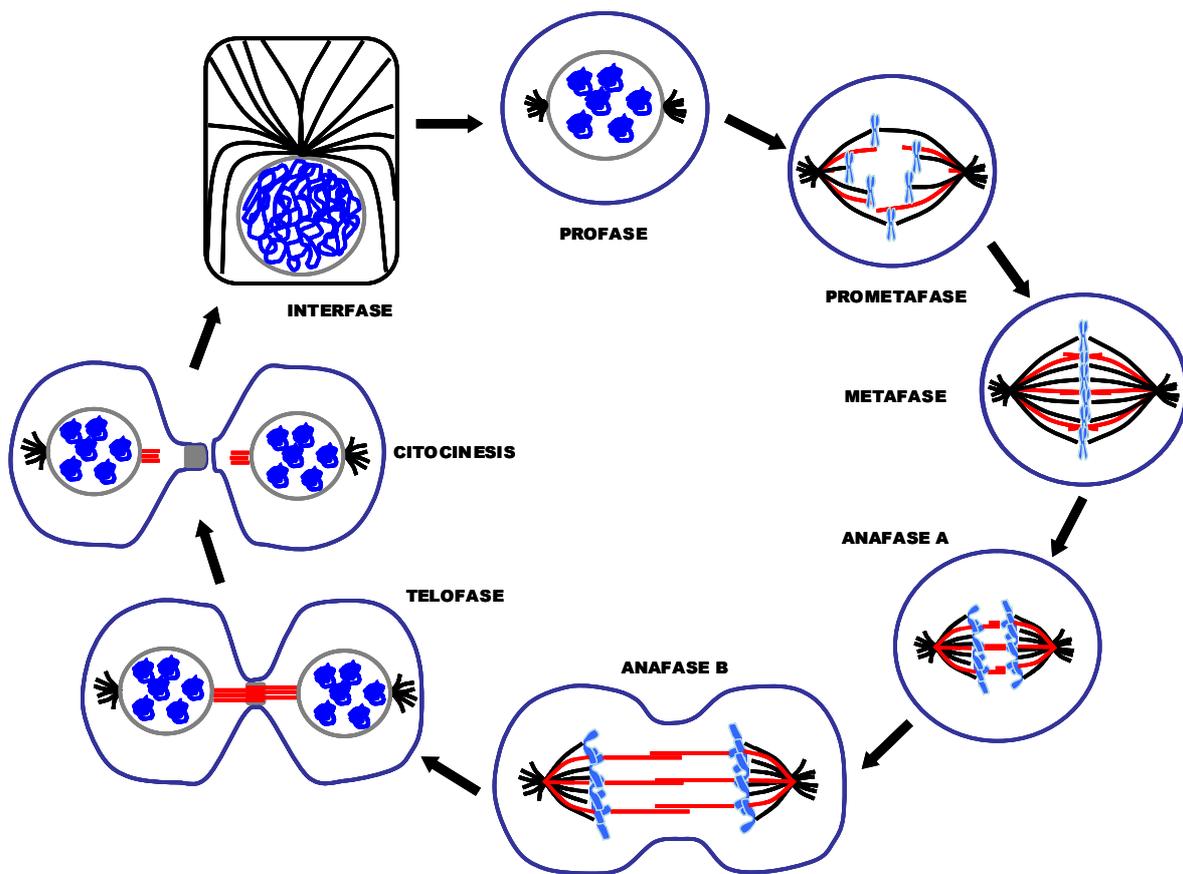


Figura I-3. Representación esquemática de la mitosis celular. Los MTs tienen una función destacada en todas las fases de la mitosis

El número de kMTs que se unen a cada cinetocoro oscila entre 20 y 40 kMTs (McEwen *et al.* 1997). En el momento en que un solo kMT se ancla a un cinetocoro, se inicia un rápido movimiento del cromosoma asociado en dirección al centrosoma del que procede dicho kMTs, con el fin de facilitar que se unan más MTs al cinetocoro. Este movimiento está probablemente mediado por la actividad motora de la proteína motora dineína (Echeverri *et al.* 1996; Sharp *et al.* 2000) que se encuentra muy concentrada en los cinetocoros sin anclar. El movimiento hacia el polo se ralentiza a medida que se

unen más kMTs, ya que la dineína se libera progresivamente de los cinetocoros según éstos se unen a más kMTs y a partir de este momento el movimiento pasa a ser dirigido por cambios en la longitud de los kMTs (Hoffman *et al.* 2001).

Como los cromosomas presentan dos cinetocoros asociados (uno en cada cromátida hermana), cuando uno de ellos se une a kMTs generados por un polo celular, el cinetocoro de la cromátida hermana queda expuesto hacia el otro polo celular. De tal manera que en la mayor parte de los casos el segundo cinetocoro se asocia a los kMTs del polo opuesto (Nicklas 1997). De esta manera, los cromosomas quedan «bi-orientados», en una configuración denominada anfitélica que asegura que la segregación tendrá lugar de manera correcta cuando la célula se divida (Dewar *et al.* 2004; Loncarek *et al.* 2007).

La mayor parte de los movimientos cromosómicos están asociados con el alargamiento y acortamiento de los kMTs. Una de las características más interesantes de los cinetocoros es su capacidad de modificar el estado de polimerización y despolimerización de sus kMTs asociados. Esto permite a los cinetocoros de las células en prometafase mostrar "inestabilidad direccional" (Skibbens *et al.* 1993), variando entre fases persistentes de movimientos hacia el polo (*poleward*) o inversos (*anti-poleward*) que están acoplados con estados alternados de despolimerización y polimerización de los kMTs, respectivamente. Esta bi-estabilidad de los cinetocoros parece ser parte de un mecanismo para alinear los cromosomas en el ecuador del huso sin perder la conexión mecánica entre los cinetocoros y los kMTs. Se cree que la bi-estabilidad de los cinetocoros se basa en la inestabilidad dinámica del extremo (+) de los kMTs y está controlado de forma parcial por la tensión existente en los cinetocoros. Se ha demostrado en experimentos *in vitro* que una baja tensión en los cinetocoros promueve el cambio hacia la despolimerización de kMTs, y una alta tensión promueve el cambio hacia polimerización de los kMTs (Rieder y Salmon 1994; Skibbens *et al.* 1995).

Como se puede deducir de la información precedente, existe un número muy elevado de proteínas en el complejo de interacción entre los kMTs y los cinetocoros, como por ejemplo NuMA o TXP2 (Di Fiore *et al.* 2004; Kline-Smith *et al.* 2004). Además, otras muchas proteínas forman parte del complejo que evalúa la correcta formación de esta unión y que se conoce con el nombre de SAC, por las siglas en inglés de *Spindle Assembly Checkpoint*. Entre estas proteínas hay algunas que mantienen su concentración constante como por ejemplo la dineína o CENP-E (también llamada

quinesina-7) y otras cuyos niveles varían al producirse la unión entre ambos componentes como son Aurora B o Mad2 (Maiato *et al.* 2004; Musacchio y Salmon 2007).

La desaparición de las proteínas del SAC de los cinetocoros marca el momento en que los cromosomas han alcanzado la placa metafásica y se encuentran en tensión bipolar. Cuando alguno de los cromosomas, por alguna razón, se retrasa durante el proceso de alineamiento, la maquinaria del SAC produce una parada temporal de la progresión en el ciclo celular dando tiempo a los mecanismos de reparación a resolver el problema detectado. Si no se ha reparado la lesión, la célula desencadena la muerte celular con objeto de evitar que se produzca una situación de aneuploidía (Musacchio y Salmon 2007).

Una vez que se ha verificado que todos los cromosomas están perfectamente alineados en esta placa ecuatorial en la metafase, comienza la etapa de anafase. Esta fase se puede dividir, a su vez, en anafase temprana o anafase A y anafase tardía o anafase B. La primera de ellas está caracterizada por la separación de las cromátidas hermanas debidas a la degradación, mediada por la proteína separasa, de las proteínas cohesinas que las mantenían unidas, y por la posterior migración de las cromátidas hermanas hacia los polos opuestos a través de los kMTs (Musacchio y Salmon 2007). Esta migración se realiza gracias a la intervención de proteínas motoras de tipo quinesinas (Lombillo *et al.* 1995; Rogers *et al.* 2004). Se han propuesto multitud de teorías con objeto de explicar el mecanismo de acortamiento de los kMTs en la migración cromosómica. De entre ellas, dos teorías, conocidas con los nombres de “Poleward Flux” y “Pac-man”, han gozado de mayor aceptación por haber sido contrastadas científicamente en modelos experimentales en organismos superiores (Maiato y Lince-Faria 2010).

La teoría del “Poleward flux” propone que la migración de los cromátidas hacia los polos se debe a un acortamiento de los kMTs en su extremo (-) o polar (Maiato *et al.* 2004), mientras que el extremo (+) de los kMTs permanece unido al cinetocoro. Por el contrario, la teoría “Pac-Man” propone que el acortamiento de los kMTs se produce en el extremo (+) o unido al cinetocoro. Para que el transporte de la cromátida fuera compatible con la despolimerización del extremo (+) es necesaria la existencia de proteínas mediadoras de la unión del cinetocoro con los kMTs que avancen en dirección al extremo (-) arrastrando a la cromátida. Los descubrimientos recientes en *Drosophila melanogaster* de que dos quinesinas denominadas KLP10A y KLP59C (Sharp y Rogers

2004) son capaces de despolimerizar en ambos extremos de los kMTs de una manera coordinada y de que la quinesina KLP59D (Rath *et al.* 2009) es capaz de regular simultáneamente la despolimerización de los kMTs y el avance hacia el extremo (-) de la proteína y de los kMTs parece haber resuelto la discusión y compilado las dos teorías bajo el nuevo nombre de “Flux-Pacman” (Zhang *et al.* 2007a; Civelekoglu-Scholey y Scholey 2010) (Figura I-4).

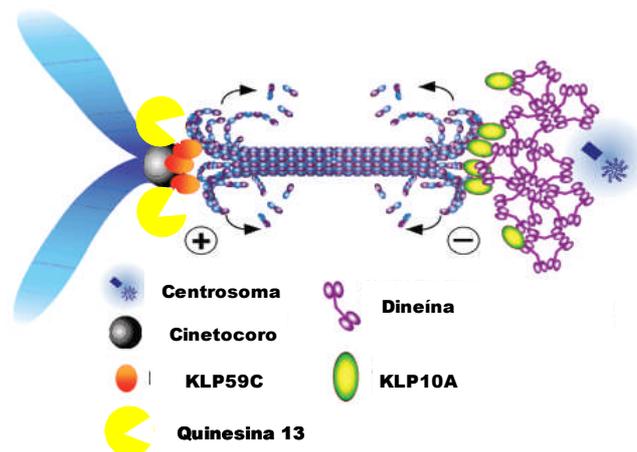


Figura I-4. Teoría de Flux-Pacman. La separación de los cromosomas hacia los polos durante la anafase A se produce por la despolimerización de los MTs tanto en su extremo (+) como en su extremo (-). Figura modifica a partir de (Sharp *et al.* 2005).

La anafase B, está caracterizada por una rápida polimerización de los ipMTs, que conduce a un alargamiento de la zona central o interzona, con la consecuente separación de los polos del huso acromático y la deformación de la célula, que pasa de tener una forma esférica a tener una forma ovalada o elíptica. Esta fase es un proceso bien conocido, que consiste en un deslizamiento uno sobre otro de los ipMTs que formaban parte del huso mitótico, en una manera dependiente de proteínas motoras y con una dependencia alta de la hidrólisis de ATP (Wordeman y Cande 1987). La elongación del huso mitótico resulta tanto de la combinación de fuerzas ejercidas en ipMTs entrelazados antiparalelamente, como de otras realizadas por la corteza celular sobre los aMTs. La unión de estos ipMTs depende de proteínas MAPs de las familias PRC1, XMAP215 y CLASP, mientras que el movimiento de deslizamiento es llevado a cabo por miembros de las familias quinesinas 5 y 6 (Severin *et al.* 2001; Higuchi y Uhlmann 2005), así como la quinesina 14 (McDonald *et al.* 1990; Walker *et al.* 1990). Además estas quinesinas han demostrado tener mayor afinidad por MTs orientados antiparalelamente (van den Wildenberg *et al.* 2008).

Durante la telofase, un grupo importante de ipMTs parece perder contacto con los polos del huso mitótico y permanecen entrelazados en el centro de la célula (coincidiendo con el punto donde se situó la placa ecuatorial) formando una estructura de alta densidad proteica que recibe el nombre de “cuerpo medio” o cuerpo central, que ya había comenzado a formarse durante la anafase (Glotzer 2004). Esta estructura parece ser la que determina el punto de la membrana donde se formará el anillo contráctil rico en actina y miosina por el cual se llevará a cabo la escisión final en la citocinesis (Glotzer 2004; Glotzer 2009; Schiel y Prekeris 2010).

La citocinesis es el proceso mediante el cual se produce la distribución del citoplasma y las dos células se separan físicamente tras la duplicación y segregación de su material genético. La citocinesis comienza con el estrechamiento del anillo contráctil y la formación del surco de escisión y termina con la escisión final de las dos células, en dos procesos que se consideran funcional y mecánicamente independientes (Pohl y Jentsch 2008).

Aunque los mecanismos implicados difieren entre distintas especies, hay dos factores que son claves y comunes entre todas las especies: la presencia de componentes del citoesqueleto como MTs y actina y la transmisión mediante quinesinas asociadas a MTs de la posición de los cromosomas para concentrar la proteína unidora de actina Rho en el punto de la membrana más cercano al cuerpo medio (Barr y Gruneberg 2007).

Aunque todavía existe controversia sobre la formación del surco de escisión, parece que tanto el cuerpo medio como los aMTs son necesarios para este proceso. Este cuerpo medio parece desarrollar una función en el posicionamiento en la membrana de reguladores de RhoA, impidiendo de este modo que se forme el surco de escisión en fases previas como anafase o telofase (Bement *et al.* 2005). Por su parte, la importancia de los aMTs en la determinación de esta estructura es relativamente novedosa y poco conocida. Determinados grupos apuntan a que una relajación de la tensión ejercida por parte de los aMTs en las zonas polares de la membrana provocaría la transmisión de señales para la contracción de la zona central de la célula (Glotzer 2004; Bringmann *et al.* 2007; Werner *et al.* 2007).

La importancia de los MTs durante la citocinesis también se pone de manifiesto debido a la gran cantidad de MAPs relacionadas con esta fase como pueden ser: Mklp1, PCR1 o CLASP-1 (Maiato *et al.* 2002; Mollinari *et al.* 2002; Mao *et al.* 2005). A partir del descenso de los niveles de CDK1 durante la anafase, estas MAPs, que durante la metafase se encontraban inhibidas por los altos niveles de CDK1, quedan ahora bajo

regulación de otras quinasas específicas de la citocinesis entre las que destacan Aurora B o Plk1 (Neef *et al.* 2006; Vader *et al.* 2006).

El momento final de la citocinesis es la escisión en dos células. En este punto las células están conectadas por un puente intercelular en cuyo centro se sitúa el cuerpo medio o también llamado cuerpo de Flemming. En este punto convergen la remodelación del entramado de MTs y el tráfico molecular de sustancias para formar la membrana plasmática (Pohl y Jentsch 2008). Los MTs de este cuerpo medio actúan como raíles por los que se transportan vesículas revestidas de clatrina con el fin movilizar componentes para regenerar la membrana plasmática en este punto (Figura I-5). A medida que estas vesículas se localizan en el cuerpo central, los MTs comienzan a despolimerizarse y por lo tanto a retirarse progresivamente de las inmediaciones del cuerpo central (Schweitzer y D'Souza-Schorey 2005; Barr y Gruneberg 2007).

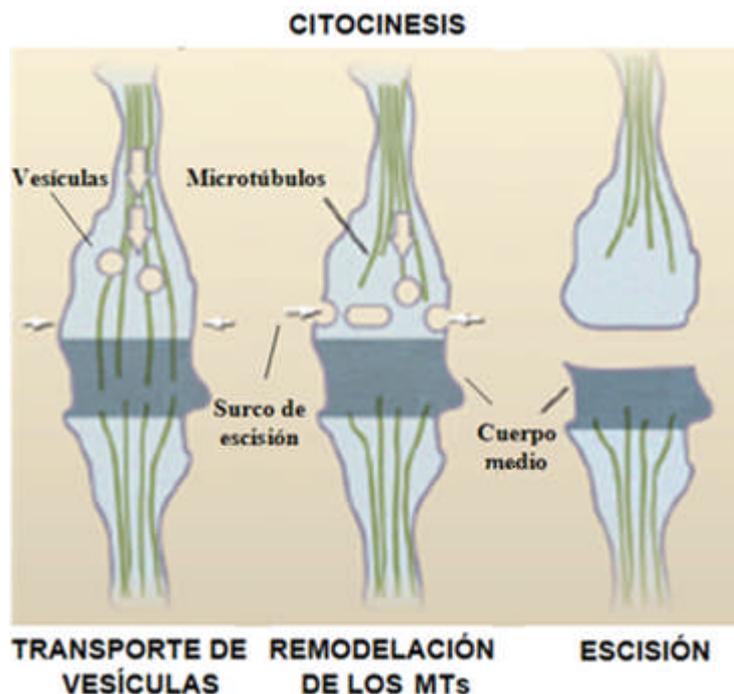


Figura I-5. Representación esquemática de la citocinesis. La citocinesis se puede dividir en tres procesos: el transporte de vesículas hacia el cuerpo medio, la remodelación de los MTs y la escisión o corte final. Figura modifica a partir de (Barr y Gruneberg 2007).

Cabe destacar que este proceso generador del surco de escisión es asimétrico. Las vesículas proceden exclusivamente de una de las dos células (Gromley *et al.* 2005) y la escisión no se realiza exactamente en el centro del cuerpo medio, si no en uno de sus laterales. De este modo, de las dos células formadas una se queda con todo el cuerpo medio y la otra sin nada, en un proceso que parece ser estocástico.

1.4 Función de los microtúbulos en la migración celular

La migración celular es fundamental para todos los organismos multicelulares tanto durante el desarrollo embrionario, como en individuos adultos y está implicada en procesos como: la extravasación de células del sistema inmune durante la inflamación, la angiogénesis, la regeneración tisular o la metástasis tumoral... (Honore *et al.* 2005).

Generalmente, la migración celular se inicia como respuesta a estímulos externos que polarizan en gran manera la célula y provocan una distribución asimétrica de moléculas implicadas en rutas de señalización, en la estructuración del aparato de Golgi, del centrosoma y del citoesqueleto (Honore *et al.* 2005). De hecho, se han estudiado las rutas de señalización implicadas en la polimerización de MTs durante la motilidad celular. Así, se ha descrito la participación de proteínas de la familia de Rho-GTPasas, como Cdc42 en la polimerización de MTs y en el reordenamiento del centrosoma mediada por α PKC (Ren *et al.* 1999; Etienne-Manneville y Hall 2001; Tzima *et al.* 2003). Por otra parte, la disociación de las adhesiones focales y su consecuente separación del sustrato parece estar regulado por la quinesina-1, la dineína y la quinasa de adhesión focal (FAK); mientras que es independiente de la actividad de Rho y Rac1 (Krylyshkina *et al.* 2002; Ezratty *et al.* 2005).

Para generar la polaridad necesaria para que la célula migre direccionalmente, es importante que los MTs aumenten su inestabilidad dinámica, generando un número determinado de MTs altamente estables en la parte anterior de la célula migratoria (Kirschner y Mitchison 1986a; Gundersen y Bulinski 1988). Estos MTs estables poseen modificaciones post-traduccionales en su extremo (+) que les confieren protección ante la despolimerización (Infante *et al.* 2000; Westermann y Weber 2003). Además de tener una función en la motilidad celular, pueden a su vez funcionar como raíles para el tráfico de vesículas o subunidades del citoesqueleto y permiten la correcta orientación del centrosoma hacia la zona anterior de la célula (Yvon *et al.* 2002).

A nivel estructural, el proceso de migración celular puede ser considerado como una repetición periódica de una secuencia de eventos que incluye la formación de pseudópodos, la unión de las membranas a sitios de anclaje extracelulares mediante adhesiones focales y la posterior translocación del cuerpo celular en dirección a los nuevos sitios de anclaje (Lauffenburger y Horwitz 1996).

La importancia de los MTs en la migración celular depende en gran parte de la capacidad de la célula para formar adhesiones focales: en aquellas células en las que se

forman adhesiones focales, la participación de los MTs es esencial, mientras que, por el contrario, en aquellas células en las que no se forman este tipo de estructuras, la función de los MTs no resulta fundamental (Ballestrem *et al.* 2004). Así, por ejemplo se ha descrito cómo la despolimerización de los MTs produce un aumento en el número y tamaño de las adhesiones focales que origina un aumento en la adhesión celular hasta niveles incompatibles con la locomoción (Ballestrem *et al.* 2000).

En resumen podemos decir que la función de los MTs en la migración celular está asociada principalmente a su capacidad para formar pseudópodos o lamelipodios en la parte anterior de la célula, producir la retracción de la parte posterior de la célula y a la capacidad para desorganizar las adhesiones focales que anclan a la célula al sustrato (Honore *et al.* 2005).

1.5 Dinámica de los microtúbulos como diana terapéutica en Oncología

La participación de los MTs tanto en la división como en la motilidad celular los convierte en candidatos excelentes para terapias antineoplásicas, ya que estas patologías se caracterizan por presentar una proliferación y migración aberrantes. Desde hace más de cuarenta años se ha validado el uso de inhibidores de los MTs como los alcaloides o los taxanos como potentes agentes antitumorales, de tal modo, que hoy en día, se siguen buscando nuevas moléculas derivadas de ellos que aporten una mayor especificidad y acción terapéutica en los tratamientos oncológicos.

Este tipo de agentes antineoplásicos se clasifican principalmente en dos grupos: compuestos despolimerizantes, como son los derivados de la planta del bígaro (*vinca rosea*) como la vincristina, o la colchicina, que impiden la polimerización de los MTs, y compuestos estabilizantes de MTs, que impiden la despolimerización de los MTs, como por ejemplo los taxanos (taxol). Ambos tipos de compuestos inducen un bloqueo del ciclo celular y conducen a la inducción de apoptosis, especialmente en la transición desde metafase a anafase, debido a las alteraciones no sólo en la masa total de MTs sino también en la estructura del huso acromático (Jordan 2002; Esteve *et al.* 2007).

Por otra parte, aunque existe controversia respecto al tema y no se ha establecido el mecanismo molecular, se ha observado en algunos modelos experimentales que los agentes inhibidores de la polimerización de los MTs impiden la migración celular y por tanto el posible desarrollo de metástasis, cuando se administran a dosis inferiores a las necesarias para inducir apoptosis (Hegedus *et al.* 2004).

2. CRMPs: Proteínas mediadoras de respuesta a colapsina

En 1985, Hedgecock y colaboradores describieron la proteína Unc-33 en *Caenorhabditis elegans*. Se observó que era una proteína esencial para un correcto desarrollo axonal y para el movimiento, pues la mutación de esta proteína conllevaba la adquisición de un fenotipo de descoordinación severa debida, principalmente, a una morfología anormal de los MTs (Hedgecock *et al.* 1985). Posteriormente se demostró que existen 3 transcritos de Unc-33 en esta especie, que codifican para 3 proteínas de distinto tamaño (55, 72 y 90kDa), y que la expresión de todas las isoformas era esencial para el desarrollo de un correcto fenotipo (Li *et al.* 1992).

Con el tiempo, se han identificado genes ortólogos a Unc-33 en diversas especies superiores. Estos genes dan lugar a las proteínas conocidas como Proteínas Mediadoras de Respuesta a Colapsinas (CRMPs) en mamíferos. El hecho de que fueran descubiertas por varios grupos a la vez en distintas especies animales ocasionó que estas proteínas sean conocidas con nombres diversos en la bibliografía. Actualmente la nomenclatura adecuada es DPYSL (Dihydropyrimidinase-like proteins) (NCBI, Universidad de John Hopkins; Uniprot), aceptándose como nombres alternativos DRP (Dihydropyrimidinase Related Proteins) y CRMP. También se han usado otros nombres como TOAD (Turned On After Division), Ulip (Unc-33 like protein) o TUC (TOAD/Ulip/CRMP).

La familia de las CRMP es una familia de proteínas altamente conservadas en mamíferos, que posee cinco miembros denominados CRMP1-5, de los cuales los cuatro primeros presentan un 75% de homología en su secuencia, mientras que CRMP-5 difiere en un 50% de su secuencia del resto de los miembros. Por otra parte, se conocen dos isoformas de cada uno de los cuatro primeros miembros de la familia (CRMP1-4) en distintas especies superiores (Quinn *et al.* 2003; Yuasa-Kawada *et al.* 2003; Bretin *et al.* 2005). En humanos, también se han descrito dos isoformas para CRMP-2 (Petratos *et al.* 2008): CRMP-2A de 677 aminoácidos y 75 kDa y CRMP-2B de 572 aminoácidos y 62 kDa.

Hemos centrado nuestro trabajo en el estudio de la isoforma CRMP-2B, que es la isoforma mayoritaria y más descrita en sistema nervioso, y a la que nos referiremos con el nombre de CRMP-2.

2.1 CRMP-2: Proteína mediadora de respuesta a colapsina 2

La proteína CRMP-2 fue la primera en ser aislada (Hamajima *et al.* 1996) y es la más estudiada de los miembros de la familia. Al igual que el resto de los miembros, el estudio de esta proteína ha estado principalmente centrado en el sistema nervioso, aunque se ha descrito su presencia en tejidos como pulmón (Ito *et al.* 2000), macrófagos (Rouzaut *et al.* 2000) o linfocitos T (Vincent *et al.* 2005) y actualmente se le considera una proteína ubicua, a pesar de no expresarse en hígado (Hamajima *et al.* 1996).

2.1.1 Estructura del gen y de la proteína

El gen de CRMP-2 se localiza en la región cromosómica 8p21.2 y abarca una extensión aproximada de 80Kb (Koyama *et al.* 1995; Hamajima *et al.* 1996). Al igual que en otras especies, se han descrito 2 isoformas proteicas en humanos, aunque no se ha descrito completamente la estructura del gen que codifica para la secuencia conocida como CRMP-2A. Gracias a comparaciones entre el RNAm de ambas isoformas con la secuencia de DNA en otras especies como *Gallus gallus*, se sabe que la isoforma CRMP-2A diferiría de la isoforma B en los 2 primeros exones.

El gen que codifica para CRMP-2 fue aislado por Hamajima y colaboradores en 1996. Contiene 14 exones cuyo tamaño oscila entre 62 y 2606 pb y 13 intrones y transcribe un RNAm de 4567 pb. El codón ATG iniciador de la traducción se encuentra situado en la base 282 del transcrito y la región traducida tiene un tamaño de 1719 pb (Hamajima *et al.* 1996; Kitamura *et al.* 1999).

La región promotora de CRMP-2B se localiza dentro del intrón 1 de la isoforma mayor o CRMP-2A (Fontan-Gabas *et al.* 2007). Se ha descrito una secuencia promotora mínima comprendida entre los nucleótidos -130 y -354 del codón de inicio ATG. Los factores de transcripción AP-2 y Pax-3 desarrollan una función fundamental en la transcripción del RNAm. (Fontan-Gabas *et al.* 2007). Otros autores apuntan también a la importancia de los factores de transcripción E2F, Sp1 y GATA 1/2 en células de neuroblastoma que son tratadas con el factor neurotrópico derivado de la glía (GDNF) (Kodama *et al.* 2004).

La forma predominante de la proteína CRMP-2 humana (CRMP-2B) contiene 572 aminoácidos con un peso molecular de 62 kDa. Además, existen datos en la bibliografía referentes a formas proteicas de tamaños moleculares comprendidos entre

55 y 58 kDa producto de modificaciones post-traduccionales. Chung y colaboradores identificaron una isoforma de 58 kDa que aumentaba en neuronas de cerebro de ratas sometidas a isquemia. Mediante técnicas de proteómica determinaron que esta forma proteica era el resultado de la proteólisis de la proteína en su extremo carboxiterminal y se comprobó que esta proteólisis está mediada por la calpaína (Chung *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2007b). La proteólisis del extremo carboxiterminal permite la exposición de residuos que constituyen un Secuencia de Localización Nuclear (NLS) (Rogemond *et al.* 2008).

2.1.2 Función de CRMP-2

CRMP-2 es una proteína capaz de interactuar con proteínas del citoesqueleto además de con otras proteínas adaptadoras como dineína o quinesinas. Muchas de estas interacciones son dependientes de su estado de fosforilación, lo que la convierte en una proteína capaz de ser regulada de modo covalente.

CRMP-2 interactúa con miembros de los tres grupos de filamentos que conforman el citoesqueleto. La interacción con tubulina es dependiente de su estado de fosforilación en los residuos Treonina 509 y 514 y Serina 517, 518 y 522. De esta manera, cuando CRMP-2 no está fosforilado es capaz de interactuar con los dímeros de tubulina y unirlos a los MTs preformados favoreciendo su polimerización (Fukata *et al.* 2002), pero si está fosforilada esta unión se desestabiliza o no se produce. La región de CRMP-2 responsable de la interacción con tubulina se encuentra en la región comprendida entre los aminoácidos 323 y 381. Se ha demostrado que CRMP-2 se une a quinesina-1 para transportar los dímeros de tubulina hacia los extremos de los MTs en crecimiento (Kimura *et al.* 2005). En cambio, para un transporte retrógrado a través de los MTs, CRMP-2 es capaz de unirse a dineína (Arimura *et al.* 2009). La interacción de CRMP-2 con tubulina es la responsable de que CRMP-2 sea una molécula fundamental en la determinación, formación y crecimiento axonal.

Se ha comprobado que CRMP-2 aumenta tras una axotomía (Suzuki *et al.* 2003) y que esta sobreexpresión acelera el proceso de regeneración del nervio hipogloso en motoneuronas en experimentos *in vivo* en ratón (Suzuki *et al.* 2003). Así, la sobreexpresión de CRMP-2 en neuronas origina múltiples axones (Inagaki *et al.* 2001).

La unión de CRMP-2 a quinesina-1 y dineína es también el fundamento del transporte activo de proteínas y orgánulos en el citoplasma de la célula. De este modo,

CRMP-2 participa en la endocitosis de vesículas revestidas de clatrina mediante su interacción con la proteína Numb. Esta interacción es necesaria para endocitar y reciclar la molécula de adhesión neuronal L1CAM en el cono axonal (Nishimura *et al.* 2003).

A diferencia de lo que sucede en su interacción con tubulina, la interacción de CRMP-2 con la actina es independiente del estado de fosforilación de la proteína. CRMP-2 puede unir también proteínas que componen los filamentos intermedios como la proteína Vimentina (Vincent *et al.* 2005) (Tabla I-1).

Proteína	Región CRMP-2	Fosforilación	Referencia
CRMP1-5	8-134 y 281-435	Independiente	
Tubulina	323-381	Dependiente	(Fukata <i>et al.</i> 2002) (Arimura <i>et al.</i> 2005)
Actina	-	Independiente	(Arimura <i>et al.</i> 2005)
Vimentina	-	Dependiente	(Vincent <i>et al.</i> 2005)
Quinesina-1	440-572	-	(Kimura <i>et al.</i> 2005)
Dineína	Región aminoterminal	-	(Arimura <i>et al.</i> 2009)
Numb	275-322	Dependiente	(Nishimura <i>et al.</i> 2003) (Arimura <i>et al.</i> 2005)
PLD2	243-300	-	(Lee <i>et al.</i> 2002)
Plexina-A1	-	-	(Fiore y Puschel 2003)
CaV2.2	-	-	(Brittain <i>et al.</i> 2009)
Calmodulina	-	-	(Zhang <i>et al.</i> 2009)
Neurofibromina	-	Dependiente	(Lin y Hsueh 2008)

Tabla I-1 CRMP-2 interacciona con numerosas proteínas. Se enumeran las proteínas con las que interacciona, así como las regiones de CRMP-2 que participan en esta unión y la dependencia del estado de fosforilación de CRMP-2 para que exista interacción.

En 2000, Gu e Ihara describieron la co-localización mediante técnicas de inmunofluorescencia de CRMP-2 con tubulina tanto en el huso acromático de células en metafase como en el cuerpo intermedio de la telofase en la línea celular de neuroblastoma Neuro2a (Gu y Ihara 2000). No es hasta 2006 cuando Tahimic y colaboradores sugieren una potencial función de CRMP-2 relacionada con la proliferación al demostrar que la fosforilación de CRMP-2 en Thr514 varía ante una

quiescencia inducida por inhibición por contacto. Además, describen una sobreexpresión de la forma fosforilada en Thr555 en líneas celulares y tumores derivados de fibroblastos (Tahimic *et al.* 2006).

Se ha propuesto también la participación de CRMP-2 en la migración celular por tratarse de una proteína capaz de reorganizar el citoesqueleto (Vincent *et al.* 2005). Más concretamente, se observó un aumento de CRMP-2 en linfocitos T periféricos como respuesta a una inflamación neuronal provocada por virus (Vuillat *et al.* 2008). Posteriormente se ha identificado a la citoquina CXCL-12 como una de las moléculas que pueden desencadenar una motilidad en la que CRMP-2 se ve involucrada. (Varrin-Doyer *et al.* 2009).

Por último, estudios recientes asignan una nueva función a CRMP-2 en relación a los canales de Ca^{2+} en neuronas presinápticas (CaV2.2). La unión de CRMP-2 a estos canales facilitaría en primer lugar la entrada de Ca^{2+} en las neuronas presinápticas y en segundo lugar conlleva un aumento del número de estos canales CaV2.2 en la superficie cercana a la sinapsis (Brittain *et al.* 2009).

2.1.3 Fosforilación de CRMP-2

Como ya se ha señalado anteriormente, CRMP-2 realiza su función mediante la interacción con otras proteínas. Esta interacción puede estar regulada por la fosforilación de CRMP-2 en múltiples residuos. Estas fosforilaciones de CRMP-2 son catalizadas por distintas proteínas quinasas, en respuesta a diferentes estímulos.

La secuencia proteica de CRMP-2 presenta numerosos residuos susceptibles de fosforilación, principalmente concentrados en su extremo carboxiterminal. Experimentalmente se ha demostrado que CRMP-2 puede ser fosforilada por: CDK5 en S522, GSK-3 β en T509, T514, S517 y S518, ROCK1 en T555 y Yes en Y479. Además, mediante un anticuerpo anti-fosfo-tirosina se ha demostrado que las proteínas tirosina quinasas Fer y Fps/Fes pueden fosforilar a CRMP-2 en un residuo no concretado (Mitsui *et al.* 2002).

La recepción en la membrana del estímulo de Sema3A activa la quinasa CDK5 que fosforila a CRMP-2 en Ser522. Esta primera fosforilación ejerce de fosforilación cebadora y permite que GSK-3 β fosforile los residuos Thr509 (Cole *et al.* 2004); (Uchida *et al.* 2005), Thr514 (Yoshimura *et al.* 2005) y Ser518 (Brown *et al.* 2004). Esta fosforilación inactiva a CRMP-2 impidiendo que se una a tubulina, lo que

desencadena un proceso de colapso axonal (Figura I-6). Este mecanismo de fosforilación e inhibición de su unión a tubulina, coincide con el descrito para otras MAPs como Tau o MAP1B (Wagner *et al.* 1996; Garcia-Perez *et al.* 1998; Good *et al.* 2004).

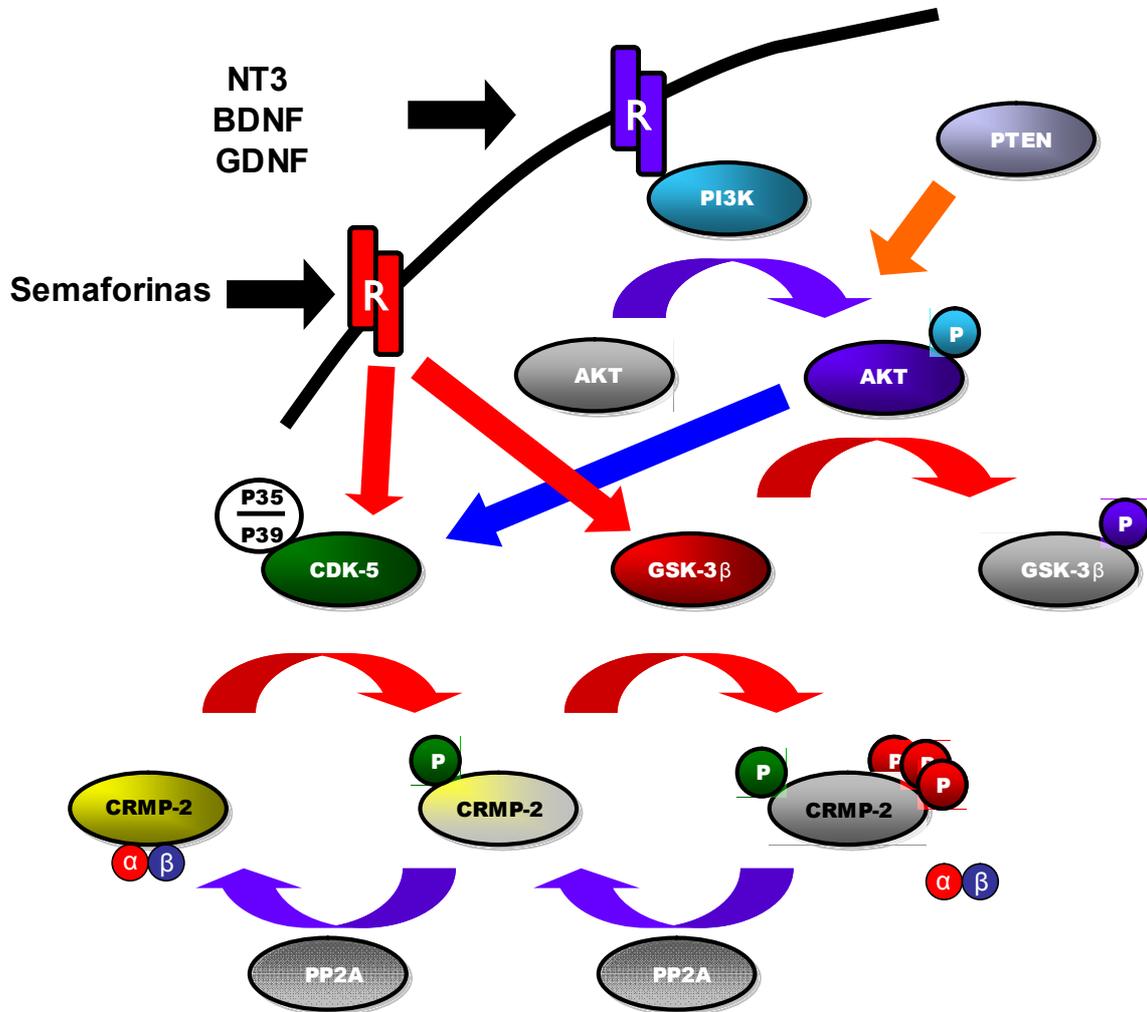


Figura I-6. Esquema de las proteínas implicadas en la fosforilación y desfosforilación de CRMP-2 en los residuos comprendidos entre Thr509 y Ser522 y su efecto sobre la interacción con los heterodímeros de tubulina.

CRMP-2 puede ser fosforilado en Thr555 por Rho/Rho quinasa (ROK) como respuesta al reconocimiento por parte del receptor del factor de crecimiento epidérmico y por los receptores Eph a estímulos producidos por el ácido lisofosfatídico o Efrina-A5 respectivamente. Esta fosforilación inhibe la capacidad de CRMP-2 de interactuar con tubulina, lo que produce también el colapso axonal (Arimura *et al.* 2000; Arimura *et al.* 2005). Esta misma fosforilación del residuo Thr555 también inhibe la interacción con la proteína Numb, mientras que la interacción con actina es independiente de esta

fosforilación. La actividad de ROK puede regularse mediante la interacción de CRMP-2 con una isoforma mayor de CRMP-1, denominada p80 CRMP-1 o L-CRMP-1, que puede, a su vez, unirse a ROK α , inhibiendo su actividad quinasa, lo que conduce a una desfosforilación de CRMP-2 (Leung *et al.* 2002). Además, Rho-quinasa ha sido relacionada con la formación de fibras de estrés, la contracción del músculo liso y con la migración celular, lo que abre la puerta a la participación de CRMP-2 en estas funciones.

Por el contrario, otros factores secretados por las células nerviosas, como el factor neurotrópico derivado de cerebro (BDNF) y la neurotropina 3 (NT-3), inhiben a GSK-3 β mediante la vía de señalización PI3K/Akt. Esto conlleva una disminución de la fosforilación de CRMP-2 en los residuos indicados y una mayor interacción con tubulina, promoviendo el crecimiento axonal (Yoshimura *et al.* 2005). El factor neuronal derivado de la glía (GDNF) aumenta los niveles totales de la proteína CRMP-2 a través de la vía ERK en células de la línea celular TGW derivada de neuroblastoma (Kodama *et al.* 2004).

2.1.4 Implicación de CRMP-2 en diversas patologías

Se han observado modificaciones tanto en la expresión como en la función en varias enfermedades, la mayoría de ellas relacionadas con el sistema nervioso. Estas alteraciones pueden ser debidas a variaciones en los niveles totales de la proteína, del mRNA o a modificaciones post-traduccionales.

A nivel genómico, se ha observado la asociación entre un polimorfismo de un solo nucleótido en la secuencia de CRMP-2 y la esquizofrenia. Así, el cambio 2236T>C en la región 3'UTR que no se codifica del gen CRMP-2 puede reducir la susceptibilidad de sufrir esquizofrenia (Nakata *et al.* 2003; Hong *et al.* 2005).

Se han encontrado descensos en los niveles de RNAm, tanto en el cerebro de personas con síndrome de Down como de pacientes que sufren la enfermedad de Alzheimer (Lubec *et al.* 1999). Por el contrario, se han observados aumentos de los niveles de RNAm en embriones de ratón que padecían hipotiroidismo (Wong y Leung 2001) que correlacionaban con un aumento en los niveles de la proteína.

Igual que en el caso del RNAm, también se han observado alteraciones de los niveles proteicos en determinadas enfermedades neurológicas. Se ha observado un descenso de la proteína en el córtex frontal y en leucocitos de personas con

esquizofrenia, (Johnston-Wilson *et al.* 2000; Nakata *et al.* 2003) Por otra parte, se describieron aumentos de CRMP-2 en el córtex singular anterior de personas esquizofrénicas (Martins-de-Souza *et al.* 2010). Debido a estos datos se ha propuesto a CRMP-2 como un potencial marcador de esquizofrenia.

Se ha propuesto que los descensos de los niveles de la proteína son causa del descenso de plasticidad y degeneración neuronal en pacientes que sufren Epilepsia relacionada con el Lóbulo Temporal Mesial, esclerosis hipocámpica (Czech *et al.* 2004) o enfermos de Alzheimer o síndrome de Down.

Cada vez son más los artículos que resaltan la importancia de las modificaciones post-traduccionales, especialmente la fosforilación, en estas y en otras enfermedades. Se ha descrito un aumento de la forma fosforilada de CRMP-2 en Ser522 en la enfermedad de Alzheimer asociada a las placas neurofibrilares (Yoshida *et al.* 1998); (Gu *et al.* 2000), incluso en etapas tempranas de la enfermedad, lo que la postula como un marcador temprano (Cole *et al.* 2007). Además, esta fosforilación ha sido descrita como una fosforilación altamente resistente a la acción de fosfatasa (Cole *et al.* 2008), al igual que la de otras proteínas relacionadas con los citoesqueleto como Tau o MAP-1 en estas mismas células (Good *et al.* 2004).

Además, se han encontrado disminuciones de la o-glicosilación de la proteína CRMP-2 en pacientes de Alzheimer (Kanninen *et al.* 2004) y se ha descrito que la o-glicosilación de CRMP-2 en los sinaptosomas es fundamental durante la embriogénesis.

Fuera del ámbito del sistema nervioso, varios grupos han estudiado a CRMP-2 en relación con diversas situaciones fisio-patológicas. Así, se observó un aumento en el nivel del RNAm de CRMP-2 en monocitos humanos activados mediante péptidos inmunopotenciadores derivados de la proteína A de *Staphylococcus aureus* (Rouzaut *et al.* 2000). Posiblemente, estos aumentos se relacionen con la redistribución del citoesqueleto en la transición monocito-macrófago. De modo similar, Vincent y colaboradores demostraron como CRMP-2 aumentaba en linfocitos T como respuesta a la inflamación, en un proceso en el que también existe una participación activa del citoesqueleto (Vincent *et al.* 2005). También en linfocitos T que migran hacia zonas inflamadas inducidas por CXCL-12 se ha encontrado una disminución de la fosforilación en Thr509 y Thr514 que se correspondían con aumentos de la fosforilación en Tyr479 y activación de CDK-5 (Varrin-Doyer *et al.* 2009).

En cuanto a la relación de CRMP-2 con enfermedades neoplásicas, CRMP-2 ha sido propuesto como marcador de cáncer colorrectal al encontrarse niveles aumentados de esta proteína en el plasma de pacientes con esta enfermedad (Wu *et al.* 2008). Además, se ha observado que tumores derivados de células fibroblásticas expresan CRMP-2 altamente fosforilada en su residuo Thr555 y que esta fosforilación podría estar relacionada con un aumento de la proliferación en células tumorales (Tahimic *et al.* 2006).

Por último, además de CRMP-2, otros dos miembros de la familia han sido relacionados con el cáncer. CRMP-1 se describió como un gen supresor de metástasis (Shih *et al.* 2001; Shih *et al.* 2003), y se ha comprobado que su expresión disminuye en tumores de estadios avanzados y correlaciona con recaídas post-operatorias y mal pronóstico. Además recientemente Pan y colaboradores han descrito que la expresión de la isoforma mayor de CRMP-1 (L-CRMP-1) de 75 kDa se asocia con metástasis en carcinoma pulmonar. En el caso de CRMP-5, se ha detectado presencia de anticuerpos frente a esta proteína en pacientes con síndromes neurológicos que se sospechaba eran de origen paraneoplásico (Yu *et al.* 2001). Este hecho lo relaciona en la respuesta antitumoral a autoantígenos creados por las células tumorales.

3. Cáncer de pulmón

3.1 Definición y características generales

El término cáncer engloba un grupo de unas 200 enfermedades caracterizadas por una proliferación excesiva y descontrolada de células del organismo que pueden invadir y dañar tejidos u órganos y provocar en última instancia la muerte del individuo. Entre estas enfermedades, se engloban bajo el término de cáncer de pulmón aquellas que tienen como origen células pulmonares.

Las células tumorales se caracterizan, como se recoge en artículo publicado en el año 2000 por Hanahan y Weinberg, por presentar una proliferación descontrolada e independiente de la presencia de factores de crecimiento, por su falta de respuesta a señales inhibitorias del mismo y el desarrollo de mecanismos de resistencia a la muerte celular programada. Además los tumores son capaces de desarrollar su propia vasculatura y sistemas para abandonar el nicho primario e invadir regiones proximales o

distales al tumor (Hanahan y Weinberg 2000). La adquisición de estas características está determinada por múltiples cambios en el genoma de las células tumorales causado tanto por la existencia de una alta inestabilidad cromosómica que facilita la generación de mutaciones (Hockel y Vaupel 2001), así como por errores en el funcionamiento de los sistemas de reparación del DNA (Lengauer *et al.* 1998) o por factores hereditarios o ambientales.

La importancia adquirida por determinados procesos en los últimos años ha llevado a que Hanahan y Weinberg amplíen de seis a diez el número de características (*Hallmarks* en inglés) que definen una célula tumoral en una reciente revisión (Hanahan y Weinberg 2011). Las características incluidas se resumen en la capacidad de las células tumorales para evadir la destrucción por parte del sistema inmune, promover la inflamación, reprogramar sus propias necesidades metabólicas y la adquisición de una inestabilidad cromosómica que favorezca las mutaciones. Además, resaltan la importancia de las células normales presentes en los tumores y que contribuyen a la creación de un “microambiente tumoral”, que puede facilitar la adquisición de estas características por parte de las células tumorales.

3.2 Epidemiología del cáncer de pulmón

Entre todos los tipos de cáncer, el cáncer de pulmón presenta la mayor mortalidad en los países occidentales (Parkin *et al.* 2005), y es una de las principales causas de muerte en estos países tras las enfermedades cardiovasculares (Organización Mundial de la Salud OMS, 2002).

Tanto en Europa como en España, el cáncer de pulmón es la segunda neoplasia más común entre los hombres, sólo por detrás del cáncer de próstata, y la cuarta en mujeres, tras los cánceres de mama, colorrectal y de útero. En cuanto a la mortalidad, constituye la primera causa de mortalidad por cáncer en hombres y la tercera en mujeres. Se estima que en Europa hubo 375.765 casos mortales en el año 2008 (OMS). Más concretamente, en España en dicho año murieron por esta causa 16859 hombres (27,55% de las muertes totales por cáncer) y 2624 mujeres (7,12%), lo que supone que 3 de cada 1000 hombres y 2 de cada 1000 mujeres fallecen debido a esta enfermedad (Instituto de Salud Carlos III, ISCIII).

A pesar de los avances alcanzados en las últimas décadas en el campo de la Oncología y de que se haya conseguido reducir la mortalidad en otros tipos de cáncer, la

tasa de supervivencia a los 5 años en el cáncer de pulmón ha permanecido invariable en el 15% (Seve *et al.* 2010). Este hecho se debe en mayor medida a que la detección de estos tumores se realiza en estadios avanzados, cuando la enfermedad es prácticamente incurable.

3.3 Clasificación histológica de los tumores de pulmón

En el año 1967 la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó por primera vez una clasificación histológica del cáncer de pulmón. Posteriormente, esta versión original fue revisada en 1988 y 1999, siendo esta última la versión la vigente en la actualidad (Travis *et al.* 1999). Esta clasificación divide principalmente el cáncer de pulmón en dos grandes grupos: cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés) o no microcítico y cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) o microcítico (Zochbauer-Muller *et al.* 2002).

Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)

El cáncer de pulmón de células no pequeñas es el más común de los dos tipos de cáncer de pulmón y representa el 80% del total de tumores pulmonares diagnosticados (Bach y Ginsberg 2002). Son tumores que derivan de células pulmonares que crecen y metastatizan con más lentitud que los tumores SCLC, por lo que en general son menos agresivos, pero su detección suele ser tardía. Alrededor de un 40% de los casos se detecta como enfermedad metastásica, en un 35% extendida regionalmente y sólo un 25% se encuentra localizado (Molina *et al.* 2008).

Este grupo se puede dividir a su vez en ocho subgrupos (Travis *et al.* 1999), atendiendo al tipo de células donde se desarrolla el tumor (Anexo I). Tres de estos subgrupos son considerados mayoritarios y representan más del 80% de los casos de NSCLC (Provencio *et al.* 2010):

- Carcinoma de células escamosas o epidermoide: Tiene su origen en células basales del epitelio bronquial. Las células suelen presentar características diferenciales tales como la formación de queratina o puentes intercelulares. Presentan un núcleo irregular y con heterocromatina y su citoplasma puede tener vacuolas, al igual que en el caso de los adenocarcinomas. Está directamente relacionado con el tabaco y representa un 30% de todos los casos de cáncer de pulmón.

- Adenocarcinoma: se forma a partir de células de glándulas bronquiales o de células del epitelio bronquial. Su aspecto citológico es complicado, debido a su alta heterogeneidad ya que habitualmente se trata de una mezcla de subtipos histológicos. El núcleo posee un nucleolo prominente y suele tener una localización periférica debido a un desplazamiento por parte de las vacuolas o los gránulos del citoplasma. Es el tumor más frecuente en personas no fumadoras y constituye el 40% de los casos de cáncer de pulmón. A pesar de su alta multiplicidad es un tipo de cáncer asociado con un buen pronóstico.

- Carcinoma de células grandes: es un tipo de cáncer pobremente diferenciado y de origen no bien definido aunque posee características de diferenciación glandular o escamosa. Sus células se caracterizan por una escasa diferenciación y por poseer un núcleo grande y con un nucleolo prominente. Representa aproximadamente el 10% de todos los casos de cáncer de pulmón y su pronóstico es malo debido a la rapidez con la que se extiende (Pass *et al.* 2005).

Cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC)

Son tumores que se originan en los bronquios primarios o vías aéreas de gran calibre. Su pronóstico es malo debido a que se trata de un tumor muy agresivo principalmente por su gran capacidad duplicativa, que aunque responde bien inicialmente a la quimioterapia, frecuentemente presenta recidivas (Zakowski 2003). Además es un tumor muy metastático con cierta tendencia hacia hueso, cerebro, hígado y glándulas suprarrenales. Sus células se caracterizan por poseer vesículas que contienen hormonas neurosecretoras. Supone aproximadamente el 20% de los casos de cáncer de pulmón y está directamente relacionado con el tabaco.

Dentro de este tipo de cáncer existen varios subtipos:

- Carcinoma de células pequeñas.
- Carcinoma mixto de células pequeñas y grandes.
- Carcinoma combinado de células pequeñas (células pequeñas de cáncer de pulmón combinadas con componentes neoplásicos escamosos, glandulares o ambos) (Hirsch *et al.* 1988).

3.4 Estadificación del cáncer de pulmón

Una correcta determinación del estadio de la enfermedad es importante debido a sus implicaciones pronósticas y terapéuticas. Se basa en una combinación de factores clínicos y patológicos y condiciona el tratamiento más adecuado para cada caso. En 1997 tanto el American Joint Committee on Cancer (AJCC) como la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) adoptaron el Sistema Internacional de Clasificación para el Cáncer de Pulmón Revisado, cuya versión fue actualizada por última vez en 2010. Este sistema es conocido también con el nombre de TNM (Mountain 1997), pues evalúa el tamaño y localización tumoral (T), el grado de afección de los ganglios linfáticos (N) y la presencia de metástasis (M). En la práctica suelen emplearse agrupaciones de estos criterios por estadios, que se resumen en el Anexo II.

3.5 Factores de riesgo

Se han descrito numerosos agentes que pueden estar relacionados con la formación del cáncer de pulmón y que se pueden agrupar en tres grupos:

- Agentes ambientales como el tabaco, que es el agente etiológico más conocido, y que, de hecho, el 85% de los carcinomas pulmonares se asocian al consumo de tabaco. (Otterson *et al.* 1992). Otros agentes ambientales importantes son la exposición a asbesto o polvo de sílice frecuente en trabajadores de la construcción (Becklake *et al.* 2007), radón o la polución ambiental (Boffetta 2006).

- Alteraciones genéticas como son mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores de los que se hablará más adelante.

- Enfermedades previas, como son las patología bronquiales como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), el enfisema pulmonar, la neumonía, la tuberculosis, el asma o la fibrosis pulmonar idiopática (Samet *et al.* 1986; Mizushima y Kobayashi 1995) o infecciones víricas. Se ha asociado al papilomavirus humano con la generación de carcinomas pulmonares (Beutner y Tying 1997) mediante la inhibición de p53 (Cheng *et al.* 2007; Giuliani *et al.* 2007).

3.6 Alteraciones moleculares frecuentes en el cáncer de pulmón

Se han demostrado la existencia de hasta 20 alteraciones genéticas y epigenéticas que actúan de modo secuencial en desarrollo del tumor (Sekido *et al.* 2003).

Uno de los mecanismos que contribuyen en mayor medida a la aparición de estas mutaciones es el incremento de la inestabilidad genómica, que incluye tanto alteraciones a nivel cromosómico como a nivel de microsatélites (Lengauer *et al.* 1998). De hecho, mediante análisis de polimorfismos (SNPs) a gran escala se han detectado 57 alteraciones en número de copia en 26 brazos cromosómicos, así como 31 eventos más focalizados, tanto en ganancia como en pérdida de material genético (Weir 2007). Dentro de todas las posibles pérdidas, la de fragmentos en el brazo corto del cromosoma 3 es una de las alteraciones más frecuentes (100% de SCLC, \geq 90% de NSCLC). En lo que respecta a ganancias, destaca la amplificación de la región 14q13.3, considerada la más recurrente por ocurrir en el 12% de los tumores analizados (Weir *et al.* 2007).

Las mutaciones puntuales de determinados genes también son un mecanismo importante en el cáncer de pulmón y por lo menos en 26 genes ha sido descrita una alta frecuencia de mutación que los relaciona directamente con el proceso de carcinogénesis (Ding *et al.* 2008).

Por último, las modificaciones epigenéticas del DNA son otro mecanismo molecular que pueden originar o colaborar en la carcinogénesis pulmonar mediante la inhibición de la expresión de determinados genes. Entre las modificaciones epigenéticas más frecuentes se encuentran la metilación del promotor y la desacetilación de las histonas (Jones 2005).

Ya sea mediante alguna de estas alteraciones o mediante la combinación de éstas, distintos genes pueden verse afectados. Dependiendo de la función de cada gen y por tanto, de las consecuencias funcionales debidas a su modificación, los genes implicados en carcinogénesis se agrupan en oncogenes o genes supresores de tumores.

Oncogenes: Son genes relacionados con rutas de señalización estimuladoras del crecimiento, por tanto, el aumento de sus niveles de expresión sea cual sea el mecanismo, confiere a la célula capacidad tumorogénica (Lewin 1994). Entre todos los oncogenes conocidos, a continuación se detalla algún ejemplo de entre aquellos que son considerados más importantes en cáncer de pulmón.

Receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR): Se ha demostrado que EGFR está sobreexpresado en un 70% de los casos de NSCLC, y HER2 en el 30% (Franklin *et al.* 2002). El tratamiento de tumores que presentan activada esta vía, consiste por lo tanto en la administración de inhibidores de la actividad tirosina-quinasa como erlotinib o gefitinib o anticuerpos monoclonales contra este dominio como cetuximab o trastuzumab.

Ruta de señalización PI3K/AKT/PTEN: el 95% de las líneas celulares procedentes de tumores NSCLC presentan activación de la proteína AKT (Brognard *et al.* 2001) debido principalmente a mutaciones en su secuencia, así como a reducciones en los niveles de expresión de su regulador negativo PTEN (Marsit *et al.* 2005). Además, un 3% de los tumores NSCLC analizados presentaron mutaciones en la subunidad catalítica α de PI3K (Samuels y Velculescu 2004).

MDM2: Se han descrito aumentos en la expresión de esta ubiquitin-ligasa en un 6% de los casos de NSCLC. Esta proteína está considerada un oncogén, ya que induce a la degradación de la proteína supresora de tumores p53 (Higashiyama *et al.* 1997).

La familia Myc (Myc, N-Myc, L-Myc): Familia de fosfoproteínas que actúan como factores de transcripción de factores de crecimiento, mediante la formación de heterodímeros con la proteína Max. Se ha observado que entre un 8-20% de los casos de NSCLC y entre un 18-31% de los de SCLC presentan amplificaciones en los genes que codifican para estas proteínas (Richardson y Johnson 1993).

La ruta de señalización RAS/RAF/MEK/ERK: es la ruta que presenta una mayor asociación con la aparición de carcinoma pulmonar en personas fumadoras. Se han detectado entre un 15-20% de mutaciones activadoras de la actividad GTP-asa de las proteínas de la familia RAS en muestras de NSCLC, entre los que destacan los adenocarcinomas, que presentan una tasa de mutación de hasta un 20-30% (Sekido *et al.* 2003). El 90% de las mutaciones de esta vía se producen en la secuencia de la proteína K-RAS. Como tratamiento en tumores que presenten mutaciones en las proteínas de esta vía de señalización, se han propuesto el uso de inhibidores de la actividad farnesilo-transferasa tales como el tipifarnib o el lobufarnib (Isobe *et al.* 2005).

Genes supresores de tumores: A diferencia de los oncogenes, los genes supresores de tumores se relacionan con vías de señalización implicadas en la inhibición del crecimiento tumoral. Por lo tanto, una inhibición o reducción de sus niveles de expresión favorecería la transformación tumoral. Mientras que en el caso de los

oncogenes una única alteración en alguno de los dos alelos puede conllevar un aumento de la tumorigenicidad de la célula, en el caso de los genes supresores tumorales suele ser necesaria la acumulación de al menos una alteración genética en ambos tal y como postula la “teoría de los dos impactos” (Knudson 1989).

Ejemplos de genes supresores de tumores son:

Gen que codifica para la proteína p53: Conocido como el “guardián del genoma”, este factor de transcripción se activa en respuesta a daño en el DNA y favorece la expresión de genes relacionados con la parada del ciclo celular, hasta que el daño sea reparado, o de factores mediadores de la apoptosis en caso de que no exista la posibilidad de tal reparación (Vousden y Lu 2002). La inhibición de p53 suele ocurrir mediante la mutación del gen que la codifica (TP53), en un 50% de los casos de tumores NSCLC y en un 90% de los SCLC. De éstas, el 80% de los casos se trata de mutaciones puntuales sin sentido, debido a las cuales se generan formas truncadas de la proteína que carecen del dominio de unión al DNA de la proteína, aunque también se han descrito deleciones homocigóticas (Hainaut *et al.* 1998).

Proteína p14ARF: Proteína encargada de estabilizar y potenciar la actividad de p53 mediante la interacción con la proteína oncogénica MDM2. Se observa una ausencia de expresión de esta proteína en el 65% de los tumores SCLC y en el 40% de los NSCLC (Vonlanthen *et al.* 1998).

