



# Dinàmica i funcionalitat de KRas en els endosomes

Mariona Gelabert Baldrich

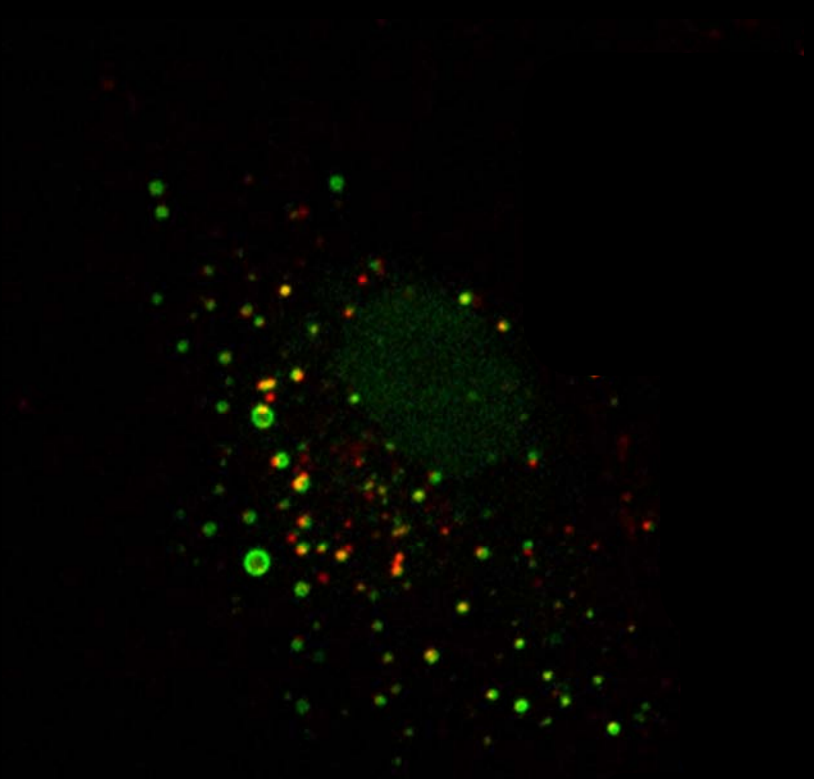
**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada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

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

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

# DINÀMICA I FUNCIONALITAT DE KRAS EN ELS ENDOSOMES

MARIONA GELABERT BALDRICH



TESI DOCTORAL  
SETEMBRE, 2014



MEMÒRIA PRESENTADA PER OPTAR AL GRAU DE DOCTORA EN BIOLOGIA

PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOMEDICINA

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR, IMMUNOLOGIA I NEUROCIÈNCIES

FACULTAT DE MEDICINA

UNIVERSITAT DE BARCELONA

LA INTERESSADA

**MARIONA GELABERT BALDRICH**

VIST-I-PLAU DEL DIRECTOR DE TESI

VIST I-PLAU DEL CO-DIRECTOR DE TESI

**DR. FRANCESC TEBAR RAMON**

**DR. ALBERT POL SOROLLA**



Als meus pares i a l'Aina.

Al Pau.



**“El més bonic d’un desert,  
és que en algun lloc hi amaga un pou d’aigua.”**

*Antoine de Saint-Exupéry, El petit príncep*





Després de gairebé cinc anys, ha arribat l'hora de fer balanç i agrair a totes les persones que heu fet possible la realització d'aquesta tesi, que no sou poques. Pot ser sembla un tòpic si dic que la tesi no només la fa el doctorand i el seu *jefe*, sinó que resulta de l'esforç, la paciència, les ganes, el recolzament i l'amistat de moltíssima, moltíssima gent.

En primer lloc gràcies a tu Siscu, i no per ser el meu *jefe* (que també) sinó per estendre'm a la mà i confiar en mi quan vaig venir a fer l'entrevista. Tot el que sé en ciència t'ho dec a tu, espero que segueixis transmetent la teva passió per la ciència com fins ara. Sembla que fos ahir que picava a la teva porta per entregar-te un currículum i mira, cinc anys que m'has hagut d'aguantar!! Moltíssimes gràcies, de debò.

Parlar d'aquesta tesi és parlar de tots els meus companys del lab 303 (sí, perquè per a mi sempre serem els del 303) i molt especialment de tu Albert H. No saps com agraeixo haver compartit amb tu tots aquests anys. Anys de compartir cultius, cerveses, converses, *buffles*, problemes i moltes, moltíssimes coses més. Mai has tingut un no com a resposta a l'hora de donar un cop de mà a ningú, per molta feina que tinguis, tenir un company com tu facilita molt les coses. Suposo que sé que sabràs per on vaig si et dic que: *is (not) only science, but we like it*.

Annes!!!! La salsa del laboratori!!!! No per fer-vos un agraïment conjunt sou menys importants per a mi, TOT al contrari, no sé què hagués fet sense vosaltres. M'encantaria no parar mai de compartir els cafès matutins amb vosaltres (les petites alegries de la vida, oi?). No sabeu la sort que té aquest laboratori d'haver-vos fixat. Gràcies per ser com sou, no canvieu mai. No són poques les coses que hem compartit aquests últims anys però sé que encara ens en queden moltíssimes més!!! No us vull perdre la pista per res del món. Us estimoooooooo!!!!!! I a tu Ivan per ajudar-me amb la portada!!! Segur que aviat descobriran el teu talent perquè ets boníssim!!!

I què faria aquest laboratori sense l'Alba Fajardo? No m'ho vull ni imaginar!!! Ets de les persones amb més "aguante" que he conegut mai. No sé quants cops ens hauran arribat a confondre, però per a mi ets única!! Moltes gràcies per estar sempre en tot, per compartir trucs de ganxet, concerts ...en fi...treballar al teu costat és molt fàcil, ets genial guapíssima!!!!

