

**UNIVERSIDAD DE CANTABRIA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
INSTITUTO DE BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA
DE CANTABRIA
(IBBTEC)**



**Ras en el Complejo de Golgi:
Señales antitumorales mediadas por PTPK**

**Ras at Golgi Complex:
PTPK-mediated antitumor signals**

Tesis Doctoral presentada por
Iñaki Jiménez Gómez
para optar al Grado de Doctor en
Biología Molecular y Biomedicina
por la Universidad de Cantabria
Mayo 2017
Santander

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

CERTIFICA:

Que Iñaki Jiménez Gómez ha realizado bajo su dirección el presente trabajo de Tesis Doctoral titulado:

**RAS EN EL COMPLEJO DE GOLGI:
SEÑALES ANTITUMORALES MEDIADAS POR PTPK**

**RAS AT GOLGI COMPLEX:
PTPK-MEDIATED ANTITUMOR SIGNALS**

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

Y para que conste y surta los efectos oportunos, expide el presente certificado en Santander, a 12 de mayo de 2017.

Fdo. Piero Crespo Baraja

El presente trabajo ha sido realizado en el Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC) y el Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria (Santander).

El autor de esta Tesis ha disfrutado de una beca de Formación del Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Economía y Competitividad durante el período de realización de la misma.

Para mis padres

AGRADECIMIENTOS

Tras un primer intento fallido en 2009: cuatro años, cinco meses y doce días de doctorado. Hoy, unos cuantos borradores después, he conseguido terminar la tesis. Y se me vienen a la cabeza multitud de buenos momentos, demasiado buenos como para dejarlos escapar así sin más, sin dar antes las gracias:

Al Dr. Piero Crespo, por abrirme las puertas de su laboratorio, por brindarme la oportunidad de hacer ciencia al más alto nivel de exigencia, por obligarme cada día a ser mejor en mi trabajo. Pertenecer a su grupo no solo me ha permitido cumplir mi gran sueño de estudiante, sino que también me ha servido para evolucionar como profesional. Y, por qué no decirlo, también como persona.

Thanks to Dr. Adam Hursltone's group as well, which gave me the opportunity to stay there, and to live one of the most amazing experience I have ever had in my life. Especially, thanks to Andy, for introducing me in the CRISPr/Cas9 system, and for crazy afterworks. Raghavendar Nagaraju, my friend and teacher: Next time I see you, we have to play cricket again. I'll do it better than the first time, I promise. I couldn't forget either my favorite "alcarreña". Thanks a lot for showing me the fascinating world of ZebraFish. I wish you the best in your new adventure. And finally, my dear Jorge Barriuso, you have been one of the Most Valuable Players in this match. Without your help, I may don't have any thesis. And that's something I'll never forget. It has been a pleasure to meet all of you guys, I'll see you as soon as possible.

A todo el IBBTEC, desde los jefes de grupo hasta los becarios y técnicos, pasando por la gente de administración. Porque si hacer ciencia en España supone siempre una batalla constante; echar a andar un Instituto, solo es posible con el mejor de los ejércitos. Porque tras cuatro años pidiendo favores sin una mala contestación, ¿qué menos? Quisiera dar las gracias especialmente a Rocío "SP6". Te ha tocado siempre aguantarme de primera mañana, cuando mi hiperactividad resulta más agobiante, y nunca ni una mala cara. A mis queridos genéticos de la vieja escuela: Mapi, Ruli, Carlos, Ana... que grandes momentos a la hora de comer. ¡Qué conversaciones! Sin duda, todos fueron contingentes, pero vosotros fuisteis necesarios. A la Srta. Zunzunegui, eres una autentica crack, y lo sabes. Mira a ver si sacas un hueco que ya va tocando volver a La Viesca. Siempre serás "mi entrenadora a este lado del Besaya". Y como no, a la Srta. Castillo, como voy a extrañar nuestros piques...

y tus magdalenas. Muchísimas gracias por estar siempre que lo he necesitado, siempre al otro lado del pasillo.

Tampoco quisiera pasar por alto a mis queridos vecinos de inmunología. En primer lugar, al Dr. Ramón Merino, por convertir su laboratorio en un refugio lejos del mundanal ruido. A Juan Jesús, alias “Juanje”, también conocido como “JJ”, progenitor de “JJJ” ... si es que el que vale, vale. Muchas gracias por tus visitas a horas intempestivas. Ahora mismo sería incapaz de recordar una sola en la que no acabásemos muertos de la risa. A Iván, mi “cuñado en la sombra”, por ser el compañero de laboratorio que durante mucho tiempo no tuve. A estas alturas, ya te he cogido aprecio y hasta te paso por alto tu afición al Real Madrid. Por supuesto a Pilar, mi querida 3'14. Mi sufrida “compi” del CSIC. Ha costado, pero ya lo tenemos. En cuanto pasen unos días, volvemos al “Woodstock” y arreglamos el país. Y avisa a Luis que venga, que alguien tendrá que pagar jeje. De verdad, sois geniales. Y dar las gracias también a los que se han ido, o a los que no han podido venir. Sí, Aramburu, me refiero a ti ¿no pensarías que me iba a olvidar? Desde el minuto 1 me caíste genial, una pena que no te hayan dejado traerte el citómetro. A Thais, a Ferchu, a Maigüi... ¿qué sería de “Los Piero” sin las locas visitas de los “inmunólogos”? Y por supuesto al Dr. Iglesias, el personaje más dicharachero de Gordaliza del Pino, “epicentro del amor”. Tu marcha marcó el principio del fin. Ese momento en el que todo doctorando se da cuenta de que las tesis se acaban, la gente se marcha, y ya nada vuelve a ser lo mismo. Un fuerte abrazo compadre.

Y si hay un laboratorio por el que creo que me he pasado al menos una vez al día durante todos estos años, ése es sin duda el “laboratorio de Bioquímica”. Mi más sincero agradecimiento al Dr. Javier León, la Dra. Dolores Delgado y el Dr. José Carlos Rodríguez por haberme dado siempre la confianza para poder entrar en su laboratorio casi como si fuera el mío. Y sobre todo agradecerles el haber contado siempre con gente tan especial. Algunos hace tiempo que marcharon: Manu, Gabi, Bolado, Javitxu, Mañica, Cortiguera... y dejo puntos suspensivos, no vaya a ser que me haya dejado a alguien en el tintero. Otras, se quedan guardando el fuerte. Rosa, muchas gracias por echarme una mano siempre que lo he necesitado. Y si alguna vez te vuelve a sobrar un disfraz, ya sabes que yo reciclo. Lorena, ¿qué va a ser de mi lejos de Potes? Espero que puedas disfrutar por muchos años de Liébana, yo seguiré siendo fan desde la distancia. Judith, algún día volveré a las clases de swing, así que vete pensando un pase nuevo. Ester, mucho ánimo que eres la siguiente. Dejo en tus manos el Guava Nexin, nos vemos por tu labo a eso de las 18:00h. Y, por último, pero sin duda la más importante, mi compañera de fatigas. Lu, ahora sí que sí. ¡¡Ya no nos queda nada!! Ha sido un placer compartir contigo todos estos años. Ya puedes ir buscando

un piso con sofá cómodo, y un pub con buenos nachos por Temple Bar, que en cuanto te descuides me tienes en Dublín. Por qué no te pienses que te vas a librar tan fácilmente de mí, esto es un “See you later alligator”

Y como no, a “Los Piero”. Mis COMPAÑEROS de laboratorio, así con mayúsculas. Porque si sacar una tesis adelante ya resulta duro, no me quiero ni imaginar cómo hubiese sido sin el buen rollo que siempre he tenido con mis compañeros. A Ali, apenas hemos coincidido un par de meses y ya te debo unos cuantos favores, muchas gracias. A Yaiza, llegaste cuando yo ya empezaba a estar “pretésico” y no nos hemos visto mucho. Una pena que no hayamos podido seguir con las clases de euskera. En todo caso, *Eskerrik Asco*. Disfruta de la experiencia y mucha suerte con medicina, aunque sé que no la necesitarás. A Ana Barruel, ahora ya sí que sí, esto es oficial. Tú no lo sabes, pero mi madre se llama M^a Carmen. Me encanta tu actitud, pero ten cuidado; porque cuando termine la numeración, sin darte cuenta habrá amanecido. Nos queda un concierto pendiente. Il mio compare Vincenzo, non so come mi ha fatto piacere al vostro arrivo in laboratorio. Non ho dubbi che andrai grande a Santander. Si sono lasciati solo al pericolo, ma si sa, dove sto sempre un amico. A mi querida Morante del Toboso, ¿qué te voy a decir que no te haya dicho ya a lo largo de estos años? Yo ahora tengo que coger un avión, pero siempre nos quedará Tanos. Ni sabía de su existencia antes de venirme para Cantabria, pero ya nunca lo abandonaré... Hay quien se vuelve chiflado haciendo una tesis, nosotros vinimos así de casa. Muchas gracias por compartir tu locura. A Rocío, “nuestra” Rocío, la famosa “Dra. García”, mi “San Romaniana” favorita. Nos ha tocado compartir muchas horas dentro y fuera del laboratorio. Hemos tenido tiempo para llegar a conocernos bien. Eres de esas personas que te hacen un favor incluso antes de que se lo pidas, siempre pensando en los demás. No cambies, tú y yo sabemos cuál es la recompensa. Mándale un abrazo a Diego. A la Dra. Casar, la STV que todo laboratorio en Cantabria debiera tener. Muchas gracias Berti por dejarme entrar en tu apasionante mundo de la PTPK, me lo he pasado “de muerte”. He aprendido muchísimo contigo, a cambio, ambos sabemos que te acordarás de mí cada vez que veas una moderna. Y no podría olvidarme de mis antiguos compañeros del “zulo”. A Chipy, por nuestros piques futboleros. A mi paisano Pinto, por tantos viajes a la “tierrina”. A Ana Herrero “Cuchillo de Palo”, que tanto me ha ayudado en el tramo final de la tesis. Y a Javi Rodríguez “Chanante”, por el último de una larga lista de favores. Mirad a ver si aguantáis en Edimburgo hasta que pueda volver a ahorrar, que me dejé un cómic sin terminar en casa y cualquier excusa puede ser buena para haceros otra visita. Y no podría olvidarme de Pau, mi compi de poyata, mi “Paulin Chen”. Muchísimas gracias de todo corazón por haber estado siempre ahí en los malos momentos. Ni te imaginas cuánto te he echado de menos. Algún día, te explicaré “How

I wish You were here". Y, obviamente, me gustaría dar las gracias a la persona que me ha aguantado desde el primer al último día. Querida Lorena, podría darte las gracias por haber sido la persona que se encargó de enseñarme en los primeros meses, si es que algún día has dejado de hacerlo. O podría decirte lo genial que ha sido tenerte siempre en la poyata de al lado. Pero parecería que tú y yo sólo hemos sido compañeros de trabajo, y eso no te haría justicia. Querida Lorena, gracias por tantos y tantos momentos; por Mari, por Antonio, y ahora por Carlos. Porque siento que, en Cantabria, he tenido la mejor familia adoptiva. Con todo mi corazón, gracias.

Y como dicen que no sólo de pan vive el hombre, siento que habría de darle las gracias a todas aquellas personas que, si bien no han aportado nada desde un punto de vista científico, han hecho posible esta tesis. A JR, a Rosana, a Kitos, a David, a Lydia, a Kevin, a Viti... porque esta tesis es la prueba: ¡¡Claro que Podemos!! A mi gran colonia astur-cántabra. Porque gracias a vosotros, "aquí" y "allí" aún hoy siguen siendo términos extraños. A Pau y Berni, mis profes favoritos, sabéis que siempre os seguiré allá donde os mande el Ministerio. Me acordaré de vosotros cada vez que disfrute de una buena parrillada. A Verata, por haberme aguantado como amiga, y también por haberme acogido bajo tu techo. Y a Toño: Oh Toño, oh Toño mío... Mi primer compañero de prácticas, ¡y aún seguimos vivos! Puede que este sistema te haya privado de hacer una tesis, pero siempre podrás contar con el mayor de mis respetos. Y a tantos otros, que no han podido estar en el día a día, pero que me han dado las fuerzas necesarias para seguir adelante. A "la gente de los bancos". A los colegas del barrio. A mis compañeros "Indignados". A los "koreanos de Avilés, siderúrgicos altivos". Y a ti, bixejo. Por lo que me has apoyado en estos últimos meses, y por la que se te viene encima...

Finalmente, dar las gracias a lo más grande en mi vida, a los imprescindibles, a mi familia. A mi sobrina Mar, aún eres muy pequeña para comprender lo que estas líneas significan, pero esta tesis no hubiera sido posible sin el mejor de mis regalos. A mi cuñado "Pove". Te conocí un día friendo patatas, y acabamos compartiendo andamio. Contigo he ganado un "hermano". A mi hermana "Roci", los que nos conocen lo saben: No existen folios en el mundo para describir lo que tú y yo nos queremos. Hemos pasado muchas cosas juntos. Pero no te preocupes, que lo mejor aún está por llegar. Y a mis padres. Porque con la exigencia del doctorado, hay días en los que uno pudiera pensar que no hay cosa más importante en la vida. Pero, para mí, existe un título que merece mucho más la pena. Por haber sido mi veleta y mi motor, seréis siempre mi legítimo tribunal. Orgulloso de ser vuestro hijo, os dedico esta tesis. Y os doy las gracias una y mil veces, sabiendo que vosotros ya me habéis aprobado...

i. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
Arg (A)	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	Nucleótido trifosfato de Adenina
Bp	Par de bases nitrogenadas
BSA	Albúmina de suero bovino
CAAX	Secuencia de aminoácidos: Cisteína-Alifático-Alifático-Cualquiera
CAM	Moléculas de Adhesión Celular
CS	Suero de ternera
C-terminal	Carboxilo-terminal
Cys (C)	Cisteína
DAG	Diacilglicerol
DMEM	Medio esencial mínimo de Eagle, modificado por Dulbecco/Vogt
DMSO	Dimetil sulfóxido
DSPs	Fosfatasa de especificidad dual
DTT	Dithiothreitol
ECL	Quimioluminiscencia ampliada
EDTA	N´N´N´N´-Etilen-diamino tetra- acetato disódico
EGTA	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i>
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico

ER	Retículo endoplásmico
ERK	<i>Extracellular regulated kinase</i>
ESTs	<i>Expressed sequence tags</i>
FNIII	Dominio Fibronectina III
GAP	Proteínas activadoras de la actividad GTPasa
GC	Complejo de Golgi
GDP	Nucleótido bifosfato de guanina
GEF	Factor de intercambio de nucleótidos
Gln (Q)	Glutamina
Glu (E)	Ácido Glutámico
Gly (G)	Glicina
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G heterotriméricas
Grb2	Proteína de unión a receptores de factores de crecimiento
GRF	<i>Guanine nucleotide releasing factor</i>
GRP	<i>Guanyl releasing factor</i>
GST	<i>Glutathione S-transferase</i>
GTP	Nucleótido trifosfato de guanina
GTPasa	Proteína con capacidad intrínseca de catalizar la hidrólisis de GTP
HA	Hemaglutinina
His (H)	Histidina
HVR	Región hipervariable de Ras
IF	Inmunofluorescencia
Ig	Inmunoglobulina
JNK	Quinasa amino-terminal de c-Jun
kb	Kilobase

kDa	Kilodalton
KO	<i>Knockout</i>
KSR	<i>Kinase supresor of Ras</i>
LB	Medio de Luria-Bertani
LPA	Ácido lisofosfatídico
mA	mili-Amperios
MAM	Dominio “ M eprin, A 5 (neuropilina), PTP mu ”
MAPK (MK)	Proteína quinasa activada por mitógenos
MAPKK (MKK)	Quinasa que fosforila MAPK
MAPKKK (MKKK)	Quinasa que fosforila MAPKK
MBP	Proteína básica de mielina
MEK	Quinasa de MAPK/ERK
MEF	Fibroblasto embrionario de ratón
MKPs	Fosfatasa inhibidora de las MAPKs
MP1	Proteína <i>scaffold</i> : <i>MEK partner 1</i>
N-terminal	Amino-terminal
NES	Señal de exportación nuclear
NF1	Neurofibromina 1
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i> o Factor de crecimiento nervioso
NLS	Señal de localización nuclear
NP-40	<i>Nonidet-40</i>
NRPTPs	Proteína tirosina fosfatasas de tipo no receptor
PAE	Producto intracelular de la proteólisis de PTPK
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAK1	<i>p21 activated kinase</i>

PBS	Solución salina tamponada de fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD	<i>Pull down</i>
Phe (F)	Fenilalanina
PI3K	Fosfatidil-inositol 3 quinasa
PIC	<i>phosphatase intracelular portion</i>
PKA	Proteína quinasa dependiente de AMP cíclico
PKC	Proteína quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PM	Membrana Plasmática
Pro (P)	Prolina
PS1	Preselina-1
PSTPs	Proteínas serina/threonina fosfatasas
PTKs	Proteína Tirosina Quinasas
PTPs	Proteína Tirosina Fosfatasas
PTPK	Proteína Tirosina Fosfatasa Kappa
R2B	RPTPs subtipo IIb
RBD	<i>Ras Binding Domain</i> o dominio de unión a Ras
REM	<i>Ras Exchange Motif</i>
rpm	Revoluciones por minuto
RPTPs	Receptores Proteína Tirosina Fosfatasas
RSK	Quinasas que fosforilan a la proteína ribosomal S6
RTK	Receptores con actividad tirosina quinasa
SDS	Dodecil sulfato sódico
Ser (S)	Serina

Sef	<i>Similar expression of FGF protein</i>
SF	Suero fetal bovino
SH2	<i>Src homology 2</i>
Sos	<i>Son of sevenless</i>
ST	<i>Starved</i> (privación de suero)
STA	<i>Staurosporine</i>
TAE	<i>Tris-acetate-EDTA</i>
TBS-T	Salino tamponado con Tris-Tween
TCF	Factor de transcripción de las células T
Thr (T)	Treonina
Tm	Temperatura <i>melting</i> o unión de oligonucleotidos
Tyr (Y)	Tirosina
UV	Ultravioleta
V	Voltios
Val	Valina
WB	<i>Western blot</i>
wt	<i>Wild type</i> o forma salvaje de una proteína

ii. ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
1.- LA SEÑALIZACIÓN CELULAR	3
2.- QUINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAPKs)	5
2.1.- PROTEÍNAS MAPKs	5
2.2.- CLASIFICACIÓN MAPKs	6
2.3.- VÍAS DE SEÑALIZACIÓN POR MAPKs	8
2.4.- RUTA DE SEÑALIZACIÓN RAS-ERK	9
2.5.- REGULACIÓN DE LA RUTA RAS-ERK	12
3.- PROTEÍNAS TIROSINA FOSFATASAS	16
3.1.- SUPERFAMILIA PTPs	16
3.2.- FAMILIA PTPs “CLÁSICAS”	18
3.3.- SUBFAMILIA RPTPs SUBTIPO IIB (R2B)	20
3.4.- PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASA KAPPA (PTPK)	24
4.- PROTEÍNAS RAS	27
4.1.- SUPERFAMILIA PROTEÍNAS RAS	27
4.1.1.- DESCRIPCIÓN GENERAL	27
4.1.2.- ESTRUCTURA GENERAL	27
4.1.3.- CICLO DE ACTIVACIÓN	28
4.1.4.- CLASIFICACIÓN	30
4.2.- SUBFAMILIA PROTEÍNAS RAS	33
4.2.1.- DESCRIPCIÓN GENERAL	33
4.2.2.- ESTRUCTURA GENERAL	33
4.2.3.- MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES	34
4.2.4.- SUBLOCALIZACIÓN CELULAR	37
4.2.5.- CICLO DE ACTIVACIÓN	39
4.2.6.- REGULACIÓN SITO-ESPECÍFICA	42
4.2.7.- RUTAS EFECTORAS	43
4.2.8.- POTENCIAL ONCOGÉNICO SITO-ESPECÍFICO	45
4.2.2.- REGULACIÓN SITO-ESPECÍFICA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	46
II. OBJETIVOS	49
III. MATERIALES Y MÉTODOS	53
1.- ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DEL ADN	55
1.1.- PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO	55
1.2.- EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO A PARTIR DE EMBRIONES	56
1.3.- EXTRACCIÓN DE ARN A PARTIR DE EMBRIONES	56
1.4.- AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN POR PCR	57
1.5.- SÍNTESIS DE ARNm “in vitro”	58
1.6.- DIGESTIÓN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN Y PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN EN GELES DE AGAROSA	58
1.7.- CLONACIÓN DE ADN EN VECTORES PLASMÍDICOS	59
1.8.- PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN	60

2.- CULTIVOS CELULARES	61
2.1.- MÉTODOS DE TRANSFECCIÓN	61
2.1.1.- TRANSFECCIÓN CON LIPOFECTAMINA 2000.....	61
2.1.2.- TRANSFECCIÓN CON LIPOFECTAMINA 3000.....	62
2.2.- LÍNEAS CELULARES	63
2.3.- TRATAMIENTOS	64
3.- ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	64
3.1.- DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT	64
3.2.- DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOFUORESCENCIA	66
3.3.- DETECCICÓN DE PROTEÍNAS CO-INMUNOPRECIPITACIÓN	67
3.4.- FRACCIONAMIENTO SOLUBLE-PARTICULADO	67
3.5.- DETECCIÓN DE APOPTOSIS POR MARCAJE CON ANEXINA V	68
3.6.- OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	68
3.7.- ENSAYOS DE PULL-DOWN	69
3.7.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD QUINASA	70
3.8.- ANTICUERPOS	71
4.- MODELO DE PEZ ZEBRA	72
5.- ANÁLISIS INFORMÁTICO	72
5.1.- DIGITALIZACIÓN DE LOS WESTERN BLOT	72
5.2.- GRÁFICAS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	72
5.3.- ANÁLISIS DE INMUNOFUORESCENCIAS	73
5.4.- ANÁLISIS DE INMUNOFUORESCENCIAS	73
5.5.- BIBLIOGRAFÍA	73
IV. RESULTADOS	75
1.- H-RAS EN GC INDUCE APOPTOSIS	77
2.- CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS SEÑALES DE RAS EN GC	81
3.- PTPK MEDIA EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR RAS DESDE GC	85
4.- POTENCIAL ONCOGÉNICO SITO-ESPECÍFICO DE RAS EN PEZ ZEBRA ...	89
5.- VALIDACIÓN DEL PEZ ZEBRA COMO MODELO PARA PTPK	92
6.- PTPK CONTRARRESTA EL POTENCIAL DE H-RAS DESDE GC	96
7.- POTENCIAL ANTITUMORAL DE PTPK EN MELANOMA	98
V. DISCUSIÓN	101
1.- RAS EN GC INDUCE APOPTOSIS	103
2.- CARÁCTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS SEÑALES DE RAS EN GC	105
3.- INDUCCIÓN DE APOPTOSIS POR RAS DESDE GC	108
4.- MELANOMAGÉNESIS SITO-ESPECÍFICA EN PEZ ZEBRA	111
VI. CONCLUSIONES	115
VII. ABSTRACT	119
VIII. BIBLIOGRAFÍA	129

iii. LISTA DE FIGURAS

	Página
I. INTRODUCCIÓN	
Figura 1.1. Esquema simplificado de una ruta de señalización celular	3
Figura 1.2. Esquema de la integración de las diferentes rutas.....	4
Figura 1.3. Regulación proteica por fosforilación reversible	4
Figura 1.4. Clasificación de la familia de las MAPKs	5
Figura 1.5. Estructura de las MAPKs clásicas y atípicas.....	7
Figura 1.6. Principales vías de señalización mediadas por MAPKs.....	9
Figura 1.7. Representación simplificada de la ruta Ras-ERK	11
Figura 1.8. Regulación de la ruta Ras-ERK por <i>scaffolds</i>	14
Figura 1.9. Regulación espacial de la ruta Ras-ERK por <i>scaffolds</i>	15
Figura 1.10. Clasificación y dominios estructurales en las PTPs.....	17
Figura 1.11. Funciones principales de las PTPs “clásicas”	19
Figura 1.12. Estructura de las proteínas R2B.	20
Figura 1.13. Regulación de las uniones célula-célula por proteínas R2B	21
Tabla 1.1 Proteínas R2B y cáncer	23
Figura 1.14. Proteólisis de PTPK por furina	24
Figura 1.15. Proteólisis de PTPK por ADAM-10 y PS-1	26
Figura 1.16. Estructura del Dominio G	28
Figura 1.17. Ciclo de activación de las proteínas Ras GTPasas.....	30
Figura 1.18. Superfamilia de proteínas Ras.....	31
Figura 1.19. Extremo C-terminal de las proteínas Ras	34
Figura 1.20. Procesamiento postraduccional de las proteínas Ras	36
Figura 1.21. Sublocalizaciones de las proteínas Ras.....	39
Figura 1.22. Dominio G en proteínas Ras	40
Figura 1.23. Proteínas reguladoras de la activación de Ras	41
Figura 1.24. Complejo Ras/Ras-GAP.....	41
Figura 1.25. Moléculas efectoras de Ras.....	43
Figura 1.26. Rutas de señalización mediadas por las proteínas Ras	44
Figura 1.27. Sito-especificidad de las señales de Ras	45
Figura 1.28. Potencial oncogénico sito-específico de las proteínas Ras.....	46
Figura 1.29. Sito-especificidad y regulación transcripcional.....	47
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
Tabla 3.1. Cebadores para amplificación de ADN	57
Tabla 3.2. Plásmidos de expresión de proteínas	60
Tabla 3.3. Líneas celulares de experimentación	63
Tabla 3.4. Estímulos químicos utilizados	64
Tabla 3.5. Anticuerpos utilizados para la detección de proteínas.....	71

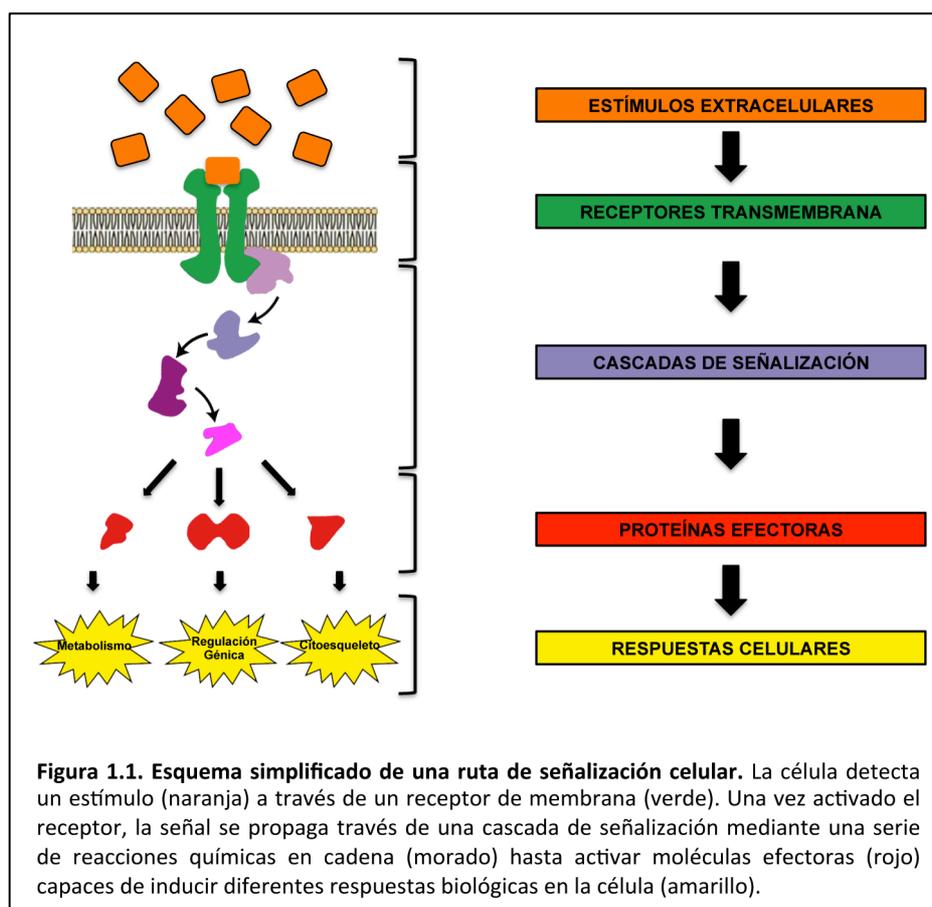
IV. RESULTADOS

Figura 4.1. Ras active en GC ejerce un impacto negative sobre la viabilidad celular.....	78
Figura 4.2. La activación de Ras en GC induce apoptosis.....	80
Figura 4.3. La activación de Ras en GC inhibe la fosforilación de ERK.....	82
Figura 4.4. Las señales inhibitorias de Ras emanan de CGN	83
Figura 4.5. H-Ras desde GC actúa vía Ral-GDS.	84
Figura 4.6. Ras activo en GC induce apoptosis vía PTPK.	86
Figura 4.7. PTPK induce apoptosis vía inhibición de ERK.	87
Figura 4.8. PTPK interacciona con C-RAF.....	88
Figura 4.9. Ras activado en GC no resulta oncogénico.....	90
Figura 4.10. Ras activado en GC induce apoptosis en células pigmentarias	91
Figura 4.11. La secuencia pronóstico de ADNc para PTPK en Pez Zebra está incompleta	93
Figura 4.12. Secuencia verificada de ADNc para PTPK en Pez Zebra.....	94
Figura 4.13. Estudio comparativo de PTPK en Danio rerio y Homo sapiens	95
Figura 4.14. PTPK regula la carcinogenesis inducida por H-Ras-V12 en Pez Zebra.	97
Figura 4.15. Ras desde GC induce la activación de ERK en ausencia de PTPK.....	98
Figura 4.16. PTPK reduce la melanomagénesis inducida por N-Ras-Q61L.	99

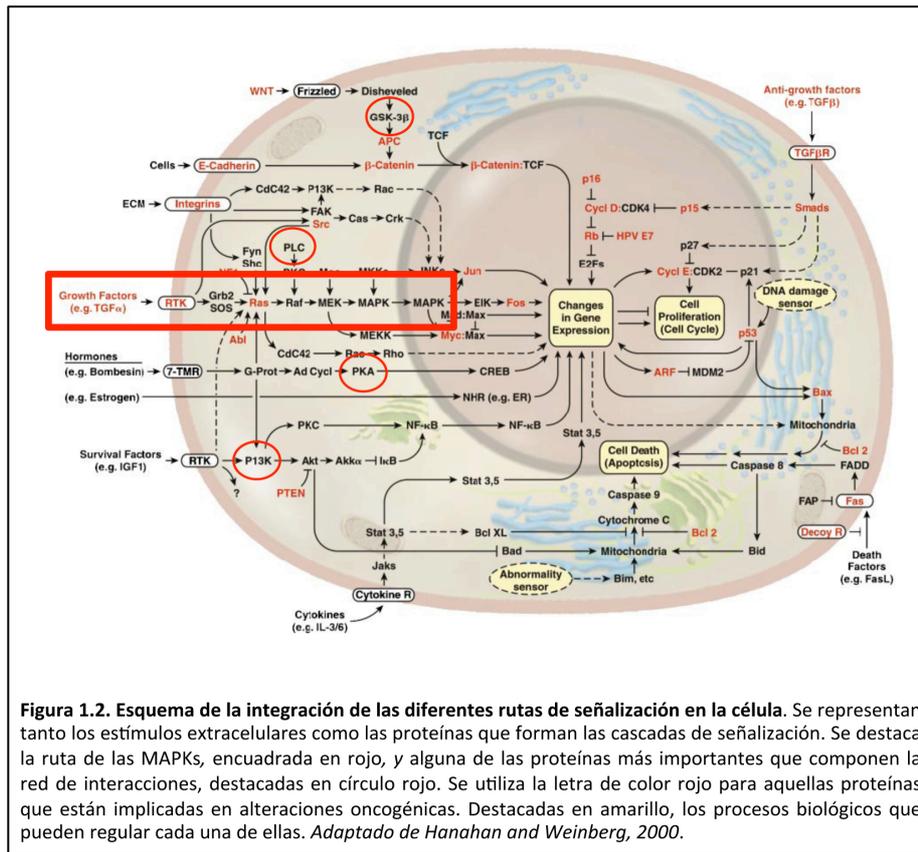
I. INTRODUCCIÓN

1. LA SEÑALIZACIÓN CELULAR

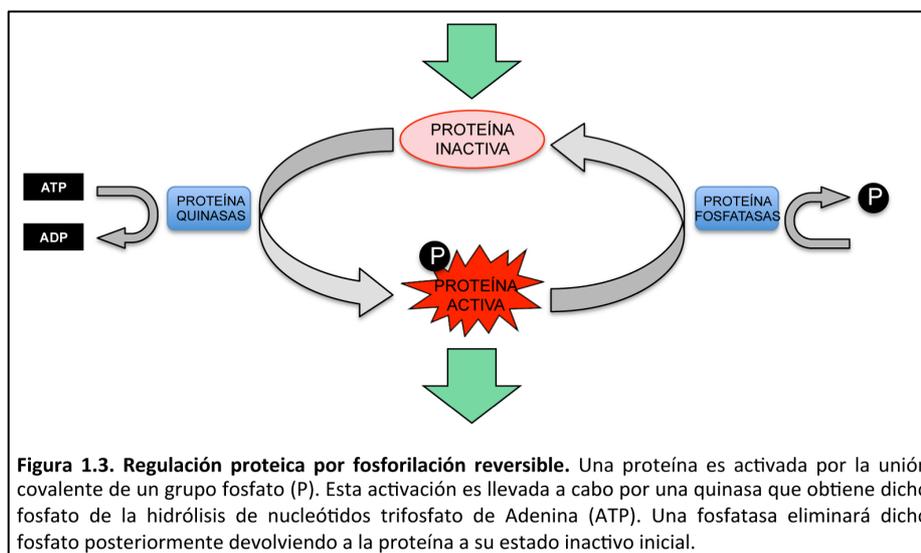
La capacidad para interpretar los diferentes estímulos recibidos del entorno, bien sean factores ambientales, bien señales procedentes de otras células, es una condición *sine qua non* para la supervivencia celular. El proceso mediante el cual estos estímulos son detectados y transformados en señales físico-químicas capaces de inducir una respuesta en la célula receptora, es definido con el término de señalización celular (Figura 1.1).



Esta respuesta biológica de las células diana a un entorno dinámico en constante cambio, está mediada por multitud de cascadas de señalización. Responsables de la transducción de señales extracelulares, conectan los receptores de membrana con el interior celular. Profusamente reguladas e interconectadas entre sí, estas rutas de señalización conforman una compleja red capaz de modular multitud de funciones celulares, tales como proliferación, diferenciación, supervivencia o muerte celular. (Jordan et al., 2000) (Figura 1.2).



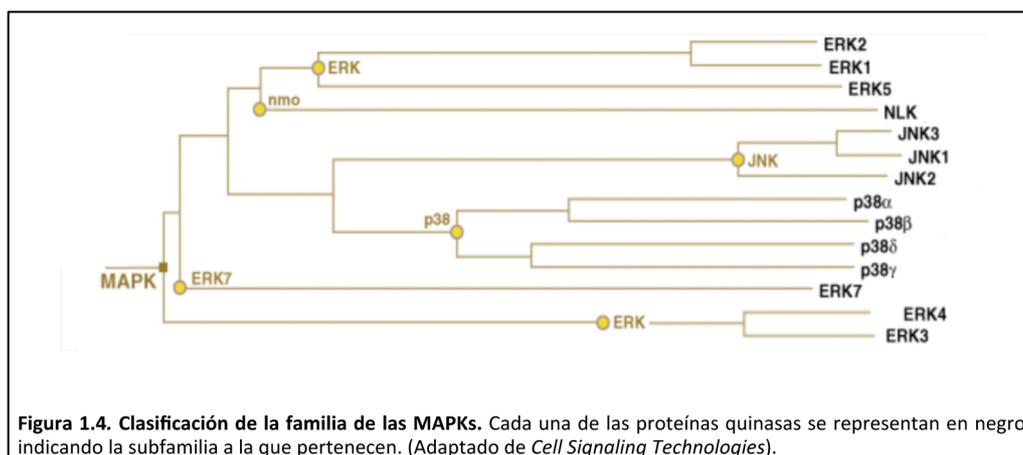
Para la mayoría de estas funciones celulares, la fosforilación reversible de proteínas es uno de los principales mecanismos de regulación. En el caso concreto de los mamíferos, se estima que un 30% de sus proteínas se encuentran covalentemente unidas a grupos fosfato. Quinasas y fosfatasa, son los dos grandes grupos de enzimas involucrados en estos ciclos de fosforilación reversible de proteínas implicadas en estos procesos de transducción de señales (Cohen, 2001) (Figura 1.3).



2. QUINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAPKs)

2.1. PROTEÍNAS MAPKs

La familia de las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), está constituida por un conjunto de proteínas con actividad serina/treonina quinasa. Altamente conservadas en plantas, hongos y animales; poseen la capacidad de transformar estímulos extracelulares en una gran variedad de respuestas biológicas (Pearson et al., 2001). Para su completa activación, las MAPKs requieren una doble fosforilación en residuos de treonina y tirosina localizados en el motivo regulador “TXY” común a todas las MAPKs (Payne et al., 1991; Robbins et al., 1993). Las MAPKs, una vez activas, pueden fosforilar residuos de serina y treonina que presenten una prolina en posición +1 (Clark-Lewis et al., 1991). Fueron descritas por primera vez gracias a su capacidad para fosforilar la proteína asociada a microtúbulos (MAP-2) en respuesta a insulina (Ray and Sturgill, 1988). Hoy en día se han identificado 14 genes en humanos que codifican para MAPKs (Coulombe and Meloche, 2007) (Figura 1.4).



2.2. CLASIFICACIÓN MAPKS

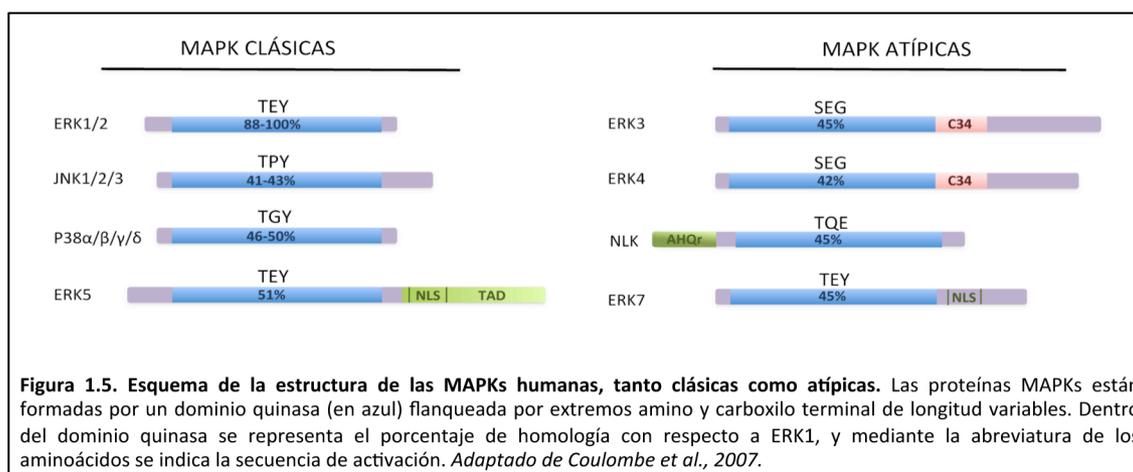
Existen cuatro subfamilias de MAPKs “clásicas”:

- **ERK1/2 (*Extracellular Regulated Kinases*):** Las quinasas ERK1 y ERK2 son los principales miembros de esta subfamilia, siendo ERK1 la primera MAPK descrita en mamíferos (Ray and Sturgill, 1988). Además, también se han descrito las isoformas ERK2b (Gonzalez et al., 1992), ERK1b (Yung et al., 2000) y ERK1c (Aebersold et al., 2004) generadas por procesamiento alternativo de los genes *erk1* y *erk2*. El motivo de fosforilación característico de esta subfamilia corresponde con la secuencia aminoacídica Thr-Glu-Tyr (TEY). Estas MAPKs, pueden ser activadas por diversos mitógenos dando lugar a una gran variedad de respuestas celulares (Johnson and Lapadat, 2002; Raman et al., 2007)
- **JNKs (*c-jun N-terminal kinases*):** También conocidas como SAPKs (*Stress Activated Protein Kinases*) por ser principalmente activadas en respuesta a estrés ambiental y estrés oxidativo, pueden responder también a citoquinas y ciertos ligandos de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (Bogoyevitch et al., 2010). Pertenecen a esta subfamilia 10 isoformas diferentes, como consecuencia del procesamiento alternativo de los genes *jnk1*, *jnk2* y *jnk3*. Con un motivo de fosforilación Thr-Pro-Tyr (TPY), activan principalmente sustratos implicados en regulación transcripcional. Pueden participar en diferentes respuestas celulares, juegan un papel especialmente importante en apoptosis e inflamación (Johnson and Lapadat, 2002; Raman et al., 2007).
- **P38 MAPK:** Compuesta por cuatro proteínas codificadas por los genes *p38α*, *p38β*, *p38γ*, *p38δ*; existen además otras isoformas generadas por procesado alternativo de *p38α* como CBSP1 (Lee et al., 1994), Mxi2 (Zervos et al., 1995) y Exip (Sudo et al., 2002). Con un dominio de activación Thr-Gly-Tyr (TGY), responden a estímulos de estrés ambiental como choques osmóticos o térmicos, así como a hormonas y citoquinas inflamatorias (Han et al., 1994; Lee et al., 1994; Rouse et al., 1994). Las proteínas que integran esta subfamilia están implicadas también en la inducción de apoptosis y en la regulación de la respuesta inmune. Así pues, existe un gran solapamiento entre las señales celulares vía p38 y la señalización mediada por JNK,

de manera que la mayoría de los estímulos que activan a la p38, estimulan igualmente a las proteínas JNK (Cuadrado and Nebreda, 2010; Martin-Blanco, 2000).

- **ERK5/BMK1 (*Big Mitogen-Activated Protein Kinase 1*):** Compuesta por tres isoformas, ERK5a, ERK5b y ERK5c, producto del procesado alternativo del gen *erk5* (Yan et al., 2001). Esta subfamilia de proteínas se activa como respuesta a diferentes mitógenos y factores de estrés, modulando el crecimiento y la diferenciación celular (Kamakura et al., 1999). Aunque comparten con ERK1/2 la secuencia de fosforilación (TEY), ERK5 no requiere estar activa para ser translocada a núcleo; pues presenta en su extremo C-terminal una secuencia de localización nuclear (Borges et al., 2007; Buschbeck and Ullrich, 2005; Raviv et al., 2004).

Además de las clásicas MAPKs profusamente descritas, existen otras MAPKs menos conocidas. Dentro de este grupo de quinasas atípicas, encontramos, por ejemplo, proteínas con un solo residuo de fosforilación, como en el caso de NLK (*Nemo Like Kinase*) (Brott et al., 1998); u otras constitutivamente activas como ERK4/5 (Deleris et al., 2008) (Figura 1.5).