La ruta de señalización p16INK4a/Ciclina D1/CDK4/Rb: Esta ruta de señalización está implicada en la regulación de la transición entre las fases G1 y S del ciclo celular. La proteína Rb, cuando se halla en un estado de baja fosforilación, se une al factor E2F de modo que se detiene el ciclo celular en la fase G1. La fosforilación de Rb por parte del complejo ciclina D1/CDK4 conlleva una entrada en la fase S, y el avance en el ciclo celular. Este proceso es bloqueado por la proteína p16INK4a que se encarga de inhibir la actividad de CDK4. Se han descrito mutaciones en la proteína Rb o ausencia de expresión en el 90% de los casos de SCLC y en el 15-20% de los casos de NSCLC (Reissmann *et al.* 1993). Por su parte la proteína p16INK4a se encuentra inactivada en el 70% de los NSCLC, mientras que por el contrario es muy frecuente encontrar altos niveles de CDK4 y ciclina D1 en tumores NSCLC (Betticher *et al.* 1996; Wikman *et al.* 2005).

3.7 Detección del cáncer de pulmón

Hasta la fecha se han propuesto numerosos métodos para la detección del cáncer de pulmón, que se pueden clasificar en: técnicas de análisis citológico, técnicas de imagen y el estudio de marcadores tumorales.

Técnicas de análisis citológico

Existen varios métodos para la recogida de la muestra del paciente: lavado bronquioalveolar, punción y aspiración con aguja, broncoscopia y mediastinoscopia (Yasufuku y Fujisawa 2007). En la actualidad, la recogida del esputo constituye la única técnica no invasiva para la recogida de muestra, pero presenta el problema de ser una técnica poco sensible, ya que mediante esta técnica sólo se detectan el 4% de las lesiones.

Sobre estas muestras se realizan análisis tanto histológicos (Zhou *et al.* 1996) como basados en técnicas de Biología Molecular (PCR) (Mao *et al.* 1994) para detectar la expresión de marcadores de lesión pulmonar.

Técnicas de imagen

Actualmente se dispone de numerosas técnicas para la detección de tumores mediante el análisis de imagen utilizando métodos no invasivos, lo que constituye una gran ventaja. Así, por ejemplo hoy en día se utilizan: la radiografía de tórax; la tomografía axial computarizada (CT), la resonancia magnética nuclear (RMN) y la tomografía por emisión de positrones (PET) (Fukuda y Okamura 2007).

Estudio de marcadores tumorales

Los marcadores tumorales, también conocidos como biomarcadores, son proteínas cuyos niveles varían en pacientes de cáncer con respecto a los niveles normales. Estas proteínas generalmente son producidas por las células tumorales y pueden ser específicas del tipo de cáncer. Estas moléculas se pueden detectar según el caso, en la sangre, en orina, en el propio tejido tumoral o en otros tejidos. Los marcadores tumorales más usados en el caso del cáncer de pulmón son:

- El antígeno carcinoembrionario (CEA) (Paganuzzi *et al.* 2001)
- El péptido liberador de gastrina (GRP) (Winther y Reubsæet 2007)
- El ácido siálico total (TSA) (Tanaka *et al.* 2001)
- La ferritina (Yildirim *et al.* 2007)
- α -1-antitripsina y la α -2-macroglobulina (Yang *et al.* 2005)
- La enolasa específica de neuronas (NSE) (Wu *et al.* 2007)
- La proteína C reactiva (CRP) (Hara *et al.* 2007)
- La haptoglobina- α (Bharti *et al.* 2004)

3.8 Tratamiento

Las opciones de tratamiento para el cáncer de pulmón son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, solas o combinadas, dependiendo del estadio del cáncer.

Cirugía

Cuando el tumor está limitado a un hemotórax y se puede abarcar quirúrgicamente la cirugía es la mejor opción. Gracias a la mejora en las técnicas quirúrgicas y anestésicas y a una mejor asistencia perioperatoria, el índice de mortalidad postoperatoria ha disminuido considerablemente durante los últimos 50 años. Hoy en día, la neumonectomía puede efectuarse con un índice de mortalidad de 5,7%, la lobectomía con un índice de 3,5% y las resecciones más pequeñas con una mortalidad del 1% o incluso menor (Ferguson y Lehman 2003; Ma *et al.* 2007b).

Radioterapia

La radioterapia es un tipo de tratamiento oncológico que utiliza las radiaciones ionizantes capaces de dañar el DNA de las células en división de la parte del organismo irradiada (tratamiento local). Los tejidos normales también están sometidos a dicha radiación en mayor o menor medida, según el protocolo de irradiación utilizado. Sin embargo, los tejidos tumorales son más sensibles debido a que proliferan de manera descontrolada y no pueden reparar el daño producido de forma tan eficiente como lo hace el tejido normal, de manera que son destruidos (Moeller *et al.* 2007).

Quimioterapia

En líneas generales, el uso de quimioterapia adyuvante puede considerarse tras una resección radical en los estadios IA/IB y IIA/IIB. Ésta debe administrarse preoperatoriamente en pacientes con enfermedad localmente avanzada (estadio III), y debe combinarse con radioterapia en pacientes con enfermedad localmente avanzada e inoperable (estadio IIIB) y como tratamiento único en pacientes con metástasis o estadio IV (Pass *et al.* 2005); (Centro Nacional del Cáncer de los EEUU, NCI).

Actualmente, no hay un régimen quimioterápico estándar porque la mayoría de los fármacos tiene una actividad moderada. Las respuestas completas a un agente único son extremadamente raras y tienen una duración de respuesta corta. Debido a ello se investigó el uso simultáneo de varios agentes quimioterápicos para mejorar los índices de respuesta (Pass *et al.* 2005). La mayoría de las combinaciones utilizan el cisplatino o sus derivados junto a otro agente asociado. Entre los fármacos más utilizados en asociación con el cisplatino destacan: Docetaxel, Paclitaxel, Irinotecan, Vinorelbina, Gemcitabina, Topotecan, y Etopósido (Charoentum *et al.* 2007; Kocak *et al.* 2007; Ohe *et al.* 2007). Varios de éstos agentes tienen como diana terapéutica a los MTs.

La aparición de resistencias a las combinaciones de estos agentes hace necesario destacar otras posibles moléculas implicadas en la división celular que puedan ser utilizadas en aproximaciones terapéuticas. En el presente trabajo, destacamos la participación de la proteína adaptadora de tubulina, CRMP-2, en la división celular y su expresión y participación en el proceso tumoral, para su valoración como posible diana molecular.

Hipótesis y Objetivos

Los microtúbulos desarrollan una función importante en procesos celulares tan cruciales como la división celular, la adhesión a sustrato, la migración o el transporte de proteínas y orgánulos. Durante la mitosis, los microtúbulos constituyen el huso mitótico. Debido a su intervención en la división celular, los microtúbulos son dianas moleculares de primera magnitud en las terapias frente al cáncer.

En los últimos años se ha descubierto que es esencial la colaboración de las Proteínas Asociadas a Microtúbulos (MAPs) para que los microtúbulos puedan realizar su función correctamente. La familia de las proteínas de respuesta a colapsina o CRMPs constituye un ejemplo de este tipo de moléculas.

La proteína mediadora de respuesta a colapsina tipo 2 (CRMP-2) es una proteína adaptadora de tubulina que interacciona con los heterodímeros de tubulina para unirlos a los microtúbulos crecientes, de modo dependiente de su estado de fosforilación. A pesar de su interacción con tubulina, CRMP-2 ha sido descrita fundamentalmente en tejido nervioso. Pensamos que debido a su participación en la dinámica de los microtúbulos, CRMP-2 puede presentar una expresión o regulación diferencial en las células transformadas con respecto a células primarias y con ello contribuir a la progresión tumoral.

En concreto en este estudio nos propusimos estudiar la función de CRMP-2 en el contexto de carcinoma pulmonar y nos planteamos los siguientes objetivos:

1- Estudiar la expresión de CRMP-2 en células primarias de epitelio bronquial, células inmortalizadas y células transformadas de pulmón y comparar los niveles de expresión y fosforilación de esta proteína en células normales y transformadas, así como su localización subcelular y co-localización con tubulina.

2- Analizar si las variaciones en el estado de fosforilación de CRMP-2 pueden contribuir a la adquisición de propiedades características de tumores agresivos: mayor proliferación y capacidad de migración.

3- Estudiar la participación de CRMP-2 en la mitosis y evaluar si las alteraciones en su grado de fosforilación afectan a la correcta división de las células tumorales.

Material y Métodos

1. Cultivos celulares

1.1 Células utilizadas

Para evaluar la presencia y los niveles de CRMP-2 se utilizó una batería de nueve líneas celulares transformadas obtenidas de carcinoma celular no microcítico de pulmón (NSCLC) (Tabla M-1). Cuatro de dichas líneas celulares proceden de adenocarcinomas (A549, H23, H2087 y H358), tres de carcinomas escamosos (H157, H2170 y H520) y dos de carcinomas de células grandes (H1299 y H460). Todas ellas obtenidas a partir de la Colección de Cultivos Celulares Americana (ATCC).

Se usaron también las líneas inmortalizadas no transformadas BEAS, HBEC 3KT, HBEC 3KT p53 y HBEC 10KT. La línea inmortalizada no transformada BEAS-2B (cedida por el Dr. Dmitrovsky, Centro del Cáncer Memorial Sloan-Kettering de Nueva York) se obtuvo a partir de la inmortalización de células primarias mediante la transfección del Antígeno T del virus SV40. Las células HBEC 3KT y 10KT se obtuvieron a partir de la transfección estable de la proteína CDK4 y de la transcriptasa inversa de la telomerasa humana (hTERT), y sin uso de componentes virales, en células aisladas a partir de pacientes; mientras que las células HBEC 3KT p53 constituyen la población surgida de inhibir los niveles de p53 en la población HBEC 3KT mediante la transfección con vectores que silenciaban la proteína. Las tres poblaciones HBEC fueron cedidas generosamente por el Dr. John Minna del Centro Hamon de Oncología Terapéutica y Departamento de Medicina Interna de la Universidad de Texas).

Se utilizaron, además, células primarias bronquioepiteliales normales NHBE (NHBE cells, Cambrex-Lonza, Barcelona, España) a modo de control; y una línea derivada de neuroblastoma (SH-SY5Y) escogida como control positivo por su elevada expresión de CRMP-2.

Nombre	Origen	Tipo celular	Morfología	Tipo de crecimiento	Medio de cultivo
NHBE	Pulmón	Células bronquioepiteliales normales	Epitelial	Adherente	BEBM completo
BEAS	Pulmón	Células inmortalizadas no transformadas de pulmón	Epitelial	Adherente	DMEM+ HAMF12 (1:1) 10% FC
HBEC 3KT	Pulmón	Células inmortalizadas no transformadas de pulmón	Epitelial	Adherente	Keratinocyte SFM completo
HBEC 3KT p53	Pulmón	Células inmortalizadas no transformadas de pulmón	Epitelial	Adherente	Keratinocyte SFM completo
HBEC 10KT	Pulmón	Células inmortalizadas no transformadas de pulmón	Epitelial	Adherente	Keratinocyte SFM completo
A549	Pulmón	NSCLC adenocarcinoma	Epitelial	Adherente	RPMI 10% FC
H1299	Pulmón	NSCLC carcinoma de células grandes	Epitelial	Adherente	RPMI 10% FC
H157	Pulmón	NSCLC carcinoma escamoso	Epitelial	Adherente	RPMI 10% FC
H2087	Pulmón	NSCLC adenocarcinoma	Epitelial	Adherente	RPMI 10% FC
H2170	Pulmón	NSCLC carcinoma escamoso	Epitelial	Adherente	RPMI 10% FC
H23	Pulmón	NSCLC adenocarcinoma	Epitelial	Adherente	RPMI 10% FC
H358	Pulmón	NSCLC adenocarcinoma bronquioalveolar	Epitelial	Adherente	RPMI 10% FC
H460	Pulmón	NSCLC carcinoma de células grandes	Epitelial	Adherente	RPMI 10%FC
H520	Pulmón	NSCLC carcinoma escamoso	Epitelial	Adherente	RPMI 10% FC
SH-SY5Y	Sistema nervioso	Neuroblastoma	Epitelial	Adherente	DMEM+ HAMF12 (1:1) 10% FC

Tabla M-1: Cultivos celulares utilizados.

1.2 Medios de cultivo

Las células primarias NHBE fueron cultivadas en el medio completo BEBM complementado con los factores de crecimiento y suplementos específicos BEGM *SingleQuots* (Cambrex-Lonza), según las cantidades y concentraciones sugeridas por la casa comercial. Las células inmortalizadas no transformadas BEAS se cultivaron en medio DMEM+HamF12 (Cambrex-Lonza), en una proporción 1:1, que fue suplementado de la misma manera que en el caso de las células NHBE. Por su parte, para el crecimiento de las distintas poblaciones HBEC se utilizó el medio Keratinocyte SFM suplementado con penicilina/estreptomicina (100 unidades/ml, Cambrex-Lonza), extracto pituitario bovino y hEGF. Las líneas celulares transformadas fueron cultivadas en medio RMPI (Cambrex-Lonza) suplementado con un 10% del suero sintético comercial FetalClone III (HyClone, Thermo Scientific, Wilmington, DE, EEUU) y penicilina/estreptomicina (100 unidades/ml). La línea derivada de neuroblastoma SH-SY5Y fue cultivada en medio DMEM/Ham's F12 (1:1) suplementado con un 10% de FetalClone III. Todas las células se mantuvieron a una temperatura constante de 37°C y en una atmósfera con un 5% de CO₂ en un incubador modelo 371 de Termo Electrón Corporation (Ohio, EEUU).

Todas las células utilizadas son adherentes. Para el crecimiento de las células inmortalizadas BEAS y para las células primarias NHBE se procedió al recubrimiento de la placa de cultivo con una solución 50 µg/ml de colágeno tipo I obtenido en cola de rata (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, EEUU), diluido en PBS con ácido acético 0.2N, con el fin de facilitar su adhesión.

Durante el trabajo con estas líneas celulares se realizaron controles periódicos para descartar la posible contaminación de los cultivos con *Mycoplasma*, utilizando el *Mycoplasma Detection Kit* (Lonza).

1.3 Tripsinización

Tras retirar el medio a las células y lavar con una solución PBS (Anexo III), se incubaron 5 minutos a 37°C con una solución de tripsina (500 µg/ml)/EDTA (200 µg/ml) (Lonza). Trascorrido este tiempo, la tripsina fue neutralizada con medio completo en el caso de las células transformadas y con medio completo suplementado con 200 µl de inhibidor de tripsina (1 mg/ml, Lonza) en el caso de tratarse de células no

transformadas. Las células se recogieron y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por último, las células se resuspendieron en medio completo y sembradas de nuevo.

En caso de ser necesario calcular la concentración celular, se realizó una mezcla consistente en un 70% de PBS, 20% de Tripan blue (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) y 10% del medio que contiene las células, y se procedió a contarlas en una cámara de Neubauer (Brand, Werheim, Alemania).

1.4 Cultivos congelados

Una vez centrifugadas las células se procedió a resuspenderlas en el volumen necesario de medio completo con un 10% de DMSO (Sigma-Aldrich) en una concentración final de 1.5×10^6 células por mililitro. Las células fueron almacenadas inicialmente a -80°C en un contenedor de isopropanol durante 24 horas y, trascurrido este tiempo, se trasladaron a tanques de nitrógeno líquido a una temperatura de -200°C . En el caso de las células primarias NHBE y la línea celular inmortalizada no transformada, BEAS, las células se resuspendieron en el medio de congelación comercial Cryo-SFM (PromoCell, Heidelberg, Alemania).

1.5 Tratamientos a los que se sometieron las células

1.5.1 Incubación en medio carente de factores de crecimiento

Con el fin de estudiar la implicación de CRMP-2 en la supervivencia o en la muerte celular, se sembraron 150 células/mm^2 y tras 24 horas, se realizó un lavado con PBS para eliminar los restos de factores de crecimiento presentes en el suero. Según el diseño experimental las células se mantuvieron en medio sin suero durante 24 o 48 horas

1.5.2 Irradiación con luz ultravioleta (UV)

Para irradiar las células se utilizó un Stratalinker modelo 2400 (Stratagene, La Jolla, CA, EEUU). Las células A549 se sometieron a un pulso de luz UV de una intensidad de $25 \mu\text{F}$. La duración del pulso, de aproximadamente 2 segundos, es

calculada automáticamente por el Stratalinker dependiendo de la intensidad de irradiación establecida.

Para una correcta irradiación, durante ésta se retiró el medio de cultivo, que se volvió a añadir tras el pulso de luz UV. Las células se mantuvieron en el incubador hasta el momento de extraer las proteínas en los tiempos adecuados, considerándose el momento de la irradiación como tiempo igual a 0 horas.

1.5.3 Sincronización de las células en prometafase con Nocodazol

Se sembraron 150 células/mm² de la línea A549 y tras esperar 24 horas se añadió nocodazol diluido en medio de crecimiento completo y a una concentración de 50 nM. Se escogió esta concentración por ser la concentración mínima a la que se observó, mediante citometría de flujo, la sincronización de, al menos, el 80% de la población celular en la fase G2/M a las 16 horas.

2. Obtención y manipulación del RNA

2.1 Extracción de RNA

La extracción de RNA se llevó a cabo utilizando el reactivo TRIzol (Gibco, Carlsbad, CA, EEUU), basado en el método descrito por Chomczynski y Sacchi (Chomczynski y Sacchi 1987), y siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Este reactivo contiene fenol para la separación orgánica, e isotiocianato de guanidina que es un inhibidor de RNasas de modo que se mantiene la integridad del RNA durante el proceso de purificación.

Se retiró el medio de cultivo y se añadió la cantidad necesaria de TRIzol para cubrir la superficie celular. Tras separar las células de la placa, la solución fue recogida en tubos de 1,5 ml y se le añadió un volumen de metanol en relación 1:5 según el volumen añadido de TRIzol. Se agitaron las muestras en un agitador tipo vórtex durante 15 segundos. Tras incubar las mezclas 5 minutos a temperatura ambiente, los tubos fueron centrifugados en una microcentrífuga modelo 5415R de Eppendorf (Hamburgo, Alemania) a 12000 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4°C. Se separó la fase acuosa superior en la que se encuentran el RNA a un tubo limpio y se añadió el mismo volumen de isopropanol que el volumen de fase acuosa recuperado y se agitaron las

muestras. En este punto, se guardaron las muestras durante toda la noche a una temperatura de -20°C para facilitar la precipitación del RNA. Trascorridas 24 horas, se centrifugaron las muestras en las mismas condiciones ya citadas y se decantó la fase acuosa resultante. Se realizaron dos lavados en etanol al 70% en agua DEPC (Sigma-Aldrich). Se volvió a centrifugar y tras descartar de nuevo la fase acuosa, se dejó evaporar el etanol del precipitado. Finalmente, el RNA se resuspendió en un volumen adecuado de agua DEPC y su concentración se midió mediante el uso de un nanodrop modelo ND-1000 de Thermo Scientific.

2.2 Retrotranscripción (RT)

La retrotranscripción del RNA se realizó mediante el uso de cebadores aleatorios o “random primers”. Para lo cual, se incubó 1 μg del RNA total extraído a 37°C durante 1 hora con la mezcla de la reacción que incluye: 1 μl de la enzima transcriptasa inversa MMLV-RT (200 U/ μl , Promega), 4 μl de su correspondiente tampón 5X, 1 μl de la mezcla de dNTP's (10 mM) y 2 μl de los cebadores aleatorios 10X. El volumen final se completa con agua DEPC hasta 20 μl .

2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) semicuantitativa

Se realizaron reacciones PCR utilizando el cDNA obtenido como molde en un volumen final de 20 μl de reacción y utilizando la PCR Master Mix comercial proporcionada por Promega, cuya composición final en la reacción de amplificación es: 25 unidades/ml de TaqDNA polimerasa en un tampón a pH 8,5, 200 mM dATP, 200 mM dGTP, 200 mM dCTP, 200 mM dTTP y 1,5 mM MgCl_2 (Promega). Posteriormente se añadió 1 μl de cada cebador sentido o antisentido a una concentración final de 1 μM y se ajustó el volumen a 19 μl con H_2O libre de RNasas. Finalmente, se añadió 1 μl de cDNA.

El perfil de reacción utilizado fue:

35 ciclos $\left\{ \begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C} \text{ --- } 5 \text{ minutos} \\ 94^{\circ}\text{C} \text{ --- } 45 \text{ segundos} \\ T_m \text{ ----- } 45 \text{ segundos} \\ 72^{\circ}\text{C} \text{ --- } 1 \text{ minuto} \\ 72^{\circ}\text{C} \text{ --- } 5 \text{ minutos} \end{array} \right.$

Posteriormente, los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en geles al 2% de agarosa (como se indica en el apartado 2.5).

La tabla M-2 muestra las condiciones de amplificación para todos los cebadores, así como sus secuencias 5'-3'.

CEBADORES	SECUENCIA	T _m	Ciclos
β-actina	5'- TCTACAATGAGCTGCGTGTG -3'	58°C	35
	5'- GGTGAGGATCTTCATGAGGT -3'		
CRMP-2	5'- GGATCACGGGGTAAATTCCT -3'	60°C	35
	5'- TGCTCCTCTGCAATGATGTC -3'		

Tabla M-2: Cebadores: Secuencia, T_m y número de ciclos.

2.4 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (RT-PCR)

Mediante esta técnica analizamos la expresión de CRMP-2 en las distintas poblaciones celulares utilizadas, respecto a un control interno, en este caso, β-actina. En la PCR a tiempo real los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea, gracias a la emisión de fluorescencia por parte del SYBR Green, fluorocromo que se intercala entre las hebras de DNA. Al intercalarse solamente en el DNA bicatenario la fluorescencia obtenida es proporcional a la cantidad de producto de PCR amplificado.

La mezcla utilizada, por muestra, para realizar la PCR a tiempo real fue: 12,5 µl de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem, Warrington, Inglaterra) (que contiene el fluorocromo SYBR Green, DNA polimerasa AmpliTaq Gold, dNTPs y el tampón adecuado para el funcionamiento de la enzima), 0,75 µl de cada cebador (sentido y antisentido) a una concentración final de 20 µM, 2 µg de cDNA diluido 1:10 en agua ultrapura y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 25 µl. Los cebadores utilizados fueron los mismos que en el caso de la PCR semicuantitativa y que se detallan en la tabla M-2. Todas las reacciones se hicieron por triplicado en el termociclador ABI PRISM 7500 Sequence Detector (Applied Biosystems).

El perfil de cada reacción fue:

50°C --- 2 minutos
95°C --- 2 minutos
40 ciclos { 95°C --- 15 segundos
 60°C --- 1 minuto
 95°C --- 1 minuto
 95°C --- 15 segundos
 60°C --- 1 minuto
 95°C --- 15 segundos

El valor que se obtuvo en la PCR a tiempo real fue el Ct (threshold cycle) que es el número de ciclos en el que la fluorescencia emitida por el fluorocromo SYBR Green es detectable dentro de la fase lineal. Se obtiene así el Ct para la β -actina y el Ct para cada gen. El incremento de Ct (Δ Ct) es la diferencia entre el Ct de cada gen y el Ct para la β -actina, que se tomó como referencia de control de carga. La relación en el número de copias que se obtiene al final de una reacción optimizada es de $2^{(\Delta Ct)}$, y este valor es el que se compara entre las distintas células incubadas, dando idea de la diferencia de expresión entre las distintas poblaciones celulares.

2.5 Electroforesis de DNA en geles horizontales de agarosa

Esta técnica se utilizó tanto para separar los genes amplificados en la reacción de PCR como para la separación de los productos de la digestión realizada con enzimas de restricción de vectores de expresión y poder distinguir los fragmentos de DNA en función de sus diferencias de tamaño.

Antes de la electroforesis se añadió a las muestras tampón de carga (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25% y ficol 15%). La electroforesis se realizó en geles de agarosa inmersos en una solución TAE 1X (Anexo III) a un voltaje constante de 90V durante 60 minutos. Para calcular el tamaño de las bandas obtenidas se incluyeron en el gel, o el marcador de peso molecular 1 Kb plus (Invitrogen, Paisley, Reino Unido), que presenta un patrón de bandas comprendidas entre 100 y 1200 pares de bases (pb) ; o el marcador Lambda Hind III (New England Biolabs, Ipswich, MA, EEUU), cuyo patrón de bandas oscila entre las 564 pb de su fragmento menor y las

23130 pb de su fragmento mayor, dependiendo de cuál se adecuase más al tamaño de las bandas de interés.

Para la realización de los geles se utilizó agarosa de baja electroendosmosis (Pronodisa, Madrid, España) a una concentración del 2% para los productos de PCR semicuantitativa y 1% para los productos de digestión. Al gel se le añadió bromuro de etidio, a una concentración de 1 µg/ml para visualizar las bandas al exponer el gel a la luz ultravioleta. Para el posterior análisis de las imágenes se utilizó el sistema digital Gel Doc (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU).

3. Obtención y manipulación de proteínas

3.1 Extracción de proteínas

3.1.1 Extracción de proteínas totales

Para la extracción de las proteínas totales se lavaron las células dos veces con PBS y se añadió un volumen de tampón RIPA (Anexo III) a la superficie de cultivo, suplementado con una pastilla del cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasa 10X (Roche, Mannheim, Alemania) por cada 10 ml de tampón de extracción de proteínas, NaF a una concentración final de 50 mM y ortovanadato sódico 2 nM, adecuado al tamaño del soporte utilizado para el crecimiento de las células en cultivo. Tras separar las células del sustrato, la solución fue recogida en tubos de un volumen de 1.5 ml que fueron sometidos a 5 o 6 agitaciones breves con vórtex cada 5 minutos y centrifugados a 16000 rpm a 4°C durante 15 minutos. La fase acuosa resultante de esta centrifugación contiene las proteínas totales de la célula.

3.1.2 Extracción de proteínas citosólicas y nucleares

Esta extracción fue llevada a cabo mediante una técnica de fraccionamiento subcelular que se basa en el uso de una solución de lisis poco agresiva que fragmenta las membranas citoplasmáticas en una primera fase, pero mantiene los núcleos intactos, que son lisados en una segunda fase con una solución más agresiva con el fin de obtener exclusivamente las proteínas nucleares.

La solución usada para romper las membranas citoplasmáticas está compuesta de H_3PO_4 5 mM, NaCl 50 mM, sacarosa 150 mM, KCl 5 mM, DTT 2 mM, MgCl_2 1 mM, CaCl_2 0.5 mM, NP-40 0.2% (Sigma-Aldrich), disuelto en agua desionizada y con pH 7.4, al que en el momento de usarlo se le añadió una pastilla del cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasas 10X (Roche) por cada 10 ml de tampón de extracción de proteínas, NaF a una concentración final de 50 mM y ortovanadato sódico 2 nM. Una vez que las muestras son centrifugadas a 10400 rpm durante 5 minutos a 4°C se puede recuperar la fase soluble que contiene la fracción de proteínas citosólicas. El precipitado se resuspende en el tampón anterior sin NP-40 y se centrifugan dos veces en un gradiente de sacarosa durante 5 minutos a 10400 rpm a 4°C con el fin de eliminar las posibles membranas y proteínas citosólicas que pudiesen estar contaminando las fracciones nucleares. El precipitado de esta centrifugación vuelve a ser la fracción nuclear y el sobrenadante de esta centrifugación se desecha. Por último, este precipitado es resuspendido en un tampón de tritón frío (50 mM Tris-HCl; 300 mM NaCl; 0.5% Tritón X-100; pH= 7,5) e incubado en agitación a 4°C durante 30 minutos para posteriormente centrifugar a 16000 rpm durante 10 minutos a 4°C, tras lo cual se recupera la fase soluble que contiene las proteínas nucleares.

3.2 Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas de las muestras se midió mediante el ensayo del ácido bicinonínico BCA (Goldschmidt y Kimelberg 1989), basado en la reducción del Cu^{2+} (azul) a Cu^+ por parte de las proteínas de la muestra, el cual es capaz de reaccionar con el ácido bicinonínico originando una solución morada (Pierce, Rokeford, IL, USA). Todas las determinaciones se hicieron por duplicado. Se tomaron 2 μl de cada muestra y se diluyeron con 8 μl de agua bidestilada estéril en placas de 96 pocillos de fondo plano. Para obtener la recta patrón se dispusieron en la misma placa varios pocillos con cantidades conocidas de seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich), en orden creciente de concentración y se completó con agua bidestilada estéril hasta un volumen de 8 μl . Por último, se añadieron a cada pocillo 2 μl del correspondiente tampón de lisis.

Una vez preparados todos los pocillos con las muestras y la curva patrón de concentraciones conocidas de BSA, se añadió a cada pocillo 200 μl del reactivo del ensayo del BCA y se incubó la placa 30 minutos a 37°C. El reactivo del ensayo se

preparó en el momento, mezclando una parte del reactivo B con 50 partes del reactivo A (BCA Protein Assay Reagent A y B, Pierce). Tras los 30 minutos de incubación se midió la absorbancia a 562 nm. Los valores obtenidos se ajustaron restando el valor del blanco (pocillo sin muestra de proteína). Las concentraciones de las muestras se interpolaron a partir de la recta patrón obtenida al representar los valores de absorbancia de las muestras patrón de BSA frente a su concentración.

3.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS

Se basa en modificaciones del método descrito por Laemmli (Laemmli 1970).

Se utilizaron minigeles de poliacrilamida discontinuos de 0,75 o 1,5 mm de espesor (acrilamida:N,N'-metilenbisacrilamida 37,5:1, Bio-Rad), constituidos por un gel inferior de separación (10% acrilamida/bisacrilamida) preparado en tampón de separación (Anexo III), y un gel superior de compactación (4% acrilamida/bisacrilamida), preparado en tampón de compactación (Anexo III).

La desnaturalización de las muestras se llevó a cabo mezclando 20 µg de las proteínas de cada muestra en tampón de carga con SDS (Sigma-Aldrich) (Anexo III).

Para poder estimar posteriormente el peso molecular de las proteínas detectadas, se utilizaron marcadores de proteínas de peso molecular comerciales (Prestained SDS-PAGE Standards Broad range, Bio-Rad).

La electroforesis se llevó a cabo en cubetas Mini PROTEAN 3 (Bio-Rad) en tampón de electroforesis (Anexo III) a un voltaje constante de 100V y a temperatura ambiente, hasta que el frente de azul de bromofenol presente en los tampones de carga alcanzó el extremo inferior del gel. En el caso de que la proteína de interés fuese CRMP-2 o sus formas fosforiladas, la electroforesis se llevó a cabo durante 2 horas y 30 minutos, descartándose las proteínas de menor tamaño y facilitando la separación de formas proteicas de CRMP-2 de peso molecular similar.

3.4. Transferencia de las proteínas a membrana para inmunodetección (Western blot)

Las proteínas separadas electroforéticamente en los geles de poliacrilamida se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) (Towbin *et al.* 1979) para su

posterior hibridación con anticuerpos específicos. Para ello se utilizó un sistema de transferencia electroforética en tanque de Mini Trans-Blot[®] Cell (Bio-Rad). La transferencia se llevó a cabo a 300mA durante una hora a 4°C en tampón de transferencia (Anexo III).

A continuación, las membranas se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo (TBS-T con un 5% de leche o TBS-T con un 2% de BSA, Anexo III) para evitar la adsorción inespecífica de los anticuerpos a la superficie de la membrana de nitrocelulosa.

Proteína	Obtenido en	Condiciones	Casa comercial
CRMP-2 (C4G)	Ratón	1:10000, 16h, 4°C	IBL International (Hamburgo, Alemania)
CRMP-2 P (3F4)	Ratón	1:10000, 16h, 4°C	No comercial (Cedido por el Dr. Kaibuchi)
CRMP-2 S522	Oveja	1:2000, 16h, 4°C	Kinasource (Dundee, Escocia)
CRMP-2 T509/T514	Oveja	1:2000, 16h, 4°C	Kinasource
GSK-3β P	Ratón	1:2000, 16h, 4°C	Calbiochem-Merck (Darmstadt, Alemania)
Akt	Conejo	1:5000, 16h, 4°C	Cell Signalling (Boston, MA, EEUU)
Akt-P	Conejo	1:5000, 16h, 4°C	Cell Signalling
Caspasa-3 activa	Conejo	1:1000, 16h, 4°C	Cell Signalling
PARP	Conejo	1:1000, 16h, 4°C	Cell Signalling
V5	Ratón	1:5000, 16h, 4°C	Invitrogen
β-actina	Ratón	1:5000, 16h, 4°C	Sigma-Aldrich

Tabla M-3. Anticuerpos primarios utilizados para Western blot.

Seguidamente, se incubaron las membranas con el anticuerpo primario en TBS-T leche o TBS-T BSA durante toda la noche a una temperatura de 4°C. La dilución del anticuerpo primario utilizado se detalla en la tabla M-3.

Se utilizaron tres anticuerpos que reconocen específicamente a la proteína CRMP-2 fosforilada. En la tabla M-4 se muestran los péptidos frente a los cuales se generaron los anticuerpos que reconocen específicamente la fosforilación de CRMP-2 en alguno de sus residuos y se detalla los residuos fosforilados necesarios para su reconocimiento.

Anticuerpo	Tipo	Residuos	Péptido
CRMP-2 (C4G)	Monoclonal	486-528	SRLAELRGVPRGLYDGPVCEV SVTPKTVTPASSAKTSPAKQQA
CRMP-2 P (3F4)	Monoclonal	486-528	SRLAELRGVPRGLYDGPVCEV SVTPKTVTPASSAKTSPAKQQA
CRMP-2 S522	Policlonal	515-528	CASSAKTSPAKQQA
CRMP-2 T509/T514	Policlonal	504-517	CEVSVTPKTVTPAS

Tabla M-4. Péptidos utilizados para la generación de los anticuerpos que detectan la fosforilación de CRMP-2. En negrita se detallan los residuos fosforilados requeridos por cada anticuerpo para el reconocimiento de CRMP-2.

Tras la incubación de los anticuerpos primarios, se realizaron tres lavados de 10 minutos en TBS-T y a continuación se añadió el anticuerpo secundario adecuado marcado con peroxidasa a la dilución correspondiente en TBS-T leche o TBS-T BSA. Los anticuerpos utilizados se detallan en la tabla M-5. Tras esta incubación, se realizaron 5 lavados de 10 minutos en TBS-T.

Proteína	Obtenido en	Condiciones	Casa comercial
Anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa	Oveja	1:10000, 1h, T ^a ambiente	GE Healthcare
Anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa	Cabra	1:5000, 1h, T ^a ambiente	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EEUU)
Anti-IgG de oveja conjugado con peroxidasa	Cabra	1:5000, 1h, T ^a ambiente	Dako (Glostrop, Dinamarca)

Tabla M-5. Anticuerpos secundarios utilizados para Western blot.

Las bandas inmunorreactivas se visualizaron mediante quimioluminiscencia utilizando el kit Lumi-light^{PLUS} Western Blotting de Roche. Para ello se incubaron las membranas con una solución de peróxido de hidrógeno y luminol, que al ser oxidado por la peroxidasa en presencia de los fenoles presentes en las proteínas emite luz de una longitud de onda de 428nm (Whitehead *et al.* 1979). A continuación, se expusieron películas fotográficas sensibles a la luz azul (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) a las membranas durante el tiempo necesario para registrar la señal y se revelaron en un revelador automático (Curix 60 de AGFA-GEVAERT N.V., Bélgica).

3.5 Inmunoprecipitación

Se realizó la técnica de inmunoprecipitación para determinar la interacción existente entre CRMP-2 y tubulina durante la mitosis en células de la línea celular A549.

Tras la extracción de proteínas totales como se describe en el apartado 3.1.1, y evitando congelar y descongelar las muestras para conservar las uniones entre las proteínas, se determinó la concentración de proteínas. Para las reacciones de precipitación, se incubaron 500 μg de proteína, a una concentración de 1mg/ml en tampón RIPA, con 2 μg de anticuerpo α -CRMP-2 durante 1 hora a 4°C en un agitador orbital. A continuación, se añadieron 20 μl de proteína inmunorreactiva A conjugada con agarosa (Sigma) y se incubaron durante 16 horas en agitación orbital a 4°C. Transcurrido este tiempo, se lavaron los complejos proteína/anticuerpo/proteína A con tampón RIPA con sucesivas centrifugaciones a 16000 rpm a 4°C durante 1 minuto.

Al precipitado obtenido se le añadió 20 μl de tampón de carga de electroforesis con β -mercaptoetanol y se hirvieron las muestras durante 7 minutos con el objetivo de romper las interacciones intermoleculares. Tras una centrifugación de 1 minuto, las muestras fueron sometidas a una electroforesis en geles de acrilamida (apartado 3.3), y tras transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa, se detectó la interacción CRMP-2/tubulina hibridando la membrana con un anticuerpo α -tubulina (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Como control de la inmunoprecipitación y de carga se incubó la membrana con el anticuerpo α -CRMP-2 (IBL International).

4. Vectores de sobreexpresión y shRNA de CRMP-2

Con objeto de estudiar el efecto de la sobreexpresión de CRMP-2 en células de NSCLC utilizamos el vector pcDNA3.2/V5/GW/D-TOPO (Invitrogen) que contiene el cDNA de CRMP-2. Para estudiar el efecto del silenciamiento de la proteína se utilizó un vector shRNA que codifica un RNA de interferencia para el RNAm de este gen (pRETROSUPER, Screeninc, Amsterdam, Holanda). Ambos vectores fueron cedidos por el Dr. Manuel Serrano (Departamento de supresión tumoral del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas CNIO, Madrid). Los mapas de ambos vectores se incluyen en la figura M-1.

La secuencia CRMP-2 contenida en el vector pcDNA3.2/V5/GW/D-TOPO fue modificada mediante mutagénesis dirigida (apartado 4.1) con el fin obtener construcciones fosfomiméticas y fosfodefactivas de CRMP-2 y analizar los efectos de la fosforilación en la posición Ser522 de CRMP-2 en la dinámica celular. Para ello, se realizaron mutaciones en la secuencia TCT comprendidas entre las bases 1567 y 1569 por la secuencia GAT y que resultaba en una sustitución del aminoácido Ser por un Asp (forma fosfomimética de la proteína); y otro en el que la misma secuencia se sustituía por GCT, de modo que se obtiene el aminoácido Ala (forma fosfodefactiva).

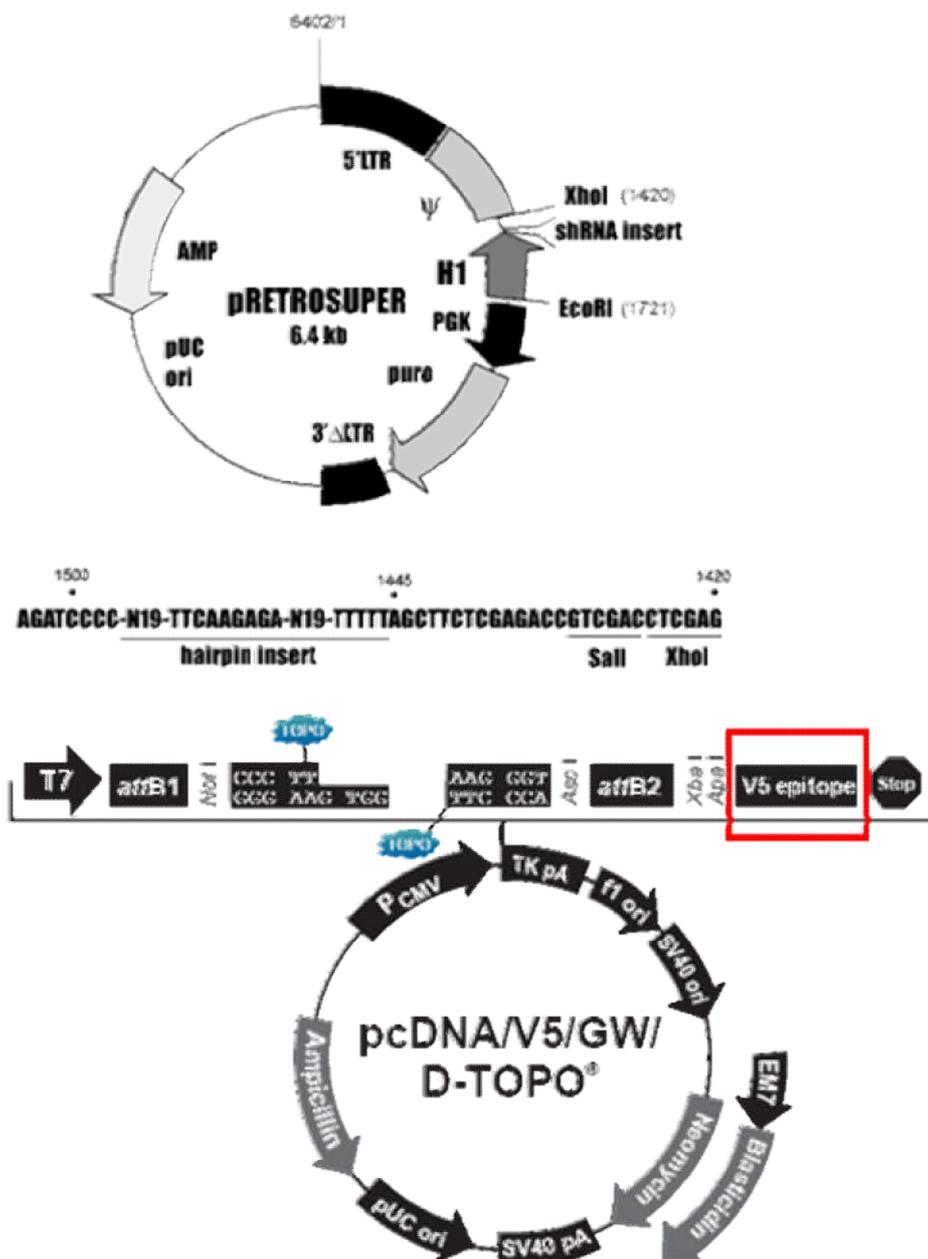


Figura M-1: Mapas de los vectores utilizados para sobreexpresar la proteína CRMP-2 (pcDNA/V5/GW/D-TOPO) y para inhibir los niveles de la proteína (pRETROSUPER).

Además, para poder estudiar la función de CRMP-2 y de sus formas mutadas *in vivo* se construyeron nuevos vectores plasmídicos en los que se subclonaron estas secuencias en el vector pEGFP-C1 que expresa en cis la proteína verde fluorescente (GFP) (Apartado 4.2).

4.1 Mutagénesis dirigida

La mutagénesis dirigida es una técnica que permite sustituir, incluir o suprimir bases nucleicas de una secuencia original. El kit utilizado (QuickChange Site Direct Mutagenesis, Stratagene) se basa en realizar una PCR con una Taq polimerasa de alta fidelidad de copia (Pfu Turbo de Invitrogen) para amplificar completamente el vector de expresión original utilizando cebadores en los que se ha incluido la mutación deseada. El resultado de dicha PCR es un nuevo vector que incluye la mutación deseada y que, al no estar metilado, no es sensible a la enzima DpnI con la que se digiere el vector original metilado.

Se realizó esta técnica con el fin de sustituir el aminoácido susceptible de fosforilación Ser522 por los aminoácidos Asp (D) y Ala (A) y así disponer de las respectivas formas fosfomiméticas y fosfodefactivas de la proteína. Los cebadores generados y las mutaciones realizadas se resumen en la tabla M-6.

Para la PCR y la subsiguiente digestión se utilizaron las enzimas, concentraciones y tiempos indicados en las instrucciones propuestas por la casa comercial; y el producto resultante se transformó en bacterias competentes (apartado 5)

El perfil de reacción utilizado para la PCR fue:

95°C --- 5 minutos
 16 ciclos { 95°C --- 30 segundos
 55°C --- 1 minuto
 68°C --- 5 minutos

CEBADORES	SECUENCIA	MUTACIÓN
S522A	5'- CCTGCTGCTTGGCAGGAG <u>CC</u> GTCTTGGCCGAGGAGG - 3'	5' AC <u>GG</u> CTCCTGCC - 3'
	5'- CCTCCTCGGCCAAGACG <u>G</u> TCCTGCCAAGCAGCAGG - 3'	3' - TG <u>CC</u> GAGGACG - 5'
S522D	5'- CCTGCTGCTTGGCAGGAT <u>CC</u> GTCTTGGCCGAGGAGG - 3'	5' - AC <u>GAT</u> CCTGCC - 3'
	5'- CCTCCTCGGCCAAGACG <u>GAT</u> TCCTGCCAAGCAGCAGG - 3'	3' - TG <u>CTA</u> GGGACG - 5'

Tabla M-6: Cebadores utilizados y mutaciones generadas en la mutagénesis dirigida. En negrita se representa el codón que codifica para el aminoácido que se desea sustituir. Se subrayan las bases nucleicas implicadas en cada sustitución.

4.2 Generación del vector pEGFP-C1-CRMP-2

Con el objetivo de poder estudiar a tiempo real la función de CRMP-2 y de su fosforilación se introdujeron las 3 secuencias de interés en el vector pEGFP-C1 (Mountain View, CA, EEUU). Este vector contiene una secuencia que codifica la proteína GFP situada en el extremo aminoterminal de la proteína que se desea expresar, donde se insertó la región que codifica CRMP-2. Esto permite obtener en última instancia una proteína de fusión CRMP-2-GFP, en la que la proteína GFP se localiza en el extremo aminoterminal de la proteína, cuya localización puede ser estudiada a tiempo real mediante técnicas de imagen gracias a la emisión verde de la proteína GFP.

Tras comprobar que no existían secuencias diana en la secuencia de CRMP-2 ni en el vector original pcDNA3.2, se seleccionaron las enzimas BglII y Sall (ambas de Takara, Shiga, Japón) presentes en los laterales de la caja de clonado para digerir el plásmido destino pEGFP-C1.

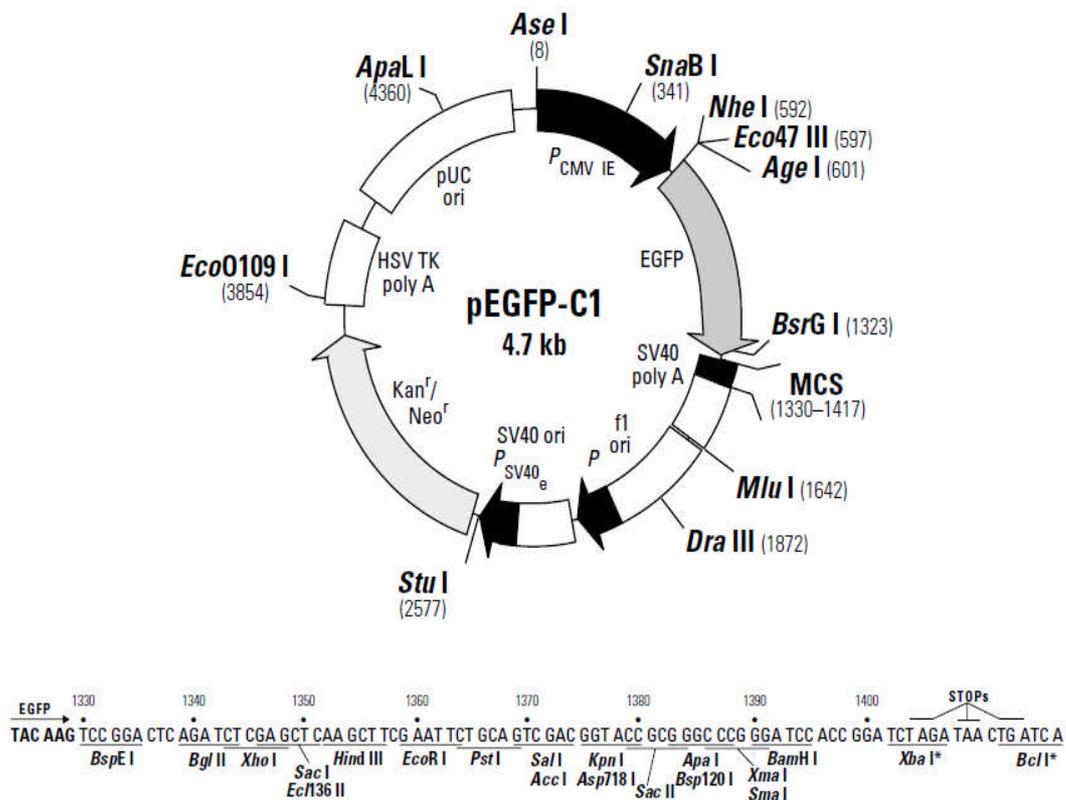


Figura M-2: Mapa del vector pEGFP-C1 que se utilizó para sobreexpresar las formas fusionadas de CRMP-2-GFP.

Se amplificó la secuencia completa de CRMP-2 incluida en el vector pcDNA3.2 mediante una PCR anidada, para lo cual se diseñaron dos parejas de cebadores que

contuviesen las secuencias diana para la enzima BglII en el extremo 5' de los cebadores sentido y para SalI en el extremo 5' de los cebadores antisentido, con el objeto de que posteriormente fuese digerido con dichas enzimas (Tabla M-7).

CEBADORES	SECUENCIA	Tm	Ciclos
PCR 1	5'-CAGATCTTCTTATCAGGGGAAGAAAAATA -3' 5'-GGTCGACCTAGCCCAGGCTGGTGATG -3'	65°C	35
PCR 2	5'-GGACTCAGATCTTCTTATCAGGGGAAGAA -3' 5'-GCGGTCGACCTAGCCCAGGCTGG -3'	69°C	35

Tabla M-7: Cebadores: Secuencia, Tm y número de ciclos usados en la generación del vector pLCGFP-CRMP-2

Las condiciones utilizadas para la amplificación mediante PCR en ambas reacciones fueron:

94°C --- 5 minutos

35 ciclos {

94°C --- 45 segundos

Tm ----- 45 segundos

72°C --- 2 minutos

72°C --- 7 minutos

La Taq polimerasa utilizada fue Pfu turbo de Invitrogen, que se usó por ser considerada una polimerasa de alta fidelidad.

El producto resultante de la PCR fue ligado con un vector pCR2.1 (Invitrogen) mediante el uso del *T/A cloning kit* (Invitrogen), que se basa en la presencia transitoria de una base nucleica A desemparejada en los extremos 3' de los fragmentos amplificados con determinadas polimerasas, como es el caso de la Pfu turbo. Estas bases A desemparejadas son ligadas por la ligasa del kit con las bases T presentes en los extremos 5' del vector pCR2.1 abierto. La reacción de ligación se llevó a cabo en baño a una temperatura de 14°C durante toda la noche. El producto de la ligación fue transformado en células competentes tal y como se detalla en el apartado 5.

Las bacterias transformadas se crecieron durante toda la noche en placas de LB-Agar (Laboratorios Conda, Madrid, España), a las que se le añadió previamente X-gal (50 µg/ml) e IPTG (0.2 mM) inductores del operón LacZ presente en el vector pCR2.1. Se seleccionaron como positivas para la presencia del vector ligado con el inserto, aquellas colonias que presentaban un color blanco y se crecieron en medio LB

(Laboratorios Conda) durante toda la noche a 37°C en un agitador horizontal a 225 rpm. Al día siguiente se realizaron minipreparaciones (*minipreps*) de los cultivos líquidos con objeto de purificar el vector (apartado 5).

Tras secuenciar el producto de las *minipreps* de dichas colonias y verificar que eran correctos, los vectores pCR2.1 que contenían las distintas secuencias de CRMP-2 fueron digeridos con las enzimas BglII y SalI en el correspondiente tampón H (500 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM MgCl₂, 10 mM Ditioneitol, 1 M NaCl) durante una hora en un baño a 37°C. Transcurrido este tiempo se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1% para separar los productos resultantes de la digestión. La banda correspondiente al inserto fue separada y purificada de la agarosa mediante el uso del kit “QIAquick gel extraction” de Qiagen, siguiendo las instrucciones del manual proporcionado por la casa comercial.

El DNA resultante de la purificación fue ligado mediante el uso de la enzima T4 ligasa de Invitrogen con el vector pEGFP-C1, previamente digerido con las mismas enzimas y purificado de la misma manera que el inserto, en un baño a 14°C durante 16 horas. Atendiendo a la relación molar y teniendo en consideración que el vector vacío tiene un tamaño de 5,1Kb y el inserto 1,7Kb, se utilizó una concentración 3 veces mayor del vector con el fin de igualar el número de copias entre el vector y el inserto y conseguir una relación 1:1 entre ambos. El producto de la ligación volvió a ser transformado en bacterias competentes que se dejaron crecer en placas de LB-Agar durante toda la noche en una estufa a 37°C.

Las colonias que crecieron en las placas de LB-Agar, fueron aisladas y tras crecerlas en medio LB líquido durante toda la noche en un agitador horizontal a 225rpm y 37°C, se realizaron *minipreps* para aislar el producto deseado. Los plásmidos obtenidos y susceptibles de contener la secuencia de CRMP-2 deseada fueron, en primer lugar, digeridos mediante las enzimas Bgl II y Sal I. Los productos de esta digestión fueron separados en geles al 1% de agarosa para comprobar la presencia de las secuencias de 1,7Kb y 5,1Kb esperadas. En segundo lugar, estas muestras fueron secuenciadas para comprobar que se trataba de la secuencia correcta. Una vez comprobado, se realizaron *maxipreps* con el fin de obtener elevadas copias del plásmido de gran pureza que poder transfectar en células eucariotas con posterioridad (apartado 5).

5. Transformación de células competentes y purificación de DNA plasmídico (*miniprep* y *maxiprep*)

Para transformar células competentes de *E. coli* Top10F' (Invitrogen) con los plásmidos recombinantes, las células competentes se descongelaron en hielo y se añadieron 2 μ l del plásmido correspondiente. Se mezcló suavemente con la punta de la pipeta para evitar la ruptura de las células competentes y se dejaron 30 minutos en hielo. Posteriormente, se incubaron a 42°C durante 45 segundos, se volvieron a dejar en hielo 2 minutos y se añadieron 500 μ l de medio SOC (2% triptona, 0.5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucosa; de Invitrogen) sin antibióticos. Se incubaron a 37°C durante 1 hora en un agitador horizontal, se sembraron 50 y 200 μ l de este cultivo en placas LB-Ampicilina (100 μ g/ml) y se incubaron a 37°C durante 16 horas.

Transcurrido este tiempo se eligieron cinco colonias de cada placa y se crecieron en 5 ml de LB con ampicilina (100 μ g/ml, Sigma-Aldrich) a 37°C toda la noche. Estos cultivos se utilizaron para la purificación de pequeñas cantidades de DNA plasmídico (5-20 μ g de DNA) mediante la realización de *minipreps*.

Con objeto de obtener una mayor cantidad de DNA se llevaron a cabo *maxipreps* (purificación de hasta 500 μ g de DNA). Para llevar a cabo dicha purificación, primero se crecieron cultivos iniciadores que contenían bacterias extraídas de una colonia crecida en LB-Agar en 5 ml de LB con ampicilina y se mantuvieron a 37°C durante 8 horas. Posteriormente, estos cultivos se añadieron a 250 ml de LB con ampicilina y se crecieron en agitación durante toda la noche a 37°C.

Para la realización de las *minipreps* y *maxipreps* se utilizaron los kits *QIAprep Spin Miniprep* y *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) respectivamente, siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

6. Transfección transitoria de células tumorales

La transfección transitoria permite sobreexpresar o silenciar una proteína con el fin de evaluar los efectos de estas alteraciones en los niveles de expresión de la proteína durante las 24-96 horas siguientes a la transfección.

6.1 Sobreexpresión de CRMP-2 en las líneas de NSCLC A549 y H1299 y en células inmortalizadas BEAS

Las células de carcinoma de pulmón A549 y H1299 y la línea celular no transformada de células bronquiales BEAS se transfectaron con el vector de expresión pcDNA3.2/V5/GW/D-TOPO de CRMP-2 (Invitrogen) utilizando el reactivo FuGENE (FuGENE 6 Transfection Reagent, Roche). Así mismo, la línea celular A549 también fue transfectada transitoriamente con el vector pEGFP-C1 que codifica para la proteína de fusión CRMP-2-GFP.

FuGene 6 es un compuesto lipídico de baja toxicidad para transfectar DNA en las células. Los complejos formados entre el FuGene y el plásmido entran a formar parte de la membrana celular, debido al carácter lipídico del FuGene. Cuando se produce esta unión a la membrana y el complejo se internaliza, éste se rompe quedando el plásmido dentro de la célula.

Las células se crecieron en placas de 6 pocillos (Soria-Greiner) hasta que alcanzaron el 60% de confluencia. En ese momento se realizó la transfección. Para ello, se añadieron, en un eppendorf, 3 µl de FuGENE por cada 1 µg de DNA a transfectar, se completó hasta 100 µl con medio RPMI sin factores de crecimiento ni antibióticos y se incubó la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio a las células y se añadió medio RPMI sin suplementar con factores de crecimiento y los 100 µl de la mezcla.

La eficacia de la transfección se analizó mediante Western blot. Para realizar los experimentos, las células se incubaron a 37°C durante 24 horas antes de tripsinizarlas y comenzar los experimentos.

6.2 Atenuación de la expresión de CRMP-2 en la líneas de NSCLC A549 y H1299

La transfección de la línea de carcinoma de pulmón A549 y H1299 con el vector pRETROSUPER de CRMP-2, se realizó mediante electroporación, ya que no se consiguió silenciar la expresión de CRMP-2 transfectando las células utilizando el reactivo FuGENE 6.

La electroporación es un método de transfección que consiste en someter a las células a un pulso de electricidad de un voltaje y capacitancia determinados,

dependientes de cada línea celular, lo que produce una serie de poros en la membrana de las células que permite la entrada del vector.

Las células se tripsinizaron y se resuspendieron en medio de transfección (Opti-MEM, Gibco, Barcelona, España) a una concentración de 10^6 células/ml. A 500 μ l de estas células se añadieron 10 μ g de DNA en cubetas de electroporación (Cell Projects, Kent, Reino Unido). Una vez que se electroporaron las células, éstas se cultivaron en placas de cultivo con medio RPMI sin factores de crecimiento durante 24 horas. Las condiciones de electroporación utilizadas fueron: 500 V de voltaje y 100 μ F de intensidad para las células H1299 y 250 V de voltaje y 950 μ F de intensidad para las células A549.

Posteriormente, las células se incubaron a 37°C durante 24 horas en medio suplementado con factores de crecimiento. Transcurrido este tiempo, parte de la población se utilizó para analizar mediante WB la eficacia de la transfección, y otra parte se utilizó para llevar a cabo los distintos ensayos funcionales.

7. Obtención de clones celulares establemente transfectados

Los clones estables se seleccionaron incubando las células transfectadas transitoriamente en medio con antibióticos específicos para los cuales existe una secuencia codificadora en los vectores transfectados.

Las células transfectadas con el vector de expresión pcDNA3.2/V5/GW/D-TOPO de CRMP-2 fueron tratadas con gentamicina durante 7 días (Sigma-Aldrich) y las transfectadas con el shRNA pRETROSUPER de CRMP-2 con puromicina (Sigma-Aldrich). Las concentraciones de cada antibiótico fueron determinadas previamente mediante estudios de citotoxicidad con concentraciones crecientes del antibiótico en células no transfectadas donde se determinó la IC50 para cada línea celular. Las concentraciones utilizadas fueron 1 mg/ml para gentamicina para las líneas celulares A549, BEAS y H1299, y de 1 μ g/ml para puromicina en el caso de la línea celular A549 y de 2 μ g/ml para puromicina en el caso de H1299.

Las células que sobrevivieron 7 días al tratamiento con dichos antibióticos fueron aisladas mediante el uso de discos estériles (Sigma-Aldrich) empapados en tripsina y trasladadas a pocillos en una placa de 24 pocillos (Corning). De este modo se obtuvieron clones aislados de cada construcción para cada línea celular que fueron crecidos para su posterior conservación y realización de experimentos.

Se verificó la expresión de la proteína CRMP-2 mediante Western blot, utilizando los anticuerpos C4G (que reconoce tanto la forma endógena de la proteína como de la transfectada) y de anti-V5 (anticuerpo que reconoce el antígeno V5 presente solamente en la secuencia de la proteína transfectada) (Figura M-3).