Valencianet !!!! Ets dels millors companys de grup que podria haver tingut!! Me'n alegro moltíssim d'haver compartit la poiata amb tu i moltes coses més últimament. Espero que la vida et somrigui, que ho farà, perquè t'ho mereixes!!!!!! Ah, i per molt que l'Albert s'encaparri...valencià i home de bé... i tant que pot ser! ;P

Meri! Al final no hem anat a veure la competència, però vull que sàpigues que sempre que l'escolti pensaré amb tu i amb com hem rigut juntes!!! Una abraçada i que vagi molt bé la nova etapa que comences, no tinc cap dubte que serà així!!!!

I no podria faltar per a res del món la Marta Bosch. Mil gràcies Marta per la teva vitalitat, ets incansable!! S'agraeix moltíssim tenir una persona com tu al laboratori, disposada a escoltar-nos i a entendre'ns, gràcies per fer de pont per a molts de nosaltres. Diuen que el meu riure s'encomana però creu-me que com el teu, no n'hi ha cap. M'encantes!!!!!!!!!!!!

Molinos, gràcies pel suport tècnic durant tots aquests anys. Espero que et vagi molt bé tot, triïs el camí que triïs!! Rentero moltes gràcies, sobretot, per tot el suport informàtic tot aquest temps, sé que pot arribar a cansar molt i tu no has tingut mai un no com a resposta, moltíssimes gràcies de debò!!! També gràcies a tu Sandra perquè, malgrat aquests últims anys no hem coincidit tant, recordaré sempre els meus primers moments i la facilitat que em vas posar perquè estigués a gust!!

Al parlar del lab 303 és inevitable pensar amb els ex-doctorands del laboratori amb qui vaig tenir el plaer de compartir molt bons moments. A tu Maite, perquè vam ser capaces de superar els primers moments sense problemes i a partir d'aquí tot va anar rodat, gràcies per confiar-me certs trucs de laboratori i com enfrontar alguns problemes. A l'Elena i l'Adam, moltes gràcies pels riures i les converses, sempre interessants.

No voldria deixar-me a ningú de l'altra banda, però molt especialment a l'Alba Llopis, l'Atilla (venga campeón que queda poc!!!!), a la Marta Sánchez amb qui he tingut el plaer de compartir escenari a part de laboratori, a l'Alba Gómez i al poeta David Giménez. I a tota la resta de personal del laboratori. Especialment també a l'Eulàlia Rius, amb qui encara compartim el club de lectura, i espero que així sigui per molt de temps.

També voldria donar les gràcies a l'Elsa, hagués estat un enorme plaer treballar al teu costat durant més temps. Que vagi molt bé aquesta nova etapa, ja veuràs que serà genial!

Moltes gràcies a l'Albert Pol, perquè sempre m'ha agradat el teu punt de vista científic. A més, m'encanta que un jefe passi pel lab a "reclutar" gent per anar a fer una cervesa, tant necessària molts cops. Ha estat un plaer compartir aquests moments al Petit pas i fins i tot una sortida a l'Apolo!!! Gràcies a tu també Carles Enrich per transmetre la teva passió per la ciència a tots nosaltres.

Finalment agrair moltíssim a les noies del confocal, la Maria Calvo, l'Anna Bosch i l'Elisenda Coll. No sé el munt d'hores que dec haver passat al confocal, gairebé ha estat com una segona casa per a mi!! Gràcies per dedicar-me el vostre temps sempre que ho he necessitat.

A les meves amigues, molt especialment a l'Spotty, la Peke, la Natàlia i la Marina. Sou les millors amigues que es poden tenir. Mil milions de gràcies perquè, encara que no sapigueu ben bé què estic fent, sempre us heu interessat per com ho portava i m'heu donat ànims quan més ho he necessitat. Aquests últims anys no han estat un camí de roses, oi? però el fet de tenir-nos a prop fa que tot sigui més fàcil. Us estimo guapes!!!!!!!!!!!!!!!!!!!! Sou genials!!!!

Com no gràcies a la família pegolina de Barcelona, a tots en general i molt especialment a la Vicky, la Claudia, el Dimas, el Sergi i l'Edwin. Per tots els sopars que hem fet, les paelles, les festes i tantes, tantes coses. M'encanta estar en la vostra companyia.

Ed anche grazie a voi, gli italiani da Milano!! Soprattutto a voi Alessia e Salvatore. Grazie mille per tutti gli aperitivi che abbiamo fatto nel navigli, per aver stato così gentili con me quando ero sola à Milano. Sono stati solamente quattro mesi ma abbiamo fatto una bella amicizia e non vorrei mai perderla. Siete fantastici!!!!

I a la veritable família, molt especialment als meus pares. Crec que mai us he agraït tot el que heu fet per a mi i ara tinc l'oportunitat de fer-ho, però amb aquestes paraules segur que em quedo curta. Moltíssimes gràcies per recolzar-me en tot moment, per animar-me a fer allò que m'agrada. Aquests últims anys n'hem passat de tots colors, cosa que em va fer adonar de l'extraordinària força de superació que teniu, i això em va confirmar el que en el fons ja sabia: que sou un dels pilars fonamentals de la meua vida. I a tu Aina, ets la millor germana que es pot tenir. Tens una vitalitat i una alegria que ja la voldria!!. Hem passat moments genials i de no tant bons, però creu-me si et dic que l'important és mirar endavant i fer-ho sense por. Ets molt més valenta del que et penses. T'estimo moltíssim!!!!

Moltes gràcies també a l'àvia, l'Ana, la Carmen i el Raül per tants bons moments i dinars familiars amb sobretauls llarguíssimes de les que a mi m'agraden. Ja ho veus àvia, em sap greu dir-te que el Nobel no me'l donaran pas, però em conformo, i molt, amb haver pogut escriure aquesta tesi.

A la família mallorquina, que per estar més lluny no vol pas dir que no els tingui presents. Especialment a ses cosines Gelabert perquè nines: feim un gran equip quan estam juntes per Maria!!!!