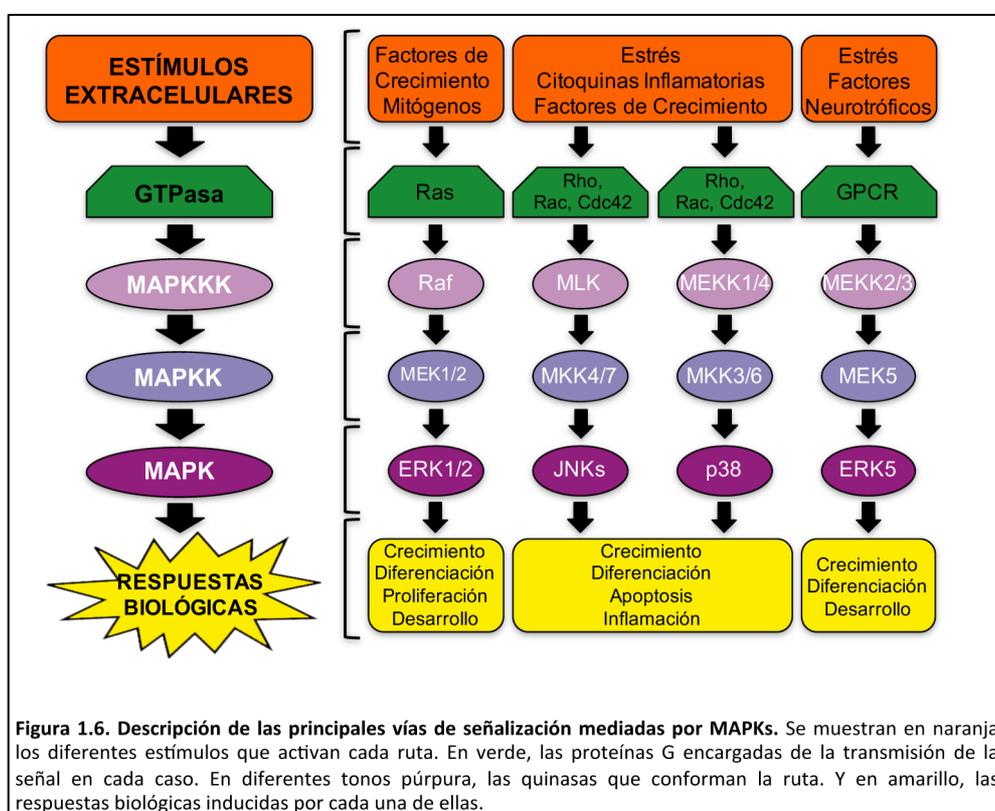
2.3. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN MEDIADAS POR MAPKS

Las proteínas MAPKs, forman parte de cascadas de señalización. Estas vías de señalización pueden dividirse, a su vez, en dos fases. En un primer momento, la señalización ocurre a nivel de membrana plasmática (PM), donde factores de crecimiento estimulan receptores específicos capaces de inducir la activación de unas proteínas G de las que hablaremos más adelante. Es entonces cuando estas proteínas, en una segunda fase ya citosólica, proceden a la estimulación de la ruta de las MAPKs propiamente dicha. Compuesta generalmente por tres o más quinasas dispuestas de manera concatenada, nos encontramos de este modo con una proteína quinasa (MAPK), a su vez fosforilada por una proteína MAPK quinasa (MAPKK), fosforilada igualmente por una proteína MAPKK quinasa (MAPKKK).

Las proteínas MAPKKK, también denominadas MEKK o MKKK, son el primer elemento de estas rutas de señalización. Proteínas ser/thr quinasa con una gran variabilidad estructural entre sus miembros, poseen motivos de regulación diferentes al resto de los integrantes de la cascada. Dentro de este grupo de quinasas, destacan las proteínas RAF, MEKK y MLK. Una vez activas, las MAPKKK activan mediante fosforilación a sus MAPKK efectoras con una gran especificidad.

Las MAPKK, MEK o MKKs; son enzimas de especificidad dual, con capacidad para fosforilar tanto residuos de ser/thr como residuos de tirosina. Sin embargo, estas proteínas presentan una gran especificidad por sus efectores, fosforilando solamente una, o unas pocas MAPK, y siempre en los motivos específicos de fosforilación (TXY). Obviando las MAPKK menos conocidas, generadas por procesamiento alternativo, pertenecen a este grupo 7 proteínas bien caracterizadas, cada una de ellas con sustratos específicos. Así pues, mientras que MEK1 y MEK2, también conocidas como MKK1/2, son capaces de activar ERK1/2 (Errede and Levin, 1993; Pelech and Sanghera, 1992); MKK3 y MKK6 activan a las proteínas p38 (Raugeaud et al., 1996); MKK7 fosforila JNK (Fleming et al., 2000); y MKK5 activa específicamente ERK5 (Zhou et al., 1995). Por último, la proteína MKK4, es capaz de fosforilar igualmente tanto a p38, así como a JNK (Derijard et al., 1995).

Una vez fosforiladas en su dominio regulador (TXY), las MAPK activas ya están disponibles para interactuar con distintos sustratos (Robbins et al., 1993). Distribuidos por diferentes sublocalizaciones celulares, se han encontrado efectores de MAPK tanto dispersos por el citoplasma, así como en membranas, mitocondrias, complejo de Golgi (GC), Retículo Endoplásmico (ER) y núcleo (Yao and Seger, 2009; Yoon and Seger, 2006). Sea como fuere, finalmente la señal llegará al núcleo donde, a través de factores de transcripción o moléculas remodeladoras de la cromatina, las MAPK regulan la expresión génica dando lugar a un amplio espectro de respuestas biológicas (Clark et al., 2009; Whitmarsh, 2007) (Figura 1.6).



2.4. RUTA DE SEÑALIZACIÓN RAS-ERK

Una de las vías de señalización celular mejor caracterizadas hasta la fecha, considerada prototipo de las cascadas de señalización, es la activación de la ruta de ERK promovida por las proteínas Ras. Las proteínas Ras, conforman una subfamilia de proteínas G de la que hablaremos minuciosamente más adelante, puesto que jugarán un papel central en este trabajo. A la hora de valorar la relevancia fisiológica de esta vía de señalización, parece suficiente con analizar los efectos dramáticos que conlleva su

desregulación. De este modo, la aparición en cáncer humano de mutaciones no solapantes en los componentes de esta ruta ha sido descrita en casi un 50% de los casos (Roberts and Der, 2007) (Figura 1.7). Así mismo, existen sobradas evidencias experimentales que demuestran la importancia de esta ruta en la iniciación y progresión del cáncer. De este modo, existen numerosos estudios que describen procesos de transformación inducida por mutantes activos de Ras, Raf y MEK en diferentes tipos celulares. Además, tanto estudios genéticos como farmacológicos han demostrado que estas señales son indispensables para la viabilidad de diferentes tipos celulares tumorales (Karnoub and Weinberg, 2008). Finalmente, la importancia de esta ruta también ha sido puesta de manifiesto en diferentes modelos animales de tumorigénesis in vivo (Karreth and Tuveson, 2009).

Existen multitud de estímulos extracelulares capaces de activar la ruta Ras-ERK a través, principalmente, de receptores con actividad tirosina quinasa (RTKs). Además, las proteínas Ras también pueden ser activadas por otros tipos de receptores, como pueden ser los receptores asociados a proteínas G heterotriméricas (GPCRs). No obstante, se ha demostrado que, en algunos casos, esta activación viene a su vez inducida por la transactivación previa de RTKs (Downward, 2003). Así pues, tras la unión a sus respectivos ligandos, los RTKs de membrana forman dímeros, lo que induce la autofosforilación en residuos de tirosina. Esta autofosforilación, es la que finalmente activa los RTKs haciendo posible la interacción con los dominios SH2 de la proteína adaptadora Grb2 (Growth-factor-receptor-bound protein 2). Igualmente, Grb2 posee además dominios SH3, a través de los cuales, interacciona con el factor de intercambio de nucleótidos Sos. De este modo, la unión de Grb2 a RTKs redirige las proteínas Sos a localizaciones próximas a membrana, donde es capaz de inducir la activación de Ras (Figura 1.7).

Esta forma activa de Ras, unida a GTP, es la responsable de retener a Raf en la PM favoreciendo su activación a través de proteínas serina-treonina y tirosina quinasas (Moodie et al., 1993; Vojtek et al., 1993; Warne et al., 1993; Zhang et al., 1993). De este modo, da comienzo una ruta de proteínas MAPKs donde como ya hemos visto, una MAPKKK, que en este caso será RAF, activa a las MAPKK duales MEK1 y MEK2 (Howe et al., 1992). Finalmente, son MEK1/2 quienes fosforilan a las proteínas quinasas activadas por mitógenos ERK1 y ERK2 (Errede and Levin, 1993; Pelech and Sanghera, 1992). En

condiciones de reposo, ERK1/2 se encuentran recluidas en el citoplasma como consecuencia de la interacción con múltiples proteínas citoplasmáticas. Una vez fosforiladas, las proteínas ERK pierden la afinidad por estos anclajes y son liberadas al citosol, donde pueden permanecer e interactuar con sustratos citoplasmáticos, o ser translocadas al núcleo. Se ha estimado que una vez activas, las moléculas de ERK se reparten a partes iguales entre ambas sublocalizaciones (Reszka et al., 1995). De hecho, prácticamente la mitad de las más de 180 proteínas identificadas como sustrato de ERK, son proteínas no nucleares (Yoon and Seger, 2006). De este modo, cuando es translocado al núcleo, ERK regula la transcripción y la replicación del ADN, la remodelación de la cromatina y la síntesis de miRNA (Marais et al., 1993; Paroo et al., 2009; Robinson and Cobb, 1997); mientras que desde citoplasma participa directamente en funciones celulares tales como la formación de contactos célula-matriz o uniones adherentes, el tráfico de endosomas o la resistencia a apoptosis (Ajenjo et al., 2004; Fincham et al., 2000; Glading et al., 2001; Teis et al., 2006).

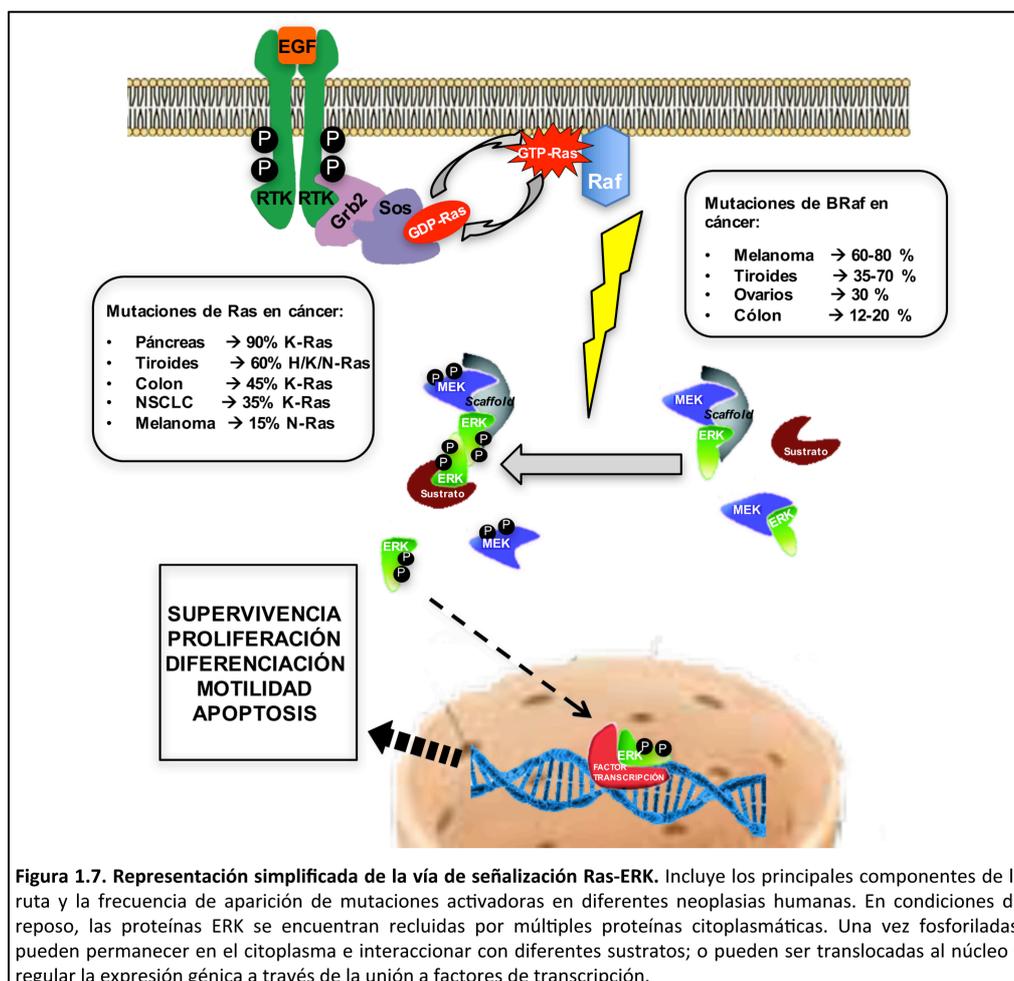


Figura 1.7. Representación simplificada de la vía de señalización Ras-ERK. Incluye los principales componentes de la ruta y la frecuencia de aparición de mutaciones activadoras en diferentes neoplasias humanas. En condiciones de reposo, las proteínas ERK se encuentran recluidas por múltiples proteínas citoplasmáticas. Una vez fosforiladas, pueden permanecer en el citoplasma e interactuar con diferentes sustratos; o pueden ser translocadas al núcleo y regular la expresión génica a través de la unión a factores de transcripción.

2.5. REGULACIÓN DE LA RUTA RAS-ERK

Como cabría esperar, dado su papel central dentro del complejo entramado de rutas que regulan la señalización celular en eucariotas; una exquisita regulación de la ruta Ras-ERK resulta imprescindible desde un punto de vista fisiológico. Sin embargo, al contrario de lo que se pudiera pensar, nuestro conocimiento sobre los mecanismos moleculares responsables de la regulación de esta cascada de señalización, se encuentra todavía en una fase muy inicial.

Como ya hemos mencionado anteriormente, existen en la célula proteínas fosfatasas capaces de revertir las reacciones de fosforilación mediadas por las diferentes quinasas que integran esta ruta. De este modo, entre las señales activadoras mediadas por quinasas y las defosforilaciones inhibitoras mediadas por proteínas fosfatasas; se genera un equilibrio dinámico capaz de modular, tanto la intensidad, como la amplitud de las señales (Hornberg et al., 2005). En función de los residuos que son capaces de defosforilar, las fosfatasas se dividen en dos grandes superfamilias: proteína-serina/treonina-fosfatasas (PSTPs) y proteína-tirosina-fosfatasas (PTPs).

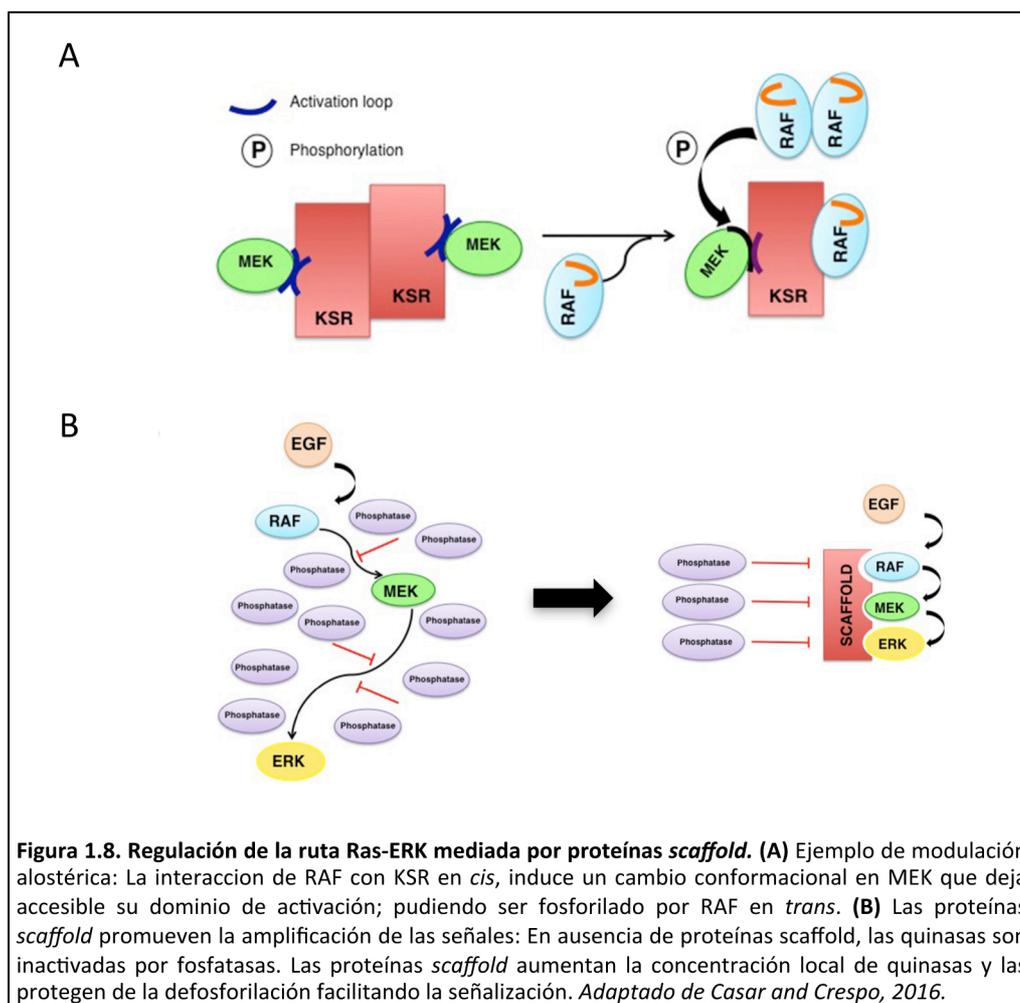
Por norma general, las PSTPs aparecen formando parte de complejos multiméricos holoenzimáticos compuestos por la interacción de un amplio espectro de subunidades catalíticas y reguladoras. Gracias a la variedad de combinaciones posibles, estos holoenzimas presentan una gran especificidad en cuanto a sustratos y localización celular se refiere (Wang et al., 2008). Si bien esta superfamilia de fosfatasas no suele jugar un papel protagonista en la regulación de la ruta Ras-ERK, al menos dos miembros (PP2A y PP2C) son capaces de defosforilar los residuos de treonina del dominio de activación de ERK; contribuyendo así a la regulación, tanto del crecimiento como de la división celular (Saxena and Mustelin, 2000).

Para la eliminación de grupos fosfato unidos a residuos de tirosina, la célula cuenta, como ya hemos dicho anteriormente, con la superfamilia de las PTPs. Dentro de esta superfamilia, existen dos familias de enzimas especialmente relevantes para el caso que nos ocupa: las “fosfatasas clásicas específicas para tirosina” (PTPs) y las “fosfatasas con especificidad dual” (DSPs) (Tonks, 2006). Curiosamente, mientras que existen numerosos estudios de investigación en torno a la función de las DSPs, las PTPs han sido siempre las

grandes olvidadas; y aún hoy se desconoce en gran medida su implicación en la regulación de la ruta Ras-ERK. No obstante, a pesar de todo, se conoce la implicación de algunos miembros de esta familia en la regulación de esta ruta. A modo de ejemplo, hoy sabemos que HePTP regula la participación de ERK en la hematopoesis (Saxena et al., 1998), PTP-SL está implicada en la translocación de ERK al núcleo (Blanco-Aparicio et al., 1999) y HD-PTP regula la actividad de Grb2 (Tanase, 2010). En cuanto a la familia de las DSPs, a pesar de compartir el mismo mecanismo de catálisis que las clásicas PTPs, estos enzimas presentan un dominio de unión a grupos fosfato con una hendidura menos profunda y, por lo tanto, más accesible. De este modo, las DSPs no sólo son capaces de defosforilar residuos de tirosina, sino que también son capaces de eliminar grupos fosfato unidos a residuos más pequeños como serinas y treoninas (Denu and Dixon, 1998). Dentro de la familia de las DSPs, existe una subfamilia de proteínas conocidas como MAPKs fosfatasas (MKPs), ampliamente descritas como el principal regulador negativo de esta ruta en mamíferos (Camps et al., 2000; Farooq and Zhou, 2004; Low and Zhang, 2016). Así pues, existen dentro de esta familia fosfatasas como MKP1 y MKP3 capaces de inactivar ERK al defosforilar, con un alto grado de especificidad, los residuos de treonina y tirosina de la secuencia TEY (Chu et al., 1996; Muda et al., 1996). Además, a pesar de haber sido consideradas en un principio como elementos reguladores capaces de influir tan sólo en el grado de activación de la ruta Ras-ERK, hoy sabemos que una de las principales funciones de las MKPs en mamíferos es la regulación de la sublocalización celular de las MAPKs (Brunet et al., 1999; Mandl et al., 2005). Igualmente, las MKPs juegan un papel primordial en la intercomunicación entre las diferentes rutas de MAPKs facilitando de este modo la integración de las diferentes señales (Liu and Hofmann, 2004).

Por otro lado, además de quinasas y fosfatasas, existen otras proteínas en la célula capaces, no solo de modular la intensidad y la amplitud de las señales de ERK, sino también su especificidad espacial. Así pues, hoy sabemos que las proteínas ERK están estrictamente reguladas por proteínas-andamio (*scaffold proteins*). La principal función de estas proteínas *scaffold*, es servir a modo de plataforma de unión para los diferentes miembros de la cascada. De esta manera, optimizan la señalización concentrando enzimas y sustratos, así como orientando espacialmente las diferentes moléculas implicadas en la transferencia de grupos fosfato (Levchenko et al., 2000; Scott et al., 1995). No obstante, estas proteínas

scaffold pueden también potenciar la señalización actuando como activadores alostéricos de quinasas (Rajakulendran et al., 2009) (Figura 1.8A). Igualmente, existe un amplio consenso en cuanto a la capacidad de las proteínas *scaffold* de prolongar el estado de activación de las proteínas quinasas aislándolas de fosfatas solubles dispersas por el citoplasma previniendo, de este modo, la defosforilación en residuos reguladores (Locasale et al., 2007) (Figura 1.8B).



Por último, hoy sabemos que las proteínas *scaffold* juegan un papel fundamental en la regulación espacial de las señales de ERK determinando su localización y su actividad sito-específica. De esta forma, está perfectamente establecido que el microambiente de los diferentes tipos de membrana de las que emanan las diferentes señales de Ras, determina qué sustratos van a ser preferentemente fosforilados por ERK, y que esta especificidad de sustratos es posible gracias a la participación de diferentes proteínas *scaffold* que varían específicamente en función del origen de las señales de Ras (Casar et al., 2009).

Por otro lado, la capacidad de las proteínas ERK para formar dímeros una vez fosforiladas, contribuye igualmente a la regulación sito-específica de estas señales. Si bien en un principio se creía que la dimerización era un requisito indispensable para la translocación nuclear (Khokhlatchev et al., 1998), hoy sabemos que el transporte de ERK al núcleo ocurre principalmente en su forma monomérica (Burack and Shaw, 2005). En el citoplasma, las proteínas *scaffold* actúan como plataformas de dimerización facilitando la formación de dímeros. En nuestro laboratorio, se ha demostrado que la formación de estos complejos dímero- *scaffold*, son imprescindibles para la subsiguiente interacción con sustratos citoplasmáticos (Casar et al., 2008). Así pues, tanto la dimerización como la unión a *scaffolds*, son dos procesos que promueven la señalización citoplasmática de ERK frente a las señales nucleares ejercidas por la forma monomérica. De esta manera, en respuesta a una señal extracelular, los monómeros fosforilados de ERK pueden ser translocados al núcleo, o bien interactuar con proteínas *scaffold* sito-específicos, dimerizar, y formar complejos dímero-*scaffold* específicos de sustrato (Figura 1.9).

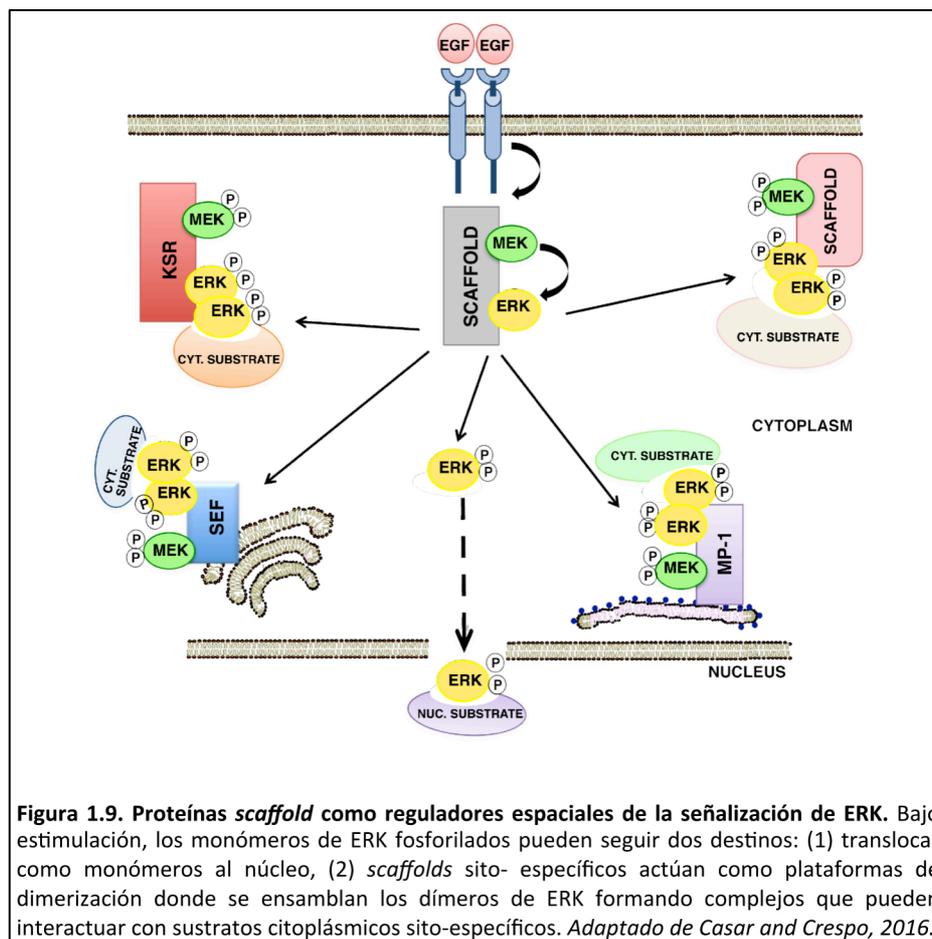


Figura 1.9. Proteínas *scaffold* como reguladores espaciales de la señalización de ERK. Bajo estimulación, los monómeros de ERK fosforilados pueden seguir dos destinos: (1) translocar como monómeros al núcleo, (2) *scaffolds* sito- específicos actúan como plataformas de dimerización donde se ensamblan los dímeros de ERK formando complejos que pueden interactuar con sustratos citoplasmáticos sito-específicos. *Adaptado de Casar and Crespo, 2016.*

En este trabajo, motivados por el impacto de la vía de señalización Ras-ERK en cáncer, e inspirados ante los últimos avances en la comprensión de la regulación sito-específica de dichas señales, trataremos de profundizar en el conocimiento de los diferentes elementos reguladores que modulan espacialmente esta ruta.

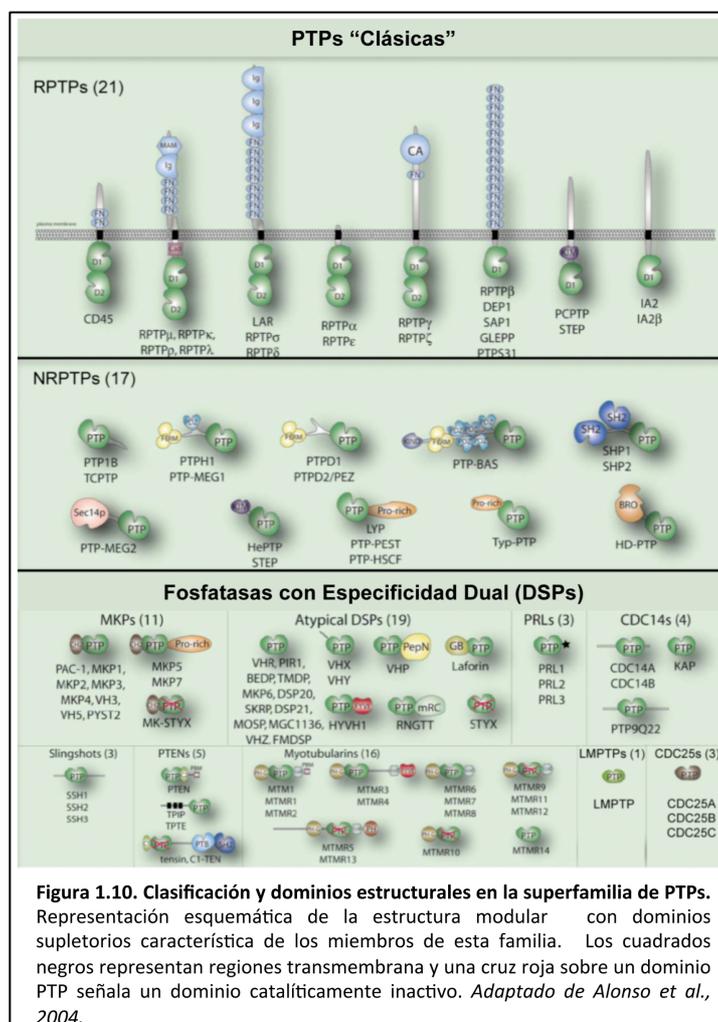
3. PROTEÍNAS TIROSINA FOSFATASAS (PTPs)

3.1. SUPERFAMILIA PTPs

Como ya hemos comentado anteriormente, en torno a un 30% del proteoma de eucariotas se encuentra fosforilado, principalmente, en residuos de serina, treonina y tirosina (Cohen, 2001). No obstante, hoy sabemos que la fosforilación en estos tres residuos no se da con la misma frecuencia. Cerca del 98% del fosfo-proteoma, se encuentra fosforilado en residuos de serina y treonina (Olsen et al., 2006). Sin embargo, la fosforilación en residuos de tirosina ejerce igualmente un papel regulador clave en innumerables procesos imprescindibles para la homeóstasis celular (Halle et al., 2007; Hunter, 1998; Larsen et al., 2003; Rhee and Veillette, 2012). De hecho, hoy se conocen multitud de enfermedades producidas por la acción aberrante de proteínas tirosina-quinazas (PTKs) (Cohen, 2002), así como por la de proteínas tirosina-fosfatasas (PTPs) (Tautz et al., 2006; Tonks, 2006).

Si bien, actualmente, nadie duda que la fosforilación en residuos de tirosina es un proceso estrechamente regulado por la acción equilibrada de PTKs y PTPs; las PTPs vuelven a ser las grandes olvidadas en favor de unas PTKs a las que históricamente se ha prestado mucha más atención. Con más de 100 miembros descritos, las PTPs forman una superfamilia de proteínas codificadas por una de las mayores familias de genes (Tonks, 2006) (Figura 1.10). Basada en una secuencia de aminoácidos altamente conservados dentro de la familia, todas presentan un motivo HCX₅R en su dominio catalítico (dominio PTP); con un residuo de cisteína imprescindible para la catálisis de la reacción de defosforilación (Andersen et al., 2001). Además, como una de las características más llamativas de las PTPs, cabe destacar su estructura; producto de la combinación modular de los diferentes dominios supletorios, altamente conservados en esta superfamilia de

proteínas. De hecho, al menos un 75% de las PTPs presentan un dominio adicional en torno a su dominio catalítico; tratándose en la mayoría de los casos de dominios para la interacción con otras proteínas o dominios de unión a fosfolípidos (Alonso et al., 2004) (Figura 1.10).



Como ya se ha mencionado anteriormente en este trabajo, la superfamilia de PTPs se subdivide a su vez en dos familias de enzimas: las "fosfatasas clásicas específicas para tirosina" (PTPs) y la familia de "fosfatasas con especificidad dual" (DSPs) (Tonks, 2006) (Figura 1.10). Por un lado, la familia de las "PTPs clásicas" consta de 38 miembros perfectamente caracterizados, todos ellos con formas ortólogas descritas en ratón. En cuanto a las proteínas DSPs, se han descrito 65 genes que codifican para un grupo mucho más heterogéneo que el de las "PTPs clásicas" en cuanto a especificidad de sustrato se refiere. Además, en función de su arquitectura modular, así como del grado de homología entre sus dominios catalíticos, todos los miembros de ambas familias pueden a su vez ser

clasificados en diferentes subfamilias (Andersen et al., 2004). Así pues, si ponemos nuestro foco de atención sobre las 65 proteínas que conforman la familia de las DSPs codificadas por el genoma humano, destacan como principal regulador negativo de la ruta Ras-ERK las 11 MKPs previamente descritas en el apartado anterior. Por otro lado, en cuanto a las “PTPs clásicas” se refiere, procedemos a continuación con un tratamiento más extenso dado su especial relevancia en este trabajo.

3.2. FAMILIA PTPs “CLÁSICAS”

Dentro de las PTPs “clásicas”, podemos distinguir entre la subfamilia de “proteínas transmembrana tipo receptor” (RPTPs), con 21 miembros divididos a su vez en 8 subtipos diferentes; y la subfamilia de “proteínas citoplásmicas tipo no receptor” (NRPTPs), con 17 miembros repartidos en 10 (Andersen et al., 2004). Mientras que las RPTPs se encuentran preferentemente localizadas en PM y todo parece indicar que poseen la capacidad de regular vías de señalización mediante reacciones de defosforilación inducidas por la unión a ligandos; las NRPTPs han sido descritas en diferentes sublocalizaciones intracelulares incluyendo citoplasma, MP y RE (Stoker, 2005). Además, cabe destacar unas secuencias reguladoras que flanquean al dominio catalítico de NRPTPs y son capaces de controlar su actividad; bien sea mediante la interacción directa modulando su grado de activación, o bien controlando la especificidad de sustrato. Estas secuencias no catalíticas, son también capaces de regular la sublocalización celular de estas enzimas (Tonks, 2006) (Figura 1.10).

A día de hoy, aún se desconocen tanto los sustratos para la mayoría de las PTPs, como los ligandos extracelulares capaces de inducir la activación de las distintas RPTPs. Sin embargo, esta situación está paulatinamente resolviéndose y ha habido grandes avances en cuanto al conocimiento de las funciones de algunas PTPs “clásicas” estrechamente implicadas tanto en la adhesión célula-matriz, como en la adhesión célula-célula, así como en la vía de señalización mediada por insulina (Stoker, 2005).

La interacción entre las células y la matriz extracelular es un punto de control esencial para la diferenciación, la supervivencia y la motilidad celular. Esta interacción, está mediada por unos complejos multi-proteicos capaces de unir diferentes moléculas extracelulares que conforman unas estructuras adherentes conocidas como adhesiones focales (Parsons, 2003). Para que se produzca el desprendimiento de las células y sea

posible la migración, los diferentes componentes de estas adhesiones focales son defosforilados por diferentes PTPs (Schwarzbauer, 1997) (Figura 1.11A).

Otra de las funciones tradicionalmente asignadas a las PTPs, principalmente RPTPs, es la regulación de las uniones intercelulares. Las uniones adherentes célula-célula que mantienen la integridad dentro de los epitelios, están mediadas por proteínas de la familia de las cadherinas. Estas cadherinas, están unidas a su vez al citoesqueleto de actina a través de α -catenina, β -catenina y p120^{ctn} (Daniel and Reynolds, 1997). Así pues, se han descrito diferentes RPTPs capaces de regular la unión entre las moléculas de cadherina y β -catenina mediante la defosforilación de ésta última (Fuchs et al., 1996; Kypta et al., 1996; Meng et al., 2000) (Figura 1.11B).

Además, como otro proceso en el que la participación de PTPs está ampliamente confirmada, tenemos la vía de señalización mediada por insulina (Asante-Appiah and Kennedy, 2003; Cheng et al., 2002). Numerosas PTPs, han sido implicadas en la regulación de esta ruta, si bien existe una gran controversia en cuanto al papel que ejercen estas proteínas. Así pues, mientras que se ha descrito el papel de LAR, PTP α y PTP ϵ como reguladores negativos de esta vía; todo indica que SHP-2 juega un papel positivo en la señalización por insulina. Por lo tanto, parece evidente que las PTPs pueden regular tanto positiva como negativamente la transducción de señales (Lammers et al., 1997; Li et al., 1996; Maegawa et al., 1999; Mooney et al., 1997) (Figura 1.11C).

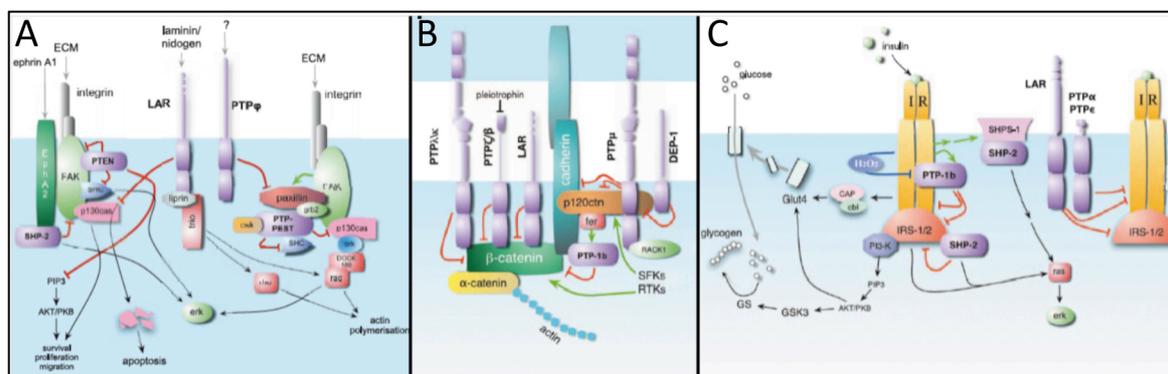
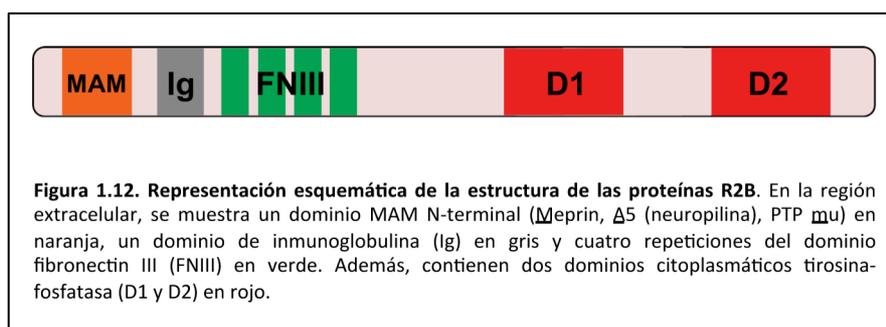


Figura 1.11. Funciones principales de las PTPs "clásicas". (A) Regulación de adhesiones focales. **(B)** Regulación de uniones adherentes célula-célula mediadas por cadherinas. **(C)** Regulación de la señalización mediada por insulina. Las reacciones de defosforilación se representan mediante líneas rojas y las reacciones de fosforilación mediante flechas verdes. Las flechas negras indican rutas estimuladas. Las flechas grises indican la unión de ligandos extracelulares. Todas las PTPs se muestran en púrpura. *Adaptado de Stoker, 2005.*

Por último, además de su papel en las uniones celulares y en la señalización vía insulina, en los últimos años se han estudiado muchas otras PTPs con un papel crucial en diferentes enfermedades como por ejemplo cáncer. Inicialmente, dado el papel predominante de las PTKs como principales proteínas oncogénicas, se pensaba que las PTPs iban a ser rápidamente identificadas y clasificadas como supresores tumorales. Sin embargo, hoy sabemos que las PTPs no sólo actúan como inhibidores de señales dependientes de fosforilación en tirosina; sino que también son capaces de actuar como reguladores positivos de la señalización celular. No resulta por tanto sorprendente, que a pesar de haber sido identificados numerosos supresores tumorales entre las PTP clásicas, se hayan descrito también PTPs con función oncogénica (Tonks, 2006).

3.3. SUBFAMILIA RPTPs SUBTIPO IIB (R2B)

Como ya hemos comentado en apartados anteriores, podemos subclasificar las 21 RPTPs descritas, en 8 diferentes subtipos basados en la estructura de sus dominios extracelulares (Andersen et al., 2001) (Figura 1.10). Uno de los grupos de RPTPs más extensamente estudiados, son las RPTPs Tipo IIB (R2B). Compuesto por cuatro miembros: PTP μ (PTPRM), PTP ρ (PTPRP), PTP κ (PTPRK) y PCP-2 (PTPRU), las proteínas R2B presentan en su región extracelular dominios similares a moléculas de adhesión celular (CAM). Así pues, los R2Bs se caracterizan por poseer un dominio MAM N-terminal (Meprin, A5 (neuropilina), PTP mu), un dominio de inmunoglobulina (Ig) en gris y cuatro repeticiones del dominio fibronectin III (FNIII) en verde. Además, los R2B contienen dos dominios citoplasmáticos tirosina-fosfatasa (D1 y D2), de los cuales sólo el más próximo a membrana (D1) es catalíticamente activo (Gebbink et al., 1993a). Así pues, el dominio inactivo D2, es probable que regule la actividad tirosina-fosfatasa del dominio D1 junto con otras regiones del dominio citoplasmático (Tonks, 2013) (Figura 1.12).



No obstante, si bien nos encontramos ante un grupo de proteínas tradicionalmente relacionadas con las interacciones célula-célula, en los últimos años se ha demostrado que estas proteínas son también capaces de inducir procesos de señalización celular motu proprio, y que los efectos producidos por la acción de esta pequeña subfamilia de RPTPs tienen un gran recorrido. De este modo, hoy en día sabemos que las proteínas R2B influyen en un amplio abanico de procesos fisiológicos, así como en enfermedades como el cáncer (Craig and Brady-Kalnay, 2015).

Las proteínas R2B, han sido descritas tanto como supresores de tumores, así como oncogenes, dependiendo de la R2B específica, el tipo de cáncer y los cambios observados a nivel de gen o proteína (Hardy et al., 2012). Además, en las proteínas R2B, se han detectado en cáncer cambios genéticos, epigenéticos, transcripcionales y postraduccionales, e incluso en algunos casos, se han descrito los cuatro eventos para una misma R2B (Zhao et al., 2015). Finalmente, está demostrado que existen también cambios postraduccionales en las proteínas R2B, que ocurren preferentemente en tejido canceroso. En concreto, los R2B forman parte de una lista de moléculas CAM que son característicamente proteolizadas en cáncer (Craig and Brady-Kalnay, 2011b).

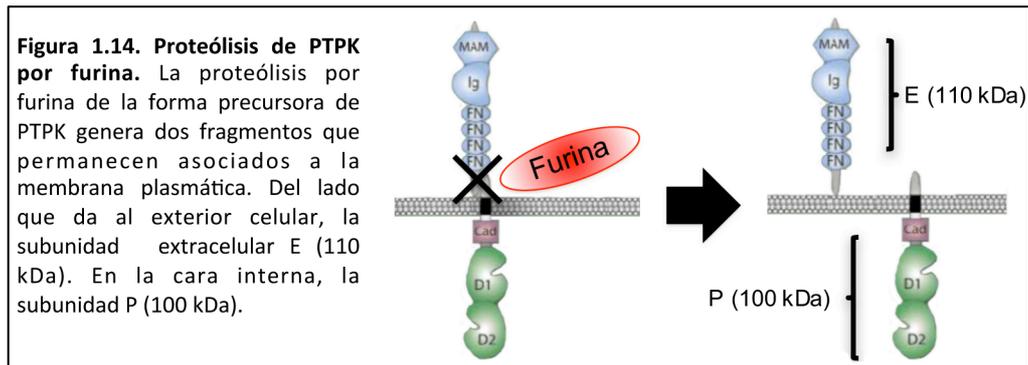
De este modo, se cree que la proteólisis de las moléculas CAM, presentes en interacciones homofílicas célula-célula, es uno de los mecanismos implicados en la migración de las células cancerosas (Craig and Brady-Kalnay, 2011a). Sorprendentemente, al contrario que sus isoformas predecesoras de longitud completa, los fragmentos proteolíticamente escindidos de las proteínas R2B suelen tener propiedades oncogénicas (Burgoyne et al., 2009; Phillips-Mason et al., 2014) (Tabla 1.1).