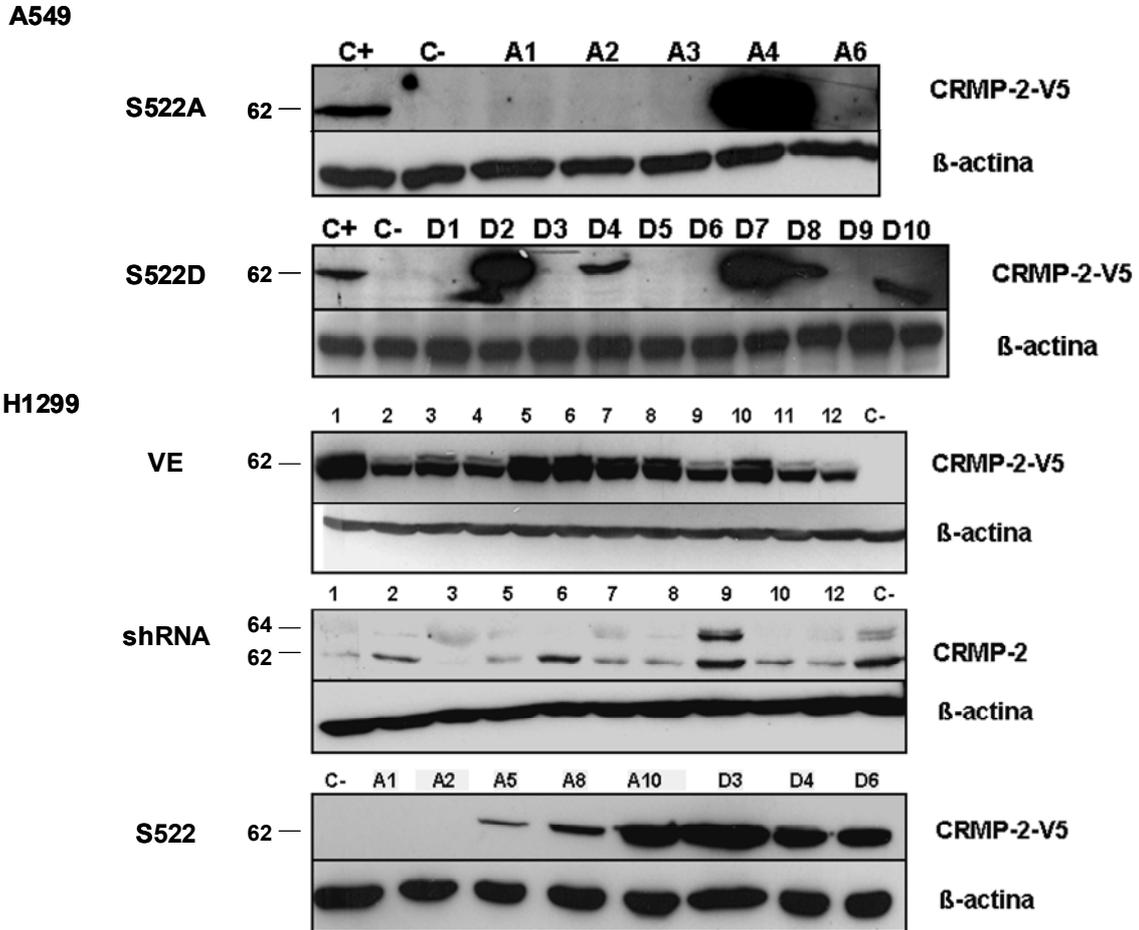


Figura M-3: Validación mediante técnica de Western blot de la obtención de clones establemente transfectados con el vector de expresión pcDNA/V5/GW/D-TOPO de CRMP-2 (VE), CRMP-2 S522A (A) y CRMP-2 S522D (D), y con el shRNA pRETROSUPER de CRMP-2 en la línea celular H1299.

8. Estudio del ciclo celular mediante citometría de flujo

Las células fueron marcadas con yoduro de propidio (IP) que se une al DNA. Se usó esta técnica porque permite evaluar el porcentaje de células de una población que se encuentra en cada fase del ciclo celular atendiendo al patrón de marcaje.

Para realizar la citometría, se sembraron 100 células/mm² en cada pocillo de una placa de 6 pocillos. Una vez que las células se adhirieron al sustrato, se retiró el medio y se cultivaron en medio carente de nutrientes durante 48 horas con el fin de sincronizar

las células en la fase G0/G1 del ciclo celular. Trascurrido este tiempo, se volvió a añadir el medio completo, momento que se consideró como tiempo 0 horas del experimento.

Las células se tripsinizaron y, tras centrifugar y eliminar el sobrenadante, se resuspendieron en 500 μ l de PBS. La fijación de las células se realizó añadiendo 1,4 ml de etanol frío al 70% en PBS y se agitó vigorosamente. Se incubaron las células en hielo durante toda la noche y al día siguiente se centrifugaron. Tras un lavado con PBS, las células se resuspendieron en 560 μ l de PBS y se añadieron 8,75 μ l de RNAsa A (10 mg/ml) por vial de células. Tras una hora de incubación a 37°C y a continuación, se añadieron 17,25 μ l de yoduro de propidio (IP a 1mg/ml, Fluka, Sigma-Aldrich) y se mantuvieron en la oscuridad a 4°C hasta analizar las muestras en el citómetro (FACScan, Becton-Dickinson) a 488 nm. Los resultados fueron analizados mediante el programa CellQuest.

9. Ensayos proliferación con rojo neutro

Los ensayos se realizaron en placas de fondo plano de 96 pocillos, en las que se sembraron 60 células/mm² por pocillo con medio completo. Al cabo de 24, 48 y 72 horas se eliminó el medio por inversión de la placa, se lavaron las células con PBS y se añadieron 200 μ l de medio de cultivo con HEPES (Sigma) a una concentración de 15 mM a todos los pocillos. A continuación se añadieron, a cada pocillo, 50 μ l de una solución filtrada del colorante vital rojo neutro (1 mg/ml), colorante catiónico débil que se concentra en células viables (Sigma-Aldrich), diluída en proporción 1:1 con cloruro sódico (NaCl) al 1,8% P/V en el momento en que va a ser usado. Se deja incubar la placa durante 1 hora y media a 37 °C y 5% de CO₂. Trascurrido este tiempo, se realizaron dos lavados con PBS. Finalmente, se añade a cada pocillo 100 μ l de dihidrogenofosfato sódico (NaH₂PO₄) 0,05 M al 50% en etanol para lisar las células y liberar el colorante. Las absorbancias se leyeron a 540 nm, máximo de emisión del rojo neutro, y a 690 nm como control de fondo en un lector de placas Tecan Sunrise (Hayward, CA, USA). La absorbancia medida es proporcional a la cantidad de colorante liberado y por tanto a la cantidad de células presente en cada pocillo.

10. Inmunofluorescencia de células crecidas en porta

La inmunofluorescencia es una técnica que permite localizar *in situ* una proteína en una célula mediante el uso de anticuerpos que poseen un fluorocromo asociado. Se realizaron inmunofluorescencias indirectas mediante las cuales es posible detectar una proteína con su anticuerpo correspondiente no conjugado y la detección de este anticuerpo con un anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo. Esta emisión puede ser captada en un microscopio de fluorescencia.

Las células fueron sembradas a una concentración de 150 células/mm² sobre un portaobjetos (Menzel-Glaser, Braunschweig, Alemania) previamente colagenizado con una solución 50 µg/ml de colágeno tipo I de cola de rata (BD Bioscience) diluido en PBS con ácido acético 0.2 N. Las células fueron fijadas en una solución de formaldehído al 4% durante 20 minutos. Tras realizar 3 lavados de 5 minutos con TBS 1X (Anexo III), se permeabilizaron las muestras con una solución de tritón X-100 0.5% en TBS 1X durante 10 minutos. Se realizaron nuevamente 3 lavados de 5 minutos y se procedió a bloquear las muestras con suero normal de cabra (SNC) (Sigma-Aldrich) a una dilución 1:10 durante 30 minutos en una cámara húmeda. Posteriormente, se decantó la solución de bloqueo y, sin lavar, se incubaron los anticuerpos primarios correspondientes en cada caso (Tabla M-8) durante 16 horas en una cámara húmeda a 4°C. Al día siguiente, tras realizar 3 lavados de 5 minutos con PBS se incubaron las muestras con los anticuerpos secundarios correspondientes (anti-IgG de ratón o de conejo, ambos de Invitrogen) diluidos 1:200 en TBS 1X. Tras 3 lavados de 5 minutos, los núcleos se marcaron con DAPI II (Abbott Molecular Inc., Abbott Park, IL, EEUU).

Anticuerpo	Obtenido en	Anticuerpo 1°	Anticuerpo 2°	Casa Comercial
α -CRMP-2	Ratón	1:20 16h	1:200, 1h	IBL International
α -tubulina	Conejo	1:400, 16h	1:200, 1h	Abcam
α -V5	Ratón	1:50, 16h	1:200, 1h	Invitrogen
α -ZO-1	Conejo	1:200, 16h	1:200, 1h	Invitrogen
α -Cad E	Ratón	1:100, 16h	1:200, 1h	BD
α -Vimentina	Ratón	1:100, 16h	1:200, 1h	Biocare Medical (Pike Lane, CA, EEUU)

Tabla M-8. Condiciones y características de los anticuerpos usados en la técnica de inmunofluorescencia.

Para realizar los experimentos de colocalización entre 2 proteínas, los dos anticuerpos primarios fueron incubados conjuntamente diluidos en TBS 1X a su correspondiente dilución en las mismas condiciones descritas anteriormente. Los anticuerpos secundarios específicos también fueron incubados simultáneamente.

La inmunotinción de la actina polimerizada, se realizó mediante inmunofluorescencia directa incubando 1 hora a temperatura ambiente con faloidina conjugada con un fluorocromo que emite a 594 nm (Sigma-Aldrich) a una concentración de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. La faloidina es una toxina extraída de la *Amanita phalloides* que tiene la capacidad de unirse exclusivamente a la F-actina o actina polimerizada.

Las preparaciones fueron observadas en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axio Imager M1 y las imágenes fueron captadas y procesadas mediante el programa Axiovision de Zeiss (Oberkochen, Alemania).

11. Microscopía confocal *in vivo*

Se utilizó la microscopía confocal *in vivo* con el fin de estudiar la función de CRMP-2 y su fosforilación durante la mitosis en células A549 que previamente habían sido transfectadas transitoriamente con alguna de las proteínas de fusión CRMP-2-GFP, cuya generación ha sido descrita en el apartado 4.2.

Se sembraron 10^5 células por cada placa de 35 mm^2 con fondo de cristal específicamente preparada para su posterior uso en el microscopio confocal (MatTek Corporation, Ashland, MA, EEUU). A las 24 horas se realizó la transfección de 1 μg de DNA de cada una de las 4 construcciones (vector vacío, S522-GFP, S522A-GFP, S522D-GFP) mediante el agente FuGene 6 (apartado 6.1). 36 horas después de la transfección, se les añadió nocodazol a una concentración de 50 nM durante 16 horas, con el fin de sincronizar las células en el estadio de prometafase.

Transcurrido este tiempo, se retiró el medio con nocodazol y se añadieron 500 μl del agente Draq5, que marca el DNA de células vivas, a una concentración 2,5 mM (Biostatus Limited, Leicestershire, Reino Unido) en cada placa, durante 10 minutos. Una vez retirado el Draq5, se añadió medio RPMI completo y las muestras fueron visualizadas en un microscopio confocal *in vivo* modelo PerkinElmer Ultraview ERS. Se adquirieron fotografías en planos separados por 1 μm en el eje Z, con el fin de captar todo el grosor celular. Las fotografías de cada *stack* se repitieron en series, cada 2 minutos durante 2 horas. Posteriormente, con estas fotografías se montaron videos

mediante el mismo programa informático llamado Ultraview de PerkinElmer (Waltham, MA, EEUU).

En estos videos se midió la duración total de la mitosis en células transfectadas con las distintas construcciones de CRMP-2, comprendida entre el tiempo en el cual se retiró el nocodazol y el momento en el que se observó la escisión total entre las dos células al final de la citocinesis. Así mismo, se midió el tiempo que transcurre desde que se retiró el nocodazol hasta la transición entre la metafase y la anafase o hasta el comienzo de la anafase b, con el fin de evaluar la duración de la prometafase y la metafase en células transfectadas con las distintas formas proteicas de CRMP-2. Para la medición de la duración de la anafase b, se midió el tiempo transcurrido entre el comienzo de esta fase, momento en el cual los ipMTs ensanchan la célula y ésta pierde su forma esférica, hasta el momento en el cual se observa la separación máxima de los polos y comienza la descondensación cromosómica. Por último, para cuantificar la duración de la citocinesis se midió desde el momento en el cual se observa esta separación polar máxima y la descondensación cromosómica hasta la escisión total de las dos células.

12. Medida de la inducción de la apoptosis

La inducción de apoptosis fue medida utilizando un kit de Anexina V-PI comercial (Serotec, Oxford, Reino Unido). La Anexina V reconoce específicamente moléculas de fosfatidilserina que en condiciones normales se sitúan en la cara interna de la membrana celular, pero que en condiciones de apoptosis, quedan expuestos hacia el exterior de la célula. Por su parte, el yoduro de propidio (PI) se une específicamente al DNA y, penetra en las células solamente cuando la integridad de las membranas se ha perdido. Con la combinación de estos 2 agentes se obtienen 3 situaciones de marcaje que representan 3 situaciones celulares distintas: 1) Marcaje Anexina - / PI - que representan a células vivas; 2) Anexina + / PI -, células apoptóticas y 3) Anexina + / PI +, células necróticas.

Las células de las poblaciones celulares obtenidas a partir de la línea celular A549 fueron sembradas en placas de 6 pocillos a una concentración de 100 células/mm² por pocillo. Transcurridas 24 horas, se retiró el medio y se sustituyó por medio carente de suero durante 24 y 48 horas. Transcurrido este tiempo las células se tripsinizaron y se resuspendieron en 200 µl de solución de unión (PBS al 10% de SFB) y se incubaron con

5 μl de Anexina V-FITC durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Las células se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en 190 μl de la solución de unión y fueron marcadas con 10 μl de la solución de yoduro de propidio 1 mg/ml (Sigma-Aldrich).

Se analizaron las células en un citómetro de flujo Becton Dickinson (San José, CA, EEUU) a una longitud de excitación de 488. Los datos fueron obtenidos y analizados mediante el programa CellQuest.

13. Ensayos de migración celular

Este ensayo se llevó a cabo para estudiar como afecta la expresión de CRMP-2 y su fosforilación a la capacidad de migración de las células de NSCLC.

Para estudiar la migración celular se utilizaron cámaras tipo Boyden (Corning, NY, EEUU). Estas cámaras contienen una cestilla cuyo fondo es una membrana de policarbonato con poros de 8 μm de diámetro que permiten el paso de las células. De este modo, sembrando las células en la parte superior de la cestilla se puede determinar cuántas la atraviesan y se quedan adheridas al otro lado de la membrana, tiñendo las células con una solución de cristal violeta al 0,5%.

En la parte inferior de la cámara se añadieron 200 μl de medio de cultivo suplementado con suero al 10%, y en la cestilla se añadieron 4×10^4 células tumorales en 100 μl de medio de migración (RPMI suplementado con 0,5% de BSA y 20 mM de HEPES).

Posteriormente, se mantuvieron las células durante 24 horas a 37°C en un incubador al 5% de CO_2 . Después de la incubación, las células de la cámara superior que no habían migrado se retiraron suavemente con una micropipeta y las posibles células que quedaron adheridas a la parte superior de la membrana se arrastraron utilizando un hisopo. Posteriormente, se lavó la cámara superior dos veces con PBS. Las células adheridas a la parte inferior de la membrana fueron fijadas con formaldehído al 4% durante 2 horas y teñidas durante 10 minutos con cristal violeta. El número de células que migraron se contaron utilizando un microscopio invertido Nikon Eclipse TE2000 (Amstelveen, Holanda) y se cuantificaron cuatro campos por muestra.

14. Adhesión de células a matriz extracelular

Se realizó este ensayo para analizar cómo afecta el nivel de fosforilación de la proteína CRMP-2 a la capacidad de adhesión a distintos componentes de la matriz extracelular en células de la línea celular A549.

Para realizar los ensayos de adhesión, se cubrieron placas de 96 pocillos de fondo plano (Cellstar) con 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ colágeno tipo I (BD Bioscience), 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ colágeno tipo IV, 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ fibronectina o una solución de BSA al 3% como control negativo (Sigma-Aldrich) durante 2 horas a 37°C. Tras eliminar los restos de las matrices, se lavaron los pocillos dos veces con PBS y se bloqueó la adhesión con una solución de BSA al 1% en PBS durante 1 hora a 37°C. Transcurrido este tiempo se lavaron los pocillos para eliminar el exceso de BSA.

Las células se tripsinizaron, se resuspendieron en RPMI sin suero a una concentración de 10^6 células/ml, y se marcaron con calceína-AM (Fluka, Sigma-Aldrich) a una concentración de 10 μM durante 20 minutos a 37°C y en oscuridad, agitándolas suavemente para evitar su sedimentación.

Tras el marcaje, se realizaron tres lavados con RPMI sin suero para eliminar el exceso de calceína y se resuspendieron las células en medio de adhesión (RPMI con BSA al 0,5% y 20 mM de HEPES) a una concentración de 10^5 células/ml. Posteriormente, se añadieron 100 μl de suspensión celular a cada pocillo de la placa recubierto con las distintas proteínas de la matriz y se incubaron durante 30 minutos a 37°C en agitación suave.

Finalmente, se realizaron 3 lavados en medio de adhesión para eliminar las células no unidas de manera específica y se añadieron 100 μl de PBS. A continuación se leyeron las placas en un fluorímetro de placas BMG, modelo Fluostar Optima utilizando una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm. Se hicieron seis réplicas para cada condición y cada experimento se realizó al menos tres veces.

15. Ensayos de formación de colonias en agar blando

Las células normales requieren para su crecimiento el anclaje a un soporte sólido y en caso de no existir tal anclaje, se inicia un proceso de apoptosis. Las células tumorales por el contrario, son capaces de crecer en un medio carente de anclaje. El

ensayo de formación de colonias en agar blando permite comparar la capacidad de distintas poblaciones celulares para formar clones a partir de una única célula. El índice de clonogenicidad se calcula hallando el porcentaje de colonias formadas respecto a células sembradas por pocillo.

Se esterilizó la cantidad deseada de agar noble (Pronadisa, Madrid, España) y se resuspendió en medio RPMI carente de suero y antibióticos hasta una concentración de 1% de agar. Para esta resuspensión es necesario calentar la mezcla de RPMI y agar a más de 40°C, temperatura a la que el agar es líquido, lo que se realizó en un microondas a baja temperatura evitando así que el medio hirviese. Una vez resuspendido, se mantuvo en un baño termostático a una temperatura de 60°C. Esta solución se utilizó para la creación de la denominada capa inferior, formada por una solución de agar diluido al 0.6% en medio RPMI que contenía además penicilina/estreptomicina (100 unidades/ml). Mientras esta capa se enfriaba y solidificaba, se procedió a la tripsinización y recuento de las células de las distintas poblaciones. A continuación, se sembraron 10^3 células por pocillo en una solución de agar al 0.3% en medio RPMI complementado con un 10% de suero y penicilina/estreptomicina (100 unidades/ml), lo que constituyó la capa superior.

Las células fueron mantenidas en incubador durante un período comprendido entre 7 y 10 días a 37°C y 5% CO₂. Trascurrido este tiempo, se procedió al revelado del experimento mediante la adición de 500 μ l de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (10 mg/ml en PBS, Sigma-Aldrich) por pocillo durante 4 horas y se mantuvo en incubación en las mismas condiciones. Tras retirar el exceso de MTT, se añadieron al pocillo 500 μ l de DMSO y se incubó durante toda la noche a 37°C y 5% CO₂.

Al día siguiente, se realizó un recuento del número de colonias crecidas en cada una de las 6 réplicas realizadas y se halló el índice de clonogenicidad de las distintas poblaciones.

16. Experimentación con modelos animales

Estos experimentos se llevaron al cabo con el fin de comparar en un modelo *in vivo* diferencias en la formación de los tumores entre la línea A549 y las 3 poblaciones (A549S522, A549S522A o fosfodefactiva y A549S522D o fosfomimética) derivadas de esta línea en las que se sobreexpresaron la forma nativa de la proteína, la forma proteica

que expresaba la mutación S522A o fosfodefactiva y la forma con la mutación S522D o fosfomimética. Se analizaron características tales como: volumen del tumor, proliferación mediante el estudio de la expresión del antígeno ki67 o muerte celular mediante la detección de la expresión de Caspasa-3 activa y p53.

Para estos experimentos se utilizaron 36 ratones atómicos (Harlan, Indianapolis, IN, EEUU) que se distribuyeron en cuatro grupos. Los ratones fueron mantenidos en jaulas en el animalario con comida y bebida *ad libitum*. El experimento fue realizado de acuerdo a un protocolo aprobado por el comité de ética en experimentación animal de la Universidad de Navarra.

Se inyectaron subcutáneamente 2×10^6 células de las distintas poblaciones resuspendidas en 1 ml de una solución de PBS y Matrigel en una relación 1:1. Trece ratones fueron inyectados con células A549 control, en ambos flancos; nueve ratones, con las células que sobreexpresaban la secuencia nativa de CRMP-2; once ratones con células que sobreexpresaban la forma proteica con la mutación S522A o fosfodefactiva en ambos flancos; y a nueve ratones, se les inyectaron células que sobreexpresaban la forma con la mutación S522D o fosfomimética.

Se realizó un seguimiento del estado general de los ratones y del tamaño tumoral cada 3-4 días a partir del día 8 después de la inoculación y hasta el día del sacrificio de los ratones. Para evaluar el crecimiento tumoral se calculó el volumen del tumor para lo cual se utilizó la fórmula $V = (a^2 + b)/2$, siendo en esta fórmula V, el volumen; a, la longitud tumoral y b, la anchura tumoral, medidas tomadas utilizando un calibre digital. Las medias de los volúmenes de cada grupo fueron comparadas mediante un test ANOVA paramétrico de muestras no pareadas.

Tras el sacrificio de los ratones se extrajeron los tumores de todos los ratones y se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes de 4 μm de cada una de las piezas extraídas y se midieron mediante técnicas de inmunocitoquímica, tal y como se describe en el siguiente apartado, la expresión de Caspasa-3 activa, p53 y ki67 en los tumores.

17. Inmunocitoquímica de tejidos en cortes de parafina

En primer lugar los cortes se mantuvieron en la estufa de 60°C durante 15 minutos para desparafinar las muestras. Posteriormente, se introdujeron los portas en xilol 100% durante 30 minutos para eliminar los restos de parafina y se hidrataron

gradualmente incubando las muestras en etanol absoluto y etanol de gradación decreciente (90%, 80%, 70%), 1 minuto en cada alcohol, y finalmente en agua desionizada. Una vez hidratadas las preparaciones se llevó a cabo la incubación en H₂O₂ al 3% en agua desionizada durante 10 minutos en oscuridad para inactivar la peroxidasa endógena.

Se lavaron las muestras en agua y se trataron durante 20 minutos a 95°C en una olla a presión para desenmascarar los epítomos antigénicos. Las preparaciones se dejaron enfriar y se lavaron en agua desionizada y en TBS. Se secaron los portaobjetos y se añadió a cada muestra 50 µl de suero normal de conejo diluido 1:20 en TBS durante 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda para bloquear las uniones inespecíficas.

Se decantó el suero normal y sin lavar se añadieron los anticuerpo anti-Caspasa-3 activa diluido 1:50, anti-p53 1:150, y anti-ki67 diluido 1:200 en TBS y se incubaron las muestras durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda (Tabla M-9).

Al día siguiente las muestras se lavaron en TBS y se incubaron con el polímero HRP (dextrano unido a anticuerpos monoclonales peroxidados) del kit de Envision (Dako) durante 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda.

A continuación se lavaron las preparaciones en TBS y la reacción antígeno-anticuerpo fue visualizada mediante la precipitación de la diaminobencidina (DAB) (DABplus, Dako) resultado de la reacción catalizada por la enzima peroxidasa. Posteriormente las células fueron contrastadas con hematoxilina.

Por último, se deshidrataron las muestras en alcoholes de gradación creciente (70%, 80% y 90%), alcohol absoluto y xilol, 1 minuto en cada alcohol, y se montaron con el medio de montaje DPX (BDH Chemicals, Poole, Reino Unido).

La cuantificación del marcaje de Caspasa-3, p53 y ki67 en los tumores fue realizada mediante un programa informático desarrollado por la Unidad de Imagen del CIMA que permitía calcular el porcentaje de área marcada en cada foto con respecto al área total de la foto. Se analizaron 10 fotos de cada muestra obtenidas al azar en un microscopio Eclipse 50i de Nikon. Se calculó la media de la intensidad de las 10 fotos de cada muestra. Se realizaron las comparaciones entre las medias de los 4 grupos mediante un test de ANOVA de k muestras independientes.

Proteína	Obtenido en	Dilución	Casa comercial
Caspasa 3 activa	Ratón	1:50	Cell Signalling
Ki67	Ratón	1:200	Cell Signalling
P53	Ratón	1:150	Novocastra (Newcastle upon Tyne, Reino Unido)

Tabla M-9. Condiciones y características de los anticuerpos primarios usados en la técnica de inmunocitoquímica.

18. Análisis estadístico de los datos

El análisis estadístico de los datos cuantitativos se efectuó utilizando el software SPSS 15.0 para Windows. En caso de que las variables estudiadas fueran cuantitativas se comprobó que los datos de las poblaciones en estudio se distribuyen de una manera normal mediante los tests de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilks.

En caso de existir normalidad, los resultados se compararon con el test de T de Student para dos muestras independientes en el caso de querer comparar dos medias y mediante el test de ANOVA de k muestras independientes en el caso de comparar más de 2 medias. En el caso de que se observasen diferencias significativas en el test de ANOVA, las poblaciones fueron comparadas 2 a 2 por medio de contrastes ortogonales y comparaciones post-hoc.

En el caso de ausencia de normalidad se realizaron test de U de Mann Whitney o de Kruskal Wallis, cuyo resultado posteriormente fue desglosado mediante test de U de Mann Whitney, dependiendo de las muestras comparadas.

Por otra parte, las variables cualitativas fueron analizadas mediante un test de contingencia rxn.

En todos los casos, los resultados del test fueron considerados significativos cuando la probabilidad fue menor de 0,05 ($p < 0,05$)* y muy significativos cuando fue menor de 0,01 ($p < 0,01$)**.

Resultados

1. Estudio de la expresión de la proteína CRMP-2 en células epiteliales primarias de pulmón, células inmortalizadas no transformadas y líneas celulares de cáncer de pulmón

Como primer paso en nuestro trabajo, decidimos estudiar la expresión de CRMP-2 tanto a nivel de RNAm como proteico en células primarias bronquioepiteliales de pulmón (NHBE), cuatro líneas celulares procedentes de células epiteliales inmortalizadas no transformadas y nueve líneas celulares obtenidas a partir de células de carcinoma pulmonar (listado en apartado 1.1 de Material y Métodos).

Las líneas celulares fueron seleccionadas de tal manera que incluyesen ejemplos de los tres grandes grupos de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC): adenocarcinoma (A549, H2087, H23 y H358), carcinoma escamoso (H157, H2170 y H520) y carcinoma de células grandes (H1299 y H460).

1.1 Expresión del RNAm del gen CRMP-2

Se evaluaron los niveles de expresión del RNAm que codifica para CRMP-2 mediante PCR a tiempo real y se normalizaron respecto a la expresión de β -actina. Como control positivo, se utilizó la línea celular SH-SY5Y, aislada a partir de neuroblastoma humano que presenta de modo basal niveles altos de expresión de CRMP-2 (Figura R-1). La expresión obtenida para las distintas poblaciones se representa con respecto a la expresión del mismo gen obtenida en las células primarias NHBE. De este modo se agruparon las líneas celulares en tres grupos atendiendo a la cantidad relativa de CRMP-2: 1) muestras que presentaron una expresión de CRMP-2 $\leq 2,5$ veces la expresión de NHBE (expresión baja); 2) muestras que presentaron una expresión de CRMP-2 entre 2,5 y 5 veces la expresión obtenida en NHBE (expresión media); y 3) muestras que presentaron ≥ 5 veces la expresión de NHBE (expresión alta). Como se puede observar en la figura R-1, las células NHBE presentan una expresión del RNAm de CRMP-2 menor que la observada en todas las líneas celulares inmortalizadas. Las cuatro líneas celulares inmortalizadas no transformadas presentaron valores altos de expresión del RNAm de CRMP-2, mientras que hubo más disparidad entre las líneas celulares transformadas: cuatro líneas celulares presentaban una baja expresión de CRMP-2: las células H1299 y H460, dos líneas celulares procedentes de carcinoma de células grandes, así como las líneas celulares H2087 y H2170 que proceden de un

adenocarcinoma y de un carcinoma escamoso respectivamente. Otras dos líneas celulares, H520, procedente de un carcinoma escamoso de pulmón, y H23, que se obtuvo a partir de adenocarcinoma, presentaron valores medios de expresión. Por el contrario, las líneas celulares de adenocarcinoma A549 y H358 y la línea celular de carcinoma escamoso H157 presentaron valores altos de expresión de CRMP-2.

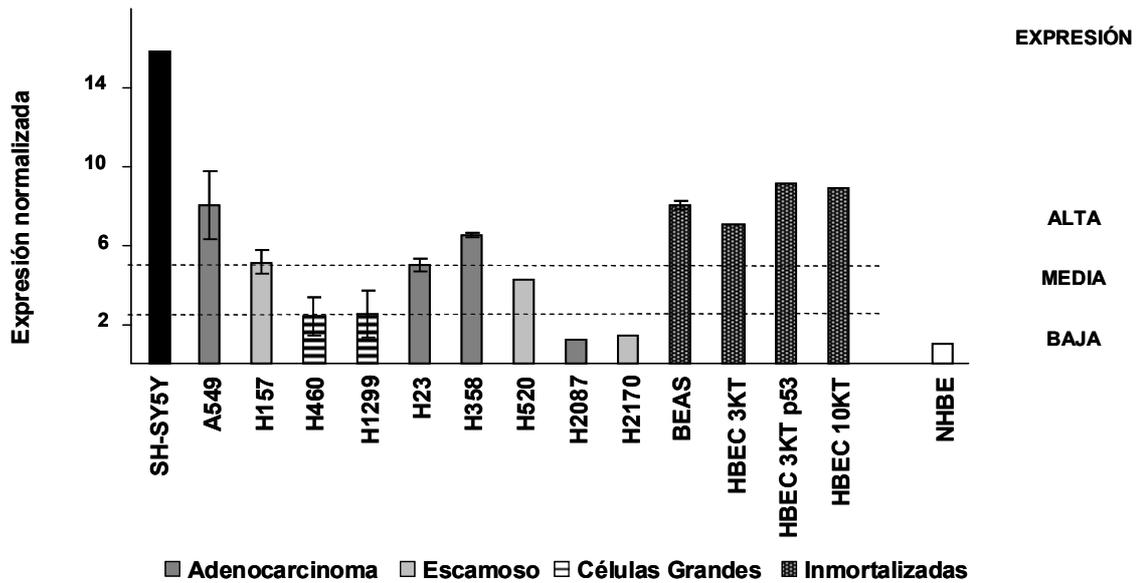


Figura R-1. Análisis de la expresión de RNAm de CRMP-2 mediante RT-PCR. En el eje de ordenadas se representa la expresión relativa de CRMP-2 frente a la expresión de las células primarias NHBE (en blanco). Como control positivo se muestra la expresión en la línea celular derivada de neuroblastoma humano SH-SY5Y (en negro).

Para determinar si existía una relación directa entre la expresión de CRMP-2 a nivel de RNAm y amplificaciones o pérdidas en la región cromosómica que contiene CRMP-2, se evaluó el número de copias de la región cromosómica 8p21-p22 en la que se halla el gen CRMP-2, así como la posible pérdida de heterocigosidad (LOH). Para ello, se utilizaron datos obtenidos a partir del estudio realizado en el Laboratorio de Biomarcadores dirigido por el Dr. Luis Montuenga mediante la hibridación del DNA extraído a partir de estas líneas celulares con el chip *GeneChip®Mapping 500K array* de Affymetrix (Santa Clara, CA, EEUU). A partir de la información obtenida mediante la hibridación con los 500000 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) presentes en el chip, se seleccionaron aquellos que comprendían la región 8p21-p22 y se analizaron mediante el programa Genotyping Console 2.0 de Affymetrix, que permite estimar la LOH de una determinada región.

Se observó que dos de las tres líneas celulares con mayor expresión de mRNA de CRMP-2 (A549, H358), presentaron más de dos copias de esta región cromosómica y el programa predijo heterocigosidad entre las copias cromosómicas; y la tercera línea celular, H157, presentó dos copias de la región y una predicción positiva de heterocigosidad. Por el contrario, entre las cuatro líneas celulares que menos mRNA expresan (H1299, H2087, H2170 y H460) se observó que la línea celular H2087 sólo presentaba una única copia de la región cromosómica, mientras que en dos líneas celulares más (H1299 y H460) se observó un potencial pérdida de heterocigosidad (LOH) (Tabla R-1).

Línea celular	Número de copias	LOH	Expresión
A549	3	Het	Alta
H1299	2	LOH	Baja
H157	2	Het	Alta
H23	2	Het	Alta
H2087	1	LOH	Baja
H2170	3-6	Het	Baja
H358	3-4	Het	Alta
H460	2	LOH	Baja
H520	2-4	LOH	Media
NHBE	2		Baja

Tabla R-1. Variaciones en el número de copias de la región cromosómica 8p21-p22 y potencial pérdida de heterocigosidad (LOH) en las distintas líneas celulares analizadas.

De este modo, se observó una relación entre el número de copias de la región cromosómica que poseían las líneas celulares y la expresión de mRNA de CRMP-2 detectado (Figura R-1). La única excepción la constituyó la línea celular H2170 en la que se detectaban niveles bajos de mRNA y que expresa de 3 a 6 copias de la región 8p21-p22 y no presenta LOH. No obstante, los aumentos en los niveles de expresión de mRNA de CRMP-2 en las distintas líneas celulares son proporcionalmente mayores que los aumentos en el número de copias de la región cromosómica 8p21-p22. Por lo tanto, cabe pensar que, además de la amplificación génica, hay otro mecanismo a nivel transcripcional que participa en el aumento de los niveles de mRNA de CRMP-2.

Por otra parte, analizamos si existía una relación entre la expresión de CRMP-2 y la del factor de transcripción p53 frecuentemente mutado en neoplasias sólidas. Observamos que dos de las tres líneas celulares que expresan p53 (A549 y H358) expresaron niveles altos de mRNA de CRMP-2. En el caso contrario, cuatro de las cinco líneas celulares con mutación o delección homocigótica de p53 (H1299, H23, H2087, H2170) mostraron una expresión baja o media de CRMP-2. Estos datos sugieren una posible relación entre la expresión de CRMP-2 y los niveles de expresión de p53, aunque, sería necesario aumentar el número de líneas celulares analizadas para realizar un análisis estadístico significativo.

LÍNEA CELULAR	TIPO	P53	METÁSTASIS	EXPRESIÓN CRMP-2
A549	AD	WT	No	Alta
H1299	CG	Del Hom	Nódulo linfático	Baja
H157	SCC	E298* Het	No	Alta
H23	AD	M246I Hom	No	Media
H2087	AD	V157F Hom	Nódulo linfático	Baja
H2170	SCC	R158G Hom	No	Baja
H358	AD	WT	No	Alta
H460	CG	WT	Pleura	Baja
H520	AD	W146* Hom	No	Alta

Tabla R-2. Expresión relativa del mRNA de CRMP-2, subtipo tumoral, estado de p53 a nivel genético y el origen metastásico de las líneas celulares transformadas analizadas. AD: Adenocarcinoma; SCC: Carcinoma escamoso; CG: Carcinoma de células grandes. Hom = homocigótico; Het = heterocigótico.

Continuamos nuestro estudio buscando si existía una relación entre la expresión de CRMP-2 en las líneas celulares y su procedencia de tumores primarios o de metástasis. Como se puede observar en la tabla R-2, en las nueve líneas celulares analizadas observamos que todas aquellas líneas celulares que procedían de tumores metastáticos poseían bajos niveles de expresión de CRMP-2 mientras que cinco de las seis líneas celulares que expresaban niveles medios y altos de CRMP-2 procedían de tumores no metastáticos.

1.2 Expresión de la proteína CRMP-2

A continuación, se analizó la expresión de la proteína CRMP-2 en extractos proteicos obtenidos a partir de las células primarias NHBE, las cuatro líneas celulares epiteliales inmortalizadas y no transformadas y las nueve líneas celulares procedentes de carcinoma pulmonar citadas en el apartado anterior, mediante la técnica de Western blot.

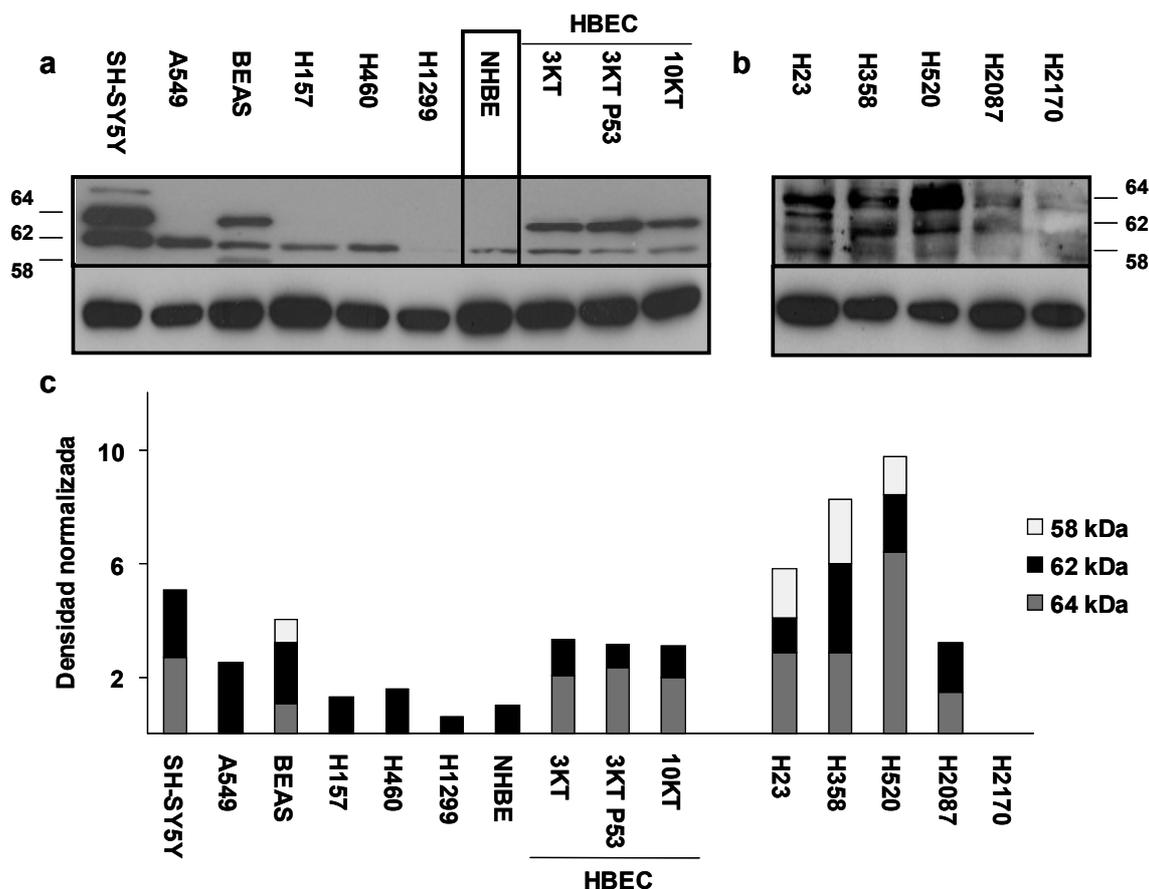


Figura R-2. Expresión de la proteína CRMP-2 medida mediante Western blot a partir de extractos celulares (a y b). En la gráfica inferior (c) se representan los valores de densidad de cada banda inmunorreactiva obtenidos mediante análisis por densitometría. En ordenadas se representa el valor de densidad normalizada (unidades arbitrarias) de cada una de las líneas celulares respecto al valor de las células primarias NHBE. El experimento se llevó a cabo por triplicado. Se muestra un ejemplo representativo de los tres experimentos realizados.

Tal y como sucedió con la expresión de RNAm, se observó que las células primarias NHBE presentan niveles bajos de expresión de la proteína CRMP-2, mientras que las cuatro líneas celulares inmortalizadas no transformadas presentan niveles altos y seis de las nueve líneas celulares analizadas (A549, H157, H23, H358, H460, H520) presentan niveles superiores a los de las células primarias NHBE (Figura R-2). Los niveles proteicos observados se correspondían con los observados a nivel de RNAm. Lo

cual apunta a que la regulación de CRMP-2 en la célula se realiza fundamentalmente a nivel transcripcional, tal y como describimos en trabajos previos de nuestro grupo (Fontan-Gabas *et al.* 2007).

2. Localización subcelular de la proteína CRMP-2 en líneas celulares

Una vez observado que la expresión CRMP-2 se encuentra aumentada en células inmortalizadas y en células transformadas, quisimos estudiar su localización subcelular con objeto de profundizar en su posible función.

2.1 Determinación mediante Western blot

Con objeto de determinar si la proteína CRMP-2 se expresaba tanto en el compartimento citoplasmático como en el núcleo, se obtuvieron extractos de proteínas citoplasmáticas y nucleares de células primarias NHBE, células epiteliales inmortalizadas no transformadas BEAS y de las líneas celulares procedentes de NSCLC A549, H1299, H358 y H460, tal y como se ha descrito en la sección correspondiente de Material y Métodos.

Al analizar la expresión de CRMP-2 en ambos compartimentos subcelulares observamos que:

- 1) La expresión era significativamente mayor, tanto en el citoplasma como en el núcleo, en células inmortalizadas con respecto a células primarias, como se puede observar en el ejemplo de la figura R-3a, en la que se observa la expresión en células, A549 y en las células primarias NHBE.
- 2) Sin embargo, aunque se puede detectar CRMP-2 en ambos compartimentos (Figura R-3b), la proteína CRMP-2 se encuentra en mayor concentración en el citoplasma de células en cultivo. De hecho, para obtener la misma intensidad de banda que en las proteínas citosólicas, las membranas correspondientes a la proteína nuclear tuvieron que ser sobreexpuestas en el momento del revelado.

- 3) En todos los casos, la proteína expresada en el citoplasma tiene un peso molecular de 62kDa, mientras que la proteína detectada en el núcleo presenta un tamaño de 58kDa (Figura R-3b).
- 4) Existe heterogeneidad en la expresión de CRMP-2 en el citoplasma entre las distintas líneas celulares analizadas mientras que los niveles de proteína nuclear observados son similares (Figura R-3b).

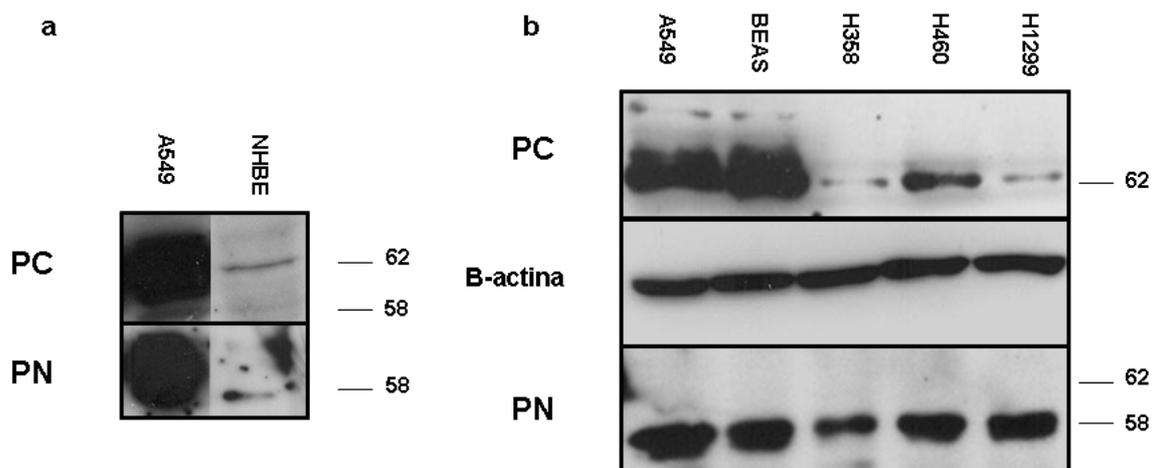


Figura R-3. Estudio de la expresión de la proteína CRMP-2 en citoplasma y núcleo. a) Expresión de CRMP-2 en extractos de proteína citoplasmática (PC) y extractos de proteína nuclear (PN) en la línea celular A549 y las células primarias NHBE. b) Expresión de CRMP-2 en las líneas celulares A549, BEAS, H358, H460 y H1299 en PC y PN. El experimento se llevó a cabo por triplicado. Se muestra un ejemplo representativo de los tres experimentos realizados.

Las diferencias observadas a nivel citoplasmático se corresponden con las diferencias observadas a nivel de extractos totales. Por lo tanto, según este dato las diferencias observadas en la expresión total de la proteína se debe a diferencias en la cantidad de CRMP-2 presente en el citoplasma.

2.2 Determinación mediante inmunofluorescencia

Una vez analizada, a nivel de RNAm y proteína, la expresión de CRMP-2 en células de carcinoma pulmonar, quisimos estudiar mediante técnicas de microscopía su distribución subcelular en células de adenocarcinoma pulmonar. Para ello analizamos mediante marcaje con anticuerpos específicos para CRMP-2 su localización en las células de NSCLC A549. Como se puede observar en la figura R-4, CRMP-2 se encuentra distribuido por todo el citoplasma, con una distribución punteada, presentando mayor intensidad de señal en la zona perinuclear. Tal y como observamos

mediante la técnica de Western blot, la cantidad de proteína en el núcleo es considerablemente menor.

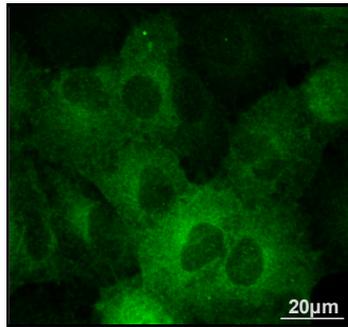


Figura R-4. Estudio de la localización subcelular de la proteína CRMP-2 en la línea celular A549 mediante inmunofluorescencia. Fotografía realizada con un aumento de 200X.

Como CRMP-2 es una proteína que interacciona con proteínas del citoesqueleto (Yoshimura *et al.* 2005), quisimos estudiar la posible co-localización de esta proteína con las proteínas actina y tubulina en células de adenocarcinoma humano A549. En experimentos de co-localización utilizando anticuerpos conjugados con moléculas fluorescentes observamos que, CRMP-2 co-localiza con los microfilamentos de actina por todo el citoplasma, mientras que la co-localización con tubulina está restringida a la zona perinuclear en células en interfase (figura R-5).

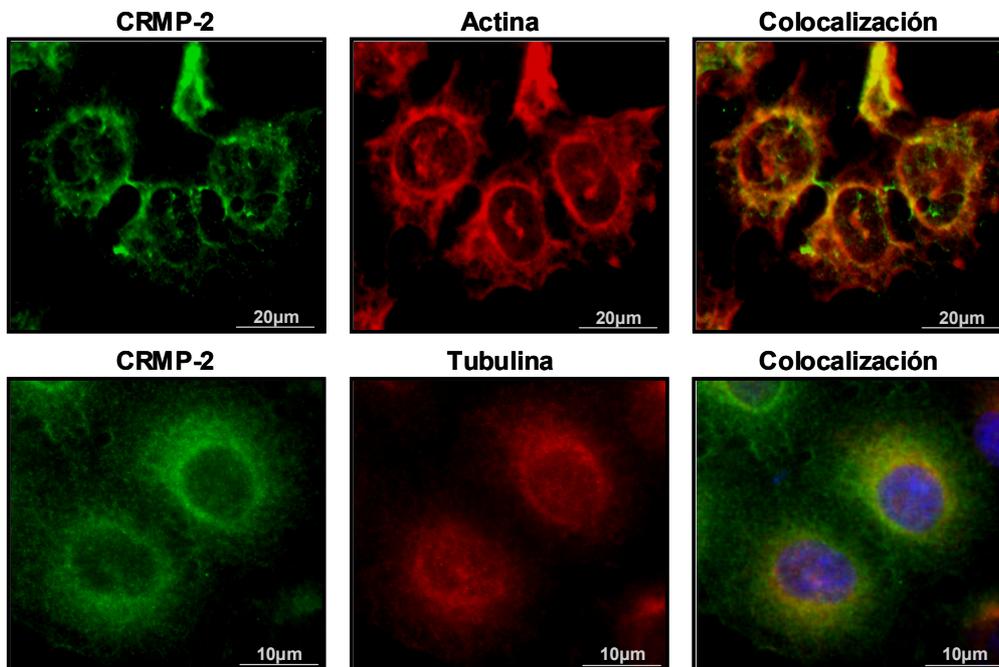


Figura R-5. Localización de la proteína CRMP-2 y actina (parte superior) o tubulina (parte inferior) mediante dobles inmunofluorescencias en la línea celular A549. En verde CRMP-2 y en rojo actina y tubulina respectivamente. Fotografías realizadas con 200 aumentos en el caso de la actina y 400 aumentos en el caso de la tubulina.

3. Estudio de la fosforilación de CRMP-2

CRMP-2 puede ser fosforilada en el residuo Serina 522 por la proteína quinasa CDK5 y en los residuos Treonina 509, Treonina 514 y Serina 518 por la proteína quinasa GSK-3 β . Esta fosforilación modula su capacidad de interacción con tubulina. Con objeto de determinar si, además de existir un aumento de la proteína total, existían variaciones en la fosforilación de CRMP-2 en células de carcinoma pulmonar, se decidió evaluar el estado de fosforilación de CRMP-2 en células primarias, células inmortalizadas no transformadas BEAS y en las 9 líneas celulares procedentes de tumores pulmonares humanos analizadas.

Para ello se utilizaron tres anticuerpos primarios distintos. En primer lugar, utilizamos un anticuerpo monoclonal denominado 3F4 (cedido por el Dr. Kaibuchi, Universidad de Nagoya, Japón), que detecta las fosforilaciones de CRMP-2 sólo cuando se encuentra fosforilado en los tres residuos Thr509, Ser518 y Ser522. Posteriormente, se utilizó el anticuerpo policlonal comercial (PB-044) para detectar exclusivamente la fosforilación en el residuo Ser522, que es un residuo susceptible de fosforilación por la quinasa CDK5, y otro anticuerpo comercial que detecta la fosforilación en Thr509 y Thr514 (PB-043).

Tal y como se observa en la figura R-6, al analizar los niveles de fosforilación de manera conjunta en Thr509, Ser518 y Ser522 de CRMP-2, con el anticuerpo 3F4, se observó que todas las líneas celulares procedentes de células transformadas analizadas (A549, H1299 y H460) presentaban fosforilación de CRMP-2, mientras que las células primarias NHBE y la línea celular inmortalizada no transformada BEAS, no presentaban fosforilación dando a entender que al menos una de las tres fosforilaciones no se halla presente en células no transformadas. En todos los análisis de expresión de proteína fosforilada se observó un patrón de varias bandas inmunorreactivas correspondientes a formas de mayor o menor densidad de fosforilación.

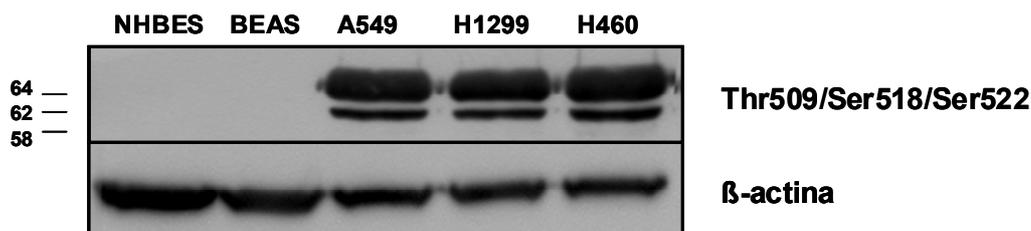


Figura R-6. Estudio de la fosforilación en los residuos Thr509/Ser518/Ser522 de CRMP-2 mediante Western blot con el anticuerpo monoclonal 3F4. El experimento se llevó a cabo por triplicado. Se muestra un ejemplo representativo de los tres experimentos realizados.

Al estudiar por separado la fosforilación de los residuos Ser522 o de los residuos Thr514 y Thr509, observamos que el residuo Ser522 de CRMP-2 se encuentra fosforilado en todas las líneas celulares independientemente de que se trate de células transformadas o no transformadas (Figura R-7), mientras que en células primarias no se detecta fosforilación de CRMP-2 en Ser522.

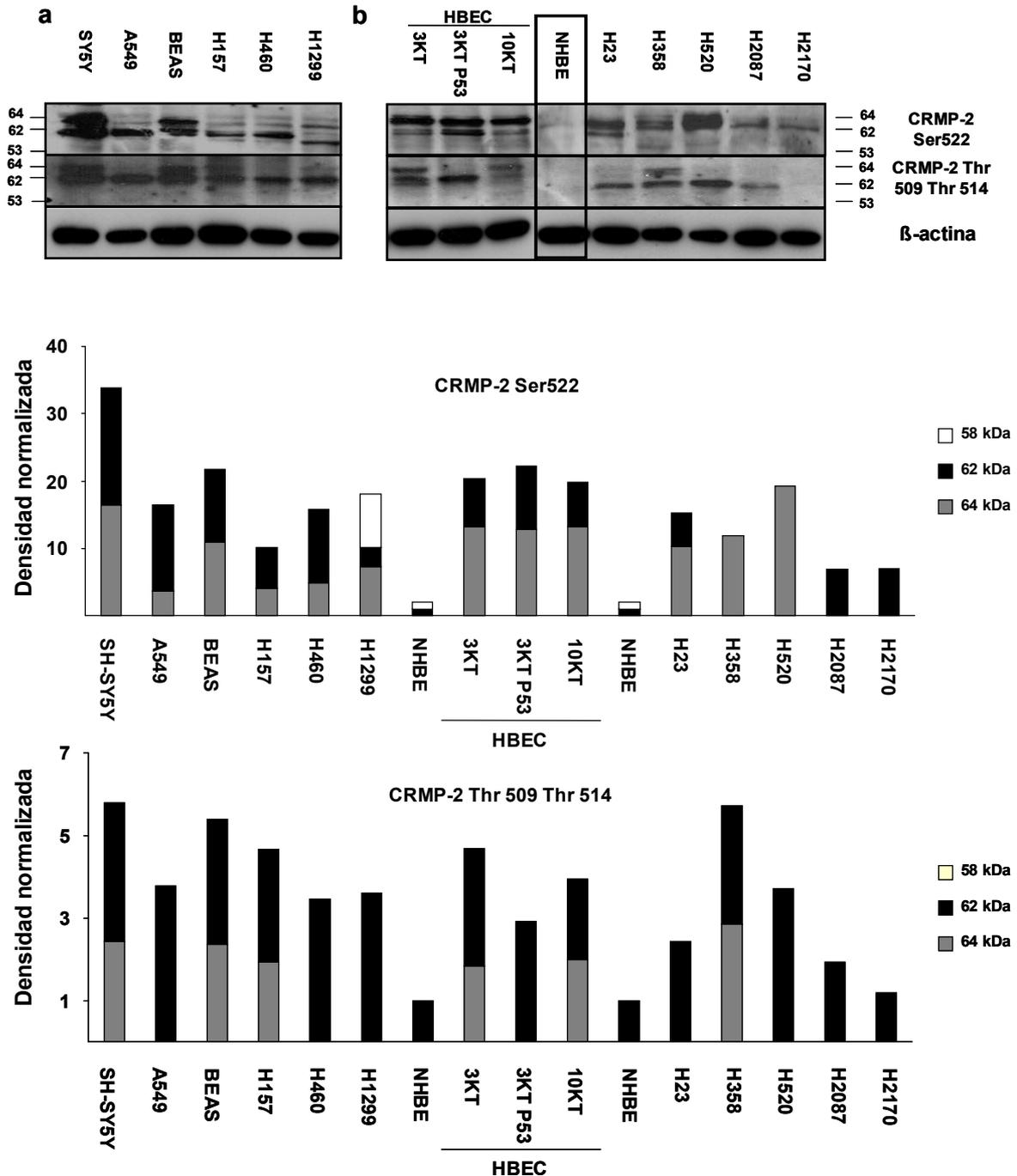


Figura R-7. Estudio de la fosforilación en los residuos Ser522 y Thr509/Thr514 de CRMP-2 mediante Western blot. En las gráficas inferiores se representan los valores de densidad de cada banda inmunorreactiva obtenidos mediante análisis por densitometría en ambos casos. En ordenadas se representa el valor de densidad normalizada (unidades arbitrarias) de cada una de las líneas celulares respecto al valor de las células primarias NHBE. El experimento se llevó a cabo por triplicado. Se muestra un ejemplo representativo de los tres experimentos realizados.

Estos datos indican que en todas las células que no poseen freno para la división celular, CRMP-2 se encuentra fosforilada en Ser522 y apuntan a una posible regulación por proteínas relacionadas con la división celular tal y como sucede en sistema nervioso en el que este residuo es fosforilado por CDK5.

Algo muy similar parece ocurrir cuando se analiza la fosforilación en los residuos Thr509 y Thr514 se detecta fosforilación de la proteína en dichos residuos en todas las líneas celulares transformadas, excepto en la línea celular H2170, y en todas las líneas celulares no transformadas, mientras que no se observa ninguna fosforilación en las células primarias. Por lo tanto, CRMP-2 se fosforila en todas las células inmortalizadas en Ser522 y en prácticamente todas las líneas celulares analizadas en los residuos Thr509/Thr514. No obstante, la fosforilación de CRMP-2 en el residuo Ser518 parece ser específica de líneas celulares transformadas, ya que no se detectó la fosforilación usando el anticuerpo 3F4 (anticuerpo que detecta CRMP-2 específicamente cuando está simultáneamente fosforilado en Thr509, Thr514, Ser518 y Ser522) ni en células inmortalizadas no transformadas BEAS ni en células primarias NHBE, mientras que sí se detectó la fosforilación de los residuos Thr509, Thr514 y Ser522 en estas mismas células cuando se utilizaron anticuerpos que detectan estas fosforilaciones por separado. Los niveles de fosforilación varían en las distintas líneas celulares, sin que se pueda asociar esta variabilidad a ningún tipo histológico. Por el contrario, no se observó fosforilación en células primarias NHBE.

No se detectó fosforilación en condiciones basales ni en Ser522 ni en Thr509 y Thr514, en ninguna de las muestras de proteínas nucleares analizadas (no se presenta Western blot).

4. Expresión de CRMP-2 en el ciclo celular

El hecho de que CRMP-2 estuviese fosforilado en las células inmortalizadas, nos llevó a plantearnos la participación de CRMP-2 en la división celular. Además, como esta proteína interacciona con tubulina, resultaba especialmente interesante estudiar su intervención en la formación del huso mitótico. CRMP-2 interacciona con tubulina de modo dependiente de su fosforilación (Uchida *et al.* 2005); por tanto, nos planteamos en primer lugar estudiar si existían variaciones tanto en la expresión de CRMP-2 como en su fosforilación en las distintas fases de la mitosis. Para ello sincronizamos las células

en fase G2/M mediante tratamiento con nocodazol, y liberamos el freno al ciclo celular y analizamos la expresión de CRMP-2 a distintos tiempos.

El nocodazol es un agente quimioterápico que impide la polimerización de los MTs de tubulina de una manera reversible. Es un agente muy usado en la sincronización celular debido a su capacidad para detener las células en prometafase, lo que facilita el estudio de la mitosis.

Una vez sincronizadas las células tras exponerlas a nocodazol durante 16 horas, se lavaron las células y se les añadió medio completo. Se tomaron muestras a las 0, 1 y 3 horas tras el tratamiento con nocodazol (Post Noc 0h, Post Noc 1h y Post Noc 3h respectivamente).

En la figura R-8a se observa el perfil del ciclo celular de células A549 medido mediante citometría de flujo en células marcadas con yoduro de propidio (PI). En ellas se puede observar cómo en los tiempos Post Noc 0h y Post Noc 1h un 80% de las células se encuentran sincronizadas en la fase G2/M y cómo a las 3h (Post Noc 3h), la mayoría de las células ha terminado esta fase y han entrado en la fase G0/G1 del ciclo, restaurándose de este modo el perfil del ciclo celular normal.

Al analizar el estado de fosforilación de CRMP-2 en estas muestras, observamos, que los niveles de CRMP-2 total o de la fosforilación en Ser522 no varían durante las distintas fases de la mitosis en células inmortalizadas A549, mientras que, por el contrario, los niveles de fosforilación en Thr509 y Thr514 sí que sufrían modificaciones en las distintas muestras (Figura R-8b). Así, en células sincronizadas en la fase G2/M se produce un aumento de la fosforilación en Thr509 y Thr514 de CRMP-2 en la isoforma de 62kDa, y también de la forma de CRMP-2 de 58kDa, en la que el incremento en la fosforilación es muy significativo. Como se observó en la figura R-3, esta forma de 58kDa tiene una localización exclusivamente nuclear en la interfase. Una hora tras la retirada del nocodazol (Post Noc 1h), se observa un descenso en los niveles de fosforilación de CRMP-2 incluso por debajo de los observados en células no sincronizadas. Finalmente, observamos que tres horas después de haber retirado el freno al ciclo celular, aumentan ligeramente los niveles de fosforilación alcanzando los mismos niveles de fosforilación que en células no sincronizadas.