I per últim a tu Pau, que precisament per ser l'últim ets el més important. Qui ho diria que *la Peña* ens duria a compartir la vida, oi? I és que les portes amaguen coses fantàstiques. Són moltes les aventures que hem passat junts tots aquests anys i m'emociona pensar que aquest és només el principi d'una altra etapa que farem junts i que tinc moltíssimes ganes de començar. Moltes gràcies per estar cada dia al meu costat, per abraçar-me quan més ho he necessitat, per entendre'm.... simplement per ser-hi. T'estimo.

Gràcies a tots.

# ÍNDEX



<b>ABREVIATURES</b>	23
<b>INTRODUCCIÓ</b>	26
1- Endocitosi	29
1.1- Endocitosi depenent de clatrina	30
1.2- Endocitosi independent de clatrina	31
1.2.1- Depenent de caveolina	31
1.2.2- Depenent d'Arf6	32
1.2.3- Endocitosi de proteïnes GPI	33
1.2.4- Ondulacions de membrana ( <i>Circular Dorsal Ruffles</i> , CDRs)	33
1.3- Macropinocitosi	34
1.4- Tipus de compartiments de la via endocítica	34
1.4.1- Endosomes primerencs	34
1.4.2- Endosomes de reciclatge	36
1.4.3- Endosomes tardans	36
1.4.4- Lisosomes	38
1.5- Endocitosi i senyalització	39
1.6- Mobilitat d'endosomes	40
1.7- Endocitosi i Mobilitat cel·lular	42
1.8- Endocitosi i Càncer	44
2- Súper família de les Ras GTPases	46
2.1- Semblances entre les diferents subfamílies	47
2.2- Les proteïnes Ras (HRas, NRas i KRas)	49
2.2.1- Diferències en les modificacions post-traduccionals de les tres isoformes de Ras	49
2.2.2- Segregació espacial de les proteïnes Ras	51
2.3- KRas	51
2.3.1- Modificacions post-traduccionals	51
2.3.1.1- Fosforilació de la Ser-181	52
2.3.2- Dinàmica de KRas	52
2.3.3- Principals proteïnes d'unió a l'extrem C-terminal de KRas	53
2.3.3.1- Subunitat $\delta$ de la fosfodiesterasa 6 (PDE $\delta$ )	53
2.3.3.2- Calmodulina (CaM)	54
2.3.3.3- Prenilated Rab acceptor 1 (PRA1)	55
2.3.3.4- Galectina 3 (Gal-3)	56
2.3.4- Vies de senyalització de KRas	57
2.3.4.1- Raf1/MEK/ERK	58
2.3.4.2- PI3K/AKT	59
2.4- compartimentalització de la senyal de les proteïnes Ras	60
2.4.1- Ras des dels endosomes	60
2.4.2- Ras des del Golgi	61
2.4.3- Ras des del Reticle endoplasmàtic	61
2.4.3- Ras des dels mitocondris	62
3- Mobilitat cel·lular	63



3.1- Migració i invasió cel·lular	63
3.1.1- Migració en 2D vs 3D	64
3.1.1.1- migració en 2D	64
3.1.1.2- migració en 3D	66
3.2- Metall proteases de la matriu extracel·lular (MMPs)	66
3.3- Tipus d'MMPs	68
3.3.1- MT1-MMP	68
3.4- MMPs activades per MT1	71
3.4.1- MMP2	71
<b>MATERIALS I MÈTODES</b>	<b>73</b>
1- Materials	75
1.1- Anticossos	75
1.2- Reactius	76
1.3- Plàsmids	76
2- Mètodes	78
2.1- Cultius cel·lulars	78
2.2- Transfeccions	78
2.2.1- DNA	78
2.2.1- RNA	80
2.3- Tècniques bioquímiques	80
2.3.1- Electroforesi	80
2.3.2- Western Blot	81
2.3.3- Fraccionament cel·lular	81
2.3.4- Immunoprecipitació	82
2.3.5- Enriquiment de membrana plasmàtica	83
2.4- Tècniques de microscòpia	84
2.4.1- Col·localització	84
2.4.2- Immunocitoquímica	84
2.4.3- Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)	85
2.4.4- Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)	87
2.4.5- Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF)	88
2.4.6- Videomicroscòpia	89
2.4.7- Degradació de la matriu extracel·lular	90
2.5- Anàlisi estadístic	91
<b>ANTECEDENTS I OBJECTIUS</b>	<b>93</b>

<b>RESULTATS</b>	97
<b>Apartat I</b>	
1- Reclutament de KRas als endosomes	99
1.1- Detecció de KRas en els endosomes	99
1.2- Senyals de KRas implicades en la seva localització en els endosomes	100
<b>Apartat II</b>	
2-Estudi de la dinàmica d'associació-dissociació de KRas en els endosomes	107
2.1- Dinàmica de KRas en la membrana dels endosomes	107
2.2- Difusió o transport vesicular?	110
2.3- Anàlisi de la influència del domini globular en la dinàmica de KRas	115
2.3.1- Efecte de l'estat d'activació de KRas	115
2.3.2- Comparació amb altres GTPases	116
2.3.3- Implicació de Sos1	118
2.3.4- Efecte del direccionalment de KRas als endosomes mitjançant la seqüència 2xFYVE	118
2.3.5- La unió de GTP/GDP a KRas modifica la seva dinàmica en la membrana dels endosomes	119
2.4- Anàlisi de la implicació de la part C-terminal de KRas en la seva dinàmica en els endosomes	120
2.4.1- Modificacions post-traduccionals de KRas. Fosforilació de la Ser-181	121
2.4.2- Implicació de la CaM en la dinàmica de KRas	122
2.4.3- Estudi de la implicació de la PDE $\delta$ en la dinàmica de KRas	123
2.5- Paper dels fosfolípids en el reclutament de KRas a la membrana dels endosomes	124
2.5.1- Fosfatidil inositol 3 fosfat (PI3P)	124
2.5.2- Fosfatidilserina (PS)	126
2.6- Diferències en la dinàmica de KRas en endosomes primerencs i tardans	129
<b>Apartat III</b>	
3- Implicació del KRas dels endosomes en diversos processos cel·lulars	135
3.1- Direccionament de KRas als EE, validació de nous mutants	135
3.2- Implicació de KRas en la mobilitat dels endosomes	138
3.2.1- Efecte de l'expressió dels mutants actiu i inactiu de KRas en la mobilitat dels endosomes	138
3.2.2- Estudi del moviment dels endosomes en cèl·lules que expressen els diferents mutants de 2xFYVEKRas	141
3.3- Efecte de l'expressió en la mobilitat cel·lular dels diferents mutants de 2xFYVE KRas	145