Tipo de Cáncer	R2B	Referencia
Glioblastoma	PTP- μ	Burgoyne et al, 2009; Burden-Gulley et al., 2010.
Glioma Maligno (incluyendo muestras de pacientes con oligodendroglioma, astrocitoma, oligodendroglioma anaplásico, astrocitoma anaplásico y glioblastoma)	PTP- κ	Assem et al., 2012.
Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello	PTP- ρ PTP- μ PTP- κ	Lui et al., 2014.
Esófago	PTP- ρ	Zhao et al., 2015.
Pulmón	PTP- ρ	Zhao et al., 2015.
Glándula mamaria	PTP- μ PTP- κ	Sun et al., 2012.
Páncreas	PTP- κ	Barghorn et al., 2001.
Estómago	PTP- ρ	Zhao et al., 2015.
Vejiga	PTP- ρ	Zhao et al., 2015.
CRC	PTP- ρ PTP- μ PTP- κ PCP-2	Wang et al., 2004; Zhao et al., 2015; Laczmanska et al., 2013; Seshagiri et al., 2012.
Endometrio	PTP- ρ PTP- μ PTP- κ PCP-2	Zhao et al., 2015.
Melanoma	PTP- κ PCP-2	Novellino et al, 2003; McArdle et al., 2001.
Linfoma del Sistema Nervioso Central	PTP- κ	Nakamura et al., 2003.
Linfoma primario intraocular	PTP- κ	Wang et al., 2014.
Linfoma de Hodgkin	PTP- κ	Flavell et al., 2008.

Tabla 1.1. Proteínas R2B y cáncer. Se muestran las distintas R2Bs implicadas en diferentes tipos de cáncer, así como los artículos en los que se describe su implicación. *Adaptado de Craig and Brady-Kalnay, 2016.*

3.4. PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASA K (PTPK)

La proteína PTPK, fue el segundo miembro descrito dentro del grupo de las R2B. Identificada en ratones, se detectó una forma precursora de 1457 aminoácidos que, al ser sometida a un procesamiento postraduccional proteolítico, generaba dos fragmentos E (110kDa) y P (100 kDa) que, no obstante, permanecían igualmente unidos a membrana tras la fractura (Figura 1.14.).

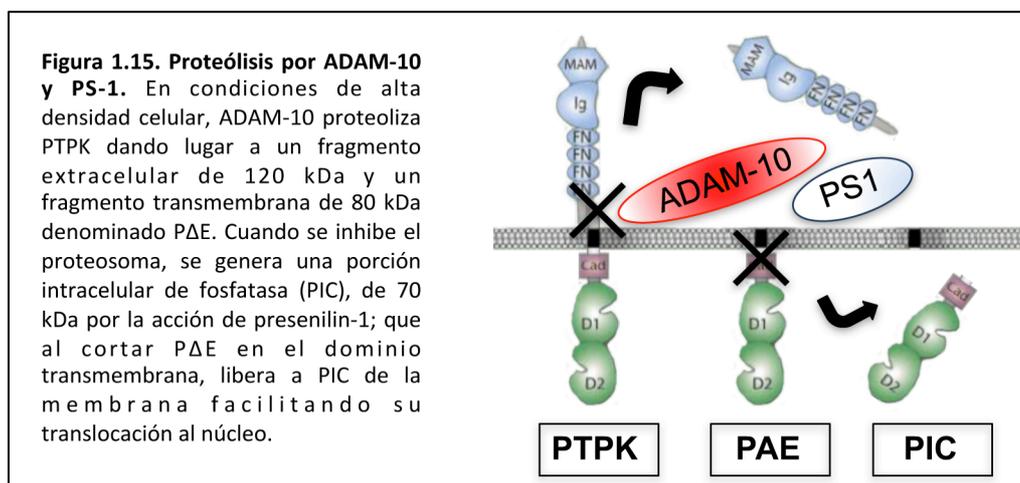


Además, los ensayos de hibridación *in situ* mostraban una alta expresión de PTPK en el sistema nervioso central, estrechamente ligada al desarrollo de esta estructura. De esta manera, se detectaban mayores niveles de expresión en áreas en desarrollo; y en el caso de individuos adultos, en áreas que presentaban plasticidad, como hipocampo y corteza cerebral (Jiang et al., 1993). Sin embargo, a pesar de esta expresión en etapas tempranas de sistema nervioso, a día de hoy su papel durante el desarrollo neural aún no ha podido ser demostrado. Por otro lado, debido a que la forma precursora de PTPK (a partir de ahora PTPK), presenta el dominio extracelular CAM anteriormente descrito, PTPK fue una de las primeras R2B en las que se investigó su implicación en las uniones célula-célula. De esta manera, se vio que PTPK mediaba la interacción homofílica intercelular; y que para que esta interacción fuera posible, no eran necesarias ni la actividad fosfatasa ni la proteólisis postraduccional de la proteína precursora (Sap et al., 1994). Igualmente, al ser identificado pocos años después el homólogo humano del PTPK murino (hPTPK), se observó que co-localizaba con β -catenina y γ -catenina en uniones adherentes (Fuchs et al., 1996). Además, como ya se intuía, estudios posteriores confirmaron que PTPK era capaz de defosforilar a β -catenina regulando así su localización en las células (Anders et al., 2006; Novellino et al., 2008).

Paralelamente al estudio de su implicación en las uniones célula-célula, con la llegada del nuevo siglo empezó a cobrar interés la relación de PTPK con el cáncer. Así pues, en un primer estudio internacional, se detectó la pérdida de expresión, o bajos niveles de PTPK, en el 20% de las células de melanoma, así como de las biopsias de tejido estudiadas (McArdle et al., 2001). En esta misma línea, surgió un estudio asociando la pérdida de heterocigosidad en la región codificante para PTPK del cromosoma 6, con la aparición de linfomas en el sistema nervioso central; postulando de este modo, a PTPK como un nuevo supresor de tumores (Nakamura et al., 2003). Y así sucesivamente, han ido apareciendo en los últimos años numerosos estudios que demuestran que, por ejemplo, la pérdida de expresión de PTPK incrementa el crecimiento y la supervivencia celular en linfoma de Hodgkin (Flavell et al., 2008); o aumenta la proliferación, la adhesión a la matriz y la invasividad en células de cáncer de mama (Sun et al., 2013a). Igualmente, la sobreexpresión exógena de PTPK reduce los niveles de proliferación y migración en células de melanoma, tal y como cabría esperar de un supresor de tumores (Agarwal et al., 2013). Además, la pérdida de heterocigosidad inicialmente descrita en linfomas del sistema nervioso central, ha sido recientemente asociada con glioma maligno y linfoma intraocular primario (Assem (Assem et al., 2012; Wang et al., 2014). De este modo, existe hoy en día un gran consenso en torno a definir PTPK como un supresor de tumores.

No obstante, existe al menos una excepción en la que PTPK parece desempeñar una función oncogénica (Sun et al., 2013b). A este respecto, ya hemos comentado brevemente que PTPK podía sufrir procesamiento postraduccional. En un primer momento se describió la proteólisis por furina de la forma precursora generando dos fragmentos, las subunidades E (110 kDa) y P (100 kDa), que permanecían asociadas a la membrana plasmática (Jiang et al., 1993) (Figura 1.14). Sin embargo, en condiciones de alta densidad celular, la proteólisis puede ser llevada a cabo por ADAM-10 dando lugar a un fragmento extracelular de 120 kDa y un fragmento transmembrana de 80 kDa denominado PΔE. Del mismo modo, se identificó un fragmento citoplasmático adicional de aproximadamente 70 kDa denominado porción intracelular de fosfatasa (PIC) (Anders et al., 2006). PIC se genera por la acción de presenilina-1 (PS1), que al cortar PΔE en el dominio transmembrana, libera a PIC de la membrana facilitando su translocación al núcleo. Sorprendentemente, tanto PIC como PTPK son capaces de defosforilar β-catenina, sin embargo, tienen efectos opuestos sobre

la transcripción. Mientras que PTPK disminuye la transcripción mediada por el factor de transcripción de células T (TCF), PIC la aumenta. De este modo, la diferente localización de las isoformas de PTPK produciría efectos celulares opuestos (Anders et al., 2006) (Figura 1.15). Igualmente, se ha visto que la sobreexpresión de la N-acetilglucosaminil-transferasa-V (GnT-V) en células de cáncer de colon, resulta en la glicosilación preferencial y el desprendimiento de la subunidad E (110 kDa) por parte de la proproteína convertasa secretada 5 (PC5A). Y aunque aún quedaría por aclarar si la escisión por PC5A/furina de PTPK produce preferentemente dos fragmentos asociados a membrana, o por el contrario resulta en el desprendimiento del segmento extracelular; es un hecho que la glicosilación y el desprendimiento de la subunidad E (110 kDa) se correlacionan con una mayor migración de las células de cáncer de colon (Kim et al., 2011; Kim et al., 2006).



De esta manera, la disfunción de PTPK está ampliamente relacionada con la aparición de cáncer. Y todo parece indicar que, la proteólisis, es un punto de control con una relevancia capital, en la regulación de esta proteína. De esta manera, parece que PTPK podría estar actuando a modo supresor de tumores, mientras que las isoformas proteolizadas, PAE y PIC, tendrían el efecto contrario, resultando oncogénicas. No obstante, al igual que ocurre con el resto de PTPs, aún falta mucho por descubrir en cuanto a sustratos catalíticos y ligandos extracelulares capaces de inducir la activación de PTPK se refiere. En resultados previos de nuestro laboratorio, mostramos cómo la expresión de PTPK era inducida por las señales de Ras desde GC (Agudo-Ibanez et al., 2007). Además, PTPK había sido previamente descrita como un elemento regulador capaz de defosforilar EGFR en queratinocitos humanos (Xu et al., 2005). En este trabajo, abordaremos la relación

de PTPK con la ruta RAS-ERK con el fin de averiguar si pudiera estar jugando algún papel en los procesos biológicos regulados por esta ruta.

4. PROTEÍNAS RAS

4.1. SUPERFAMILIA DE PROTEÍNAS RAS

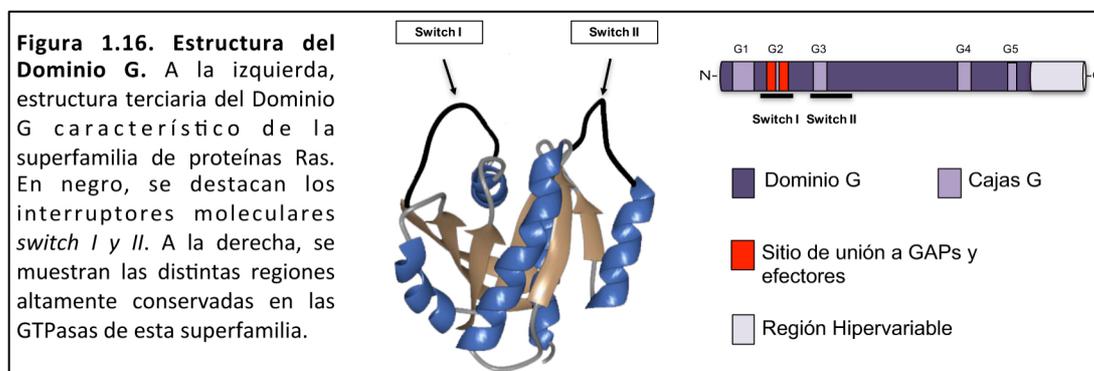
4.1.1. DESCRIPCIÓN GENERAL

La superfamilia de las GTPasas Ras está integrada por un conjunto de más de 150 proteínas G monoméricas homólogas a las proteínas Ras (Colicelli, 2004). Descritas como producto de la expresión de secuencias retrovirales con capacidad tumorigénica en rata (**Rat sarcoma**) (Harvey, 1964; Kirsten et al., 1966); estas proteínas tienen en común su pequeño tamaño (20-30 kDa), actividad intrínseca GTPasa, capacidad de unir nucleótidos de guanina, y la necesidad de asociarse a membranas para ser funcionales (Willingham et al., 1980). Extraordinariamente conservadas a lo largo de la evolución de los organismos eucariotas, juegan un papel crítico en la transmisión al interior de la célula de señales extracelulares captadas por receptores de superficie; principalmente, RTKs y GPCRs (Colicelli, 2004; Lundquist, 2006; Macara et al., 1996; Santos and Nebreda, 1989; Wennerberg et al., 2005). De marcado carácter binario, éstas pequeñas proteínas G actúan como interruptores moleculares al ser capaces de alternar, gracias a su actividad GTPasa; entre una forma activa, unidas a GTP, y una forma inactiva, unidas a GDP (Vetter and Wittinghofer, 2001). De este modo, las GTPasas Ras están implicadas en la regulación de multitud de procesos biológicos tales como división celular, apoptosis o motilidad entre otras (Hoshino et al., 2004; Romano et al., 2013; Wu et al., 2009).

4.1.2. ESTRUCTURA GENERAL

A pesar de mostrar una gran variabilidad en cuanto a función y secuencia se refiere, todos los miembros de esta superfamilia comparten un dominio estructural de unión a GTP con dos intercambiadores (*Switch I y II*), claves en los cambios conformacionales requeridos por los ciclos de activación, comunes a todas las Ras GTPasas (Ma and Karplus, 1997). Localizado en el extremo N-terminal, este “Dominio G” responsable de la interacción con nucleótidos de guanina, así como de la hidrólisis del GTP, consta además de cinco

secuencias consenso “cajas G” (G1-G5), cinco hélices α (A1-A5) y seis láminas β (B1-B6) (Colicelli, 2004) (Figura 1.16).



La caja G1, también conocida como Bucle P, es una secuencia característica de unión a nucleótidos de purina. La caja G2, caracterizada por una Treonina localizada en *Switch-I*, juega un papel crítico en la unión a efectores y al fosfato γ del GTP. Los residuos de la caja G3, son los responsables de la unión a iones Mg_{2+} necesarios para la unión a nucleótidos. Los aminoácidos que componen la caja G4, son capaces de establecer puentes de hidrógeno con el anillo de guanina, otorgando a estas proteínas especificidad para la unión a GTP frente al ATP, y aportando mayor estabilidad a las uniones establecidas con los residuos de G1. Finalmente, la caja G5, se asocia de manera indirecta con los nucleótidos de guanina (Vetter and Wittinghofer, 2001; Wennerberg et al., 2005) (Figura 1.16).

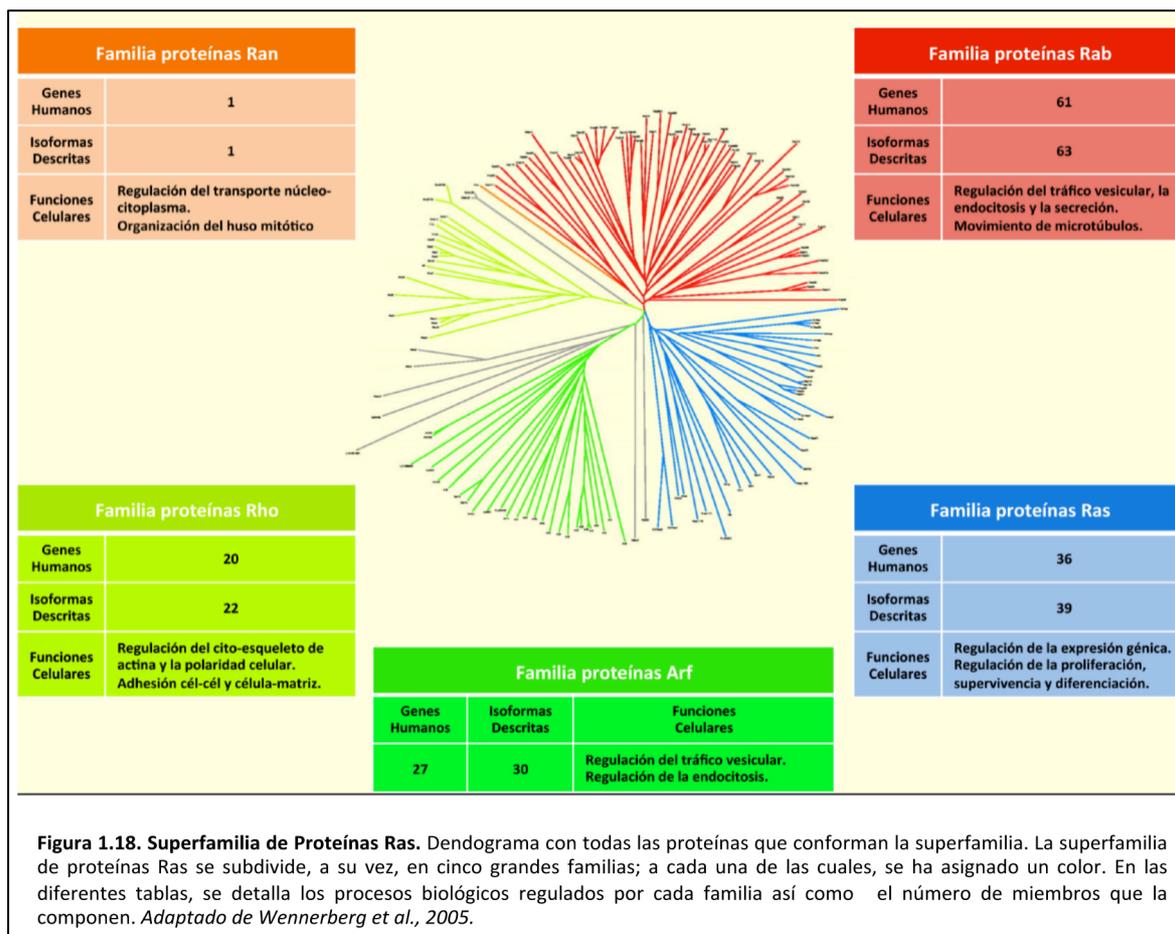
4.1.3. CICLO DE ACTIVACIÓN

Los miembros de la superfamilia de las proteínas Ras GTPasas, actúan como interruptores moleculares binarios capaces de alternar entre una forma inactiva, unida a GDP, y una forma activa, unida a GTP. Sin embargo, debido a la afinidad similar, alta para ambos nucleótidos, así como su baja capacidad GTPasa intrínseca, resulta imprescindible para el intercambio de nucleótidos la actuación de dos proteínas reguladoras: las Proteínas GTPasa Activadoras (GAPs) y los Factores de Intercambio de Nucleótidos de Guanina (GEFs) (Bernards and Settleman, 2004; Schmidt and Hall, 2002).

De este modo, existe un ciclo de activación mediante el cual, las proteínas GEFs, promueven la forma activa catalizando la sustitución del GDP por GTP. Dicha reacción, viene acompañada por una serie de cambios conformacionales que incrementan, notablemente, la afinidad de las GTPasas por sus efectores. De esta manera, se inicia una serie de rutas de señalización, que serán inactivadas posteriormente una vez que se produzca la hidrólisis del GTP, acelerada por las proteínas GAPs, devolviendo las GTPasas a su estado inactivo (Takai et al., 2001) (Figura 1.17A).

Para cada una de las familias de Ras GTPasas, existen GEFs específicos. Y si bien los dominios catalíticos de las distintas familias son distintos y no parecen guardar relación entre sí, todas parecen compartir el mismo mecanismo de acción. Las proteínas GEFs, son capaces de inducir cambios conformacionales en las regiones *Switch I* y *II*, así como en el bucle P mencionados anteriormente. Estos cambios conformacionales, reducen notablemente la afinidad de las proteínas G por GDP. De este modo, el GDP es liberado y sustituido por GTP, diez veces más abundante en las células. Entonces, se produce un nuevo cambio conformacional que estabiliza el fosfato γ del GTP, que se estabiliza en el bucle P fijando los interruptores *Switch I* y *II*, en una conformación que será reconocida por los efectores y/o las proteínas GAPs (Bos et al., 2007; Vetter and Wittinghofer, 2001) (Figura 1.17B).

Al igual que ocurre con los GEFs, las proteínas GAPs de las distintas familias de GTPasas Ras, no son proteínas altamente conservadas. Encaran las proteínas G desde diferentes ángulos, e incluso catalizan de modos diferentes la hidrólisis de la molécula de GTP. Sin embargo, en todos los casos nos encontramos ante una serie de características comunes: orientación y polarización de una molécula de agua que ejecuta el ataque nucleofílico que hidroliza el fosfato γ , retención de dicha molécula en el centro activo de la proteína, y estabilización de los estados transitorios mediante la neutralización de las cargas negativas del fosfato γ . Elementos, todos ellos comunes a una catálisis efectiva, por



➤ Familia de proteínas Ran (*Ras-like nuclear*)

Su único miembro caracterizado, la proteína Ran, es la GTPasa más abundante en las células. Durante la interfase, es la encargada de modular el transporte de macromoléculas entre el núcleo y el citoplasma. Además, ejerce un papel fundamental durante la mitosis, regulando la formación del huso mitótico, así como controlando la formación de las envolturas nucleares (Stewart, 2007; Weis, 2003).

➤ Familia de proteínas Rab (*Ras-like proteins in brain*)

Con más de sesenta miembros caracterizados, se trata de la familia más numerosa dentro de las pequeñas GTPasas. Encargadas de la regulación del transporte vesicular, así como del tráfico de proteínas entre diferentes compartimentos membranosos, coordinan a través de sus efectores las diferentes fases comprendidas desde la formación de vesículas hasta su posterior unión al compartimento receptor (Hutagalung and Novick, 2011; Zerial and McBride, 2001).

➤ Familia de proteínas Arf (*ADP-ribosilation factor*)

Al igual que las proteínas Rab, esta familia de proteínas es también uno de los principales elementos reguladores del transporte intracelular mediado por vesículas. Cada miembro de la familia de proteínas Arf, es capaz de ejercer su función reguladora a diferentes niveles de este proceso (Donaldson and Jackson, 2011; Pasqualato et al., 2002).

➤ Familia de proteínas Rho (*Ras homologus*)

Familia de pequeñas GTPasas estrechamente relacionadas con la familia de proteínas Ras, consta de veintitrés miembros implicados en la regulación de la organización del citoesqueleto de actina, en motilidad, polaridad, y en progresión del ciclo celular, así como en regulación de la expresión génica (Heasman and Ridley, 2008).

➤ Familia de proteínas Ras (*Rat sarcoma*)

Como ya se ha mencionado anteriormente, las proteínas Ras fueron las primeras GTPasas monoméricas en ser descubiertas. Familia compuesta por más de treinta y seis miembros, las proteínas Ras son capaces de activarse en respuesta a múltiples estímulos extracelulares. Una vez activas, la interacción con efectores citoplasmáticos dará inicio a cascadas de señalización implicadas en la regulación de la expresión génica, así como en proliferación, diferenciación, y supervivencia celular. Los miembros de esta familia, pueden a su vez clasificarse en siete subfamilias: Rap, Ral, R-Ras, Rheb, Rin, Rit y Ras (Repasky et al., 2004; Wennerberg et al., 2005).

4.2. SUBFAMILIA DE PROTEÍNAS RAS

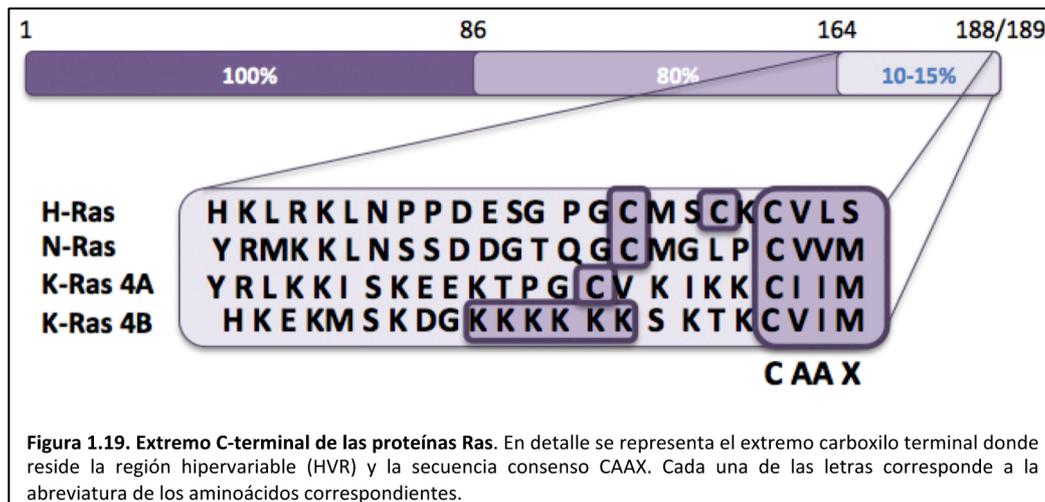
4.2.1. DESCRIPCIÓN GENERAL

Integrada por cuatro miembros: H-Ras, N-Ras, K-RasA y K-RasB, las proteínas Ras juegan un papel determinante en multitud de procesos biológicos tales como proliferación, diferenciación, apoptosis, supervivencia y adhesión entre otros (Malumbres and Barbacid, 2003). De expresión ubicua en eucariotas, es requisito indispensable un nivel mínimo de expresión de todas sus variantes para la viabilidad celular (Maher et al., 1995). Asimismo, la desregulación de estas proteínas deviene irremediablemente en la aparición de diferentes patologías. De este modo, conviene recordar que Ras es el oncogén con mayor frecuencia de mutación en cáncer humano, donde se estima que en un 30% de los tumores aparece alguna isoforma mutada de Ras constitutivamente activa (Roberts and Der, 2007; Scheffzek et al., 1997).

4.2.2. ESTRUCTURA GENERAL

En el genoma humano, se distinguen tres genes (*h-ras*, *n-Ras* y *k-ras*), altamente conservados en la escala evolutiva, desde levaduras a mamíferos. Formados todos ellos por cuatro exones codificantes y un quinto no codificante (exón ϕ), se localizan en el cromosoma 11 (11p15.1-p15.5), el cromosoma 1 (1p22.p32) y el cromosoma 12 (12p12.1-pter) respectivamente (Barbacid, 1987; Lowy and Willumsen, 1993; Malumbres and Pellicer, 1998). Estos tres genes codifican para cuatro proteínas diferentes, gracias a un procesamiento alternativo del exón 4 en el gen *k-ras*, capaz de dar lugar a las isoformas K-Ras4A y K-Ras4B (Barbacid, 1987). Con cadenas polipeptídicas de 188 aminoácidos en el caso de K-Ras4B y 189 aminoácidos en el resto de las isoformas, nos encontramos ante proteínas de 21kDa con una estructura altamente conservada. En el extremo N-terminal de 164 aminoácidos, existe una gran homología entre los diferentes miembros de la subfamilia. Por el contrario, el extremo C-terminal, está formado por 25 aminoácidos con una alta heterogeneidad entre las diferentes isoformas, formando una región hipervariable (HVR) (Figura 1.19). En el extremo N-terminal, los 86 primeros residuos son completamente idénticos y los siguientes 78 comparten un 80% de homología. Es en esta región, donde se encuentra el "Dominio G" de unión a nucleótidos característico de estas proteínas G monoméricas. Por otro lado, en la región hipervariable, existe una secuencia C-terminal CAAX (C= cisteína, A= aminoácidos alifáticos y X= metionina o serina) presente en todos los

miembros, donde tendrán lugar toda una serie de modificaciones post-traduccionales que aportarán a estas proteínas una gran diversidad funcional y biológica al condicionar su localización subcelular (Figura 1.19).



4.2.3. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES

En un principio, las proteínas Ras son sintetizadas en ribosomas libres como proteínas hidrofílicas dispersas por el citoplasma. Sin embargo, dado que estas proteínas necesitan permanecer ancladas a membranas para ser activas, son necesarias toda una serie de modificaciones postraduccionales que incrementen la hidrofobicidad de la región HVR ubicada en el extremo C-terminal (Figura 1.20).

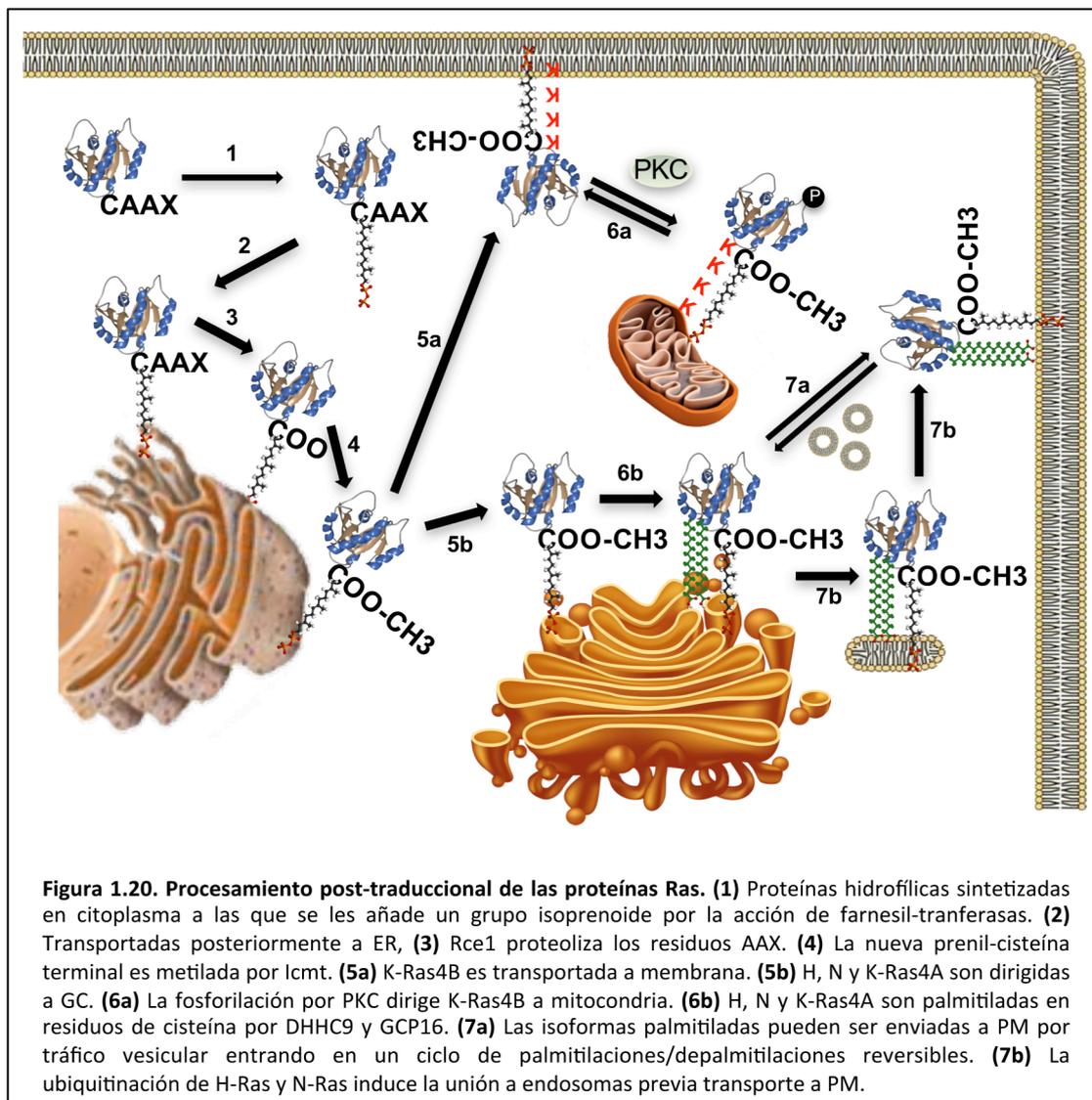
La primera de estas modificaciones, tiene lugar en una cisteína común a todas las isoformas de Ras. Ubicada en posición 186 dentro de la secuencia CAA X anteriormente descrita, a esta cisteína se le añade un grupo isoprenoide de 15 carbonos en una reacción catalizada por enzimas farnesil-transferasas o geranil-transferasas (Zhang and Casey, 1996). Esta modificación, incrementa la hidrofobicidad de estas proteínas, facilitando su desplazamiento al RE donde la endopeptidasa Rce1 (Ras converting enzyme-1) proteoliza los residuos AAX (Trueblood et al., 2000). Finalmente, el extremo α -carboxilo de la ahora prenil-cisteína terminal, es metilado por la enzima Icmt (Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase) (Choy et al., 1999; Dai et al., 1998). Todas estas modificaciones postraduccionales, dan lugar a unas proteínas Ras mucho más hidrofóbicas, capaces de interactuar con bicapas lipídicas. Sin embargo, para fijar a membranas celulares las

diferentes isoformas de Ras, se hace imprescindible una segunda señal en la región hipervariable (Figura 1.20).

En el caso de K-Ras4B, esta segunda señal viene determinada por la presencia de un dominio polibásico en el extremo C-terminal. Compuesto por 6 residuos de lisina, esta secuencia confiere carga neta positiva a la región HVR de K-Ras4B, haciendo posible la unión a membranas mediante interacciones electrostáticas con los fosfolípidos de carga negativa (Hancock et al., 1990). La fosforilación de K-Ras en ser¹⁸¹ por proteína quinasa C (PKC) en respuesta a la estimulación por ésteres de forbol (Ballester et al., 1987), parece neutralizar, al menos parcialmente, estas cargas positivas. De este modo, reduciendo la interacción electrostática a fosfolípidos, se induce la translocación de K-Ras desde MP a membranas intracelulares tales como RE, CG y mitocondria (Bivona et al., 2006). Además, a la región polibásica de K-Ras también se le puede unir una molécula de calmodulina, la cual redirige esta proteína a endosomas de manera transitoria (Fivaz and Meyer, 2005). Curiosamente, la calmodulina entra en competencia directa con PKC (Villalonga et al., 2002). De esta manera, la unión de K-Ras a calmodulina previene la fosforilación en ser¹⁸¹ por PKC, y la fosforilación por PKC en ser¹⁸¹ impide la unión a calmodulina, generándose de este modo, un antagonismo regulador capaz de modular tanto la función, como la localización de K-Ras (Figura 1.20).

Por otro lado, existe un amplio consenso en torno a la palmitilación de residuos como la modificación postraducciona con mayor relevancia en la regulación de funciones, localización y tráfico intracelular; para el caso de H-Ras, N-Ras y K-Ras4A. En H-Ras, serán palmitilados los residuos Cys¹⁸¹ y Cys¹⁸⁴, mientras que en N-Ras y K-Ras4A únicamente serán palmitiladas las Cys¹⁸¹ y Cys¹⁸⁰ respectivamente. Estas reacciones de palmitilación, tendrán lugar en CG y serán catalizadas por las acyl-transferasas DHHC9 y GCP16 (Mitchell et al., 2006; Swarthout et al., 2005). Al contrario que la farnesilación, la unión del ácido palmítico es un proceso reversible que da origen a un ciclo constante de palmitilación/depalmitilación. De esta manera, isoformas palmitiladas de Ras ligadas a MP, serán enviadas de vuelta al GC previa depalmitilación. Una vez de nuevo en GC, H-Ras, N-Ras y K-Ras4A se acumulan a la espera de una nueva reacción de palmitilación que las devuelva a MP. Sin embargo, las reacciones de palmitilación no son la única modificación

postraduccional capaz de regular estas proteínas. Recientemente, se ha descrito la ubiquitinación de H-Ras y N-Ras como un proceso que induce la unión a endosomas reciclados en lo que parece ser un nuevo elemento intermedio implicado en el transporte entre GC y PM (Misaki et al., 2010) (Figura 1.20).



Finalmente, una vez concluidas todas estas modificaciones postraducionales, serán las características físico-químicas de la región HVR resultante, las que determinen la sublocalización celular de las proteínas Ras, bien sea en los diferentes microdominios de membrana plasmática, o en los distintos sistemas de endomembranas presentes en la célula.

4.2.4. SUBLOCALIZACIÓN CELULAR

Históricamente, siempre se ha considerado que la traducción de señales a través de las proteínas Ras era un proceso específicamente ligado a membrana plasmática. Así pues, existía un consenso generalizado en cuanto a reconocer la unión a la cara citoplasmática de la PM como un requisito indispensable para su funcionalidad (Willingham et al., 1980). Sin embargo, hoy en día sabemos que ésta no sería su única plataforma de actuación, habiéndose descrito proteínas Ras presentes y activas en diferentes endomembranas, así como en orgánulos citoplasmáticos (Figura 1.21).

De sobra conocida, la internalización de PTKRs vía endosomas derivados de PM es un requisito indispensable para una correcta señalización en el caso de algunos factores de crecimiento. Es por ello que no resulta sorprendente la señalización por Ras a través de endosomas endocíticos (Di Fiore and De Camilli, 2001). En el caso de H-Ras y N-Ras, como ya hemos mencionado anteriormente, reacciones de ubiquitinación asocian de manera estable ambas proteínas a endosomas, favoreciendo de este modo su transporte y función (Jura et al., 2006; Omerovic et al., 2007; Roy et al., 2002). De este modo, la señalización desde endosomas parece afectar a la cinética de señalización, sosteniendo en el tiempo las señales con un carácter más transitorio generadas en PM (Oksvold et al., 2001; Taub et al., 2007) (Figura 1.21).

Así mismo, una vez estabilizadas mediante la adición de un grupo isoprenoide, H-Ras y N-Ras pueden ser activadas tanto en ER como en GC (Bivona et al., 2003). Además, como ya hemos visto, formas activadas en PM pueden ser enviadas de vuelta al GC tras su depalmitoilación (Rocks et al., 2005). De este modo, existen poblaciones funcionales de H-Ras y de N-Ras capaces de activar cascadas de señalización desde ER y GC (Chiu et al., 2002)(Figura 1.21).

Por otro lado, se ha descrito también la presencia de todas las isoformas de Ras en mitocondria. En todos los casos, las proteínas Ras están implicadas en la regulación de la apoptosis. Curiosamente, mientras que H-Ras y N-Ras parecen ser responsables de resistencia a apoptosis, la translocación de K-Ras4B a membrana externa mitocondrial tras la fosforilación previamente descrita en ser¹⁸¹ por PKC, es un fuerte inductor de apoptosis (Bivona et al., 2006; Rebollo et al., 1999; Wolfman et al., 2006) (Figura 1.21).

Además, la actual concepción de la PM como un mosaico compartimentado en microdominios de diferente composición y propiedades físico-químicas, ha añadido un nuevo nivel de complejidad a la distribución de las proteínas Ras. Así, distinguimos entre membrana desordenada, regiones ricas en fosfolípidos insaturados que confieren a la membrana una gran fluidez; y balsas lipídicas con alta concentración de colesterol y glucoesfingolípidos, subdivididas éstas a su vez en función de la presencia o no de proteínas de la familia de las caveolinas (Sengupta et al., 2007). De esta manera, la compartimentación de las proteínas Ras no finaliza una vez adheridas a PM, pues hoy sabemos que las distintas isoformas se reparten de manera desigual entre los distintos microdominios. Así pues, mientras que podemos encontrar H-Ras diseminada por todos los microdominios de membrana, N-Ras no localiza en balsas lipídicas caveolares, y K-Ras, se encuentra restringida a dominios de membrana desordenada (Figura 1.21).

Finalmente, para el caso de H-Ras, tanto el estado de activación como el grado de palmitilación, son dos factores capaces de modular la distribución y la difusión lateral entre microdominios de PM. Si bien hasta ahora era generalmente aceptada la hipótesis de que H-Ras inactiva, con mayor afinidad por balsas lipídicas, era inmediatamente translocada a membrana desordenada tras su activación; trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que este modelo no es universal. Así pues, hoy sabemos que la sublocalización de H-Ras depende principalmente de su grado de palmitilación, siendo éste específico para cada línea celular. De esta manera, H-Ras inactiva se ubica preferentemente en balsas lipídicas en aquellas líneas celulares con bajos niveles de palmitilación, mientras que se dispone en dominios de membrana desordenada cuando se encuentra altamente palmitilada. Curiosamente, la activación de H-Ras deriva en ambos casos en la difusión lateral hacia el microdominio opuesto; en un fenómeno para el cual todavía no hemos hallado respuesta (Agudo-Ibanez et al., 2015; Hancock and Parton, 2005; Matallanas et al., 2003; Prior et al., 2001) (Figura 1.21).

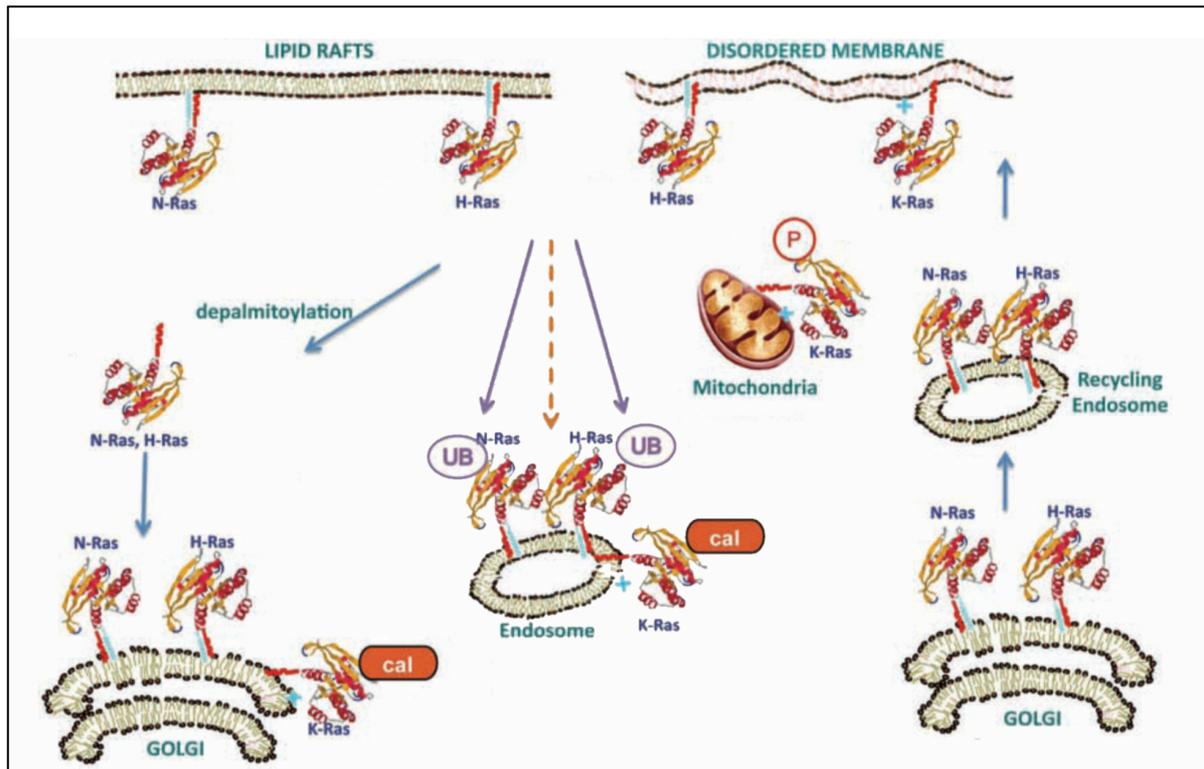
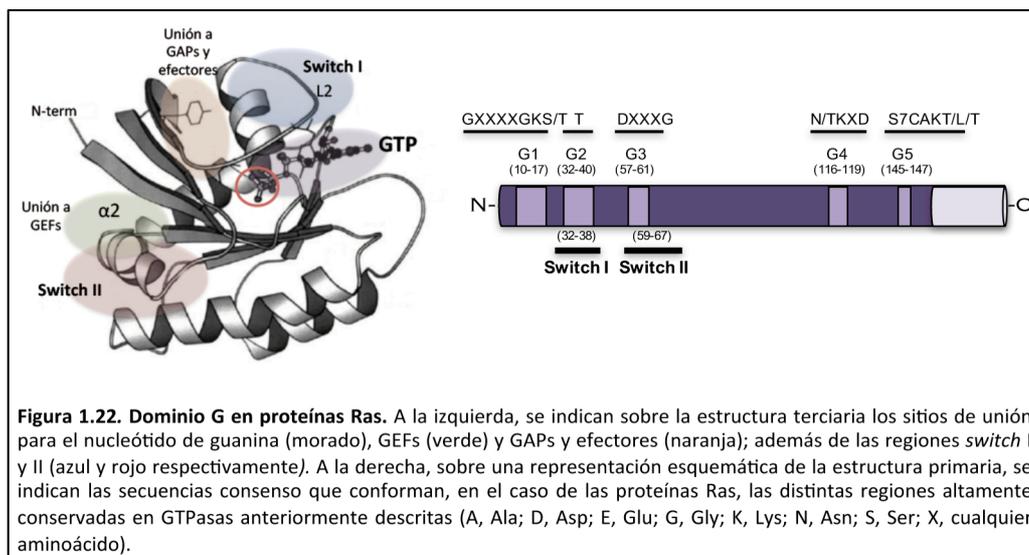


Figura 1.21. Sublocalizaciones de las proteínas Ras. En membrana plasmática (PM), N-Ras se encuentra en balsas lipídicas, K-Ras4B (K-Ras) en membrana desordenada, y H-Ras tanto en balsas lipídicas como en membrana desordenada. H-Ras y N-Ras depalmitilados son dirigidos al GC donde son completamente funcionales (flechas azul claro). H-Ras y N-Ras también pueden inducir señalización de manera transitoria a través de endosomas reciclados (flechas azul claro) o endocíticos (flecha naranja punteada). Además, reacciones de ubiquitinación pueden estabilizar esta asociación a endosomas (flechas púrpura). La unión a calmodulina de K-Ras, promueve su ubicación en endosomas y GC. K-Ras fosforilada se ubica en endomembranas, particularmente mitocondrias, donde al contrario que el resto de isoformas, induce apoptosis. *Adaptado de Arozarena et al., 2011.*

4.2.5. CICLO DE ACTIVACIÓN

Sólo tras la resolución cristalográfica de la estructura tridimensional de H-Ras fue posible describir de manera precisa la estructura del Dominio G y las diferentes conformaciones adoptadas por las proteínas Ras en función del nucleótido al que se encuentran unido (Pai et al., 1989; Tong et al., 1989). De este modo, hoy sabemos que, en el caso de los miembros que conforman la subfamilia Ras, la caja G1 o bucle P (GXXXXGKS/T) se encuentra localizada entre los residuos 10-17. La caja G2 (YDPTIEDSY en H-Ras), está comprendida entre los aminoácidos 32-40. La caja G3 (DXXXG), a su vez, abarca los residuos 57-61. La caja G4 (N/TKXD), se sitúa entre los aminoácidos 116-119. Y, por último, la caja G5 (S7CAKT/L/T), ubicada prácticamente al final del extremo N-terminal entre las posiciones 145-147 (Colicelli, 2004) (Figura 1.22).