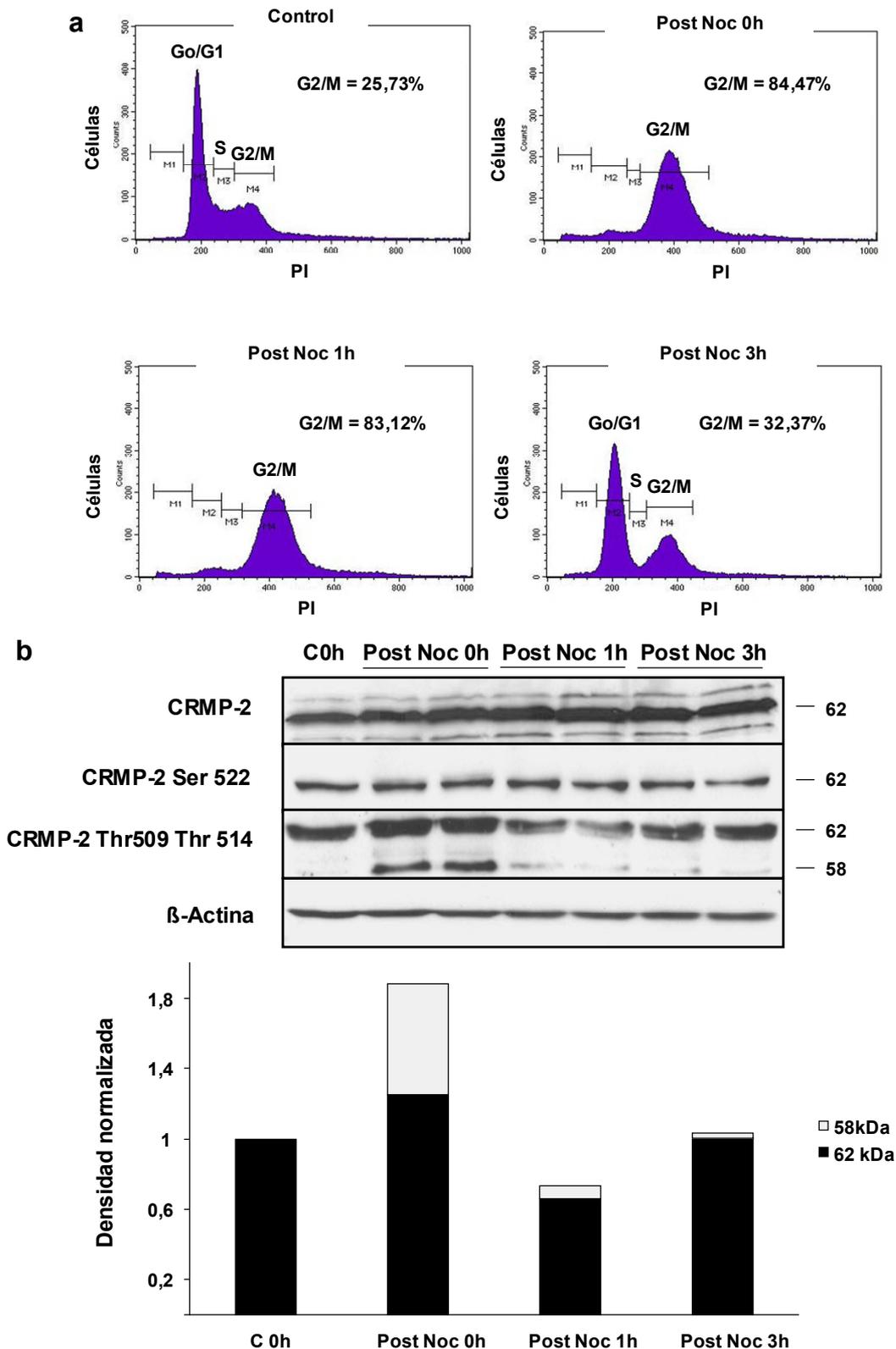


Figura R-8. Sincronización en fase G2/M de la línea celular A549 mediante el uso de nocodazol. Verificación de los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular mediante citometría de flujo en células incubadas con yoduro de propidio (PI) (a), en abscisas se representa la intensidad de marcaje de PI y en ordenadas el número de células. Evaluación de los niveles de expresión y fosforilación de CRMP-2 en células sincronizadas en G2/M y 1 y 3 h tras haber retirado el freno del ciclo celular mediante Western blot (b). Noc = Nocodazol. En la gráfica inferior se representan los valores de densidad de cada banda inmunorreactiva obtenidos mediante análisis por densitometría. En ordenadas se representa el valor de densidad normalizada (unidades arbitrarias) respecto al valor obtenido en el control tiempo = 0 (C0h). El experimento se llevó a cabo por triplicado. Se muestra un ejemplo representativo de los tres experimentos realizados.

Con objeto de confirmar que el aumento en la fosforilación de CRMP-2 ocurría únicamente en células en división, realizamos una separación basada en el distinto grado de adhesión de las células en división (células poco adheridas) y de las células en interfase (células muy adheridas) y analizamos la expresión de proteína CRMP-2 fosforilada por Western blot. De este modo corroboramos que el aumento de la fosforilación en Thr509 y Thr514, tanto de la forma proteica de 62kDa como la de 58kDa, ocurre sólo en aquellas células poco adheridas, y por tanto en división o fase G2/M. Las células adheridas y por tanto en interfase presentan menores niveles de fosforilación (Figura R-9).

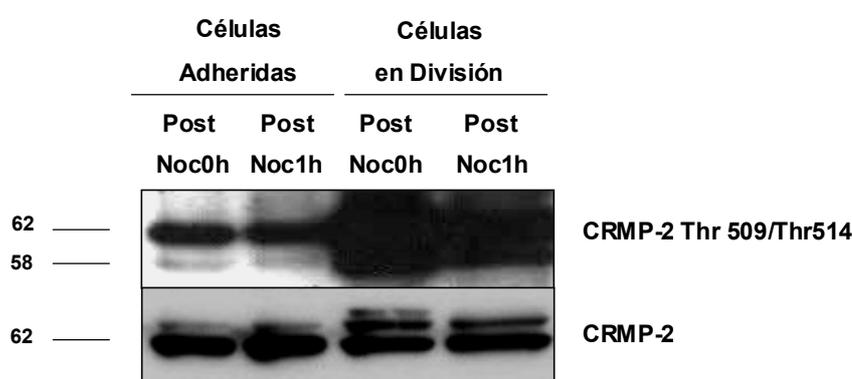


Figura R-9. Estudio mediante Western blot de la fosforilación de CRMP-2 en células sincronizadas en prometafase mediante nocodazol (células en división) y células en interfase (adheridas). Noc = Nocodazol. El experimento se llevó a cabo por triplicado. Se muestra un ejemplo representativo de los tres experimentos realizados.

A continuación quisimos determinar si GSK-3 β es la quinasa que cataliza la fosforilación de CRMP-2 durante el ciclo celular en células de carcinoma pulmonar. CRMP-2 puede ser fosforilada en Thr509 y Thr514 por GSK-3 β que a su vez se inhibe por la fosforilación en su residuo Ser9 llevada a cabo por Akt. Determinamos mediante western blot el grado de fosforilación tanto de Akt como de GSK-3 β en células A549 sincronizadas con nocodazol. Como se puede observar en la figura R-10, en las células A549 sincronizadas en la fase G2/M del ciclo celular, existe un descenso en el grado de fosforilación de Akt que conduce a su inhibición parcial y por tanto a una menor actividad quinasa sobre su diana GSK-3 β , que finalmente conlleva una mayor concentración de GSK-3 β activa para fosforilar a CRMP-2. Una vez retirado el nocodazol, pudimos observar que a la 1 y 3 horas aumenta de nuevo la fosforilación de GSK-3 β que se conlleva una disminución en el grado de fosforilación de CRMP-2.

Estos resultados aportan una evidencia indirecta de que son las mismas proteínas quinasas descritas en células del sistema nervioso las que catalizan la fosforilación de

CRMP-2 en células A549. No obstante, harían falta experimentos de inhibición específica de GSK-3 β para demostrar de modo definitivo que esta quinasa es la responsable de la fosforilación de CRMP-2 en células de carcinoma pulmonar.

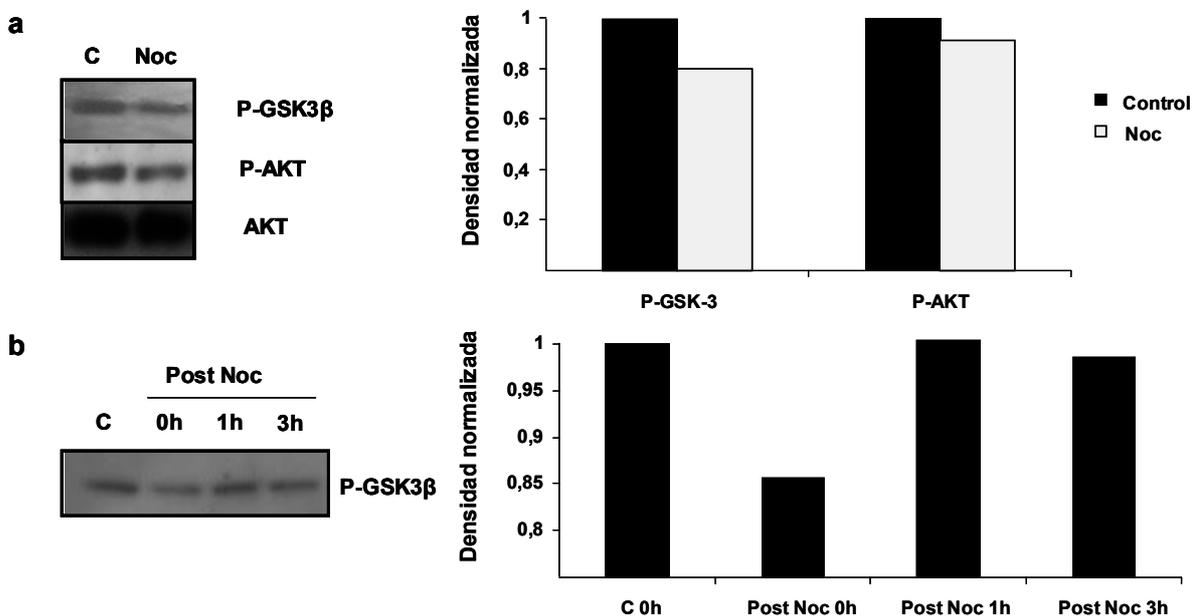


Figura R-10. Evaluación de los niveles de fosforilación de GSK-3 β y Akt en células sincronizadas en prometafase con nocodazol (Noc) mediante western blot (a). Evaluación del nivel de fosforilación de GSK-3 β en células sincronizadas con nocodazol y a las que se retiró el nocodazol durante 1 y 3 horas (b). En las gráficas de la derecha se representan los valores de densidad de cada banda inmunorreactiva obtenidos mediante análisis por densitometría. En el eje de ordenadas de ambas gráficas se representan los valores de densitometría normalizados (unidades arbitrarias) respecto al valor obtenido en el control (C). El experimento se llevó a cabo por triplicado. Se muestra un ejemplo representativo de los tres experimentos realizados.

4.1 Estudio de la fosforilación de CRMP-2 en células A549 atendiendo al grado de confluencia celular

Con objeto de demostrar que las variaciones en la fosforilación de CRMP-2 eran debidas a la proliferación celular y no al tratamiento con nocodazol, utilizamos una aproximación alternativa que consistió en analizar mediante Western blot los niveles de esta proteína en cultivos confluentes (C: 100% de confluencia), subconfluentes (SC: 75% de confluencia) y en confluencia media (MC: 50% de confluencia). Lo hicimos así tras observar que a pesar de ser células transformadas las células A549 disminuyen su ritmo de proliferación en cultivos confluentes.

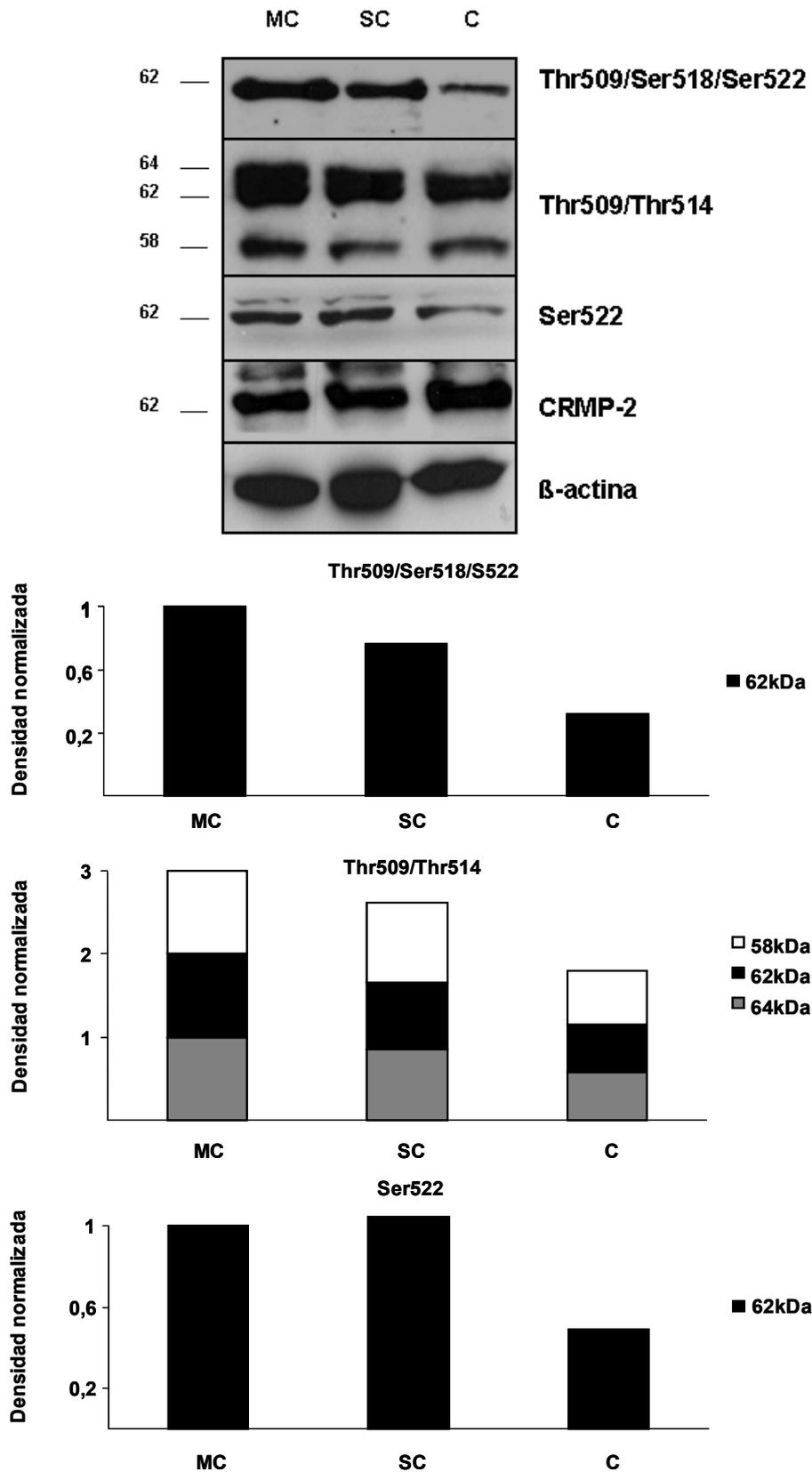


Figura R-11. Evaluación de los niveles de fosforilación dependiendo de la confluencia celular. MC = Confluencia media. SC = Subconfluencia. C = Confluencia máxima. En las gráficas inferiores se representan los valores de densidad de cada banda inmunorreactiva obtenidos mediante análisis por densitometría para cada uno de los casos. En el eje de ordenadas de las tres gráficas se representan los valores de densidad normalizados (unidades arbitrarias) respecto al valor obtenido en confluencia media (MC). El experimento se llevó a cabo por triplicado. Se muestra un ejemplo representativo de los tres experimentos realizados.

Como se puede observar en la figura R-11, en todos los casos, la fosforilación de CRMP-2 disminuye progresivamente a medida que aumenta la confluencia celular. Por lo tanto, en aquellas células que no se encuentran en una fase de crecimiento exponencial el nivel de fosforilación de CRMP-2 disminuye. Con estos datos apoyamos de un modo indirecto la existencia de incrementos en la fosforilación de CRMP-2 en células que proliferan activamente.

5. Estudio del comportamiento celular en clones que expresan establemente una forma fosfomimética o fosfodefactiva de CRMP-2

El hecho de haber encontrado que CRMP-2 se fosforila de modo constitutivo en células inmortalizadas nos llevó a plantearnos el estudio de la función de la fosforilación de CRMP-2 en células de carcinoma pulmonar. Para ello, decidimos inhibir su expresión mediante transfección con un vector que expresase una secuencia de shRNA bloqueante de la expresión de CRMP-2, y aumentar sus niveles mediante transfección con un vector de expresión que contuviese la secuencia que codifica para la proteína. También se generaron por mutagénesis dirigida del residuo cebador de la fosforilación Ser522, dos formas mutadas de CRMP-2 que dan lugar a las formas fosfomimética y fosfodefactiva de la proteína, tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos.

5.1 Mutagénesis dirigida y obtención de clones

Se obtuvieron dos secuencias mutadas de CRMP-2 en las cuales el residuo Ser522, cebador para posteriores fosforilaciones, fue sustituido en un caso por alanina (pcDNA3.2-CRMP-2S522A), de este modo no puede sufrir ninguna incorporación de fosfato (forma fosfodefactiva), o por aspartato (pcDNA3.2-CRMP-2S522D), aportando un grupo ácido que simula las funciones de proteína constitutivamente fosforilada (forma fosfomimética).

Una vez se realizaron dichas mutaciones, se transfectaron por separado cada uno de los tres vectores de expresión y el vector que codificaba para un shRNA específico para silenciar la expresión de CRMP-2 (pRETROSUPER-CRMP-2) (cedido por el Dr. Manuel Serrano, CNIO) en las líneas celulares de NSCLC A549 y H1299 y la línea celular procedente de células epiteliales inmortalizadas y no transformadas, BEAS. En

primer lugar, nos llamó la atención observar diferencias en el número de clones obtenidos dependiendo de la construcción transfectada en cada línea celular. Como se puede observar en la tabla R-3, fue imposible aislar clones estables en los que se inhibiese la expresión de la proteína CRMP-2 en la línea celular A549 y en las células inmortalizadas no transformadas BEAS. Además, fue imposible sobreexpresar la forma fosfodefactiva de la proteína (S522A) en las células inmortalizadas BEAS y sólo se pudo aislar un único clon en células A549. Por el contrario, no se observó ninguna diferencia entre las distintas líneas celulares cuando se trato de expresar de modo estable la secuencia nativa de CRMP-2 o la forma fosfomimética de la proteína (S522D) en todos los tipos celulares. Además curiosamente, en la línea celular H1299 se pudieron obtener clones estables de todas las construcciones ensayadas.

Al analizar las posibles causas de las diferencias en la eficiencia en la consecución de clones dependiendo de la línea celular, observamos que en células p53 *wildtype* (BEAS y A549) no era posible silenciar el gen ni transfectar la secuencia de CRMP-2 que contuviese la mutación S522A o fosfodefactiva, mientras que sí era posible en células que presentaban una delección homocigótica de p53 (H1299). Como se mencionó anteriormente, existen datos bibliográficos que apuntan a que un descenso en los niveles de la proteína CRMP-2 conlleva un aumento de la actividad transcripcional de p53, potente inductor de apoptosis (Llanos *et al.* 2006).

Construcción transfectada	Líneas celulares		
	BEAS P53 (+/+)	A549 P53 (+/+)	H1299 P53 (-/-)
CRMP-2 S522 Forma nativa	ND	2/3	12/12
CRMP-2 S522A Fosfodefactiva	0/12	1/10	3/5
CRMP-2 S522D Fosfomimética	4/6	5/10	3/3
ShRNA CRMP-2	ND	0/20	8/12

Tabla R-3. Resumen del número de clones establemente transfectados con las diversas construcciones de CRMP-2 ensayadas en las distintas líneas celulares. El cociente indica el número de clones positivos para cada construcción con respecto al total de clones analizados. ND: No hay datos, no se intentó la transfección.

No existen datos bibliográficos que establezcan una relación entre variaciones en la fosforilación de CRMP-2 y la inducción de apoptosis. Pero debido a que esta proteína interactúa con tubulina, pensamos que podría suceder que su desfosforilación constitutiva afecte a la correcta dinámica los MTs de tubulina implicados en la división celular.

5.2 Caracterización de los clones que sobreexpresan las formas fosfodefactiva y fosfomimética de CRMP-2

5.2.1 Estudio de la viabilidad celular de los clones obtenidos en la línea de NSCLC A549 y H1299

En primer lugar, decidimos evaluar la viabilidad celular de las distintas poblaciones transfectadas establemente con las construcciones de CRMP-2 y obtenidas en las líneas celulares de carcinoma pulmonar A549 y H1299 mediante la medida de incorporación del colorante vital rojo neutro. El ensayo de rojo neutro es uno de los ensayos utilizados para valorar la viabilidad celular de una población debido a una incorporación de este colorante de una manera selectiva por parte de las células viables (Repetto *et al.* 2008). En nuestro caso, realizamos medidas de viabilidad celular en muestras procedentes de los clones en estudio, crecidas a distintos tiempos en subconfluencia y en medio completo.

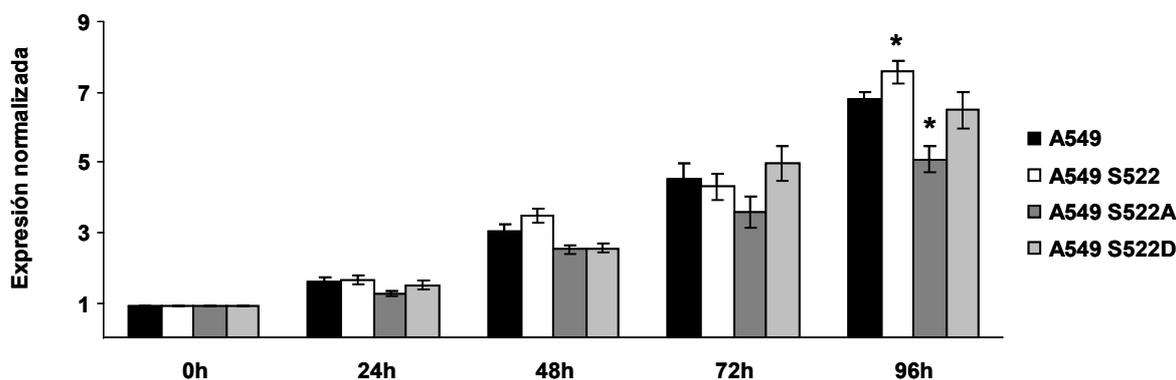


Figura 12. Evaluación de la viabilidad celular de los clones establemente transfectados de la línea celular A549 mediante ensayos de adquisición de rojo neutro. En ordenadas se representan los datos normalizados respecto a la población normal A549 en cada tiempo, y normalizados dentro de cada población con respecto al tiempo igual a 0. Se comparó la proliferación respecto a las células no transfectadas en cada tiempo mediante un test de ANOVA de k muestras independientes. * ($p < 0.05$).

Como se puede observar en la figura R-12, existen diferencias en la viabilidad entre los distintos clones aislados a partir de la línea celular A549. La población que sobreexpresaba la forma nativa de la proteína (S522), presentaba una incorporación de rojo neutro ligeramente mayor que las demás poblaciones, mientras que la población que sobreexpresaba la proteína con la mutación S522A o fosfodefactiva presentaba valores menores de viabilidad. Esta menor proliferación en células incapaces de fosforilar CRMP-2 nos pareció muy interesante ya que como se ha comentado anteriormente únicamente pudimos obtener un clon de esta población. Por su parte, la población S522D o fosfomimética, presentaba valores de viabilidad similares a la población A549 no transfectada.

En el caso de las poblaciones obtenidas a partir de transfecciones realizadas en las células H1299, los resultados fueron diferentes a los obtenidos en células A549. No se observó un descenso en la viabilidad de la población que expresaba la mutación CRMP-2 S522A o fosfodefactiva (Figura R-13), y disminuyó ligeramente la viabilidad de las poblaciones que expresaban la forma fosfomimética de CRMP-2 (S522D). Pensamos que estas diferencias en la proliferación celular entre las poblaciones celulares de las líneas celulares A549 y H1299 quizá puedan deberse a la diferente expresión de p53 en estas líneas celulares.

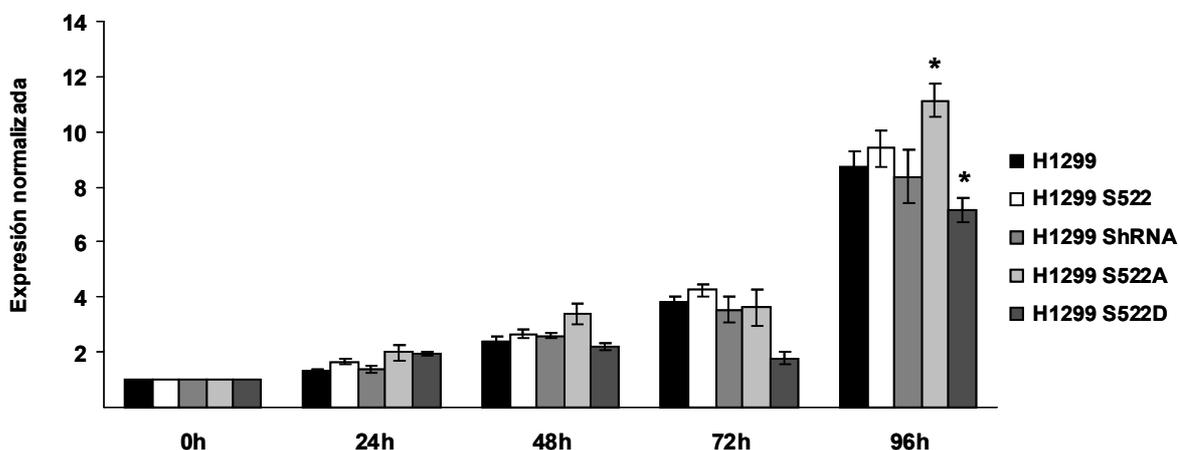


Figura R-13. Evaluación de la viabilidad celular de los clones establemente transfectados de la línea celular H1299 mediante ensayos de adquisición de rojo neutro. En ordenadas se representan los datos normalizados respecto a la población normal H1299 en cada tiempo, y normalizados dentro de cada población con respecto al tiempo igual a 0. Se comparó la proliferación respecto a las células no transfectadas en cada tiempo mediante un test de ANOVA de k muestras independientes. * ($p < 0.05$).

5.2.2 Estudio fenotípico

Se analizó el aspecto morfológico de los clones positivos obtenidos en células A549 y H1299 mediante microscopía. Como se observa en la figura R-14, las células que expresaban la secuencia nativa o la secuencia fosfodefactiva de CRMP-2, muestran una morfología y un modo de crecimiento idéntico a la línea celular A549 parental. En cambio, los clones obtenidos a partir de las células transfectadas de modo estable con la construcción fosfomimética (S522D) de CRMP-2, crecieron formando parches en el cultivo sin alcanzar en ningún momento la confluencia aunque no perdieron la estructura poligonal característica de una célula epitelial.

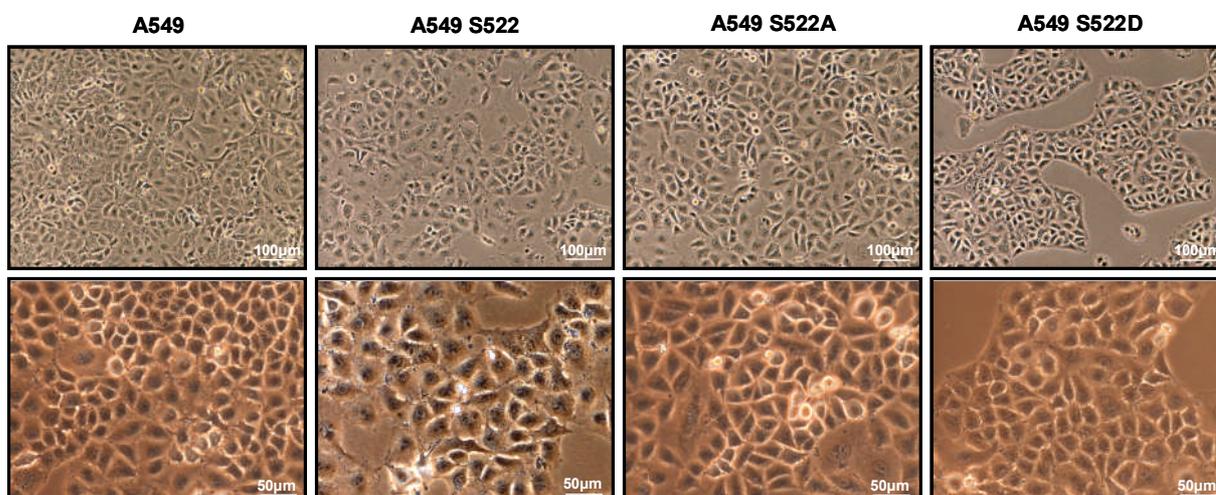


Figura R-14. Ejemplos del modo de crecimiento de clones representativos de cada construcción transfectada en la línea celular A549. En la fila superior fotografías realizadas con un aumento 100X y en la inferior con un aumento de 200X. A549 S522 (células que sobreexpresan la forma nativa de CRMP-2); A549 S522A (células que sobreexpresan la forma fosfodefactiva de CRMP-2) y A549 S522D (células que sobreexpresan la forma nativa de CRMP-2).

En el caso de la línea celular H1299 obtuvimos fenotipos parecidos tanto en el caso de silenciar la proteína como en el caso de expresar la forma fosfodefactiva de la proteína (S522A) También en este caso, las células H1299 S522D o fosfomiméticas presentaron cambios respecto a las otras poblaciones transfectadas, y aunque no crecían formando parches, en ningún momento alcanzaron monocapas confluentes. Además, las células de esta población tenían un aspecto estrellado (Figura R-15), y adquieren un fenotipo alargado más propio de una célula fibroblástica o mesenquimal. Estas dos características, crecimiento diferencial y cambios morfológicos, son compartidas por el clon que tiene inhibida la expresión de CRMP-2.

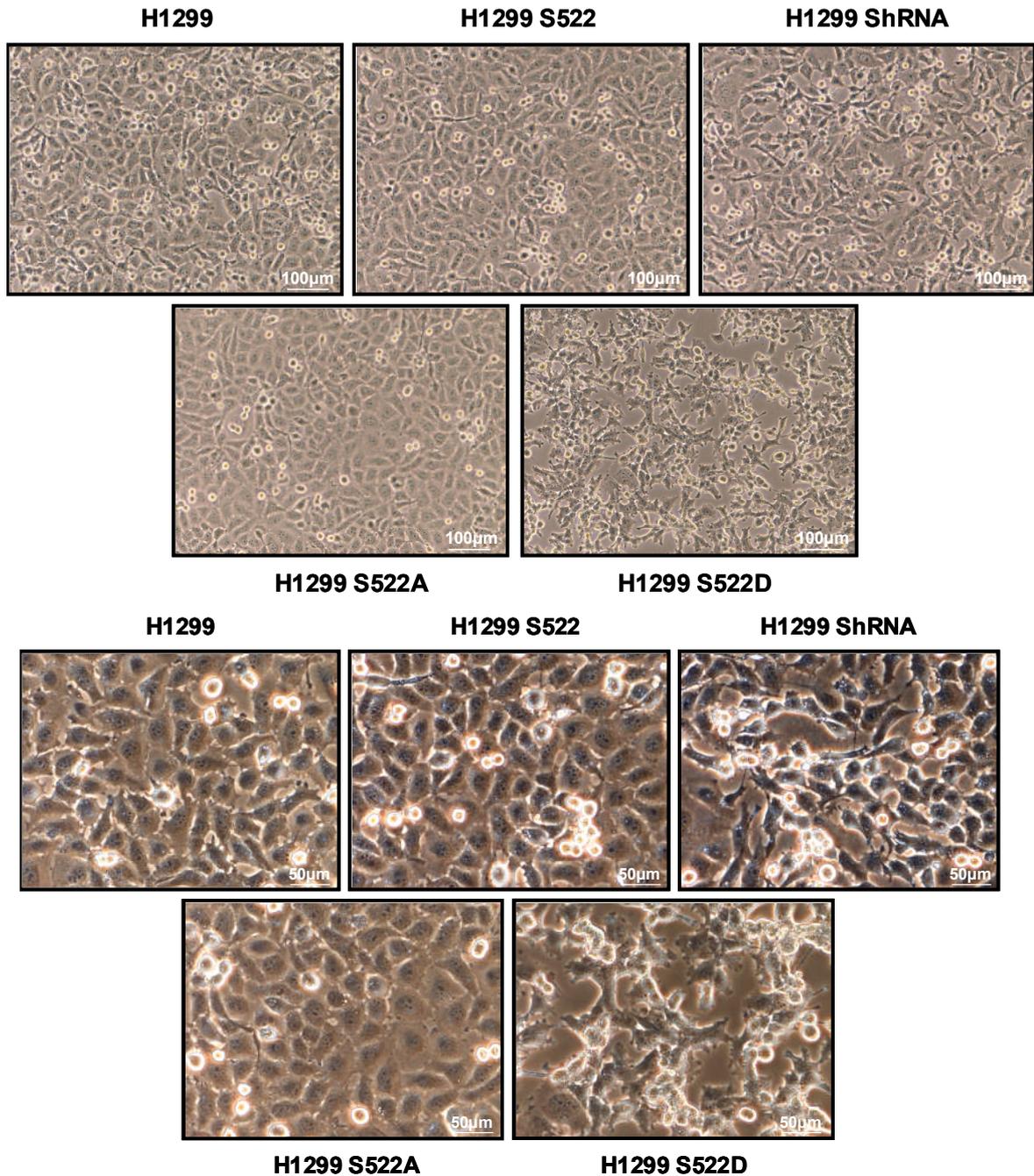


Figura R-15. Ejemplos del modo de crecimiento de clones representativos de cada construcción transfectada en la línea celular H1299. En la parte superior fotografías realizadas con un aumento de 100X y en la inferior con un aumento 200X. H1299 S522 (células que sobreexpresan la forma nativa de CRMP-2); H1299 S522A (células que sobreexpresan la forma fosfodefensiva de CRMP-2); H1299 S522D (células que sobreexpresan la forma nativa de CRMP-2 y H1299 shRNA (células con niveles de CRMP-2 inhibidos).

Con objeto de dilucidar los mecanismos mediante los cuales las variaciones de la expresión o de la fosforilación de CRMP-2 pueden influir en las propiedades tumorales, decidimos continuar nuestro estudio en un contexto celular p53 *wildtype* ya que pensamos que las mutaciones en este gen podrían enmascarar los efectos derivados de la alteración en los MTs originada por una expresión o fosforilación aberrante de CRMP-

2. Así pues, a partir de este momento decidimos continuar el estudio únicamente con los clones obtenidos a partir de la transfección de las distintas construcciones en las células p53 *wildtype* A549, posponiendo el análisis de las poblaciones celulares obtenidas a partir de las células H1299 para el futuro.

A continuación, con objeto de completar la caracterización, decidimos analizar mediante inmunocitoquímica (ICQ) la expresión de moléculas de adhesión.

5.2.3 Estudio mediante inmunocitoquímica de la expresión de moléculas de adhesión

Decidimos determinar mediante ICQ la expresión y localización de las moléculas de adhesión Cadherina-E y Zona Occludens 1.

Tanto la proteína Cadherina-E (E-Cad) como la proteína zona occludens 1 (ZO-1) son proteínas presentes en las células epiteliales y que desempeñan una función relacionada con el mantenimiento de la integridad del tejido. Ambas proteínas son capaces de interactuar con proteínas del citoesqueleto tales como la actina, pero mientras que la Cadherina-E es una proteína transmembrana que participa en la adhesión célula a célula de una manera dependiente de Ca^{2+} , la proteína ZO-1 es una proteína presente en la región citoplasmática de las uniones estrechas, en donde realiza una función de proteína adaptadora entre las proteínas transmembrana y el citoesqueleto de actina (Matter y Balda 2007). Una pérdida o deslocalización de estas proteínas conlleva una pérdida de la integridad del tejido y suelen estar relacionadas con un descenso en la adhesión entre células y un aumento en la migración, muy importantes en el proceso de transición epitelio-mesénquima (TEM).

Tras realizar inmunofluorescencias con anticuerpos específicos frente a Cadherina-E y ZO-1 en células de la línea celular A549 transfectadas con las distintas construcciones, observamos que en la población que expresaba de modo estable la forma fosfomimética de CRMP-2 (S522D), la proteína Cadherina-E sufre una deslocalización y desaparece de la membrana para situarse en el núcleo, mientras que en las células que sobreexpresan las otras tres construcciones se mantiene la expresión de Cadherina-E en la membrana citoplasmática. En el caso de la proteína ZO-1, no observamos ningún cambio de localización, aunque sí parece haber un descenso en la expresión de la proteína tanto en las células que expresan la forma fosfomimética de

CRMP-2 (S522D) como en aquellas células que expresaban la proteína fosfodefactiva (S522A) (Figura R-16).

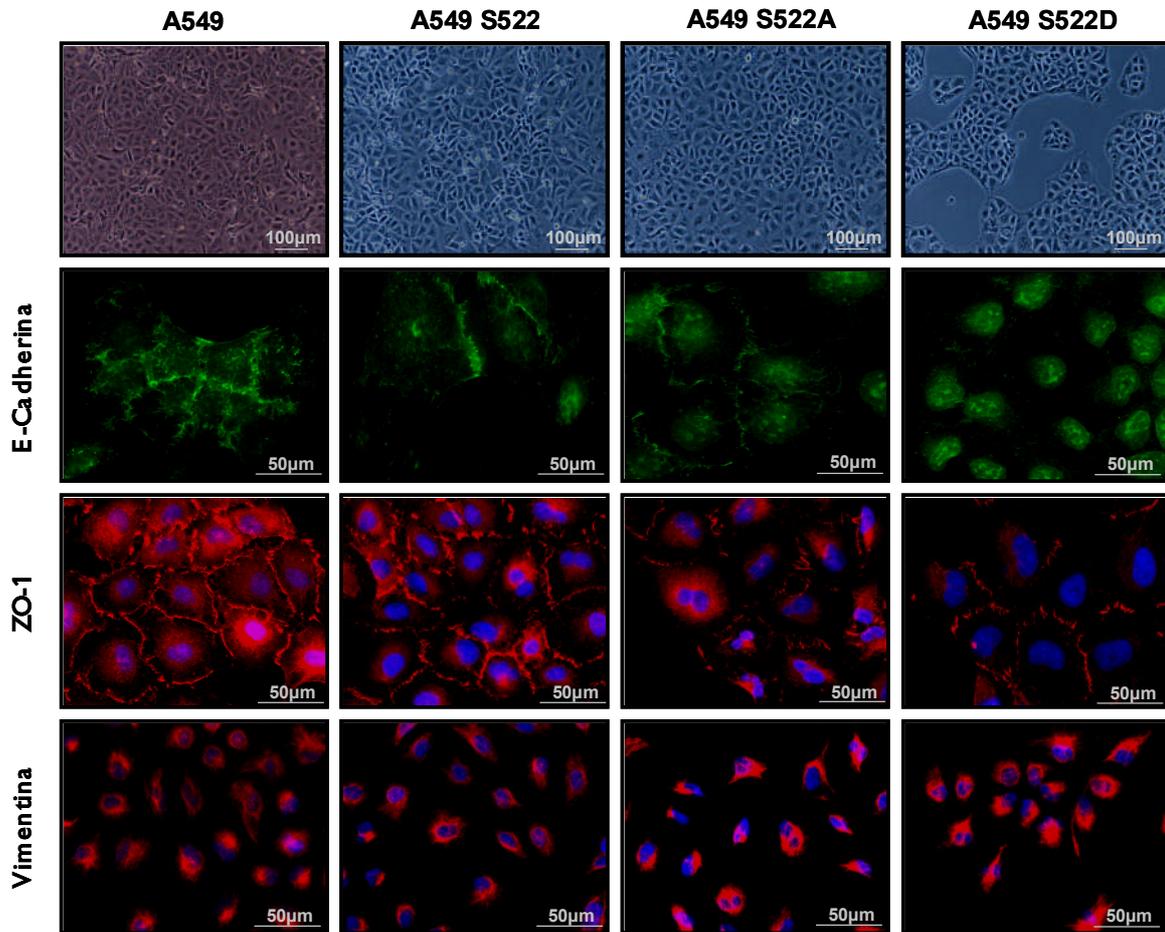


Figura R-16. Estudio de cambios moleculares experimentados en los clones establemente transfectados obtenidos de la línea celular A549. Fotografías realizadas con un aumento de 100X en el caso de las obtenidas con el microscopio invertido y de 200X en el caso de las inmunofluorescencias.

De los resultados anteriores podemos deducir que los cambios en la fosforilación de CRMP-2 pueden inducir alteraciones en procesos morfológicos relacionados con la pérdida de moléculas de adhesión que pueden estar relacionados con la transformación tumoral. Por ello, proseguimos nuestro estudio evaluando algunas propiedades celulares como proliferación, adhesión a sustrato y migración que normalmente se ven alteradas durante el desarrollo de los tumores.

5.3 Descripción funcional

5.3.1 Estudio de la proliferación celular

Teniendo en cuenta que observamos un aumento del grado de fosforilación de CRMP-2 en células inmortalizadas y que un aumento el grado de fosforilación de CRMP-2 parece estar relacionado con la proliferación como se apunta en la figura R-11, decidimos evaluar el grado de proliferación de las poblaciones transfectadas establemente con las distintas construcciones de CRMP-2 y obtenidas en la línea celular A549. Como se puede observar en la figura R-17, no se observaron diferencias en los porcentajes de células en las distintas fases del ciclo celular entre las distintas poblaciones en estudio.

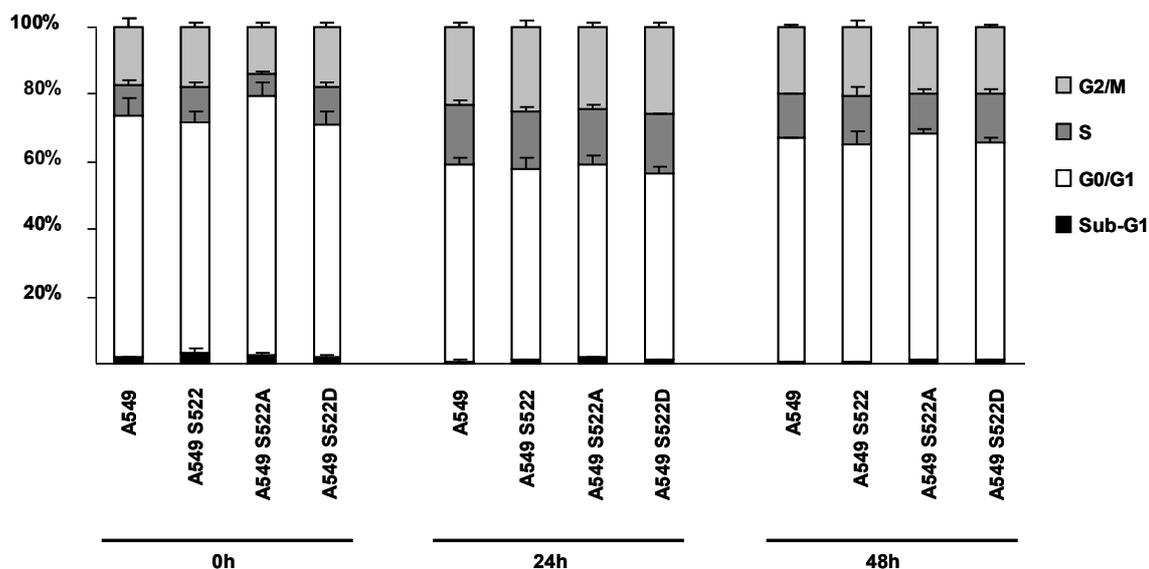


Figura R-17. Evaluación de la proliferación celular de los clones establemente transfectados de la línea celular A549 mediante el análisis de la distribución de porcentajes de células en las distintas fases del ciclo celular mediante citometría de flujo. En ordenadas se representan los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular.

5.3.2 Supervivencia en ausencia de factores de crecimiento

Una característica fundamental de las células tumorales es su capacidad de sobrevivir en medios carentes de factores de crecimiento. Como se ha observado en la figura R-12, las células A549 que sobreexpresan la forma fosfodeficiente o S522A de la proteína presentan menor viabilidad que las demás poblaciones. Con objeto de comprobar si las alteraciones en la fosforilación de CRMP-2 alteraban su viabilidad en

situaciones de estrés, los distintos clones obtenidos en la línea celular A549 fueron crecidos durante 24 y 48 horas en ausencia de suero y se determinó el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular.

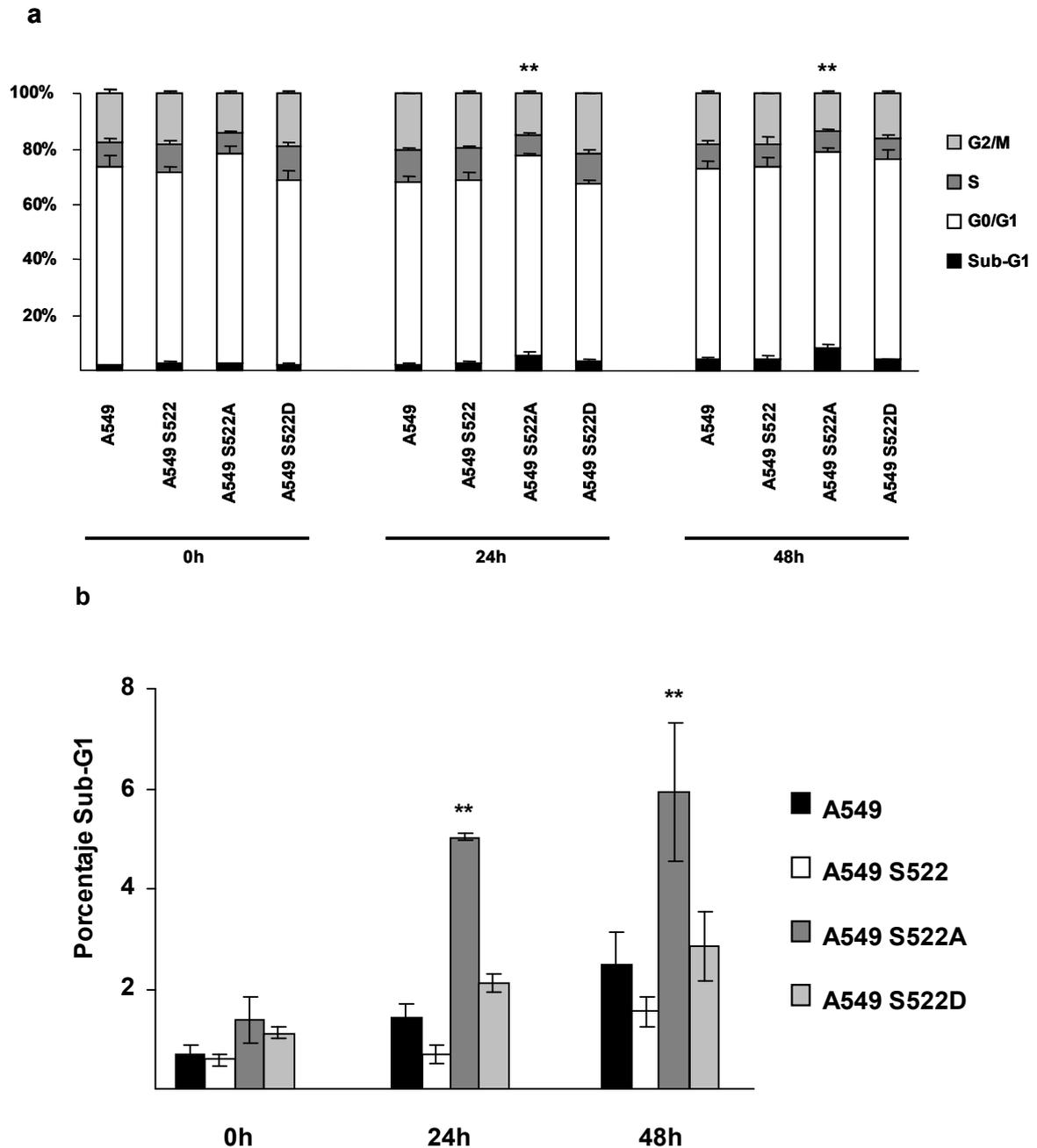


Figura R-18. Evaluación de la supervivencia celular de los clones establemente transfectados de la línea celular A549 mediante el análisis de la distribución de porcentajes de células en las distintas fases del ciclo celular mediante citometría de flujo en condiciones de ausencia de factores de crecimiento (a). En ordenadas se representan los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular. Evaluación de la mortalidad celular mediante el estudio de los porcentajes de la fase sub-G1 (b). En el eje de ordenadas se representan los porcentajes de células en fase sub-G1 obtenidos. Para la estadística se realizó un test de ANOVA de k muestras independientes. ** ($p < 0.01$).

Como se puede observar en la figura R-18a, en medio carente de suero, la población S522A presentó un descenso en el porcentaje de células en fase G2/M del ciclo celular. Así, la población fosfodefensiva o S522A, presenta un porcentaje medio de células en fase G2/M de 14% y 13% a las 24 y 48 horas respectivamente, mientras que las otras 3 poblaciones presentaron valores medios que comprendieron entre 20-22% y 16-18% a los mismos tiempos.

Además, como se detalla en la figura R-18b, la fase Sub-G1 es aproximadamente tres veces mayor (6% a las 24 horas y 8% a las 48 horas) que las demás poblaciones (cuyos valores oscilan entre 1-2% a las 24 horas y 2-3% a las 48 horas), y que además es proporcional al tiempo de privación de factores de crecimiento.

5.3.3 Análisis de la mortalidad celular mediante ensayos de detección de Anexina/PI

Con el fin de estudiar si los descensos de la viabilidad de la población fosfodefensiva, CRMP-2 S522A eran debidos a una inducción mayor de apoptosis en condiciones de estrés, se realizaron ensayos de medida de anexina-PI mediante citometría de flujo en cada una de las líneas celulares una vez crecidas en medio carente de factores de crecimiento durante 24 y 48 horas. Los ensayos de anexina-PI permiten evaluar y discernir dentro de una muestra: células vivas (A-, PI-), células apoptóticas (A+, PI-) y células necróticas (A+, PI+).

Como se puede observar en la figura R-19a, la población S522A o fosfodefensiva presenta unos valores de apoptosis superiores a las demás poblaciones, siendo el porcentaje de células apoptóticas y necróticas de un 10% y 6% respectivamente tras 24 horas de cultivo en medio carente de factores de crecimiento y de un 8% y 14% respectivamente tras 48 horas, lo cual supone el doble que el resto de las poblaciones en los mismos tiempos.

Por lo tanto, la población que expresa la forma S522A o fosfodefensiva de la proteína, presenta una mayor sensibilidad celular a la retirada de factores de crecimiento que el resto de las poblaciones estudiadas. Por el contrario, los demás clones no varían su crecimiento en ausencia de factores de crecimiento respecto a células no transfectadas.

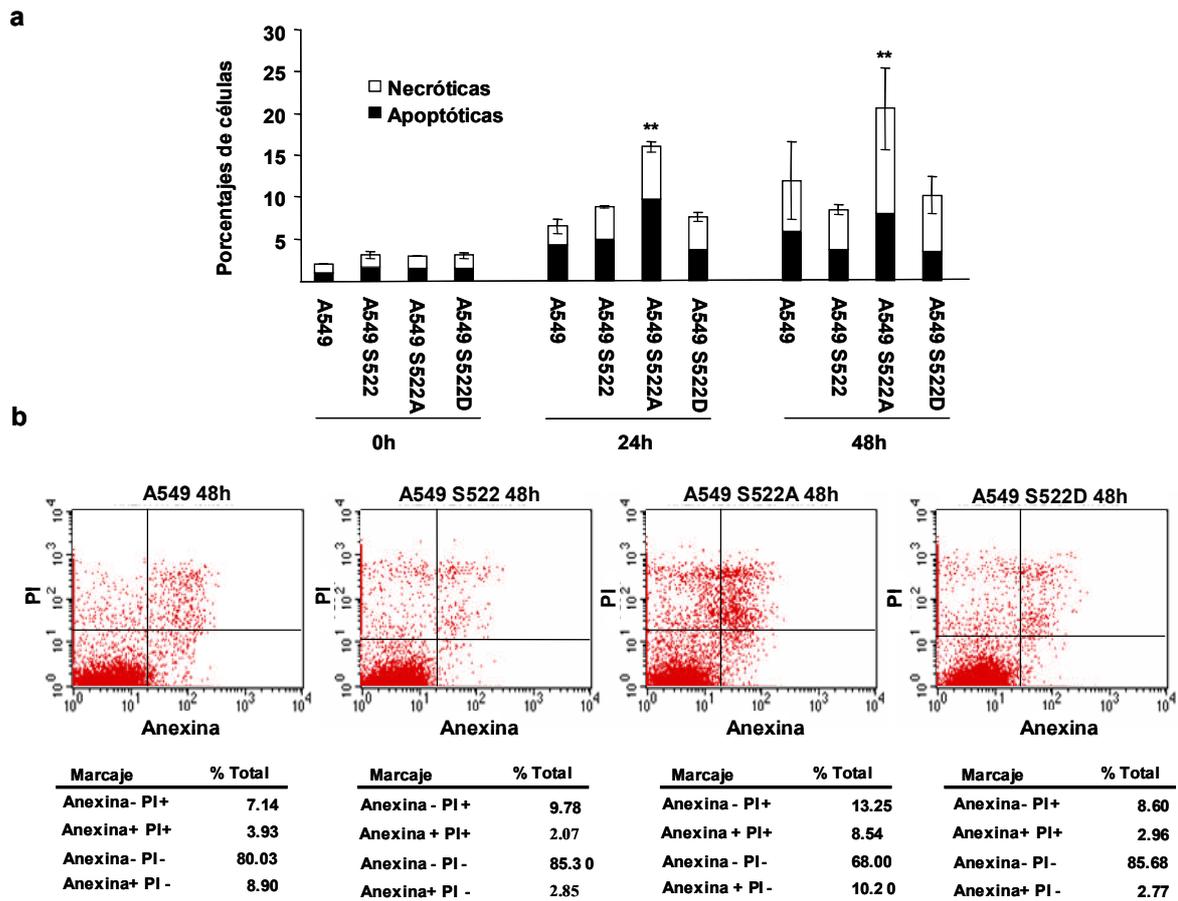


Figura R-19. Estudio de la muerte celular de los clones establemente transfectados aislados a partir de la línea celular A549 en ausencia de factores de crecimiento mediante ensayos de anexina-PI. a) Gráfica de los porcentajes de células anexina + respecto al total: células apoptóticas anexina + PI – en negro; y células necróticas anexina + PI + en blanco. b) Histogramas representativos de células A549 crecidas durante 48 horas en ausencia de suero. Para la estadística se realizó un test de ANOVA de k muestras independientes. ** ($p < 0.01$).

5.3.4 Adhesión de los distintos clones a proteínas de la matriz extracelular

Con el fin de estudiar si las variaciones en el grado de expresión o fosforilación de CRMP-2 afectaban a la adhesión a sustrato, se realizaron ensayos de adhesión celular de las cuatro poblaciones celulares obtenidas a partir de la línea celular A549 (células no transfectadas, células que sobreexpresan CRMP-2, células que sobreexpresan la secuencia que contiene la mutación CRMP-2 S522A o fosfodeficiente y aquellas células que sobreexpresan la forma que contiene la mutación CRMP-2 S522D o forma fosfomimética), a las siguientes proteínas presentes en la matriz extracelular: colágeno tipo I, colágeno tipo V y fibronectina. Como control negativo se cuantificó la adhesión a albúmina sérica bovina (BSA).

Como se puede observar en la figura R-20, los clones que expresaban la forma fosfomimética de CRMP-2 fueron los que menor adhesión presentaron a todos los sustratos ensayados. Por el contrario, aquellos clones que expresaban la forma

fosfodefactiva o sobreexpresaban la proteína CRMP-2 aumentaron basalmente la adhesión respecto a las células no transfectadas.

La disminución en la adhesión al sustrato es una de las propiedades que adquieren las células tumorales de fenotipo más agresivo y suele estar asociada a un aumento en la migración y en la capacidad de dar lugar a metástasis.

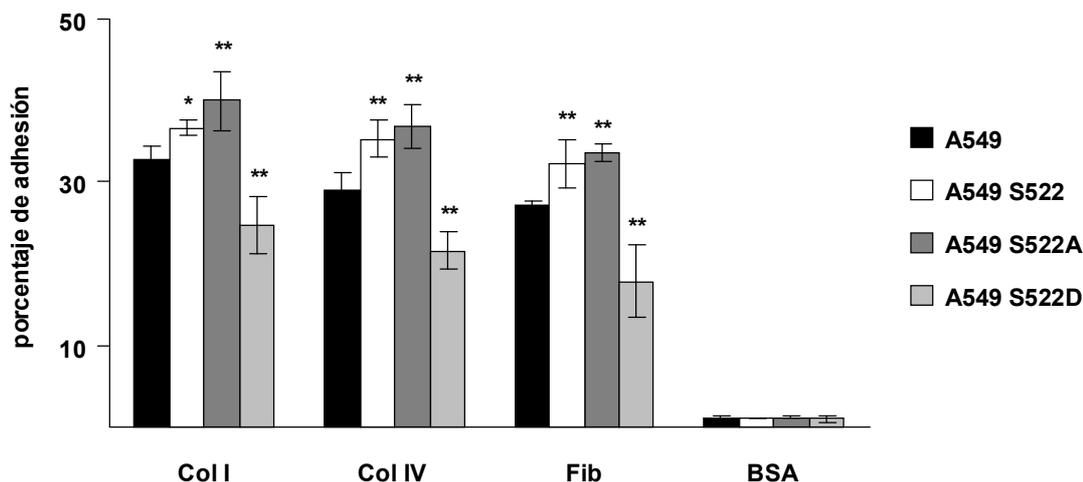


Figura R-20. Estudio de la adhesión celular de los distintos clones obtenidas mediante transfección estable de las diversas construcciones de CRMP-2 en la línea celular de NSCLC A549 a distintos sustratos. En ordenadas el porcentaje de células que se adhirieron cada sustrato normalizados respecto al total de células añadidas inicialmente. Para la estadística se realizó un test de ANOVA de k muestras independientes * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$).

5.3.5 Migración hacia factores de crecimiento

Con el fin de evaluar si las variaciones en la expresión de CRMP-2 modifican la capacidad quimiotáctica de las células tumorales, se llevaron a cabo ensayos de migración en cámaras tipo Boyden hacia medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino al 10%.

Los resultados obtenidos y que se resumen en la figura R-21, muestran como la población que expresa la forma fosfomimética o S522D de la proteína CRMP-2 presenta una migración hacia factores de crecimiento dos veces mayor que el resto de poblaciones celulares. Así, como era de esperar, aquellas células en las que se observó una menor adhesión, presentaron una mayor migración. Este resultado se debe con toda probabilidad a variaciones en la capacidad de polimerizar los MTs en la población que expresa la forma fosfomimética o S522D de CRMP-2.

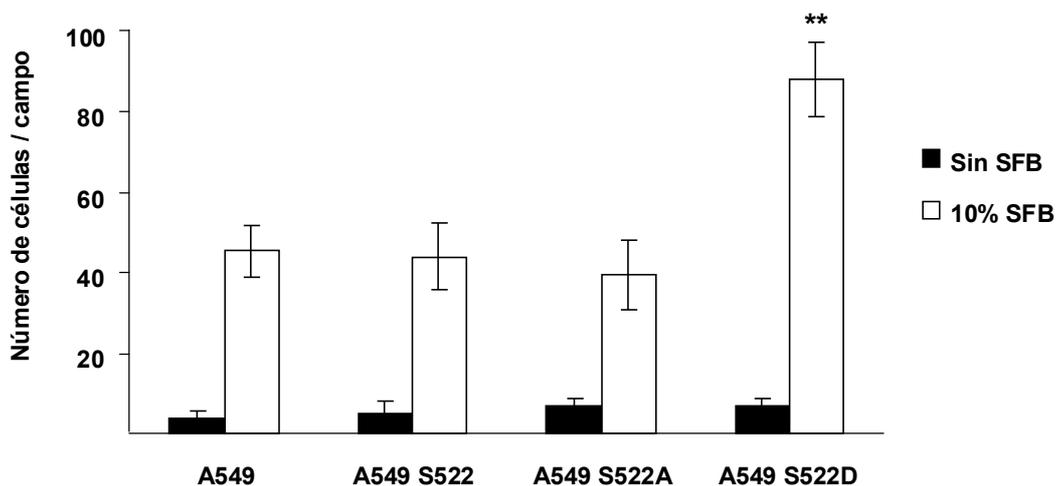


Figura R-21. Estudio de la migración celular hacia factores de crecimiento de los distintos clones estables de la línea celular A549 en ensayos de migración en cámaras tipo Boyden. En ordenadas el número de células que atravesaron la membrana en campos de visión con objetivo de 20X. Para la estadística se realizó un test de ANOVA de k muestras independientes ** ($p < 0.01$)

5.3.6 Ensayos de formación de colonias en agar blando

Por último, con el fin de comprobar si las variaciones en la expresión o en la fosforilación de CRMP-2 conllevan un aumento en la capacidad de crecimiento en ausencia de anclaje se realizaron ensayos de crecimiento en agar blando. El índice de clonogenicidad, calculado como el número de colonias crecidas en agar blando respecto al número de células sembradas, fue significativamente superior en las células que expresaban S522D con respecto a células no transfectadas. En las poblaciones transfectadas con la forma nativa o S522 y la población S522A o fosfodeficiente apenas se observan modificaciones respecto a la población control (Figura R-22).

Todos los datos obtenidos *in vitro* sugieren que la fosforilación de la proteína CRMP-2 aporta una ventaja en cuanto a la motilidad de las células tumorales sin modificar sustancialmente su proliferación. Sin embargo, la ausencia de fosforilación hace que las células sean más sensibles al estrés inducido, por ejemplo, la retirada de nutrientes.