3.4- Implicació del KRas endosomal en la degradació de la matriu extracel·lular	147
3.4.1- Distribució d'MT1-MMP en la membrana cel·lular	147
3.4.2- Estudi de la degradació de la matriu extracel·lular	152
<b>DISCUSSIÓ</b>	157
<b>CONCLUSIONS</b>	173
<b>REFERÈNCIES</b>	177

## **A**BREVIATURES



Arf6: ADP-ribosylation factor 6  
BA-1: Bafylomicin A1  
CaM: Calmodulin  
CCV: Clathrin Coated Vesicle  
CDE: Clathrin Dependent endocytosis  
CDR: Circular Dorsal Ruffles  
CIE: Clathrin Independent Endocytosis  
CLIC: Clathrin Independent Carrier  
ECM: Extracellular matrix  
EE: Early Endosome  
EEA-1: Early Endosome Antigen 1  
EGF: Epidermal Growth Factor  
ERC: Endosomal Recycling Compartment  
FRAP: Fluorescence Recovery After Photobleaching  
FRET: Fluorescence Receptor Energy Transfer  
FYVE: Fab 1 (orthologue de PIKfyve en llevat), YOTB, Vac 1 (*vesicle transport protein*),  
i EEA1.  
GAP: GTPase activating Factor  
GEEC: GPI enriched Early Endosomes Compartment  
GEF: Guanine Exchange Factor  
GFP: Green Fluorescence Protein  
HGF: Hepatocyte Growth Factor  
HRas: Harvey Rat Sarcome viral oncogen homolog  
HT: Half Time  
KRas: Kirstein Rat Sarcome viral oncogen homolog  
LactC2: Lactadherin domain C2  
LBPA: Lysobisfosfatidic Acid  
LE: Late Endosome  
MF: Mobile Fraction  
MMP: Matrix Metalloprotease  
MT1-MMP: matrix metalloprotease type I  
MVB: Multivesicular Body  
NRas: Neuroblastoma Ras viral oncogen homolog  
PBR: Polibasic Region  
PDE  $\delta$ : Fosfodiesterasa delta  
PI3K: Phosphatidylinositol 3 kinase  
PI3P: Fosfatidylinositol-3-phosphate  
PRA 1: Prenilated Rab acceptor  
PS: Phosphatidylserine

Rac1: Ras-related C3 botulinium toxin substrate 1

RBD: Ras Binding Domain

RTK: Tyrosine Kinase Receptor

Sos-1: Son of sevenless

TGF- $\alpha$ : Tumor Growth Factor alfa

TIRF: Total Internal Reflection Fluorescence

W13: N-(4-aminobutyl)-5-chloro-2-naphthalenesulfonamide

# **I**NTRODUCCIÓ





## 1- ENDOCITOSI

L'endocitosi és la principal entrada de nutrients, lligands i proteïnes transmembrana a l'interior de la cèl·lula. Els mecanismes endocítics que utilitzen les cèl·lules eucariotes es divideixen en dues classes segons si capten principalment líquids (pinocitosi) o soluts i partícules grans (fagocitosi), com ara bacteris. Existeixen diferents vies d'entrada que poden classificar-se en dependents de clatrina (CDE), independents de clatrina (CIE) o macropinocitosi, segons la maquinària molecular que hi intervé. Tot seguit es detallen les principals vies (Fig. 1).