Como se ha mencionado anteriormente, *Switch-I*, situado entre los residuos 32-38, constituye el dominio activo a través del cual las proteínas Ras interactúan con sus efectores y con las proteínas GAP. Mientras que *Switch-II*, emplazado entre los residuos 59-67, juega un papel esencial en la hidrólisis del GTP. Además, la interacción de ambos interruptores moleculares con las proteínas GEFs es requisito indispensable para una correcta activación de Ras (Vetter and Wittinghofer, 2001).

En cuanto a la estructura de las proteínas reguladoras de la subfamilia Ras, cabe destacar que todas las proteínas GEFs comparten dos dominios altamente conservados: un dominio REM (Ras Exchange Motif) de 50 aminoácidos, responsable de dar estabilidad a la unión con Ras, y un dominio catalítico CDC25-HD (Dominio homólogo al factor de intercambio CDC25 de *Saccharomyces cerevisiae*) de 250 aminoácidos. Las proteínas GEFs que regulan a las proteínas Ras, se clasifican a su vez en tres grandes familias: Sos, Ras-GRF y Ras-GRP, cada una de ellas con varios miembros (Figura 1.23A). En lo que a proteínas GAPs se refiere, todos los reguladores específicos para Ras comparten un dominio catalítico (RasGAP), de unos 250 aminoácidos. Entre los miembros más característicos nos encontramos con las proteínas p120GAP y la Neurofibromina (NF1) (Figura 1.23B).

constitutivamente activas con un gran poder oncogénico (Bollag and McCormick, 1991; Der et al., 1986; Gideon et al., 1992; Marshall, 1993).

4.2.6. REGULACIÓN SITO-ESPECÍFICA

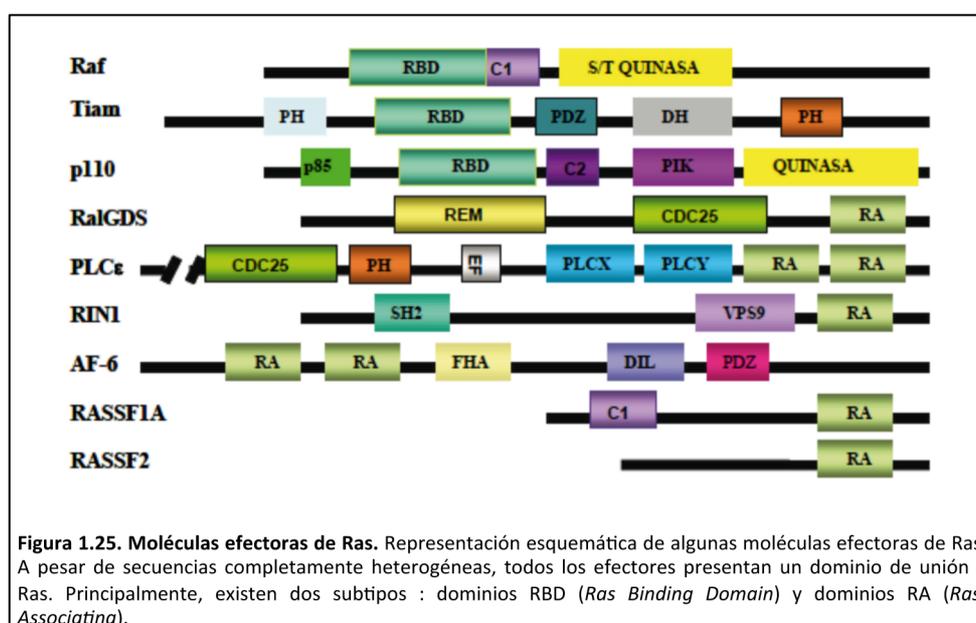
Estando presentes como están las proteínas Ras en múltiples sublocalizaciones celulares, es de esperar que exista una regulación específica en función de la presencia, disponibilidad y funcionalidad de las diferentes proteínas reguladoras que modulan su activación. Así pues, las proteínas Ras estarán sujetas a la regulación de diferentes proteínas GEFs, así como distintas GAPs, en función de su localización.

En un principio, se pensaba que las proteínas GEFs activaban a Ras sólo en membrana plasmática (Quilliam et al., 1995). Sin embargo, una vez demostrado que las proteínas Ras también eran activadas en sistemas de membrana intracelulares, se descubrieron proteínas GEFs específicas para ciertas sublocalizaciones celulares. A modo de ejemplo, Ras es activado por GEFs de la familia Ras-GRP en Complejo de Golgi, mientras que GEFs de las familias SOS y Ras-GRF son las encargadas de la regulación en Retículo Endoplásmico (Arozarena et al., 2004; Bivona et al., 2003; Caloca et al., 2003).

Igualmente, la desactivación de Ras a través de proteínas GAPs, también parece estar sometida a procesos de regulación espacial. Y si bien al principio se creía que ejercían su función preferentemente en el interior de la célula (Mochizuki et al., 2001; Ohba et al., 2003), hoy se asume que esta afirmación no adquiere carácter general pudiendo variar bastante la situación en función del contexto celular. Un claro ejemplo de regulación específica de PM, se da en linfocitos, donde se ha descrito la inactivación de Ras por la proteína GAP-CAPRI dependiente de Calcio (Bivona et al., 2003).

4.2.7. RUTAS EFECTORAS

Actualmente, el registro de moléculas efectoras de Ras sigue abierto e in crescendo. Para que una proteína sea considerada efectora de Ras, debe cumplir tres requisitos. En primer lugar, debe asociarse preferentemente a la forma activa de Ras unida a GTP. En segundo lugar, esta unión debe establecerse a través del dominio efector, produciendo la activación de la proteína efectora, y desencadenando, en consecuencia, una respuesta biológica. Y, por último, inhibiendo la expresión del gen candidato mediante técnicas de “Knocking out”, debieran revertirse, al menos en parte, los efectos de Ras (Malumbres and Pellicer, 1998; Rodriguez-Viciano et al., 2004). Los efectores de Ras comparten un dominio de unión a Ras comúnmente denominado RBD (Ras Binding Domain) (Figura 1.25).



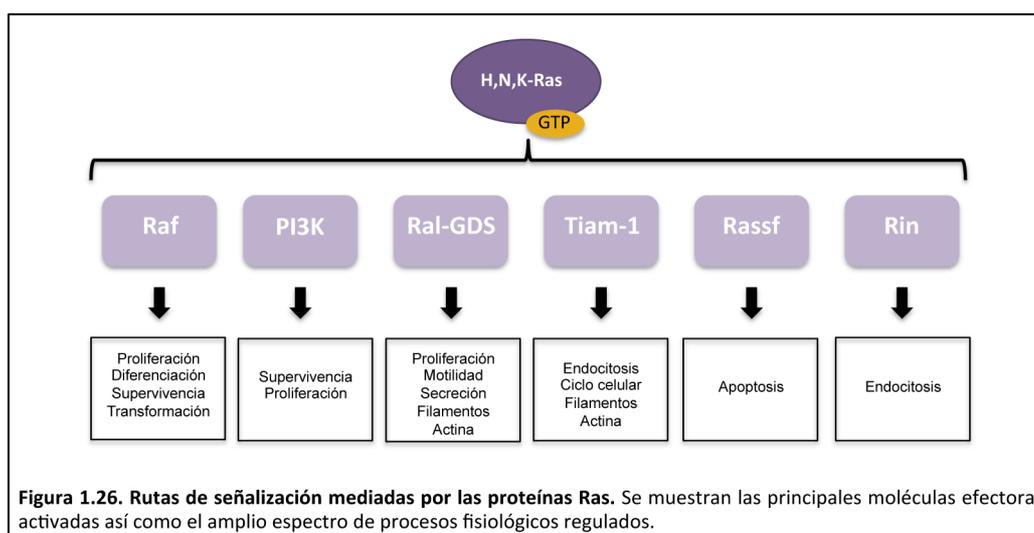
A pesar de mostrar secuencias primarias heterogéneas, todos estos dominios RBD presentan la misma estructura terciaria $\beta\alpha\beta\beta$ capaz de interactuar con el dominio efector de Ras (Herrmann, 2003). A día de hoy, más de diez tipos de proteínas han sido catalogadas como efectoras de Ras. Sin embargo, tres son las rutas mejor caracterizadas: Raf-1, PI3K y RAL-GDS (Repasky et al., 2004) (Figura 1.26).

La ruta Ras-Raf-ERK, a la que se ha hecho referencia en este trabajo, es la ruta mejor validada y caracterizada de entre todas las reguladas por Ras. Esta vía juega un papel esencial en la transmisión de señales mitogénicas a través de receptores tirosina quinasa,

controlando la proliferación, diferenciación y transformación celular (Marais et al., 1995; Marshall, 1995) (Figura 1.26).

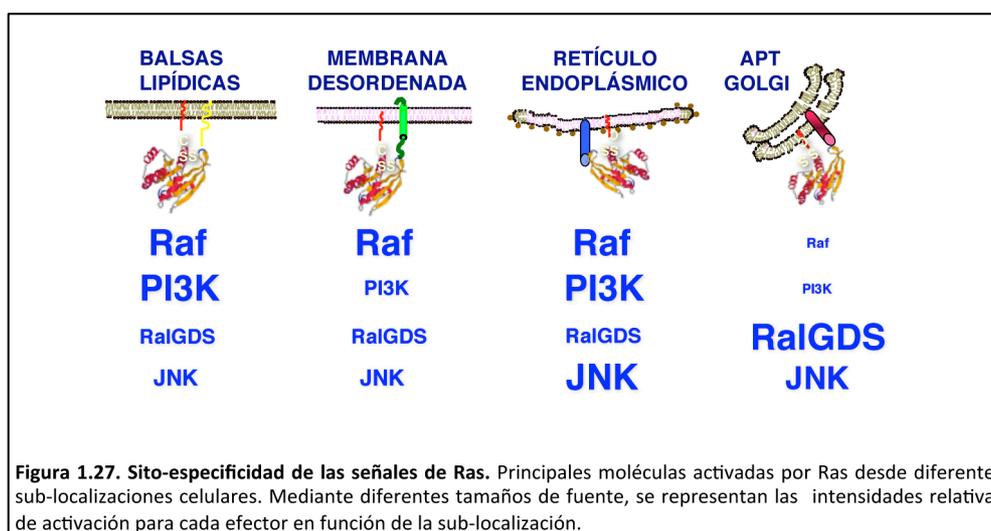
En cuanto a la familia de proteínas PI3K (fosfatidilinositol-3-quinasas), están compuestas por un heterodímero formado por una subunidad catalítica (p110) y una subunidad reguladora (p85), que no se une a Ras. Se encargan de la fosforilación de PIP₂(fosfatidilinositol-4,5-bifosfato) generando PIP₃ (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato), un segundo mensajero que desempeña un papel fundamental en la regulación de la supervivencia y la proliferación celular (Vivanco and Sawyers, 2002) (Figura 1.26).

Por último, RAL-GDS es una proteína GEF implicada en la activación de la proteína G monomérica RAL. En respuesta a factores de crecimiento, RAL-GDS interacciona con Ras, lo cual incrementa su capacidad catalizadora, activando RAL, quien a su vez regula procesos tales como proliferación celular, motilidad, secreción y mantenimiento de la arquitectura celular (Urano et al., 1996) (Figura 1.26).



En resultados previos de nuestro laboratorio, se demostró cómo la compartimentación de H-Ras en distintas sublocalizaciones celulares; determinaba a su vez la selección del efector a activar, así como la intensidad de la señal generada. De este modo, la activación de H-Ras en membrana desordenada, induce preferentemente la ruta Ras-ERK. Sin embargo, si la activación tiene lugar en balsas lipídicas, PI3K también es fuertemente activada. En cuanto a la activación de H-Ras en ER, cabe resaltar que es desde esta sublocalización desde donde se observan los mayores niveles de activación de ERK.

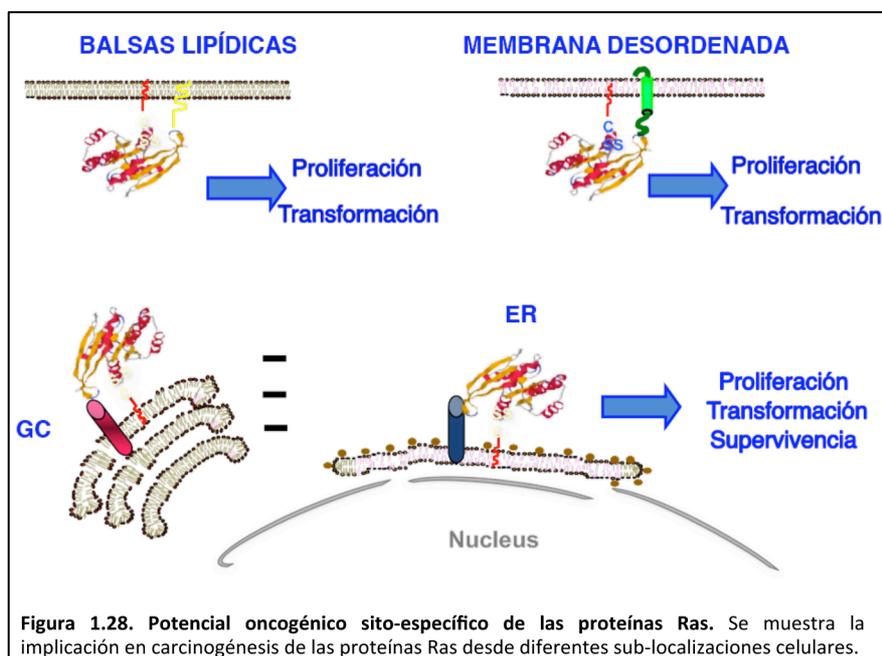
Además, al igual que ocurre en balsas lipídicas, H-Ras es capaz de inducir señalización vía PI3K desde ER. Curiosamente, si nos fijamos en la activación de H-Ras desde GC, los patrones de señalización parecen ser completamente opuestos. De esta manera, mientras que los niveles de activación de ERK y PI3K, son prácticamente despreciables; desde GC se induce una fuerte activación de RAL-GDS (Matallanas et al., 2006) (Figura 1.27).



4.2.8. POTENCIAL ONCOGÉNICO SITO-ESPECÍFICO

La variabilidad descrita entre las señales generadas desde las distintas sublocalizaciones en cuanto a moléculas efectoras se refiere, así como en cuanto a intensidad de señal, se traduce del mismo en un amplio espectro de respuestas biológicas diferentes. Cuando se analizó cómo la compartimentación de Ras afectaba a la supervivencia celular; se observó que las células con H-Ras activado en ER eran capaces de sobrevivir en ausencia de factores de crecimiento, mostrando unos índices de muerte celular significativamente inferiores a cuando H-Ras era activado desde el resto de sublocalizaciones. En cuanto a la capacidad proliferativa de líneas celulares con H-Ras activo, se obtuvieron curvas de crecimiento prácticamente iguales para todas las sublocalizaciones; con la excepción de las líneas con H-Ras activado desde GC, las cuales exhibían una cinética mucho más lenta de crecimiento. Por último, la señalización por Ras activado en GC, vuelve una vez más a ser la excepción si centramos nuestro foco de atención en la capacidad de H-Ras para inducir transformación celular. Así pues, la señalización por Ras desde GC, parece ir por libre tanto en cuanto a moléculas efectoras se refiere, como a las respuestas biológicas generadas por las mismas. Siendo, de esta

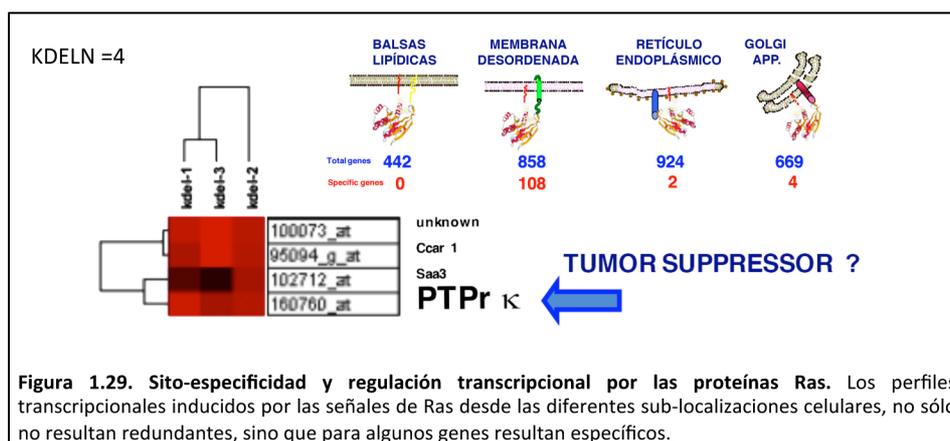
manera, completamente despreciable su aportación a la proliferación y transformación celular inducidas por H-Ras (Matallanas et al., 2006) (Figura 1.28).



4.2.9. REGULACIÓN SITO-ESPECÍFICA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Dado que la compartimentación de las proteínas Ras en diferentes sublocalizaciones celulares era capaz de determinar las rutas bioquímicas efectoras, así como las respuestas biológicas resultado de las mismas, era de esperar una eventual influencia en la expresión génica. De este modo, al analizar los perfiles de expresión originados desde cada una de las sublocalizaciones, se descubrió que, si bien existía un gran solapamiento entre los distintos transcriptomas, cada plataforma de señalización era capaz de generar una firma transcriptómica propia (Agudo-Ibanez et al., 2007). Así pues, H-Ras activo desde membrana desordenada es capaz de modular la expresión de 858 genes, 108 de ellos de manera específica, algunos de ellos con un papel importante en supervivencia y proliferación celular. Por el contrario, desde balsas lipídicas, H-Ras sólo regula la expresión de 442 genes, y ninguno de ellos de manera específica. En cuanto a las señales originadas desde ER, a pesar de ser la localización con mayor impacto en el transcriptoma modulando la expresión de 924 genes, sólo 2 son regulados de manera específica, Spg1 y SMAP1. Sorprendentemente, ninguno de ellos parece guardar relación alguna con el efecto antiapoptótico previamente descrito para las señales de Ras originadas desde RE. Por

último, las señales de Ras originadas en GC regulaban 669 genes, 4 de ellos de manera específica. Resultando cuanto menos interesante que uno de esos cuatro loci codificase para PTPK, un gen previamente descrito como candidato a tumor supresor (Nakamura et al., 2003)(Figura 1.29).



A la vista de los conocimientos adquiridos en las últimas décadas, no cabe ya la menor duda en cuánto a la regulación sito-específica de las señales de Ras como un factor a tener en cuenta a la hora de analizar la variabilidad de dichas señales. Hoy en día, resulta imprescindible abandonar el concepto de la señalización por RAS como un eje lineal único, para empezar e entenderla como la integración de distintas sub-señales sito-específicas. De esta manera, sólo a través de un mayor estudio y conocimiento de la regulación espacial de Ras podremos comprender como un oncogén mutado en el 30% de los tumores humanos, podría estar induciendo la expresión de un gen supresor de tumores.

Lamentablemente, poco se sabe a día de hoy acerca del papel que juegan en cáncer las proteínas Ras desde las distintas sublocalizaciones. Esta incertidumbre, particularmente relevante en endomembranas, resulta intrigante en el caso del Complejo de Golgi. Al inicio de este proyecto, los datos disponibles acerca de las señales de Ras desde GC, se limitaban únicamente a unos pocos estudios en cultivos celulares que habían arrojado resultados poco concluyentes. En este trabajo, trataremos de llenar este vacío mediante el uso de diversos modelos celulares y animales con el fin de determinar el papel en cáncer de las señales de Ras originadas en GC.

II. OBJETIVOS

La ruta de señalización Ras-ERK, de gran importancia en multitud de procesos biológicos, aparece alterada en un alto porcentaje de tumores humanos. Uno de los grandes retos de la biomedicina actual, consiste en conocer los mecanismos mediante los cuales esta ruta es regulada. Como objetivo general de esta tesis, nos planteamos obtener más información acerca de cómo pudiera afectar, la sublocalización celular, al poder oncogénico de las proteínas Ras.

En concreto, los objetivos de esta tesis han sido tres:

- Determinar las respuestas biológicas inducidas por las proteínas Ras cuando son activadas desde el Complejo de Golgi.
- Caracterizar bioquímicamente las rutas de señalización que promueven dichas respuestas biológicas.
- Analizar en un modelo animal el potencial oncogénico de las señales de Ras en función de la especificidad espacial.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DEL ADN

1.1. PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO

La purificación de ADN plasmídico se llevó a cabo a partir de cultivos bacterianos derivados de cepas transformadas de *Escherichia coli* DH5 α . Los cultivos bacterianos se crecieron en un volumen total de 250 ml de medio de cultivo *Luria Broth* (LB) durante 16 horas, a una temperatura de 37°C en presencia del antibiótico de selección adecuado a la resistencia proporcionada por el plásmido (generalmente ampicilina o kanamicina) a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$.

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

También se realizaron purificaciones a pequeña escala de ADN plasmídico, partiendo de 5ml de cultivo bacteriano y siguiendo las instrucciones recomendadas por *Macherey-Nagel*, fabricante del kit de extracción de ADN plasmídico *NucleoSpin Plasmid*. Este kit también consiste en un primer paso de resuspensión del sedimento del cultivo, seguida de una lisis durante un minuto y una neutralización. A continuación, la mezcla neutralizada se pasó por una columna de intercambio, sobre la cual se realizaron una serie de lavados. Por último, el ADN plasmídico se resuspendió en un volumen final de 40µl, y se almacenó a -20°C para su posterior uso.

1.2. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO A PARTIR DE EMBRIONES

Para verificar el correcto funcionamiento de nuestro sistema CRISPr/Cas9, fue necesario analizar, 24 hpi (horas post inyección), el ADN genómico de los primeros cigotos inyectados. Para la extracción de ADN a partir de embriones, seguimos el método de “Choque Térmico”. En primer lugar, se añadieron 50µl de NaOH 50mM a cada embrión y se incubaron durante 30 minutos a 95°C. Transcurrido este tiempo, se mantuvieron en hielo durante 10 minutos. Después, se añadieron 5µl de Tris HCl 1M pH 7.2 y se centrifugaron las muestras a 13000 rpm durante 30 min. Finalmente, transferimos el sobrenadante, con el ADN genómico del embrión, a un tubo de 1.5ml estéril donde se almacenó a 4°C hasta ser utilizado.

1.3. EXTRACCIÓN DE ARN A PARTIR DE EMBRIONES

Para conocer el producto resultante de la maduración del transcrito primario de PTPK en pez cebra, extrajimos ARN de embriones de la raza AB/Note (WT). Tomamos un volumen aproximado de 400µl de embriones en un tubo de 1.5ml y los llevamos con Tryzol a un volumen final de 1ml. Agitamos en vortex durante 30 segundos para homogeneizar la mezcla, y centrifugamos durante otros 30 segundos para recoger los restos adheridos a las paredes del tubo. A continuación, procedimos a la lisis física de los embriones pasándolos por una jeringuilla de insulina y dejamos en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para separar el ARN del resto de productos de la mezcla, usamos el kit “RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen)” siguiendo las especificaciones del fabricante.

1.4. AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN POR PCR

Para obtener el ADN complementario (ADNc) de PTPK en Pez Cebra, primero fue necesario retrotranscribir el ARN extraído de embriones con el método descrito en el apartado 1.3. Para ello, utilizamos el kit de síntesis de cDNA iScript (BioRad). Siguiendo las especificaciones del fabricante, añadimos 1'5 µg de ADN a la mezcla de reacción, y seguimos el siguiente protocolo de reacción: 5 minutos a 25°C, 1 hora a 42°C y 5 minutos a 85°C. Para analizar el Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) generado por nuestro sistema CRISPr/Cas9, usamos como molde el ADN genómico obtenido mediante el protocolo descrito en el apartado 1.2.

Para amplificar los fragmentos de ADN deseados, buscando siempre la mayor fidelidad en la polimerización, usamos el kit Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix (New England BioLabs). La PCR (Polymerase Chain Reaction) comienza con un primer paso de 95 °C durante 3 minutos para desnaturalizar la doble hebra de ADN, seguido de 35 ciclos de [1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 54-58 °C para la óptima hibridación de los cebadores (Tabla 3.1), 1 minuto a 72°C para la elongación de la hebra naciente] y por último 72°C durante 10 minutos, con el fin de completar la elongación de los fragmentos.

Cebadores para la Amplificación del cADN codificante para PTPK	
Directo	ATGGATATCATCATTTTTGAGCACATTGC
Reverso	ATGGTGACGTTGAAGGTGTG
Cebadores para la Amplificación RFLP Confirmación CRISPr/Cas9	
Directo	CACACCTTCAACGTCACCAT
Reverso	TGCGTTTTACTCTCCTTCTCCACTC

Tabla 3.1. Cebadores para amplificación de ADN. Se detallan las secuencias 5'-3' de los cebadores empleados para la realización de la tesis.

Las reacciones se hicieron en un volumen de 50µl y las concentraciones de los reactivos se eligieron según la recomendación del fabricante. Una vez terminada la amplificación, se corrieron las muestras en un gel de agarosa.

1.5. SÍNTESIS DE ARNm “*in vitro*”

Para el silenciamiento génico de PTPK en Pez Cebra, diseñamos un sistema CRISPr/Cas 9 con la herramienta bioinformática “crisp.mit.edu”. Este sistema consta de dos componentes: un “ARNm guía” complementario a la secuencia a editar, y el ARNm de la Caspasa9. Por lo tanto, como paso previo a la inyección, fue necesario sintetizar estos oligonucleótidos *in vitro* y posteriormente purificarlos. Nuestro molde para la Caspasa9, lleva adosado un promotor para la ARN polimerasa Sp6. Siguiendo las especificaciones del fabricante, llevamos a cabo la transcripción con el kit mMACHINE mMACHINE® SP6 (ThermoFisher). En el caso del “ARNm guía”, la secuencia lleva adosada un promotor para la polimerasa T7, por lo que utilizamos el kit MEGashortscript™ T7 (ThermoFisher), por supuesto siguiendo las recomendaciones del fabricante. En ambos casos, el producto de reacción fue purificado con el kit MEGAclean™ Transcription Clean-Up (ThermoFisher) de acuerdo al protocolo recomendado. Finalmente, se corren los productos en un gel de agarosa para ver el grado de conservación y se procede a su cuantificación.

1.6. DIGESTIÓN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN Y PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN EN GELES DE AGAROSA

Para la realización de clonajes y subclonajes, así como para analizar el RFLP generado por el CRISPr/Cas9, uno de los abordajes más empleados ha sido mediante digestiones realizadas con endonucleasas de restricción. Las digestiones de los plásmidos se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones de la casa comercial correspondiente (Fermentas o Invitrogen) en función de la enzima utilizada.

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

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

1.7. CLONACIÓN DE ADN EN VECTORES PLASMÍDICOS

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

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

1.8. PLÁSMIDOS

A continuación, se detallan los plásmidos utilizados para la realización de esta tesis:

Plásmido	Descripción
pCEFL	Se usó para igualar las concentraciones de ADN de cada transfección realizada; Se usó también como control negativo.
pCEFL-HA-H-Ras-G12V	Expresa la proteína H-Ras constitutivamente activa; contiene el epítipo HA.
pCEFL-LCK-HA-H-Ras-G12V	Expresa la proteína H-Ras constitutivamente activa; contiene el epítipo HA; la señal LCK la ubica en balsas lipídicas.
pCEFL-CD8-HA-H-Ras-G12V	Expresa la proteína H-Ras constitutivamente activa; contiene el epítipo HA; CD8 la ubica en membrana desordenada.
pCEFL-KDELN-HA-H-Ras-G12V	Expresa la proteína H-Ras constitutivamente activa; contiene el epítipo HA; el receptor KDELN la redirige a CGC.
pCEFL-HA-N-Ras-Q61L	Expresa la proteína N-Ras constitutivamente activa; contiene el epítipo HA.
pCEFL-HA-RasGRP1	Expresa la proteína RasGRP1; Contiene el epítipo HA.
pCEFL-HA-RasGRP1-S322D	Expresa el mutante fosfomimético de RasGRP1; Contiene el epítipo HA.
pCEFL-HA-RasGRP1-S322A	Expresa el mutante no fosforilable de RasGRP1; Contiene el epítipo HA.
pGEX2T RBD	Plásmido de expresión en bacterias que codifica la proteína de fusión entre GST y el dominio <i>Ras Binding Protein</i> (RBD) de Raf desde el aminoácido 1 al aminoácido 149.
pGEX-2TH RBD	Plásmido de expresión en bacterias que codifica la proteína de fusión entre GST y el dominio <i>Ras Binding Protein</i> (RBD) de Raf desde el aminoácido 51 al aminoácido 131.
pCEFL-KDELN-FLAG-cdc25	Expresa el dominio catalítico cdc25; contiene el epítipo FLAG; el receptor KDELN lo redirige a GC.
pCEFL-SCG10-FLAG-H-Ras-G12V	Expresa la proteína H-Ras constitutivamente activa; contiene el epítipo HA; SCG10 la redirige a TGC.
pCEFL-KDELN-HA-H-Ras-V12-S35	Expresa la proteína H-Ras constitutivamente activa; contiene el epítipo HA; el receptor KDELN la redirige a CGC; la mutación S35 provoca especificidad por las proteínas RAF.
pCEFL-KDELN-HA-H-Ras-V12-G37	Expresa la proteína H-Ras constitutivamente activa; contiene el epítipo HA; el receptor KDELN la redirige a CGC la mutación G37 provoca especificidad por las proteínas Ral-GAPs.
pCEFL-KDELN-HA-H-Ras-V12-C40	Expresa la proteína H-Ras constitutivamente activa; contiene el epítipo HA; el receptor KDELN la redirige a CGC la mutación C40 provoca especificidad por PI3K.
pcDNA3-HA-TIAM1	Expresa la proteína TIAM1; Contiene el epítipo HA.
pcDNA3-HA-RASSF1A	Expresa la proteína RASSF1A; Contiene el epítipo HA.
pcDNA3-FLAG-RASSF1A	Expresa la proteína RASSF1A; Contiene el epítipo FLAG.
pcDNA3-Myc-RIN1	Expresa la proteína RIN1; Contiene el epítipo Myc.
pRK-Myc-RalGDS	Expresa la proteína RalGDS; Contiene el epítipo Myc.
pCMV-FLAG-PTPK	Expresa la proteína PTPK; Contiene el epítipo Myc.
pEF-Myc-Raf1	Expresa la proteína Raf1; Contiene el epítipo Myc.
pcDNA3-MEK1-EE	Expresa la proteína MEK1 constitutivamente activa.

Tabla 3.2. Plásmidos de expresión de proteínas. Se detallan los plásmidos empleados para la realización de la tesis junto a una breve descripción de los mismos.

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

- **SS**: mutaciones realizadas en la región carboxilo terminal de la proteína Ras, dentro de la región hipervariable, de tal manera que se impide la palmitilación de dicha proteína. Afectan a las cisteínas 181 y 184 de HRas, y a la cisteína 181 de NRas, que son sustituidas por serinas. Así se puede dirigir la proteína a la localización subcelular deseada, usando para ello una serie de señales que se detallan a continuación.

- **M1**: se trata de una señal (de 66 aminoácidos) de unión al retículo endoplasmático, procedente del virus de la bronquitis aviar M1 (Swift and Machamer, 1991).

- **LCK**: señal de miristilación de LCK (proteína quinasa residente en las balsas lipídicas de la membrana).

- **CD8**: se trata de la secuencia (de 210 aminoácidos) del receptor humano CD8 α , de unión a la membrana plasmática desordenada (Littman et al., 1985).

- **KDELN**: secuencia del receptor de la proteína KDELR, con la mutación D193N que lo hace permanecer de manera estable en el Aparato de Golgi, impidiendo su tránsito con el retículo endoplasmático (Townesley et al., 1993).

2. CULTIVOS CELULARES

2.1. MÉTODOS DE TRANSFECCIÓN

2.1.1. TRANSFECCIÓN CON LIPOFECTAMINA 2000

En el laboratorio utilizamos dos métodos diferentes de transfección con lipofectamina 2000. Generalmente, siguiendo las especificaciones del fabricante (ThermoFisher), se preparan dos tubos con 250 μ l de medio OptiMEM para cada placa de 60 mm y se añaden por una parte 2 μ g de ADN y por otra 6 μ l de lipofectamina 2000 (3 μ l de reactivo/ μ g de ADN). Se da un pequeño vortex y se espera cinco minutos antes de juntar el medio de los dos tubos y volver a dar vortex. Transcurridos 25

minutos se añade la mezcla a las células, previamente lavadas con PBS, y se deja durante 5 horas con la mezcla y medio DMEM sin suplementar. Transcurridas estas horas, se lava la placa y se añade medio suplementado con 10% de suero fetal.

El siguiente método, es mucho más efectivo para algunos tipos celulares, como por ejemplo las MCF-7. En este caso, se preparan igualmente dos tubos, con 250 μ l de OptiMEM para cada placa de 60 mm. A uno de los tubos se le añade el ADN, al otro 7'5 μ l de lipofectamina 2000. Se da un pequeño vortex y se espera cinco minutos antes de juntar el medio de los dos tubos y volver a dar vortex. Llegado a este punto se espera 25 minutos antes de echarlo a las células, previamente lavadas con PBS. Se deja a las células con esos 500 μ l durante 30-45 minutos, período tras el cual se completa las células con dos mililitros de DMEM con una concentración de suero de 10%. Se dejaron las células 24-48 horas con el fin de que expresaran la proteína exógena.

2.1.2. TRANSFECCIÓN CON LIPOFECTAMINA 3000

Para la transfección de las células PAC-1, resultó necesario transfectar con Lipofectamina 3000 (ThermoFisher). Siguiendo las especificaciones del fabricante (ThermoFisher), se preparan dos tubos con 250 μ l de medio OptiMEM para cada placa de 60 mm. Se añaden por una parte 5 μ g de ADN 10 μ l de reactivo P3000 (2 μ l/ μ g de DNA), y por otra 7'5 μ l de lipofectamina 3000 (1.5 μ l de reactivo/ μ g de ADN). Se da un pequeño vortex y se espera cinco minutos antes de juntar el medio de los dos tubos y volver a dar vortex. Pasados 15 minutos, se añade la mezcla a las células, previamente lavadas con PBS, y se deja durante 24 horas con la mezcla y medio suplementado con 10% de suero fetal.

Posteriormente a cada tipo de técnica de transfección empleada, una vez sometidas a las condiciones deseadas en cada experimento; las células se recogieron en hielo con el tampón de lisis adecuado para cada experimento, o fueron fijadas en paraformaldehído al 4%.

2.2. LÍNEAS CELULARES

A continuación, se detallan por orden de aparición, las líneas celulares utilizadas para la realización de esta tesis:

Línea celular	Origen	Medio de Propagación
MCF7 (ATCC® HTB-22™)	Células epiteliales derivadas de cáncer de mama	DMEM 10% FS
CHL-1 (ATCC® CRL-9446™)	Células epiteliales de melanoma	DMEM 10% FS
HTH83	Celulas derivadas de carcinoma anaplásico de tiroides	DMEM-F12 10% FS
SK-MEL-2 (ATCC® HTB-68™)	Células epiteliales derivadas de melanoma metastático	DMEM 10% FS
HCT 116 (ATCC® CCL-247™)	Células epiteliales derivadas de cáncer colorectal	McCoy's 10% FS
A-375 [A375] (ATCC® CRL-1619™)	Células epiteliales de melanoma	DMEM 10% FS
8505C	Células de tiroides derivadas de carcinoma	DMEM 10% FS
NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™)	Fibroblastos embrionarios de ratón	DMEM 10% CS
HeLa (ATCC® CCL-2™)	Células epiteliales derivadas de cáncer de útero	DMEM 10% FS
PAC	Células de Pez Cebra derivadas de la línea parachordal.	Leibovitz's 15% FS

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

Todas las líneas fueron mantenidas a una temperatura de 37 °C, 5% de CO₂ y una humedad de 95%, salvo las células PAC, que requerían temperaturas de 28 °C.

2.3. TRATAMIENTOS

Durante este trabajo, se han utilizado ciertos tratamientos o fármacos, en función del experimento a realizar, con el fin de inducir una respuesta determinada en las células. En todos los experimentos de estimulación con EGF, las células eran privadas de suero durante 16 horas y, posteriormente, se procedía a la estimulación durante 5 minutos. En los primeros ensayos de inducción de apoptosis, se emplearon células tratadas con *staurosporine* (STA) durante tres horas como punto de control positivo.

Los tratamientos empleados y sus concentraciones son:

TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN	CÉLULAS ESTIMULADAS
EGF	50 ng/ml	MCF-7, NIH-3T3, HeLa
STA	1 μ M	MCF-7

Tabla 3.4. Estímulos químicos utilizados. Se detallan los estímulos utilizados durante la realización de la tesis, detallando la concentración y la línea celular en la que se utilizaron.

3. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

3.1. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

Para la obtención de los extractos totales de proteína proveniente de cultivos celulares, después del tratamiento oportuno si fuera necesario, se eliminó el medio de cultivo de las placas, y se lisaron con el volumen adecuado de un tampón de lisis. Se usó un tampón de lisis constituido por: 20 mM HEPES pH 7.5, 10 mM EGTA, 40 mM β -glicerofosfato, 1% detergente no iónico NP40, 2.5 mM $MgCl_2$, 1mM ortovanadato, 1mM DTT y extemporáneamente 10 μ g/ml aprotinina y 10 μ g/ml leupeptina. Las células se recogieron y se centrifugaron a 13.000 rpm, durante 7 minutos y a 4 °C, para su clarificación. Se separaron los extractos de proteínas del resto de componentes de las células y se procedió a la cuantificación de la concentración proteica de cada lisado.

Para la determinación de la cantidad de proteína se usó el método de Bradford (Bradford, 1975), empleando la albúmina de suero bovino (BSA) para establecer una recta patrón, y se realizó la medida a una longitud de onda de 620 nm en un aparato de ELISA.

Se tomaron aproximadamente 50 µg de proteína, a los que se añadió tampón Laemli 5X (100 mM Tris pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 20 mM DTT y 0.005% azul de bromofenol). Tras hervir las muestras durante cinco minutos, se sometieron a electroforesis en un gel vertical de poliacrilamida (29:1)-SDS (dodecil sulfato sódico) de un porcentaje adecuado al tamaño de la proteína a analizar. Se usó un porcentaje del 12% de acrilamida para las proteínas menores de 45 kDa, del 10% para detectar proteínas entre 45 y 100 kDa, y del 8% para proteínas de gran peso molecular. La electroforesis vertical se llevó a cabo en un tampón con 25 mM Trizma base, 192 mM glicina y 0.1% SDS. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa fijando el amperaje en 400 mA durante el tiempo apropiado en función del tamaño de la proteína, en un tampón de Trizma base 25 mM y 192 mM Glicina, o bien en membranas de PVDF a un voltaje constante de 100 V durante una hora en un tampón Trizma base 25 mM, 192 mM glicina y 10% metanol.

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

detectar una banda allí donde el anticuerpo primario había reconocido de forma específica la proteína de interés.

3.2. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOFLUORESCENCIA

Las células se crecieron hasta subconfluencia sobre cubreobjetos de vidrio de 10 mm de diámetro, que previamente habían sido esterilizados. En el momento de hacer la inmunofluorescencia, las células se lavaron con PBS 1X y se fijaron con una solución al 3.7% de paraformaldehído en PBS 1X, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras la fijación de las células, se realizaron dos lavados con PBS 1X, cinco minutos cada lavado, seguido por un lavado con 0.1 M de glicina y tres lavados con PBS 1X. En el caso en el que las células tuvieran que ser permeabilizadas, se incubaron durante 15 minutos con una dilución 0.1 M de glicina, 0.5% de Tritón X-100 en PBS, seguido por tres lavados de PBS 1X de cinco minutos cada uno. A continuación, las células se incubaron con el anticuerpo primario necesario a una concentración 1/75 o 1/100, durante una hora en una cámara húmeda. Tras tres lavados con PBS, de cinco minutos cada uno, se añadió el anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo: FITC (Conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína) o bien Texas Red, incubándolo durante 45-50 minutos en una cámara húmeda y en oscuridad. Transcurrido ese tiempo, se realizaron dos nuevos lavados, de cinco minutos cada uno, con PBS 1X.

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

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

3.3. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR CO-INMUNOPRECIPITACIÓN

Para el estudio de la formación de complejos entre distintas proteínas se llevaron a cabo experimentos de coimmunoprecipitación *in vivo*. En el caso de cultivos celulares, se guardaron 40 μ l de lisado total ya clarificado y al resto se le añadieron 0'2 μ g del anticuerpo necesario para inmunoprecipitar una de las dos proteínas, procediendo a su incubación a 4°C durante 1 hora. Una vez transcurrido este tiempo, se añadieron 20 μ l de proteína G-Sepharosa (Pharmacia), y se incubaron en agitación a 4°C durante 15 minutos. La proteína G-Sepharosa, se une a la región Fc de las inmunoglobulinas, lo que permite precipitar los inmunocomplejos por centrifugación durante unos segundos. Estos inmunoprecipitados, fueron lavados tres veces: una vez con el tampón de lisis de alta astringencia previamente descrito, y dos veces con PBS 1% NP40. Finalmente, se añadieron 30 μ l de tampón Laemli 2X y las muestras se hirvieron y se resolvieron por electroforesis tal y como se detalla en apartado 3.1.

3.4. FRACCIONAMIENTOS SOLUBLE-PARTICULADO

Para separar la fase soluble de las membranas celulares, se lavaron las células 3 veces con PBS 1X y una vez con HEPES 20mM pH7'4, ambos a 4°C. Las células se recogieron en 500 μ l del mismo tampón HEPES y se mantuvieron en hielo. Se pasaron los lisados 8 veces por una jeringa con una aguja de 9G y 10 veces por una de 19G. Los núcleos se eliminaron mediante centrifugación a 3000rpm durante 5 minutos. Se recogió el sobrenadante y se centrifugó en una ultracentrífuga a 100.000g durante 30 minutos. Se recogió el sobrenadante (fracción citosólica o S₁₀₀), y el precipitado se resuspendió en el mismo volumen de HEPES 20mM pH7'4, 1% Tritón X-100 (fracción particulada o P₁₀₀).

Posteriormente se añadió a cada fracción el volumen preciso de tampón de carga Laemli 5X, se hirvieron las muestras, y se resolvieron por electroforesis tal y como se detalla en apartado 3.1.