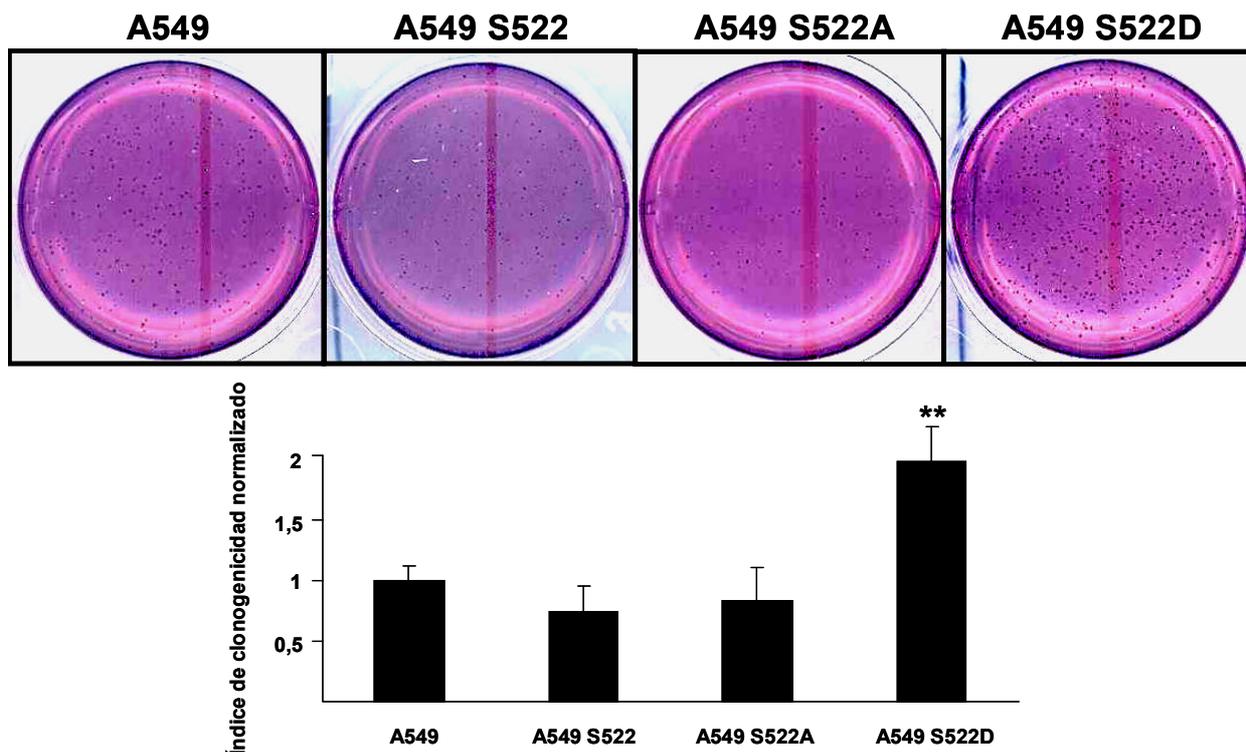


Figura R-22. Estudio de la capacidad de los distintos clones estables de la línea celular A549 de formar clones en ensayos de crecimiento en agar blando. En ordenadas se representa el número de colonias que crecieron en cada población normalizados con respecto al número de colonias crecidas al sembrar células A549 no transfectadas. ** (p < 0.01).

6. Estudio de la función de CRMP-2 en modelos de *Xenograft* de NSCLC en ratones inmunodeficientes

Con el fin de comprobar si los resultados obtenidos *in vitro*, eran reproducibles en un modelo animal, decidimos estudiar en modelos *in vivo* de *Xenograft* de ratón, el comportamiento de cada una de las construcciones de CRMP-2 transfectadas en la línea de NSCLC A549.

Para ello, se inocularon subcutáneamente 2×10^6 células de cada una de las poblaciones aisladas en las células de NSCLC A549 (A549 no transfectadas, A549 que expresan la forma nativa de CRMP-2 o S522, la forma fosfodeficiente de CRMP-2 o S522A y la forma fosfomimética de CRMP-2 o S522D) y se observó la formación de tumores durante diez semanas hasta que el tamaño de los tumores en uno de los grupos alcanzó 1000 mm^3 , momento en el que se sacrificaron todos los animales. Al analizar las curvas de crecimiento de los tumores, observamos que las células A549 que contenían la construcción fosfodeficiente o S522A producían tumores que crecían más rápido que células no transfectadas y que, por el contrario, aquellos ratones que fueron

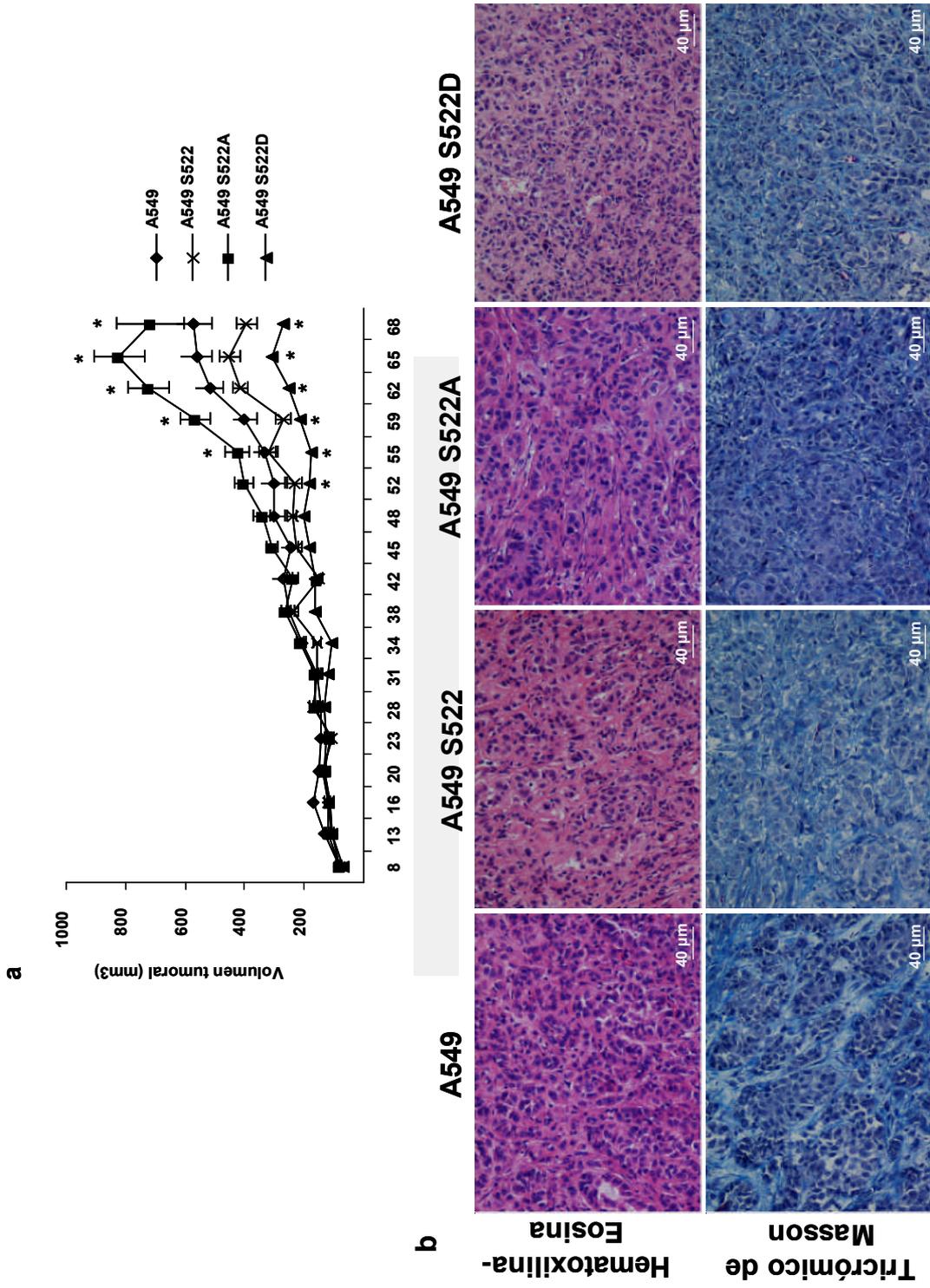


Figura R-23.a) Estudio del crecimiento de los tumores originados en ratones xenograft inoculados con células de cada clon celular aislado a partir de A549. En abscisas se representa el tiempo en días a los que se realizaron las medidas y en ordenadas el volumen tumoral en mm³. Para la estadística se realizó un test de ANOVA de k muestras independientes * ($p < 0.05$). **b)** Se muestran fotografías representativas de cortes de los tumores de cada grupo teñidos con hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson y que fueron realizadas con un aumento 200X.

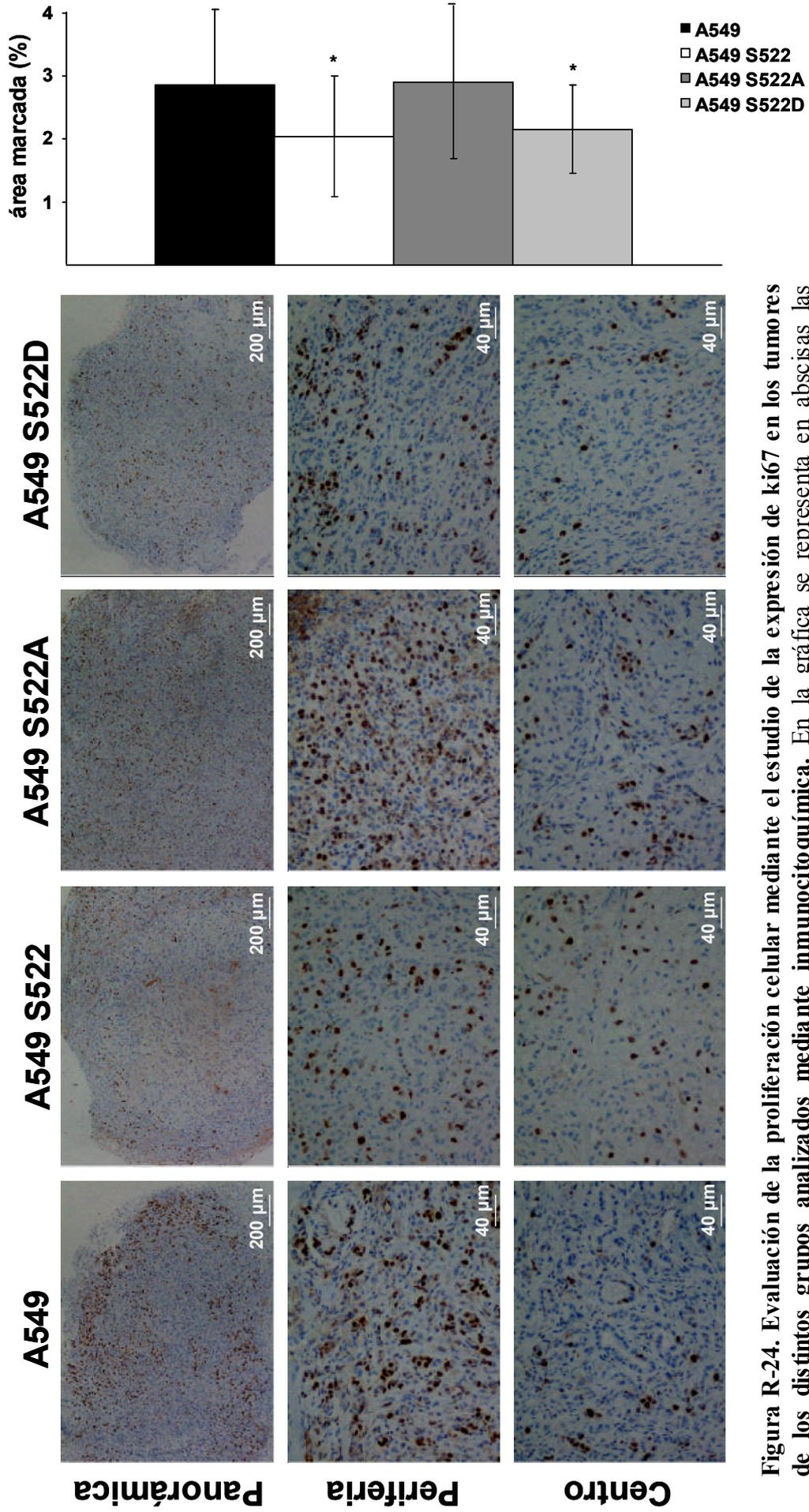


Figura R-24. Evaluación de la proliferación celular mediante el estudio de la expresión de ki67 en los tumores de los distintos grupos analizados mediante inmunocitoquímica. En la gráfica se representa en abscisas las muestras analizadas y en ordenadas el porcentaje de área positiva marcada. Para la estadística se realizó un test de ANOVA de k muestras independientes. * ($p < 0,05$). En la parte inferior se muestran campos representativos de fotografías tomadas con un aumento 40X y fotografías realizadas con un aumento 200X en la periferia y en el centro de tumores representativos para cada grupo.

inoculados con células que expresan la proteína con la mutación S522D o fosfomimética presentaron tumores más pequeños que las células no transfectadas o aquellas que sobreexpresan la proteína CRMP-2 (Figura R-23a). Aparentemente, estos datos se encuentran en oposición a los resultados obtenidos *in vitro*, en los que las células que expresaban establemente la forma fosfodeficiente de CRMP-2 o S522A proliferaban menos y era más sensible a la carencia de factores de crecimiento. Con objeto de estudiar con mayor detalle el estado de los tumores, éstos fueron extirpados y fueron teñidos con Hematoxilina-eosina y con tricrómico de Masson (Figura R-23a). Además, mediante técnicas inmunocitoquímicas, medimos la expresión de Ki67 como marcador de proliferación y de Caspasa-3 activa y p53 con el fin de evaluar la inducción de apoptosis en los diversos tumores.

Los resultados obtenidos al analizar la expresión del marcador de proliferación Ki67, mostraron un mayor porcentaje de células positivas en los tumores desarrollados a partir de células A549 no transfectadas y en los obtenidos a partir de los clones que expresaban la mutación fosfodeficiente o CRMP-2 S522A. En estas muestras se observó un mayor marcaje en la periferia de los tumores. En las otras dos poblaciones el marcaje con Ki67 fue significativamente menor y presentaba el mismo marcaje en el centro que en la periferia tumoral (Figura R-24). Por tanto parece que las células A549 S522A o fosfodeficiente inducen tumores con una mayor tasa de proliferación que aquellas que expresan las formas nativa o fosfomimética de CRMP-2.

Se realizaron medidas de detección de Caspasa-3 activa y p53 en todos los tumores extirpados de los ratones. Los datos recogidos en la figura R-25 muestran cómo la zona central de los tumores de mayor tamaño (aquellos que sobreexpresaban la mutación CRMP-2-S522A o fosfodeficiente) presentaron un marcaje más intenso para Caspasa-3, debido a la presencia de zonas necróticas en las zonas centrales de los tumores. Esta necrosis, como ya es sabido, está originada por la ineficiente vascularización de las zonas centrales y la presencia de regiones de hipoxia y pobres en nutrientes. Resultó sorprendente observar células Caspasa-3 activa positivas en la periferia de los tumores procedentes de células que expresaban la forma fosfodeficiente CRMP-2-S522A que no se detectaron en el resto de los tumores analizados.

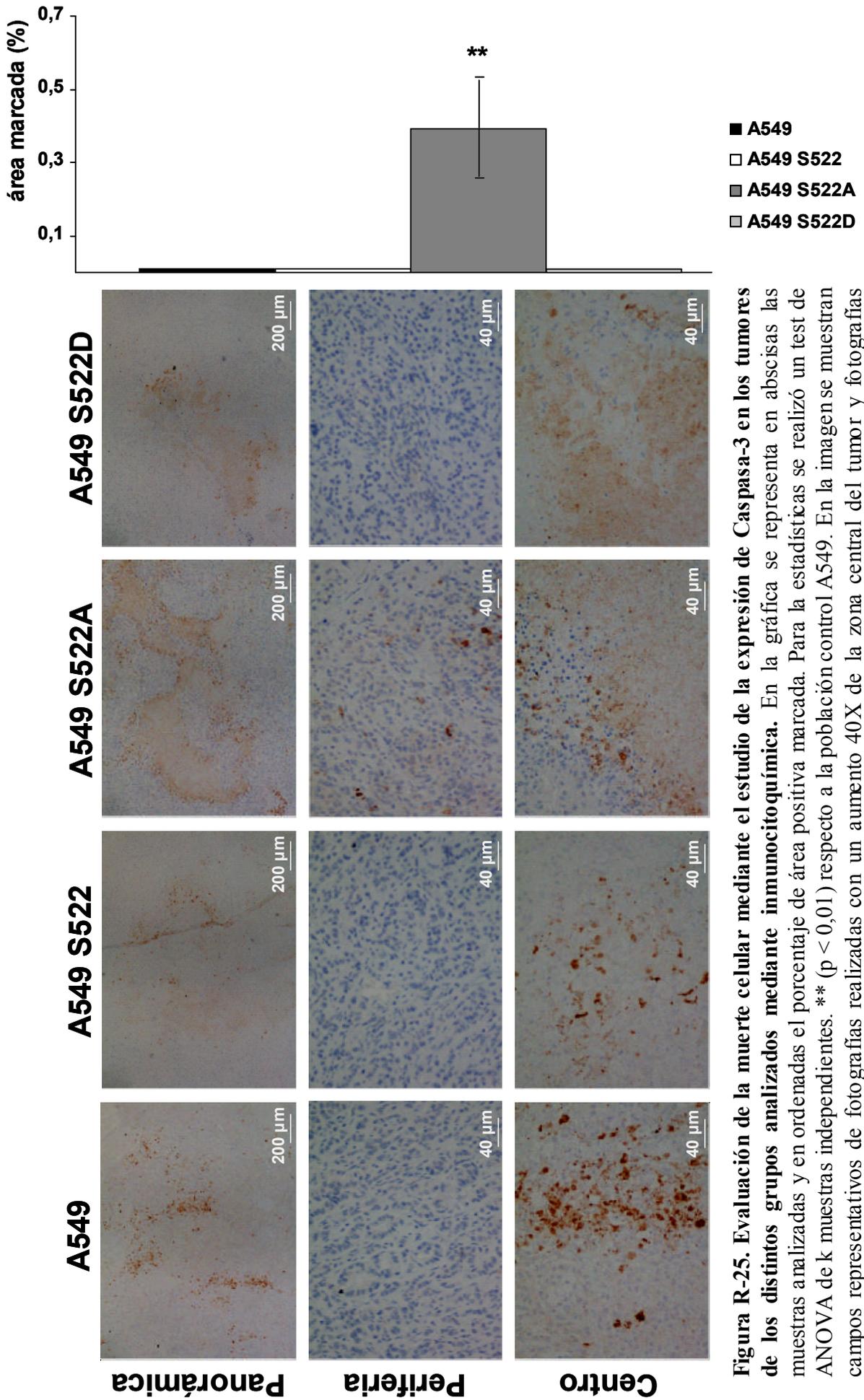


Figura R-25. Evaluación de la muerte celular mediante el estudio de la expresión de Caspasa-3 en los tumores de los distintos grupos analizados mediante inmunocitoquímica. En la gráfica se representa en abscisas las muestras analizadas y en ordenadas el porcentaje de área positiva marcada. Para la estadísticas se realizó un test de ANOVA de k muestras independientes. ** ($p < 0,01$) respecto a la población control A549. En la imagen se muestran campos representativos de fotografías realizadas con un aumento 40X de la zona central del tumor y fotografías realizadas con un aumento 200X en la periferia y en el centro de tumores representativos para cada grupo.

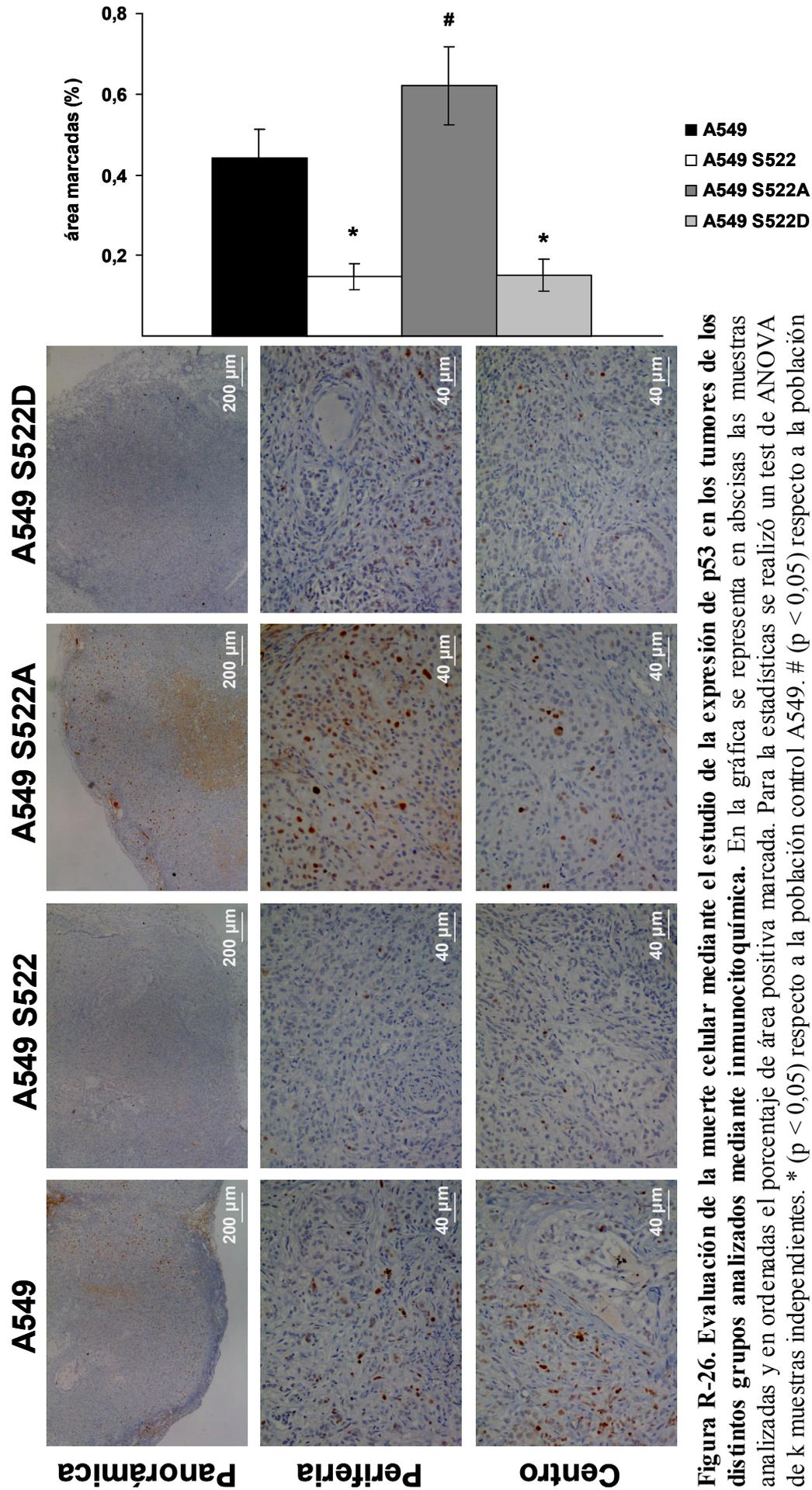


Figura R-26. Evaluación de la muerte celular mediante el estudio de la expresión de p53 en los tumores de los distintos grupos analizados mediante inmunocitoquímica. En la gráfica se representa en abscisas las muestras analizadas y en ordenadas el porcentaje de área positiva marcada. Para la estadísticas se realizó un test de ANOVA de k muestras independientes. * ($p < 0,05$) respecto a la población control A549. # ($p < 0,05$) respecto a la población A549 S522. En la imagen se muestran campos representativos de fotografías realizadas con un aumento 40X y fotografías realizadas con un aumento 200X en la periferia y en el centro de tumores representativos para cada grupo.

En el caso de las inmunocitoquímicas realizadas para p53 (Figura R-26), se puede observar que en todas las muestras tumorales existen células positivas para p53. Igual que en el caso de Caspasa-3, el marcaje era mayor en aquellos tumores que proceden de células que expresaban la forma fosfodefactiva o S522A de CRMP-2 y significativamente menor en el caso de los tumores formados por las células que expresan la forma nativa o S522 y la forma fosfomimética S522D.

Los resultados obtenidos al analizar las histologías de los tumores pueden contribuir a explicar las discrepancias observadas entre los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* e *in vivo*. Según este análisis los tumores CRMP-2 S522A pese a ser más grandes, presentan una tasa mayor de muerte celular. Curiosamente esta alta tasa de muerte celular no sólo ocurre en zonas centrales y poco oxigenadas de los tumores sino que también sucede en la periferia tumoral inducida por otros mecanismos diferentes. Éste aumento de la muerte es paralelo a los incrementos en apoptosis observados en los cultivos *in vitro* de células CRMP-2 S522A.

7. Relación entre la fosforilación de CRMP-2 y la muerte celular

Los resultados obtenidos al analizar la muerte celular en los tumores extirpados de los animales, así como los obtenidos en la experimentación *in vitro*, nos llevaron a preguntarnos hasta qué punto existía una relación entre el grado de fosforilación de CRMP-2 y la muerte celular y cuál podía ser el mecanismo celular implicado. Recientemente, el grupo dirigido por el Dr. Manuel Serrano (CNIO, Madrid) ha publicado que al inhibir la expresión de la proteína CRMP-2 se induce la expresión de p53 (Llanos *et al.* 2006). Como es bien sabido, p53 es un factor de transcripción que se induce fundamentalmente por daño cromosómico y desencadena la muerte celular en situaciones de mitosis aberrantes. CRMP-2 interacciona con tubulina y por lo tanto podría estar implicado en la migración de las cromátidas en la división celular. De este modo, se puede postular que alteraciones en la fosforilación de CRMP-2 den lugar a mitosis aberrantes y a la activación de la muerte mediada por p53. Este dato explicaría la incapacidad para obtener clones estables que sobreexpresen la forma fosfodefactiva (S522A) de CRMP-2 en células p53 *wildtype* como en el caso de la línea celular A549 y en las células inmortalizadas BEAS.

7.1 Relación entre la fosforilación de CRMP-2 y p53

Para abordar esta cuestión, en primer lugar, analizamos si existían alteraciones en la morfología de los núcleos de las células que expresaban de modo estable las distintas construcciones de CRMP-2 con las que se ha venido trabajando a lo largo de este proyecto. Para ello se analizaron los núcleos marcados con DAPI en 1000 células de cada una de las cuatro poblaciones y se contabilizaron las células que poseían núcleos normales, núcleos multilobulados o varios núcleos (células multinucleadas).

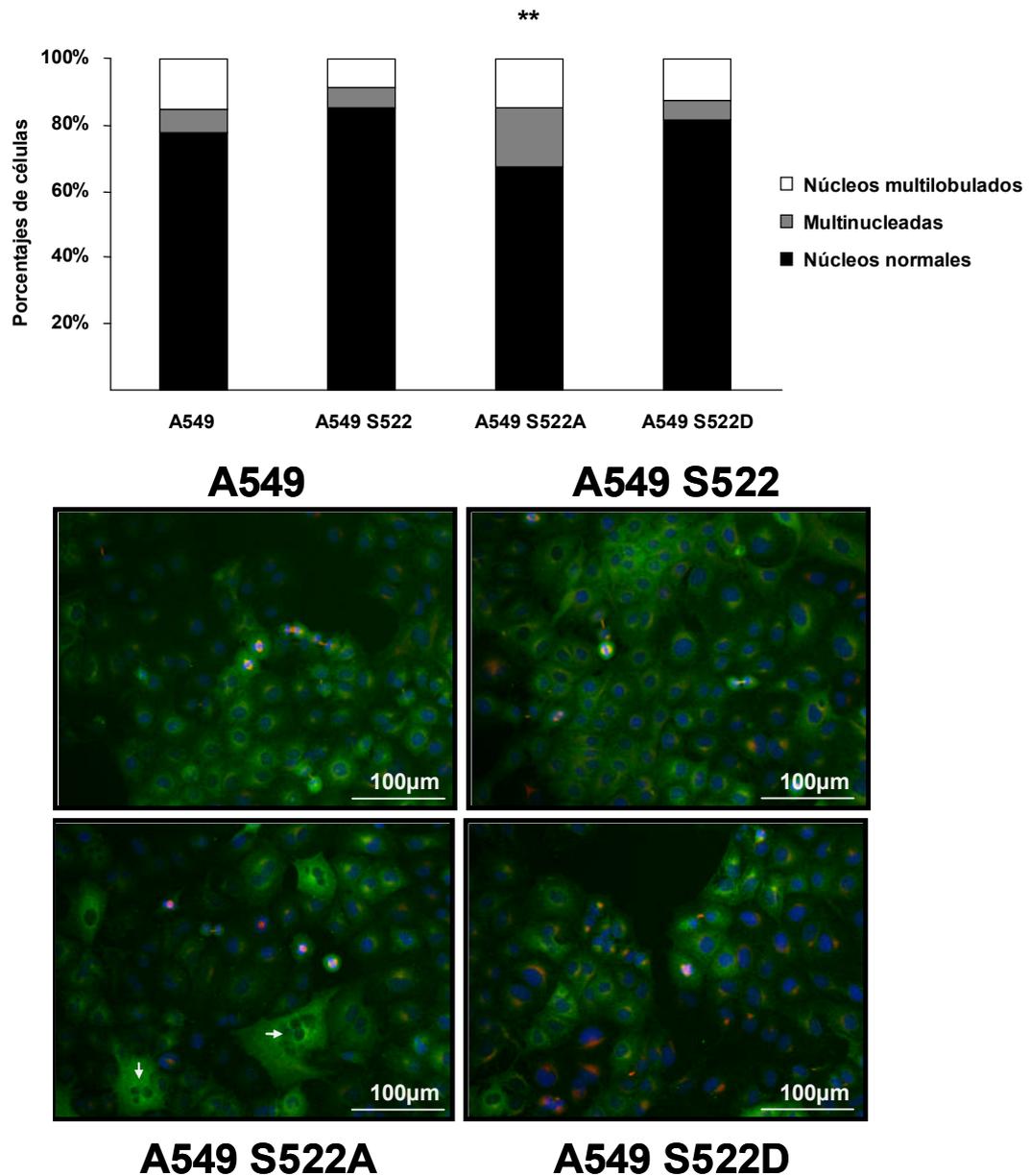


Figura R-27. Evaluación del porcentaje de células multinucleadas y multilobuladas en las poblaciones establemente transfectadas y aisladas de la línea celular A549. En abscisas se representan las poblaciones analizadas y en ordenadas el porcentaje de células con núcleos normales, multilobulados o células multinucleadas en cada población. En la parte inferior se muestra una fotografía respresentativa de cada población realizada con un aumento de 200X. Las puntas de flecha indican células multinucleadas. Para la estadística se realizó un test de contingencia rxn. ** (p < 0.01).

A continuación, determinamos mediante Western blot la expresión de p53 en el núcleo de las diferentes poblaciones estudiadas. Como se puede observar en la figura R-28, los niveles de p53 son mayores en extractos de proteína nuclear obtenidos a partir de la población que sobreexpresa la forma S522A o fosfodefactiva de CRMP-2 que en las demás poblaciones aisladas a partir de la línea celular A549, tal y como observamos en los tumores obtenidos en ratones, demostrando que ésta población celular posee una activación basal mayor de p53 que puede ser la responsable de los niveles mayores de muerte celular detectados en esta población.

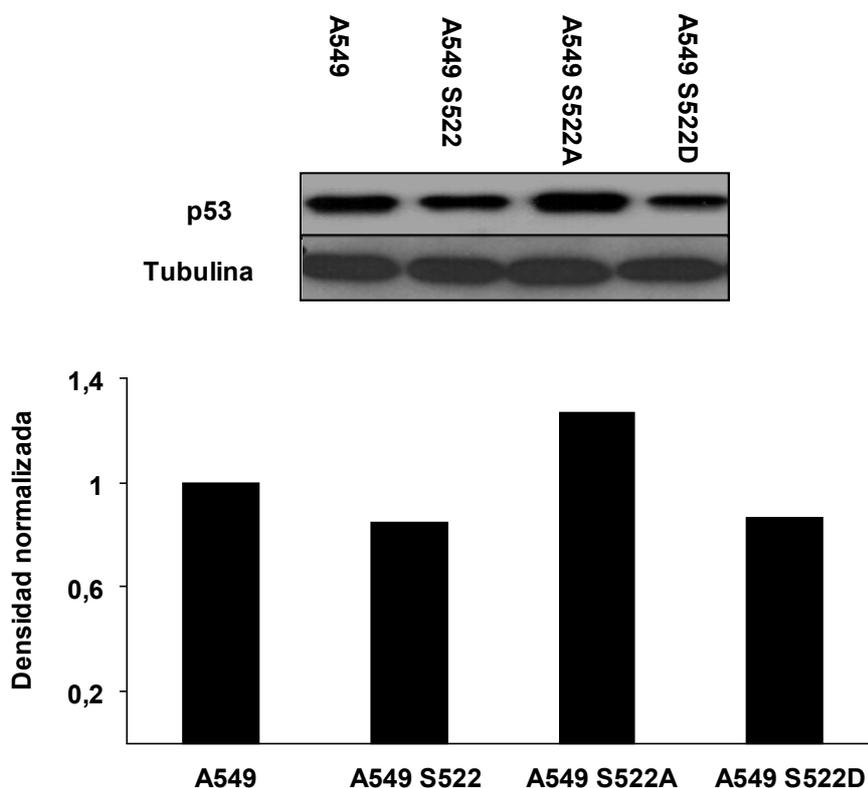


Figura R-28. Medida de la expresión de p53 en extractos de proteína nuclear en las distintas poblaciones aisladas a partir de la línea celular A549 mediante Western blot. En la gráfica inferior se representan los valores de densidad de cada banda inmunorreactiva obtenidos mediante análisis por densitometría. En el eje de ordenadas se representan los valores de densitometría normalizados (unidades arbitrarias) respecto al valor obtenido en células de la línea control A549. El experimento se llevó a cabo por triplicado. Se muestra un ejemplo representativo de los tres experimentos realizados.

7.2 Estudio de la fosforilación de CRMP-2 en células irradiadas con luz UV

Ante la posibilidad de que CRMP-2 se relacionase de alguna forma con p53 y provocase una mayor muerte celular, se decidió en primer lugar estudiar en qué medida la fosforilación de esta proteína participa en procesos de muerte celular en los que se ha establecido que interviene p53. Para ello, irradiamos con luz UV, a una intensidad de 25

$\mu\text{J}/\text{m}^2$ las células de la línea celular A549 con el fin de analizar las variaciones de la fosforilación de CRMP-2 en Ser522.

Las células fueron irradiadas con luz UV y mantenidas en cultivo durante 12, 24 y 48 horas en medio completo. Trascurrido este tiempo se obtuvieron extractos de proteínas totales y nucleares para evaluar los niveles de fosforilación de CRMP-2 en Ser522 y en Thr509 y Thr514 mediante Western-blot. En la figura R-29 se puede observar cómo en las células de adenocarcinoma pulmonar A549 expuestas a luz UV se induce activación de Caspasa-3 y proteólisis de PARP ya desde 12 horas después de la exposición a luz UV y se mantienen los niveles elevados 24 y 48 horas tras el estímulo. En estos mismos tiempos no observamos alteraciones en la expresión de CRMP-2 total en núcleo ni en el citoplasma de las células, pero sí detectamos una disminución significativa en la cantidad de CRMP-2 fosforilada tanto en Ser522 como en Thr509 y Thr514 en las muestras expuestas a luz UV. Además, se observó un descenso de los niveles de fosforilación en Thr509 y Thr514 de la forma proteica de 58kDa. Los niveles más bajos de fosforilación se alcanzaron 48 horas después del tratamiento. No pudimos detectar fosforilación de la proteína CRMP-2 en los extractos nucleares. De estos datos podemos deducir que la inducción de muerte provocada por irradiación de luz UV, que implica daño en el DNA, conlleva una disminución en los niveles de fosforilación de CRMP-2. Estas disminuciones en la fosforilación parecen ser originadas por la radiación UV, pero no podemos distinguir si son causa o consecuencia de la activación de P53. Sin embargo, tal y como se ha demostrado en la figura R-28, p53 se expresa en mayor medida en células que carecen de la fosforilación de CRMP-2 en Ser522. Luego nuestros resultados parecen más bien mostrar que la desfosforilación de CRMP-2 es anterior a la activación de p53.

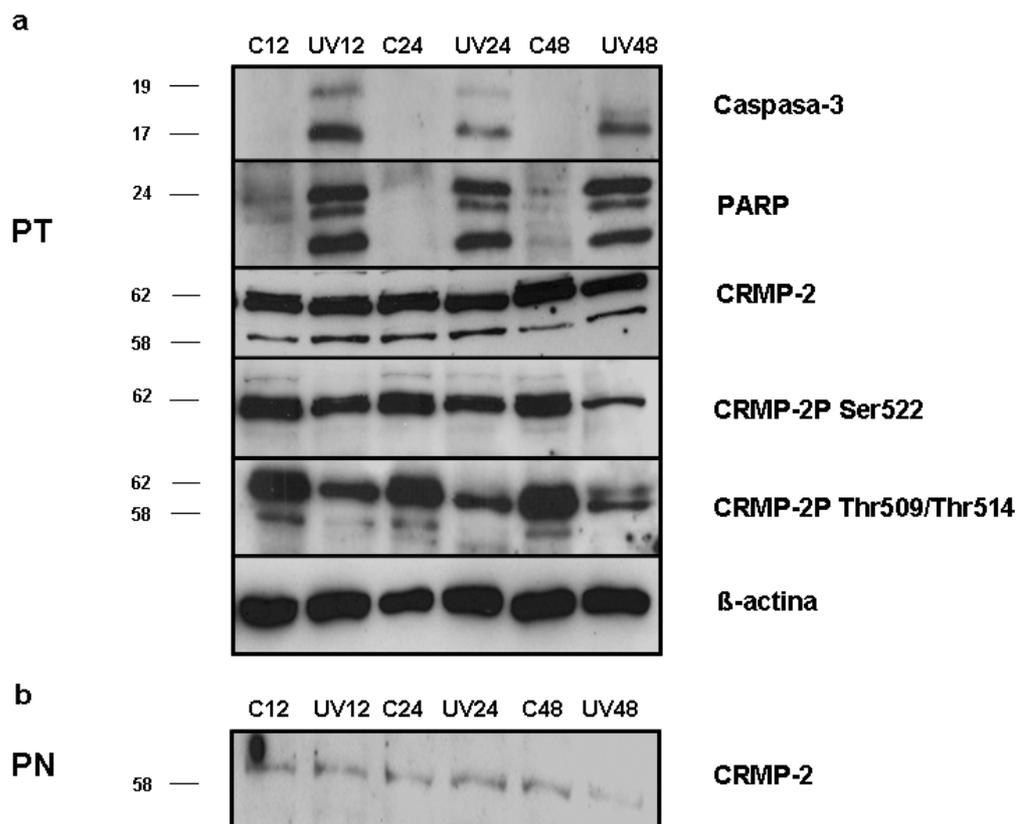


Figura R-29. Estudio de los niveles de expresión y de fosforilación de la proteína CRMP-2 mediante Western blot en extractos de (a) proteína total (PT) y (b) nuclear (PN) en células A549 irradiadas con luz ultravioleta (UV) C = Control, células sin irradiar; UV = Células irradiadas. El experimento se llevó a cabo por triplicado. Se muestra un ejemplo representativo de los tres experimentos realizados.

7.3 Activación de p53 en células privadas de suero

Quisimos estudiar si la desfosforilación de CRMP-2 además de contribuir a la muerte celular originada por daño cromosómico, podía estar implicado en muerte celular originada por otros agentes no genotóxicos. Para ello sometimos a las células a un tipo de estrés diferente como es la ausencia de factores de crecimiento durante 48 horas y determinamos la activación de p53 en esas condiciones.

Como se observa en la figura R-30, la ausencia de factores de crecimiento incrementó de manera significativa la expresión de p53 en las células que expresan la forma fosfodeficiente de CRMP-2. De las figuras precedentes podemos deducir claramente que de algún modo las alteraciones en la fosforilación del residuo Ser522 de CRMP-2 dan lugar a células más sensibles a cualquier agente inductor de muerte celular, muy probablemente porque sensibiliza al daño genotóxico.

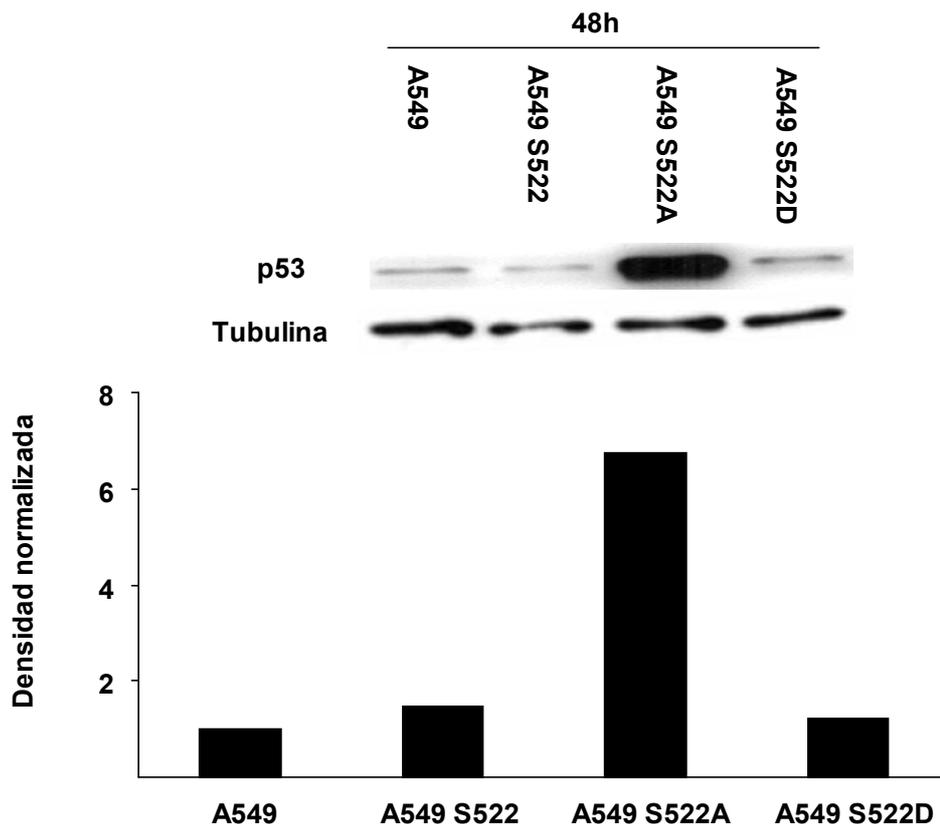


Figura R-30. Medida de la expresión de p53 en extractos de proteína nuclear en las distintas poblaciones aisladas a partir de la línea celular A549 mediante Western blot en ausencia de factores de crecimiento. En la gráfica inferior se representan los valores de densidad de cada banda inmunorreactiva obtenidos mediante análisis por densitometría. En el eje de ordenadas se representan los valores de densitometría normalizados (unidades arbitrarias) respecto al valor obtenido en células de la línea control A549. El experimento se llevó a cabo por triplicado. Se muestra un ejemplo representativo de los tres experimentos realizados.

8. Estudio de la función de CRMP-2 en la mitosis

Los datos expuestos hasta ahora han puesto de manifiesto que CRMP-2 está regulada mediante variaciones en su grado de fosforilación durante la división celular. También hemos demostrado que alteraciones en este patrón de fosforilación y desfosforilación pueden inducir la activación de p53 y la muerte celular. Para profundizar en la función de CRMP-2 en la mitosis realizamos una serie de experimentos basados fundamentalmente en microscopía confocal. Para ello, se subclonaron las tres construcciones del gen CRMP-2 (secuencia nativa, fosfodefactiva y fosfomimética) en vectores de expresión que contenían la secuencia de la proteína GFP, estableciendo así proteínas de fusión CRMP-2-GFP que permitiesen un seguimiento a tiempo real de la proteína durante el ciclo celular.

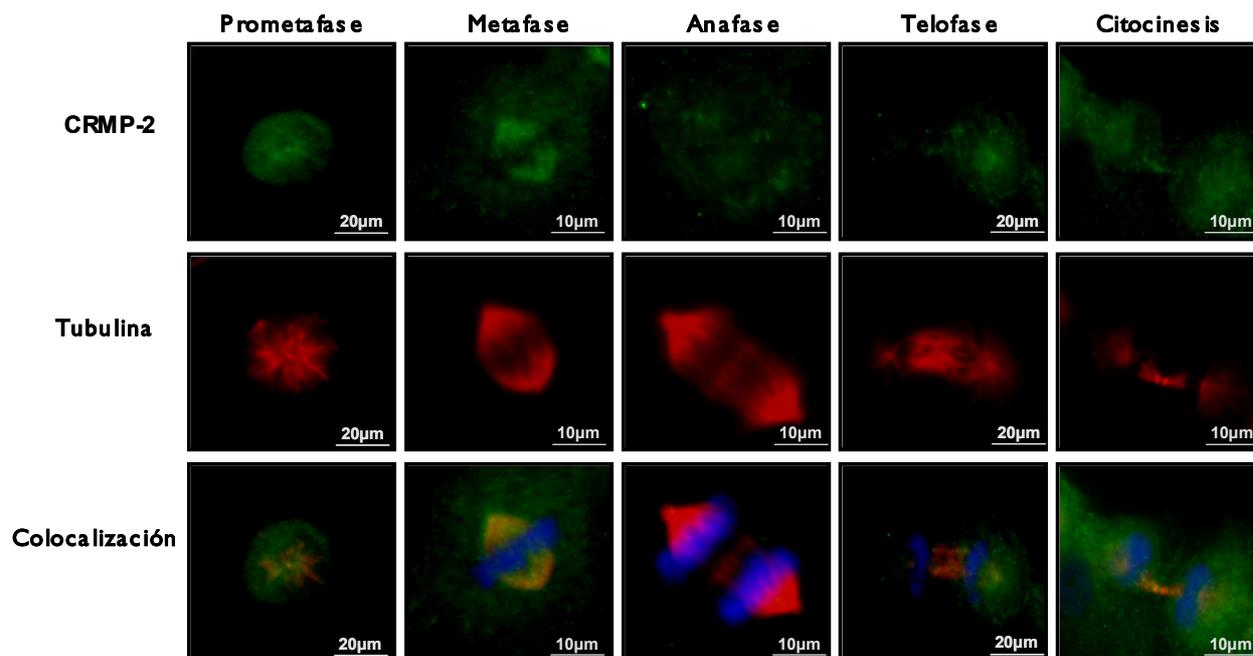


Figura R-31. Estudio de la localización de CRMP-2 y de la co-localización con tubulina en las distintas fases de la mitosis en células A549. En verde CRMP-2, en rojo tubulina y los núcleos en marcados en azul con DAPI II. Fotografías realizadas con un aumento de 400X.

8.1 Co-localización de la proteína CRMP-2 y tubulina durante la mitosis

En primer lugar se realizaron dobles inmunofluorescencias para detectar CRMP-2 total y tubulina en cultivos de células A549 crecidas sobre portaobjetos. Una vez fijadas las células, se realizaron las inmunofluorescencias y se tomaron imágenes de las células en las distintas fases del ciclo celular. Al analizar las imágenes observamos tal y como se puede ver en la figura R-31 que CRMP-2 co-localiza con tubulina en los MTs pro-metafásicos y en toda la extensión del huso mitótico en células en metafase. Esta co-localización es tan evidente durante la metafase que las imágenes obtenidas con el anticuerpo anti-tubulina o el anticuerpo anti-CRMP-2 de modo aislado son casi idénticas. Las primeras fases de la mitosis, constituyen un momento en el que existe una gran tasa de polimerización de los MTs. Por lo tanto, tiene sentido que CRMP-2 se una a la tubulina para favorecer la unión de nuevos dímeros a los extremos de los MTs en crecimiento.

Durante la anafase se pierde la localización de CRMP-2 en toda la extensión del huso acromático mientras que se aprecia una ligera co-localización con tubulina en los polos del huso acromático y en la zona intermedia donde se situó la placa ecuatorial. En

la telofase, se mantiene una intensidad de señal mayor en la zona de los polos celulares y menos intensamente en la zona media. Por último en la citocinesis, se observa una señal de CRMP-2 de gran intensidad en el cuerpo central, que co-localiza con tubulina.

De este análisis mediante dobles inmuno fluorescencias podemos concluir que CRMP-2 interacciona con tubulina de manera diferente a lo largo de las diversas fases de la mitosis, siendo máxima su interacción con tubulina en la metafase y durante la citocinesis únicamente en el cuerpo central, mientras que en las demás fases se observan co-localizaciones fundamentalmente en los extremos del huso acromático.

Con objeto de comprobar si la co-localización observada mediante inmunofluorescencias con anticuerpos específicos se correspondía con una interacción real entre tubulina y CRMP-2, se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación utilizando células sincronizadas en G2/M con nocodazol. Como se puede apreciar en la figura R-32 no se observó apenas interacción entre CRMP-2 y tubulina en células sincronizadas en prometafase (0h Post Noc). Por el contrario, trascurrida una hora de la retirada del nocodazol (1h Post Noc), tiempo en el que el 40% de estas se encuentran en metafase, se pudo detectar una clara interacción entre CRMP-2 y tubulina. Tres horas después de retirar el nocodazol, cuando la mayoría de las células han superado la citocinesis, se observa un descenso de la interacción. Con estos datos demostramos cómo CRMP-2 interactúa con la tubulina durante la mitosis celular.

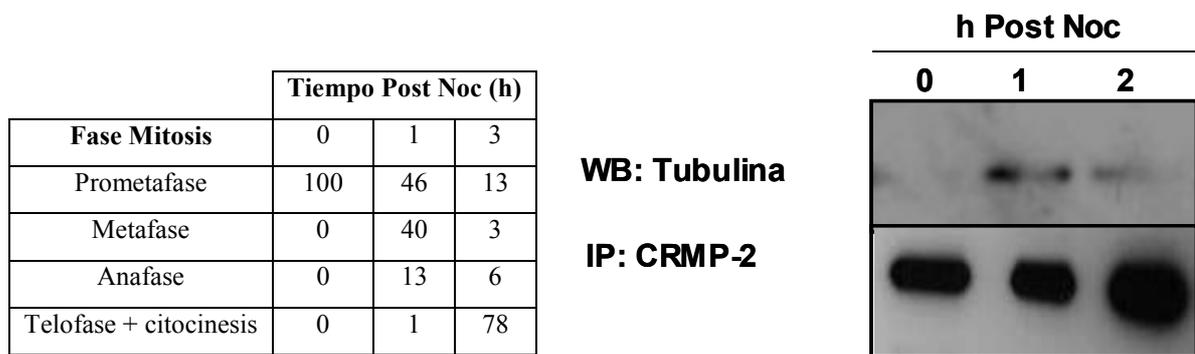


Figura R-32. Evaluación mediante inmunoprecipitación de los niveles de interacción entre CRMP-2 y tubulina en células A549 sincronizadas con nocodazol. En la tabla se representan los porcentajes de células que se encuentran en cada fase de la mitosis respecto al total de células que se encuentran en mitosis a las 0, 1 y 3 horas tras la retirada del nocodazol (Noc). P = Prometafase, M = Metafase, A = Anafase, T+C = Telofase + citocinesis.

8.2 Interacción con tubulina y duración de la mitosis en células transfectadas con las formas fosfodefactivas y fosfomiméticas de CRMP-2

Una vez descrita la interacción de CRMP-2 con tubulina durante el ciclo celular quisimos determinar si las alteraciones en la fosforilación de la misma producían cambios en el patrón de co-localización observado. Para ello, se construyeron tres vectores de expresión pCLGFP-CRMP-2 que permitiesen sobreexpresar la proteína CRMP-2 nativa, la forma fosfodefactiva (S522A) de CRMP-2 y la forma fosfomimética (S522D) de CRMP-2 unidas a GFP. La fusión de GFP se realizó en el extremo aminoterminal de la proteína CRMP-2. Como control negativo se utilizó un vector vacío que sólo expresa GFP, que como se observa en la figura R-33 no presenta el mismo patrón de co-localización con tubulina que las distintas construcciones de CRMP-2, lo que demuestra que la co-localización observada en las células transfectadas se debe a la expresión de la proteína CRMP-2.

8.2.1 Co-localización con tubulina de las formas fosfomimética y fosfodefactiva de CRMP-2 durante la mitosis

Se transfectaron transitoriamente las distintas construcciones de CRMP-2-GFP en células A549. 36 horas después, se realizaron inmunofluorescencias para detectar tubulina en las células que expresaban cada una de las construcciones. En la figura R-33, se observa una co-localización CRMP-2 con tubulina en la metafase de las células transfectadas con la forma nativa o S522 de CRMP-2. Se observa un incremento de la co-localización entre CRMP-2 y tubulina en la metafase en las células transfectadas con la forma fosfodefactiva o S522A de CRMP-2, mientras que en las poblaciones que sobreexpresan la forma fosfomimética o S522D, se observa una co-localización menor entre ambas proteínas.

Nos pareció de gran interés observar que tanto las células que sobreexpresan la forma desfosforilada de la proteína como aquellas que sobreexpresan la proteína nativa, presentan co-localización de CRMP-2 con los MTs de la zona intermedia durante la anafase, mientras que en la población que expresa la forma fosfomimética de CRMP-2 se observa una co-localización menor entre CRMP-2 y tubulina, y el huso parece estar peor estructurado que en las células que expresan las formas nativas o fosfodefactivas de CRMP-2. Como se explicó en el apartado de Introducción, la anafase es una etapa de

la mitosis en la que se requiere un incremento de la despolimerización de los MTs asociados a los cinetocoros con el fin de separar las dos cromátidas hermanas, aunque también existe un aumento en la polimerización en los extremos de los MTs no asociados a los cinetocoros o ipMTs.

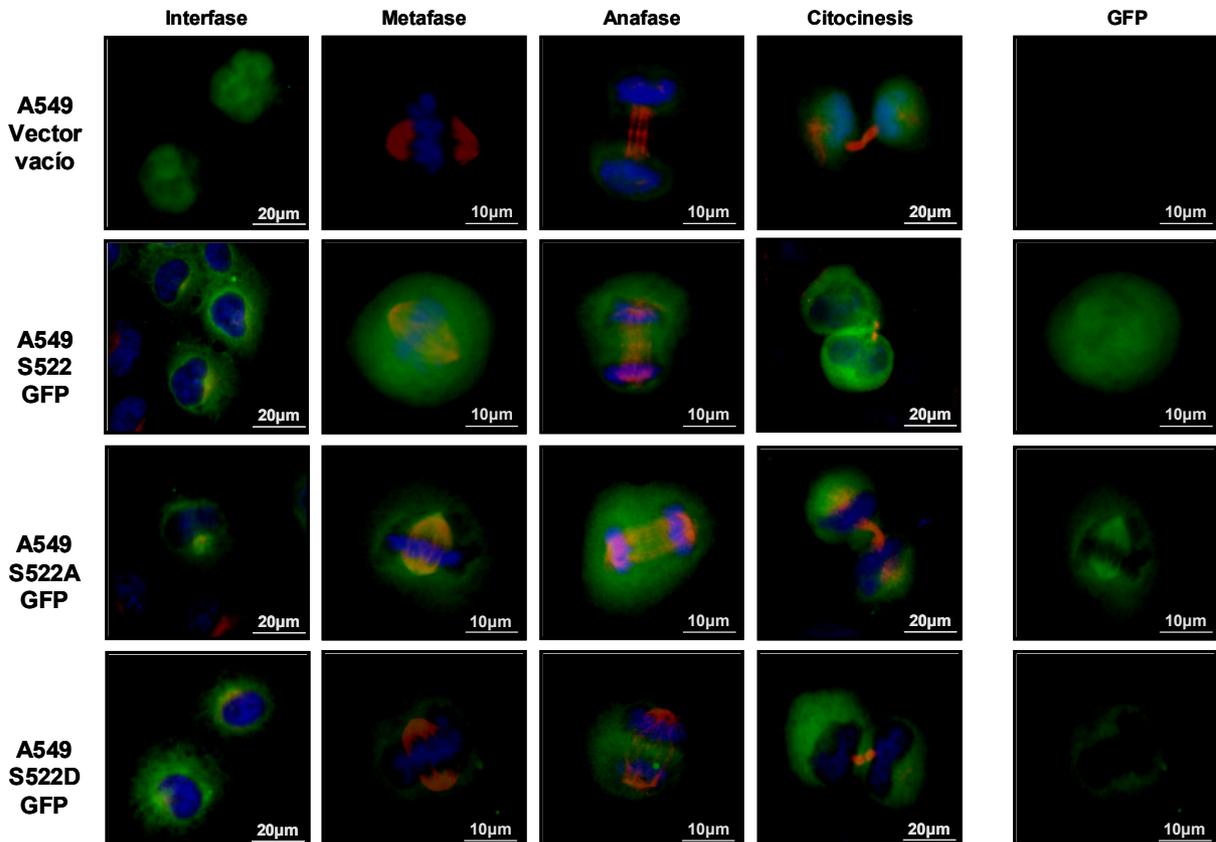


Figura R-33. Estudio de la localización de CRMP-2 y de su colocalización con tubulina en las distintas fases de la mitosis en células A549 transfectadas transitoriamente con la proteína de fusión CRMP-2-GFP. En verde CRMP-2-GFP, en rojo tubulina y los núcleos en marcados en azul con DAPI II. Fotografías realizadas con un aumento 400X. A la derecha se presentan fotografías representativas de la localización de CRMP-2-GFP durante la metafase

En el caso de la citocinesis, se observó localización de CRMP-2 en todo el cuerpo medio, tanto en las células que sobreexpresaban la proteína como en las células que expresaban la forma fosfomimética. En el caso de la población S522A o fosfodefensiva, no se observó esta co-localización entre ambas proteínas en esta estructura o la intensidad disminuía significativamente.

Este patrón de co-localización, dependiente de fosforilación, entre CRMP-2 y tubulina también se observó en células transfectadas establemente obtenidas a partir de la línea celular A549 durante la mitosis. Los datos de prometafase, metafase y anafase correspondían en su totalidad con los obtenidos en células transfectadas

transitoriamente. No obstante, el estudio de la co-localización en estas células establemente transfectadas permitió observar que en la citocinesis la co-localización entre la forma fosfodefactiva de CRMP-2 (S522A) y la tubulina está restringida al surco de escisión del cuerpo medio, mientras que tanto en las células A549 control, como en aquellas células en las que se sobreexpresó la forma nativa y fosfomimética de CRMP-2, la co-localización entre ambas proteínas se producía en la totalidad del cuerpo medio (Figura R-34).

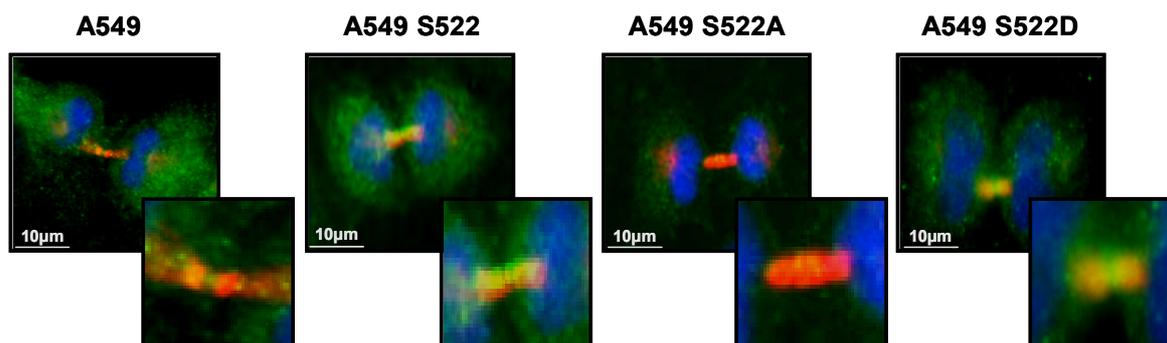


Figura R-34. Estudio mediante inmunofluorescencia de la localización de CRMP-2 y de la co-localización con tubulina en la citocinesis en células A549 transfectadas establemente con las formas nativa (S522), fosfodefactiva (S522A) y fosfomimética (S522D) de CRMP-2. En verde CRMP-2, en rojo tubulina y los núcleos en marcados en azul con DAPI II. Fotografías realizadas con un aumento 400X. En la parte inferior derecha de cada foto se presenta una ampliación que permite observar con mayor detalle la co-localización de CRMP-2 y tubulina en el cuerpo medio.

8.2.2 Estudio mediante inmunoprecipitación de la interacción de las formas mutadas de CRMP-2 con tubulina durante la mitosis

Para comprobar que la forma fosfodefactiva de CRMP-2 interaccionaba en mayor grado con tubulina en metafase que las demás construcciones de la proteína, realizamos experimentos de inmunoprecipitación de CRMP-2 y tubulina, utilizando proteínas extraídas a partir de poblaciones celulares transfectadas transitoriamente con los vectores de expresión que codifican para CRMP-2-GFP con un elevado porcentaje de células en metafase. Para ello, se sincronizaron las células con nocodazol una vez transfectadas y se realizaron inmunoprecipitaciones 1 hora después de la retirada del mismo.

Como se observa en la figura R-35, transcurrida una hora tras la retirada del nocodazol, se observa un aumento de la interacción entre CRMP-2 y tubulina en aquellas células que expresan la proteína transfectadas que contiene la mutación S522A o fosfodefactiva.