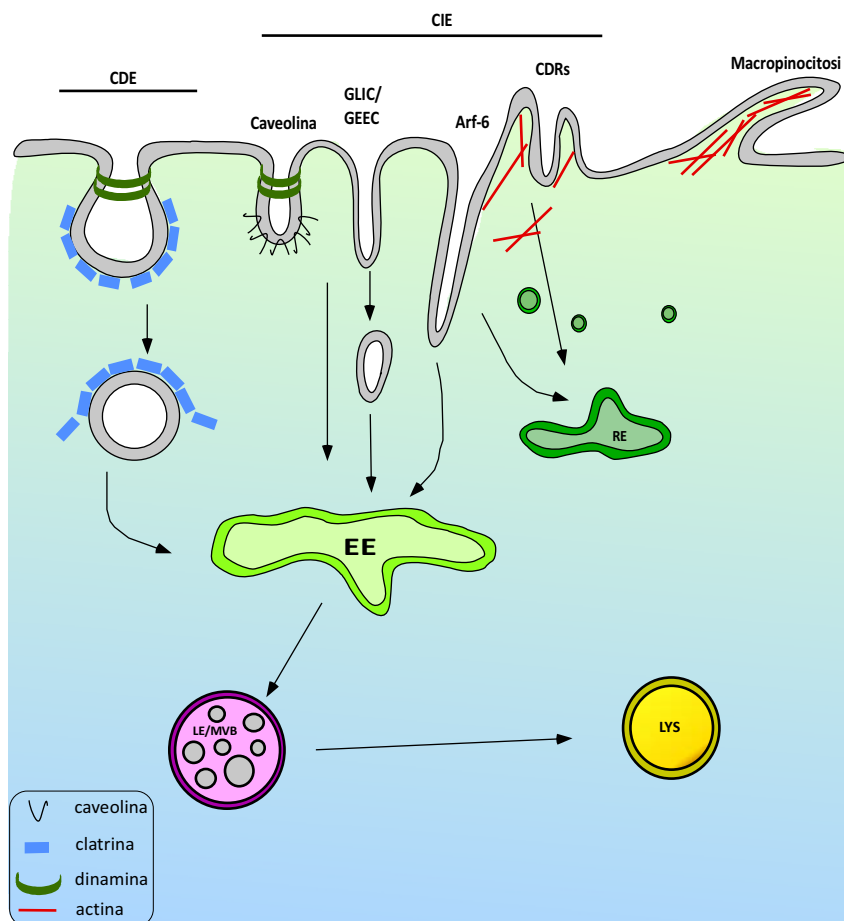


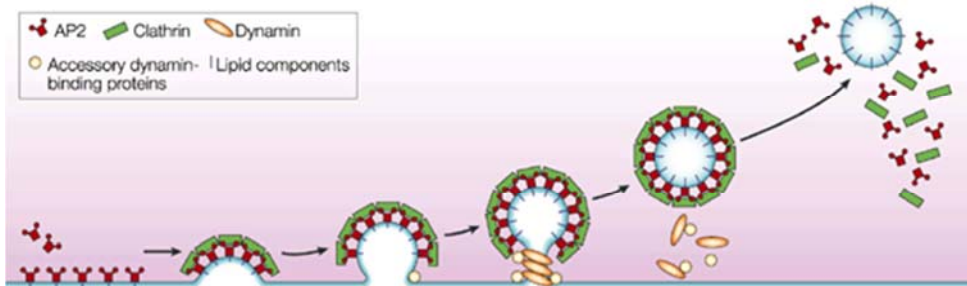
Figura 1. Esquema representatiu dels diferents tipus d'endocitosi.

## 1.1- ENDOCITOSI DEPENENT DE CLATRINA (CDE)

Aquesta via va ser la primera en ser descoberta i la millor caracteritzada fins ara. Segons el model establert per McMahon i Boucrot, l'endocitosi mediada per clatrina pot dividir-se en cinc fases: nucleació, selecció del material a transportar, formació de la coberta de clatrina (*coating*), escissió i pèrdua de la coberta de clatrina (*uncoating*) (McMahon and Boucrot, 2011).

La clatrina és la unitat bàsica de les vesícules formades en aquest tipus d'endocitosi. És una proteïna formada per un trímer de cadenes pesades, d'uns 190 kDa cadascuna, associades a tres cadenes lleugeres d'uns 26 kDa. L'estructura sencera rep el nom de *triskelion*, i polimeritza en forma polièdrica a la cara interna de la membrana cel·lular facilitant la invaginació d'una porció de membrana (Saffarian et al., 2009). Un cop formada la coberta de clatrina, la vesícula pot escindir-se gràcies a la GTPasa dinamina i transformar-se en una vesícula de transport anomenada vesícula recoberta de clatrina (*clathrin coated vesicle*, CCV) (Marks et al., 2001). La CDE comença en zones de la membrana enriquides amb el lípid PIP<sub>2</sub> (fosfatidilinositol-4,5-bifosfat), que es caracteritzen per tenir una petita curvatura. Els PIP<sub>2</sub> provoquen el reclutament de diverses proteïnes com la proteïna adaptadora-2 (AP-2), l'epsina o les F-BAR, que faciliten el reclutament de clatrina a la membrana. La polimerització de la clatrina en aquestes regions provoca la invaginació de la membrana cap a l'interior de la cèl·lula. Quan aquestes vesícules es troben a l'interior de la cèl·lula, la proteïna Hsc-70 conjuntament amb la proteïna auxilina provoquen la desestabilització de la clatrina i la seva dissociació de la vesícula. En aquest punt les vesícules poden fusionar-se amb els endosomes primerencs (Fig. 2) (Eisenberg and Greene, 2007; Gundelfinger et al., 2003).

Aquest tipus d'endocitosi facilita la internalització de diverses molècules, la majoria receptors transmembrana. De fet, la selecció del material a endocitar es dona gràcies al reclutament de proteïnes adaptadores (AP-2) i accessòries que reconeixen les cues citoplasmàtiques dels receptors o bé interaccionen amb certes modificacions post-traduccionals com l'acetilació o la ubiquitinització (Goh et al., 2010; Hsu et al., 2011). Alguns receptors, com el de transferrina, s'internalitzen de manera constitutiva, mentre que d'altres, com el receptor d'EGF (*Epidermal Growth Factor Receptor*), incrementen la seva internalització en resposta a lligand. Les CCVs són importants tan pel transport de molècules cap a la via endocítica com des del trans-Golgi cap als endosomes (Saffarian et al., 2009; Traub, 2005).



**Figura 2.** Esquema representatiu de l'endocitosis mediada per clatrina. (Gundelfinger et al., 2003)

## 1.2- ENDOCITOSI INDEPENDENT DE CLATRINA (CIE)

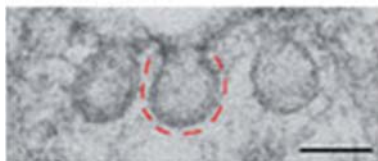
Sota aquest nom s'agrupen diferents processos d'endocitosis que són insensibles a la depleció de clatrina i que sovint depenen de microdominis de membrana plasmàtica rics en colesterol. Damke *et al.* demostraven per primer cop l'any 1994 que en mutar la dinamina, continuava havent-hi endocitosis de fase fluida a la cèl·lula, però l'endocitosis per clatrina quedava inhibida (Damke et al., 1994). També es van dur a terme experiments on es bloquejaven altres proteïnes involucrades en la CDE, com l'Eps15, obtenint-se els mateixos resultats (Benmerah et al., 1998). Tot i els estudis fets per diversos grups, avui en dia encara no es coneix en profunditat aquest tipus d'endocitosis.

### 1.2.1- Depenent de caveolina

La principal estructura d'aquest tipus d'endocitosis són les caveoles. Aquestes són invaginacions de la membrana d'uns 60-80 nm de diàmetre, amb una morfologia característica en forma d'omega invertida (Fig. 3) (Stan, 2002). Les caveoles estan enriquides amb esfingolípids i colesterol. Les caveolines són les proteïnes estructurals essencials de les caveoles. En cèl·lules de mamífer existeixen tres tipus de caveolines: CAV-1 i CAV-2 (que es troben en la majoria de teixits excepte múscul), i CAV-3 (que és específica del múscul). Totes elles s'insereixen en la membrana deixant els seus extrems N i C-terminal a la cara citosòlica de la cèl·lula. La CAV-1 és, sense dubte, la més estudiada fins ara. De 140-150 molècules de CAV-1 estan presents a cada caveola (Parton and del Pozo, 2013). Les caveolines interaccionen directament amb el colesterol i, en el seu defecte, les caveoles no es formen. Els últims anys s'ha descobert la família de les cavines i com aquestes, juntament amb la caveolina-1, són crucials per a la formació de caveoles.