3.5. DETECCIÓN DE APOPTOSIS POR MARCAJE CON ANEXINA V

La Anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos con gran afinidad por PS, un componente de la membrana que normalmente está localizado en la cara interna de la membrana celular. Ya al inicio de la apoptosis se transloca a la cara externa de la membrana donde la anexina podrá unirse a ellas.

Para este análisis utilizamos el Guava Nexin Reagent de Millipore, apropiado para citómetros Guava. 48 horas después de la transfección, se recogen las células (tanto las adheridas como las muertas) y se centrifugan, incluidos los controles positivos y negativos, a 1200 rpm durante 5 minutos. Las células se resuspenden a una concentración de entre 2×10^5 o 2×10^6 células/ml en PBS con 1% de BSA. Se toma 100 μ l de la suspensión de células y se añade 100 microlitros del reactivo Guava previamente atemperado. Se deja incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Pasado este tiempo se lleva a analizar al citómetro. Las células que aparezcan en el cuadrante inferior derecho son células en apoptosis temprana, las células en el cuadrante superior derecho son células muertas o en apoptosis tardía.

3.6. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES PARA LOS ENSAYOS DE UNIÓN “*in vitro*”

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

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

Dtiogalactopiranosido) a una concentración de 0.1 mM, incubándolo durante 4 horas más a 37 °C.

En el momento de recoger las bacterias, se centrifugó a 6.000 rpm durante 10 minutos y se resuspendieron en 10 ml de tampón I: PBS 1X, 1% NP40, 10 µg/ml aprotinina y 10 µg/ml leupeptina. Posteriormente se sonicó durante 7 minutos a una amplitud de 80% y 0,9 ciclos. El extracto del sonicado se centrifugó a 3.500 rpm durante 30 minutos a 4 °C, recogiendo posteriormente el sobrenadante al que se le añadió 500 µl de *Glutation-Sepharose* 4B que nos permite recuperar la proteína GST, para lo cual se incubó 3 horas a 4 °C en agitación orbital. La matriz de *Glutation-Sepharose* 4B con la proteína de fusión asociada, se lavó tres veces con el tampón I, anteriormente usado para la resuspensión, dos veces más con PBS frío y una última vez con el tampón MLB: 25 mM Hepes pH 7.5, 150 mM de NaCl, 1% Nonidet-P40, 10% glicerol, 25 mM NaF, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, y 1 mM ortovanadato sódico. La matriz de *Glutation-Sepharose* 4B se diluyó con este último tampón en una relación 1:1 para su conservación a 4 °C. En algunos de los ensayos se utilizó una proteína recombinante comercial para ERK2, fusionada con GST en el extremo amino terminal, obtenida tras la expresión en *E.coli* y tras la activación con MEK1.

3.7. ENSAYOS DE PULL-DOWN

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

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

3.8. ENSAYOS DE ACTIVIDAD QUINASA

Para determinar la actividad quinasa de ERK y AKT se utilizó el ensayo quinasa puesto a punto por Crespo et al., (Crespo et al., 1994b). Se recogieron las células y se lisaron en un tampón de lisis de alta astringencia (20mM HEPES pH 7.5, 10 mM EGTA, 40 mM β -glicerofosfato, 1% detergente no iónico NP40, 2.5 mM $MgCl_2$, 1mM Ortovanadato Sódico, 1mM DTT (dithiothreiol), 10 $\mu g/\mu l$ aprotinina y 10 $\mu g/\mu l$ leupeptina). Tras esto, los lisados se centrifugaron a 13000 rpm durante 8 minutos y los sobrenadantes se incubaron con 0.2 μg de anticuerpo anti HA o anti AU5, en función del epítipo de la proteína transfectada, durante una hora a 4°C. Antes de realizar la inmunoprecipitación, se guardaron 40 μl de lisado total para luego poder detectar por *western-blot* las proteínas estudiadas y comprobar que su actividad en el ensayo quinasa se correlaciona con su expresión en el *western blot*. Se recuperaron los inmunocomplejos con 20 μl de proteína G-Sepharosa (GE), manteniéndose en agitación durante quince minutos a 4°C. Estos inmunocomplejos se lavaron tres veces con PBS 1% NP40, una vez con 100 mM Tris pH 7.5, 0.5 M LiCl y una vez con el tampón de reacción quinasa (12.5 mM MOPS pH 7.5, 12.5 mM β -glicerofosfato, 7.5 mM $MgCl_2$, 0.5 mM EGTA, 0.5 mM NaF, 0.5 mM Ortovanadato Sódico y 1mM DTT. El ensayo quinasa se llevó a cabo en 30 μl totales incluyendo en esa mezcla de reacción 1.5 μl de ATP frío 1mM, 1 μCi ATP gamma 32, 2 μl sustrato MBP 10mg/ml completando la mezcla con tampón quinasa y 1.5 mg/ml del sustrato que corresponda en cada caso: MBP o proteína básica de mielina (Sigma) o PROTEÍNAS DE FUSIÓN GST (purificadas de bacterias). Se incubaron las muestras a 30°C durante 30 minutos y se paró la reacción por adición de tampón de carga Laemli 5X. Finalmente, las muestras se hirvieron y se sometieron a electroforesis tal y como se detalla en el punto 3.1.

3.9. ANTICUERPOS

A continuación, se detallan los anticuerpos utilizados para la realización de esta tesis:

ANTICUERPOS PRIMARIOS	ORIGEN	COMPAÑÍA/REFERENCIA	APLICACIÓN/ DILUCIÓN
p-ERK (E-4)	Ratón	Sta Cruz/sc-7383	WB→ 1:1000
ERK 2 (C-14)	Conejo	Sta. Cruz/sc-154	WB→ 1:1000
AKT-1 (B-1)	Ratón	Sta. Cruz/Sc-5292	WB→ 1:1000
HA probe (F-7)	Ratón	Sta. Cruz/sc-7392	WB→ 1:1000 IF→ 1:100
FLAG M2	Ratón	Sigma_Aldrich/ F1804	WB→ 1:1000 IF→ 1:100
FLAG	Conejo	Sigma_Aldrich/ F7425	IF→ 1:50
HA (Y-11)	Conejo	Sta. Cruz/sc-805	IF→ 1:100
Myc (c-Myc) (A-14)	Conejo	Sta. Cruz/sc-789	WB→ 1:1000
MEK-1 (C-18)	Conejo	Sta. Cruz/sc-219	WB→ 1:1000
p-MEK1/2 (Ser 217/221)			
p-RAF-1 (Tyr 340/341)	Conejo	Sta. Cruz /sc-16806 R	WB→ 1:500 on
Raf-1	Conejo	Sta. Cruz/sc-7267	WB→ 1:1000
H-Ras (C-20)	Conejo	Sta. Cruz/sc-520	WB→ 1:1000
PTPk (H-3)	Ratón	Sta. Cruz/ sc-374315	WB→ 1:500 on
GM130	Ratón	BD Bioscience/610822	IF→ 1:100
TGN46	Conejo	BIO-RAD/AHP1586	WB→ 1:1000 IF→ 1:100
ANTICUERPOS SECUNDARIOS	ORIGEN	COMPAÑÍA/REFERENCIA	APLICACIÓN/ DILUCIÓN
anti- mouse-HRP (IgG de ratón)	Cabra	Biorad/170-5047	WB→ 1:7500
anti- Rabbit-HRP (IgG de conejo)	Cabra	Biorad; 170-5046	WB→ 1:7500
anti-Mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 594	Cabra	Thermo-Fisher/ A-11032	IF→ 1:200
anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 488	Cabra	Thermo-Fisher/ A-11034	IF→ 1:200
anti-Rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor 594	Cabra	Thermo-Fisher/ A-11037	IF→ 1:200
Anti-Mouse IgG Fluorescein (FITC) AffiniPure F(ab') ₂	Cabra	Jackson-InmunoResearch/ 115-096-072	IF→ 1:100-200

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

4. MODELO ANIMAL DE PEZ ZEBRA

Los animales transgénicos se generaron por micro-inyección de embriones de una sola célula utilizando un picoinyector PLI-90 tal (Thermes et al., 2002). En los experimentos de sobreexpresión, se inyectaron 2nl/embrión de ADN plasmídico (25µg/µl). Para el silenciamiento génico, se inyectaron 2nl/embrión de una solución (ARNm-guía (50-75ng/µl) + Caspasa-9 (125-300ng/µl) + mKate2 (50ng/µl) + 1µl Phenol Red).

Posteriormente, los animales se criaron bajo condiciones estándar (Temperatura ambiente de 28,5°C, ciclo de luz/oscuridad de 14/10 horas, con una dieta a base de larvas de *Artemia sp.*) en las instalaciones de la Universidad de Manchester. Los individuos G0 fundadores, se retrocruzaron para generar líneas transgénicas estables.

Para la toma de fotografías, los animales fueron anestesiados con MS222 (Sigma). La toma de imágenes se llevó a cabo con una cámara Canon Digital Ixus 80 IS o con una cámara digital AxioCam MR montada en un microscopio de estereodisección (Zeiss StereoLumar). Todos los experimentos con animales fueron llevados a cabo bajo la licencia y la supervisión de la Oficina de Ética Experimental.

5. ANÁLISIS INFORMÁTICO

5.1. DIGITALIZACIÓN DE LOS WESTERN BLOT

Las bandas obtenidas en las películas tras realizar los *western blot*, fueron digitalizadas mediante el uso del programa informático *Adobe Photoshop CS4*.

5.2. GRÁFICAS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Las gráficas y diseños de esta tesis se han realizado mediante el uso del software *GraphPad Prism 6*, *PowerPoint2011* y *Adobe Illustrator CS5*.

Para el análisis del nivel de confianza o significancia de los distintos experimentos se empleó el software *GraphPad Prism 6*.

5.3. ANÁLISIS DE INMUNOFLUORESCENCIAS

Las imágenes obtenidas en el microscopio fueron posteriormente montadas con el software Fiji-image j.

5.4. ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Para el manejo de las diferentes secuencias, se empleó el programa informático *ApE-A plasmid editor*. Para los análisis de hidrofobicidad, utilizamos el software del Centro de Bioinformática de Estocolmo (SBC) (<http://phobius.sbc.su.se>). Finalmente, para los distintos alineamientos, así como para la búsqueda de dominios conservados, se hizo uso de las herramientas informáticas online del *NIH* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

5.5. BIBLIOGRAFÍA

La bibliografía presente en este trabajo se realizó usando el *software EndNote X8*.

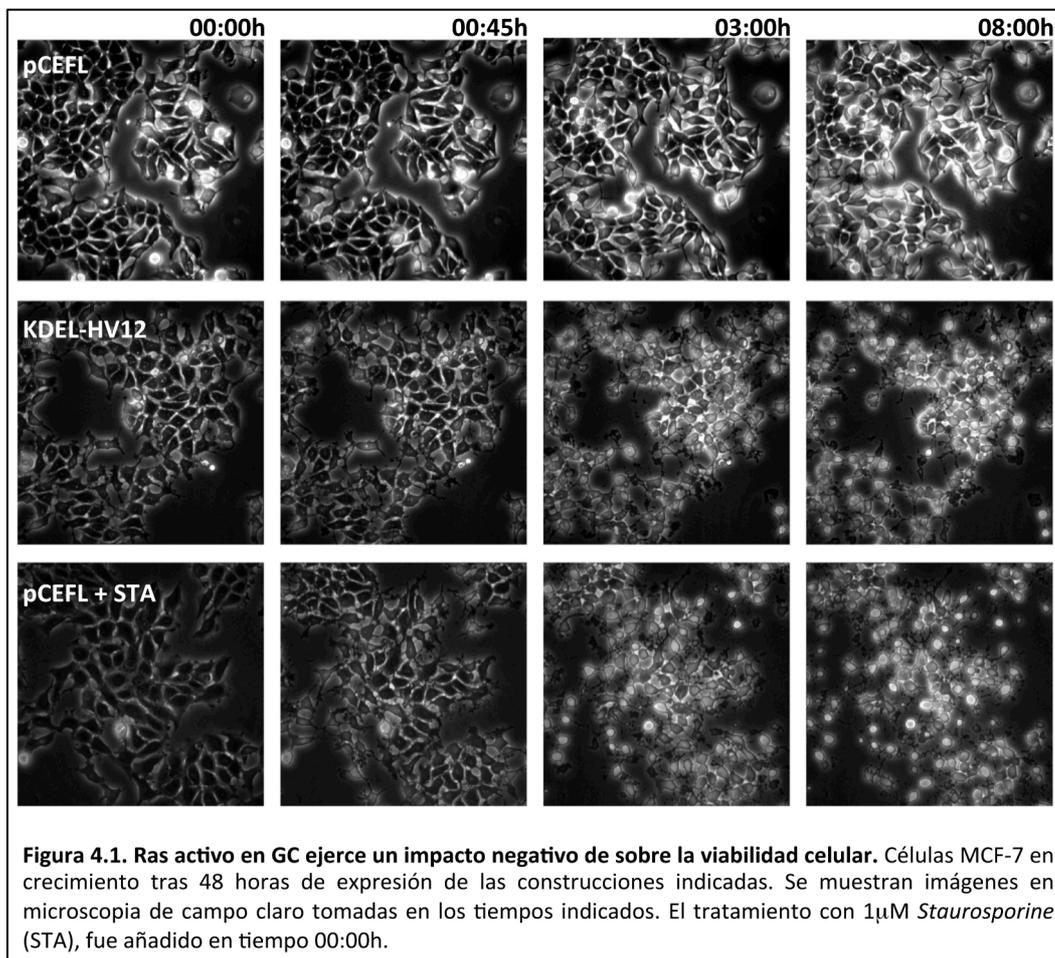
IV. RESULTADOS

1. H-RAS EN GC INDUCE APOPTOSIS

Las señales transmitidas a través de la vía RAS-ERK, resultaban esenciales para la determinación del destino celular. Uno de los factores que influían en la variabilidad de estas señales, residía en los diferentes microambientes en los que éstas se desarrollaban. Sin embargo, no estaba del todo claro cómo el espacio actuaba sobre las señales RAS-ERK con el fin de obtener una respuesta biológica dada. En estudios previos de nuestro laboratorio con células NIH-3T3, mostramos cómo H-Ras activo era capaz de inducir proliferación y transformación desde todas las sublocalizaciones, con la única excepción de las señales originadas desde GC. Además, si bien los niveles de activación de ERK1/2 inducidos por Ras no parecían diferir en exceso entre la mayoría de las sublocalizaciones; las señales de H-Ras originadas desde GC no estimulaban sustancialmente la activación de ERK (Matallanas et al., 2006). Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos resultaban especialmente interesantes, por desconocidas, las señales generadas por H-Ras desde complejo de Golgi y los efectos biológicos que pudieran desencadenar. Con el fin de obtener una visión inicial, decidimos estudiar las señales de Ras desde GC en células MCF-7, dado que esta línea de células epiteliales mamarias presentaba una amplia variabilidad de respuestas a estímulos diferentes (Nagashima et al., 2007).

Para estudiar la señalización por Ras específica de GC, contábamos con una construcción plasmídica de un mutante constitutivamente activo de H-Ras (H-Ras-V12) al que se le había fusionado en su extremo N-terminal el receptor KDELR mutado en la posición N193D (Cole et al., 1996). Esta mutación en el receptor, impedía la redistribución de esta proteína-fusión a ER, proporcionando a KDELN-H-Ras-V12 una ubicación estable en GC previamente utilizada con éxito en nuestro laboratorio (Arozarena et al., 2004; Herrero et al., 2016; Matallanas et al., 2006). Curiosamente, trascurridas 48 horas de expresión, comenzaba a observarse un comportamiento anómalo en las células que derivaba en la muerte total del cultivo 8 horas después. Así pues, la activación de Ras en GC parecía tener un efecto negativo sobre la viabilidad en células MCF-7. De este modo, nos decidimos a comparar el

comportamiento de células sometidas a la sobre-expresión transitoria de esta proteína con la respuesta de cultivos control a un tratamiento con un reconocido agente pro-apoptótico como la *staurosporine* (Antonsson and Persson, 2009). Efectivamente, tras 56 horas de sobre-expresión, las células con KDELN-H-Ras-V12 mostraban un aspecto similar a las tratadas con *staurosporine* (Figura 4.1). Por lo tanto, la activación de Ras en GC podría tener un efecto letal en células MCF-7, en lo que parecía ser un claro ejemplo de muerte celular programada.

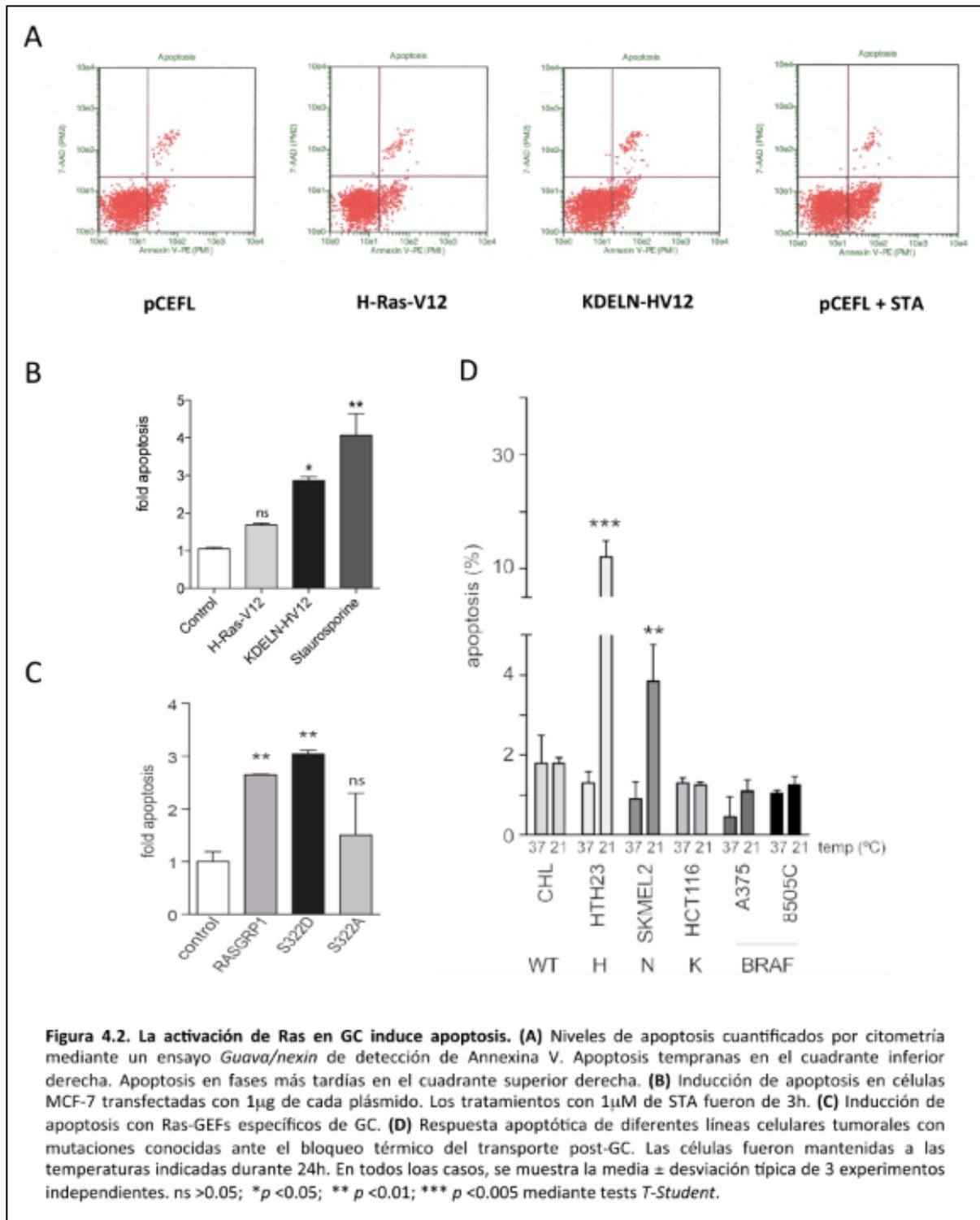


Con el fin de confirmar nuestras sospechas, procedimos a cuantificar por citometría los niveles de apoptosis mediante ensayos *Guava/nexin* de detección de Annexina V (Figura 4.2A). De este modo, se analizó la inducción de apoptosis con diferentes plásmidos. Los valores de células positivas para Annexina V, se relativizaron frente a los del vector vacío pCEFL. Efectivamente, la expresión de KDELN-H-Ras-V12 en células MCF-7 indujo apoptosis a unos niveles cuantitativamente similares al tratamiento con *staurosporine*. En cambio, con H-Ras-V12, si bien se observaba un pequeño incremento en la apoptosis, no se trataba de una respuesta estadísticamente significativa. (Figura 4.2B).

Llegados a este punto, resultaba imprescindible descartar la posibilidad de que se tratase de un artefacto resultante de la expresión de KDELN-H-Ras-V12. De este modo, probamos a ver si era posible obtener una respuesta similar mediante la estimulación del Ras endógeno localizado en GC; demostrando así que la activación de Ras en GC podía resultar apoptótica per se. Con este fin, se observó que era posible inducir apoptosis mediante la sobre-expresión de Ras-GRP1, el factor de intercambio de nucleótidos específico para Ras en GC (Caloca et al., 2003) (Figura 4.2C). Además, hoy sabemos que Ca^{2+} regula positivamente la actividad de RAS-GRP1 en el GC (Bivona et al., 2003) mediante una fosforilación activadora en la serina 332 (Limnander and Weiss, 2011). En consonancia, el mutante fosfo-mimético S332D fue capaz de inducir apoptosis; mientras que el mutante que no se fosforila, S332A, resultó completamente ineficaz a tales efectos (Figura 4.2C).

Por otro lado, ya hemos comentado en este trabajo la importancia de las reacciones de palmitilación de H-Ras y N-Ras ocurridas en GC como paso previo a su transporte a PM (Rocks et al., 2005). Manteniendo los cultivos celulares a 21º de temperatura, era posible detener el transporte post-CG (Saraste and Kuismanen, 1984); por lo que deberíamos poder bloquear el tránsito de las moléculas recién sintetizadas de RAS, e inhibir el transporte entre ambos compartimentos. De este modo, bajo estas condiciones de cultivo, se debería producir una acumulación de Ras en GC que indujese apoptosis cuando Ras fuese activado. Efectivamente, al mantener a 21ºC diferentes líneas celulares tumorales, aumentamos significativamente la apoptosis. Significativamente, este incremento tan solo se produjo en aquellas líneas celulares con mutaciones en H-Ras y N-RAS, isoformas presentes en GC; nunca en líneas

mutantes para BRAF, activador citoplasmático, o K-RAS, isoforma que no se encuentra en GC (Figura 4.2D).

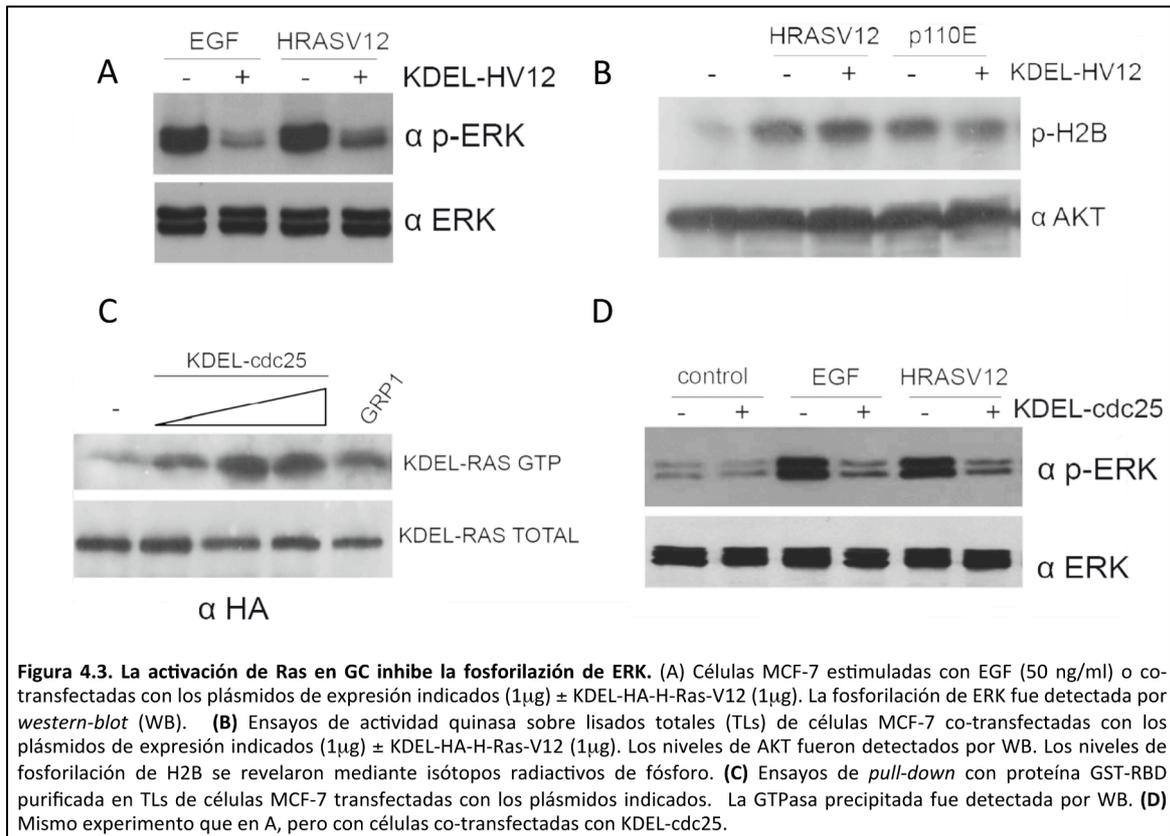


De este modo, nuestros resultados mostraban cómo la mera presencia de RAS activo en GC, tanto de manera endógena como ectópica; resultaba suficiente para inducir una respuesta apoptótica.

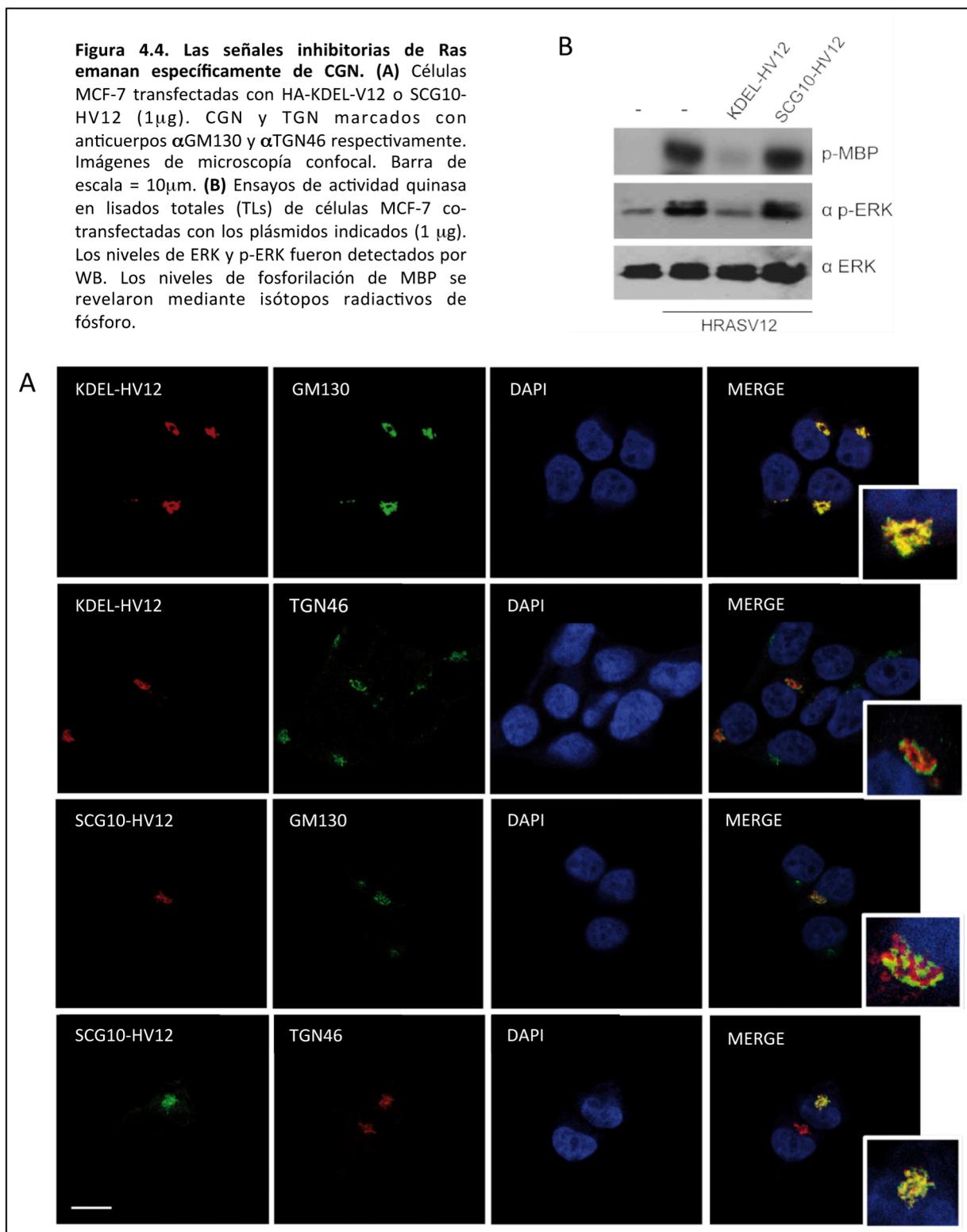
2. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS SEÑALES DE RAS EN GC

A continuación, nos interesamos en determinar cómo las señales de Ras originadas en GC afectaban a la activación de ERK. Por otro lado, teniendo en cuenta los efectos observados en el punto anterior, resultaba interesante estudiar si este proceso pudiera guardar alguna relación con la apoptosis descrita. De este modo, la sobre-expresión transitoria de KDELN-H-Ras-V12 en células MCF-7, no sólo no activaba ERK, como ya habíamos descrito en células NIH-3T3 (Matallanas et al., 2006), sino que era capaz de interferir en la fosforilación de ERK inducida por la estimulación con EGF o la co-transfección con la construcción oncogénica H-RAS-V12 (Figura 4.3A). Además, en ensayos de actividad quinasa de la proteína AKT estimulada por H-Ras-V12 o p110E; la fosforilación de su sustrato, la histona H2B, no se vio alterada al sobre-expresar KDELN-H-Ras-V12. De este modo, demostramos que este efecto inhibitorio de Ras desde GC, resultaba específico para la ruta Ras-ERK, de manera que la otra principal vía de señalización de Ras, la de PI3K, no se veía alterada (Figura 4.3B).

Igualmente, quisimos reproducir estos resultados mediante la estimulación del Ras endógeno localizado en GC. Con el fin de evitar otros efectos colaterales que pudiera inducir RasGRP1 al activar a Ras en otras sublocalizaciones, probamos otra construcción plasmídica de una proteína quimérica del receptor mutante KDELN unido al dominio catalítico cdc25 del factor de intercambio RASGRF1 (KDELN-CDC25) (Herrero et al., 2016). Mediante ensayos de *Pull-Down* con concentraciones crecientes de KDELN-cdc25, obtuvimos concentraciones crecientes de KDELN-H-Ras-GTP hasta alcanzar unos niveles incluso superiores a los obtenidos con Ras-GRP1 (Figura 4.3C). Con esta construcción, pudimos observar cómo la activación de H-Ras endógeno provocaba el mismo efecto supresor sobre la activación de ERK desde GC que la expresión ectópica de KDELN-H-Ras-V12 (Figura 4.3D).

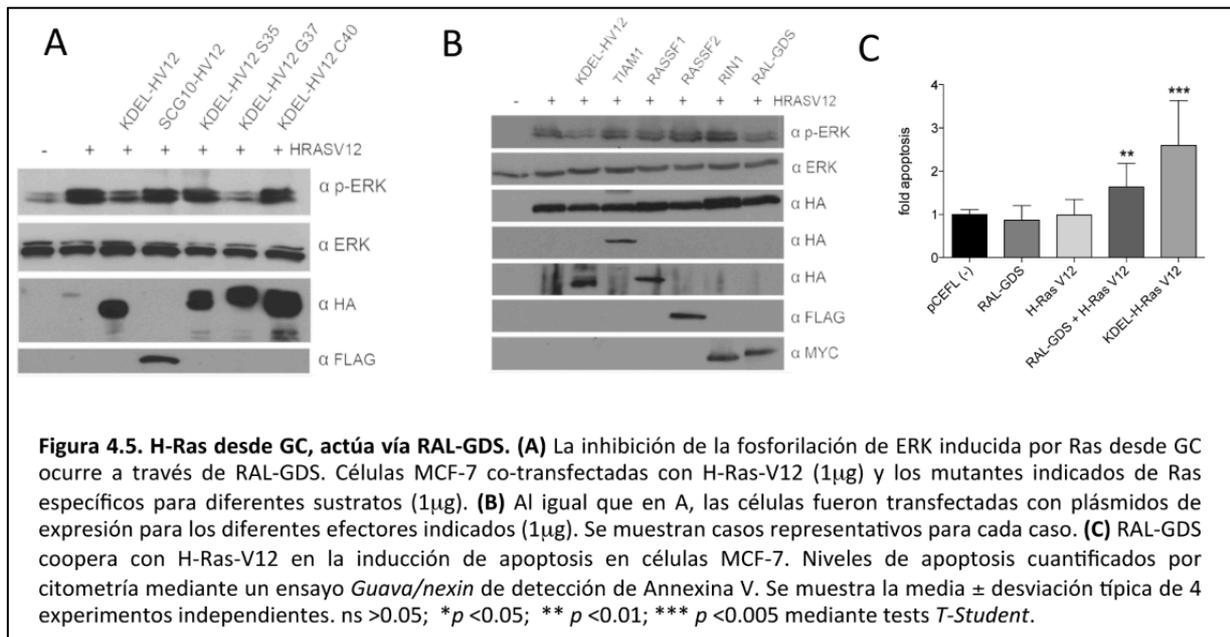


Por otro lado, puesto que el GC se compone de dos redes funcional y estructuralmente distintas: la red *cis* Golgi (CGN) y la red *trans* Golgi (TGN), nos resultó interesante determinar desde cuál de estos dos compartimentos estaba Ras ejerciendo su papel supresor sobre la activación de ERK. Así pues, dado que el receptor mutado KDELN dirige las proteínas a CGN (Cole et al., 1996), necesitábamos diseñar una construcción para conducir específicamente H-Ras-V12 a TGN. Con este propósito, empleamos el extremo N-terminal de la proteína SCG-10 (Di Paolo et al., 1997). Mediante microscopía de fluorescencia, comprobamos cómo KDELN-H-Ras-V12 co-localizaba con GM130, una proteína localizada exclusivamente en CGN. En cambio, esta co-localización no se observaba con TGN46, un marcador de TGN (Figura 4.4A). Por el contrario, SCG10-H-Ras-V12 co-localizaba con TGN46 y no con GM130. Por último, mediante ensayos de actividad quinasa observamos cómo la sobre-expresión de SCG10-H-Ras-V12 fue incapaz de inhibir la fosforilación de ERK, demostrando que el efecto inhibitorio de RAS partía específicamente de CGN (Figura 4.4B).



Para finalizar este punto, tratamos de identificar las moléculas efectoras a través de las cuales, desde GC, Ras era capaz de inhibir la activación de ERK. Con este propósito, añadimos la secuencia KDELN a diferentes formas mutantes previamente descritas de H-Ras-V12 que, debido a mutaciones en su dominio efector, activaban específicamente determinados

efectores y no otros (Rodríguez-Viciano et al., 1997). De esta forma, observamos cómo solamente el mutante G37, que activaba específicamente factores de intercambio de Ral, era capaz de inhibir la activación de ERK; mientras que los mutantes S35 y C40, específicos para C-RAF y PI3K respectivamente, se mostraron completamente ineficaces al respecto (Figura 4.5A). Por otro lado, con el fin de descartar otras rutas efectoras; analizamos también la capacidad para inhibir la activación de ERK de otros efectores de Ras, no caracterizados en cuanto a su respuesta a estas formas mutantes para el dominio *Switch-1*. Así pues, como esperábamos, la sobreexpresión de Ral-GDS fue capaz de interferir en la fosforilación de ERK. Mientras que TIAM-1, RASSF1A, RASSF2 y RIN-1 no produjeron tal efecto. De este modo, todo apuntaba hacia las proteínas RAL-GEFs como únicas responsables de este fenómeno (Figura 4.5B). En esa misma dirección, aunque la sobre-expresión de RAL-GDS no resultó suficiente para estimular una respuesta apoptótica en células MCF-7; su co-transfección con H-Ras-V12 mostró un efecto sinérgico capaz de inducir muerte celular, si bien no al mismo nivel que KDELN-H-Ras-V12, sí de manera significativa (Figura 4.5C).



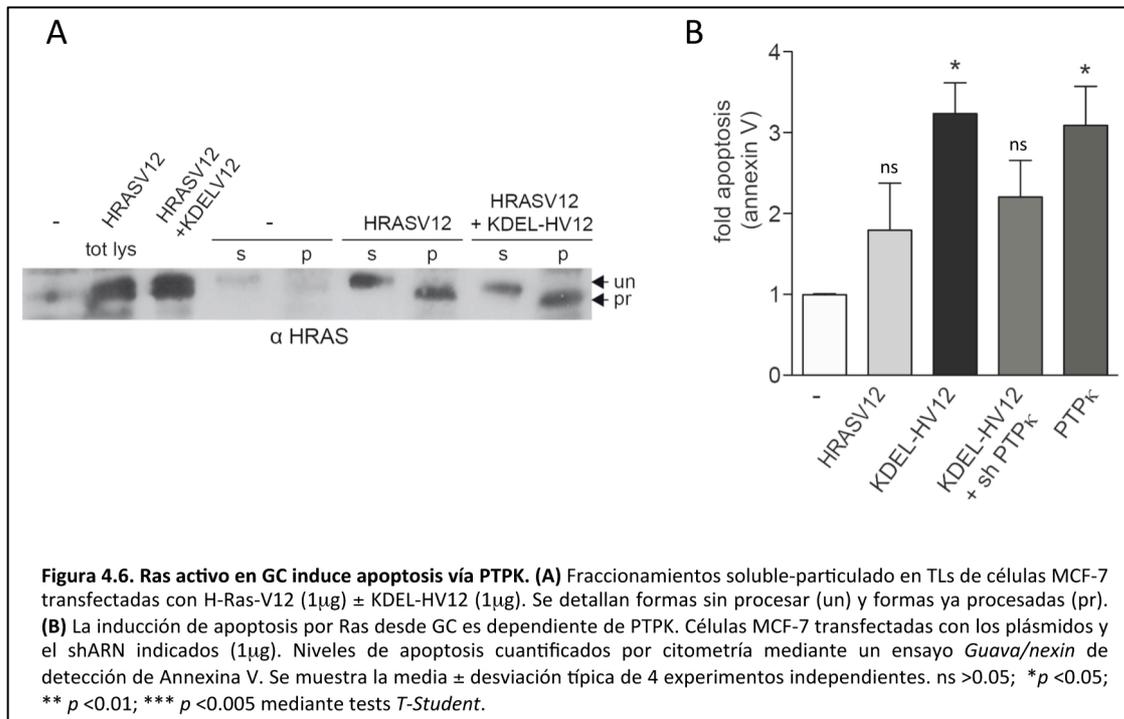
En su conjunto, estos resultados demostraban cómo las señales de Ras originadas desde GC estaban ejerciendo un papel regulador negativo sobre la activación de ERK a través de Ral-GDS. Lo que parecía sugerir que era de este modo, inhibiendo la fosforilación de ERK inducida tanto por estímulos externos, así como por señales procedentes de otras ubicaciones subcelulares, como Ras desde GC inducía apoptosis.

3. PTPK MEDIA EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR RAS DESDE GC

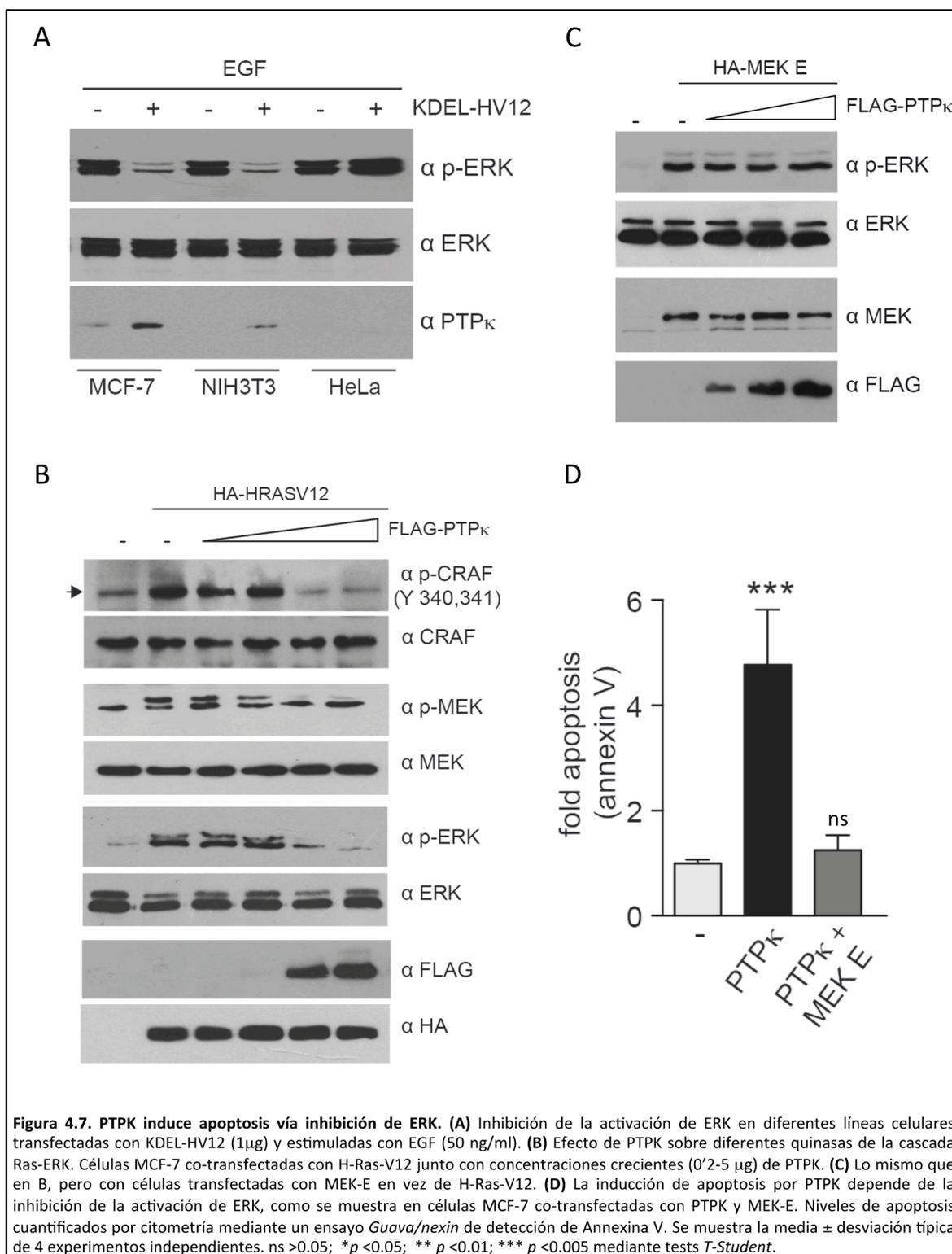
Dado que Ras activo desde GC se mostraba capaz de inhibir la activación de ERK inducida por estímulos externos, así como por la sobreexpresión de H-Ras-V12, cabía la posibilidad de que dicha inhibición de ERK fuese consecuencia de una alteración del tráfico de las proteínas Ras que estuviese impidiendo su acceso a las sublocalizaciones desde donde se activa ERK. En fraccionamientos celulares fase soluble Vs particulada, en los que se observan las formas sin procesar en la fase soluble y las formas ya procesadas en la fase particulada, H-Ras-V12 mostró la misma distribución independientemente de la presencia de KDELN-H-Ras-V12. De este modo, demostramos que la sobre-expresión de KDEL-HV12, no impedía el acceso de H-Ras-V12 a membranas celulares (Figura 4.6A). Por lo tanto, todo parecía indicar que las señales de Ras desde GC estaban ejerciendo su función inhibidora sobre algún proceso posterior de la ruta. Resultaba entonces necesario averiguar el mecanismo por el cual Ras inhibía la activación de ERK a través de Ral-GDS; así como confirmar definitivamente si esta inhibición era el agente causal subyacente a la inducción de apoptosis.