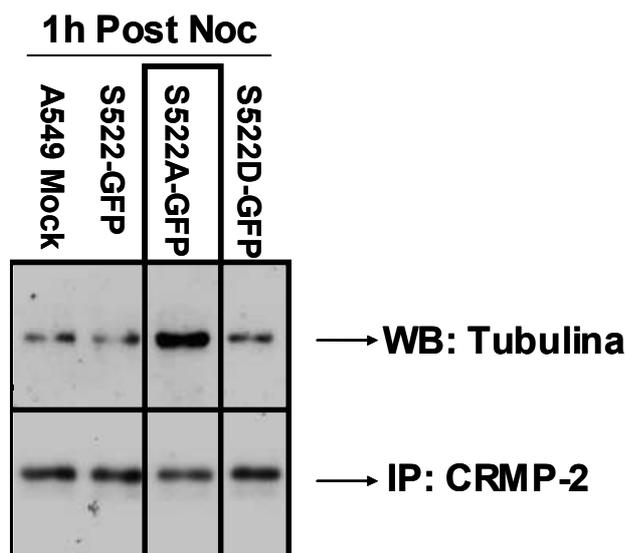


Figura R-35. Evaluación mediante inmunoprecipitación de los niveles de interacción entre CRMP-2 y tubulina en células A549 transfectadas transitoriamente con la proteína de fusión CRMP-2-GFP y sincronizadas con nocodazol.

Estos resultados llevaron a preguntarnos si las variaciones en la interacción entre CRMP-2 y tubulina afectaban a la división celular por alterar la velocidad de polimerización y despolimerización de los MTs. Para abordar experimentalmente esta pregunta decidimos estudiar tanto el porcentaje de células en cada fase de la mitosis como la duración de la misma en células de NSCLC transfectadas con las formas nativa y mutadas de CRMP-2, y sincronizadas con nocodazol.

8.2.3 Relación entre el estado de fosforilación de CRMP-2 y la duración de la mitosis

En primer lugar, se sincronizaron células de las tres poblaciones transfectadas establemente con los vectores de expresión de CRMP-2 con nocodazol. Se realizaron experimentos de progresión mitótica en los que se evaluaron los porcentajes de células observadas en cada fase de la mitosis en las distintas poblaciones a los 30, 60, 90, 120 y 180 minutos después de haber retirado el freno del ciclo celular, contando un mínimo de 50 células por muestra. Los resultados se presentan como porcentajes respecto a las mitosis analizadas en cada muestra.

Como se puede observar en la figura R-36, 30 minutos después de la retirada del nocodazol, la población que expresaba la forma fosfomimética (S522D) presentó el menor porcentaje de metafases, un 8% frente a un 19,5% en la población no transfectada, un 35% en las población que expresa la forma nativa (S522) y un 25% de

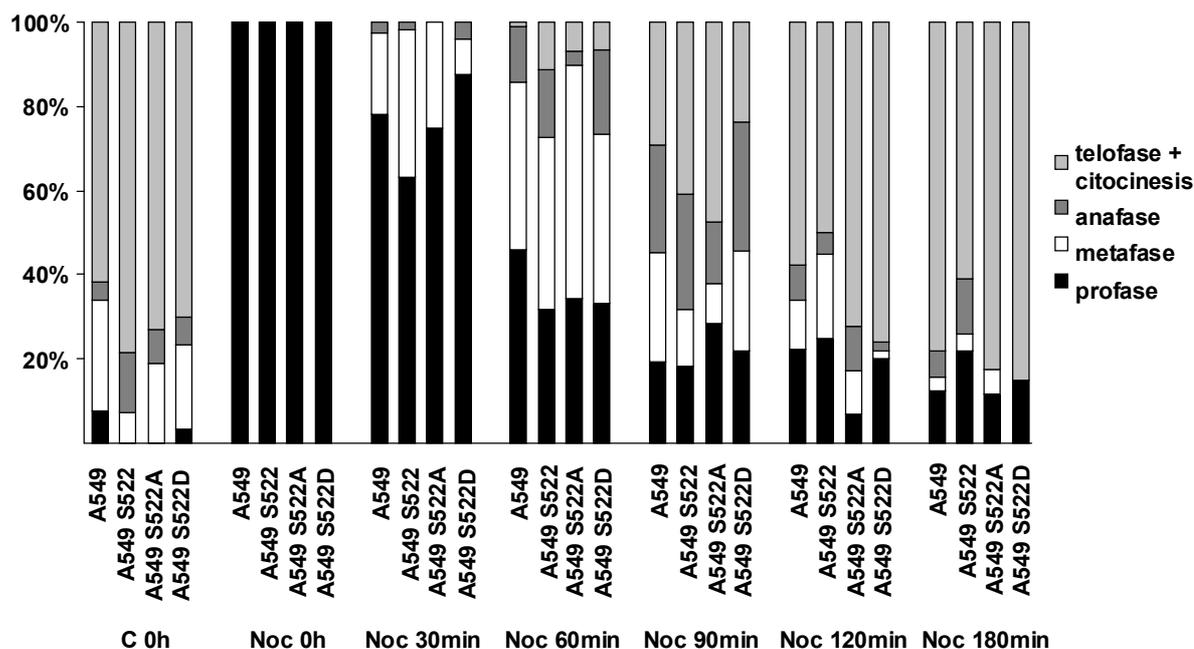


Figura R-36. Evaluación de la duración de la mitosis en los clones establemente transfectados con la forma nativa (S522), fosfodefactiva (S522A) y fosfomimética (S522D) de CRMP-2 y aislados a partir de la línea celular A549 sincronizadas con nocodazol. La determinación de la fase de la mitosis se realizó sobre muestras de dobles inmunofluorescencias realizadas frente a CRMP-2 y tubulina. En el eje de ordenadas se representan los porcentajes de células en cada fase de la mitosis.

las mitosis analizadas en la población CRMP-2 fosfodefactiva (S522A). Además, en ese mismo tiempo, todas las poblaciones, excepto la que expresaba la forma fosfodefactiva de la proteína (S522A), presentan entre un 2% y un 4% de células en anafase. Estos resultados tienen sentido ya que la forma fosfomimética impide la correcta polimerización de tubulina, necesaria para entrar en metafase, mientras que la forma fosfodefactiva de CRMP-2 podría facilitar este proceso.

Al analizar los porcentajes de células en metafase y anafase a los 60 minutos de haber retirado el nocodazol observamos que un 52% de las células de la población CRMP-2 fosfodefactiva se encontraban en metafase, mientras que sólo un 3,5% de las células de la misma población se encontraban en anafase. En las demás poblaciones los porcentajes de células en metafase se situaron alrededor de un 40% y presentaron valores entre un 13-20% de células en anafase. Además, sumando las células que se encontraban en anafase y telofase, sólo un 10% de las células de la población fosfodefactiva habían superado la metafase, frente al 14% de la población control, el 27% de las células que sobreexpresaban la forma nativa de la proteína o el 26,5% de la población que expresa la forma fosfomimética. Estos datos se pueden explicar teniendo en cuenta que la imposibilidad de fosforilar a CRMP-2 en la forma fosfodefactiva impide la despolimerización de tubulina necesaria para entrar en anafase. Por el

contrario, la forma fosfomimética que dificultaba la llegada a la metafase, parece facilitar la entrada en anafase ya que no colabora en la estabilización de los MTs del huso mitótico y permite o favorece su despolimerización.

Al analizar la distribución de células en cada fase de la mitosis 90 minutos tras la retirada de nocodazol nos sorprendió observar que la población que expresaba la proteína fosfodefensiva de CRMP-2 (S522A) era la que mayor porcentaje de células en telofase o citocinesis presentaba (47,5%). Estos datos, apuntan a que la duración de la anafase en esta población de células que sobreexpresan la forma fosfodefensiva de CRMP-2 podría ser menor que en el resto de poblaciones en estudio, o que incluso que esta fase prácticamente no exista.

Con el fin de comprobar si esto es así, se realizaron medidas de la duración de la mitosis mediante microscopía confocal *in vivo* de células A549 transfectadas con las construcciones CRMP-2-GFP fosfodefensiva y fosfomimética.

8.3 Estudio de la duración de la mitosis mediante microscopía confocal *in vivo*

Las células A549 fueron transfectadas transitoriamente con las distintas construcciones de CRMP-2-GFP (nativa, fosfodefensiva y fosfomimética) y se sincronizaron en prometafase mediante tratamiento con nocodazol. Tras la sincronización, se seleccionaron células que se encontraban en prometafase por su aspecto redondeado y en las que se observara una condensación de la cromatina. Se realizaron fotografías de estas células cada dos minutos, durante dos horas, con el fin de analizar tanto la localización de CRMP-2 durante la mitosis, como la duración de las distintas fases de la mitosis en cada una de estas poblaciones celulares. Con estas fotografías tomadas cada dos minutos se realizaron vídeos de la división celular de cada una de las poblaciones que se adjuntan en el DVD como “vídeos mitosis CRMP-2” (Vídeos 1-4).

En estos vídeos, de los cuales se presentan fotogramas representativos en la figura R-37, se confirman parte de los datos observados anteriormente. Así, las células transfectadas con la forma S522A o fosfodefensiva de la proteína se observa una mayor intensidad de marcaje de CRMP-2 en el huso acromático de células en metafase, que respecto al resto de poblaciones. Durante la anafase, se observa una localización de todas las formas de CRMP-2 en la zona intermedia, siendo siempre más intensa en el

caso de las células que sobreexpresan la forma fosfodefactiva de CRMP-2. Posteriormente, durante la citocinesis, todas las formas de CRMP-2 forman parte del cuerpo medio que conecta las dos células “hijas”. No obstante, como se puede observar en la figura R-37 y en el video 5 adjunto, mientras en las formas S522 y S522D la citocinesis termina correctamente, en las células que sobreexpresan la forma S522A, la citocinesis se prolonga en el tiempo debido a la falta de escisión del cuerpo medio. De hecho, en el 33% de los casos las células no terminaron de separarse y fusionaban en una única célula multinucleada.

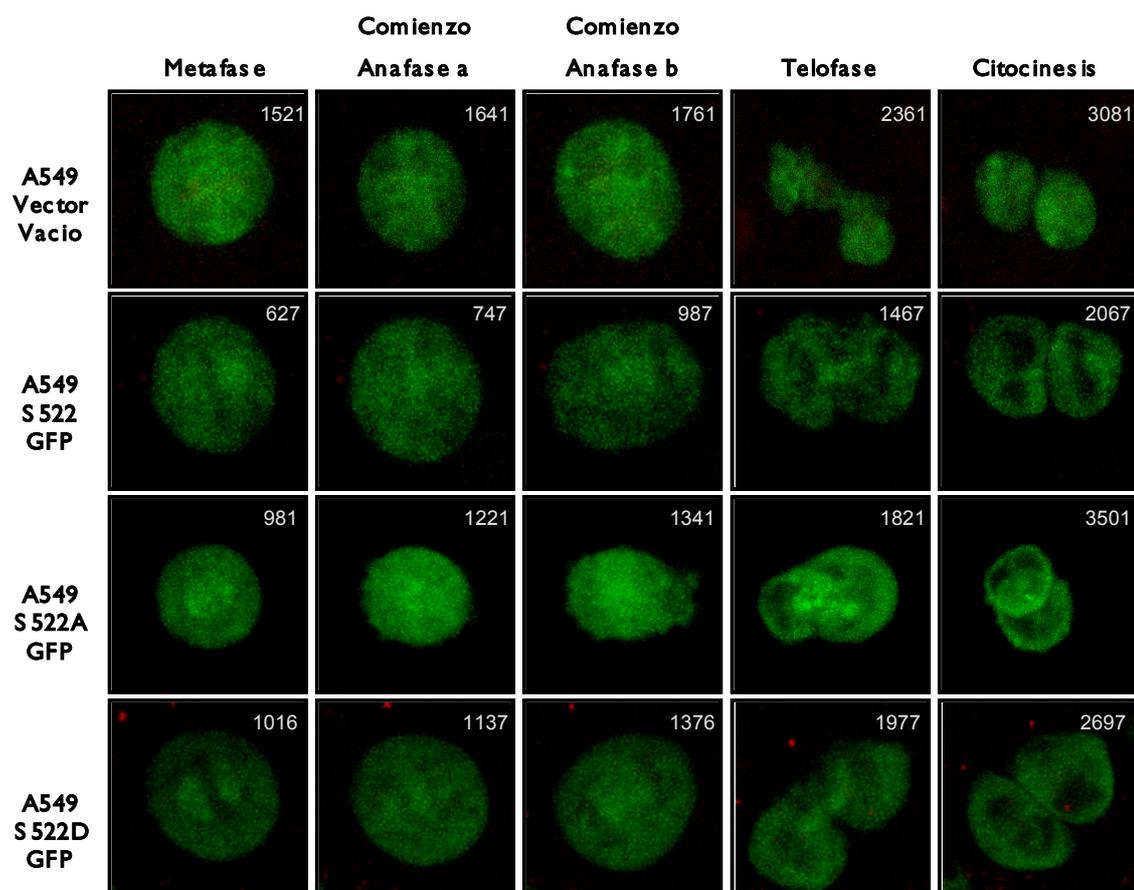


Figura R-37. Evaluación de la localización de CRMP-2-GFP en células transfectadas transitoriamente con las formas nativa (S522), fosfodefactiva (S522A) y fosfomimética (S522D) de la proteína de fusión CRMP-2-GFP y sincronizadas con nocodazol. Se presentan 5 fotogramas representativos de videos de células transfectadas con cada una de las formas de CRMP-2 y exclusivamente con GFP, que coinciden con momentos en los cuales las células se encuentran en metafase, comienzo de la anafase a, comienzo de la anafase b, telofase y separación celular. En el margen izquierdo de cada fotograma se adjunta el tiempo en segundos desde el comienzo del video.

Quisimos comprobar si la alteración de los niveles de fosforilación de la proteína mediante la transfección con las secuencias fosfomimética o fosfodefactiva ocasionaba diferencias en la duración de la mitosis o en alguna de las fases de esta. En primer lugar, medimos el tiempo que transcurre desde la retirada de nocodazol en prometafase hasta

la separación física entre las dos células “hijas”, con el fin de medir la duración total de la división celular en las distintas poblaciones.

Como se puede apreciar en la figura R-38, al analizar la duración total de la mitosis en las distintas poblaciones, aquellas células que fueron transfectadas con la forma nativa de CRMP-2 presentaron una división celular más rápida (2140 s) que las transfectadas sólo con el vector vacío (3074 s). Aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas debido a la heterogeneidad de los datos del grupo control, lo que puede ser resuelto aumentando el tamaño muestral del grupo en un futuro. No obstante, la sobreexpresión de la proteína fosfodeficiente o fosfomimética de CRMP-2 no tuvo este mismo efecto, y presentaron mitosis significativamente más lentas que las células que sobreexpresan la forma nativa de CRMP-2 (2815 s y 3228 s respectivamente). Por lo tanto, la sobreexpresión de CRMP-2 y su correcta fosforilación durante las distintas fases de la mitosis parece influir en que las mitosis sean más rápidas.

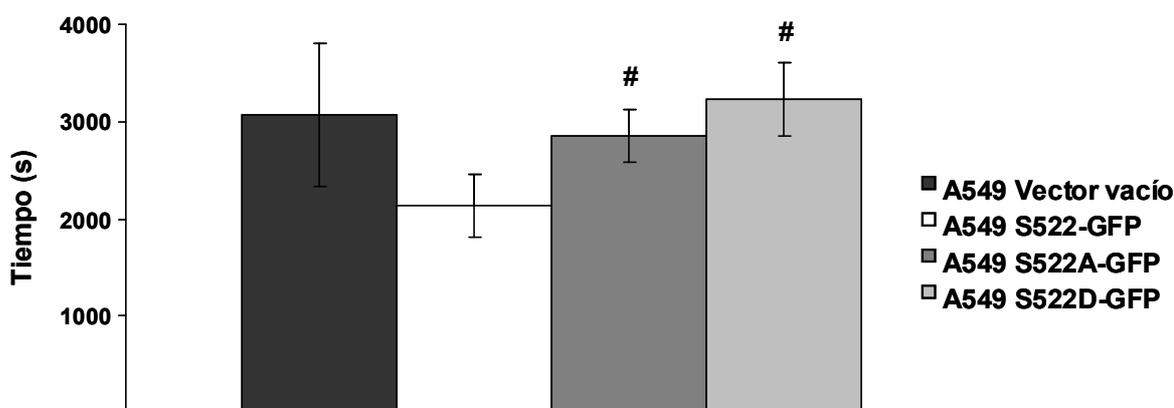


Figura R-38. Medida de la duración de la división celular en células transfectadas transitoriamente con las formas nativa (S522), fosfodeficiente (S522A) y fosfomimética (S522D) de la proteína de fusión CRMP-2-GFP o exclusivamente con GFP (Vector vacío) y sincronizadas con nocodazol. En la gráfica se representa el tiempo transcurrido desde la prometáfase hasta la separación celular. Tamaño muestral: n=6 en vector vacío, n=11 en S522, n=9 en S522A, n=13 en S522D. En ordenadas se representa el tiempo en segundos. # ($p < 0,05$) respecto a la población A549 S522.

Para evaluar si esta disminución en la duración de la mitosis se debe al acortamiento de alguna de las fases de la misma, se decidió analizar la duración de varias fases de la mitosis. Para ello, en primer lugar se midió el tiempo que transcurre desde la prometáfase (momento en el que las células adquieren una apariencia circular y hay una condensación de la cromatina) hasta el momento de la transición entre metafase

y anafase (caracterizado por el comienzo de la separación de las cromátidas desde el plano ecuatorial hacia los polos celulares).

No fue posible realizar esta determinación en las células transfectadas con vector vacío debido a la localización inespecífica de la GFP, que impedía determinar correctamente el momento exacto en el que comienza la anafase. Por eso, con el fin de poder realizar comparaciones frente a células transfectadas con el vector vacío, también se realizaron medidas del tiempo transcurrido desde la prometafase hasta el comienzo de la separación de los polos celulares, que es posible visualizar claramente y que coincide con el comienzo de la anafase b. La anafase b se caracteriza por una polimerización de los ipMTs situados en la zona intermedia, lo que produce una separación de los polos, con la consecuente elongación celular y la pérdida de la forma redondeada de la célula típica de fases previas de la mitosis (Maiato *et al.* 2004; Civelekoglu-Scholey y Scholey 2010). La anafase b sucede a continuación de la anafase a, como se ha descrito en la introducción. La duración de la anafase a es muy corta, por tanto la medida de comienzo de anafase b puede ser también utilizada como una aproximación para estudiar el tiempo transcurrido hasta dicha transición.

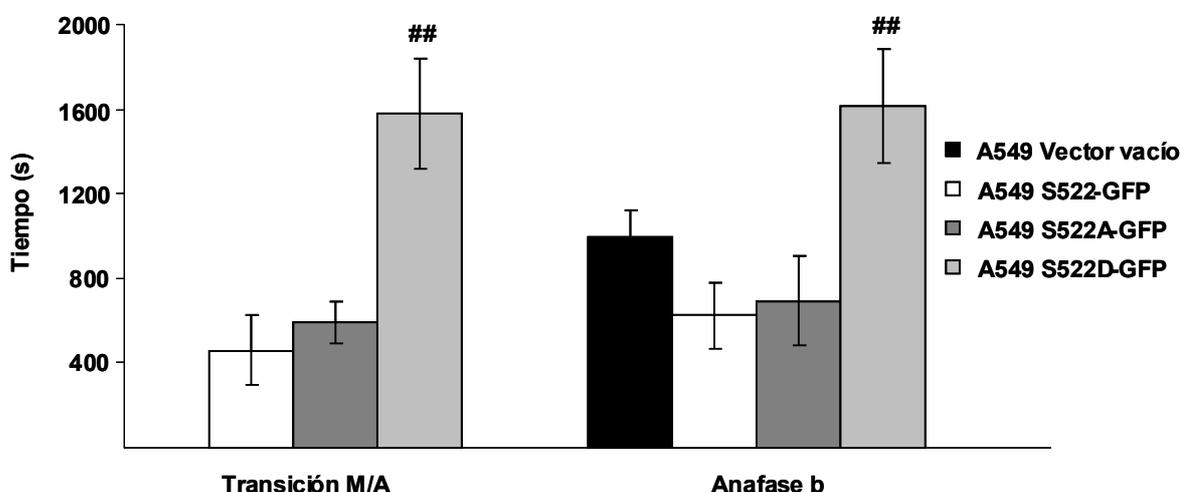


Figura R-39. Medida del tiempo comprendido entre el comienzo de la prometafase y el momento de la transición entre metafase y anafase, y comienzo de la anafase b en células transfectadas transitoriamente con las formas nativa (S522), fosfodefactiva (S522A) y fosfomimética (S522D) de la proteína de fusión CRMP-2-GFP o exclusivamente con el vector vacío. Para la estadística se realizó un test de ANOVA de k muestras independientes. ## ($p < 0,01$) respecto a la población A549 S522. Tamaño muestral hasta transición M/A n=9 en S522, n=9 en S522A, n=16 en S522D. Tamaño muestral hasta anafase b: n=8 en mock, n=14 en S522, n=14 en S522A, n=17 en S522D. En ordenadas se representa el tiempo en segundos.

Como se puede observar en la figura R-39, aquellas células que son transfectadas con la forma S522D o fosfomimética de la proteína necesitan más tiempo

tanto para terminar la metafase y empezar la anafase, como para comenzar la anafase b (1582s y 1611 s de media respectivamente). Por el contrario, las células expresaban la forma nativa de CRMP-2 o la forma fosfodefactiva o S522A necesitan tiempos menores que las células control para alcanzar la anafase b, aunque no se detectaron diferencias estadísticamente significativas.

A continuación, decidimos medir la duración de la anafase (y más concretamente la anafase b) en las células que sobreexpresan las distintas formas mutantes de CRMP-2. Por anafase, entendimos el tiempo comprendido entre la transición metafase-anafase y el momento en el cual se observó la mayor distancia entre los polos celulares. No se pudo realizar esta medición en el caso de las células transfectadas exclusivamente con GFP, ya que como se explicó anteriormente, la inespecificidad de la localización de GFP impidió determinar el tiempo exacto en el cual se produce esta transición en las células del grupo transfectadas con el vector vacío (A549 vector vacío). Por anafase b entendimos el tiempo comprendido entre el comienzo de la separación de los polos, con la consecuente pérdida de la forma circular de la célula propia de fases previas de la mitosis, y el momento en el cual se observó la mayor distancia entre los polos celulares y se observó la descondensación cromosómica, que marca el comienzo de la telofase.

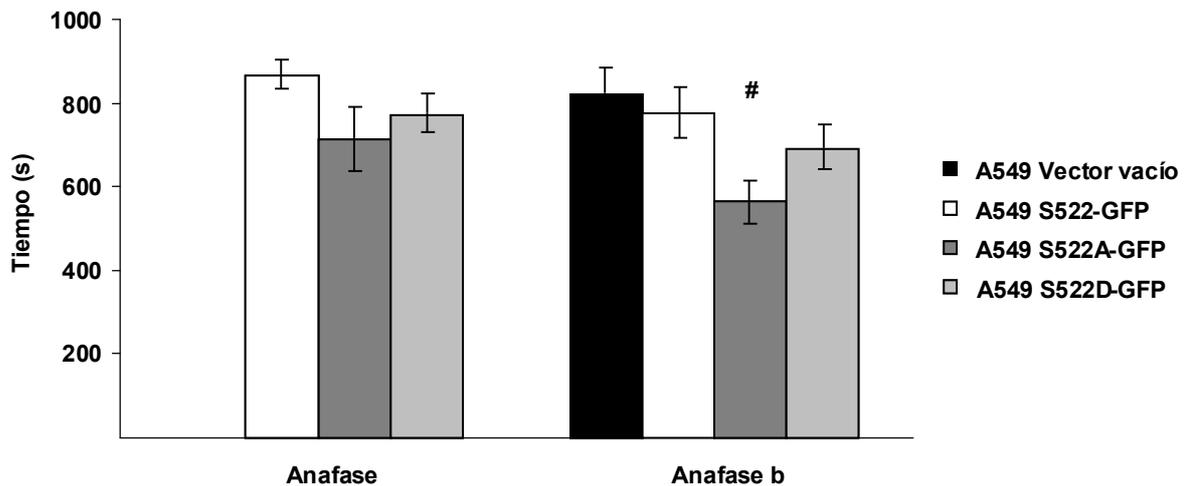


Figura R-40. Medida de la duración de la anafase y de la anafase b en células transfectadas transitoriamente con las formas nativa (S522), fosfodefactiva (S522A) y fosfomimética (S522D) de la proteína de fusión CRMP-2-GFP o exclusivamente con GFP (Vector vacío). Tamaño muestral en duración de anafase total, n=9 en S522, n=7 en S522A, n=14 en S522D. Tamaño muestral en duración de la anafase b n=7 en mock, n=14 en S522, n=13 en S522A, n=22 en S522D. En ordenadas se representa el tiempo en segundos.

Como se observa en la figura R-40, no se observaron diferencias significativas en la duración de la anafase entre las células transfectadas con las distintas construcciones de CRMP-2. No obstante, la anafase b de las células que sobreexpresaban la forma fosfodefensiva S522A de CRMP-2 era significativamente más corta que en el resto de las poblaciones (566 s).

Por último, decidimos analizar la duración de la citocinesis en las células que sobreexpresan las distintas formas de CRMP-2. Para calcular la duración de la citocinesis, medimos el tiempo comprendido entre el momento en el cual se observa la máxima separación de los polos celulares y la separación citoplasmática total de las dos células. Como se puede observar en la figura R-41, las células que sobreexpresaban la forma fosfodefensiva de la proteína o S522A necesitan 2109 s de media para realizar la citocinesis, tiempo significativamente mayor que el que necesita el resto de las poblaciones.

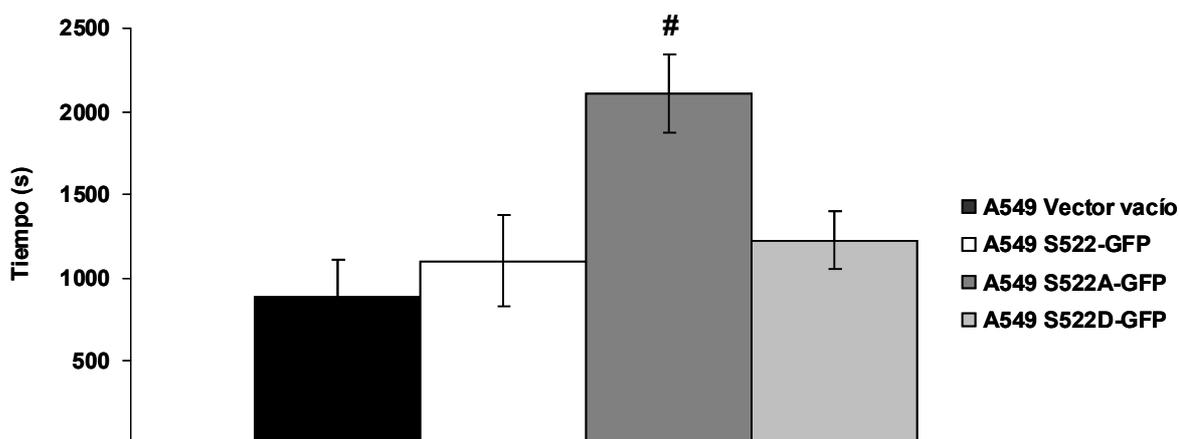


Figura R-41. Medida de la duración de la citocinesis en células transfectadas transitoriamente con las formas nativa (S522), fosfodefensiva (S522A) y fosfomimética (S522D) de la proteína de fusión CRMP-2-GFP o exclusivamente con GFP (Vector vacío). Para la estadísticas se realizó un test de ANOVA de k muestras independientes. # ($p < 0,05$) respecto a la población A549 S522-GFP. En la gráfica se mide el tiempo que transcurre entre la formación del cuerpo medio y la separación celular. Tamaño muestral: $n=6$ en vector vacío, $n=10$ en S522, $n=9$ en S522A, $n=15$ en S522D. En ordenadas se representa el tiempo en segundos.

Además, como se comentó anteriormente, a este dato de una mayor duración de la citocinesis hay que añadir el hecho de haber observado que un 33% de los casos analizados en células que sobreexpresaban CRMP-2S522A-GFP no fueron capaces de dividirse completamente. Este hecho fue observado también en un 20% de las divisiones celulares analizadas en el caso de sobreexpresar la forma nativa de CRMP-2. Por el contrario, no se observó en el caso de las células que sobreexpresaron la forma fosfomimética o S522D de CRMP-2 ni en el caso de transfectar a las células con el

vector vacío. Estos errores en la separación entre las dos células hijas pueden ser los originantes de que las células terminen por fusionarse de nuevo y adherirse al sustrato como una única célula multinucleada. Por lo tanto, ante estos dos datos, podemos afirmar que la fosforilación de CRMP-2 es necesaria durante la citocinesis para producir una correcta escisión final entre ambas células.

De todos los datos anteriormente expuestos se puede deducir que CRMP-2 participa en la mitosis de una manera dependiente de su fosforilación y que su sobreexpresión favorece mitosis más rápidas. A su vez, alteraciones en el patrón de fosforilación y desfosforilación de esta proteína provocan variaciones en la duración de las distintas fases de la mitosis, muy probablemente debido a cambios en la dinámica de los MTs. Además, en el caso de las células que sobreexpresan la forma fosfodeficiente de CRMP-2, se observa la aparición de un mayor número de células multinucleadas. Con estos resultados hemos demostrado de manera concluyente la participación de CRMP-2 en el proceso de división celular.

Discusión

El cáncer de pulmón cuenta con unas tasas de prevalencia y mortalidad elevadas, por lo que durante los últimos años se ha incrementado el interés por identificar nuevos marcadores moleculares, que permitan detectar esta neoplasia en estadios precoces y que puedan servir como factores pronóstico de la enfermedad (Brundage *et al.* 2002).

Se ha propuesto también la conveniencia de establecer perfiles de expresión génica de cada subtipo tumoral (Bhattacharjee *et al.* 2001; Inamura *et al.* 2005; Hayes *et al.* 2006). Otras prioridades han sido detectar genes que permitan establecer un pronóstico de la evolución de la enfermedad (Lau *et al.* 2007), predecir la supervivencia de los pacientes (Beer *et al.* 2002), o la aparición de metástasis (Nguyen y Massague 2007). Además, los resultados de estas estrategias podrían servir para establecer terapias más personalizadas y efectivas que hicieran disminuir la alta tasa de mortalidad que caracteriza al cáncer de pulmón.

Algunos de los quimioterápicos más utilizados en el tratamiento del cáncer de pulmón dirigen su actividad contra la dinámica de los MTs. El mecanismo de acción de los agentes antimitóticos, como son los derivados del taxol o de la vinca, se basa en impedir la mitosis de las células tumorales modificando la capacidad de polimerización de los MTs (Jordan y Wilson 2004). Estos quimioterápicos no actúan específicamente sobre las células tumorales y su acción sobre éstas se basa, exclusivamente, en su mayor capacidad proliferativa respecto a las células normales. Por lo tanto, estos quimioterápicos también actúan contra células no tumorales que se encuentren en división. Además, la aparición de resistencia a la quimioterapia en las células tumorales continúa siendo un problema en su uso clínico. Por esto, en las últimas décadas se han realizado grandes esfuerzos para conseguir una mayor especificidad de estas terapias, con el fin de potenciar sus efectos beneficiosos y minimizar sus efectos secundarios nocivos (Johnstone *et al.* 2002).

Los MTs desarrollan una importante función en procesos como: la adquisición y mantenimiento de la forma y tamaño celular, la polarización celular, en la migración, adhesión y por ende en la mitosis de las células (Valiron *et al.* 2001; Small *et al.* 2002; Honore *et al.* 2005; Pereira *et al.* 2006). Estos procesos se fundamentan en la capacidad dinámica de los MTs y requieren de una regulación estrecha sin la cual no sería posible llevar a cabo ninguna de las funciones anteriormente mencionadas. Este control se lleva a cabo mediante las Proteínas Asociadas a Microtúbulos (MAPs, por sus siglas en inglés: Microtubule Associated Proteins) (Maiato *et al.* 2004). En 2002, el grupo del Dr. Kaibuchi describió la capacidad de CRMP-2 para interactuar con los MTs, y

demonstró que su función primordial consiste en reclutar heterodímeros de tubulina y unirlos al extremo (+) del MT ya preformado, favoreciendo así su polimerización (Fukata *et al.* 2002).

El conocimiento de los mecanismos por los cuales las MAPs regulan la dinámica de los MTs puede ayudar en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas frente al cáncer en general y para combatir el carcinoma pulmonar, en nuestro caso particular, de modo que se mejoren sus tasas de supervivencia. Mientras que la función de varias MAPs ha sido ampliamente estudiada en cáncer, especialmente en el contexto de la mitosis (Maiato *et al.* 2004), no existe hasta la fecha ningún trabajo que aborde la función de CRMP-2 en carcinoma pulmonar. Por lo tanto, nos pareció de interés realizar un estudio sobre la función desarrollada por CRMP-2 en el carcinoma pulmonar, así como de los mecanismos por los cuales colabora en la regulación de la dinámica de los MTs.

1. CRMP-2 como marcador tumoral

Las proteínas MAPs se han propuesto en diversas ocasiones como marcadores tumorales. Por ejemplo, se ha observado un aumento de la expresión de la proteína Tau en NSCLC (Dumontet *et al.* 2005) y se ha demostrado que la expresión de MAP-2 es un factor que puede ayudar en el diagnóstico y clasificación de carcinomas pulmonares neuroendocrinos como SCLC y carcinoma de células grandes (Liu *et al.* 2001b; Tanaka y Terasaki 2002; Liu *et al.* 2003). También se ha descrito que la metilación del promotor de APC y Rassf1A es un marcador de recurrencia y de mal pronóstico en pacientes en estadio I de NSCLC (Wang *et al.* 2004; Brock *et al.* 2008). Por su parte, la proteína Survivina ha sido propuesta como marcador de mal pronóstico en NSCLC (Monzo *et al.* 1999; Duffy *et al.* 2007).

Por otro lado, se ha descrito que proteína quinasas implicadas en la regulación de MAPs durante la mitosis, como por ejemplo la proteína Aurora B quinasa o Plk-1 (*Polo like kinase 1*), son marcadores indicadores de mal pronóstico en NSCLC (Liu y Erikson 2002; Smith *et al.* 2005; Vischioni *et al.* 2006). A estos datos hay que sumar numerosos estudios en los que se han detectado alteraciones en la ruta de señalización PI3K/AKT/PTEN, importante en la regulación de la dinámica de los MTs (y responsable de la fosforilación de CRMP-2). Estos estudios han demostrado que el 95% de las líneas celulares procedentes de tumores NSCLC presentaban una activación basal de la proteína AKT (Brognard *et al.* 2001), así como una reducción en los niveles de

expresión de su regulador negativo PTEN (Marsit *et al.* 2005), lo que favorece la proliferación de estos tumores. Además, un 3% de los tumores NSCLC analizados presentaron mutaciones en la subunidad catalítica α de la proteína PI3K (Samuels y Velculescu 2004).

Por su parte, como se describió en la introducción, entre los miembros de la familia de las proteínas CRMP, CRMP-2 ha sido recientemente propuesto como marcador de cáncer colorrectal (Wu *et al.* 2008). Además, en el cáncer de pulmón se han estudiado otros miembros de la familia como CRMP-1 o CRMP-5 (Yu *et al.* 2001; Pan *et al.* 2010).

1.1 Expresión de CRMP-2 en NSCLC

La presencia de CRMP-2 en pulmón fue descrita en el año 2000 por Ito y colaboradores (Ito *et al.* 2000). A pesar de esto, no se ha publicado ningún estudio sobre CRMP-2 y su posible función en el cáncer de pulmón.

En nuestros resultados, hemos observado una mayor expresión del RNAm y de la proteína CRMP-2 en las todas las líneas celulares analizadas, tanto procedentes de células transformadas como de no transformadas, con respecto a las células primarias (NHBE). Estos datos coinciden con los ya publicados acerca de la expresión de CRMP-2 en carcinoma colorrectal, así como en tejido tumoral y en líneas celulares procedentes de fibroblastos tumorales (Tahimic *et al.* 2006; Wu *et al.* 2008), en los cuales también se encontraron aumentos de los niveles de expresión de CRMP-2 con respecto a células no tumorales. La alta expresión de CRMP-2 también ha sido descrita en líneas celulares de neuroblastoma (Gu y Ihara 2000; Ni *et al.* 2008). Todos estos datos parecen sugerir la posibilidad de que esta proteína intervenga en algún proceso clave del desarrollo tumoral.

Para explicar los mayores niveles de expresión de CRMP-2 en las células inmortalizadas respecto a las células primarias NHBE, estudiamos el número de copias de la región cromosómica 8p21.2, en la que se encuentra el gen de CRMP-2 y la pérdida de heterocigosidad (LOH) en esta región cromosómica. Ni el número de copias de la región cromosómica, ni la LOH de la región observada parecen ser suficientes para explicar la magnitud de las diferencias de expresión de CRMP-2 observadas entre células primarias y células inmortalizadas. No obstante, sí parece servir para explicar la diferente expresión de CRMP-2 observada entre las distintas líneas celulares. Así, a

excepción de la línea celular H2170, aquellas líneas celulares en las que se detectó un bajo número de copias de la región y/o LOH presentaron menores niveles de expresión que aquellas en las que no se observó LOH. Tanto los datos del número de copias de la región cromosómica como los referentes a la LOH, coinciden con los datos publicados en la página web del proyecto *Cancer Genome Project* del Instituto Wellcome Trust Sanger (Hinxton, Reino Unido) en las mismas líneas celulares. Además, cabe mencionar que la LOH en la región 8p21.2, en la que se encuentra la secuencia del gen de CRMP-2, es un hecho frecuente en NSCLC (Emi *et al.* 1992; Fujiwara *et al.* 1994).

Por otro lado, el hecho de que las diferencias observadas en la expresión a nivel de RNAm y proteína sean similares apunta a que el aumento en la expresión de CRMP-2 se debe a una regulación transcripcional como ya fue demostrado en anteriores estudios de nuestro grupo (Fontan-Gabas *et al.* 2007).

Se ha descrito que la localización de CRMP-2, así como de los otros miembros de la familia, es citoplasmática en células del sistema nervioso y en linfocitos (Fukata *et al.* 2002; Vincent *et al.* 2005). En nuestro estudio, hemos comprobado que CRMP-2 se localiza mayoritariamente en el citoplasma tanto en las líneas celulares procedentes de NSCLC estudiadas, como en el caso de las células primarias NHBE. No obstante, también hemos detectado, mediante western blot, la presencia de una forma de 58 kDa en extractos proteicos nucleares, expresada siempre en menor nivel que la forma mayoritaria citoplasmática. Recientemente se ha descrito la expresión de una forma proteica de 58 kDa en neuronas embrionarias de ratón durante el desarrollo cerebral. Además, este mismo artículo propone un mecanismo por el cual la proteólisis del extremo carboxilterminal, que está mediada por la proteasa calpaína, permite la exposición de un dominio de señalización nuclear que provoca el transporte de esta forma proteica de menor tamaño al núcleo (Rogemond *et al.* 2008).

Mediante técnicas de inmunofluorescencia pudimos observar que CRMP-2 se localiza preferentemente en la zona perinuclear del citoplasma y que colocaliza con actina en todo el citoplasma y en la zona perinuclear, con tubulina. En el núcleo sólo pudimos detectar claramente CRMP-2 en células en división como se discutirá más adelante. Por tanto, podemos decir que la expresión de CRMP-2 parece asociarse a un aumento del estado proliferativo.

1.2 Fosforilación CRMP-2 en NSCLC

En 2005, Uchida y colaboradores demostraron que CDK5 es la proteína quinasa que media la fosforilación de CRMP-2 en el residuo Ser522. A su vez, esta fosforilación actúa como cebadora que permite la posterior fosforilación en los residuos Thr509, Thr514 y Ser518 por la proteína quinasa GSK-3 β (Uchida *et al.* 2005). Estos datos han sido contrastados posteriormente por otros autores tanto en células del sistema nervioso (Cole *et al.* 2006; Ni *et al.* 2008), como en linfocitos T y fibroblastos (Tahimic *et al.* 2006; Varrin-Doyer *et al.* 2009).

1.2.1 Fosforilación en el residuo Serina 522 de CRMP-2

CDK5 es una proteína ubicua, cuya presencia se ha observado en todos los tejidos en los que se ha estudiado, si bien se ha demostrado que sus mayores niveles se encuentran en el SNC, donde presenta valores 10 veces superiores a los detectados en otros tejidos. El aumento de sus niveles de expresión es especialmente significativo en neuronas post mitóticas o quiescentes, en las que por el contrario, el resto de miembros de las CDKs están disminuidas (Schmid *et al.* 2006).

CDK5 es una serina treonina proteína quinasa con múltiples sustratos que presentan una secuencia común S/TPXK/R (S = Serina, T = Treonina, P = prolina, K = lisina, R = Arginina). La mayoría de las proteínas a las que fosforila se relacionan con el citoesqueleto y especialmente con los MTs. Por ejemplo, CDK5 fosforila a Tau (Kobayashi *et al.* 1993), CRMP-2 (Uchida *et al.* 2005), Doublecortin (Tanaka *et al.* 2004), Cables (Dhavan y Tsai 2001) o neurofilamentos (Sharma *et al.* 1999). Al margen de proteínas relacionadas con el citoesqueleto, CDK5 puede fosforilar a la proteína de Retinoblastoma (Lee *et al.* 1997a), fosforilación que termina por desencadenar la muerte neuronal por senescencia (Hamdane *et al.* 2005; Mao *et al.* 2005) o proteínas relacionadas con la adhesión como β -catenina (Smith *et al.* 2001) o Src (Smith y Tsai 2002). Su capacidad para fosforilar proteínas relacionadas con los MTs y de modular su actividad, la convierten en una proteína fundamental durante el desarrollo embrionario, en especial del sistema nervioso, ya que interviene en la proliferación de las células, la adquisición del fenotipo neuronal, la maduración y migración de las neuronas así como en la formación de contactos célula-célula en zonas sinápticas (Dhariwala y Rajadhyaksha 2008; Tripathi y Zelenka 2009).

Desde el punto de vista funcional, y a pesar de pertenecer a la familia de proteínas CDKs, fundamentales en el ciclo celular, no se ha descrito ninguna implicación de esta proteína en la regulación de este proceso hasta hace relativamente poco tiempo (Dhariwala y Rajadhyaksha 2008). Así, en el año 2007, se demostró por primera vez la translocación de CDK5 al núcleo. Y ya en 2010, Zhang y colaboradores mostraron que CDK5 es un supresor del ciclo celular mediante su unión a E2F1, que impide la unión de su cofactor DP1 e inhibe la capacidad de E2F1 para unirse a los promotores de genes relacionados con el ciclo celular (Zhang *et al.* 2010).

Por otra parte, son varias las diferencias bioquímicas que existen entre esta proteína y los miembros clásicos de la familia de las quinasas dependientes de ciclinas:

A diferencia de las demás CDKs, en las que la fosforilación en los residuos Thr tiene efectos inhibitorios, la fosforilación de CDK5 en Thr15 tiene efectos activadores, mientras que la fosforilación en Thr14 comparte efecto inhibitorio. Además, la enzima que fosforila a las demás CDKs en Thr15 es la quinasa Wee1 mientras que en CDK5 se trata de c-Abelson (Alb) (Zukerberg *et al.* 2000).

Por otra parte, los dos inhibidores de quinasas dependientes de ciclina (CKI) p21 y p27 que normalmente actúan inactivando los complejos formados por las ciclinas y las CDKs, no tienen efecto sobre los complejos formados por CDK5 y sus activadores (Lee *et al.* 1997b).

Por último, su activación no depende de ciclinas (aunque puede unirse a ciclina D y E), sino de la interacción con CDK5R1 (p35) o CDK5R2 (p39) o sus formas proteolizadas p25 o p29 (Lalioi *et al.* 2010). Recientemente se ha descrito un método alternativo de activación de CDK5 mediado por PI3K ante determinados estímulos como insulina (Lalioi *et al.* 2009). Este nuevo mecanismo de activación conecta por primera vez a CDK5 con la ruta de señalización PTEN/PI3K/AKT/GSK-3 β , pieza clave, al igual que CDK5, en la regulación de la dinámica y funciones del citoesqueleto.

En nuestro trabajo hemos podido observar que existe fosforilación del residuo Ser522 de CRMP-2 en todas las líneas inmortalizadas analizadas, mientras que el grado de fosforilación de CRMP-2 en este residuo es mucho menor en las células primarias NHBE. Este hecho coincide con otras observaciones previas realizadas en cáncer, donde se ha observado que los niveles de CDK5 están elevados en el 70% de las muestras de pacientes con NSCLC analizadas en las que además existe una activación constitutiva de la ruta PI3K/AKT (Liu *et al.* 2010).

Por otra parte, se ha demostrado la existencia de una correlación positiva entre una elevada expresión de CDK5 y de su activador p35 con la progresión tumoral, la aparición de metástasis en nódulo linfático y con una menor supervivencia (Liu *et al.* 2010). A su vez, p39, el otro activador de CDK5 ha sido propuesto como marcador de mal pronóstico al estar correlacionado con una mayor progresión del carcinoma hepatocelular (Lu *et al.* 2010). Por tanto nos parece muy interesante observar una mayor intensidad de fosforilación de CRMP-2 mediada por CDK5 en células inmortalizadas y en células transformadas con respecto a las células primarias.

1.2.2 Fosforilación en los residuos Treonina 509, Treonina 514 y Serina 518 de CRMP-2

GSK-3 β es una serina treonina quinasa que recibe el nombre debido a su primer sustrato identificado, la enzima glucógeno sintasa (GS) (Embi *et al.* 1980). Al igual que sucede con CDK5, en el caso de GSK-3, nos encontramos ante otra quinasa que pueden realizar una función importante en procesos tan dispares como el metabolismo del glucógeno, la señalización de la insulina, la proliferación celular, la oncogénesis, el desarrollo embrionario incluyendo de modo específico todos aquellos procesos que intervienen en la diferenciación neuronal. Aunque presenta una mayor expresión en el cerebro, se trata de una proteína ubicua (Jope y Roh 2006; Mazanetz y Fischer 2007), que además ha sido relacionada con enfermedades tan dispares como la diabetes, la obesidad, el Alzheimer, la demencia bipolar, el cáncer o el Huntington (Woodgett 2001; Jope *et al.* 2007).

GSK-3 β necesita de una fosforilación cebadora cuatro residuos hacia el extremo carboxilterminal desde el residuo al que fosforila. Además, posee algunas particularidades como por ejemplo, que la fosforilación de sus sustratos tiene efectos inhibidores sobre ellos. Por ejemplo, tanto la fosforilación de Tau como de CRMP-2 inhiben su capacidad para unirse a la tubulina, lo que implica una menor polimerización de los MTs (Doble y Woodgett 2003). Otra característica diferencial de esta proteína quinasa consiste en que, al contrario de lo que sucede en la mayoría de quinasas, GSK-3 β normalmente se encuentra activa en condiciones basales, y necesita de señales extracelulares que la inactiven (Harwood 2001; Doble y Woodgett 2003). Esta inactivación generalmente se produce mediante la fosforilación del residuo Ser9 por parte de Akt/PKB (Proteína quinasa B) (Cross *et al.* 1995), aunque también se ha

descrito la posibilidad de que GSK-3 β sea fosforilado en su residuo Ser9 por PKA (proteína quinasa A) (Fang *et al.* 2000), PKC (Proteína quinasa C) (Kim *et al.* 2007), p90RSK/MAPKAP (Quinasa S6 ribosomal p90/Proteína Activadora de MAPK) (Stambolic y Woodgett 1994) y p70S6K (Quinasa S6 ribosomal p70) (Sutherland *et al.* 1993).

La función de GSK-3 β en cáncer es contradictoria, así, ha sido propuesta a la vez como proteína supresora tumoral o como promotora dependiendo del tipo de cáncer, debido a la diferente actividad de GSK-3 β observada en distintos tipos de tumores (Mishra 2010). No obstante, parece haber un consenso en cuanto a la existencia de una inhibición de GSK-3 β en aquellos tumores de origen epitelial como son NSCLC, el cáncer de mama, de piel, de esófago, laringe o bucal (Ma *et al.* 2007a; Mishra 2010). En NSCLC se ha demostrado que Akt está fosforilada y por lo tanto activa (Brognard *et al.* 2001), de modo que puede inhibir la actividad de GSK-3 β . En estos tumores epiteliales, la inhibición de GSK-3 β impide la fosforilación de muchas proteínas, entre ellas las ciclinas D1 y E, con lo que se evita la degradación de ambas ciclinas, favoreciéndose así la unión con sus correspondientes CDKs: CDK4 y CDK2, lo que se traduce en una rápida transición a través de la fase G0/G1 del ciclo celular (Diehl *et al.* 1998; Leis *et al.* 2002; Welcker *et al.* 2003). La sobreexpresión de la forma fosforilada de GSK-3 β favorece la transformación tumoral de células NHBE (Ma *et al.* 2009). Además, también se ha demostrado que aquellos tumores NSCLC que presentan fosforilación de GSK-3 β en el residuo Ser9 presentan una relación inversa con el marcador de proliferación ki67, y mejor pronóstico (Zheng *et al.* 2007).

Además, el hecho de haber encontrado simultáneamente fosforilados GSK-3 β y sus sustratos en determinadas enfermedades como en Alzheimer (Hur y Zhou 2010), apoya la teoría de que no en todos los casos desfosforilación de GSK-3 β y actividad van unidos. Por ejemplo, se ha observado hiperfosforilación de CRMP-2, Tau o β -Catenina (Gu *et al.* 2000; Ghanevati y Miller 2005), en muestras procedentes de enfermos de Alzheimer al mismo tiempo que se ha detectado la fosforilación de GSK-3 β (Ferrer *et al.* 2002; Swatton *et al.* 2004). Se han propuesto varios modelos o teorías para explicar este aparente contrasentido, tales como la regulación espacio-temporal de GSK-3 β a lo largo del ciclo celular (Buttrick y Wakefield 2008), la inhibición regional de GSK-3 β en el citoplasma durante la interfase (Arevalo y Chao 2005), o modelos en los que la fosfatasa PP2A, encargada de desfosforilar a la mayoría de sustratos fosforilados por GSK-3 β , es la que realmente se encuentra inhibida (Lim *et al.* 2010).

En el caso de la regulación de proteínas MAPs, se ha comprobado que la actividad de GSK-3 β está regulada espacio-temporalmente a lo largo del ciclo celular, y que por lo tanto los niveles de fosforilación de las MAPs sobre las que ejerce su acción quinasa varían a lo largo del ciclo celular (Buttrick y Wakefield 2008). De este modo, GSK-3 β permanecería inactivado por Akt en el citoplasma durante la interfase o fase G0/G1 del ciclo celular, mientras que en fases tempranas de la mitosis como la profase o la prometafase se activaría debido a una traslocación de Akt a regiones de la membrana plasmática abundantes en PIP3, regiones en las que es necesario inhibir a GSK-3 β para favorecer la estabilidad de los MTs y establecer las uniones de los aMTs con la membrana (Wakefield *et al.* 2003). Durante la metafase, Akt vuelve a inhibir a GSK-3 β debido a que se restituye la colocalización entre ambas proteínas en el centrosoma, los aMTs y los kMTs (Buttrick y Wakefield 2008).

En nuestro caso también observamos la simultánea activación de Akt y consecuente inhibición de GSK-3 β en las líneas celulares con las que trabajamos, si bien, también detectamos una fosforilación basal de CRMP-2 en los residuos Thr509, Thr514 y Ser518. Esta fosforilación de CRMP-2 en los residuos susceptible de fosforilación por GSK-3 β se modula durante la mitosis de un modo paralelo a los niveles de fosforilación de GSK-3 β . Mediante estudios realizados con células sincronizadas con nocodazol hemos observado que los mayores niveles de fosforilación de CRMP-2 se producen en la prometafase, coincidiendo con un descenso en la fosforilación y consecuente activación de GSK-3 β . Trascorrida una hora desde el fin de la sincronización en prometafase, momento que coincide con un alto porcentaje de células en metafase, se observa un descenso de los niveles de fosforilación de CRMP-2 que coincide con la fosforilación de GSK-3 β . Por tanto, podemos concluir que GSK-3 β se encuentra inhibido durante la interfase, parece intervenir en la fosforilación de CRMP-2 en estos residuos en fases tempranas de la mitosis, y se regula durante el ciclo celular aunque en ningún caso llega a inhibirse totalmente. Aunque estos datos coinciden con los precedentes descritos en la literatura y mencionados anteriormente, para poder afirmar todo lo anterior definitivamente sería necesario utilizar inhibidores químicos de las quinasas y fosfatasa implicadas.

En nuestro análisis del grado de fosforilación en los residuos de CRMP-2 susceptible de fosforilación por GSK-3 β , Thr509, Thr514 y Ser518, observamos que la fosforilación de los residuos Thr509 y Thr514 está presente en prácticamente todas las líneas celulares immortalizadas, sean o no células transformadas, mientras que no se

detectó su fosforilación en células primarias NHBE. La fosforilación de los residuos Thr509 y Thr514 detectada en líneas celulares procedentes de NSCLC coincide con las observaciones realizadas previamente en líneas celulares derivadas de otros tipos de tumor, como la línea celular procedente de fibroblastos de hígado Cos-7 o la línea celular derivada de cáncer de cérvix HeLa (Yoshimura *et al.* 2005; Ni *et al.* 2008). Además, en el caso de utilizar el anticuerpo no comercial 3F4 (cedido por el Dr. Kaibuchi) que reconoce CRMP-2 exclusivamente cuando los tres residuos, Thr509, Thr514 y Ser518, de CRMP-2 están fosforilados, sólo detectamos señal en extractos de líneas celulares transformadas, mientras que no se detectó fosforilación simultánea de los tres residuos, ni en las células primarias NHBE ni en las células inmortalizadas BEAS. Por lo tanto, únicamente las células transformadas presentan fosforilación de CRMP-2 en el residuo Ser518. Este resultado es especialmente interesante ya que puede suponer el hallazgo de un nuevo marcador de transformación en células de adenocarcinoma pulmonar. Sería interesante asociar por tanto la presencia de fosforilación en el residuo Ser518 con la progresión tumoral. En la actualidad se están realizando determinaciones del grado de fosforilación en estos residuos fosforilados por GSK-3 β en muestras procedentes de adenocarcinoma pulmonar.

El hecho de detectar fosforilación del residuo Ser518 de CRPM-2 exclusivamente en líneas celulares transformadas es coherente con el mecanismo de fosforilación de GSK-3 β . Esta serina-treonina proteína quinasa en el caso de sustratos multifosforilados, fosforila secuencialmente, actuando las primeras fosforilaciones como cebadoras de las siguientes (Frame y Cohen 2001), en una especie de cooperatividad enzimática. Esto sucede en otras MAPs, por ejemplo, en el caso de la proteína CLASP2, el mecanismo secuencial de fosforilación por parte de GSK-3 β tiene un efecto gradual en su inhibición en la unión de CLASP2 a los dímeros de tubulina, (Watanabe *et al.* 2009). En el caso de CRMP-2, el primer residuo fosforilado es Thr509 mientras que el residuo Ser518 es el último residuo susceptible de fosforilación de la secuencia. Por lo tanto, podría ser que la fosforilación de todos los residuos sea un hecho diferencial y exclusivo en líneas celulares transformadas, mientras que la fosforilación en células inmortalizadas no transformadas sea únicamente parcial, de modo que la multifosforilación confiriera ventajas adaptativas a las células tumorales. No obstante, el por qué esta fosforilación es exclusiva de células transformadas así como qué ventajas adaptativas proporciona a estas células con respecto a las células

inmortalizadas no transformadas es una incógnita que merecería ser estudiada en un futuro.

Podría suceder también que sea una quinasa diferente la que lleve a cabo la fosforilación en este residuo Ser518, aunque este hecho no ha sido descrito en la bibliografía hasta la fecha. Otra opción posible es que en células transformadas procedentes de NSCLC se encuentre inhibida alguna actividad fosfatasa que promueva la eliminación del residuo fosfato del residuo Ser518. De hecho, CRMP-2 se desfosforila completamente por acción de la proteína fosfatasa PP1, y parcialmente por la acción de PP2A y PP2C (Cole *et al.* 2008) de modo que reduce la afinidad por tubulina. En los últimos años se ha descubierto que las fosfatasas son realmente familias que engloban a decenas de proteínas con capacidad para desfosforilar proteínas (Virshup y Shenolikar 2009). De entre estas tres fosfatasas, PP2A es la que mayor asociación presenta con cáncer debido al gran número de estudios en los que se han descrito alteraciones de su expresión tanto en NSCLC como en otros tumores (Wang *et al.* 1998; Ruediger *et al.* 2001). De hecho, ya que su inhibición colabora o promueve la transformación celular (Chen *et al.* 2005; Sablina y Hahn 2007), en la actualidad se considera como un gen supresor de tumores (Perrotti y Neviani 2008; Eichhorn *et al.* 2009). En el caso de PP1, aunque su relación con el carcinoma pulmonar ha sido menos estudiada, se han descrito pérdidas de expresión de subunidades reguladoras de esta fosfatasa, como por ejemplo PPP1R3, en varios tipos de cáncer entre ellos NSCLC (Kohno *et al.* 1999; Takakura *et al.* 2001; Hayashida *et al.* 2005). Por su parte, en el caso de las proteínas de la familia PP2C se ha observado que su expresión es baja en pulmón (Genome Browser, UCSC).

A la vista de estos datos, creemos que la fosforilación de CRMP-2 en los residuos Thr509 y Thr514 puede constituir un marcador de proliferación o de inmortalización de las células de pulmón, y por lo tanto un marcador de estadios previos o tempranos de la enfermedad. Además, el hecho de que la fosforilación de CRMP-2 en el residuo Ser 518 sea exclusiva de células transformadas, la convierten en susceptible de ser considerada como un nuevo marcador tumoral en carcinoma pulmonar.

2. CRMP-2 y tumorigénesis

2.1 Experimentación *in vitro*

Tahimic y colaboradores relacionaron a CRMP-2 con la proliferación al comprobar que células de la línea celular M5S procedente de fibroblastos que se encontraban en crecimiento exponencial presentaban mayores niveles de CRMP-2 fosforilado que las células en confluencia (Tahimic *et al.* 2006). En nuestro trabajo, también hemos observado una disminución en los niveles de fosforilación de CRMP-2 en células de NSCLC (A549) a medida que alcanzan la confluencia. No obstante, no observamos diferencias en la proliferación entre las distintas poblaciones celulares de la línea NSCLC A549 transfectadas con las construcciones fosfodeficiente y fosfomimética de CRMP-2 en los experimentos realizados *in vitro*.

En nuestro trabajo, cabe resaltar las diferencias observadas en la viabilidad de las líneas celulares que sobreexpresaban las diversas formas de CRMP-2. Curiosamente, observamos que las células de NSCLC A549, que expresa la forma normal (*wild type* en inglés) de p53 (p53 wt) transfectadas para sobreexpresar la forma fosfodeficiente de CRMP-2 presentaban una viabilidad significativamente menor que el resto de las poblaciones estudiadas. Por el contrario las células de la línea de carcinoma pulmonar H1299, defectiva en p53 (p53^{-/-}), transfectadas con la misma construcción de CRMP-2 presentaron una mayor viabilidad. En un artículo publicado en el año 2005 por el grupo de Dr. M. Serrano, se describió por primera vez una relación entre la expresión CRMP-2 y p53, y observaron un aumento en los niveles de expresión de p53 al silenciar la expresión de CRMP-2 (Llanos *et al.* 2006). Este hecho, nos indujo a pensar que la sobreexpresión de la forma fosfodeficiente de CRMP-2 podría inducir la muerte celular mediada por p53.

De hecho, al evaluar la expresión de p53 en extractos de proteína obtenidos a partir de las distintas poblaciones celulares procedentes de la línea celular A549, observamos que existía una mayor expresión de p53 en la población que sobreexpresaba la forma fosfodeficiente o S522A de CRMP-2. Esta diferencia se hacía mayor en el caso de que sometiésemos a las células a un estrés como es la privación de factores de crecimiento.

Además este dato explicaría porqué el rendimiento en la consecución de clones que sobreexpresan la forma fosfodeficiente de CRMP-2 (S522A) en la línea celular

A549 fue tan bajo en comparación con el rendimiento obtenido al transfectar las células H1299 con las distintas construcciones. Asimismo explica el que no pudiésemos sobreexpresar la forma fosfodefactiva de CRMP-2 en células de epitelio bronquial inmortalizadas pero no transformadas BEAS que son p53 wt.

Además de la proliferación y de la viabilidad, hemos estudiado otros procesos celulares cuyas modificaciones pueden conllevar la adquisición por parte de las células de un fenotipo tumoral más agresivo, como son la capacidad de formar colonias en ausencia de anclaje, la migración hacia factores quimiotácticos y la adhesión a proteínas de la matriz extracelular. Mediante ensayos de clonogenicidad en agar blando comprobamos que las células procedentes de la línea celular A549 que sobreexpresan la forma fosfomimética de CRMP-2 duplican su capacidad de formar colonias en ausencia de anclaje respecto a células de la misma línea celular transfectadas establemente con las otras secuencias de CRMP-2. Por lo tanto, la fosforilación de CRMP-2 parecía constituir una ventaja para que las células tumorales crezcan en ausencia de anclaje, lo cual no deja de ser interesante ya que estas células tienen impedida la unión de CRMP-2 a tubulina y por tanto la dinámica de estos MTs sin que se modifique su interacción con actina.