Les caveoles s'han vist implicades en processos d'endocitosis de diversos lligands com algunes integrines, glicolípids, toxines i alguns virus com el SV40

(Sigismund et al., 2012). S'han descrit dos pools de caveoles en la membrana plasmàtica, un d'estàtic i un altre de dinàmic que afavoreix els processos ràpids de formació de vesícules (Pelkmans et al., 2004; Pellinen and Ivaska, 2006; Thomsen et al., 2002). De manera similar a l'endocitosi depenent de clatrina, l'endocitosi a través de caveoles també necessita la dinamina per al correcte funcionament. A més, la caveolina s'ha vist implicada en l'emmagatzematge d'àcids grassos en els cossos lipídics i en el seu transport intracel·lular (Pol et al., 2001).



**Figura 3. Imatge de microscòpia electrònica de caveoles en fibroblasts.** Adaptat de (Parton and del Pozo, 2013) (Barra = 100 nm).

### 1.2.2- Depenent d'Arf6

Arf6 forma part de la gran família de GTPases petites. Normalment es troba a la cara interna de la membrana plasmàtica així com en endosomes i a Golgi. Arf6 és important per a l'activació de PIP5K (fosfatidilinositol-4-fosfat 5-quinasa) de tipus I, enzim encarregat de generar els PIP<sub>2</sub>, i per a l'activació de la Fosfolipasa D-2 (PLD2), que en formar àcid fosfatídic afavoreix l'activació de la PIP5K. Degut a la regulació dels nivells de PIP<sub>2</sub>, Arf6 modula tant la via CDE com la via CIE. A través d'aquesta última, hi entren algunes proteïnes importants com l'MHC-I, la integrina-β1 o la proteïna CD59. Però no només es veu involucrada en l'endocitosi d'aquestes proteïnes sinó que també intervé en el seu reciclatge (Brown et al., 2001; Naslavsky et al., 2004). Les vesícules que s'internalitzen per aquesta via, són transportades a vesícules Arf6 positives enlloc dels endosomes primerencs (EE), com està descrit clàssicament. A partir d'aquí, aquestes vesícules es podran reciclar cap a la membrana plasmàtica o ser direccionades cap als endosomes primerencs Rab5 positius (Brown et al., 2001; Naslavsky et al., 2004).

El reciclatge d'aquestes vesícules també depèn de l'activació de la PLD2, la qual es troba en els endosomes de reciclatge (Jovanovic et al., 2006). Aquest tipus de reciclatge depenent d'Arf6, està involucrat en els processos de migració cel·lular (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006).

Arf6 es pot localitzar en les anomenades zones ordenades de membrana o *lipid rafts*. Aquestes zones són riques en colesterol i lípids saturats. Per això es creu que aquest procés d'internalització regulat per Arf6 és majoritàriament regulat pels *lipid raft* (Naslavsky et al., 2004). Arf6 també regula diferents processos a part de

l'endocitosi independent de clatrina, com ara l'exocitosi, la formació d'ondulacions de membrana (*ruffles*) o la macropinocitosi (Gong et al., 2008).

### 1.2.3- Endocitosi de les proteïnes GPI (CLIC/GEEC)

En un principi es pensava que les proteïnes GPI (proteïnes ancorades a la membrana per Glicosilfosfatidilinositol) eren internalitzades a través de les caveoles, però es va descartar la hipòtesi en descriure's que en les estructures de caveolina, aquestes proteïnes no hi eren presents (Fujimoto, 1996). Sabharanjak *et al.* descriuen per primer cop la via de les proteïnes GPI estudiant l'endocitosi en cèl·lules CHO. Van trobar com les proteïnes GPI eren internalitzades per estructures tubulars que no col·localitzaven amb transferrina. D'aquí que se les anomenés *clathrin-independent carriers* (CLICs) (Sabharanjak et al., 2002). Hi ha d'altres proteïnes que també s'internalitzen per aquesta via, com ara la toxina colèrica B (Kirkham et al., 2005).

Aquesta via no depèn de dinamina però la família de les Rho GTPases hi estan íntimament relacionades ja que la inhibició de Cdc42 inhibeix l'entrada per fase fluïda i indueix que les proteïnes GPI hagin d'entrar per la via dependent de clatrina (Sabharanjak et al., 2002). A més a més, el colesterol també té un paper important en aquesta via ja que la seva depleció provoca la inhibició de l'endocitosi mitjançant CLIC/GEEC (Gong et al., 2008).

Recentment s'ha demostrat que, en fibroblasts, aquesta via d'entrada és la majoritària per l'endocitosi de fase fluïda i de membrana. Fins i tot és tres cops més activa que no pas la CDE (Howes et al., 2010). La majoria de proteïnes GPI s'internalitzen mitjançant les CLICs, que es fusionen entre elles de manera independent de Rab5. Aquest nou compartiment és anomenat GEEC (*GPI Enriched Endosomal Compartment*). A partir d'aquest punt, el destí de les proteïnes internalitzades pot ser molt divers segons la línia cel·lular.