Por otro lado, ya hemos comentado cómo tras examinar el impacto a nivel transcripcional de las diferentes sublocalizaciones de H-Ras, en nuestro laboratorio observamos 4 genes única y específicamente regulados desde GC. Entre esos cuatro *loci*, apareció el gen que codificaba para PTPK (Protein Tyrosin Phosphatase receptor-like Kappa) (Agudo-Ibanez et al., 2007). Esta RPTP, ya había sido previamente descrita como un elemento regulador capaz de defosforilar EGFR en queratinocitos humanos (Xu et al., 2005). Además, también se había observado que la sobre-expresión de PTPK en células MCF-7 conllevaba una reducción en la activación de ERK, tanto en condiciones basales, como tras la estimulación por EGF. Igualmente, PTPK resultaba un mediador esencial para los efectos anti-proliferativos de TGF- β en células MCF-10A (Wang et al., 2005). De este modo, quisimos probar si PTPK estaba involucrada en la inducción de apoptosis por las señales de RAS originadas desde GC en células MCF-7. Efectivamente, nos encontramos con que la sobre-expresión de PTPK era capaz de inducir apoptosis a unos niveles similares a los obtenidos con la sobre-expresión de KDELN-H-Ras-V12. Además, silenciando la expresión de PTPK mediante la co-transfección, junto con KDELN-H-Ras-V12, de un siRNA contra esta fosfatasa;

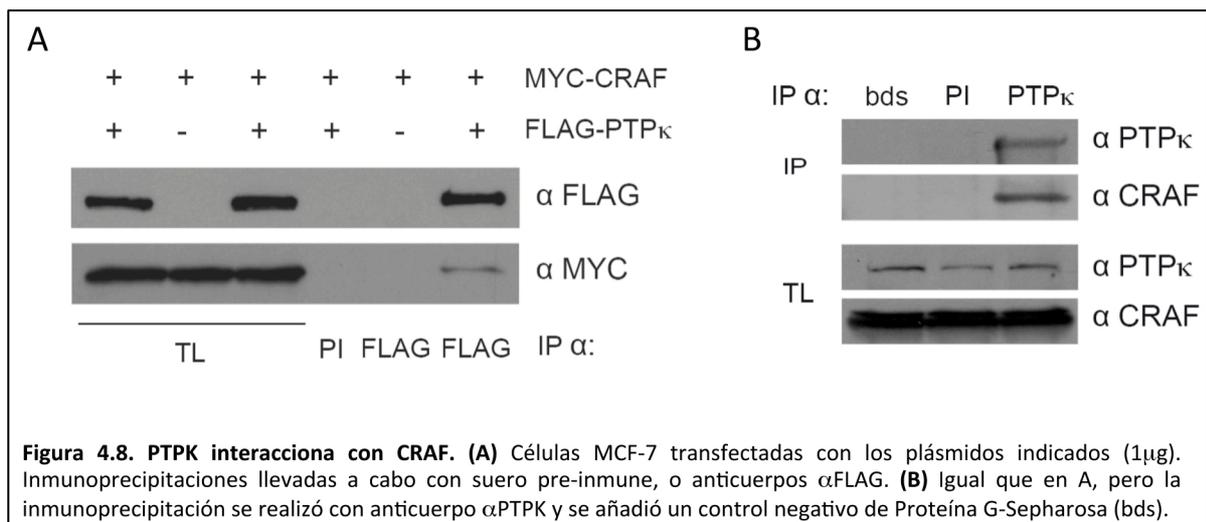
éramos capaces de suprimir la respuesta apoptótica inducida por KDELN-H-Ras-V12 (Figura 4.6B).



No obstante, faltaba por determinar en qué medida la respuesta apoptótica inducida por la expresión de PTPK era consecuencia directa de un impacto negativo sobre la activación de ERK. Con este propósito, analizamos en primer lugar la capacidad de KDELN-H-Ras-V12 para suprimir la activación de ERK mediante la sobre-expresión en diferentes líneas celulares. Curiosamente, ésta sólo se produjo en aquellas líneas en las que la activación de Ras en GC inducía la expresión de PTPK (Figura 4.7A). A continuación, analizamos el efecto de PTPK sobre los niveles de fosforilación de las diferentes proteínas que componen la ruta Ras-ERK. De este modo, observamos que la sobre-expresión de PTPK reducía significativamente la fosforilación de CRAF en residuos de tirosina y, en consecuencia, los niveles de fosforilación de MEK y ERK (Figura 4.7B). Por el contrario, la sobre-expresión de PTPK no era capaz de inhibir la fosforilación de ERK cuando ésta era inducida por el mutante constitutivamente activo MEK-E (Figura 4.7C), confirmando que PTPK estaba actuando a un nivel superior a MEK en la ruta RAS-ERK. Finalmente, fuimos capaces de revertir la apoptosis inducida por PTPK mediante la co-transfección con MEK1-E, demostrando que la inhibición de la activación de ERK era el evento clave para la apoptosis inducida por PTPK (Figura 4.7D).



A la vista de estos resultados, nos dispusimos a explicar el mecanismo mediante el cual PTPK inhibía la activación de CRAF. En trabajos previos de otros laboratorios, se había demostrado que las RPTPs se unen a sus sustratos de manera suficientemente estable como para ser detectados por co-inmunoprecipitación (Walia et al., 2014). Así pues, tratamos de ver si era esto posible para el caso de PTPK y su supuesto sustrato CRAF. Efectivamente, al co-transfectar células MCF-7 con construcciones de ambas proteínas fusionadas a diferentes epítomos, fuimos capaces de detectar la co-inmunoprecipitación de CRAF y PTPK (Figura 4.8A). Esta asociación entre PTPK y CRAF, también fue detectada entre las proteínas endógenas (Figura 4.8B).



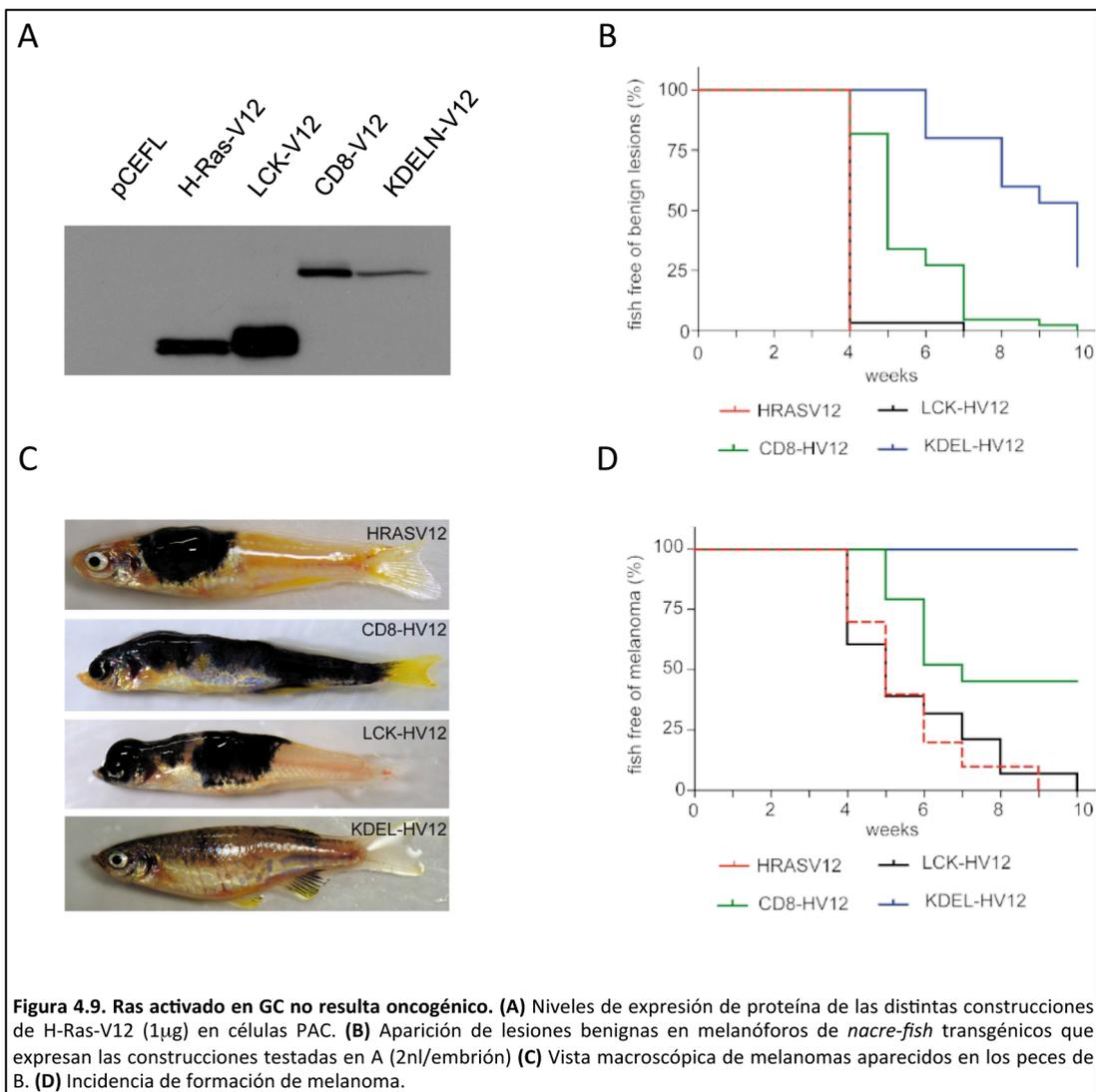
En definitiva, estos datos mostraron cómo a través de la inactivación de CRAF mediante la defosforilación de residuos de tirosina, y por consiguiente inhibiendo la fosforilación de ERK, PTPK era la proteína responsable de la inducción de apoptosis iniciada por la activación de Ras en GC.

4. POTENCIAL ONCOGÉNICO SITO-ESPECÍFICO DE RAS EN EL MODELO ANIMAL DEL PEZ ZEBRA

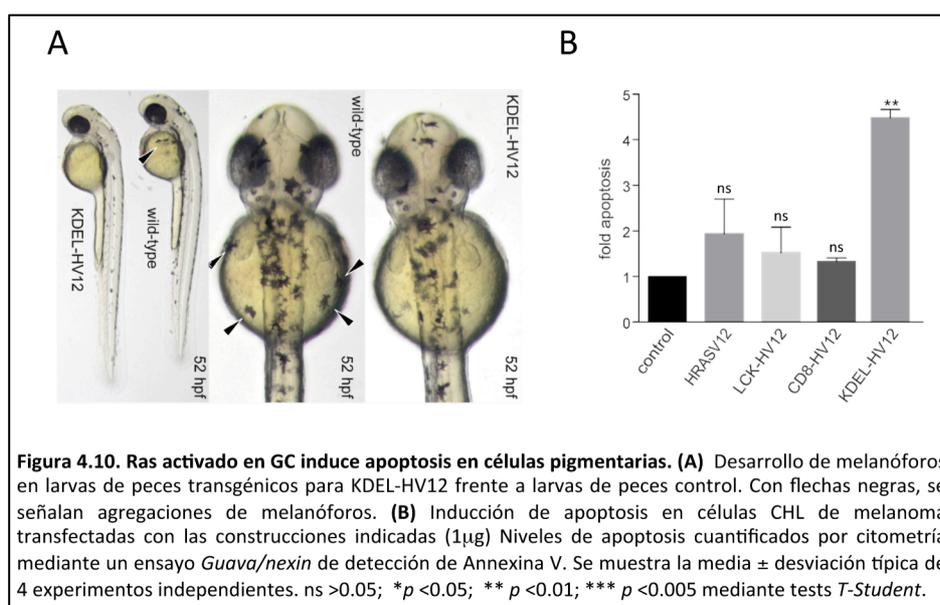
Desde un punto de vista histórico, el papel de las proteínas Ras en GC nunca había sido estudiado en profundidad. Los datos disponibles hasta la fecha, se restringían únicamente a unos pocos estudios en cultivos celulares, con resultados poco concluyentes (Chiu et al., 2002; Hart and Donoghue, 1997; Matallanas et al., 2006). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo, atribuían a las señales de Ras originadas en GC efectos evidentemente incompatibles con el tradicional papel oncogénico de las proteínas Ras. Por lo tanto, quisimos poner a prueba nuestros hallazgos en un modelo de carcinogénesis animal. En nuestro laboratorio, habíamos estudiado previamente con éxito la tumorigénesis inducida por las señales Ras-ERK en Pez Cebra; concretamente en *Jet-Fish* (Herrero et al., 2015). En este modelo, H-Ras-V12 inducía lesiones displásicas, inicialmente benignas; que progresaban de manera espontánea a melanoma invasivo (Michailidou et al., 2009). De este modo, tratando de comprobar si esta capacidad para inducir melanoma de H-Ras-V12 dependía de la sublocalización celular, nos decidimos a probar con otro modelo de melanoma en Pez Zebra: los peces *nacre-fish* (*mif1* $-/-$) (Dorsky et al., 2000).

El factor de transcripción inducido por microphthalmia (MITF), era un gen regulador principal para la diferenciación de melanóforos y resultaba necesario y suficiente para su desarrollo (Levy et al., 2006). De este modo, los peces *nacre-fish* (*mif1* $-/-$) mostraban una completa ausencia de pigmentación corporal (Lister et al., 2001). En este modelo, podíamos testar el efecto de potenciales oncogenes, expresados específicamente en melanóforos, bajo el control del promotor de MITF. Además, la expresión ectópica de MITF, era suficiente para recuperar la pigmentación de estos peces. Por lo tanto, inyectando junto con nuestros genes de interés, un pequeño fragmento de MITF, resultaría fácilmente verificable la eficiencia de nuestras inyecciones. Una vez comprobada la expresión de nuestras construcciones (Matallanas et al., 2006) en células de pez (Figura 4.9A), monitorizamos la melanomagénesis en peces adultos a lo largo de las semanas sucesivas a la micro-inyección en embriones unicelulares. De este modo, se observó que KDELN-H-Ras-V12 indujo lesiones benignas de

una manera mucho menos eficiente que las construcciones de H-Ras dirigida a microdominios de balsas lipídicas (LCK-HV12) y membrana desordenada (CD8-HV12) o que Ras total (Figura 4.9B). Además, mientras que la mayoría de los peces que presentaban lesiones benignas inducidas desde sublocalizaciones de PM, principalmente desde membrana desordenada, desarrollaron posteriormente melanoma; ninguno de los tumores benignos inducidos por KDELN-H-Ras-V12 evolucionó a tumor maligno (Figuras 4.9C y 4.9D).



A continuación, nos preguntamos si el bajo potencial oncogénico de KDELN-H-Ras-V12 en peces estaría relacionado con su efecto negativo sobre la supervivencia celular observado en nuestros modelos celulares. Curiosamente, el número de melanóforos en embriones de peces que sobre-expresaban Ras activo en GC parecía ser significativamente menor respecto al de los embriones control (Figura 4.10A). Sin embargo, cuantificar la apoptosis en Pez Zebra de manera específica para melanóforos resultaba técnicamente muy difícil. Para paliar esta limitación, decidimos sobre-expresar las diferentes construcciones sito-específicas de H-Ras-V12 en células CHL, una línea de células derivadas de melanoma humano. De acuerdo con nuestros anteriores resultados, se observó que la presencia de H-RAS oncogénico en el GC, pero no en otras sublocalizaciones, desencadenaba una potente respuesta apoptótica (Figura 4.10B).



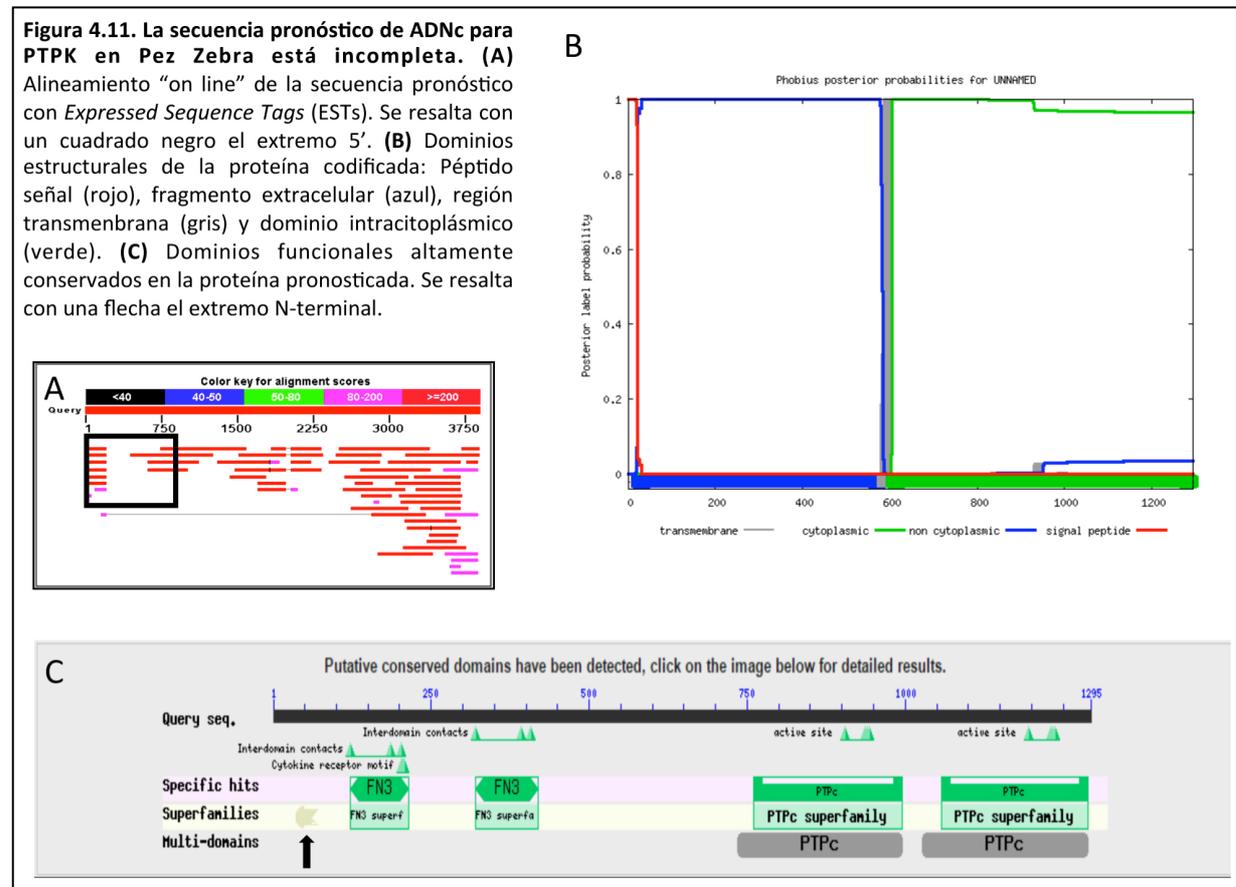
En su conjunto, estos hallazgos demostraban: 1) Que el potencial de RAS para inducir carcinogénesis era estrictamente dependiente de la sublocalización celular y 2) Que RAS constitutivamente activo en GC era incapaz de fomentar la melanomagénesis debido, al menos en parte, a su efecto supresor sobre la viabilidad celular.

5. VALIDACIÓN DEL PEZ ZEBRA COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE PTPK

Estábamos interesados en comprobar si, al igual que en nuestros modelos celulares, PTPK podía guardar alguna relación con la incapacidad de Ras desde GC para inducir la aparición de tumores en nuestro modelo animal. Como paso previo a investigar el papel de PTPK en Pez Zebra, nos pareció importante conocer el grado de conservación de esta proteína con la que, hasta ese momento, sólo habíamos trabajado en mamíferos. A día de hoy, las fosfatasa R2B sólo han sido descritas en vertebrados (Craig and Brady-Kalnay, 2015); lo que sugiere un rol importante en la regulación de procesos imprescindibles en organismos superiores. El Pez Zebra, es un modelo animal en alza cuyo número de publicaciones no ha parado de crecer en los últimos años. Sin embargo, a la hora de trabajar con PTPK, nos planteaba un inconveniente: si bien el genoma de Pez Zebra estaba ya completamente secuenciado (GRCz10 (GCF_000002035.5)), desconocíamos el patrón de maduración del transcrito primario resultante de la transcripción del locus PTPK; e igualmente, desconocíamos la secuencia de aminoácidos de la proteína resultante. A este respecto, lo único con lo que contábamos era con una predicción de ADNc (ZFIN:ZDB-GENE-030131-9834); por lo que procedimos a tratar de validar dicha secuencia.

En un primer paso, al hacer una búsqueda inicial en las bases de datos, descubrimos que el alineamiento de la secuencia pronóstico con “secuencias de expresión conocida” (*expressed sequence tags* “ESTs”), no cubría el 100% de la longitud. Así, observábamos un fragmento no reconocido al inicio de la secuencia de nucleótidos justo en la zona que codificaba para el extremo N-terminal. Este hallazgo, resultó especialmente inquietante si tenemos en cuenta que nos referimos a una proteína transmembrana de tipo receptor con capacidad de unión a ligandos (Figura 4.11A). Sin embargo, si traducíamos la secuencia de nucleótidos a aminoácidos con la ayuda de software bio-informático, podíamos predecir, en función de la polaridad de las diferentes regiones, la estructura tipo de una proteína transmembrana. De esta manera, se observaba un péptido-señal seguido de una región extracelular; separada a su vez por una región transmembrana del dominio intra-citoplásmico de la proteína (Figura 4.11B). Sin embargo, cuando tratamos de identificar dominios funcionales altamente conservados en las proteínas R2B, nuestra “predicción” carecía de las

secuencias codificantes para los dominios MAM e Ig característicos del extremo N-terminal de este tipo de proteínas (Figura 4.11C).



De este modo, la secuencia “ZFIN:ZDB-GENE-030131-9834” podía ser incompleta, y necesitaríamos secuenciar el fragmento no reconocido por “ESTs” si queríamos estar seguros de conocer la verdadera secuencia de PTPK en Pez Zebra. Curiosamente, al tratar de amplificar mediante PCR la secuencia codificante para el extremo N-terminal de PTPK a partir de ARN extraído de embriones; frente a los 770 pares que cabía esperar, obtuvimos un producto de 1277 pares de bases (Figura 4.12A). Así mismo, resultaba interesante que ambas secuencias compartían una identidad del 100%, presentando nuestro producto de PCR una “inserción” de 500 pares de bases en el centro de la secuencia (Figura 4.12B). De este modo, en lugar de una secuencia de 3885 pares de bases, la secuencia codificante para PTPK en Pez Zebra constaba de 4392 pares de bases. Por último, al introducir nuestra secuencia en las bases de datos de ESTs; vimos que toda la secuencia era cubierta por fragmentos de expresión solapantes, de manera que podíamos afirmar que teníamos una secuencia real (Figura 4.12C).

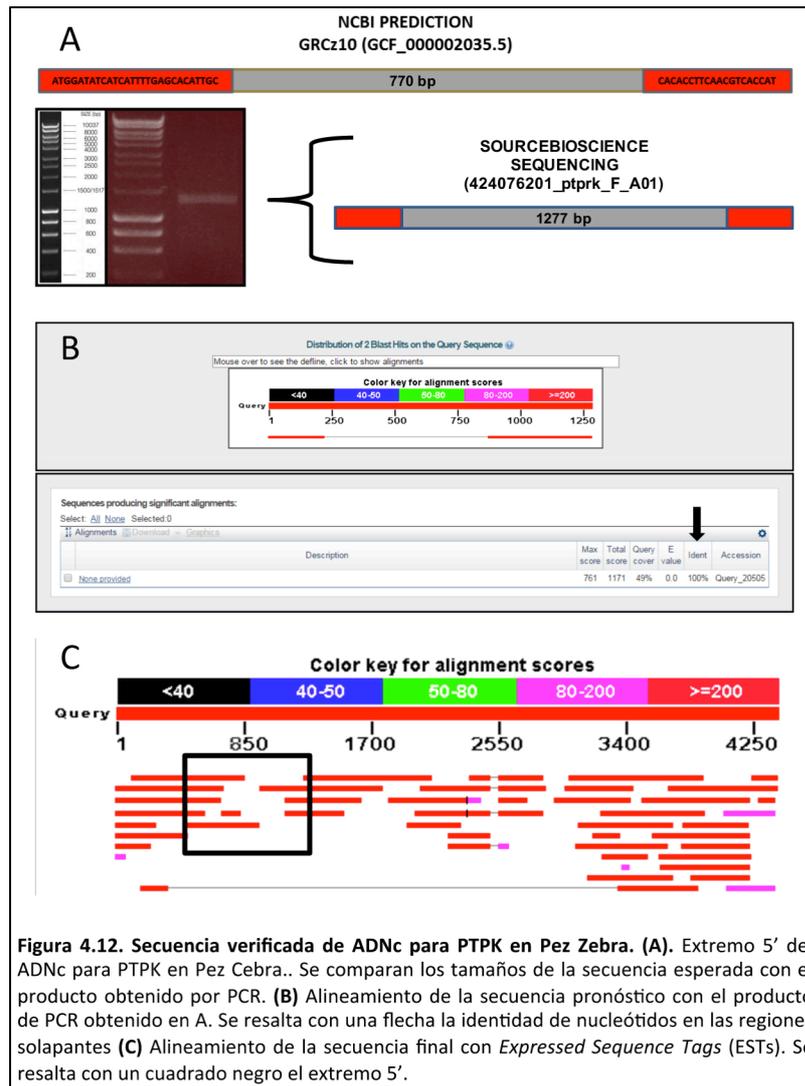
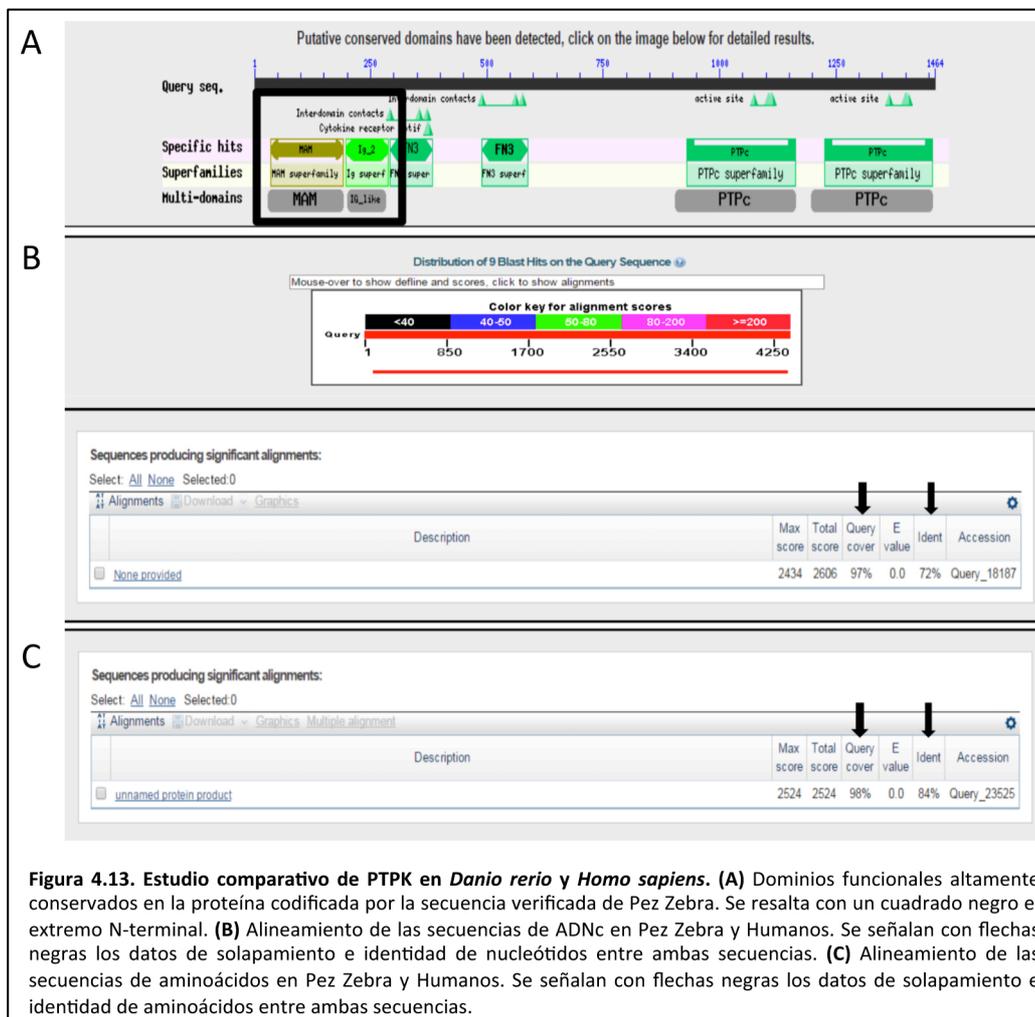


Figura 4.12. Secuencia verificada de ADNc para PTPK en Pez Zebra. (A). Extremo 5' del ADNc para PTPK en Pez Cebra.. Se comparan los tamaños de la secuencia esperada con el producto obtenido por PCR. **(B)** Alineamiento de la secuencia pronóstico con el producto de PCR obtenido en A. Se resalta con una flecha la identidad de nucleótidos en las regiones solapantes **(C)** Alineamiento de la secuencia final con *Expressed Sequence Tags* (ESTs). Se resalta con un cuadrado negro el extremo 5'.

Finalmente, procedimos a comparar las secuencias de PTPK de Pez Zebra y Humano. En primer lugar, al traducir nuestra secuencia de PTPK de Pez Zebra a aminoácidos, obtuvimos una proteína con todos los dominios característicos de las fosfatasas R2B (Figura 4.13A), lo que nos dio ya una primera idea del grado de conservación de estas proteínas. A continuación, cuando comparamos las secuencias de nucleótidos de ambas especies, se observó un 72% de homología en unas secuencias que presentaban un solapamiento del 95% (Figura 4.13B). Por último, al fijarnos en las secuencias de aminoácidos, la identidad entre secuencias aumentó sin perder solapamiento hasta unas cifras superiores al 80% (Figura 4.13C).



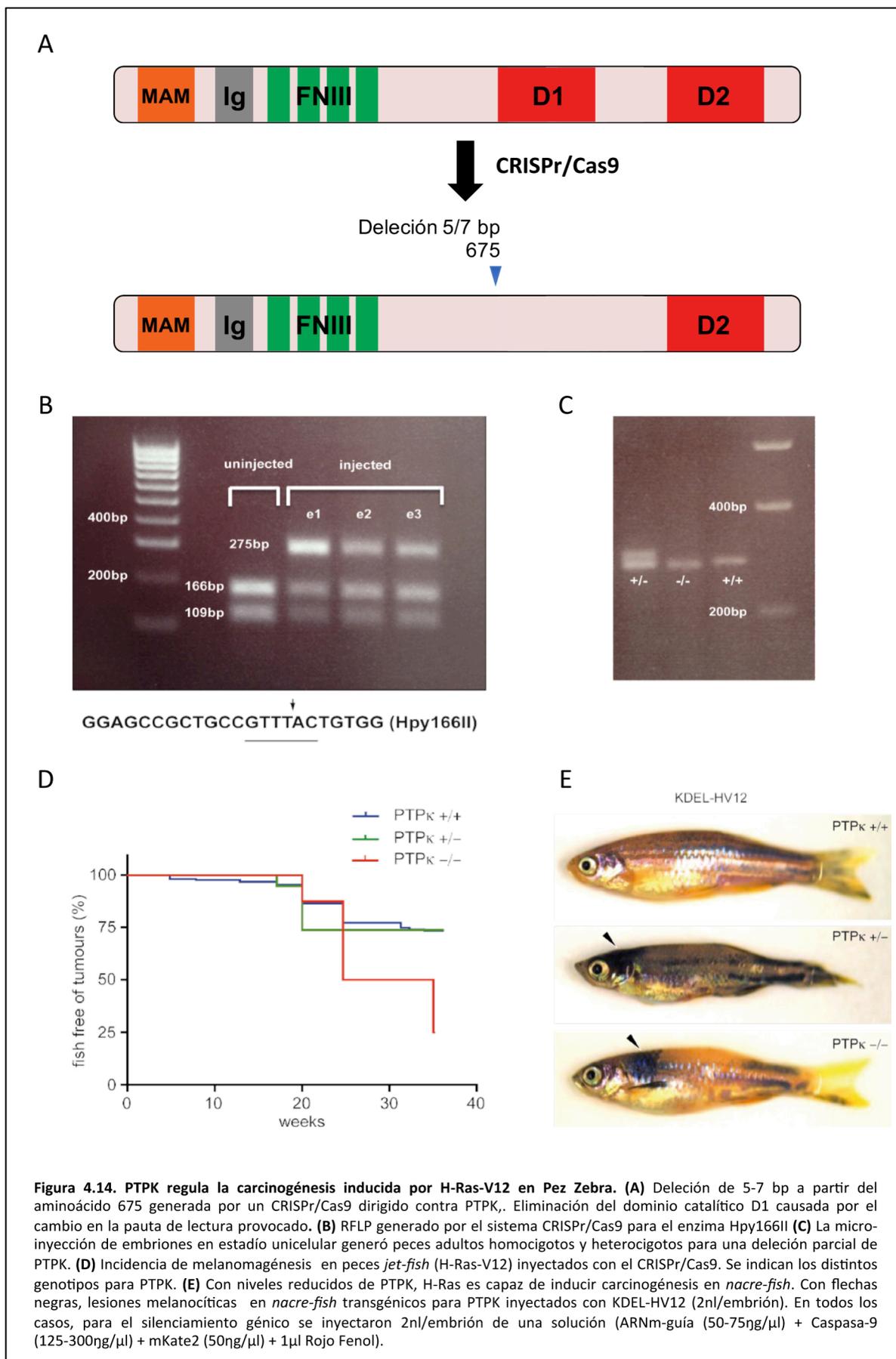
De este modo, pudimos confirmar que PTPK era una proteína altamente conservada en la escala evolutiva y; por lo tanto, el Pez Zebra podía ser un modelo perfectamente válido con el que intentar extrapolar nuestros resultados obtenidos en células humanas.

6. PTPK CONTRARRESTA EL POTENCIAL ONCOGÉNICO DE H-RAS DESDE GC

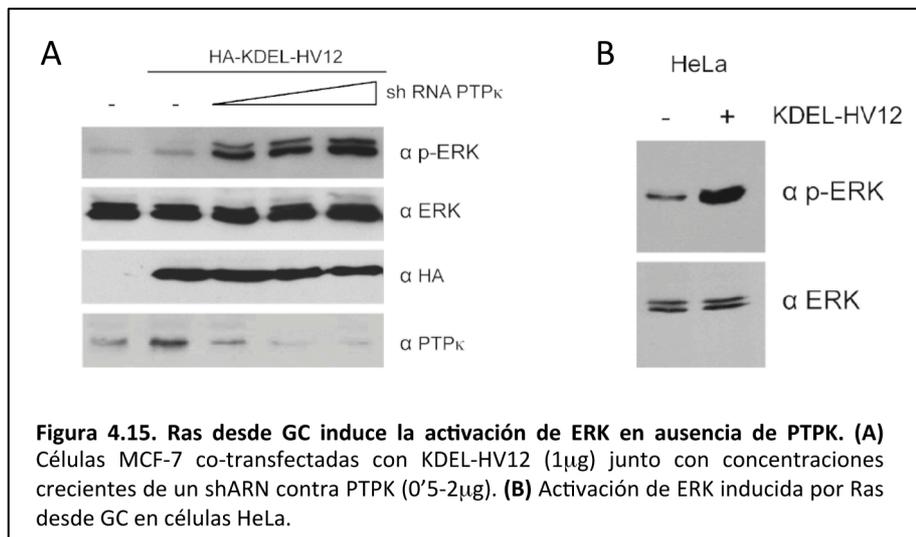
Una vez validado el Pez Zebra como modelo animal de experimentación para PTPK, procedimos a silenciar su expresión para comprobar si estaba implicado en la regulación de la melanogénesis inducida por las proteínas Ras. Con este objetivo, diseñamos un sistema CRISPR/Cas9 capaz de interferir con el locus de PTPK en peces. De este modo, tratamos de generar una delección de 5-7 bp a partir del aminoácido 675 que, debido a un cambio en la pauta de lectura, derivase en la transcripción de una fosfatasa sin dominio catalítico D1 (Figura 4.14A). Como primer punto de verificación, comprobamos el correcto funcionamiento de nuestro CRISPr/Cas9 dirigido contra PTPK mediante un RFLP para el enzima Hpy166II (Figura 4.14B).

A continuación, con el fin de averiguar si PTPK estaba ejerciendo la misma función que en nuestros modelos celulares, decidimos hacer un primer experimento en la raza *jet-fish* (Michailidou et al., 2009). Como ya hemos mencionado anteriormente, esta raza de Pez Zebra presenta la mutación H-Ras-V12, de manera que un 37% de los individuos presentan tumoración espontánea. Mediante la micro-inyección de nuestro sistema CRISPR/Cas9 en embriones unicelulares, generamos individuos homo y heterocigotos para la delección parcial de PTPK (Figura 4.14C). Así pues, la ausencia total de PTPK resultó en un pronunciado incremento en la incidencia de tumores espontáneos hasta un 75%, a diferencia de los peces PTPK +/-, que mostraron la misma frecuencia tumoral que los peces control (Figura 4.14D). De este modo, todo parecía indicar que PTPK podía estar ejerciendo en pez Zebra un rol como supresor de tumores similar al que habíamos observado en células humanas.

Nos decidimos entonces a tratar de silenciar la expresión de PTPK en *nacre-fish* (Dorsky et al., 2000). Con este objetivo, se generaron individuos homo y heterocigotos para la delección de PTPK. Los huevos producto del apareamiento de estos animales, fueron posteriormente inyectados con la construcción KDELN-H-Ras-V12. Curiosamente, la ausencia de un único alelo de PTPK, al contrario que en el experimento anterior, fue suficiente para posibilitar la melanogénesis inducida por KDELN-H-V12, sin duda mucho más evidente con la ausencia total de fosfatasa en peces PTPK -/- (Figura 4.14E).



A raíz de estos resultados, todo parecía sugerir que, en ausencia de PTPK, las señales de Ras originadas en Golgi recuperaban su potencial oncogénico al no resultar inhibida la activación de ERK. Con el propósito de confirmar si éste era el caso, co-transfectamos KDELN-H-Ras-V12 en células MCF-7 con concentraciones crecientes de un shRNA contra PTPK. Efectivamente, observamos cómo una reducción progresiva de los niveles de expresión de PTPK venía acompañada de un aumento de los niveles de fosforilación de ERK (Figura 4.15A). Finalmente, en células HELA, en las que ya habíamos visto que no se detectaba expresión de PTPK (Figura 4.7A), KDELN-H-Ras-V12 inducía *per se* una potente fosforilación de ERK (Figura 4.15B).



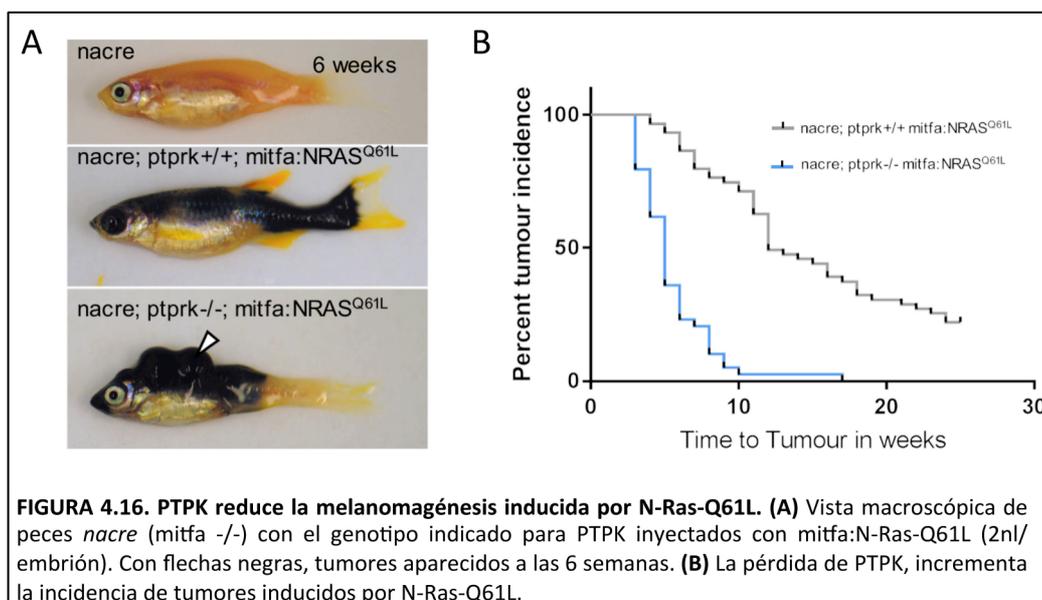
En definitiva, al igual que en nuestros modelos celulares; PTPK jugaba en Pez Zebra un papel central en la regulación de las señales antitumorales mediadas por H-Ras desde GC. En consecuencia, el silenciamiento de la expresión de PTPK conllevaba la recuperación del potencial oncogénico de dichas señales.

7. POTENCIAL ANTITUMORAL DE PTPK EN MELANOMA

Gracias a los experimentos descritos en Pez Zebra, habíamos logrado trasladar, a un modelo animal, nuestros resultados en cultivo celular. De este modo, pudimos analizar el potencial oncogénico de las señales de H-Ras originadas desde las distintas sublocalizaciones en el modelo previamente establecido de *nacre-fish* (Dorsky et al., 2000). Además, nuestro sistema de edición genética con CRISPR/Cas9 en Pez Zebra, nos había permitido investigar la implicación de PTPK en dichas señales, tanto en *jet-fish* (Michailidou et al., 2009), como en

nacre-fish (Dorsky et al., 2000). No obstante, con el fin de completar nuestros estudios, y teniendo en cuenta que N-Ras presenta poblaciones funcionales en GC capaces de activar cascadas de señalización (Chiu et al., 2002); quisimos analizar el comportamiento N-Ras y su posible relación con PTPK en nuestro modelo de Pez Zebra.

Para el caso del Pez Zebra, los genes ortólogos a las secuencias de Ras en humano guardaban el mismo grado de parentesco tanto en N-Ras como en H-Ras (Michailidou et al., 2009). Además, ya había sido descrito cómo las formas oncogénicas tanto de H-Ras como de N-Ras resultaban igualmente eficaces en la inducción de melanoma en un modelo de piel humana reconstituida (Chudnovsky et al., 2005). No obstante, dado que se habían descrito mutaciones de N-Ras en un 15-20% de los melanomas (Chin et al., 2006), y se había observado su implicación en fenómenos de aparición de resistencia a medicamentos (Nazarian et al., 2010), quisimos analizar el comportamiento del mutante constitutivamente activo N-Ras-Q61L en nuestro nuevo modelo de Pez Zebra. De este modo, analizamos la inducción de melanoma mediante la micro-inyección con N-RAS-Q61L en peces *nacre-fish* y en *nacre-fish* PTPK KO (Figura 4.16A). Tras mantener los peces bajo seguimiento las semanas posteriores a la micro-inyección, se observó cómo la pérdida de PTPK aumentaba significativamente la velocidad de formación de tumores, así como la ratio de aparición de los mismos (Figura 4.16B)



A tenor de nuestros experimentos, podíamos inferir que PTPK era capaz de ejercer en Pez Zebra un papel regulador sobre la melanomagénesis inducida por H y N-Ras.