Los MTs, y en general el citoesqueleto, desarrollan una función esencial en la migración de las células participando en la polarización celular y modulando el patrón de adhesión de la célula a la matriz extracelular (Small *et al.* 2002). Como consecuencia, es muy importante también la intervención de las MAPs como reguladoras de la dinámica de los MTs (Wittmann y Waterman-Storer 2005). Así, se ha relacionado por ejemplo a proteínas como CLASP1, CLASP2 o APC con la migración celular tanto en un células tumorales como en células no tumorales (Akhmanova *et al.* 2001; Wen *et al.* 2004; Wittmann y Waterman-Storer 2005). La capacidad de las MAPs de unirse a los MTs y por lo tanto de intervenir en la migración suele estar regulada mediante su fosforilación. Recientemente se ha demostrado que GSK-3 β puede fosforilar a un alto número de MAPs, incluidas proteínas motoras, proteínas que unen los dímeros de tubulina o proteínas del COMT como APC, CLASP1, CLASP2 o Quinesina-2 (Sun *et al.* 2009). Por ejemplo, GSK-3 β fosforila a APC en fibroblastos y células epiteliales, lo que inhibe la estabilización y polimerización de los MTs en el frente anterior de células epiteliales que se encuentran migrando (Zumbrunn *et al.* 2001). Por su parte la fosforilación de CLASP2, inhibe su actividad e impide la

polimerización de los MTs en los lamelipodios del frente de migración, con lo que interfiere en su papel en la migración (Wittmann y Waterman-Storer 2005).

Hemos observado un aumento de la capacidad migratoria de la línea celular A549 cuando sobreexpresa la forma fosfomimética de CRMP-2. En el año 2005, el grupo de Giraudon describió aumentos en la expresión de CRMP-2 durante la quimiotaxis mediada por CXCL12 de linfocitos T, en un proceso que incluía la remodelación de los filamentos intermedios en el urópodo (Vincent *et al.* 2005). Posteriormente, el mismo grupo demostró aumentos en la expresión de CRMP-2 en linfocitos T periféricos como respuesta a una neuroinflamación viral (Vuillat *et al.* 2008). Por último, en el año 2009 describieron cómo existían descensos en los niveles de fosforilación de CRMP-2 mediada por GSK-3 β en los residuos Thr509 y Thr514 mientras que los niveles de fosforilación del residuo Ser522 mediada por CDK5 aumentaban en linfocitos T que migran hacia gradientes de la quimioquina CXCL12 (Varrin-Doyer *et al.* 2009).

Una mayor capacidad migratoria en células que sobreexpresan la forma fosfomimética de CRMP-2 coinciden con estas evidencias previas de la bibliografía. En nuestro estudio, describimos la importancia de la fosforilación de CRMP-2 para la migración de células tumorales mediada por GSK-3 β , muy probablemente aumentando la inestabilidad de los MTs.

En los experimentos en los que valoramos la adhesión a diversas proteínas de la matriz extracelular, observamos que las células que sobreexpresan CRMP-2 o su forma fosfodeficiente presentan mayores porcentajes de adhesión con respecto a las células no transfectadas, mientras que se produjo una reducción significativa de la adhesión de la población que sobreexpresa la forma fosfomimética de CRMP-2. La motilidad de las células adherentes está relacionada con su capacidad para desestructurar las adhesiones focales (Honore *et al.* 2005; Sun *et al.* 2009). Aunque es menos conocida la función desarrollada por los MTs en la adhesión que en la división o motilidad celular, sí que se han relacionado las variaciones en la dinámica de los MTs con alteraciones en la capacidad de adhesión celular (Honore *et al.* 2005). Además, se ha demostrado que la fosforilación por GSK-3 β de algunas de las proteínas que intervienen en la dinámica de los MTs, como es el caso de la quinesina, conlleva la disociación de las adhesiones focales (Wittmann y Waterman-Storer 2001; Morfini *et al.* 2002) en la parte posterior de células en migración, lo que favorece la migración debido a la pérdida de adhesividad al sustrato, lo cual coincide plenamente con nuestros resultados.

Así en nuestros análisis mediante inmunofluorescencia, observamos un cambio en la localización de la proteína Cadherina-E, desde la membrana citoplasmática al núcleo, en aquellas células que sobreexpresan la forma fosfomimética de CRMP-2. Se ha descrito que los MTs se anclan por sus extremos (+) a β -catenina, receptor citoplasmático de las cadherinas clásicas como Cadherina-E y que por consiguiente, la desestabilización de los MTs conlleva a la desestructuración de estas uniones adherentes en un proceso mediado por la dineína (Ligon y Holzbaur 2007; Harris y Tepass 2010). Por lo tanto, parece lógico que la fosforilación constitutiva de CRMP-2, que impide su unión a tubulina y la polimerización de los MTs, pueda estar causando la desestructuración de estas uniones adherentes y la deslocalización de la Cadherina-E.

Además, observamos que las células que expresan la forma fosfomimética de CRMP-2 no formaban monocapas confluentes a diferencia del resto de las poblaciones que sí lo hacían. Este hecho sugiere que la fosforilación de CRMP-2 en el residuo Ser522 podría estar relacionada con la pérdida de la inhibición de la proliferación por contacto, cuando las células alcanzan la confluencia. Se ha comprobado que la Cadherina-E tiene una importante función en la inhibición por contacto y que la disminución de su expresión contribuye a la pérdida de esta inhibición mediada por p27 en otros carcinomas (St Croix *et al.* 1998; Motti *et al.* 2005).

Además de la expresión de Cadherina-E, se analizó la expresión de la proteína ZO-1, componente estructural de las uniones estrechas ricas en ocludina. No pudimos detectar ninguna diferencia en la expresión de esta proteína entre las distintas poblaciones estudiadas. A diferencia de la Cadherina-E, ZO-1 es una proteína que interacciona con α -actina y no se une con los MTs (Itoh *et al.* 1997; Muller *et al.* 2005). La fosforilación de CRMP-2 no tiene efectos sobre el grado de interacción con la actina, por lo que también parece lógico no observar diferencias en la localización o expresión de ZO-1 dependiendo del grado de fosforilación de CRMP-2.

La pérdida de uniones de adhesión y la translocación de la Cadherina-E al núcleo han sido relacionadas con el proceso de transición epitelio mesénquima (TEM). En esta transición se produce una pérdida de las características propias de las células epiteliales (forma poliédrica, presencia de uniones estrechas, polaridad) y se adquieren otras de células mesenquimales (morfología fibroblástica, presencia de marcadores mesenquimales, pérdida de adhesión a sustrato...). En nuestro caso analizamos también si la presencia de mutaciones en la proteína CRMP-2 producía alteraciones en la expresión del marcador mesenquimal vimentina. Contrariamente a lo esperado, no

observamos ninguna variación en su expresión entre las poblaciones analizadas. Por lo tanto podemos concluir que existe una pérdida de las uniones adherentes en las células que sobreexpresan la forma fosfomimética de CRMP-2, debido a una deslocalización de la proteína Cadherina-E, sin que se observe la adquisición de otras características propias de las células mesenquimales.

2.2 Experimentación *in vivo*

Con objeto de poder trasladar a modelos *in vivo* los resultados obtenidos *in vitro* con las diversas construcciones de CRMP-2, se realizaron ensayos de inoculación de células tumorales en el dorso de ratones atímicos (nude). Para estos ensayos utilizamos células de la línea de adenocarcinoma pulmonar A549 transfectadas con las distintas construcciones de CRMP-2. Los resultados obtenidos, sorprendentemente, fueron contrarios a los esperados. Los tumores procedentes de las células que expresaban la forma fosfodefensiva de CRMP-2, fueron los de mayor tamaño, mientras que, por el contrario, los tumores procedentes de las células que expresaban la forma fosfomimética fueron los más pequeños. Además, se detectó mayor marcaje para el marcador de proliferación ki67 en inmunocitoquímicas realizadas en los cortes procedentes de los tumores desarrollados por las células que sobreexpresaban la forma fosfodefensiva de CRMP-2, que en los tumores desarrollados por las células que sobreexpresaban la forma fosfomimética.

Una posible explicación, que puede contribuir a aclarar las diferencias observadas entre los datos obtenidos *in vitro* e *in vivo* sería el considerar que aparentemente las células transfectadas con las formas fosfomiméticas de CRMP-2 son de menor tamaño que el resto de las poblaciones celulares y que crecen en grupos compactos sin formar monocapas extendidas, lo cual en el modelo en ratón podría reflejarse en los tumores más pequeños pero con una gran densidad celular. En experimentos *in vitro*, a pesar de no haber observado diferencias en la proliferación entre las distintas poblaciones que sobreexpresan las distintas formas proteicas de CRMP-2 en la línea celular A549, las células que sobreexpresaban la forma fosfomimética ocupaban una menor superficie de crecimiento en la placa de cultivo.

Estudios recientes han debatido la cuestión de la importancia real del tamaño en tumores NSCLC y otros tipos de tumores, y se ha observado que un mayor volumen tumoral no tiene que significar necesariamente una mayor malignidad del tumor (Potti

et al. 2006; Foulkes *et al.* 2010; Spiro *et al.* 2010). De modo que se ha propuesto el estudio complementario de biomarcadores que predigan la malignidad del tumor de modo independientemente al tamaño tumoral (Potti *et al.* 2006). Además, las células que sobreexpresan la forma fosfomimética de CRMP-2 presentan una deslocalización de la proteína Cadherina-E desde la membrana hacia el núcleo. Se ha comprobado que esta deslocalización o la disminución de la expresión de Cadherina-E correlaciona con una mayor desdiferenciación celular y menor adhesión celular, que se traduce en una mayor progresión de la enfermedad. Así, los tumores NSCLC que no expresan Cadherina-E son más invasivos y producen mayor número de metástasis a nódulos linfáticos que los tumores que expresan Cadherina-E (Kase *et al.* 2000; Liu *et al.* 2001a; Pagaki *et al.* 2010).

Esta explicación, basada en el distinto tamaño de las células transfectadas con las distintas formas proteicas de CRMP-2, podría corroborarse adjuntando un cálculo del volumen celular de cada una de las poblaciones analizadas.

A pesar de las diferencias de tamaño observadas, al determinar el grado de daño celular, mediante determinaciones inmunohistoquímicas de la expresión de las proteínas p53 y Caspasa-3 activa observamos que los tumores de mayor tamaño presentaban inmunotinción para Caspasa-3 activa, no sólo en la región central del tumor, que posee bajos niveles de oxígeno, sino en la periferia del mismo. Los demás tipos tumorales no presentaron inmunotinción para Caspasa-3 activa en la periferia tumoral. Así podemos concluir que los tumores procedentes de células que expresan la forma fosfodeficiente de CRMP-2 son de mayor tamaño, al menos al tiempo final de nuestra situación experimental, pero presentan una menor viabilidad.

Ya que se ha observado que la forma fosfomimética aumenta la capacidad de migración *in vitro*, sería muy interesante estudiar si en los modelos animales las células que sobreexpresan esta forma mutada son capaces de producir un mayor número de metástasis.

3. Intervención de CRMP-2 en la mitosis

La correcta dinámica de los MTs es esencial durante la mitosis para realizar adecuadamente procesos tan importantes como el anclaje de los cromosomas, su concentración en la placa ecuatorial, la segregación de estos y para una correcta citocinesis.

Como ya se ha comentado con anterioridad, las proteínas MAPs son las principales reguladoras de la dinámica de los MTs y sus funciones pueden resumirse en: 1) promover y estabilizar la polimerización de los MTs, 2) desestabilizar o favorecer la despolimerización de los MTs, 3) funcionar como unión entre los MTs y otras estructuras y 4) favorecer la motilidad de los centrosomas y de los cromosomas (Maiato *et al.* 2004).

Las MAPs fueron originalmente descritas como proteínas que co-immunoprecipitaban con tubulina a lo largo de varios ciclos de polimerización y despolimerización y que estimulaban el ensamblaje de los MTs *in vivo* (Solomon *et al.* 1979). Esta definición comprendía a las familias de las proteínas Tau/MAP2 y MAP1A/1B que actualmente también son conocidas como MAPs estructurales o clásicas (Dehmelt y Halpain 2004). Con el tiempo, esta definición se ha ido ampliando significativamente desde que las primeras MAPs fueron aisladas (Solomon *et al.* 1979; Olmsted 1986) y actualmente se puede incluir en esta superfamilia a todas aquellas proteínas que se unen, incluso transitoriamente, a los MTs ya sea *in vivo* o *in vitro* (Maiato *et al.* 2004). Así, dentro de todas estas proteínas se pueden establecer 2 grupos claramente definidos dependiendo de si poseen capacidad motora (dineínas y quinesinas) o no (CLASP1, CLASP2 CLIP-170, EB1, APC...). Durante la mitosis, se ha descrito su participación en todos los procesos relacionados con los MTs, algunos tan importantes como la organización o mantenimiento del huso mitótico (Andersen *et al.* 1994), anclaje de los MTs a los cinetocoros (Tanenbaum *et al.* 2006), movimiento cromosómico (Pereira *et al.* 1992) o formación del surco de escisión durante la citocinesis (Lemos *et al.* 2000). Entre estas nuevas MAPs, un grupo de proteínas, entre las que podemos incluir a CRMP-2, han sido agrupadas bajo el nombre de “+TIPs”, por su capacidad de unirse a los MTs en su extremo (+), principalmente estabilizándolos y promoviendo su polimerización. Debido a la gran importancia que estas proteínas tienen en la mitosis, el descubrimiento de nuevas “+TIPs” así como el estudio de su función y regulación durante la mitosis es un tema de gran actualidad.

Como ya se ha comentado, la capacidad de CRMP-2 de interactuar con heterodímeros de tubulina y añadirlos al MT preformado, favoreciendo su polimerización, fue descrita en 2002 por Fukata y colaboradores (Fukata *et al.* 2002). Posteriormente se demostró que esta unión se inhibe mediante la fosforilación de los residuos Thr509, Thr514 y Ser518 por parte de GSK-3 β , a su vez dependientes de una fosforilación cebadora del residuo Ser522 por parte de CDK5 (Uchida *et al.* 2005). En

el año 2000, Gu y colaboradores descubrieron que CRMP-2 co-localizaba con el huso mitótico en la metafase de células procedentes de neuroblastoma de ratón (Gu y Ihara 2000), aunque hasta la fecha no se ha estudiado su función y/o regulación ni en la metafase ni en otras fases de la mitosis.

Un artículo publicado recientemente relaciona a CRMP-4, miembro de la familia de las CRMPs, con la mitosis en células HeLa (Ong Tone *et al.* 2010). Este artículo describe el aumento de la fosforilación de CRMP-4 por parte de GSK-3 β durante toda la mitosis y propone que es la forma fosforilada de la proteína la que se une a tubulina tanto en el huso mitótico como en otras estructuras formadas por los MTs como en el cuerpo medio de la citocinesis. Este artículo centra su estudio en la importancia de esta proteína en la correcta formación del huso acromático, y demuestra que la inhibición de la expresión de CRMP-4 mediante un siRNA conlleva una falta de alineación de uno o varios cromosomas en la placa ecuatorial, y el subsiguiente incremento en la duración de la prometafase, efectos que no se observa que sean dependientes de su estado de fosforilación. Este mismo artículo descarta que CRMP-2 sea regulado por GSK-3 β en la mitosis, aunque a su vez valora la posibilidad que otras proteínas reguladas por GSK-3 β participen en estos procesos, ya que la sobreexpresión de formas fosfomiméticas o fosfodefactivas de CRMP-4 no reprodujeron los defectos en el alineamiento cromosómico y en el consecuente retraso en superar la metafase observados al inhibir GSK-3 β .

Nosotros en el presente trabajo demostramos que CRMP-2 sí participa en la mitosis permitiendo la polimerización y estabilización de los MTs de una manera dependiente de su estado de fosforilación en los residuos susceptible de fosforilación por GSK-3 β . De este modo, observamos que la co-localización e interacción con tubulina es dependiente del grado de fosforilación de la proteína, interaccionando sólo cuando CRMP-2 se encuentra desfosforilada. Esta interacción de CRMP-2 con los MTs del huso mitótico sólo cuando CRMP-2 está desfosforilada está en consonancia con la bibliografía que detalla que la interacción de CRMP-2, y de los otros miembros de la familia, con tubulina es exclusiva de la forma no fosforilada de CRMP-2 (Fukata *et al.* 2002; Yoshimura *et al.* 2005).

En nuestro caso, como detallamos a continuación, no hemos estudiado diferencias en el porcentaje de husos acromáticos aberrantes según el estado de fosforilación, pero sí hemos observado diferencias en el tiempo requerido para superar la metafase dependiente de este estado. Este dato relaciona la fosforilación de CRMP-2

con la velocidad de polimerización de los MTs y el alineamiento cromosómico. Mediante estudios de progresión mitótica también hemos observado incrementos en el tiempo necesario para que se produzca la transición entre la metafase y la anafase por parte de las células que sobreexpresan la forma fosfodefensiva, lo cual la relaciona con un aumento de la estabilidad de los kMTs. Además, describimos una regulación de la fosforilación de CRMP-2 y de su interacción con tubulina dentro de la mitosis, que concuerda con los requerimientos de polimerización y despolimerización de los MTs en las distintas fases de la mitosis. Por último, ampliamos el estudio de la regulación de la fosforilación de CRMP-2 a otras fases de la mitosis, y apuntamos la importancia de la fosforilación de CRMP-2 en el proceso de escisión final en la citocinesis, ya que la sobreexpresión de la forma fosfodefensiva S522A de CRMP-2 origina citocinesis aberrantes que terminan con la formación de células multinucleadas en un porcentaje muy alto de ocasiones. Por tanto, creemos que nuestro estudio aporta un conocimiento novedoso sobre la función de CRMP-2 y de su fosforilación mediada por GSK-3 β , y de la familia de proteínas CRMPs en general, durante la mitosis en células procedentes de carcinoma pulmonar, además de establecer nuevas funciones de CRMP-2 durante la mitosis, no descritas hasta la fecha en otros miembros de la familia.

3.1 Localización de CRMP-2 en la mitosis

Mediante doble inmunofluorescencia hemos observado que CRMP-2 se localiza durante la mitosis en estructuras tan importantes como el huso mitótico o el cuerpo central y que co-localiza con tubulina en ambas estructuras. Al inicio de la prometafase, CRMP-2 co-localiza con tubulina en los MTs, y esta co-localización entre CRMP-2 y tubulina alcanza su máximo durante la metafase, en la cual CRMP-2 presenta el mismo patrón de marcaje que la tubulina del huso mitótico. CRMP-2 y tubulina co-localizan también durante la anafase tardía y en la telofase en los extremos del huso acromático y con los ipMTs que forman parte de la zona intermedia, precursora del cuerpo intermedio propio de la citocinesis.

Generalmente, la función de las MAPs está estrechamente regulada por procesos post-transcripcionales, principalmente fosforilaciones. Una de las principales quinasas implicadas es precisamente GSK-3 β , que se ha comprobado que fosforila y regula a MAPs tan importantes para la correcta mitosis como APC y CLASP1 y CLASP2 (Rubinfeld *et al.* 1996; Kumar *et al.* 2009). Además, se ha comprobado que el descenso

de los niveles de GSK-3 β ya sea con un siRNA o con inhibidores específicos altera la morfología del huso mitótico, aumenta los fallos en la alineación de los cromosomas en la placa ecuatorial y provoca un retraso de la mitosis (Wakefield *et al.* 2003; Tighe *et al.* 2007).

Por tanto, es posible que esta distinta co-localización de CRMP-2 con tubulina durante los procesos de polimerización o despolimerización se deba a una regulación de CRMP-2 por parte de GSK-3 β , que se apoya en los resultados obtenidos en los experimentos realizados con las formas constitutivamente fosforilada y no fosforilada de CRMP-2. Durante las distintas fases de la mitosis, no se observaron variaciones en los niveles de expresión de CRMP-2 ni en los niveles de fosforilación de la proteína en su residuo Ser522, sustrato de la quinasa CDK5. Por el contrario, se observaron variaciones de los niveles de fosforilación de los residuos susceptible de fosforilación por la quinasa GSK-3 β (Thr509 y Thr514).

Estas variaciones en el grado de fosforilación de estos residuos coinciden con la co-localización observada mediante la técnica de inmunofluorescencia en las distintas fases del ciclo y con la interacción entre CRMP-2 y tubulina observada mediante inmunoprecipitación. Al comienzo de la prometafase, CRMP-2 co-localiza con tubulina (inmunofluorescencia), pero no existe interacción real entre ambas proteínas (inmunoprecipitación) debido al elevado grado de fosforilación de CRMP-2. Este aumento de fosforilación de CRMP-2 al comienzo de la prometafase en los centrosomas coincide con la localización centromérica descrita para GSK-3 β en el comienzo de la mitosis (Wakefield *et al.* 2003; Cheng *et al.* 2007). El aumento de la fosforilación de las proteínas MAPs con el fin de impedir su interacción con los MTs es un hecho frecuente en los momentos previos y al comienzo de la prometafase. De este modo, al impedir la acción de factores estabilizantes de los MTs se favorece la acción de factores desestabilizantes de los MTs y su produce un aumento de la dinámica de los mismos (Andersen 1998; Maiato *et al.* 2004).

Por el contrario, durante la metafase, en la que es necesaria una rápida polimerización de los MTs, se observa un descenso de la fosforilación de estos residuos fosforilados de CRMP-2 y un consecuente aumento de la interacción con tubulina en el huso mitótico. Estas variaciones se correspondían con la restauración de los niveles basales de la fosforilación inhibitoria de GSK-3 β por parte de Akt. Por lo cual, se puede concluir que las alteraciones en el grado de fosforilación de CRMP-2 observados

durante la mitosis parecen estar regulados por variaciones en la fosforilación de GSK-3 β que modulan su actividad y su interacción con los MTs.

Una vez que las células comienzan la anafase, se observa una recuperación de los niveles basales de fosforilación de CRMP-2, lo que conduce a una disminución de la interacción y co-localización con tubulina, que queda restringida a los polos del huso mitótico y a la región intermedia constituida por ipMTs. Por último, durante la citocinesis, se observa que CRMP-2 se localiza en el cuerpo intermedio que conecta las dos células. La fosforilación de CRMP-2 impide su unión a tubulina y, por tanto, facilitaría la despolimerización de los ipMTs del cuerpo medio necesaria para la escisión final de las dos células

3.2 Alteraciones en la duración de la mitosis

Como consecuencia de la importancia de las MAPs en la mitosis, las alteraciones en su expresión o regulación pueden dar lugar a errores en la distribución del material. Estas alteraciones pueden, en consecuencia, originar cambios en la duración de las fases de la mitosis, una formación incorrecta del huso mitótico o el surco de escisión, o la incorrecta separación de las cromátidas hermanas durante la anafase. Estos fallos pueden inducir a su vez tanto procesos de apoptosis, como la generación de una mayor inestabilidad cromosómica (CIN) (Rossi *et al.* 2008; Schwartzman *et al.* 2010; Thompson *et al.* 2010).

La sobreexpresión de la forma fosfomimética o fosfodeficiente de la proteína CRMP-2 permitió observar alteraciones en la duración de las distintas fases del ciclo celular atendiendo al grado de fosforilación de ésta. Así, en primer lugar se observó que las células que sobreexpresan la forma fosfomimética de CRMP-2 requerían más tiempo para alcanzar la metafase, mientras que aquellas células que sobreexpresaban la forma no fosforilada de CRMP-2 alcanzaron la metafase a tiempos menores. Durante la prometafase, los kMTs escrutan el interior celular en busca de cromosomas a los que unirse a través del cinetocoro (Maiato *et al.* 2004; Tanaka *et al.* 2005). Para realizar esta función, la célula requiere la polimerización de los kMTs. Por lo tanto, parece lógico que la desfosforilación de CRMP-2 favorezca este proceso y se acorte el tiempo necesario para alcanzar la metafase. En cambio, al sobreexpresar la forma fosforilada de CRMP-2 se dificulta la polimerización de la tubulina y por tanto posiblemente por esta razón los kMTs necesitaron más tiempo para formarse completamente y agrupar a

los cromosomas en la placa ecuatorial (Mimori-Kiyosue *et al.* 2006; Sun *et al.* 2009). Si bien es la primera vez que se observa esta función en el caso de CRMP-2, se han observado resultados similares en el caso de otras MAPs como CLASP1 o CLIP-170 (Dujardin *et al.* 1998; Maiato *et al.* 2002; Mimori-Kiyosue *et al.* 2006; Ortiz *et al.* 2009).

Durante la metafase, en la cual los kMTs colaboran en la agrupación de los cromosomas en la placa metafásica, las proteínas MAPs se encargan de estabilizar a los MTs. Se ha descrito la necesidad de la desfosforilación de varias MAPs para su localización en el huso mitótico (Andersen 1998; Chang *et al.* 2001). Este mismo parece ser el caso de CRMP-2 ya que es necesaria su desfosforilación para poder unirse a los dímeros de tubulina (Fukata *et al.* 2002; Yoshimura *et al.* 2005). Por tanto, la localización de CRMP-2 en el huso mitótico durante la metafase podría ser necesaria para la polimerización de los kMTs, así como para generar la tensión necesaria para superar el SAC (Maresca y Salmon 2010). En nuestro estudio de progresión mitótica observamos como las células que sobreexpresan la forma fosfodeficiente de CRMP-2 alcanzan antes la metafase.

Durante la anafase, los MTs deben polimerizarse y despolimerizarse de un modo coordinado. Es necesaria una despolimerización de los kMTs para la migración de las cromátidas hermanas desde la placa ecuatorial hacia los polos celulares, mientras que los ipMTs deben polimerizarse para que se elongue la célula y distancien los polos celulares (Maiato *et al.* 2004). En nuestros experimentos observamos una mayor co-localización entre CRMP-2 y tubulina en la zona intermedia, y una menor duración de la anafase b en células transfectadas con la forma fosfodeficiente de CRMP-2 con respecto a las demás poblaciones. Pensamos que este resultado se debe a que la forma fosfodeficiente de CRMP-2 favorece la polimerización de los ipMTs y por lo tanto acorta el tiempo necesario para completar la anafase b. La anafase b es la fase de la mitosis menos estudiada y por tanto existen pocos datos en la bibliografía acerca de la intervención de las proteínas MAPs en esta etapa. No obstante, se han comenzado a publicar los primeros artículos que relacionan a MAPs en la necesidad de polimerizar y entrelazar (*bundling* en inglés) ipMTs (Jiang *et al.* 1998; Severin *et al.* 2001; Liu *et al.* 2009).

Al finalizar la citocinesis, las dos células hijas se separan a través del surco de escisión presente en el cuerpo medio que conecta las dos células. En este momento, es necesario el transporte de vesículas hacia el surco de escisión que contengan el material

necesario para la reconstrucción de la membrana plasmática de ambas células “hijas” (Schweitzer y D'Souza-Schorey 2005; Barr y Gruneberg 2007). Los ipMTs del cuerpo medio actúan a modo de raíles a través de los cuales se produce este transporte. No obstante, a medida que aumenta la concentración de vesículas en las inmediaciones del surco de escisión, los ipMTs deben despolimerizarse y retirarse progresivamente con el fin de liberar espacio y permitir así la llegada de más vesículas. Además de la ya mencionada capacidad de CRMP-2 de unirse a tubulina de un modo dependiente de fosforilación, se ha descrito que CRMP-2 participa en el transporte a través de los MTs de vesículas revestidas de clatrina mediante su unión dependiente de fosforilación con Numb (Nishimura *et al.* 2003; Arimura *et al.* 2005). Esta doble función de CRMP-2 en la polimerización de los MTs y en el transporte de vesículas de una manera dependiente de fosforilación puede ser la causa que explique la larga duración, e incluso la ausencia de escisión, observada en la citocinesis en células que fueron transfectadas con la forma fosfodeficiente de CRMP-2, que suponemos poseerán MTs muy estables. Otras MAPs implicadas en la correcta citocinesis debido a su interacción con los MTs del cuerpo medio son MKLP1, PCR1 o INCENP (Adams *et al.* 1998; Jiang *et al.* 1998; Adams *et al.* 2001). En el caso de esta última proteína se ha observado que forma un complejo con la también MAP Survivina y con Aurora B y que su función en la citocinesis depende de su fosforilación. Así, se ha observado que en caso de estar fosforilada se localiza en todo el cuerpo medio, mientras que en caso de estar desfosforilada se localiza exclusivamente en el surco intermedio, lo cual conduce a fallos en la mitosis y en la formación de células binucleadas (Glotzer 2009). En nuestro caso observamos que las células que expresaban formas constitutivamente desfosforiladas de CRMP-2, las que dan lugar a un porcentaje elevado de células multinucleadas, el marcaje para nuestra proteína se localizaba únicamente en el surco de escisión mientras que en las células que expresaban cualquiera de las construcciones restantes de CRMP-2 mostraban un marcaje distribuido en todo el cuerpo medio.

Estos datos muestran la necesidad de una regulación de la fosforilación de CRMP-2 para la correcta mitosis y podrían explicar por qué la forma fosforilada se encuentra altamente expresada en células inmortalizadas cuando se compara con células primarias. Alteraciones en la fosforilación de CRMP-2 producen la muerte celular mediada por p53 de células de NSCLC. Por lo tanto, CRMP-2 constituye una potencial diana terapéutica, ya que mediante terapias que inhiban su fosforilación e

impidan una correcta dinámica de los MTs durante la mitosis, se podría inducir la muerte de células de tumores.

4. Desfosforilación de CRMP-2 y muerte celular

En los estudios realizados con las células de adenocarcinoma pulmonar que expresan la forma fosfodeficiente de CRMP-2 observamos un incremento significativo en el número de células multinucleadas. En estas mismas células también observamos mediante microscopía confocal *in vivo* que un porcentaje de la población celular no completa la escisión final en la citocinesis, lo que desemboca en la generación de células multinucleadas. Por otra parte, las células tumorales que sobreexpresaban la forma fosfodeficiente de CRMP-2 y los tumores procedentes de la inyección de éstos clones en ratones atímicos, expresaron niveles elevados de p53 (significativamente mayores que los demás tipos celulares analizados) y, en el caso de los tumores, una mayor inmunotinción para la proteína Caspasa-3, efector de muerte celular.

Estos hallazgos nos llevaron a preguntarnos acerca de la relación entre la fosforilación de CRMP-2, las citocinesis aberrantes y la inducción de muerte celular.

La mayoría de los tumores son aneuploídicos y frecuentemente presentan fallos en la segregación cromosómica, en un fenómeno conocido como inestabilidad cromosómica (CIN) y que correlaciona con un mal pronóstico de los pacientes (Choi *et al.* 2009). La CIN se define como el fenómeno por el cual se produce una alta tasa de ganancias o pérdidas de al menos un cromosoma, sin tener en cuenta otros mecanismos de reordenación cromosómica como translocaciones, deleciones o inversiones que también son causa de errores en la mitosis (Thompson *et al.* 2010). La existencia de CIN puede contribuir a la evolución tumoral a través de la adquisición de propiedades metastásicas y de resistencia a quimioterápicos (Kuukasjarvi *et al.* 1997; Swanton *et al.* 2009). La estabilidad genómica requiere de una segregación cromosómica sin fallo (Kops *et al.* 2010), de hecho, para asegurar la correcta segregación de los cromosomas, las células poseen un mecanismo de control denominado punto de control del ensamblaje del huso mitótico (SAC o *Spindle Assembly Checkpoint*). A pesar de que el SAC constituye una buena manera de impedir fallos en la distribución del material genético de la célula, existen determinadas situaciones que escapan a este mecanismo de control como son los fallos en la escisión durante la citocinesis (Fujiwara *et al.* 2005). En caso de no darse la escisión de las dos células, se originan células diploídicas

que pueden contribuir a la transformación tumoral mediante la incorporación o el aumento en la expresión de determinados oncogenes. Sin embargo, las células no pueden incorporar material cromosómico indefinidamente ya que está comprobado que las células diploídicas tras una segregación cromosómica que influya a un gran número de cromosomas presentan dificultades para dividirse (Thompson y Compton 2008) y se induce la muerte por apoptosis mediada por p53 (Thompson y Compton 2010).

Así se han sugerido como opciones terapéuticas tanto el suprimir la CIN con el fin de eliminar la adaptabilidad de las células tumorales, como su contrario, promover la CIN intencionadamente a fin de facilitar la formación de células diploídicas o poliploídicas hasta nivel intolerables con la viabilidad celular (Thompson *et al.* 2010).

En nuestro caso sería interesante comprobar si la inhibición de las proteína quinasas que fosforilan a CRMP-2 pueden originar fenotipos parecidos al que observamos al estudiar la citocinesis en células deficientes en CRMP-2 fosforilado. A pesar de que el conocimiento de la importancia de GSK-3 β y CDK5 en la citocinesis sea escaso hasta la fecha, se ha descrito recientemente que CDK5 localiza en el cuerpo central durante la citocinesis y que las células CDK5 $-/-$ presentan una mayor aneuploidía (Lee *et al.* 2010). Además, se ha demostrado descensos en la expresión en la fosforilación mediada por CDK5 de la Proteína Asociada a la subunidad reguladora de CDK5 2 (CDK5PA2), impiden la escisión final y provoca la generación de células binucleadas (Paramasivam *et al.* 2007). Junto a lo anterior, se ha demostrado que GSK-3 β participa en la citocinesis fosforilando a PKC (Proteína Quinasa C) en la línea celular HeLa (Saurin *et al.* 2008).

Por otra parte, recientemente se ha descrito que una alta estabilidad de la unión entre los kMTs y los cinetocoros puede ser una causa de fallo del SAC ya que impide la disociación necesaria entre kMT y cinetocoro para poder corregir uniones incorrectas (Bakhoum *et al.* 2009). Nosotros, hemos observado que aquellas células que sobreexpresan la forma fosfodeficiente de la proteína presentan dificultades para superar la metafase y entrar en la anafase en experimentos de progresión mitótica, muy probablemente debido a que se forman MTs muy estables que no pueden ser despolimerizados por fosforilación de CRMP-2. De hecho, en este estudio, comprobamos como, a pesar de que las células que sobreexpresan la forma fosfodeficiente de CRMP-2 alcanzaran antes la metafase, tardan más en superar esta fase y comenzar la anafase, que además son más cortas que en las demás poblaciones.

Nuestro estudio acerca de la regulación de la fosforilación de CRMP-2 durante

la mitosis por tanto pone de manifiesto la importancia de la intervención y fosforilación correcta de ésta proteína para que ocurran divisiones celulares normales. Además, como ya se ha comentado anteriormente, abre perspectivas al uso de inhibidores selectivos de esta proteína o de su fosforilación como posibles estrategias para combatir el crecimiento descontrolado de las células tumorales.

5. Expresión y función de una forma proteolizada de CRMP-2 de 58 kDa

En el año 2005 Chung y colaboradores describieron la existencia de una isoforma de 58 kDa de CRMP-2 que se originaba como producto de una proteólisis de la forma proteica de 62 kDa en el extremo carboxiloterminial (Chung *et al.* 2005). En 2010 Shinkai-Ouchi y colaboradores describieron mediante proteómica la existencia de una forma de 56 kDa cuya secuencia es proteolizada en el residuo Ser518 (Shinkai-Ouchi *et al.* 2010). Teniendo en cuenta que estos estudios se realizaron en especies animales distintas y utilizando técnicas diferentes para la determinación del peso molecular, además de que el hecho de que la fosforilación y otras modificaciones post-traduccionales provocan un retraso en la separación de una proteína por Western Blot, parece que nos encontramos ante la misma forma proteica.

Esta forma de 58 kDa presenta una localización nuclear, debido a que la proteólisis del extremo carboxilo de CRMP-2 permite la exposición de una señal de localización nuclear hasta entonces oculta en la disposición tridimensional de la forma de 62kDa (Rogemond *et al.* 2008). Funcionalmente, en la mayoría de los estudios se ha relacionado esta proteólisis de CRMP-2 con diversos procesos apoptóticos provocados por distintos estímulos (Chung *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2007b; Rogemond *et al.* 2008), siempre en células de sistema nervioso. Recientemente también ha sido descrita en la periferia de fibras nerviosas de ratas en condiciones normales (Katano *et al.* 2006).

En nuestro trabajo hemos observado la expresión de la forma de 58 kDa de CRMP-2 en extractos nucleares tanto de células primarias de epitelio pulmonar como en células inmortalizadas y transformadas. Si bien la expresión es notablemente inferior a la de la isoforma de CRMP-2 de 62 kDa (es necesario sobreexponer las membranas para poder detectar la señal), el hecho de encontrar formas de proteólisis de esta proteína en el núcleo en condiciones basales es un hecho completamente novedoso y que requiere profundización.

Por otra parte, fuimos capaces de detectar formas fosforiladas de la proteína utilizando anticuerpos específicos frente a los residuos Thr 509 y Thr 514 fosforilados por GSK-3 β . No pudimos detectar esta forma de la proteína al utilizar anticuerpos específicos frente en el residuo Ser522 de CRMP-2. Lo cual indica, como se apuntó al describir la proteólisis de la proteína, que muy probablemente el lugar del corte se sitúa previamente a este residuo. Este hecho abre perspectivas muy interesantes en cuanto a la posible función de esta forma de proteólisis de CRMP-2 en la división celular ya que carece del elemento regulador de fosforilación por CDK5, que es por otra parte un residuo muy resistente a la desfosforilación (Cole *et al.* 2008), rindiendo una molécula de CRMP-2 cuya unión a tubulina depende únicamente de la actividad de la quinasa GSK-3 β y por tanto permite regulaciones rápidas de la dinámica microtubular. De hecho, en los experimentos de sincronización con nocodazol de células de adenocarcinoma pulmonar, se observaron también incrementos muy significativos en la fosforilación de esta isoforma menor de CRMP-2. Así, la proteólisis de este residuo podría constituir un método alternativo de regulación de su actividad.

Si bien en nuestros estudios hemos detectado la aparición de esta forma proteica en experimentos de sincronización con nocodazol, y por lo tanto no es descartable que su formación sea provocada por un efecto nocivo de este agente, el hecho de detectarla en condiciones basales nos hace dudar de ello. Además, hemos comprobado un incremento en sus niveles de fosforilación en células de NSCLC A549 en crecimiento exponencial con respecto a poblaciones que se encuentran en confluencia máxima. Por el contrario, no hemos detectado su expresión cuando las células fueron tratadas con otros agentes nocivos como el taxol, cisplatino o etopósido. Por otra parte, hemos podido constatar una reducción en la fosforilación de esta forma de 58 kDa en células en las que se indujo la muerte celular mediante UV. Estos datos nos llevan a plantear una función más general o alternativa a la descrita hasta la fecha para esta isoforma que dependa del estado de fosforilación de esta forma proteica de 58 kDa. Una posibilidad muy sugerente sería analizar si en células con una alta tasa de proliferación, como por ejemplo células transformadas, aumentan los niveles de proteólisis de CRMP-2 como un modo de facilitar la regulación de la dinámica de los MTs.

Conclusiones

Conclusiones

1) CRMP-2 se expresa en mayor medida tanto a nivel de RNAm como de proteína en células inmortalizadas respecto a células primarias, así como en células de adenocarcinoma pulmonar A549 en crecimiento exponencial frente a células en confluencia. Este hallazgo supone una relación entre la expresión de esta proteína y la proliferación.

2) En células de adenocarcinoma pulmonar, CRMP-2 presenta una localización diferencial dependiendo de su tamaño molecular. Así, la forma proteica mayoritaria de 62kDa se localiza en el citoplasma, donde co-localiza con actina en toda su extensión y con tubulina en la zona perinuclear. La forma proteolizada de 58kDa, que presenta una menor expresión, se localiza en el núcleo.

3) En líneas celulares procedentes de NSCLC, la proteína CRMP-2 se encuentra fosforilada en los residuos Ser522, Thr509 y Thr514 así como en células inmortalizadas no transformadas procedentes de células de epitelio pulmonar. Por el contrario, no se detecta fosforilación de la proteína en células primarias. Por otra parte, la fosforilación en el residuo Ser518 es específica de células transformadas. Por tanto la fosforilación de CRMP-2 en Ser518 en células de epitelio bronquial podría proponerse como un marcador de lesión neoplásica.

4) La sobreexpresión de una forma fosfomimética de CRMP-2 en células A549 de adenocarcinoma pulmonar conduce a células con una menor adhesión a sustrato y mayor migración y capacidad de crecer en ausencia de anclaje. Además se observa la internalización de la molécula de adhesión Cadherina-E en este tipo celular. Todas estas propiedades observadas *in vitro* apuntan hacia fenotipos más metastásicos.

5) La sobreexpresión de una forma proteica fosfodeficiente de CRMP-2 en células A549 de adenocarcinoma pulmonar provoca un aumento en la mortalidad celular asociada a un incremento en la expresión de p53.

6) En modelos realizados en ratones inmunodeficientes, de *xenograft* de tumores procedentes de células de adenocarcinoma pulmonar transfectadas con las construcciones de CRMP-2, las células que expresaban la forma fosfodefactiva de CRMP-2 dieron lugar a los tumores de mayor tamaño. Sin embargo estos tumores presentaron tasas de mortalidad más altas.

7) CRMP-2 participa en la mitosis. Se observa un incremento en la fosforilación de CRMP-2 en sus residuos Thr509 y Thr514 en células en mitosis, que se corresponden con variaciones en la activación de la quinasa GSK-3 β , que regula la capacidad de CRMP-2 de unirse diferencialmente a los microtúbulos.

8) Durante la mitosis se observa una co-localización débil entre CRMP-2 y los microtúbulos durante la prometafase que pasa a ser muy intensa en células en metafase. No se observa co-localización entre CRMP-2 y tubulina durante la anafase y la telofase. Durante la citocinesis se vuelve a observar co-localización con tubulina en el cuerpo medio.

9) Al estudiar la co-localización entre CRMP-2 y tubulina durante la mitosis en células que expresaban las formas fosfomiméticas y fosfodefactiva de CRMP-2 se hace evidente que la desfosforilación de la proteína es necesaria para su asociación con tubulina durante la metafase y que a su vez estabiliza esta unión dificultando la separación de CRMP-2 del huso acromático durante la anafase. Durante la citocinesis la interacción con tubulina es independiente de la desfosforilación de la proteína excepto para la estructura denominada surco de escisión.

10) La sobreexpresión de CRMP-2 da lugar a mitosis más cortas en el tiempo. Por el contrario, la sobreexpresión de la forma fosfodefactiva de CRMP-2 da lugar a metafases más largas, a reducciones en la duración de la anafase b y a citocinesis prolongadas. Por su parte, la sobreexpresión de la forma fosfomimética de CRMP-2 conlleva aumentos en la duración de la prometafase y metafases muy breves.

11) Se observó que la imposibilidad de fosforilar a CRMP-2 durante la citocinesis conlleva fallos en la correcta escisión que se traduce en la formación de

células multinucleadas. Esta puede ser la razón por la cual se desencadena un proceso de apoptosis mediado por p53 en estas células.

12) La fosforilación de CRMP-2 podría ser utilizada con fines diagnósticos, como marcador de lesión tumoral, y terapéuticos como diana antimitótica y proapoptótica.

Bibliografía

- Adams, R. R., Maiato, H., Earnshaw, W. C., *et al.* (2001). "Essential roles of Drosophila inner centromere protein (INCENP) and aurora B in histone H3 phosphorylation, metaphase chromosome alignment, kinetochore disjunction, and chromosome segregation." *J Cell Biol* **153**(4): 865-880.
- Adams, R. R., Tavares, A. A., Salzberg, A., *et al.* (1998). "pavarotti encodes a kinesin-like protein required to organize the central spindle and contractile ring for cytokinesis." *Genes Dev* **12**(10): 1483-1494.
- Akhmanova, A., Hoogenraad, C. C., Drabek, K., *et al.* (2001). "Clasps are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts." *Cell* **104**(6): 923-935.
- Allen, C. and Borisy, G. G. (1974). "Structural polarity and directional growth of microtubules of Chlamydomonas flagella." *J Mol Biol* **90**(2): 381-402.
- Andersen, J. S., Wilkinson, C. J., Mayor, T., *et al.* (2003). "Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling." *Nature* **426**(6966): 570-574.
- Andersen, S. S. (1998). "Xenopus interphase and mitotic microtubule-associated proteins differentially suppress microtubule dynamics in vitro." *Cell Motil Cytoskeleton* **41**(3): 202-213.
- Andersen, S. S., Buendia, B., Dominguez, J. E., *et al.* (1994). "Effect on microtubule dynamics of XMAP230, a microtubule-associated protein present in Xenopus laevis eggs and dividing cells." *J Cell Biol* **127**(5): 1289-1299.
- Arevalo, J. C. and Chao, M. V. (2005). "Axonal growth: where neurotrophins meet Wnts." *Curr Opin Cell Biol* **17**(2): 112-115.
- Arimura, N., Hattori, A., Kimura, T., *et al.* (2009). "CRMP-2 directly binds to cytoplasmic dynein and interferes with its activity." *J Neurochem* **111**(2): 380-390.
- Arimura, N., Inagaki, N., Chihara, K., *et al.* (2000). "Phosphorylation of collapsin response mediator protein-2 by Rho-kinase. Evidence for two separate signaling pathways for growth cone collapse." *J Biol Chem* **275**(31): 23973-23980.
- Arimura, N., Menager, C., Fukata, Y., *et al.* (2004). "Role of CRMP-2 in neuronal polarity." *J Neurobiol* **58**(1): 34-47.
- Arimura, N., Menager, C., Kawano, Y., *et al.* (2005). "Phosphorylation by Rho kinase regulates CRMP-2 activity in growth cones." *Mol Cell Biol* **25**(22): 9973-9984.
- Baas, P. W. (1999). "Microtubules and neuronal polarity: lessons from mitosis." *Neuron* **22**(1): 23-31.
- Bach, P. B. and Ginsberg, R. J. (2002). Epidemiology in lung cancer. *Atlas of Clinical Oncology. Lung cancer* A. C. Society. Hamilton, ON, Ginsberg, R.J.:
- Bakhom, S. F., Thompson, S. L., Manning, A. L., *et al.* (2009). "Genome stability is ensured by temporal control of kinetochore-microtubule dynamics." *Nat Cell Biol* **11**(1): 27-35.
- Ballestrem, C., Magid, N., Zonis, J., *et al.* (2004). Interplay between the actin cytoskeleton, focal adhesions and microtubules. *Cell Motility: From Molecules to Organisms*. P. M. a. C. P. Ridley A.P.: pp. 75-99.
- Ballestrem, C., Wehrle-Haller, B., Hinz, B., *et al.* (2000). "Actin-dependent lamellipodia formation and microtubule-dependent tail retraction control-directed cell migration." *Mol Biol Cell* **11**(9): 2999-3012.
- Barr, F. A. and Gruneberg, U. (2007). "Cytokinesis: placing and making the final cut." *Cell* **131**(5): 847-860.

- Becklake, M. R., Bagatin, E. and Neder, J. A. (2007). "Asbestos-related diseases of the lungs and pleura: uses, trends and management over the last century." Int J Tuberc Lung Dis **11**(4): 356-369.
- Beer, D. G., Kardia, S. L., Huang, C. C., *et al.* (2002). "Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma." Nat Med **8**(8): 816-824.
- Bement, W. M., Benink, H. A. and von Dassow, G. (2005). "A microtubule-dependent zone of active RhoA during cleavage plane specification." J Cell Biol **170**(1): 91-101.
- Betticher, D. C., Heighway, J., Hasleton, P. S., *et al.* (1996). "Prognostic significance of CCND1 (cyclin D1) overexpression in primary resected non-small-cell lung cancer." Br J Cancer **73**(3): 294-300.
- Beutner, K. R. and Tyring, S. (1997). "Human papillomavirus and human disease." Am J Med **102**(5A): 9-15.
- Bharti, A., Ma, P. C., Maulik, G., *et al.* (2004). "Haptoglobin alpha-subunit and hepatocyte growth factor can potentially serve as serum tumor biomarkers in small cell lung cancer." Anticancer Res **24**(2C): 1031-1038.
- Bhattacharjee, A., Richards, W. G., Staunton, J., *et al.* (2001). "Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(24): 13790-13795.
- Boffetta, P. (2006). "Human cancer from environmental pollutants: the epidemiological evidence." Mutat Res **608**(2): 157-162.
- Bretin, S., Reibel, S., Charrier, E., *et al.* (2005). "Differential expression of CRMP1, CRMP2A, CRMP2B, and CRMP5 in axons or dendrites of distinct neurons in the mouse brain." J Comp Neurol **486**(1): 1-17.
- Bringmann, H., Cowan, C. R., Kong, J., *et al.* (2007). "LET-99, GOA-1/GPA-16, and GPR-1/2 are required for aster-positioned cytokinesis." Curr Biol **17**(2): 185-191.
- Brittain, J. M., Piekarz, A. D., Wang, Y., *et al.* (2009). "An atypical role for collapsin response mediator protein 2 (CRMP-2) in neurotransmitter release via interaction with presynaptic voltage-gated calcium channels." J Biol Chem **284**(45): 31375-31390.
- Brock, M. V., Hooker, C. M., Ota-Machida, E., *et al.* (2008). "DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer." N Engl J Med **358**(11): 1118-1128.
- Brognard, J., Clark, A. S., Ni, Y., *et al.* (2001). "Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation." Cancer Res **61**(10): 3986-3997.
- Brown, M., Jacobs, T., Eickholt, B., *et al.* (2004). "Alpha2-chimaerin, cyclin-dependent Kinase 5/p35, and its target collapsin response mediator protein-2 are essential components in semaphorin 3A-induced growth-cone collapse." J Neurosci **24**(41): 8994-9004.
- Brundage, M. D., Davies, D. and Mackillop, W. J. (2002). "Prognostic factors in non-small cell lung cancer: a decade of progress." Chest **122**(3): 1037-1057.
- Brust-Mascher, I., Civelekoglu-Scholey, G., Kwon, M., *et al.* (2004). "Model for anaphase B: role of three mitotic motors in a switch from poleward flux to spindle elongation." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(45): 15938-15943.
- Buttrick, G. J. and Wakefield, J. G. (2008). "PI3-K and GSK-3: Akt-ing together with microtubules." Cell Cycle **7**(17): 2621-2625.

- Casenghi, M., Meraldi, P., Weinhart, U., *et al.* (2003). "Polo-like kinase 1 regulates Nlp, a centrosome protein involved in microtubule nucleation." *Dev Cell* **5**(1): 113-125.
- Civelekoglu-Scholey, G. and Scholey, J. M. (2010). "Mitotic force generators and chromosome segregation." *Cell Mol Life Sci* **67**(13): 2231-2250.
- Cole, A. R., Causeret, F., Yadirgi, G., *et al.* (2006). "Distinct priming kinases contribute to differential regulation of collapsin response mediator proteins by glycogen synthase kinase-3 in vivo." *J Biol Chem* **281**(24): 16591-16598.
- Cole, A. R., Knebel, A., Morrice, N. A., *et al.* (2004). "GSK-3 phosphorylation of the Alzheimer epitope within collapsin response mediator proteins regulates axon elongation in primary neurons." *J Biol Chem* **279**(48): 50176-50180.
- Cole, A. R., Noble, W., van Aalten, L., *et al.* (2007). "Collapsin response mediator protein-2 hyperphosphorylation is an early event in Alzheimer's disease progression." *J Neurochem* **103**(3): 1132-1144.
- Cole, A. R., Soutar, M. P., Rembutsu, M., *et al.* (2008). "Relative resistance of Cdk5-phosphorylated CRMP2 to dephosphorylation." *J Biol Chem* **283**(26): 18227-18237.
- Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., *et al.* (1995). "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B." *Nature* **378**(6559): 785-789.
- Czech, T., Yang, J. W., Csaszar, E., *et al.* (2004). "Reduction of hippocampal collapsin response mediated protein-2 in patients with mesial temporal lobe epilepsy." *Neurochem Res* **29**(12): 2189-2196.
- Chang, W., Gruber, D., Chari, S., *et al.* (2001). "Phosphorylation of MAP4 affects microtubule properties and cell cycle progression." *J Cell Sci* **114**(Pt 15): 2879-2887.
- Charoentum, C., Thongprasert, S., Chewasakulyong, B., *et al.* (2007). "Phase II study of cisplatin combined to irinotecan administered alternately with docetaxel in advanced non-small cell lung cancer." *J Med Assoc Thai* **90**(11): 2506-2512.
- Chen, W., Arroyo, J. D., Timmons, J. C., *et al.* (2005). "Cancer-associated PP2A Aalpha subunits induce functional haploinsufficiency and tumorigenicity." *Cancer Res* **65**(18): 8183-8192.
- Cheng, Y. W., Wu, M. F., Wang, J., *et al.* (2007). "Human papillomavirus 16/18 E6 oncoprotein is expressed in lung cancer and related with p53 inactivation." *Cancer Res* **67**(22): 10686-10693.
- Choi, C. M., Seo, K. W., Jang, S. J., *et al.* (2009). "Chromosomal instability is a risk factor for poor prognosis of adenocarcinoma of the lung: Fluorescence in situ hybridization analysis of paraffin-embedded tissue from Korean patients." *Lung Cancer* **64**(1): 66-70.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* **162**(1): 156-159.
- Chung, M. A., Lee, J. E., Lee, J. Y., *et al.* (2005). "Alteration of collapsin response mediator protein-2 expression in focal ischemic rat brain." *Neuroreport* **16**(15): 1647-1653.
- Dehmelt, L. and Halpain, S. (2004). "Actin and microtubules in neurite initiation: are MAPs the missing link?" *J Neurobiol* **58**(1): 18-33.
- Desai, A., Deacon, H. W., Walczak, C. E., *et al.* (1997). "A method that allows the assembly of kinetochore components onto chromosomes condensed in clarified *Xenopus* egg extracts." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(23): 12378-12383.

- Desai, A. and Mitchison, T. J. (1997). "Microtubule polymerization dynamics." Annu Rev Cell Dev Biol **13**: 83-117.
- Dewar, H., Tanaka, K., Nasmyth, K., *et al.* (2004). "Tension between two kinetochores suffices for their bi-orientation on the mitotic spindle." Nature **428**(6978): 93-97.
- Dhariwala, F. A. and Rajadhyaksha, M. S. (2008). "An unusual member of the Cdk family: Cdk5." Cell Mol Neurobiol **28**(3): 351-369.
- Dhavan, R. and Tsai, L. H. (2001). "A decade of CDK5." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(10): 749-759.
- Di Fiore, B., Ciciarello, M. and Lavia, P. (2004). "Mitotic functions of the Ran GTPase network: the importance of being in the right place at the right time." Cell Cycle **3**(3): 305-313.
- Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F., *et al.* (1998). "Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization." Genes Dev **12**(22): 3499-3511.
- Ding, L., Getz, G., Wheeler, D. A., *et al.* (2008). "Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma." Nature **455**(7216): 1069-1075.
- Doble, B. W. and Woodgett, J. R. (2003). "GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase." J Cell Sci **116**(Pt 7): 1175-1186.
- Drubin, D. G. and Nelson, W. J. (1996). "Origins of cell polarity." Cell **84**(3): 335-344.
- Duffy, M. J., O'Donovan, N., Brennan, D. J., *et al.* (2007). "Survivin: a promising tumor biomarker." Cancer Lett **249**(1): 49-60.
- Dujardin, D., Wacker, U. I., Moreau, A., *et al.* (1998). "Evidence for a role of CLIP-170 in the establishment of metaphase chromosome alignment." J Cell Biol **141**(4): 849-862.
- Dumontet, C., Isaac, S., Souquet, P. J., *et al.* (2005). "Expression of class III beta tubulin in non-small cell lung cancer is correlated with resistance to taxane chemotherapy." Bull Cancer **92**(2): E25-30.
- Echeverri, C. J., Paschal, B. M., Vaughan, K. T., *et al.* (1996). "Molecular characterization of the 50-kD subunit of dynactin reveals function for the complex in chromosome alignment and spindle organization during mitosis." J Cell Biol **132**(4): 617-633.
- Eichhorn, P. J., Creighton, M. P. and Bernards, R. (2009). "Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer." Biochim Biophys Acta **1795**(1): 1-15.
- Embi, N., Rylatt, D. B. and Cohen, P. (1980). "Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase." Eur J Biochem **107**(2): 519-527.
- Emi, M., Fujiwara, Y., Nakajima, T., *et al.* (1992). "Frequent loss of heterozygosity for loci on chromosome 8p in hepatocellular carcinoma, colorectal cancer, and lung cancer." Cancer Res **52**(19): 5368-5372.
- Esteve, M. A., Carre, M. and Braguer, D. (2007). "Microtubules in apoptosis induction: are they necessary?" Curr Cancer Drug Targets **7**(8): 713-729.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2001). "Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKC ζ ." Cell **106**(4): 489-498.
- Ezratty, E. J., Partridge, M. A. and Gundersen, G. G. (2005). "Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase." Nat Cell Biol **7**(6): 581-590.
- Fang, X., Yu, S. X., Lu, Y., *et al.* (2000). "Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(22): 11960-11965.

- Ferguson, M. K. and Lehman, A. G. (2003). "Sleeve lobectomy or pneumonectomy: optimal management strategy using decision analysis techniques." Ann Thorac Surg **76**(6): 1782-1788.
- Ferrer, I., Barrachina, M. and Puig, B. (2002). "Glycogen synthase kinase-3 is associated with neuronal and glial hyperphosphorylated tau deposits in Alzheimer's disease, Pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration." Acta Neuropathol **104**(6): 583-591.
- Fiore, R. and Puschel, A. W. (2003). "The function of semaphorins during nervous system development." Front Biosci **8**: s484-499.
- Fontan-Gabas, L., Oliemuller, E., Martinez-Irujo, J. J., *et al.* (2007). "All-trans-retinoic acid inhibits collapsin response mediator protein-2 transcriptional activity during SH-SY5Y neuroblastoma cell differentiation." FEBS J **274**(2): 498-511.
- Foulkes, W. D., Reis-Filho, J. S. and Narod, S. A. (2010). "Tumor size and survival in breast cancer--a reappraisal." Nat Rev Clin Oncol **7**(6): 348-353.
- Frame, S. and Cohen, P. (2001). "GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery." Biochem J **359**(Pt 1): 1-16.
- Franklin, W. A., Veve, R., Hirsch, F. R., *et al.* (2002). "Epidermal growth factor receptor family in lung cancer and premalignancy." Semin Oncol **29**(1 Suppl 4): 3-14.
- Fujiwara, T., Bandi, M., Nitta, M., *et al.* (2005). "Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells." Nature **437**(7061): 1043-1047.
- Fujiwara, Y., Ohata, H., Emi, M., *et al.* (1994). "A 3-Mb physical map of the chromosome region 8p21.3-p22, including a 600-kb region commonly deleted in human hepatocellular carcinoma, colorectal cancer, and non-small cell lung cancer." Genes Chromosomes Cancer **10**(1): 7-14.
- Fukasawa, K. (2007). "Oncogenes and tumour suppressors take on centrosomes." Nat Rev Cancer **7**(12): 911-924.
- Fukasawa, K., Choi, T., Kuriyama, R., *et al.* (1996). "Abnormal centrosome amplification in the absence of p53." Science **271**(5256): 1744-1747.
- Fukata, Y., Itoh, T. J., Kimura, T., *et al.* (2002). "CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly." Nat Cell Biol **4**(8): 583-591.
- Fukuda, H. and Okamura, N. (2007). "[Introduction to and general remarks on molecular imaging]." Brain Nerve **59**(3): 203-207.
- Garcia-Perez, J., Avila, J. and Diaz-Nido, J. (1998). "Implication of cyclin-dependent kinases and glycogen synthase kinase 3 in the phosphorylation of microtubule-associated protein 1B in developing neuronal cells." J Neurosci Res **52**(4): 445-452.
- Ghadimi, B. M., Sackett, D. L., Difilippantonio, M. J., *et al.* (2000). "Centrosome amplification and instability occurs exclusively in aneuploid, but not in diploid colorectal cancer cell lines, and correlates with numerical chromosomal aberrations." Genes Chromosomes Cancer **27**(2): 183-190.
- Ghanevati, M. and Miller, C. A. (2005). "Phospho-beta-catenin accumulation in Alzheimer's disease and in aggresomes attributable to proteasome dysfunction." J Mol Neurosci **25**(1): 79-94.
- Giuliani, L., Jaxmar, T., Casadio, C., *et al.* (2007). "Detection of oncogenic viruses SV40, BKV, JCV, HCMV, HPV and p53 codon 72 polymorphism in lung carcinoma." Lung Cancer **57**(3): 273-281.
- Glotzer, M. (2004). "Cleavage furrow positioning." J Cell Biol **164**(3): 347-351.