### 1.2.4- Ondulacions de membrana (*Circular dorsal ruffles, CDRs*)

Durant molts anys es va suggerir que la principal via d'entrada de les proteïnes transmembrana era la CDE. Amb el temps, diversos estudis han demostrat que aquests receptors de membrana, quan són activats per altes concentracions dels seus lligands (com l'EGF, *Epidermal Growth Factor*, l'HGF, *Hepatocyte Growth Factor* o el PDGF, *Platelet Derived Growth Factor*), indueixen la formació de CDRs i poden internalitzar a través d'aquests. Els CDRs són estructures altament dinàmiques que es troben en la membrana dorsal de moltes cèl·lules després de ser estimulades amb factors de creixement. Val a dir que, tot i que la seva formació incrementa amb la presència de factors de creixement, dependrà de la concentració d'aquests i de la línia cel·lular estimulada. Els CDRs també es troben al front d'avanç (*leading edge*) de cèl·lules

migratòries (Gong et al., 2008). Aquesta via està íntimament lligada al citoesquelet d'actina i és dependent de dinamina i Rab5.

### **1.3- MACROPINOCITOSI**

L'entrada de material a partir de la macropinocitosi comporta la formació de grans vesícules. Aquestes són bastant heterogènies essent les seves mides des de 0.2 µm a 5 µm. Per tal que la macropinocitosi tingui lloc, necessita l'activitat de la PI3K (fosfatidilinositol-3-quinasa) i de la remodelació d'actina, que es tradueix en la formació d'ondulacions de membrana (Bohdanowicz and Grinstein, 2013). S'ha descrit que la sobreexpressió de proteïnes com ara Ras, Src o Rac1, poden provocar la formació massiva de macropinocitosi, cosa que certs patògens com la *Salmonella* aprofiten per introduir-se en la cèl·lula hoste (Swanson, 1989). Quan els RTKs recluten Grb2/Sos1, aquest pot activar Ras i aquest pot acabar activant Rac1 i Cdc42 a través de la PI3K de classe I. És ben conegut que el Rac1 actiu pot reclutar actina a la membrana plasmàtica i que, a més, pot promoure la formació d'ondulacions de membrana (Ridley and Hall, 1992). Mitjançant tècniques de microscopia s'ha vist un increment dels lípids PIP<sub>2</sub> i PIP<sub>3</sub> en aquestes ondulacions degut a l'activació de la PI3K (Swanson, 2008).

### **1.4- TIPUS DE COMPARTIMENTS DE LA VIA ENDOCÍTICA**

L'endocitosi d'alguns receptors es veu estimulada quan aquests s'activen en la membrana plasmàtica mitjançant la unió al seu lligand corresponent, com per exemple l'EGFR en unir l'EGF. Aquests receptors i/o lligands poden transitar per diferents compartiments endocítics. Al llarg de la via endocítica les vesícules que en formen part van canviant les característiques moleculars de les seves membranes, així doncs, es poden distingir diferents compartiments endocítics. Aquests es resumeixen a continuació:

#### **1.4.1- Endosomes primerencs (EE)**

En general, les vesícules endocitades es fusionen amb els EE. En aquest compartiment, les molècules que hi arriben són classificades i destinades a diferents compartiments per transport vesicular majoritàriament. El pH intraluminal dels EE és àcid (6.0-6.5) gràcies a les bombes de protons, cosa que permet modular la interacció dels lligands amb els seus receptors i, per tant, la destinació final dels mateixos. En certs casos els receptors i/o lligands poden ser destinats cap als lisosomes, a través dels endosomes tardans (LE), per a la seva hidròlisi o degradació. En altres casos, seran reciclats cap a la membrana plasmàtica (Fig. 5).

Aquests endosomes primerencs es caracteritzen principalment per presentar les proteïnes Rab5 i EEA-1 (*Early Endosome Antigen-1*) en la seva membrana. Tot i això, la població d'endosomes primerencs és bastant heterogènia, ja que es poden trobar endosomes positius per Rab5 que contenen proteïnes APPL (efectores de Rab5) enlloc d'EEA-1 (Zoncu et al., 2009). De fet, els endosomes positius per APPL són una subpoblació d'endosomes primerencs, precursors dels positius per EEA-1 (Miaczynska et al., 2004). Rab5 confereix a la membrana dels endosomes primerencs una identitat pròpia ja que en el transcurs de l'evolució dels endosomes primerencs es recluta la PI3K de tipus III (o Vps34) gràcies al Rab5 actiu, la qual augmenta els nivells de PI3P (fosfatidilinositol-3-fosfat) en la seva membrana. Aquesta acumulació de PI3P promou el reclutament d'EEA-1 i la dissociació d'APPL. Així doncs, APPL competeix amb EEA-1 per unir-se a Rab5 durant la maduració dels endosomes primerencs. Curiosament, proteïnes com l'EEA-1 o Rabenosina (un efector de Rab5), tenen la capacitat d'unir el fosfolípid PI3P mitjançant el seu domini 2xFYVE.

Rab5, a través de la formació dels PI3P i la interacció amb altres proteïnes, s'encarrega de la formació de vesícules endocítiques així com de la fusió heterotípica de vesícules i homotípica dels endosomes. S'ha observat que la seva sobreexpressió provoca la formació d'EE gegants (Stenmark, 2009). Però Rab5 no és l'única proteïna Rab que es troba en la membrana dels EE, també hi són presents Rab4 i Rab11, que estan relacionades amb el reciclatge tal com es detalla en l'apartat 1.4.2 d'aquesta secció (Sonnichsen et al., 2000).

La síntesi dels PI3P pot donar-se a partir de la fosforilació del PI per les tres classes de PI3K, o bé per la defosforilació del  $PIP_2$  per acció de la Inpp4. El PI3P és important en el tràfic de membranes a l'interior de la cèl·lula, en la maduració dels fagosomes, en els estadis inicials de l'autofàgia i en la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS) en plantes, així com en la mobilitat dels endosomes (Devereaux et al., 2013; Lawe et al., 2000; Park et al., 2003). El PI3P pot ser fosforilat en la posició 5 convertint-se així en el lípid majoritari dels endosomes tardans, el PI(3,5)P.