V. DISCUSIÓN

1. RAS EN GC INDUCE APOPTOSIS

Hacía ya tiempo que se sabía que, para ser funcionales, las proteínas Ras debían estar asociadas a la membrana plasmática (Willingham et al., 1980). Sin embargo, durante las últimas décadas habían surgido una gran cantidad de estudios estableciendo firmemente que, además de en membrana plasmática, las proteínas RAS estaban también presentes y eran funcionales en sistemas de endomembranas tales como el retículo endoplásmico, los endosomas y el Complejo de Golgi (Fehrenbacher et al., 2009). Así pues, resultaba imprescindible dejar de concebir las señales de Ras como un eje lineal y único, para comprender que no eran sino el resultado de la integración de diferentes sub-señales sito-específicas. De este modo, se había descubierto que las proteínas Ras, en sus diversas sublocalizaciones, estaban sujetas a la regulación sito-específica de diferentes factores de intercambio (Arozarena et al., 2004; Bivona et al., 2003; Caloca et al., 2003), que activaban diferentes rutas efectoras (Inder et al., 2008; Matallanas et al., 2006), y que inducían distintos programas genéticos (Agudo-Ibanez et al., 2007). Sin embargo, poco se conocía aún acerca del rol que jugaban cada una de las sublocalizaciones en las distintas respuestas biológicas mediadas por Ras. Este desconocimiento, resultaba particularmente llamativo para el caso de las endomembranas. De este modo, si bien estaban bastante caracterizadas las señales de RAS generadas en los diferentes microdominios de membrana plasmática, así como su participación en procesos carcinogénicos (Hancock and Parton, 2005); las señales de RAS procedentes de endomembranas, sobremanera las de GC, seguían perteneciendo a un terreno prácticamente desconocido.

Con estos antecedentes, la primera cuestión que se decidió abordar en este trabajo fue analizar las respuestas biológicas que Ras activado en Golgi pudiera desencadenar. En estudios recientes de nuestro laboratorio, mostramos de un modo muy preliminar cómo H-Ras, constitutivamente activo, podía inducir apoptosis en la línea celular MCF-7. Los resultados obtenidos parecían, sugerir que este efecto pudiera ser debido a la activación desde GC (Herrero et al., 2016). En este trabajo, coincidiendo además con otros estudios en virus oncolíticos (Garant et al., 2016), demostramos cómo en células MCF-7 la sobre-activación de H-Ras en GC, inducía la entrada en apoptosis a unos niveles muy similares a los provocados por un reconocido agente pro-apoptótico como la *staurosporine* (Antonsson and

Persson, 2009). Además, de acuerdo con estudios anteriores (Limnander and Weiss, 2011), nuestros resultados con los mutantes de RasGRP1 parecían confirmar que esta vía era estimulada por Ca_{2+} ; si bien parecen necesarios más experimentos para poder asegurar tal afirmación. A continuación, con nuestros experimentos de acumulación de Ras en GC en diferentes líneas celulares, demostramos que la respuesta apoptótica observada no era un fenómeno únicamente limitado a la línea celular MCF-7. A este respecto, cabe recordar la importancia de la palmitilación como la modificación postraduccional con mayor relevancia en la regulación de las funciones, la localización y el tráfico intracelular tanto de H-Ras como de N-Ras. Como ya se ha comentado anteriormente en este trabajo, existe en las células un ciclo constante de palmitilación/depalmitilación por el cual, H-Ras y N-Ras, son palmitiladas en GC como paso previo a su transporte a PM; desde donde serán enviadas de vuelta al GC previa depalmitilación (Rocks et al., 2005). Así pues, existen reservas de H-Ras y N-Ras, nunca de la isoforma más oncogénica K-RAS; que residen en GC y son capaces de activar cascadas de señalización (Chiu et al., 2002). Además, estaba firmemente establecido que la disrupción de este ciclo de palmitilación/depalmitilación conducía a una distribución no específica de H-Ras y N-Ras a endomembranas y disminuía la señalización desde la PM (Dekker et al., 2010). De este modo, ya se había descrito cómo inhibiendo la palmitilación de N-Ras se producía una reducción del crecimiento inducido por N-RasG12D en células hematopoyéticas (Xu et al., 2012). En consonancia, resultaron especialmente interesantes nuestros experimentos en los que observamos como en la línea celular SKMEL-2, portadora del mutante constitutivamente activo N-Ras-Q61L, la acumulación de Ras en GC también inducía apoptosis. A la vista de estos resultados, todo parecía indicar que tanto N-Ras como H-Ras, eran capaces de inducir apoptosis desde Golgi. No obstante, cabría preguntarse cómo la activación de Ras en GC se había mostrado previamente incapaz de inducir apoptosis en células NIH-3T3 (Matallanas et al., 2006). En dicho estudio, células transfectadas con la construcción KDELN-H-Ras-V12 mostraban curvas de proliferación normales en unos experimentos donde se mostraba que sólo las señales desde RE tenían un impacto específico sobre la viabilidad celular. A este respecto, conviene recordar que en nuestros experimentos hemos testado los efectos producidos por la expresión transitoria de proteínas mientras que Matallanas et al. trabajaban con líneas de expresión estable. De este modo, es posible que en el proceso de selección se eliminase el grueso de células transfectadas, que habrían entrado

en apoptosis, y se produjese una selección de aquellas células en que los efectos apoptóticos de Ras en GC estuviesen atenuados.

2. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS SEÑALES DE RAS EN GC

Hoy en día, no cabe ninguna duda que la intensidad con la que una ruta efectora es activada por Ras, depende en gran medida de la sub-localización celular. En trabajos previos de nuestro laboratorio, cuando estudiamos la activación de la cascada de ERK en células NIH-3T3, se detectaron diferencias pronunciadas dependiendo del sitio celular del que partían las señales de Ras. Curiosamente, cuando las señales de Ras emanaban del Complejo de Golgi, se detectaba muy poca activación de ERK (Matallanas et al., 2006). Sin embargo, esta observación no parecía tener un carácter universal, pues ya se había descrito cómo Ras desde GC inducía la activación de ERK en células COS-1 (Chiu et al., 2002). Igualmente, cuando se estudió la ruta PI3K, Ras situado en el complejo de Golgi, fue una vez más el menos eficiente para activar AKT (Matallanas et al., 2006). Por otro lado, era de sobra conocido que las rutas de señalización PI3K/AKT y RAF/ERK estaban estrechamente ligadas a la regulación de la supervivencia celular. Por aquel entonces, estaba ya perfectamente establecido que la inducción de apoptosis mediada por *staurosporine*, en células de leucemia humana U-937, venía acompañada de una reducción significativa en los niveles de fosforilación de ambas quinasas (Antonsson and Persson, 2009).

En este trabajo, mostramos cómo en células MCF-7, la activación de Ras en Golgi no sólo no activaba ERK, sino que era capaz de inhibir la activación de ERK inducida por diferentes estímulos. Sin embargo, este efecto inhibitorio de las señales de Ras originadas desde GC, resultó específico para la ruta RAF-ERK, manteniéndose inalterados los niveles de fosforilación de AKT. Por otro lado, se sabía que el GC estaba compuesto por dos redes funcional y estructuralmente distintas: la red *cis* Golgi (CGN) y la red *trans* Golgi (TGN). De este modo, nos resultó interesante determinar desde cuál de estos dos compartimentos estaba Ras ejerciendo su papel supresor sobre la activación de ERK. Con los resultados obtenidos en este trabajo, quedaba fehacientemente demostrado que, el efecto inhibitorio de RAS sobre la activación de ERK, emanaba específicamente de CGN. Sin embargo, en los

estudios ya citados de apoptosis inducida por virus oncolíticos (Garant et al., 2016), se describía como tras la infección tenía lugar una acumulación de la forma activa de H-Ras en TGN. En el caso de la apoptosis inducida por estos virus, los niveles de fosforilación de ERK no se mostraban apenas alterados y se explicaba la inducción de apoptosis por un incremento en la activación de JNK. De este modo, si bien en ambos estudios se describe cómo las proteínas Ras inducen apoptosis desde GC, todo parece indicar que este proceso es regulado por dos vías alternativas: desde CGN mediante la inhibición de ERK, y desde TGN a través de JNK. Así pues, quedarían por analizar los mecanismos de regulación que dirigen a las proteínas Ras a uno u otro compartimento de GC, así como investigar las circunstancias que determinan que las proteínas Ras en GC se decanten por uno u otro efector.

Una vez confirmada la inhibición de la activación de ERK por las señales de Ras originadas en TGN, faltaba conocer la molécula efectora responsable de este efecto. Curiosamente, en el estudio sobre las diferentes rutas efectoras de Ras desde las distintas sublocalizaciones citado recurrentemente en este trabajo, se observó que el GC era la plataforma desde la cual Ral-GDS era activado de manera más efectiva (Matallanas et al., 2006). De acuerdo con estos resultados, mediante el empleo de mutantes de Ras específicos para CRAF, PI3K y Ral-GEFs previamente descritos (Rodríguez-Viciano et al., 1997); demostramos que ni la activación de CRAF ni la de PI3K estaban detrás de la inhibición de la activación de ERK. Posteriormente, fuimos capaces de reproducir esta respuesta mediante la sobre-expresión de Ral-GDS en un experimento en el que también descartamos efectores de Ras menos conocidos como TIAM-1, RASSF1A, RASSF2 y RIN-1. Llegados a este punto, si bien no podíamos descartar la implicación de otros efectores no testados, podíamos asegurar que el factor de intercambio Ral-GDS era responsable, al menos en parte, de la inhibición desde GC de la activación de ERK.

Por último, dado que la sobre-expresión conjunta de Ral-GDS con H-Ras-V12 mostró un efecto sinérgico en la inducción de apoptosis, todo parecía sugerir que la inhibición de la activación de ERK vía Ral-GDS pudiera ser responsable de esta respuesta. No obstante, puesto que no fue posible igualar los niveles de apoptosis obtenidos con la activación de Ras en GC, resultaba prematuro proferir tal afirmación. Una posible explicación para estos resultados, pudiera deberse al diseño experimental llevado a cabo. De acuerdo con nuestra

hipótesis, las proteínas Ras sólo inducirían muerte celular una vez activadas desde GC. Una forma constitutivamente activa de H-Ras difundiendo libremente por la célula, sería capaz no sólo de activar señales pro-apoptóticas desde GC, sino también las señales de supervivencia características de las proteínas Ras desde el resto de sublocalizaciones celulares. Así pues, con la activación por H-Ras-V12, tendría lugar un fenómeno de competencia entre señales antagonistas que daría como resultado final unos niveles basales de apoptosis mínimos, similares a los previamente descritos en nuestro laboratorio (Herrero et al., 2016). A este respecto, conviene recordar que Ral-GDS fue descrita como una proteína GEF capaz de catalizar el intercambio de nucleótidos tanto en Ral-A como en Ral-B (Albright et al., 1993). Estas pequeñas GTPasas, estaban estrechamente relacionadas con las proteínas Ras. De hecho, la activación de las proteínas Ral fue rápidamente descrita como un factor implicado en la transformación oncogénica inducida por las proteínas Ras (Feig et al., 1996). De este modo, las RAL GTPasas resultaron ser unos componentes cruciales en la regulación de las células tumorales, mediando tanto señales mitogénicas, como de supervivencia. Esta doble función, estaba perfectamente repartida entre ambas isoformas, siendo Ral-A necesaria para la proliferación celular, y resultando Ral-B imprescindible para evitar la entrada en apoptosis inducida por estrés oncogénico (Chien and White, 2003). Esta divergencia funcional, podría ser debida a su localización subcelular: si bien se han observado ambas isoformas en membrana plasmática, sólo Ral-A ha sido detectada en endomembranas (Shipitsin and Feig, 2004). Quedaría pues pendiente un nuevo experimento que nos permitiese activar de manera específica Ral-GDS desde GC. La activación de las proteínas Ras en Golgi, daría lugar a una activación de Ral-GDS que conllevaría la activación única y exclusivamente de Ral-A. De esta manera, la ausencia de señales de supervivencia mediadas por Ral-B desde PM podría dar una primera explicación a este novedoso papel de Ral-GDS activo desde GC como agente promotor de muerte celular. Una alternativa experimental posible, podría consistir en analizar la inducción de apoptosis por el mutante específico para Ral-GDS, KDEL-HV12-G37, utilizado en los primeros experimentos de inhibición de ERK. Si bien este mutante no interacciona únicamente con Ral-GDS, en caso de igualar los niveles de apoptosis obtenidos con la activación de Ras desde GC, podríamos atribuir definitivamente dicho efecto a la acción de las proteínas GEFs de Ral.

3. INDUCCIÓN DE APOPTOSIS POR RAS DESDE GC

Una vez confirmado que la activación de Ras en GC inducía apoptosis a la vez que una supresión de la activación de ERK; procedimos a analizar el mecanismo mediante el cual tenía lugar esta inhibición, tratando de averiguar si ésta pudiera ser el agente causal subyacente a la inducción de apoptosis. En primer lugar, dado que Ras activo desde GC se mostraba capaz de inhibir la activación de ERK inducida por estímulos externos, así como por la sobreexpresión de H-Ras-V12, cabía la posibilidad de que estuviese alterando el tráfico de las proteínas Ras e impidiendo su acceso a la membrana plasmática. Con nuestros experimentos, demostramos que la sobre-expresión de KDEL-HV12, no impedía el acceso de H-Ras-V12 a membranas celulares, por lo que necesariamente debía de estar actuando sobre algún miembro inferior de la ruta. En trabajos previos de nuestro laboratorio, habíamos demostrado cómo la variabilidad espacial de las señales bioquímicas generadas por Ras, afectaba al programa genético activado, tanto cualitativa como cuantitativamente. De esta manera, el análisis del transcrito derivado de la activación de Ras en GC, mostró una desregulación en 669 genes: 317 sobre-expresados y 352 reprimidos (Agudo-Ibanez et al., 2007). De estos genes, sólo 4 presentaron una regulación específica desde GC. Uno de esos loci, codificaba para el receptor tirosina fosfatasa Kappa (PTPK). Por aquel entonces, PTPK era una proteína fosfatasa poco estudiada en el campo de la progresión del cáncer. Y aún faltaba mucho por descubrir en cuanto a sustratos catalíticos y ligandos extracelulares capaces de inducir la activación de PTPK se refiere. No obstante, ya se había descrito su potencial función como supresor de tumores en linfoma primario del sistema nervioso central (Nakamura et al., 2003). Además, habían ido apareciendo en los últimos años numerosos estudios que demostraban que, por ejemplo, la pérdida de expresión de PTPK incrementaba el crecimiento y la supervivencia celular en linfoma de Hodgkin (Flavell et al., 2008); o aumentaba la proliferación, la adhesión a la matriz y la invasividad en células de cáncer de mama (Sun et al., 2013a). Igualmente, la sobreexpresión exógena de la isoforma precursora de PTPK reducía los niveles de proliferación y migración en células de melanoma (Agarwal et al., 2013). Curiosamente, en cuanto a supervivencia celular se refiere, PTPK había sido descrito en células de cáncer de próstata como un factor clave en la supresión de la apoptosis mediada por MAPKs, en particular por la vía JNK (Sun et al., 2013b). Sin embargo, PTPK había sido también previamente descrito como un mediador esencial para

los efectos anti-proliferativos de TGF- β en células MCF-10A (Wang et al., 2005), por lo que parecía más que evidente que el papel de PTPK en cáncer dependía del subtipo celular, así como del contexto fisiológico.

En este trabajo, demostramos que PTPK era responsable de la inducción de apoptosis por las señales de Ras desde GC en células MCF-7. Además, analizando diferentes líneas celulares, demostramos que PTPK era un mediador esencial para la supresión de la activación de ERK inducida por dichas señales. En queratinocitos humanos, ya había sido descrito previamente cómo PTPK era capaz de defosforilar el receptor de EGF (EGFR) regulando negativamente la activación de ERK (Xu et al., 2005). No obstante, si bien este mecanismo de acción pudiera resultar suficiente para explicar la inhibición de la activación de ERK bajo estimulación por EGF, no daría nunca respuesta a aquellas situaciones en las que se inhibían las señales internas de Ras. De este modo, mostramos en este trabajo cómo la interacción de PTPK con CRAF, estaba reduciendo significativamente los niveles de fosforilación de CRAF en residuos de tirosina y, en consecuencia, los niveles de fosforilación de MEK y ERK. Igualmente, demostramos que esta inhibición de la activación de ERK, era el evento clave para la inducción de apoptosis en células MCF-7.

No obstante, con la vista puesta en un futuro, quedarían aún sin respuesta algunas preguntas que sería interesante resolver. En primer lugar, como ya se ha mencionado, había sido descrito que H-Ras desde GC activaba preferentemente la vía de Ral-GDS (Matallanas et al., 2006). Y de acuerdo con esos datos, nuestros resultados sugerían que Ral-GDS sería capaz de inducir apoptosis mediante la inhibición de ERK. Por otro lado, estaba descrito que la activación de H-Ras en GC inducía la expresión de PTPK (Agudo-Ibanez et al., 2007). Y coincidiendo una vez más con los datos previos, nuestros resultados mostraban como la activación de Ras en GC, conllevaba un aumento en la expresión de PTPK, quien a su vez era capaz de defosforilar CRAF induciendo apoptosis en células MCF-7. Sin embargo, todavía no habría sido demostrado que este incremento en la expresión de PTPK fuese inducido específicamente por Ral-GDS, para lo que serían imprescindibles más experimentos. Además, habíamos demostrado que PTPK era indispensable para la inhibición de la activación de ERK en diferentes líneas celulares, y que esta inhibición era responsable directa de la apoptosis en células MCF-7. Sin embargo, podría resultar interesante trasladar este modelo a más líneas

celulares. Así pues, cabría esperar que, como mostramos en células NIH-3T3 y HeLa, la inhibición de la activación de ERK sólo tuviese lugar en aquellas líneas en las que las señales de Ras indujesen la expresión de PTPK. Así mismo, la inducción de apoptosis sólo se produciría en aquellas líneas celulares que presentasen inhibición en la activación de ERK.

En cuanto a C-RAF, estaba perfectamente establecido que la fosforilación en los residuos Tyr340 y Tyr341 presentes en el extremo N-terminal, era un requisito indispensable para la completa activación de la enzima (Fabian et al., 1993). Así mismo, había sido confirmado en numerosos estudios que la familia de quinasas SRC eran las encargadas de dicha activación (Cleghon and Morrison, 1994; Thompson et al., 1991; Williams et al., 1992). Sin embargo, nada se sabía de las proteínas encargadas de revertir esta fosforilación. Con los resultados obtenidos en este trabajo, demostramos que existía una interacción entre PTPK y C-RAF. Igualmente, quedaba perfectamente establecido que la presencia de PTPK conllevaba una disminución en el grado de fosforilación en dichos residuos de tirosina. En cambio, no podríamos aún descartar que la defosforilación fuese mediada por una tercera molécula que actuase a modo de intermediario. Por lo tanto, para poder demostrar que PTPK estaba defosforilando de manera directa C-RAF, serían necesarios experimentos de defosforilación *in vitro* con una proteína de fusión que expresase PTPK activa unida a GST tal y como han descrito otros grupos (Xu et al., 2005).

Por otro lado, sea o no debida a la defosforilación directa por PTPK, resultaría interesante estudiar cómo la inactivación de la ruta Ras/ERK pudiera estar promoviendo la entrada en apoptosis en nuestro modelo. Buscando avanzar en esa dirección, se pudieran analizar, por ejemplo, los niveles de activación de moléculas tradicionalmente asociadas con la muerte celular programada como Bcl-2, BH3 o Bax (Adams, 2003). Como ya hemos mencionado anteriormente en este trabajo, la inducción de apoptosis mediada por *staurosporine* en células de leucemia humana U-937, venía acompañada, al igual que en nuestro modelo, de una reducción significativa en los niveles de fosforilación de ERK. Además, en esos mismos estudios, se observaba una disminución en la expresión de p27, una proteína efectora de p53 (Antonsson and Persson, 2009). Por otro lado, en células MCF-7, se había descrito cómo la acumulación de p53 en respuesta a la sobreexpresión de TC-PTP, una tirosina-fosfatasa nuclear, aumentaba directamente la α -isoforma pro-apoptótica de

caspasa-1 (Gupta et al., 2002). De esta manera, todo pareciera indicar que p53 podría ser un buen candidato con el que continuar con nuevos experimentos.

4. MELANOMAGÉNESIS SITO-ESPECÍFICA EN PEZ ZEBRA

Como ya hemos comentado anteriormente, hasta el momento en que emprendimos este proyecto, el potencial oncogénico de las señales de Ras desde las distintas sublocalizaciones había sido un aspecto muy poco estudiado. Así pues, los datos disponibles referidos a las señales desde GC se restringían únicamente a un reducido número de estudios en modelos celulares con resultados divergentes (Chiu et al., 2002; Hart and Donoghue, 1997; Matallanas et al., 2006). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo atribuían a las señales de Ras desde GC efectos evidentemente incompatibles con la tumorigénesis. De este modo, nos decidimos a estudiar el papel desempeñado en cáncer por las señales de RAS en un modelo animal, concretamente, en Pez Zebra.

En este modelo, había sido previamente descrito que H-Ras-V12 inducía lesiones displásicas, inicialmente benignas; que progresaban posteriormente de manera espontánea a melanoma invasivo (Michailidou et al., 2009). Sin embargo, no existían hasta la fecha modelos animales de experimentación que analizaran el potencial oncogénico de las señales de Ras desde las distintas sublocalizaciones. Por lo tanto, con este trabajo, demostrábamos por primera vez en un modelo animal, que la carcinogénesis inducida por las proteínas Ras era estrictamente dependiente de su localización. Y de este modo, RAS constitutivamente activo en GC, era incapaz de fomentar la progresión de melanoma debido, al menos en parte, a su efecto supresor sobre la viabilidad celular. A continuación, dado que queríamos estudiar si, al igual que en nuestros modelos celulares, PTPK pudiera ser la responsable de dicho efecto, nos dispusimos a hacer un estudio comparativo entre las proteínas de Pez Zebra y Humano. De este modo, confirmamos que PTPK era una proteína altamente conservada en la escala evolutiva y, por lo tanto; el Pez Zebra podía ser un modelo perfectamente válido con el que intentar extrapolar nuestros resultados en células humanas. De esta forma, demostramos que PTPK jugaba en pez Zebra un papel central en la regulación de las señales antitumorales mediadas por H-Ras desde GC. Finalmente, puesto que se habían descrito mutaciones de N-Ras en un 15-20% de los melanomas (Chin et al., 2006), y se había observado su implicación en fenómenos de aparición de resistencia a medicamentos

(Nazarian et al., 2010), quisimos analizar en nuestro modelo la otra isoforma de Ras con poblaciones funcionales en GC (Chiu et al., 2002). A la vista de los resultados obtenidos en este trabajo, podíamos asegurar que PTPK estaba ejerciendo en Pez Zebra una regulación negativa sobre el conjunto de señales de las proteínas Ras originadas en GC. De este modo, pudiera pensarse que PTPK podría ejercer un rol como supresor de tumores en aquellos melanomas dirigidos por mutaciones activadoras de N-Ras. Por lo tanto, teniendo en cuenta estos resultados, se abre una nueva perspectiva en cuanto a las señales de Ras desde GC se refiere y podría resultar interesante volver a trabajar de nuevo en cultivos celulares, con el fin de testar nuestro modelo en líneas inmortalizadas de melanoma.

VI. CONCLUSIONES

1. La activación de las proteínas Ras en el Complejo de Golgi, produce señales antitumorales capaces de inducir apoptosis bajo determinados contextos celulares.
2. La entrada en apoptosis inducida por las señales de Ras desde el Complejo de Golgi, es debida a una inhibición de la activación de ERK mediada por PTPK.
3. En un modelo de Pez Cebra, PTPK es capaz de contrarrestar, al menos en parte, la melanomagénesis inducida por N-Ras-Q61L; confirmando de este modo, su papel como supresor tumoral.

VII. ABSTRACT

I. INTRODUCTION

Cells respond to changes in their environment, to developmental cues, and to pathogen aggression through the action of a complex network of proteins. These networks can be decomposed into a multitude of signalling pathways that relay signals from the microenvironment to the cellular components involved in eliciting a specific response. In eukaryotes, about one third of the entire proteome is phosphorylated, predominantly on serine, threonine, and tyrosine. Protein phosphorylation is a rapidly reversible post-translational modification, controlled by the opposing activities of protein kinases and protein phosphatases. Hence, protein phosphorylation is a fundamental mechanism for these signaling pathways.

ERK 1 and 2 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are cytoplasmic serine/threonine kinases that participate in the transduction of signals from the surface to the interior of the cell. It is well-known that ERK1/2 signalling pathways are involved in the regulation of prime physiological processes, such as cellular proliferation, differentiation, cell cycle control, development and survival, in addition to hundreds of cell and tissue-specific events. The ERK1/2 cascades are generally constituted by MAPKKs of the RAF family. These, at their turn, convey signals downstream by phosphorylating/ activating dual-specificity MAPKKs MEK 1 and 2, ultimately responsible for the phosphorylation and the unleashing of ERKs activity. Because of their key role in cell signalling, a rigorous regulation of these MAPKs is essential in eukaryotic physiology. Consequently, unregulated or aberrant ERK signalling results in multiple pathological conditions ranging from psoriasis to cancer. Therefore, tyrosine, serine/threonine and dual-specificity phosphatases coordinately dephosphorylate and thereby inactivate the different components of MAPKs signalling pathways.

While phosphorylation on serine/threonine is most abundant (~98 %), tyrosine phosphorylation, which accounts for less than 2 % of the total phosphoproteome, is a key regulatory mechanism in numerous important aspects of eukaryotic cell physiology as well. The importance of tyrosine phosphorylation in normal cell physiology is highlighted by the fact that many human diseases are the result of aberrant protein tyrosine kinase (PTK) or protein tyrosine phosphatase (PTP) function. Historically, research had long been focused on the role of PTKs in signaling, as it was generally believed that PTPs functioned merely as indiscriminate “housekeeping” enzymes with broad specificities. However, we now know that PTPs are highly specific and tightly regulated, both in space and time.

One of the most well-known ERK cascade, prototype of signaling pathways is the Ras/ERK signaling. Signals conveyed through RAS family GTPases play critical roles in multiple biochemical processes, hence in key biological decisions at the proliferation-differentiation-survival crossroads. Their importance in cell physiology is highlighted by the dramatic results of their malfunction, RAS mutational activation being detected in about 30% of human tumors. It has long been known that in order to be functional RAS proteins must associate to the plasma-membrane. However, a wealth of data accumulated over the past decades has firmly established that, in addition to the plasma-membrane, RAS is also present and functional at endomembranes such as the endoplasmic reticulum (ER), endosomes and the Golgi Complex (GC). This has led to abandon the initial concept of the

RAS signal as a unique, linear signaling axis, now being envisioned as the integration of sublocalization-specified sub-signals. On these, space plays a critical role by providing output variability, depending on the availability of regulatory and effector molecules at the different platforms from which RAS signals emanate, thereby regulating its biochemical and biological consequences site-specifically.

While it is firmly established that at its diverse sublocalizations: RAS is subject to site-specific regulation by different exchange factors; engages different effector pathways; and switches on distinct genetic programs, the participation of each of the RAS signaling platforms in defined RAS-mediated biological outcomes, remains unclear. Such is the case for carcinogenesis: hitherto, how RAS sublocalization impacts on its potential to drive malignancy remains an open issue. This uncertainty is particularly relevant in the case of endomembranes. While there is little doubt about the participation of RAS signals generated at plasma-membrane microdomains in carcinogenic processes, the involvement of RAS signals coming from endomembranes, particularly the GC, remains obscure. It is well known that pools of H- and NRAS, but not of the most oncogenic isoform KRAS, reside at the GC and therein they can productively engage downstream effectors. However, the association of the RAS GC pool to malignancy is largely understudied and, as of today, the available data is solely restricted to cell culture approaches that have yielded inconclusive results. Herein, we have proposed to filling this gap by using diverse cellular and animal models for studying the role played in cancer by RAS signals emanating from the GC.

II. AIMS

Specifically, the objectives of this thesis have been three:

1. Determine the biological responses induced by Ras proteins activated from the Golgi Complex.
2. Biochemically characterization of signaling pathways which promotes such biological responses.
3. To analyze in an animal model the site-specific oncogenic potential of the Ras signals.

III. RESULTS

RAS activation at the GC induces apoptosis

To gain an initial insight into the role of the RAS GC pool, we utilized MCF-7 cells. This mammary epithelial cell line undergoes different fates depending on different agonists. To monitor RAS activation specifically at the GC, we used as a site-specific probe a construct expressing an HRAS V12 constitutively-activated mutant N-terminally fused to the KDEL receptor (KDELr-HV12) harboring the mutation N193D, which prevents it from redistributing to the ER, making it a permanent GC resident. Remarkably, the expression of this construct in MCF-7 cells was sufficient to produce an apoptotic response comparable to that elicited by staurosporine. Similarly, apoptosis was also strongly induced as a consequence of persistent activation of the endogenous RAS GC pool, achieved by the overexpression of RAS-GRP1, the exchange factor responsible for activating RAS at the GC. Finally, it is well established the importance of H- and NRAS acylation in GC previous trafficking to the plasma-membrane. So, voiding the trafficking between both compartments provokes Ras accumulation at the GC. At 21°C, post-GC transport is stopped. Growing some of tumor cell lines at this temperature, we blocked further transit of newly-synthesized RAS. Indeed, culture at 21°C potentially induced apoptosis in cell lines expressing mutant H- and NRAS, but not in those harboring BRAF or KRAS, that does not traffic through the GC.

Biochemical characterization of Ras signals at GC

It was important to elucidate the mechanism whereby RAS activation at the GC elicits cell death. Previous studies from our lab had shown that RAS at the GC fails to stimulate substantial ERK activity levels. Interestingly, RAS constitutive activity at the GC resulting from the expression of KDEL-HV12 markedly interfered with ERK phosphorylation as induced by an external agonist like EGF or by a potent oncogene like HRAS V12. Noticeably, GC RAS inhibitory effect was restricted to the ERK pathway as it did not alter the activity of other routes such as the PI-3K pathway. Moreover, using the KDELr cue to tether to the GC the CDC25 domain of RASGRF1 (KDEL-CDC25), thereby achieving a potent activation of RAS specifically at this organelle, it was found that activation of the endogenous RAS GC pool evoked a suppressive effect on ERK activation, identical to that one resulting from the ectopic expression of KDEL-HV12.

Since the GC is made up of two functionally and structurally different networks: the cis Golgi network (CGN) and the trans Golgi network (TGN), it was of interest to determine from which of these compartments RAS would be exerting its suppressive role on ERK activation. Since the KDELr is a CGN anchor, we engineered a construct to specifically deliver HRAS V12 to the TGN. This was achieved by the fusion of SCG-10 N-terminus. Noticeably, while KDEL-HV12 markedly inhibited ERK phosphorylation and activity induced by the oncogene HRAS V12, SCG10-HV12 failed to do so, indicating that GC RAS inhibitory effect on ERK emanates specifically from the CGN.

We then sought to identify the effector pathways that GC RAS utilizes to down-regulate ERK activation. For this purpose, we added the KDELr tether to a series of HRASV12 switch-I domain mutants known to specifically activate defined effector routes. It was found that only the mutant G37 that specifically activates RAL exchange factors, but not those that exclusively signal through CRAF or PI-3K, could down-regulate ERK activation. To further substantiate this point, we also analyzed the suppression of ERK activation by other bona fide RAS effectors, uncharacterized with respect to their response to mutations in the RAS switch-I domain. While HRASV12-induced ERK phosphorylation was markedly attenuated by overexpression of RAL-GDS, other RAS effectors failed to do so, pointing to the RAL GEFs effector pathway as the only responsible for antagonizing ERK activation. In this respect, even though overexpression of RAL-GDS was not sufficient to stimulate an apoptotic response in MCF-7 cells, it synergized with H-Ras-V12 to induce cell death.

PTPK-mediated apoptosis induced by Ras from GC

It was essential to unravel the mechanism whereby ERK activation was inhibited by RAS signals coming from the GC. RAS activation at the GC did not prevent RAS access to other membrane systems, suggesting that the point of impact was further downstream. In a previous study, we have unraveled the transcriptomes resulting from RAS activation at each of its sublocalizations. Interestingly, one of the genes specifically switched-on by RAS at the GC is the one encoding for PTPK. When we tested if PTPK was involved in the unleashing of apoptosis by GC RAS signals. It was found that overexpression of PTPK and of KDEL-HV12 in MCF-7 cells induced apoptosis to similar extents. Remarkably, the apoptotic response to KDEL-HV12 was prevented when this construct was co-expressed together with a siRNA that suppressed PTPK expression. We then tested in different cell lines KDEL-HV12 ability to suppress ERK activation and this only occurred in those cells where constitutive GC RAS activity induced PTPK expression.

Next, we sought to understand the mechanism whereby PTPK inhibited ERK activation. To identify the point of the RAS-ERK pathway subject to PTPK regulation, we analyzed the phosphorylation of the different tiers of the cascade in response to the up-regulation of the phosphatase. It was found that increasing the expression of PTPK markedly reduced RAS-stimulated CRAF tyrosine phosphorylation and, consequently, the phosphorylation levels of MEK and ERK. Contrarily, increments on PTPK levels did not alter ERK phosphorylation as induced by MEK-E, this confirmed that PTPK impacted on the RAS-ERK cascade at the highest kinase echelon. However, since PTPK can inhibit several signaling pathways, it was important to determine the extent to which the apoptotic response induced by PTPK expression was a consequence of its impact on ERK activation. It was found that cell death induced by PTPK could be prevented by the co-expression of MEK1-E known to yield a constitutive ERK activation. Finally, we tested if PTPK binds to its putative substrate CRAF stably enough as to be detected by co-immunoprecipitation. Indeed, when epitope-tagged forms of both proteins were co-expressed in MCF-7 cells, PTPK and CRAF readily co-immunoprecipitated in MCF-7. Moreover, PTPK and CRAF association was also observed between the endogenous proteins as well.

Site-specific oncogenic potential of Ras in zebra fish model

The aforementioned data clearly assigned to RAS activation at the GC an effect incompatible with tumorigenesis. Thus, it was essential to put this notion under test in an animal cancer model. To this end, we utilized the Zebra Fish melanoma model. In nacre-fish model, putative oncogenes are specifically expressed in melanocytes, via injecting in single-cell embryos constructs under the control of the MITF promoter, and melanomagenesis is monitored in adult fish through several weeks post-injection. As such, we tested the capability of HRASV12 to induce melanoma depending on its sublocalization. In zebrafish, H-RASV12 initially induces benign dysplastic lesions that spontaneously progress to invasive melanoma. However, H-RAS V12 targeted to the GC induced benign lesions far less efficiently than HRASV12 targeted to plasma-membrane sublocalizations: lipid rafts (LCK-HV12) or disordered membrane (CD8-HV12). More remarkably, whereas most of the fish displaying benign lesions induced from RAS plasma-membrane sublocalizations, particularly the disordered membrane, eventually developed full-blown melanomas, none of the benign cases induced by GC RAS progressed to malignant tumors.

Zebra-fish as a good model for PTPK research

Next, we wanted to test whether PTPK had the same role in Zebra Fish as in human cell lines. But it was essential to know how similar was PTPK in both, human and fish. And, at this point, we had a problem. Because we already knew the zebrafish genomic sequence but we didn't know the cDNA. And obviously, we neither knew the amino-acid sequence. So before starting our experiments, we had to verify the predicted sequences. To gain an initial insight into the predicted sequence, we made an alignment with ESTs. Remarkably, we found a gap in the extreme 5'. Contrarily, we could translate the sequence to a characteristic transmembrane protein with bio-informatic software. We then looked forward to conserve domains, but couldn't find the characteristic extracellular MAM and Ig-like domains. Therefore, predicted sequence could be uncompleted. Indeed, we amplified by PCR a little fragment of N-term and we got a PCR product with 1277bp instead of the 770bp we hoped. Interestingly, both sequences shared a 100% of identity but they didn't have a cover of 100% because of the aforementioned gap in 5'. Hence, we had a sequence of 4.3kb instead of a 3885bp prediction. We then aligned the new sequence with ESTs and the gap in the 5' extreme disappeared so we had a real sequence of cDNA. In addition to that, when we translated the DNA sequence to amino-acid, we got a protein with all R2B characteristic domains. Finally, we compared the sequences of human and fish. When we aligned the nucleotide sequences, we observed a 72% of identity and the query cover was more than 95%. When we aligned amino-acid sequences, the identity increased up to more than 80% without losing query cover.

Absence of PTPK restores GC RAS oncogenicity.

We wanted to understand if, similarly to our observations in cellular models, PTPK was somehow involved in GC RAS defective oncogenicity. To this end, CRISPR/Cas9 technology was utilized to disrupt the PTPK locus in jet-fish. Remarkably, the total absence of PTPK resulted in a pronounced increment on the incidence of spontaneous tumours, unlike PTPK +/- fish which resembled wild-type fish with respect to the frequency of spontaneous tumors. In the meantime, we used the CRISPR/Cas9 System with nacre-fish as well, leading to the generation of fish lineages homo and heterozygous for PTPK deletion. Eggs from these animals were subsequently injected with the KDEL-HV12 construct. Interestingly, a background devoid of just one PTPK allele was sufficient to foster melanoma formation by KDEL-HV12, an effect exacerbated in the total absence of the phosphatase as was the case for PTPK -/- fish. We reasoned that an explanation for GC RAS regained oncogenic potential could underlie in the restitution of its ability to activate ERK in the absence of PTPK quenching effect. To test if this was the case, MCF-7 cells were co-transfected with KDEL-HV12 and increasing concentrations of an shRNA against PTPK. It was found that progressive down-regulation of PTPK expression was accompanied by augmented ERK phosphorylation levels. Further proof for this notion came from HeLa cells, in which PTPK is not expressed, KDEL-HV12 can stimulate a potent ERK phosphorylation per se.

PTPK as a potential tumor suppressor in melanoma.

Activating mutations in N-RAS (typically a lysine for glutamine substitution at position 61) occur in 15-25% of naevi and melanomas. Since It is well known that pools of N-RAS reside at the GC and therein they can productively engage downstream effectors, we wanted to test whether PTPK was involved in N-Ras-Q61L induced melanomagenesis. To this end, we utilized eggs from nacre PTPK -/- fish. Indeed, lack of PTPK resulted in a pronounced increment on the incidence of tumors.

IV. CONCLUSION

Herein, we show that the presence of activated RAS, both endogenous and ectopic at the GC, is sufficient to stimulate an apoptotic response. In addition to that, Ras activity at the GC down-regulates ERK activation and this inhibitory effect emanates specifically from the *cis* Golgi network. Moreover, our results suggest that Ral-GEFs effector pathway is the only responsible for antagonizing ERK activation.

Ras activation at the GC did not prevent Ras access to other membrane systems. PTPK is responsible for inducing apoptosis by inhibiting ERK activation. In fact, PTPK quenches ERK activation acting over CRAF phosphorylation in tyrosine.

Overall, our findings demonstrate that RAS potential to drive carcinogenesis is strictly dependent on its subcellular localization and that mutant RAS at the GC is unable to foster melanoma progression due to, at least in part, its suppressive effect on cellular viability. Indeed, PTPK is able to counteract, at least in part, H-Ras-Q61L-induced melanomagenesis; confirming its role as tumor suppressor.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, J.M. (2003). Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* 17, 2481-2495.
- Aebbersold, D.M., Shaul, Y.D., Yung, Y., Yarom, N., Yao, Z., Hanoch, T., and Seger, R. (2004). Extracellular signal-regulated kinase 1c (ERK1c), a novel 42-kilodalton ERK, demonstrates unique modes of regulation, localization, and function. *Mol Cell Biol* 24, 10000-10015.
- Agarwal, S., Al-Keilani, M.S., Alqudah, M.A., Sibenaller, Z.A., Ryken, T.C., and Assem, M. (2013). Tumor derived mutations of protein tyrosine phosphatase receptor type k affect its function and alter sensitivity to chemotherapeutics in glioma. *PLoS One* 8, e62852.
- Agudo-Ibanez, L., Herrero, A., Barbacid, M., and Crespo, P. (2015). H-ras distribution and signaling in plasma membrane microdomains are regulated by acylation and deacylation events. *Mol Cell Biol* 35, 1898-1914.
- Agudo-Ibanez, L., Nunez, F., Calvo, F., Berenjano, I.M., Bustelo, X.R., and Crespo, P. (2007). Transcriptomal profiling of site-specific Ras signals. *Cell Signal* 19, 2264-2276.
- Ajenjo, N., Canon, E., Sanchez-Perez, I., Matallanas, D., Leon, J., Perona, R., and Crespo, P. (2004). Subcellular localization determines the protective effects of activated ERK2 against distinct apoptogenic stimuli in myeloid leukemia cells. *J Biol Chem* 279, 32813-32823.
- Albright, C.F., Giddings, B.W., Liu, J., Vito, M., and Weinberg, R.A. (1993). Characterization of a guanine nucleotide dissociation stimulator for a ras-related GTPase. *EMBO J* 12, 339-347.
- Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J., and Mustelin, T. (2004). Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* 117, 699-711.
- Anders, L., Mertins, P., Lammich, S., Murgia, M., Hartmann, D., Saftig, P., Haass, C., and Ullrich, A. (2006). Furin-, ADAM 10-, and gamma-secretase-mediated cleavage of a receptor tyrosine phosphatase and regulation of beta-catenin's transcriptional activity. *Mol Cell Biol* 26, 3917-3934.
- Andersen, J.N., Jansen, P.G., Echwald, S.M., Mortensen, O.H., Fukada, T., Del Vecchio, R., Tonks, N.K., and Moller, N.P. (2004). A genomic perspective on protein tyrosine phosphatases: gene structure, pseudogenes, and genetic disease linkage. *FASEB J* 18, 8-30.
- Andersen, J.N., Mortensen, O.H., Peters, G.H., Drake, P.G., Iversen, L.F., Olsen, O.H., Jansen, P.G., Andersen, H.S., Tonks, N.K., and Moller, N.P. (2001). Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Mol Cell Biol* 21, 7117-7136.
- Antonsson, A., and Persson, J.L. (2009). Induction of apoptosis by staurosporine involves the inhibition of expression of the major cell cycle proteins at the G(2)/m checkpoint accompanied by alterations in Erk and Akt kinase activities. *Anticancer Res* 29, 2893-2898.

Aricescu, A.R., Siebold, C., Choudhuri, K., Chang, V.T., Lu, W., Davis, S.J., van der Merwe, P.A., and Jones, E.Y. (2007). Structure of a tyrosine phosphatase adhesive interaction reveals a spacer-clamp mechanism. *Science* *317*, 1217-1220.

Arozarena, I., Matallanas, D., Berciano, M.T., Sanz-Moreno, V., Calvo, F., Munoz, M.T., Egea, G., Lafarga, M., and Crespo, P. (2004). Activation of H-Ras in the endoplasmic reticulum by the RasGRF family guanine nucleotide exchange factors. *Mol Cell Biol* *24*, 1516-1530.

Asante-Appiah, E., and Kennedy, B.P. (2003). Protein tyrosine phosphatases: the quest for negative regulators of insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab* *284*, E663-670.

Assem, M., Sibenaller, Z., Agarwal, S., Al-Keilani, M.S., Alqudah, M.A., and Ryken, T.C. (2012). Enhancing diagnosis, prognosis, and therapeutic outcome prediction of gliomas using genomics. *OMICS* *16*, 113-122.

Ballester, R., Furth, M.E., and Rosen, O.M. (1987). Phorbol ester- and protein kinase C-mediated phosphorylation of the cellular Kirsten ras gene product. *J Biol Chem* *262*, 2688-2695.

Barbacid, M. (1987). ras genes. *Annu Rev Biochem* *56*, 779-827.

Becka, S., Zhang, P., Craig, S.E., Lodowski, D.T., Wang, Z., and Brady-Kalnay, S.M. (2010). Characterization of the adhesive properties of the type IIb subfamily receptor protein tyrosine phosphatases. *Cell Commun Adhes* *17*, 34-47.

Bernards, A., and Settleman, J. (2004). GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol* *14*, 377-385.