- Glotzer, M. (2009). "The 3Ms of central spindle assembly: microtubules, motors and MAPs." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(1): 9-20.
- Goldschmidt, R. C. and Kimelberg, H. K. (1989). "Protein analysis of mammalian cells in monolayer culture using the bicinchoninic assay." Anal Biochem **177**(1): 41-45.
- Goldstein, L. S. and Philp, A. V. (1999). "The road less traveled: emerging principles of kinesin motor utilization." Annu Rev Cell Dev Biol **15**: 141-183.
- Good, P. F., Alapat, D., Hsu, A., *et al.* (2004). "A role for semaphorin 3A signaling in the degeneration of hippocampal neurons during Alzheimer's disease." J Neurochem **91**(3): 716-736.
- Gromley, A., Yeaman, C., Rosa, J., *et al.* (2005). "Centriolin anchoring of exocyst and SNARE complexes at the midbody is required for secretory-vesicle-mediated abscission." Cell **123**(1): 75-87.
- Gu, Y., Hamajima, N. and Ihara, Y. (2000). "Neurofibrillary tangle-associated collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) is highly phosphorylated on Thr-509, Ser-518, and Ser-522." Biochemistry **39**(15): 4267-4275.
- Gu, Y. and Ihara, Y. (2000). "Evidence that collapsin response mediator protein-2 is involved in the dynamics of microtubules." J Biol Chem **275**(24): 17917-17920.
- Gundersen, G. G. and Bulinski, J. C. (1988). "Selective stabilization of microtubules oriented toward the direction of cell migration." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(16): 5946-5950.
- Hainaut, P., Hernandez, T., Robinson, A., *et al.* (1998). "IARC Database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools." Nucleic Acids Res **26**(1): 205-213.
- Hamajima, N., Matsuda, K., Sakata, S., *et al.* (1996). "A novel gene family defined by human dihydropyrimidinase and three related proteins with differential tissue distribution." Gene **180**(1-2): 157-163.
- Hamdane, M., Bretteville, A., Sambo, A. V., *et al.* (2005). "p25/Cdk5-mediated retinoblastoma phosphorylation is an early event in neuronal cell death." J Cell Sci **118**(Pt 6): 1291-1298.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011). "The Hallmarks of Cancer: The Next Generation." Cell **144**(5): 646-674.
- Hara, M., Matsuzaki, Y., Shimuzu, T., *et al.* (2007). "Preoperative serum C-reactive protein level in non-small cell lung cancer." Anticancer Res **27**(4C): 3001-3004.
- Harris, T. J. and Tepass, U. (2010). "Adherens junctions: from molecules to morphogenesis." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(7): 502-514.
- Harwood, A. J. (2001). "Regulation of GSK-3: a cellular multiprocessor." Cell **105**(7): 821-824.
- Hayashida, Y., Goi, T., Hirono, Y., *et al.* (2005). "PPP1R3 gene (protein phosphatase 1) alterations in colorectal cancer and its relationship to metastasis." Oncol Rep **13**(6): 1223-1227.
- Hayes, D. C., Secrist, H., Bangur, C. S., *et al.* (2006). "Multigene real-time PCR detection of circulating tumor cells in peripheral blood of lung cancer patients." Anticancer Res **26**(2B): 1567-1575.
- Hedgecock, E. M., Culotti, J. G., Thomson, J. N., *et al.* (1985). "Axonal guidance mutants of *Caenorhabditis elegans* identified by filling sensory neurons with fluorescein dyes." Dev Biol **111**(1): 158-170.

- Hegedus, B., Zach, J., Czirik, A., *et al.* (2004). "Irradiation and Taxol treatment result in non-monotonous, dose-dependent changes in the motility of glioblastoma cells." J Neurooncol **67**(1-2): 147-157.
- Higashiyama, M., Doi, O., Kodama, K., *et al.* (1997). "MDM2 gene amplification and expression in non-small-cell lung cancer: immunohistochemical expression of its protein is a favourable prognostic marker in patients without p53 protein accumulation." Br J Cancer **75**(9): 1302-1308.
- Higuchi, T. and Uhlmann, F. (2005). "Stabilization of microtubule dynamics at anaphase onset promotes chromosome segregation." Nature **433**(7022): 171-176.
- Hirokawa, N. (1998). "Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport." Science **279**(5350): 519-526.
- Hirsch, F. R., Matthews, M. J., Aisner, S., *et al.* (1988). "Histopathologic classification of small cell lung cancer. Changing concepts and terminology." Cancer **62**(5): 973-977.
- Hockel, M. and Vaupel, P. (2001). "Biological consequences of tumor hypoxia." Semin Oncol **28**(2 Suppl 8): 36-41.
- Hoffman, D. B., Pearson, C. G., Yen, T. J., *et al.* (2001). "Microtubule-dependent changes in assembly of microtubule motor proteins and mitotic spindle checkpoint proteins at PtK1 kinetochores." Mol Biol Cell **12**(7): 1995-2009.
- Holy, T. E. and Leibler, S. (1994). "Dynamic instability of microtubules as an efficient way to search in space." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(12): 5682-5685.
- Hong, L. E., Wonodi, I., Avila, M. T., *et al.* (2005). "Dihydropyrimidinase-related protein 2 (DRP-2) gene and association to deficit and nondeficit schizophrenia." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet **136B**(1): 8-11.
- Honore, S., Pasquier, E. and Braguer, D. (2005). "Understanding microtubule dynamics for improved cancer therapy." Cell Mol Life Sci **62**(24): 3039-3056.
- Hur, E. M. and Zhou, F. Q. (2010). "GSK3 signalling in neural development." Nat Rev Neurosci **11**(8): 539-551.
- Hyman, A. A. and Karsenti, E. (1996). "Morphogenetic properties of microtubules and mitotic spindle assembly." Cell **84**(3): 401-410.
- Inagaki, N., Chihara, K., Arimura, N., *et al.* (2001). "CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons." Nat Neurosci **4**(8): 781-782.
- Inamura, K., Fujiwara, T., Hoshida, Y., *et al.* (2005). "Two subclasses of lung squamous cell carcinoma with different gene expression profiles and prognosis identified by hierarchical clustering and non-negative matrix factorization." Oncogene **24**(47): 7105-7113.
- Infante, A. S., Stein, M. S., Zhai, Y., *et al.* (2000). "Detyrosinated (Glu) microtubules are stabilized by an ATP-sensitive plus-end cap." J Cell Sci **113** (Pt 22): 3907-3919.
- Isobe, T., Herbst, R. S. and Onn, A. (2005). "Current management of advanced non-small cell lung cancer: targeted therapy." Semin Oncol **32**(3): 315-328.
- Ito, T., Kagoshima, M., Sasaki, Y., *et al.* (2000). "Repulsive axon guidance molecule Sema3A inhibits branching morphogenesis of fetal mouse lung." Mech Dev **97**(1-2): 35-45.
- Itoh, M., Nagafuchi, A., Moroi, S., *et al.* (1997). "Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments." J Cell Biol **138**(1): 181-192.
- Jiang, W., Jimenez, G., Wells, N. J., *et al.* (1998). "PRC1: a human mitotic spindle-associated CDK substrate protein required for cytokinesis." Mol Cell **2**(6): 877-885.

- Johnston-Wilson, N. L., Sims, C. D., Hofmann, J. P., *et al.* (2000). "Disease-specific alterations in frontal cortex brain proteins in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. The Stanley Neuropathology Consortium." Mol Psychiatry **5**(2): 142-149.
- Johnstone, R. W., Ruefli, A. A. and Lowe, S. W. (2002). "Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy." Cell **108**(2): 153-164.
- Jones, P. A. (2005). "Overview of cancer epigenetics." Semin Hematol **42**(3 Suppl 2): S3-8.
- Jope, R. S. and Roh, M. S. (2006). "Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in psychiatric diseases and therapeutic interventions." Curr Drug Targets **7**(11): 1421-1434.
- Jope, R. S., Yuskaitis, C. J. and Beurel, E. (2007). "Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics." Neurochem Res **32**(4-5): 577-595.
- Jordan, M. A. (2002). "Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin." Curr Med Chem Anticancer Agents **2**(1): 1-17.
- Jordan, M. A. and Wilson, L. (2004). "Microtubules as a target for anticancer drugs." Nat Rev Cancer **4**(4): 253-265.
- Kamal, A. and Goldstein, L. S. (2002). "Principles of cargo attachment to cytoplasmic motor proteins." Curr Opin Cell Biol **14**(1): 63-68.
- Kanninen, K., Goldsteins, G., Auriola, S., *et al.* (2004). "Glycosylation changes in Alzheimer's disease as revealed by a proteomic approach." Neurosci Lett **367**(2): 235-240.
- Kase, S., Sugio, K., Yamazaki, K., *et al.* (2000). "Expression of E-cadherin and beta-catenin in human non-small cell lung cancer and the clinical significance." Clin Cancer Res **6**(12): 4789-4796.
- Katano, T., Mabuchi, T., Okuda-Ashitaka, E., *et al.* (2006). "Proteomic identification of a novel isoform of collapsin response mediator protein-2 in spinal nerves peripheral to dorsal root ganglia." Proteomics **6**(22): 6085-6094.
- Kim, M., Datta, A., Brakeman, P., *et al.* (2007). "Polarity proteins PAR6 and aPKC regulate cell death through GSK-3beta in 3D epithelial morphogenesis." J Cell Sci **120**(Pt 14): 2309-2317.
- Kimura, T., Watanabe, H., Iwamatsu, A., *et al.* (2005). "Tubulin and CRMP-2 complex is transported via Kinesin-1." J Neurochem **93**(6): 1371-1382.
- Kirschner, M. and Mitchison, T. (1986a). "Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis." Cell **45**(3): 329-342.
- Kirschner, M. W. and Mitchison, T. (1986b). "Microtubule dynamics." Nature **324**(6098): 621.
- Kitamura, K., Takayama, M., Hamajima, N., *et al.* (1999). "Characterization of the human dihydropyrimidinase-related protein 2 (DRP-2) gene." DNA Res **6**(5): 291-297.
- Kline-Smith, S. L., Khodjakov, A., Hergert, P., *et al.* (2004). "Depletion of centromeric MCAK leads to chromosome congression and segregation defects due to improper kinetochore attachments." Mol Biol Cell **15**(3): 1146-1159.
- Knoblich, J. A. (2010). "Asymmetric cell division: recent developments and their implications for tumour biology." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(12): 849-860.
- Knudson, A. G., Jr. (1989). "Hereditary cancers disclose a class of cancer genes." Cancer **63**(10): 1888-1891.
- Kobayashi, S., Ishiguro, K., Omori, A., *et al.* (1993). "A cdc2-related kinase PSSALRE/cdk5 is homologous with the 30 kDa subunit of tau protein kinase II,

- a proline-directed protein kinase associated with microtubule." FEBS Lett **335**(2): 171-175.
- Kocak, M., Mayadagli, A., Ozkan, A., *et al.* (2007). "Outcome of metastatic non-small cell lung carcinoma patients receiving docetaxelcisplatin combination chemotherapy: single institution experience." J BUON **12**(4): 471-476.
- Kodama, Y., Murakumo, Y., Ichihara, M., *et al.* (2004). "Induction of CRMP-2 by GDNF and analysis of the CRMP-2 promoter region." Biochem Biophys Res Commun **320**(1): 108-115.
- Kohno, T., Takakura, S., Yamada, T., *et al.* (1999). "Alterations of the PPP1R3 gene in human cancer." Cancer Res **59**(17): 4170-4174.
- Kops, G. J., Saurin, A. T. and Meraldi, P. (2010). "Finding the middle ground: how kinetochores power chromosome congression." Cell Mol Life Sci **67**(13): 2145-2161.
- Koyama, K., Sudo, K. and Nakamura, Y. (1995). "Isolation of 115 human chromosome 8-specific expressed-sequence tags by exon amplification." Genomics **26**(2): 245-253.
- Krylyshkina, O., Kaverina, I., Kranewitter, W., *et al.* (2002). "Modulation of substrate adhesion dynamics via microtubule targeting requires kinesin-1." J Cell Biol **156**(2): 349-359.
- Kumar, P., Lyle, K. S., Gierke, S., *et al.* (2009). "GSK3beta phosphorylation modulates CLASP-microtubule association and lamella microtubule attachment." J Cell Biol **184**(6): 895-908.
- Kuukasjarvi, T., Karhu, R., Tanner, M., *et al.* (1997). "Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer." Cancer Res **57**(8): 1597-1604.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lalioti, V., Muruais, G., Dinarina, A., *et al.* (2009). "The atypical kinase Cdk5 is activated by insulin, regulates the association between GLUT4 and E-Syt1, and modulates glucose transport in 3T3-L1 adipocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(11): 4249-4253.
- Lalioti, V., Pulido, D. and Sandoval, I. V. (2010). "Cdk5, the multifunctional surveyor." Cell Cycle **9**(2): 284-311.
- Lau, S. K., Boutros, P. C., Pintilie, M., *et al.* (2007). "Three-gene prognostic classifier for early-stage non small-cell lung cancer." J Clin Oncol **25**(35): 5562-5569.
- Lauffenburger, D. A. and Horwitz, A. F. (1996). "Cell migration: a physically integrated molecular process." Cell **84**(3): 359-369.
- Lee, K. Y., Helbing, C. C., Choi, K. S., *et al.* (1997a). "Neuronal Cdc2-like kinase (Nclk) binds and phosphorylates the retinoblastoma protein." J Biol Chem **272**(9): 5622-5626.
- Lee, K. Y., Mummery, A., Park, J., *et al.* (2010). "Localization of CDK5 in the midbody and increased aneuploidy in CDK5^{-/-} cells." Cell Cycle **9**(17): 3629-3630.
- Lee, K. Y., Qi, Z., Yu, Y. P., *et al.* (1997b). "Neuronal Cdc2-like kinases: neuron-specific forms of Cdk5." Int J Biochem Cell Biol **29**(7): 951-958.
- Lee, S., Kim, J. H., Lee, C. S., *et al.* (2002). "Collapsin response mediator protein-2 inhibits neuronal phospholipase D(2) activity by direct interaction." J Biol Chem **277**(8): 6542-6549.
- Leis, H., Segrelles, C., Ruiz, S., *et al.* (2002). "Expression, localization, and activity of glycogen synthase kinase 3beta during mouse skin tumorigenesis." Mol Carcinog **35**(4): 180-185.

- Lemos, C. L., Sampaio, P., Maiato, H., *et al.* (2000). "Mast, a conserved microtubule-associated protein required for bipolar mitotic spindle organization." EMBO J **19**(14): 3668-3682.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1998). "Genetic instabilities in human cancers." Nature **396**(6712): 643-649.
- Leung, T., Ng, Y., Cheong, A., *et al.* (2002). "p80 ROKalpha binding protein is a novel splice variant of CRMP-1 which associates with CRMP-2 and modulates RhoA-induced neuronal morphology." FEBS Lett **532**(3): 445-449.
- Lewin, B. (1994). Genes V. Oxford ; New York, Oxford University Press.
- Li, W., Herman, R. K. and Shaw, J. E. (1992). "Analysis of the *Caenorhabditis elegans* axonal guidance and outgrowth gene *unc-33*." Genetics **132**(3): 675-689.
- Ligon, L. A. and Holzbaur, E. L. (2007). "Microtubules tethered at epithelial cell junctions by dynein facilitate efficient junction assembly." Traffic **8**(7): 808-819.
- Lim, Y. W., Yoon, S. Y., Choi, J. E., *et al.* (2010). "Maintained activity of glycogen synthase kinase-3beta despite of its phosphorylation at serine-9 in okadaic acid-induced neurodegenerative model." Biochem Biophys Res Commun **395**(2): 207-212.
- Lin, Y. L. and Hsueh, Y. P. (2008). "Neurofibromin interacts with CRMP-2 and CRMP-4 in rat brain." Biochem Biophys Res Commun **369**(2): 747-752.
- Lingle, W. L., Barrett, S. L., Negron, V. C., *et al.* (2002). "Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(4): 1978-1983.
- Liu, D., Huang, C., Kameyama, K., *et al.* (2001a). "E-cadherin expression associated with differentiation and prognosis in patients with non-small cell lung cancer." Ann Thorac Surg **71**(3): 949-954; discussion 954-945.
- Liu, J., Wang, Z., Jiang, K., *et al.* (2009). "PRC1 cooperates with CLASP1 to organize central spindle plasticity in mitosis." J Biol Chem **284**(34): 23059-23071.
- Liu, J. L., Wang, X. Y., Huang, B. X., *et al.* (2010). "Expression of CDK5/p35 in resected patients with non-small cell lung cancer: relation to prognosis." Med Oncol.
- Liu, X. and Erikson, R. L. (2002). "Activation of Cdc2/cyclin B and inhibition of centrosome amplification in cells depleted of Plk1 by siRNA." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(13): 8672-8676.
- Liu, Y., Saad, R. S., Shen, S. S., *et al.* (2003). "Diagnostic value of microtubule-associated protein-2 (MAP-2) for neuroendocrine neoplasms." Adv Anat Pathol **10**(2): 101-106.
- Liu, Y., Sturgis, C. D., Grzybicki, D. M., *et al.* (2001b). "Microtubule-associated protein-2: a new sensitive and specific marker for pulmonary carcinoid tumor and small cell carcinoma." Mod Pathol **14**(9): 880-885.
- Lombillo, V. A., Nislow, C., Yen, T. J., *et al.* (1995). "Antibodies to the kinesin motor domain and CENP-E inhibit microtubule depolymerization-dependent motion of chromosomes in vitro." J Cell Biol **128**(1-2): 107-115.
- Loncarek, J., Kisurina-Evgenieva, O., Vinogradova, T., *et al.* (2007). "The centromere geometry essential for keeping mitosis error free is controlled by spindle forces." Nature **450**(7170): 745-749.
- Lu, J. W., Chang, J. G., Yeh, K. T., *et al.* (2010). "Decreased expression of p39 is associated with a poor prognosis in human hepatocellular carcinoma." Med Oncol.
- Lubec, G., Nonaka, M., Krapfenbauer, K., *et al.* (1999). "Expression of the dihydropyrimidinase related protein 2 (DRP-2) in Down syndrome and

- Alzheimer's disease brain is downregulated at the mRNA and dysregulated at the protein level." *J Neural Transm Suppl* **57**: 161-177.
- Llanos, S., Efeyan, A., Monsech, J., *et al.* (2006). "A high-throughput loss-of-function screening identifies novel p53 regulators." *Cell Cycle* **5**(16): 1880-1885.
- Ma, C., Wang, J., Gao, Y., *et al.* (2007a). "The role of glycogen synthase kinase 3beta in the transformation of epidermal cells." *Cancer Res* **67**(16): 7756-7764.
- Ma, Y., Wang, M., Li, N., *et al.* (2009). "Bleomycin-induced nuclear factor-kappaB activation in human bronchial epithelial cells involves the phosphorylation of glycogen synthase kinase 3beta." *Toxicol Lett* **187**(3): 194-200.
- Ma, Z., Dong, A., Fan, J., *et al.* (2007b). "Does sleeve lobectomy concomitant with or without pulmonary artery reconstruction (double sleeve) have favorable results for non-small cell lung cancer compared with pneumonectomy? A meta-analysis." *Eur J Cardiothorac Surg* **32**(1): 20-28.
- Maiato, H. and Lince-Faria, M. (2010). "The perpetual movements of anaphase." *Cell Mol Life Sci* **67**(13): 2251-2269.
- Maiato, H., Sampaio, P., Lemos, C. L., *et al.* (2002). "MAST/Orbit has a role in microtubule-kinetochore attachment and is essential for chromosome alignment and maintenance of spindle bipolarity." *J Cell Biol* **157**(5): 749-760.
- Maiato, H., Sampaio, P. and Sunkel, C. E. (2004). "Microtubule-associated proteins and their essential roles during mitosis." *Int Rev Cytol* **241**: 53-153.
- Mao, L., Hruban, R. H., Boyle, J. O., *et al.* (1994). "Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer." *Cancer Res* **54**(7): 1634-1637.
- Mao, Y., Desai, A. and Cleveland, D. W. (2005). "Microtubule capture by CENP-E silences BubR1-dependent mitotic checkpoint signaling." *J Cell Biol* **170**(6): 873-880.
- Maresca, T. J. and Salmon, E. D. (2010). "Welcome to a new kind of tension: translating kinetochore mechanics into a wait-anaphase signal." *J Cell Sci* **123**(Pt 6): 825-835.
- Margolis, R. L. and Wilson, L. (1998). "Microtubule treadmill: what goes around comes around." *Bioessays* **20**(10): 830-836.
- Marsit, C. J., Zheng, S., Aldape, K., *et al.* (2005). "PTEN expression in non-small-cell lung cancer: evaluating its relation to tumor characteristics, allelic loss, and epigenetic alteration." *Hum Pathol* **36**(7): 768-776.
- Martins-de-Souza, D., Schmitt, A., Roder, R., *et al.* (2010). "Sex-specific proteome differences in the anterior cingulate cortex of schizophrenia." *J Psychiatr Res* **44**(14): 989-991.
- Mastrorade, D. N., McDonald, K. L., Ding, R., *et al.* (1993). "Interpolar spindle microtubules in PTK cells." *J Cell Biol* **123**(6 Pt 1): 1475-1489.
- Matter, K. and Balda, M. S. (2007). "Epithelial tight junctions, gene expression and nucleo-junctional interplay." *J Cell Sci* **120**(Pt 9): 1505-1511.
- Mayor, T., Meraldi, P., Stierhof, Y. D., *et al.* (1999). "Protein kinases in control of the centrosome cycle." *FEBS Lett* **452**(1-2): 92-95.
- Mazanetz, M. P. and Fischer, P. M. (2007). "Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases." *Nat Rev Drug Discov* **6**(6): 464-479.
- McDonald, H. B., Stewart, R. J. and Goldstein, L. S. (1990). "The kinesin-like ncd protein of *Drosophila* is a minus end-directed microtubule motor." *Cell* **63**(6): 1159-1165.

- McEwen, B. F., Heagle, A. B., Cassels, G. O., *et al.* (1997). "Kinetochore fiber maturation in PtK1 cells and its implications for the mechanisms of chromosome congression and anaphase onset." *J Cell Biol* **137**(7): 1567-1580.
- Mimori-Kiyosue, Y., Grigoriev, I., Sasaki, H., *et al.* (2006). "Mammalian CLASPs are required for mitotic spindle organization and kinetochore alignment." *Genes Cells* **11**(8): 845-857.
- Mishra, R. (2010). "Glycogen synthase kinase 3 beta: can it be a target for oral cancer." *Mol Cancer* **9**: 144.
- Mitchison, T. and Kirschner, M. (1984). "Dynamic instability of microtubule growth." *Nature* **312**(5991): 237-242.
- Mitchison, T. J. and Kirschner, M. W. (1985). "Properties of the kinetochore in vitro. I. Microtubule nucleation and tubulin binding." *J Cell Biol* **101**(3): 755-765.
- Mitsui, N., Inatome, R., Takahashi, S., *et al.* (2002). "Involvement of Fes/Fps tyrosine kinase in semaphorin3A signaling." *EMBO J* **21**(13): 3274-3285.
- Mizushima, Y. and Kobayashi, M. (1995). "Clinical characteristics of synchronous multiple lung cancer associated with idiopathic pulmonary fibrosis. A review of Japanese cases." *Chest* **108**(5): 1272-1277.
- Moeller, B. J., Richardson, R. A. and Dewhirst, M. W. (2007). "Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment." *Cancer Metastasis Rev* **26**(2): 241-248.
- Molina, J. R., Yang, P., Cassivi, S. D., *et al.* (2008). "Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship." *Mayo Clin Proc* **83**(5): 584-594.
- Mollinari, C., Kleman, J. P., Jiang, W., *et al.* (2002). "PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone." *J Cell Biol* **157**(7): 1175-1186.
- Monzo, M., Rosell, R., Felip, E., *et al.* (1999). "A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers." *J Clin Oncol* **17**(7): 2100-2104.
- Morfini, G., Szebenyi, G., Elluru, R., *et al.* (2002). "Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates kinesin light chains and negatively regulates kinesin-based motility." *EMBO J* **21**(3): 281-293.
- Motti, M. L., Califano, D., Baldassarre, G., *et al.* (2005). "Reduced E-cadherin expression contributes to the loss of p27kip1-mediated mechanism of contact inhibition in thyroid anaplastic carcinomas." *Carcinogenesis* **26**(6): 1021-1034.
- Mountain, C. F. (1997). "Revisions in the International System for Staging Lung Cancer." *Chest* **111**(6): 1710-1717.
- Muller-Sterl, W. (2008). "Bioquímica. Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida." *Ed. Reverte*.
- Muller, S. L., Portwich, M., Schmidt, A., *et al.* (2005). "The tight junction protein occludin and the adherens junction protein alpha-catenin share a common interaction mechanism with ZO-1." *J Biol Chem* **280**(5): 3747-3756.
- Musacchio, A. and Salmon, E. D. (2007). "The spindle-assembly checkpoint in space and time." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(5): 379-393.
- Nakata, K., Ujike, H., Sakai, A., *et al.* (2003). "The human dihydropyrimidinase-related protein 2 gene on chromosome 8p21 is associated with paranoid-type schizophrenia." *Biol Psychiatry* **53**(7): 571-576.
- Neef, R., Klein, U. R., Kopajtich, R., *et al.* (2006). "Cooperation between mitotic kinesins controls the late stages of cytokinesis." *Curr Biol* **16**(3): 301-307.

- Nguyen, D. X. and Massague, J. (2007). "Genetic determinants of cancer metastasis." Nat Rev Genet **8**(5): 341-352.
- Ni, M. H., Wu, C. C., Chan, W. H., *et al.* (2008). "GSK-3 mediates the okadaic acid-induced modification of collapsin response mediator protein-2 in human SK-N-SH neuroblastoma cells." J Cell Biochem **103**(6): 1833-1848.
- Nicklas, R. B. (1985). "Mitosis in eukaryotic cells: an overview of chromosome distribution." Basic Life Sci **36**: 183-195.
- Nicklas, R. B. (1997). "How cells get the right chromosomes." Science **275**(5300): 632-637.
- Nigg, E. A. (2002). "Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression?" Nat Rev Cancer **2**(11): 815-825.
- Nigg, E. A. (2007). "Centrosome duplication: of rules and licenses." Trends Cell Biol **17**(5): 215-221.
- Nishimura, T., Fukata, Y., Kato, K., *et al.* (2003). "CRMP-2 regulates polarized Numb-mediated endocytosis for axon growth." Nat Cell Biol **5**(9): 819-826.
- Ohe, Y., Ohashi, Y., Kubota, K., *et al.* (2007). "Randomized phase III study of cisplatin plus irinotecan versus carboplatin plus paclitaxel, cisplatin plus gemcitabine, and cisplatin plus vinorelbine for advanced non-small-cell lung cancer: Four-Arm Cooperative Study in Japan." Ann Oncol **18**(2): 317-323.
- Olmsted, J. B. (1986). "Microtubule-associated proteins." Annu Rev Cell Biol **2**: 421-457.
- Ong Tone, S., Dayanandan, B., Fournier, A. E., *et al.* (2010). "GSK3 regulates mitotic chromosomal alignment through CRMP4." PLoS One **5**(12): e14345.
- Ortiz, J., Funk, C., Schafer, A., *et al.* (2009). "Stu1 inversely regulates kinetochore capture and spindle stability." Genes Dev **23**(23): 2778-2791.
- Otterson, G., Lin, A. and Kay, F. (1992). "Genetic etiology of lung cancer." Oncology (Williston Park) **6**(9): 97-104, 107; discussion 108, 111-102.
- Pagaki, E., Patsouris, E., Gonidi, M., *et al.* (2010). "The value of E-cadherin/beta-catenin expression in imprints of NCSLC: relationship with clinicopathological factors." Diagn Cytopathol **38**(6): 419-424.
- Paganuzzi, M., Onetto, M., Marroni, P., *et al.* (2001). "Diagnostic value of CYFRA 21-1 tumor marker and CEA in pleural effusion due to mesothelioma." Chest **119**(4): 1138-1142.
- Pan, S. H., Chao, Y. C., Chen, H. Y., *et al.* (2010). "Long form collapsin response mediator protein-1 (LCRMP-1) expression is associated with clinical outcome and lymph node metastasis in non-small cell lung cancer patients." Lung Cancer **67**(1): 93-100.
- Paramasivam, M., Chang, Y. J. and LoTurco, J. J. (2007). "ASPM and citron kinase co-localize to the midbody ring during cytokinesis." Cell Cycle **6**(13): 1605-1612.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., *et al.* (2005). "Global cancer statistics, 2002." CA Cancer J Clin **55**(2): 74-108.
- Pass, H. I., Lott, D., Lonardo, F., *et al.* (2005). "Asbestos exposure, pleural mesothelioma, and serum osteopontin levels." N Engl J Med **353**(15): 1564-1573.
- Pereira, A., Doshen, J., Tanaka, E., *et al.* (1992). "Genetic analysis of a Drosophila microtubule-associated protein." J Cell Biol **116**(2): 377-383.
- Pereira, A. L., Pereira, A. J., Maia, A. R., *et al.* (2006). "Mammalian CLASP1 and CLASP2 cooperate to ensure mitotic fidelity by regulating spindle and kinetochore function." Mol Biol Cell **17**(10): 4526-4542.

- Perrotti, D. and Neviani, P. (2008). "Protein phosphatase 2A (PP2A), a drugable tumor suppressor in Ph1(+) leukemias." Cancer Metastasis Rev **27**(2): 159-168.
- Petratos, S., Li, Q. X., George, A. J., *et al.* (2008). "The beta-amyloid protein of Alzheimer's disease increases neuronal CRMP-2 phosphorylation by a Rho-GTP mechanism." Brain **131**(Pt 1): 90-108.
- Pohl, C. and Jentsch, S. (2008). "Final stages of cytokinesis and midbody ring formation are controlled by BRUCE." Cell **132**(5): 832-845.
- Potti, A., Mukherjee, S., Petersen, R., *et al.* (2006). "A genomic strategy to refine prognosis in early-stage non-small-cell lung cancer." N Engl J Med **355**(6): 570-580.
- Provencio, M., Sanchez, A., Garrido, P., *et al.* (2010). "New molecular targeted therapies integrated with radiation therapy in lung cancer." Clin Lung Cancer **11**(2): 91-97.
- Quinn, C. C., Chen, E., Kinjo, T. G., *et al.* (2003). "TUC-4b, a novel TUC family variant, regulates neurite outgrowth and associates with vesicles in the growth cone." J Neurosci **23**(7): 2815-2823.
- Rath, U., Rogers, G. C., Tan, D., *et al.* (2009). "The Drosophila kinesin-13, KLP59D, impacts Pacman- and Flux-based chromosome movement." Mol Biol Cell **20**(22): 4696-4705.
- Reissmann, P. T., Koga, H., Takahashi, R., *et al.* (1993). "Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in non-small-cell lung cancer. The Lung Cancer Study Group." Oncogene **8**(7): 1913-1919.
- Ren, X. D., Kiosses, W. B. and Schwartz, M. A. (1999). "Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton." EMBO J **18**(3): 578-585.
- Repetto, G., del Peso, A. and Zurita, J. L. (2008). "Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity." Nat Protoc **3**(7): 1125-1131.
- Richardson, G. E. and Johnson, B. E. (1993). "The biology of lung cancer." Semin Oncol **20**(2): 105-127.
- Rieder, C. L. (1990). "Formation of the astral mitotic spindle: ultrastructural basis for the centrosome-kinetochore interaction." Electron Microsc Rev **3**(2): 269-300.
- Rieder, C. L. and Salmon, E. D. (1994). "Motile kinetochores and polar ejection forces dictate chromosome position on the vertebrate mitotic spindle." J Cell Biol **124**(3): 223-233.
- Rodriguez, O. C., Schaefer, A. W., Mandato, C. A., *et al.* (2003). "Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis." Nat Cell Biol **5**(7): 599-609.
- Rogemond, V., Auger, C., Giraudon, P., *et al.* (2008). "Processing and nuclear localization of CRMP2 during brain development induce neurite outgrowth inhibition." J Biol Chem **283**(21): 14751-14761.
- Rogers, G. C., Rogers, S. L., Schwimmer, T. A., *et al.* (2004). "Two mitotic kinesins cooperate to drive sister chromatid separation during anaphase." Nature **427**(6972): 364-370.
- Rossi, G., Dalpra, L., Crosti, F., *et al.* (2008). "A new function of microtubule-associated protein tau: involvement in chromosome stability." Cell Cycle **7**(12): 1788-1794.
- Rouzaut, A., Lopez-Moratalla, N. and de Miguel, C. (2000). "Differential gene expression in the activation and maturation of human monocytes." Arch Biochem Biophys **374**(2): 153-160.

- Rubinfeld, B., Albert, I., Porfiri, E., *et al.* (1996). "Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly." Science **272**(5264): 1023-1026.
- Ruediger, R., Pham, H. T. and Walter, G. (2001). "Alterations in protein phosphatase 2A subunit interaction in human carcinomas of the lung and colon with mutations in the A beta subunit gene." Oncogene **20**(15): 1892-1899.
- Sablina, A. A. and Hahn, W. C. (2007). "The role of PP2A A subunits in tumor suppression." Cell Adh Migr **1**(3): 140-141.
- Samet, J. M., Humble, C. G. and Pathak, D. R. (1986). "Personal and family history of respiratory disease and lung cancer risk." Am Rev Respir Dis **134**(3): 466-470.
- Samuels, Y. and Velculescu, V. E. (2004). "Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers." Cell Cycle **3**(10): 1221-1224.
- Saurin, A. T., Durgan, J., Cameron, A. J., *et al.* (2008). "The regulated assembly of a PKCepsilon complex controls the completion of cytokinesis." Nat Cell Biol **10**(8): 891-901.
- Schiel, J. A. and Prekeris, R. (2010). "Making the final cut - mechanisms mediating the abscission step of cytokinesis." ScientificWorldJournal **10**: 1424-1434.
- Schmid, G., Strosznajder, J. B. and Wesierska-Gadek, J. (2006). "Interplay between the p53 tumor suppressor protein family and Cdk5: novel therapeutic approaches for the treatment of neurodegenerative diseases using selective Cdk inhibitors." Mol Neurobiol **34**(1): 27-50.
- Schwartzman, J. M., Sotillo, R. and Benezra, R. (2010). "Mitotic chromosomal instability and cancer: mouse modelling of the human disease." Nat Rev Cancer **10**(2): 102-115.
- Schweitzer, J. K. and D'Souza-Schorey, C. (2005). "A requirement for ARF6 during the completion of cytokinesis." Exp Cell Res **311**(1): 74-83.
- Sekido, Y., Umemura, S., Takekoshi, S., *et al.* (2003). "Heterogeneous gene alterations in primary breast cancer contribute to discordance between primary and asynchronous metastatic/recurrent sites: HER2 gene amplification and p53 mutation." Int J Oncol **22**(6): 1225-1232.
- Seve, P., Reiman, T. and Dumontet, C. (2010). "The role of betaIII tubulin in predicting chemoresistance in non-small cell lung cancer." Lung Cancer **67**(2): 136-143.
- Severin, F., Habermann, B., Huffaker, T., *et al.* (2001). "Stu2 promotes mitotic spindle elongation in anaphase." J Cell Biol **153**(2): 435-442.
- Sharma, M., Sharma, P. and Pant, H. C. (1999). "CDK-5-mediated neurofilament phosphorylation in SHSY5Y human neuroblastoma cells." J Neurochem **73**(1): 79-86.
- Sharp, D. J., Mennella, V. and Buster, D. W. (2005). "KLP10A and KLP59C: the dynamic duo of microtubule depolymerization." Cell Cycle **4**(11): 1482-1485.
- Sharp, D. J. and Rogers, G. C. (2004). "A Kin I-dependent Pacman-flux mechanism for anaphase A." Cell Cycle **3**(6): 707-710.
- Sharp, D. J., Rogers, G. C. and Scholey, J. M. (2000). "Cytoplasmic dynein is required for poleward chromosome movement during mitosis in Drosophila embryos." Nat Cell Biol **2**(12): 922-930.
- Shih, J. Y., Lee, Y. C., Yang, S. C., *et al.* (2003). "Collapsin response mediator protein-1: a novel invasion-suppressor gene." Clin Exp Metastasis **20**(1): 69-76.
- Shih, J. Y., Yang, S. C., Hong, T. M., *et al.* (2001). "Collapsin response mediator protein-1 and the invasion and metastasis of cancer cells." J Natl Cancer Inst **93**(18): 1392-1400.

- Shinkai-Ouchi, F., Yamakawa, Y., Hara, H., *et al.* (2010). "Identification and structural analysis of C-terminally truncated collapsin response mediator protein-2 in a murine model of prion diseases." Proteome Sci **8**: 53.
- Skibbens, R. V., Rieder, C. L. and Salmon, E. D. (1995). "Kinetochore motility after severing between sister centromeres using laser microsurgery: evidence that kinetochore directional instability and position is regulated by tension." J Cell Sci **108 (Pt 7)**: 2537-2548.
- Skibbens, R. V., Skeen, V. P. and Salmon, E. D. (1993). "Directional instability of kinetochore motility during chromosome congression and segregation in mitotic newt lung cells: a push-pull mechanism." J Cell Biol **122(4)**: 859-875.
- Sluder, G. and Nordberg, J. J. (2004). "The good, the bad and the ugly: the practical consequences of centrosome amplification." Curr Opin Cell Biol **16(1)**: 49-54.
- Small, J. V., Geiger, B., Kaverina, I., *et al.* (2002). "How do microtubules guide migrating cells?" Nat Rev Mol Cell Biol **3(12)**: 957-964.
- Smith, D. S., Greer, P. L. and Tsai, L. H. (2001). "Cdk5 on the brain." Cell Growth Differ **12(6)**: 277-283.
- Smith, D. S. and Tsai, L. H. (2002). "Cdk5 behind the wheel: a role in trafficking and transport?" Trends Cell Biol **12(1)**: 28-36.
- Smith, S. L., Bowers, N. L., Betticher, D. C., *et al.* (2005). "Overexpression of aurora B kinase (AURKB) in primary non-small cell lung carcinoma is frequent, generally driven from one allele, and correlates with the level of genetic instability." Br J Cancer **93(6)**: 719-729.
- Solomon, F., Magendantz, M. and Salzman, A. (1979). "Identification with cellular microtubules of one of the co-assembling microtubule-associated proteins." Cell **18(2)**: 431-438.
- Spiro, S. G., Tanner, N. T., Silvestri, G. A., *et al.* (2010). "Lung cancer: progress in diagnosis, staging and therapy." Respirology **15(1)**: 44-50.
- St Croix, B., Sheehan, C., Rak, J. W., *et al.* (1998). "E-Cadherin-dependent growth suppression is mediated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(KIP1)." J Cell Biol **142(2)**: 557-571.
- Stambolic, V. and Woodgett, J. R. (1994). "Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta in intact cells via serine 9 phosphorylation." Biochem J **303 (Pt 3)**: 701-704.
- Sun, T., Rodriguez, M. and Kim, L. (2009). "Glycogen synthase kinase 3 in the world of cell migration." Dev Growth Differ **51(9)**: 735-742.
- Sutherland, C., Leighton, I. A. and Cohen, P. (1993). "Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling." Biochem J **296 (Pt 1)**: 15-19.
- Suzuki, Y., Nakagomi, S., Namikawa, K., *et al.* (2003). "Collapsin response mediator protein-2 accelerates axon regeneration of nerve-injured motor neurons of rat." J Neurochem **86(4)**: 1042-1050.
- Swanton, C., Nicke, B., Schuett, M., *et al.* (2009). "Chromosomal instability determines taxane response." Proc Natl Acad Sci U S A **106(21)**: 8671-8676.
- Swatton, J. E., Sellers, L. A., Faull, R. L., *et al.* (2004). "Increased MAP kinase activity in Alzheimer's and Down syndrome but not in schizophrenia human brain." Eur J Neurosci **19(10)**: 2711-2719.
- Tahimic, C. G., Tomimatsu, N., Nishigaki, R., *et al.* (2006). "Evidence for a role of Collapsin response mediator protein-2 in signaling pathways that regulate the proliferation of non-neuronal cells." Biochem Biophys Res Commun **340(4)**: 1244-1250.

- Takakura, S., Kohno, T., Manda, R., *et al.* (2001). "Genetic alterations and expression of the protein phosphatase 1 genes in human cancers." Int J Oncol **18**(4): 817-824.
- Tanaka, F., Otake, Y., Nakagawa, T., *et al.* (2001). "Prognostic significance of polysialic acid expression in resected non-small cell lung cancer." Cancer Res **61**(4): 1666-1670.
- Tanaka, K. and Terasaki, T. (2002). "Immunocytochemical expression of microtubule-associated protein-2 (MAP-2) in small cell lung cancer cell lines with neuronal-like processes." Jpn J Cancer Res **93**(6): 699-705.
- Tanaka, T., Serneo, F. F., Tseng, H. C., *et al.* (2004). "Cdk5 phosphorylation of doublecortin ser297 regulates its effect on neuronal migration." Neuron **41**(2): 215-227.
- Tanaka, T. U., Stark, M. J. and Tanaka, K. (2005). "Kinetochore capture and bi-orientation on the mitotic spindle." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(12): 929-942.
- Tanenbaum, M. E., Galjart, N., van Vugt, M. A., *et al.* (2006). "CLIP-170 facilitates the formation of kinetochore-microtubule attachments." EMBO J **25**(1): 45-57.
- Thompson, S. L., Bakhoum, S. F. and Compton, D. A. (2010). "Mechanisms of chromosomal instability." Curr Biol **20**(6): R285-295.
- Thompson, S. L. and Compton, D. A. (2008). "Examining the link between chromosomal instability and aneuploidy in human cells." J Cell Biol **180**(4): 665-672.
- Thompson, S. L. and Compton, D. A. (2010). "Proliferation of aneuploid human cells is limited by a p53-dependent mechanism." J Cell Biol **188**(3): 369-381.
- Tighe, A., Ray-Sinha, A., Staples, O. D., *et al.* (2007). "GSK-3 inhibitors induce chromosome instability." BMC Cell Biol **8**: 34.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.
- Toyoshima, F., Matsumura, S., Morimoto, H., *et al.* (2007). "PtdIns(3,4,5)P3 regulates spindle orientation in adherent cells." Dev Cell **13**(6): 796-811.
- Travis, W. D., Colby, T. V. and Corrin, B. (1999). Histological typing of lung and pleural tumors. Berlin, Springer-Verlag.
- Tripathi, B. K. and Zelenka, P. S. (2009). "Cdk5-dependent regulation of Rho activity, cytoskeletal contraction, and epithelial cell migration via suppression of Src and p190RhoGAP." Mol Cell Biol **29**(24): 6488-6499.
- Tsou, M. F. and Stearns, T. (2006). "Mechanism limiting centrosome duplication to once per cell cycle." Nature **442**(7105): 947-951.
- Tzima, E., Kiosses, W. B., del Pozo, M. A., *et al.* (2003). "Localized cdc42 activation, detected using a novel assay, mediates microtubule organizing center positioning in endothelial cells in response to fluid shear stress." J Biol Chem **278**(33): 31020-31023.
- Uchida, Y., Ohshima, T., Sasaki, Y., *et al.* (2005). "Semaphorin3A signalling is mediated via sequential Cdk5 and GSK3beta phosphorylation of CRMP2: implication of common phosphorylating mechanism underlying axon guidance and Alzheimer's disease." Genes Cells **10**(2): 165-179.
- Vader, G., Kauw, J. J., Medema, R. H., *et al.* (2006). "Survivin mediates targeting of the chromosomal passenger complex to the centromere and midbody." EMBO Rep **7**(1): 85-92.
- Valiron, O., Caudron, N. and Job, D. (2001). "Microtubule dynamics." Cell Mol Life Sci **58**(14): 2069-2084.

- van den Wildenberg, S. M., Tao, L., Kapitein, L. C., *et al.* (2008). "The homotetrameric kinesin-5 KLP61F preferentially crosslinks microtubules into antiparallel orientations." *Curr Biol* **18**(23): 1860-1864.
- Varrin-Doyer, M., Vincent, P., Cavagna, S., *et al.* (2009). "Phosphorylation of collapsin response mediator protein 2 on Tyr-479 regulates CXCL12-induced T lymphocyte migration." *J Biol Chem* **284**(19): 13265-13276.
- Vincent, P., Collette, Y., Marignier, R., *et al.* (2005). "A role for the neuronal protein collapsin response mediator protein 2 in T lymphocyte polarization and migration." *J Immunol* **175**(11): 7650-7660.
- Virshup, D. M. and Shenolikar, S. (2009). "From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover." *Mol Cell* **33**(5): 537-545.
- Vischioni, B., Oudejans, J. J., Vos, W., *et al.* (2006). "Frequent overexpression of aurora B kinase, a novel drug target, in non-small cell lung carcinoma patients." *Mol Cancer Ther* **5**(11): 2905-2913.
- Vonlanthen, S., Heighway, J., Tschan, M. P., *et al.* (1998). "Expression of p16INK4a/p16alpha and p19ARF/p16beta is frequently altered in non-small cell lung cancer and correlates with p53 overexpression." *Oncogene* **17**(21): 2779-2785.
- Vousden, K. H. and Lu, X. (2002). "Live or let die: the cell's response to p53." *Nat Rev Cancer* **2**(8): 594-604.
- Vuaillet, C., Varrin-Doyer, M., Bernard, A., *et al.* (2008). "High CRMP2 expression in peripheral T lymphocytes is associated with recruitment to the brain during virus-induced neuroinflammation." *J Neuroimmunol* **193**(1-2): 38-51.
- Wagner, U., Utton, M., Gallo, J. M., *et al.* (1996). "Cellular phosphorylation of tau by GSK-3 beta influences tau binding to microtubules and microtubule organisation." *J Cell Sci* **109** (Pt 6): 1537-1543.
- Wakefield, J. G., Stephens, D. J. and Tavare, J. M. (2003). "A role for glycogen synthase kinase-3 in mitotic spindle dynamics and chromosome alignment." *J Cell Sci* **116**(Pt 4): 637-646.
- Walker, R. A., Salmon, E. D. and Endow, S. A. (1990). "The Drosophila claret segregation protein is a minus-end directed motor molecule." *Nature* **347**(6295): 780-782.
- Wang, J., Lee, J. J., Wang, L., *et al.* (2004). "Value of p16INK4a and RASSF1A promoter hypermethylation in prognosis of patients with resectable non-small cell lung cancer." *Clin Cancer Res* **10**(18 Pt 1): 6119-6125.
- Wang, S. S., Esplin, E. D., Li, J. L., *et al.* (1998). "Alterations of the PPP2R1B gene in human lung and colon cancer." *Science* **282**(5387): 284-287.
- Watanabe, T., Noritake, J., Kakeno, M., *et al.* (2009). "Phosphorylation of CLASP2 by GSK-3beta regulates its interaction with IQGAP1, EB1 and microtubules." *J Cell Sci* **122**(Pt 16): 2969-2979.
- Weir, B. A., Woo, M. S., Getz, G., *et al.* (2007). "Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma." *Nature* **450**(7171): 893-898.
- Weir, B. S. (2007). "Estimating the recombination parameter: a commentary on 'Estimating the recombination parameter of a finite population model without selection' by Richard R. Hudson." *Genet Res* **89**(5-6): 425-426.
- Weisenberg, R. C. (1972). "Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentrations." *Science* **177**(54): 1104-1105.
- Weisenberg, R. C. and Deery, W. J. (1976). "Role of nucleotide hydrolysis in microtubule assembly." *Nature* **263**(5580): 792-793.

- Welcker, M., Singer, J., Loeb, K. R., *et al.* (2003). "Multisite phosphorylation by Cdk2 and GSK3 controls cyclin E degradation." Mol Cell **12**(2): 381-392.
- Wen, Y., Eng, C. H., Schmoranzler, J., *et al.* (2004). "EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration." Nat Cell Biol **6**(9): 820-830.
- Werner, M., Munro, E. and Glotzer, M. (2007). "Astral signals spatially bias cortical myosin recruitment to break symmetry and promote cytokinesis." Curr Biol **17**(15): 1286-1297.
- Westermann, S. and Weber, K. (2003). "Post-translational modifications regulate microtubule function." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(12): 938-947.
- Whitehead, T. P., Kricka, L. J., Carter, T. J., *et al.* (1979). "Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory." Clin Chem **25**(9): 1531-1546.
- Wikman, H., Nymark, P., Vayrynen, A., *et al.* (2005). "CDK4 is a probable target gene in a novel amplicon at 12q13.3-q14.1 in lung cancer." Genes Chromosomes Cancer **42**(2): 193-199.
- Winther, B. and Reubsaet, J. L. (2007). "Determination of the small cell lung cancer associated biomarker pro-gastrin-releasing peptide (ProGRP) using LC-MS." J Sep Sci **30**(2): 234-240.
- Wittmann, T. and Waterman-Storer, C. M. (2001). "Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way?" J Cell Sci **114**(Pt 21): 3795-3803.
- Wittmann, T. and Waterman-Storer, C. M. (2005). "Spatial regulation of CLASP affinity for microtubules by Rac1 and GSK3beta in migrating epithelial cells." J Cell Biol **169**(6): 929-939.
- Wong, C. C. and Leung, M. S. (2001). "Effects of neonatal hypothyroidism on the expressions of growth cone proteins and axon guidance molecules related genes in the hippocampus." Mol Cell Endocrinol **184**(1-2): 143-150.
- Woodgett, J. R. (2001). "Judging a protein by more than its name: GSK-3." Sci STKE **2001**(100): re12.
- Wordeman, L. and Cande, W. Z. (1987). "Reactivation of spindle elongation in vitro is correlated with the phosphorylation of a 205 kd spindle-associated protein." Cell **50**(4): 535-543.
- Wu, C. C., Chen, H. C., Chen, S. J., *et al.* (2008). "Identification of collapsin response mediator protein-2 as a potential marker of colorectal carcinoma by comparative analysis of cancer cell secretomes." Proteomics **8**(2): 316-332.
- Wu, G. P., Ba, J., Zhao, Y. J., *et al.* (2007). "Diagnostic value of CEA, CYFRA 21-1, NSE and CA 125 assay in serum and pleural effusion of patients with lung cancer." Acta Cytol **51**(4): 679-680.
- Yang, P., Bamlet, W. R., Sun, Z., *et al.* (2005). "Alpha1-antitrypsin and neutrophil elastase imbalance and lung cancer risk." Chest **128**(1): 445-452.
- Yasufuku, K. and Fujisawa, T. (2007). "Staging and diagnosis of non-small cell lung cancer: invasive modalities." Respirology **12**(2): 173-183.
- Yildirim, A., Meral, M., Kaynar, H., *et al.* (2007). "Relationship between serum levels of some acute-phase proteins and stage of disease and performance status in patients with lung cancer." Med Sci Monit **13**(4): CR195-200.
- Yoshida, H., Watanabe, A. and Ihara, Y. (1998). "Collapsin response mediator protein-2 is associated with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease." J Biol Chem **273**(16): 9761-9768.
- Yoshimura, T., Kawano, Y., Arimura, N., *et al.* (2005). "GSK-3beta regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity." Cell **120**(1): 137-149.

- Yu, Z., Kryzer, T. J., Griesmann, G. E., *et al.* (2001). "CRMP-5 neuronal autoantibody: marker of lung cancer and thymoma-related autoimmunity." Ann Neurol **49**(2): 146-154.
- Yuasa-Kawada, J., Suzuki, R., Kano, F., *et al.* (2003). "Axonal morphogenesis controlled by antagonistic roles of two CRMP subtypes in microtubule organization." Eur J Neurosci **17**(11): 2329-2343.
- Yvon, A. M., Walker, J. W., Danowski, B., *et al.* (2002). "Centrosome reorientation in wound-edge cells is cell type specific." Mol Biol Cell **13**(6): 1871-1880.
- Zakowski, M. F. (2003). "Pathology of small cell carcinoma of the lung." Semin Oncol **30**(1): 3-8.
- Zhang, D., Rogers, G. C., Buster, D. W., *et al.* (2007a). "Three microtubule severing enzymes contribute to the "Pacman-flux" machinery that moves chromosomes." J Cell Biol **177**(2): 231-242.
- Zhang, J., Li, H., Yabut, O., *et al.* (2010). "Cdk5 suppresses the neuronal cell cycle by disrupting the E2F1-DP1 complex." J Neurosci **30**(15): 5219-5228.
- Zhang, Z., Majava, V., Greffier, A., *et al.* (2009). "Collapsin response mediator protein-2 is a calmodulin-binding protein." Cell Mol Life Sci **66**(3): 526-536.
- Zhang, Z., Ottens, A. K., Sadasivan, S., *et al.* (2007b). "Calpain-mediated collapsin response mediator protein-1, -2, and -4 proteolysis after neurotoxic and traumatic brain injury." J Neurotrauma **24**(3): 460-472.
- Zheng, H., Saito, H., Masuda, S., *et al.* (2007). "Phosphorylated GSK3beta-ser9 and EGFR are good prognostic factors for lung carcinomas." Anticancer Res **27**(5B): 3561-3569.
- Zhou, J., Jensen, S. M., Steinberg, S. M., *et al.* (1996). "Expression of early lung cancer detection marker p31 in neoplastic and non-neoplastic respiratory epithelium." Lung Cancer **14**(1): 85-97.
- Zochbauer-Muller, S., Gazdar, A. F. and Minna, J. D. (2002). "Molecular pathogenesis of lung cancer." Annu Rev Physiol **64**: 681-708.
- Zukerberg, L. R., Patrick, G. N., Nikolic, M., *et al.* (2000). "Cables links Cdk5 and c-Abl and facilitates Cdk5 tyrosine phosphorylation, kinase upregulation, and neurite outgrowth." Neuron **26**(3): 633-646.
- Zumbrunn, J., Kinoshita, K., Hyman, A. A., *et al.* (2001). "Binding of the adenomatous polyposis coli protein to microtubules increases microtubule stability and is regulated by GSK3 beta phosphorylation." Curr Biol **11**(1): 44-49.

Anexos

ANEXO I: CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS TUMORES EPITELIALES MALIGNOS DE PULMÓN ^a

1. Carcinoma de células escamosas.

- Papilar.
- Células claras.
- Células pequeñas.
- Basaloides.

2. Adenocarcinoma.

- Acinar.
- Papilar.
- Carcinoma bronquioloalveolar.
 - No mucinoso.
 - Mucinoso.
 - Mucinoso y no mucinoso mixto o de tipo celular indeterminado.
- Adenocarcinoma sólido con mucina.
- Adenocarcinoma con subtipos mixtos.
- Variantes.
 - Adenocarcinoma fetal bien diferenciado.
 - Adenocarcinoma mucinoso (coloide).
 - Cistoadenocarcinoma mucinoso.
 - Adenocarcinoma de células en anillo de sello.
 - Adenocarcinoma de células claras.

3. Carcinoma de células grandes.

- Variantes.
 - Carcinoma neuroendocrino de células grandes.
 - Carcinoma neuroendocrino de células grandes combinado.
 - Carcinoma basaloide.
 - Carcinoma semejante a linfoepitelioma.
 - Carcinoma de células claras.
 - Carcinoma de células grandes con fenotipo rabdoide.

4. Carcinoma adenoescamoso.

5. Carcinoma con elementos pleomórficos, sarcomatoides o sarcomatosos.

- Carcinoma de células fusiformes o gigantes.
- Carcinoma fusiforme.
- Carcinoma de células gigantes.
- Carcinosarcoma.
- Blastoma pulmonar.

6. Tumor carcinoide.

- Carcinoide típico.
- Carcinoide atípico.

7. Carcinoma de tipo de glándulas salivales.

- Carcinoma mucoepidermoide.
- Carcinoma quístico adenoide.
- Otros.

8. Carcinoma no clasificado.

^aTravis *et al.* 1999

**ANEXO II: ESTADIFICACIÓN DEL CÁNCER DE PULMÓN NO
MICROCÍTICO SEGÚN EL SISTEMA TNM**

Tabla A-1. Grupos de estadio/factor pronóstico anatómico^a

Carcinoma oculto	TX	N0	M0
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio IA	T1a	N0	M0
	T1b	N0	M0
Estadio IB	T2a	N0	M0
Estadio IIA	T2b	N0	M0
	T1a	N1	M0
	T1b	N1	M0
	T2a	N1	M0
Estadio IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Estadio IIIA	T1a	N2	M0
	T1b	N2	M0
	T2a	N2	M0
	T2b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
Estadio IIIB	T1a	N3	M0
	T1b	N3	M0
	T2a	N3	M0
	T2b	N3	M0
	T3	N3	M0
	T4	N2	M0
	T4	N3	M0
Estadio IV	Cualquier T	Cualquier N	M1a
	Cualquier T	Cualquier N	M1b

Tabla A-2: Tumor primario (T)^a

TX	No se puede evaluar el tumor primario, o el tumor se prueba mediante la presencia de células malignas en el esputo o lavados bronquiales pero sin visualización mediante imaginología o broncoscopia.
T0	No hay pruebas de tumor primario.
Tis	Carcinoma in situ.
T1	Tumor ≤ 3 cm en su mayor dimensión, rodeado por el pulmón o pleura visceral, sin pruebas mediante broncoscopia de invasión más proximal que el lóbulo bronquial (es decir, no en el bronquio principal). ^b
T1a	Tumor ≤ 2 cm en su mayor dimensión.
T1b	Tumor > 2 cm pero ≤ 3 en su mayor dimensión.
T2	Tumor > 3 cm pero ≤ 7 cm o tumor con cualquiera de las siguientes características (tumores T2 con estas características son clasificados T2a si son de ≤ 5 cm):
	Compromete los bronquios principales.
	≥ 2 cm a distancia de la carina.
	Compromete la pleura visceral (PL1 o PL2).
	Relacionado con la atelectasis o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hiliar pero que no compromete todo el pulmón.
T2a	Tumor > 3 cm ≤ 5 cm en su mayor dimensión.
T2b	Tumor > 5 cm pero ≤ 7 cm en su mayor dimensión.
T3	Tumor > 7 cm o que directamente invade uno de los siguientes:
	Pared torácica parietal pleural (PL3) (incluye tumores del sulco superior), diafragma, nervio frénico, pleura mediastínica, pericardio parietal.
	Tumor en el bronquio principal (< 2 cm de distancia a la carina ^b pero sin comprometer la carina).
	Atelectasia relacionada o neumonitis obstructiva de todo el pulmón o nódulos tumorales separados en el mismo lóbulo.
T4	Tumor de cualquier tamaño que invade cualquiera de lo siguiente:
	Mediastino, corazón, vasos grandes, tráquea, nervio laríngeo recurrente, esófago, cuerpo vertebral, carina, nódulo tumoral separado en un lóbulo ipsilateral diferente.

^b La diseminación superficial de un tumor de cualquier tamaño con su componente invasivo limitado a la pared bronquial, que podría extenderse de manera proximal al bronquio principal, también se clasifica como T1a.

Tabla A-3. Ganglios linfáticos regionales (N)^a

NX	Los ganglios linfáticos regionales no se pueden evaluar.
N0	No hay metástasis a ganglios linfáticos regionales.
N1	Metástasis en los ganglios linfáticos ipsilaterales peribronquiales o ipsilares hiliares y nódulos intrapulmonares, incluyendo un compromiso por extensión directa.
N2	Metástasis en los ganglios linfáticos ipsilateral mediastínicos o subcarinos.
N3	Metástasis en los ganglios linfáticos contralaterales mediastínicos, contralateral hilar, ipsilateral o contralateral escaleno, o supraclavicular.

Tabla A-4. Metástasis distante (M)^a

M0	No hay metástasis a distancia.
M1	Metástasis a distancia.
M1a	Nódulos tumorales separados en un lóbulo contralateral o un tumor con nódulos pleurales o efusión pleural maligna (o pericárdica). ^b
M1b	Metástasis a distancia.

^b La mayoría de las efusiones pleurales (y pericárdicas) con cáncer de pulmón se deben a un tumor. En algunos pacientes, sin embargo, los exámenes citopatológicos múltiples de los líquidos pleurales o (pericárdicos) son tumoralmente negativos, y los líquidos no contienen sangre y no es un exudado. Si bien estos elementos y juicios clínicos dictan que las efusiones no se relacionan con el tumor, las efusiones se deben excluir como elemento de estadificación, y el paciente se debe clasificar como M0.

^a Reproducido con permiso del AJCC: Lung. En: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al., eds.: AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010, pp 253–70.

ANEXO III: COMPOSICIÓN DE LAS SOLUCIONES UTILIZADAS

PBS 1X

137 mM NaCl
2.7 mM KCl
10 mM Na₂HPO₄
1.8 mM KH₂PO₄
pH 7.4

TBS 1X

Proteína	Tris/HCl	pH	NaCl	Tween-20
CRMP-2 (C4G)	25mM	7,4	200 mM	0,1 %
CRMP-2 P (3F4)	25mM	7,4	200 mM	0,1 %
CRMP-2 S522	50mM	7,5	150 mM	0,1 %
CRMP-2 T509/T514	50mM	7,5	150 mM	0,1 %
GSK-3 β P	10mM	8	150 mM	0,05 %
Akt	20mM	7,6	137 mM	0,1 %
Akt-P	20mM	7,6	137 mM	0,1 %
Caspasa-3 activa	20mM	7,6	137 mM	0,1 %
PARP	20mM	7,6	137 mM	0,1 %
V5	10mM	8	137 mM	0,05 %
β -actina	20mM	7,6	137 mM	0,1 %

Solución gel inferior o de resolución 4X

Tris-HCl 1,5M pH=8,8

Solución gel superior o de compactación 4X

Tris-HCl 0,5M pH=6,8

Tampón de electroforesis

Tris 0,025 pH=8,3; 192mM Glicina; 0,1% SDS

Tampón de transferencia

Tris 0,025 pH=8,3; 192mM Glicina; 20%V/V Metanol

TAE 50X

2 M Tris-acético
0.05 M EDTA, pH 8
10% Ácido acético glacial

Tampón RIPA para extracción de proteínas

PBS 1X 98%
SDS 0,1%
NP-40 1%
Deoxicolato sódico 0,5%

Tampón de carga reductor

Tris-HCl 0,125M pH=6.8
SDS 4%
Glicerol 20%
B-Mercaptoetanol 10%
Azul de Bromofenol 0,0125%