Bivona, T.G., Perez de Castro, I., Ahearn, I.M., Grana, T.M., Chiu, V.K., Lockyer, P.J., Cullen, P.J., Pellicer, A., Cox, A.D., and Philips, M.R. (2003). Phospholipase C α activates Ras on the Golgi apparatus by means of RasGRP1. *Nature* *424*, 694-698.

Bivona, T.G., Quatela, S.E., Bodemann, B.O., Ahearn, I.M., Soskis, M.J., Mor, A., Miura, J., Wiener, H.H., Wright, L., Saba, S.G., *et al.* (2006). PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis. *Mol Cell* *21*, 481-493.

Blanco-Aparicio, C., Torres, J., and Pulido, R. (1999). A novel regulatory mechanism of MAP kinases activation and nuclear translocation mediated by PKA and the PTP-SL tyrosine phosphatase. *J Cell Biol* *147*, 1129-1136.

Bogoyevitch, M.A., Ngoei, K.R., Zhao, T.T., Yeap, Y.Y., and Ng, D.C. (2010). c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges. *Biochim Biophys Acta* *1804*, 463-475.

Bollag, G., and McCormick, F. (1991). Differential regulation of Ras GAP and neurofibromatosis gene products activities. *Nature* *351*, 576-579.

- Borges, J., Pandiella, A., and Esparis-Ogando, A. (2007). Erk5 nuclear location is independent on dual phosphorylation, and favours resistance to TRAIL-induced apoptosis. *Cell Signal* *19*, 1473-1487.
- Bos, J.L., Rehmann, H., and Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* *129*, 865-877.
- Bradford, C.H. (1975). Countway happenings. James Thacher, M.D. (1754-1844). *The New England journal of medicine* *293*, 762-763.
- Brady-Kalnay, S.M., Flint, A.J., and Tonks, N.K. (1993). Homophilic binding of PTP mu, a receptor-type protein tyrosine phosphatase, can mediate cell-cell aggregation. *J Cell Biol* *122*, 961-972.
- Brott, B.K., Pinsky, B.A., and Erikson, R.L. (1998). Nlk is a murine protein kinase related to Erk/MAP kinases and localized in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 963-968.
- Brunet, A., Roux, D., Lenormand, P., Dowd, S., Keyse, S., and Pouyssegur, J. (1999). Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *EMBO J* *18*, 664-674.
- Burack, W.R., and Shaw, A.S. (2005). Live Cell Imaging of ERK and MEK: simple binding equilibrium explains the regulated nucleocytoplasmic distribution of ERK. *J Biol Chem* *280*, 3832-3837.
- Burgoyne, A.M., Phillips-Mason, P.J., Burden-Gulley, S.M., Robinson, S., Sloan, A.E., Miller, R.H., and Brady-Kalnay, S.M. (2009). Proteolytic cleavage of protein tyrosine phosphatase mu regulates glioblastoma cell migration. *Cancer Res* *69*, 6960-6968.
- Buschbeck, M., and Ullrich, A. (2005). The unique C-terminal tail of the mitogen-activated protein kinase ERK5 regulates its activation and nuclear shuttling. *J Biol Chem* *280*, 2659-2667.
- Caloca, M.J., Zugaza, J.L., and Bustelo, X.R. (2003). Exchange factors of the RasGRP family mediate Ras activation in the Golgi. *J Biol Chem* *278*, 33465-33473.
- Camps, M., Nichols, A., and Arkinstall, S. (2000). Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *FASEB J* *14*, 6-16.
- Casar, B., Arozarena, I., Sanz-Moreno, V., Pinto, A., Agudo-Ibanez, L., Marais, R., Lewis, R.E., Berciano, M.T., and Crespo, P. (2009). Ras subcellular localization defines extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 substrate specificity through distinct utilization of scaffold proteins. *Mol Cell Biol* *29*, 1338-1353.
- Casar, B., Pinto, A., and Crespo, P. (2008). Essential role of ERK dimers in the activation of cytoplasmic but not nuclear substrates by ERK-scaffold complexes. *Mol Cell* *31*, 708-721.
- Cheng, A., Dube, N., Gu, F., and Tremblay, M.L. (2002). Coordinated action of protein tyrosine phosphatases in insulin signal transduction. *Eur J Biochem* *269*, 1050-1059.

Cherfils, J., and Zeghouf, M. (2013). Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol Rev* 93, 269-309.

Chien, Y., and White, M.A. (2003). RAL GTPases are linchpin modulators of human tumour-cell proliferation and survival. *EMBO Rep* 4, 800-806.

Chin, L., Garraway, L.A., and Fisher, D.E. (2006). Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev* 20, 2149-2182.

Chiu, V.K., Bivona, T., Hach, A., Sajous, J.B., Silletti, J., Wiener, H., Johnson, R.L., 2nd, Cox, A.D., and Philips, M.R. (2002). Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nat Cell Biol* 4, 343-350.

Choy, E., Chiu, V.K., Silletti, J., Feoktistov, M., Morimoto, T., Michaelson, D., Ivanov, I.E., and Philips, M.R. (1999). Endomembrane trafficking of Ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell* 98, 69-80.

Chu, Y., Solski, P.A., Khosravi-Far, R., Der, C.J., and Kelly, K. (1996). The mitogen-activated protein kinase phosphatases PAC1, MKP-1, and MKP-2 have unique substrate specificities and reduced activity in vivo toward the ERK2 sevenmaker mutation. *J Biol Chem* 271, 6497-6501.

Chudnovsky, Y., Adams, A.E., Robbins, P.B., Lin, Q., and Khavari, P.A. (2005). Use of human tissue to assess the oncogenic activity of melanoma-associated mutations. *Nat Genet* 37, 745-749.

Clark, A., Dean, J., Tudor, C., and Saklatvala, J. (2009). Post-transcriptional gene regulation by MAP kinases via AU-rich elements. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14, 847-871.

Clark-Lewis, I., Sanghera, J.S., and Pelech, S.L. (1991). Definition of a consensus sequence for peptide substrate recognition by p44mpk, the meiosis-activated myelin basic protein kinase. *J Biol Chem* 266, 15180-15184.

Cleghon, V., and Morrison, D.K. (1994). Raf-1 interacts with Fyn and Src in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *J Biol Chem* 269, 17749-17755.

Cohen, P. (2001). The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. *Eur J Biochem* 268, 5001-5010.

Cohen, P. (2002). Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov* 1, 309-315.

Cole, N.B., Smith, C.L., Sciaky, N., Terasaki, M., Edidin, M., and Lippincott-Schwartz, J. (1996). Diffusional mobility of Golgi proteins in membranes of living cells. *Science* 273, 797-801.

Colicelli, J. (2004). Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE* 2004, RE13.

Coulombe, P., and Meloche, S. (2007). Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1376-1387.

Craig, S.E., and Brady-Kalnay, S.M. (2011a). Cancer cells cut homophilic cell adhesion molecules and run. *Cancer Res* 71, 303-309.

Craig, S.E., and Brady-Kalnay, S.M. (2011b). Tumor-derived extracellular fragments of receptor protein tyrosine phosphatases (RPTPs) as cancer molecular diagnostic tools. *Anticancer Agents Med Chem* 11, 133-140.

Craig, S.E., and Brady-Kalnay, S.M. (2015). Regulation of development and cancer by the R2B subfamily of RPTPs and the implications of proteolysis. *Semin Cell Dev Biol* 37, 108-118.

Cuadrado, A., and Nebreda, A.R. (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J* 429, 403-417.

Dai, Q., Choy, E., Chiu, V., Romano, J., Slivka, S.R., Steitz, S.A., Michaelis, S., and Philips, M.R. (1998). Mammalian prenylcysteine carboxyl methyltransferase is in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 273, 15030-15034.

Daniel, J.M., and Reynolds, A.B. (1997). Tyrosine phosphorylation and cadherin/catenin function. *Bioessays* 19, 883-891.

Dekker, F.J., Rocks, O., Vartak, N., Menninger, S., Hedberg, C., Balamurugan, R., Wetzel, S., Renner, S., Gerauer, M., Scholermann, B., *et al.* (2010). Small-molecule inhibition of APT1 affects Ras localization and signaling. *Nat Chem Biol* 6, 449-456.

Deleris, P., Rousseau, J., Coulombe, P., Rodier, G., Tanguay, P.L., and Meloche, S. (2008). Activation loop phosphorylation of the atypical MAP kinases ERK3 and ERK4 is required for binding, activation and cytoplasmic relocalization of MK5. *J Cell Physiol* 217, 778-788.

Denu, J.M., and Dixon, J.E. (1998). Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Curr Opin Chem Biol* 2, 633-641.

Der, C.J., Finkel, T., and Cooper, G.M. (1986). Biological and biochemical properties of human rasH genes mutated at codon 61. *Cell* 44, 167-176.

Derijard, B., Raingeaud, J., Barrett, T., Wu, I.H., Han, J., Ulevitch, R.J., and Davis, R.J. (1995). Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 267, 682-685.

Di Fiore, P.P., and De Camilli, P. (2001). Endocytosis and signaling. an inseparable partnership. *Cell* 106, 1-4.

Di Paolo, G., Lutjens, R., Pellier, V., Stimpson, S.A., Beuchat, M.H., Catsicas, S., and Grenningloh, G. (1997). Targeting of SCG10 to the area of the Golgi complex is mediated by its NH2-terminal region. *J Biol Chem* 272, 5175-5182.

- Donaldson, J.G., and Jackson, C.L. (2011). ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* *12*, 362-375.
- Dorsky, R.I., Raible, D.W., and Moon, R.T. (2000). Direct regulation of nacre, a zebrafish MITF homolog required for pigment cell formation, by the Wnt pathway. *Genes Dev* *14*, 158-162.
- Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* *3*, 11-22.
- Errede, B., and Levin, D.E. (1993). A conserved kinase cascade for MAP kinase activation in yeast. *Curr Opin Cell Biol* *5*, 254-260.
- Fabian, J.R., Daar, I.O., and Morrison, D.K. (1993). Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase. *Mol Cell Biol* *13*, 7170-7179.
- Farooq, A., and Zhou, M.M. (2004). Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cell Signal* *16*, 769-779.
- Fehrenbacher, N., Bar-Sagi, D., and Philips, M. (2009). Ras/MAPK signaling from endomembranes. *Mol Oncol* *3*, 297-307.
- Feig, L.A., Urano, T., and Cantor, S. (1996). Evidence for a Ras/Ral signaling cascade. *Trends Biochem Sci* *21*, 438-441.
- Fincham, V.J., James, M., Frame, M.C., and Winder, S.J. (2000). Active ERK/MAP kinase is targeted to newly forming cell-matrix adhesions by integrin engagement and v-Src. *Embo J* *19*, 2911-2923.
- Fivaz, M., and Meyer, T. (2005). Reversible intracellular translocation of KRas but not HRas in hippocampal neurons regulated by Ca²⁺/calmodulin. *J Cell Biol* *170*, 429-441.
- Flavell, J.R., Baumforth, K.R., Wood, V.H., Davies, G.L., Wei, W., Reynolds, G.M., Morgan, S., Boyce, A., Kelly, G.L., Young, L.S., *et al.* (2008). Down-regulation of the TGF-beta target gene, PTPRK, by the Epstein-Barr virus encoded EBNA1 contributes to the growth and survival of Hodgkin lymphoma cells. *Blood* *111*, 292-301.
- Fleming, Y., Armstrong, C.G., Morrice, N., Paterson, A., Goedert, M., and Cohen, P. (2000). Synergistic activation of stress-activated protein kinase 1/c-Jun N-terminal kinase (SAPK1/JNK) isoforms by mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) and MKK7. *Biochem J* *352 Pt 1*, 145-154.
- Fuchs, M., Muller, T., Lerch, M.M., and Ullrich, A. (1996). Association of human protein-tyrosine phosphatase kappa with members of the armadillo family. *J Biol Chem* *271*, 16712-16719.
- Garant, K.A., Shmulevitz, M., Pan, L., Daigle, R.M., Ahn, D.G., Gujar, S.A., and Lee, P.W. (2016). Oncolytic reovirus induces intracellular redistribution of Ras to promote apoptosis and progeny virus release. *Oncogene* *35*, 771-782.

- Gebbink, M.F., Verheijen, M.H., Zondag, G.C., van Etten, I., and Moolenaar, W.H. (1993a). Purification and characterization of the cytoplasmic domain of human receptor-like protein tyrosine phosphatase RPTP mu. *Biochemistry* *32*, 13516-13522.
- Gebbink, M.F., Zondag, G.C., Wubbolts, R.W., Beijersbergen, R.L., van Etten, I., and Moolenaar, W.H. (1993b). Cell-cell adhesion mediated by a receptor-like protein tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* *268*, 16101-16104.
- Gideon, P., John, J., Frech, M., Lautwein, A., Clark, R., Scheffler, J.E., and Wittinghofer, A. (1992). Mutational and kinetic analyses of the GTPase-activating protein (GAP)-p21 interaction: the C-terminal domain of GAP is not sufficient for full activity. *Mol Cell Biol* *12*, 2050-2056.
- Glading, A., Uberall, F., Keyse, S.M., Lauffenburger, D.A., and Wells, A. (2001). Membrane proximal ERK signaling is required for M-calpain activation downstream of epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem* *276*, 23341-23348.
- Gonzalez, F.A., Raden, D.L., Rigby, M.R., and Davis, R.J. (1992). Heterogeneous expression of four MAP kinase isoforms in human tissues. *FEBS Lett* *304*, 170-178.
- Gupta, S., Radha, V., Sudhakar, C., and Swarup, G. (2002). A nuclear protein tyrosine phosphatase activates p53 and induces caspase-1-dependent apoptosis. *FEBS Lett* *532*, 61-66.
- Halle, M., Tremblay, M.L., and Meng, T.C. (2007). Protein tyrosine phosphatases: emerging regulators of apoptosis. *Cell Cycle* *6*, 2773-2781.
- Han, J., Lee, J.D., Bibbs, L., and Ulevitch, R.J. (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* *265*, 808-811.
- Hancock, J.F., and Parton, R.G. (2005). Ras plasma membrane signalling platforms. *Biochem J* *389*, 1-11.
- Hancock, J.F., Paterson, H., and Marshall, C.J. (1990). A polybasic domain or palmytoilation is required in addition to the CAAX motif to localize p21Ras to the membrane. *Cell* *63*, 133-139.
- Hardy, S., Julien, S.G., and Tremblay, M.L. (2012). Impact of oncogenic protein tyrosine phosphatases in cancer. *Anticancer Agents Med Chem* *12*, 4-18.
- Hart, K.C., and Donoghue, D.J. (1997). Derivatives of activated H-ras lacking C-terminal lipid modifications retain transforming ability if targeted to the correct subcellular location. *Oncogene* *14*, 945-953.
- Harvey, J.J. (1964). An Unidentified Virus Which Causes the Rapid Production of Tumours in Mice. *Nature* *204*, 1104-1105.
- Heasman, S.J., and Ridley, A.J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* *9*, 690-701.

Herrero, A., Casar, B., Colon-Bolea, P., Agudo-Ibanez, L., and Crespo, P. (2016). Defined spatiotemporal features of RAS-ERK signals dictate cell fate in MCF-7 mammary epithelial cells. *Mol Biol Cell* *27*, 1958-1968.

Herrero, A., Pinto, A., Colon-Bolea, P., Casar, B., Jones, M., Agudo-Ibanez, L., Vidal, R., Tenbaum, S.P., Nuciforo, P., Valdizan, E.M., *et al.* (2015). Small Molecule Inhibition of ERK Dimerization Prevents Tumorigenesis by RAS-ERK Pathway Oncogenes. *Cancer Cell* *28*, 170-182.

Herrmann, C. (2003). Ras-effector interactions: after one decade. *Curr Opin Struct Biol* *13*, 122-129.

Hornberg, J.J., Bruggeman, F.J., Binder, B., Geest, C.R., de Vaate, A.J., Lankelma, J., Heinrich, R., and Westerhoff, H.V. (2005). Principles behind the multifarious control of signal transduction. ERK phosphorylation and kinase/phosphatase control. *FEBS J* *272*, 244-258.

Hoshino, T., Shimizu, K., Honda, T., Kawakatsu, T., Fukuyama, T., Nakamura, T., Matsuda, M., and Takai, Y. (2004). A novel role of nectins in inhibition of the E-cadherin-induced activation of Rac and formation of cell-cell adherens junctions. *Mol Biol Cell* *15*, 1077-1088.

Howe, L.R., Leever, S.J., Gomez, N., Nakielny, S., Cohen, P., and Marshall, C.J. (1992). Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell* *71*, 335-342.

Hunter, T. (1998). The role of tyrosine phosphorylation in cell growth and disease. *Harvey Lect* *94*, 81-119.

Hutagalung, A.H., and Novick, P.J. (2011). Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol Rev* *91*, 119-149.

Inder, K., Harding, A., Plowman, S.J., Philips, M.R., Parton, R.G., and Hancock, J.F. (2008). Activation of the MAPK module from different spatial locations generates distinct system outputs. *Mol Biol Cell* *19*, 4776-4784.

Jiang, Y.P., Wang, H., D'Eustachio, P., Musacchio, J.M., Schlessinger, J., and Sap, J. (1993). Cloning and characterization of R-PTP-kappa, a new member of the receptor protein tyrosine phosphatase family with a proteolytically cleaved cellular adhesion molecule-like extracellular region. *Mol Cell Biol* *13*, 2942-2951.

Johnson, G.L., and Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* *298*, 1911-1912.

Jordan, J.D., Landau, E.M., and Iyengar, R. (2000). Signaling networks: the origins of cellular multitasking. *Cell* *103*, 193-200.

Jura, N., Scotto-Lavino, E., Sobczyk, A., and Bar-Sagi, D. (2006). Differential modification of Ras proteins by ubiquitination. *Mol Cell* *21*, 679-687.

- Kamakura, S., Moriguchi, T., and Nishida, E. (1999). Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus. *J Biol Chem* 274, 26563-26571.
- Karnoub, A.E., and Weinberg, R.A. (2008). Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 517-531.
- Karreth, F.A., and Tuveson, D.A. (2009). Modelling oncogenic Ras/Raf signalling in the mouse. *Curr Opin Genet Dev* 19, 4-11.
- Khokhlatchev, A.V., Canagarajah, B., Wilsbacher, J., Robinson, M., Atkinson, M., Goldsmith, E., and Cobb, M.H. (1998). Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* 93, 605-615.
- Kim, Y.S., Jung, J.A., Kim, H.J., Ahn, Y.H., Yoo, J.S., Oh, S., Cho, C., Yoo, H.S., and Ko, J.H. (2011). Galectin-3 binding protein promotes cell motility in colon cancer by stimulating the shedding of protein tyrosine phosphatase kappa by proprotein convertase 5. *Biochem Biophys Res Commun* 404, 96-102.
- Kim, Y.S., Kang, H.Y., Kim, J.Y., Oh, S., Kim, C.H., Ryu, C.J., Miyoshi, E., Taniguchi, N., and Ko, J.H. (2006). Identification of target proteins of N-acetylglucosaminyl transferase V in human colon cancer and implications of protein tyrosine phosphatase kappa in enhanced cancer cell migration. *Proteomics* 6, 1187-1191.
- Kirsten, W.H., Mayer, L.A., and Welander, C.W. (1966). Infective and noninfective viral murine leukemias. *Natl Cancer Inst Monogr* 22, 369-377.
- Kypta, R.M., Su, H., and Reichardt, L.F. (1996). Association between a transmembrane protein tyrosine phosphatase and the cadherin-catenin complex. *J Cell Biol* 134, 1519-1529.
- Lammers, R., Moller, N.P., and Ullrich, A. (1997). The transmembrane protein tyrosine phosphatase alpha dephosphorylates the insulin receptor in intact cells. *FEBS Lett* 404, 37-40.
- Larsen, M., Tremblay, M.L., and Yamada, K.M. (2003). Phosphatases in cell-matrix adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 700-711.
- Lee, J.C., Laydon, J.T., McDonnell, P.C., Gallagher, T.F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M.J., Heys, J.R., Landvatter, S.W., *et al.* (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372, 739-746.
- Levchenko, A., Bruck, J., and Sternberg, P.W. (2000). Scaffold proteins may biphasically affect the levels of mitogen-activated protein kinase signaling and reduce its threshold properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5818-5823.
- Levy, C., Khaled, M., and Fisher, D.E. (2006). MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med* 12, 406-414.

- Li, P.M., Zhang, W.R., and Goldstein, B.J. (1996). Suppression of insulin receptor activation by overexpression of the protein-tyrosine phosphatase LAR in hepatoma cells. *Cell Signal* 8, 467-473.
- Limnander, A., and Weiss, A. (2011). Ca-dependent Ras/Erk signaling mediates negative selection of autoreactive B cells. *Small GTPases* 2, 282-288.
- Lister, J.A., Close, J., and Raible, D.W. (2001). Duplicate *mitf* genes in zebrafish: complementary expression and conservation of melanogenic potential. *Dev Biol* 237, 333-344.
- Littman, D.R., Thomas, Y., Maddon, P.J., Chess, L., and Axel, R. (1985). The isolation and sequence of the gene encoding T8: a molecule defining functional classes of T lymphocytes. *Cell* 40, 237-246.
- Liu, Q., and Hofmann, P.A. (2004). Protein phosphatase 2A-mediated cross-talk between p38 MAPK and ERK in apoptosis of cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286, H2204-2212.
- Locasale, J.W., Shaw, A.S., and Chakraborty, A.K. (2007). Scaffold proteins confer diverse regulatory properties to protein kinase cascades. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 13307-13312.
- Low, H.B., and Zhang, Y. (2016). Regulatory Roles of MAPK Phosphatases in Cancer. *Immune Netw* 16, 85-98.
- Lowy, D.R., and Willumsen, B.M. (1993). Function and regulation of ras. *Annu Rev Biochem* 62, 851-891.
- Lundquist, E.A. (2006). Small GTPases. *WormBook*, 1-18.
- Ma, J., and Karplus, M. (1997). Molecular switch in signal transduction: reaction paths of the conformational changes in ras p21. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11905-11910.
- Macara, I.G., Lounsbury, K.M., Richards, S.A., McKiernan, C., and Bar-Sagi, D. (1996). The Ras superfamily of GTPases. *FASEB J* 10, 625-630.
- Maegawa, H., Hasegawa, M., Sugai, S., Obata, T., Ugi, S., Morino, K., Egawa, K., Fujita, T., Sakamoto, T., Nishio, Y., *et al.* (1999). Expression of a dominant negative SHP-2 in transgenic mice induces insulin resistance. *J Biol Chem* 274, 30236-30243.
- Maher, J., Baker, D.A., Manning, M., Dibb, N.J., and Roberts, I.A. (1995). Evidence for cell-specific differences in transformation by N-, H- and K-ras. *Oncogene* 11, 1639-1647.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 3, 459-465.
- Malumbres, M., and Pellicer, A. (1998). RAS pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front Biosci* 3, d887-912.

- Mandl, M., Slack, D.N., and Keyse, S.M. (2005). Specific inactivation and nuclear anchoring of extracellular signal-regulated kinase 2 by the inducible dual-specificity protein phosphatase DUSP5. *Mol Cell Biol* 25, 1830-1845.
- Marais, R., Light, Y., Paterson, H.F., and Marshall, C.J. (1995). Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *EMBO J* 14, 3136-3145.
- Marais, R., Wynne, J., and Treisman, R. (1993). The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell* 73, 381-393.
- Marshall, M.S. (1993). The effector interactions of p21ras. *Trends Biochem Sci* 18, 250-254.
- Marshall, M.S. (1995). Ras target proteins in eukaryotic cells. *FASEB J* 9, 1311-1318.
- Martin-Blanco, E. (2000). p38 MAPK signalling cascades: ancient roles and new functions. *Bioessays* 22, 637-645.
- Matallanas, D., Arozarena, I., Berciano, M.T., Aaronson, D.S., Pellicer, A., Lafarga, M., and Crespo, P. (2003). Differences in the inhibitory specificities of H-Ras, K-Ras and N-Ras (N17) dominant negative mutants are related to their membrane microlocalization. *J Biol Chem* 278, 4572-4581.
- Matallanas, D., Sanz-Moreno, V., Arozarena, I., Calvo, F., Agudo-Ibanez, L., Santos, E., Berciano, M.T., and Crespo, P. (2006). Distinct utilization of effectors and biological outcomes resulting from site-specific Ras activation: Ras functions in lipid rafts and Golgi complex are dispensable for proliferation and transformation. *Mol Cell Biol* 26, 100-116.
- McArdle, L., Rafferty, M., Maelandsmo, G.M., Bergin, O., Farr, C.J., Dervan, P.A., O'Loughlin, S., Herlyn, M., and Easty, D.J. (2001). Protein tyrosine phosphatase genes downregulated in melanoma. *J Invest Dermatol* 117, 1255-1260.
- Meng, K., Rodriguez-Pena, A., Dimitrov, T., Chen, W., Yamin, M., Noda, M., and Deuel, T.F. (2000). Pleiotrophin signals increased tyrosine phosphorylation of beta-catenin through inactivation of the intrinsic catalytic activity of the receptor-type protein tyrosine phosphatase beta/zeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2603-2608.
- Michailidou, C., Jones, M., Walker, P., Kamarashev, J., Kelly, A., and Hurlstone, A.F. (2009). Dissecting the roles of Raf- and PI3K-signalling pathways in melanoma formation and progression in a zebrafish model. *Dis Model Mech* 2, 399-411.
- Misaki, R., Morimatsu, M., Uemura, T., Waguri, S., Miyoshi, E., Taniguchi, N., Matsuda, M., and Taguchi, T. (2010). Palmitoylated Ras proteins traffic through recycling endosomes to the plasma membrane during exocytosis. *J Cell Biol* 191, 23-29.
- Mitchell, D.A., Vasudevan, A., Linder, M.E., and Deschenes, R.J. (2006). Protein palmitoylation by a family of DHHC protein S-acyltransferases. *J Lipid Res* 47, 1118-1127.

Mochizuki, N., Yamashita, S., Kurokawa, K., Ohba, Y., Nagai, T., Miyakawa, A., and Matsuda, M. (2001). Spatio-temporal images of growth factor induced activation of Ras and Rap1. *Nature* *411*, 1065-1068.

Moodie, S.A., Willumsen, B.M., Weber, M.J., and Wolfman, A. (1993). Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science* *260*, 1658-1661.

Mooney, R.A., Kulas, D.T., Bleyl, L.A., and Novak, J.S. (1997). The protein tyrosine phosphatase LAR has a major impact on insulin receptor dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* *235*, 709-712.

Muda, M., Theodosiou, A., Rodrigues, N., Boschert, U., Camps, M., Gillieron, C., Davies, K., Ashworth, A., and Arkinstall, S. (1996). The dual specificity phosphatases M3/6 and MKP-3 are highly selective for inactivation of distinct mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* *271*, 27205-27208.

Nagashima, T., Shimodaira, H., Ide, K., Nakakuki, T., Tani, Y., Takahashi, K., Yumoto, N., and Hatakeyama, M. (2007). Quantitative transcriptional control of ErbB receptor signaling undergoes graded to biphasic response for cell differentiation. *J Biol Chem* *282*, 4045-4056.

Nakamura, M., Kishi, M., Sakaki, T., Hashimoto, H., Nakase, H., Shimada, K., Ishida, E., and Konishi, N. (2003). Novel tumor suppressor loci on 6q22-23 in primary central nervous system lymphomas. *Cancer Res* *63*, 737-741.

Nazarian, R., Shi, H., Wang, Q., Kong, X., Koya, R.C., Lee, H., Chen, Z., Lee, M.K., Attar, N., Sazegar, H., *et al.* (2010). Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* *468*, 973-977.

Novellino, L., De Filippo, A., Deho, P., Perrone, F., Pilotti, S., Parmiani, G., and Castelli, C. (2008). PTPRK negatively regulates transcriptional activity of wild type and mutated oncogenic beta-catenin and affects membrane distribution of beta-catenin/E-cadherin complexes in cancer cells. *Cell Signal* *20*, 872-883.

Ohba, Y., Kurokawa, K., and Matsuda, M. (2003). Mechanism of the spatio-temporal regulation of Ras and Rap1. *Embo J* *22*, 859-869.

Oksvold, M.P., Skarpen, E., Wierod, L., Paulsen, R.E., and Huitfeldt, H.S. (2001). Re-localization of activated EGF receptor and its signal transducers to multivesicular compartments downstream of early endosomes in response to EGF. *Eur J Cell Biol* *80*, 285-294.

Olsen, J.V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., and Mann, M. (2006). Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* *127*, 635-648.

Omerovic, J., Laude, A.J., and Prior, I.A. (2007). Ras proteins: paradigms for compartmentalised and isoform-specific signalling. *Cell Mol Life Sci* *64*, 2575-2589.

- Pai, E.F., Kabsch, W., Krengel, U., Holmes, K.C., John, J., and Wittinghofer, A. (1989). Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature* *341*, 209-214.
- Paroo, Z., Ye, X., Chen, S., and Liu, Q. (2009). Phosphorylation of the human microRNA-generating complex mediates MAPK/Erk signaling. *Cell* *139*, 112-122.
- Parsons, J.T. (2003). Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci* *116*, 1409-1416.
- Pasqualato, S., Renault, L., and Cherfils, J. (2002). Arf, Arl, Arp and Sar proteins: a family of GTP-binding proteins with a structural device for 'front-back' communication. *EMBO Rep* *3*, 1035-1041.
- Payne, D.M., Rossomando, A.J., Martino, P., Erickson, A.K., Her, J.H., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Weber, M.J., and Sturgill, T.W. (1991). Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J* *10*, 885-892.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M.H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* *22*, 153-183.
- Pelech, S.L., and Sanghera, J.S. (1992). Mitogen-activated protein kinases: versatile transducers for cell signaling. *Trends Biochem Sci* *17*, 233-238.
- Phillips-Mason, P.J., Craig, S.E., and Brady-Kalnay, S.M. (2014). A protease storm cleaves a cell-cell adhesion molecule in cancer: multiple proteases converge to regulate PTPmu in glioma cells. *J Cell Biochem* *115*, 1609-1623.
- Prior, I.A., Harding, A., Yan, J., Sluimer, J., Parton, R.G., and Hancock, J.F. (2001). GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity. *Nat Cell Biol* *3*, 368-375.
- Quilliam, L.A., Khosravi-Far, R., Huff, S.Y., and Der, C.J. (1995). Guanine nucleotide exchange factors: activators of the Ras superfamily of proteins. *Bioessays* *17*, 395-404.
- Raingeaud, J., Whitmarsh, A.J., Barrett, T., Derijard, B., and Davis, R.J. (1996). MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* *16*, 1247-1255.
- Rajakulendran, T., Sahmi, M., Lefrancois, M., Sicheri, F., and Therrien, M. (2009). A dimerization-dependent mechanism drives RAF catalytic activation. *Nature* *461*, 542-545.
- Raman, M., Chen, W., and Cobb, M.H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* *26*, 3100-3112.
- Raviv, Z., Kalie, E., and Seger, R. (2004). MEK5 and ERK5 are localized in the nuclei of resting as well as stimulated cells, while MEKK2 translocates from the cytosol to the nucleus upon stimulation. *J Cell Sci* *117*, 1773-1784.

Ray, L.B., and Sturgill, T.W. (1988). Insulin-stimulated microtubule associated protein kinase is detectable by analytical gel chromatography as a 35-kDa protein in myocytes, adipocytes, and hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 262, 307-313.

Rebollo, A., Perez-Sala, D., and Martinez, A.C. (1999). Bcl-2 differentially targets K-, N-, and H-Ras to mitochondria in IL-2 supplemented or deprived cells: implications in prevention of apoptosis. *Oncogene* 18, 4930-4939.

Repasky, G.A., Chenette, E.J., and Der, C.J. (2004). Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends Cell Biol* 14, 639-647.

Reszka, A.A., Seger, R., Diltz, C.D., Krebs, E.G., and Fischer, E.H. (1995). Association of mitogen-activated protein kinase with the microtubule cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8881-8885.

Rhee, I., and Veillette, A. (2012). Protein tyrosine phosphatases in lymphocyte activation and autoimmunity. *Nat Immunol* 13, 439-447.

Robbins, D.J., Zhen, E., Cheng, M., Xu, S., Vanderbilt, C.A., Ebert, D., Garcia, C., Dang, A., and Cobb, M.H. (1993). Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1, 2, and 3. *J Am Soc Nephrol* 4, 1104-1110.

Roberts, P.J., and Der, C.J. (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26, 3291-3310.

Robinson, M.J., and Cobb, M.H. (1997). Mitogen -Activated Protein kinases pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9, 180-186.

Rocks, O., Peyker, A., Kahms, M., Verveer, P.J., Koerner, C., Lumbierres, M., Kuhlmann, J., Waldmann, H., Wittinghofer, A., and Bastiaens, P.I. (2005). An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms. *Science* 307, 1746-1752.

Rodriguez-Viciano, P., Sabatier, C., and McCormick, F. (2004). Signaling specificity by Ras family GTPases is determined by the full spectrum of effectors they regulate. *Mol Cell Biol* 24, 4943-4954.

Rodriguez-Viciano, P., Warne, P.H., Khwaja, A., Marte, B.M., Pappin, D., Das, P., Waterfield, M.D., Ridley, A., and Downward, J. (1997). Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell* 89, 457-467.

Romano, D., Maccario, H., Doherty, C., Quinn, N.P., Kolch, W., and Matallanas, D. (2013). The differential effects of wild-type and mutated K-Ras on MST2 signaling are determined by K-Ras activation kinetics. *Mol Cell Biol* 33, 1859-1868.

Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., and Nebreda, A.R. (1994). A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 78, 1027-1037.

Roy, S., Wyse, B., and Hancock, J.F. (2002). H-Ras signaling and K-Ras signaling are differentially dependent on endocytosis. *Mol Cell Biol* 22, 5128-5140.

Santos, E., and Nebreda, A.R. (1989). Structural and functional properties of ras proteins. *FASEB J* 3, 2151-2163.

Sap, J., Jiang, Y.P., Friedlander, D., Grumet, M., and Schlessinger, J. (1994). Receptor tyrosine phosphatase R-PTP-kappa mediates homophilic binding. *Mol Cell Biol* 14, 1-9.

Saraste, J., and Kuismanen, E. (1984). Pre- and post-Golgi vacuoles operate in the transport of Semliki Forest virus membrane glycoproteins to the cell surface. *Cell* 38, 535-549.

Saxena, M., and Mustelin, T. (2000). Extracellular signals and scores of phosphatases: all roads lead to MAP kinase. *Semin Immunol* 12, 387-396.

Saxena, M., Williams, S., Gilman, J., and Mustelin, T. (1998). Negative regulation of T cell antigen receptor signal transduction by hematopoietic tyrosine phosphatase (HePTP). *J Biol Chem* 273, 15340-15344.

Scheffzek, K., Ahmadian, M.R., Kabsch, W., Wiesmuller, L., Lautwein, A., Schmitz, F., and Wittinghofer, A. (1997). The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* 277, 333-338.

Schmidt, A., and Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* 16, 1587-1609.

Schwarzbauer, J.E. (1997). Cell migration: may the force be with you. *Curr Biol* 7, R292-294.

Scott, A., Haystead, C.M., and Haystead, T.A. (1995). Purification of a 12,020-dalton protein that enhances the activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase by MAP kinase kinase. *J Biol Chem* 270, 24540-24547.

Sengupta, P., Baird, B., and Holowka, D. (2007). Lipid rafts, fluid/fluid phase separation, and their relevance to plasma membrane structure and function. *Semin Cell Dev Biol* 18, 583-590.

Shipitsin, M., and Feig, L.A. (2004). RalA but not RalB enhances polarized delivery of membrane proteins to the basolateral surface of epithelial cells. *Mol Cell Biol* 24, 5746-5756.

Stewart, M. (2007). Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 195-208.

Stoker, A.W. (2005). Protein tyrosine phosphatases and signalling. *J Endocrinol* 185, 19-33.

Sudo, T., Yagasaki, Y., Hama, H., Watanabe, N., and Osada, H. (2002). Exip, a new alternative splicing variant of p38 alpha, can induce an earlier onset of apoptosis in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 291, 838-843.

Sun, P.H., Ye, L., Mason, M.D., and Jiang, W.G. (2013a). Protein tyrosine phosphatase kappa (PTPRK) is a negative regulator of adhesion and invasion of breast cancer cells, and associates with poor prognosis of breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* *139*, 1129-1139.

Sun, P.H., Ye, L., Mason, M.D., and Jiang, W.G. (2013b). Receptor-like protein tyrosine phosphatase kappa negatively regulates the apoptosis of prostate cancer cells via the JNK pathway. *Int J Oncol* *43*, 1560-1568.

Swarthout, J.T., Lobo, S., Farh, L., Croke, M.R., Greentree, W.K., Deschenes, R.J., and Linder, M.E. (2005). DHHC9 and GCP16 constitute a human protein fatty acyltransferase with specificity for H- and N-Ras. *J Biol Chem* *280*, 31141-31148.

Swift, A.M., and Machamer, C.E. (1991). A Golgi retention signal in a membrane-spanning domain of coronavirus E1 protein. *J Cell Biol* *115*, 19-30.

Takai, Y., Sasaki, T., and Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* *81*, 153-208.

Tanase, C.A. (2010). Histidine domain-protein tyrosine phosphatase interacts with Grb2 and GrpL. *PLoS One* *5*, e14339.

Taub, N., Teis, D., Ebner, H.L., Hess, M.W., and Huber, L.A. (2007). Late endosomal traffic of the epidermal growth factor receptor ensures spatial and temporal fidelity of mitogen-activated protein kinase signaling. *Mol Biol Cell* *18*, 4698-4710.

Tautz, L., Pellecchia, M., and Mustelin, T. (2006). Targeting the PTPome in human disease. *Expert Opin Ther Targets* *10*, 157-177.

Teis, D., Taub, N., Kurzbauer, R., Hilber, D., de Araujo, M.E., Erlacher, M., Offterdinger, M., Villunger, A., Geley, S., Bohn, G., *et al.* (2006). p14-MP1-MEK1 signaling regulates endosomal traffic and cellular proliferation during tissue homeostasis. *J Cell Biol* *175*, 861-868.

Thompson, P.A., Ledbetter, J.A., Rapp, U.R., and Bolen, J.B. (1991). The Raf-1 serine-threonine kinase is a substrate for the p56lck protein tyrosine kinase in human T-cells. *Cell Growth Differ* *2*, 609-617.

Tong, L., Milburn, M.V., de Vos, A.M., and Kim, S.H. (1989). Structure of ras proteins. *Science* *245*, 244.

Tonks, N.K. (2006). Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* *7*, 833-846.

Tonks, N.K. (2013). Protein tyrosine phosphatases--from housekeeping enzymes to master regulators of signal transduction. *FEBS J* *280*, 346-378.

Townsley, F.M., Wilson, D.W., and Pelham, H.R. (1993). Mutational analysis of the human KDEL receptor: distinct structural requirements for Golgi retention, ligand binding and retrograde transport. *EMBO J* *12*, 2821-2829.

- Trueblood, C.E., Boyartchuk, V.L., Picologlou, E.A., Rozema, D., Poulter, C.D., and Rine, J. (2000). The CaaX proteases, Afc1p and Rce1p, have overlapping but distinct substrate specificities. *Mol Cell Biol* 20, 4381-4392.
- Urano, T., Emkey, R., and Feig, L.A. (1996). Ral-GTPases mediate a distinct downstream signaling pathway from Ras that facilitates cellular transformation. *EMBO J* 15, 810-816.
- Vetter, I.R., and Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294, 1299-1304.
- Villalonga, P., Lopez-Alcala, C., Chiloeches, A., Gil, J., Marais, R., Bachs, O., and Agell, N. (2002). Calmodulin prevents activation of Ras by PKC in 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 277, 37929-37935.
- Vivanco, I., and Sawyers, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 489-501.
- Vojtek, A.B., Hollenberg, S.M., and Cooper, J.A. (1993). Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* 74, 205-214.
- Walia, V., Prickett, T.D., Kim, J.S., Gartner, J.J., Lin, J.C., Zhou, M., Rosenberg, S.A., Elble, R.C., Solomon, D.A., Waldman, T., *et al.* (2014). Mutational and functional analysis of the tumor-suppressor PTPRD in human melanoma. *Hum Mutat* 35, 1301-1310.
- Wang, B., Zhang, P., and Wei, Q. (2008). Recent progress on the structure of Ser/Thr protein phosphatases. *Sci China C Life Sci* 51, 487-494.
- Wang, L., Sato-Otsubo, A., Sugita, S., Takase, H., Mochizuki, M., Usui, Y., Goto, H., Koyama, T., Akiyama, H., Miura, O., *et al.* (2014). High-resolution genomic copy number profiling of primary intraocular lymphoma by single nucleotide polymorphism microarrays. *Cancer Sci* 105, 592-599.
- Wang, S.E., Wu, F.Y., Shin, I., Qu, S., and Arteaga, C.L. (2005). Transforming growth factor {beta} (TGF- β)-Smad target gene protein tyrosine phosphatase receptor type kappa is required for TGF- β function. *Mol Cell Biol* 25, 4703-4715.
- Warne, P.H., Viciano, P.R., and Downward, J. (1993). Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. *Nature* 364, 352-355.
- Weis, K. (2003). Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell* 112, 441-451.
- Wennerberg, K., Rossman, K.L., and Der, C.J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 118, 843-846.
- Whitmarsh, A.J. (2007). Regulation of gene transcription by mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1285-1298.

Williams, N.G., Roberts, T.M., and Li, P. (1992). Both p21ras and pp60v-src are required, but neither alone is sufficient, to activate the Raf-1 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 2922-2926.

Willingham, M.C., Pastan, I., Shih, T.Y., and Scolnick, E.M. (1980). Localization of the src gene product of the Harvey strain of MSV to plasma membrane of transformed cells by electron microscopic immunocytochemistry. *Cell* *19*, 1005-1014.

Wolfman, J.C., Planchon, S.M., Liao, J., and Wolfman, A. (2006). Structural and functional consequences of c-N-Ras constitutively associated with intact mitochondria. *Biochim Biophys Acta* *1763*, 1108-1124.

Wu, Y.I., Frey, D., Lungu, O.I., Jaehrig, A., Schlichting, I., Kuhlman, B., and Hahn, K.M. (2009). A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells. *Nature* *461*, 104-108.

Xu, J., Hedberg, C., Dekker, F.J., Li, Q., Haigis, K.M., Hwang, E., Waldmann, H., and Shannon, K. (2012). Inhibiting the palmitoylation/depalmitoylation cycle selectively reduces the growth of hematopoietic cells expressing oncogenic Nras. *Blood* *119*, 1032-1035.

Xu, Y., Tan, L.J., Grachtchouk, V., Voorhees, J.J., and Fisher, G.J. (2005). Receptor-type protein-tyrosine phosphatase-kappa regulates epidermal growth factor receptor function. *J Biol Chem* *280*, 42694-42700.

Yan, C., Luo, H., Lee, J.D., Abe, J., and Berk, B.C. (2001). Molecular cloning of mouse ERK5/BMK1 splice variants and characterization of ERK5 functional domains. *J Biol Chem* *276*, 10870-10878.

Yao, Z., and Seger, R. (2009). The ERK signaling cascade--views from different subcellular compartments. *Biofactors* *35*, 407-416.

Yoon, S., and Seger, R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* *24*, 21-44.

Yung, Y., Yao, Z., Hanoch, T., and Seger, R. (2000). ERK1b, a 46-kDa ERK isoform that is differentially regulated by MEK. *J Biol Chem* *275*, 15799-15808.

Zerial, M., and McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* *2*, 107-117.

Zervos, A.S., Faccio, L., Gatto, J.P., Kyriakis, J.M., and Brent, R. (1995). Mxi2, a mitogen-activated protein kinase that recognizes and phosphorylates Max protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 10531-10534.

Zhang, F.L., and Casey, P.J. (1996). Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem* *65*, 241-269.

Zhang, X.F., Settleman, J., Kyriakis, J.M., Takeuchi-Suzuki, E., Elledge, S.J., Marshall, M.S., Bruder, J.T., Rapp, U.R., and Avruch, J. (1993). Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature* 364, 308-313.

Zhou, G., Bao, Z.Q., and Dixon, J.E. (1995). Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 270, 12665-12669.