La fosfatidilserina (PS) és l'altre lípid majoritari en aquest compartiment. Aquest lípid representa entre un 2-10% del total de fosfolípids presents a la cèl·lula. En cèl·lules eucariotes es sintetitza a partir d'una reacció dependent de calci entre els lípids fosfatidiletanilamina (PtdEtn) o la fosfatidilcolina (PtdCho) i la L-serina. Aquesta reacció la duen a terme les PtdSer-sintases (PSS1 o PSS2 respectivament). La PS es troba al reticle endoplasmàtic, on es sintetitza, però majoritàriament es localitza en la membrana plasmàtica i als compartiments de la via endocítica (Leventis and Grinstein, 2010). En condicions normals, la PS es troba a la cara citosòlica de les membranes cel·lulars, però en determinades circumstàncies com ara l'apoptosi, pot ser exposada a la cara externa de la membrana plasmàtica. A més, pot interaccionar amb diverses proteïnes com ara la PKC gràcies al seu domini C2. Mitjançant l'ús de liposomes rics en



PS, s'ha descrit la interacció electrostàtica de KRas (Hancock et al., 1990) i altres Rho GTPases amb la PS. Però la PS també té funcions independents de la seva interacció amb proteïnes com per exemple en la fusió de membranes (Oku et al., 1986).

Com es comentarà més endavant, els endosomes primerencs són també una plataforma de senyalització intracel·lular.

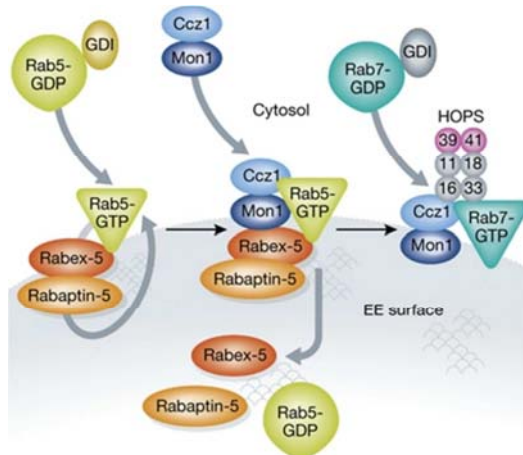
#### **1.4.2- Endosomes de reciclatge**

La via de reciclatge és essencial per regular els nivells de receptors en la membrana plasmàtica. Hi ha dues vies de reciclatge dels receptors que es troben als endosomes primerencs: o bé segueixen la via ràpida de reciclatge, que és dependent de Rab4, o bé ho fan a través de la via lenta dependent de Rab11 (Stenmark, 2009). Tal com s'ha comentat anteriorment, Rab4, Rab11 i Rab5 es localitzen als EE, en dominis diferents de la membrana d'aquests orgànuls (Sonnichsen et al., 2000). El reciclatge ràpid a través de vesícules positives per Rab4, es dona directament des dels EE cap a la membrana plasmàtica mentre que la via lenta es dona des de l'ERC (compartiment endosomal de reciclatge) cap a la membrana plasmàtica a través de vesícules positives per Rab11, que es localitzen preferentment en l'ERC i també a la cara *trans* del Golgi (TGN) (Fig. 5) (Maxfield and McGraw, 2004). A part del reciclatge cap a la membrana plasmàtica, aquest tipus d'endosomes també tenen una funció en el transport retrògrad cap al Golgi.

Un exemple del procés de reciclatge, mitjançant el compartiment ERC, és el del receptor de la transferrina (TfR). En una situació d'equilibri, aquest receptor recicla cap a la membrana plasmàtica a través d'endosomes positius per Rab11, però en cas d'una major necessitat d'aquest receptor en la membrana plasmàtica, el seu reciclatge es dona a través de la via ràpida gràcies als endosomes positius per Rab4 (Sonnichsen et al., 2000).

#### **1.4.3- Endosomes tardans (LE)**

El material que arriba en aquest compartiment provinent dels endosomes primerencs, ja sigui per transport vesicular o com a resultat de la maduració dels EE a LE, acabarà sent conduït cap als lisosomes per a la degradació mitjançant les hidrolases (Fig. 5). En la maduració dels endosomes primerencs cap a tardans es veuen involucrades les proteïnes Rab7 i Rab5 entre d'altres. Inicialment, Rabex-5 (GEF de Rab5) és reclutat a la membrana dels EE on forma un complexe amb Rabaptina-5, que promou l'activació Rab5. La conversió de Rab5 a Rab7 es dona gràcies a la unió del complexe Mon1/SAND-1-Ccz1 als PI3P, Rab5 i Rabex-5, causant la dissociació d'aquestes últimes proteïnes i la unió de Rab7. En aquest punt és on el complexe HOPS (GEF de Rab7) pot unir-se al complexe Mon1/SAND-1-Ccz1 activant així Rab7 (Fig. 4) (Huotari and Helenius, 2011).



**Figura 4. Model esquemàtic de la *Rab conversion* entre EE i LE (Huotari and Helenius, 2011).**

Mentre que els endosomes primerencs presenten una estructura tubulovesicular, els tardans es caracteritzen per tenir una morfologia vacuolar. Poden formar cossos multivesiculars (MVBs) gràcies a la invaginació de la seva membrana. La formació d'aquests MVBs es dona gràcies als complexos ESCRT (*Endosomal Sorting complex Required for Transport*) i hi participen senyals d'ubiquitinització que contenen els receptors destinats a la degradació (Piper et al., 2014). Els receptors, com els RTKs, que queden atrapats en els MVBs dels endosomes tardans no es poden reciclar i, per tant, són destinats a la degradació mitjançant els lisosomes.

La composició lipídica de la membrana dels endosomes tardans és lleugerament diferent a la dels primerencs. El lípid principal en aquest cas és el PI(3,5)P<sub>2</sub>, el qual es sintetitza a partir del PI3P per fosforilació en la posició 5 per la PIK-FYVE. La seva defosforilació depèn de miotubularina. Aquest lípid es troba principalment a la cara citosòlica de la membrana dels endosomes tardans. El seu paper no és tan clar com el dels PI3P als endosomes primerencs, però s'ha observat la seva implicació en la formació dels cossos multivesiculars abans esmentats, en l'osmòsi, en l'autofàgia o en l'activitat dels canals iònics (Huotari and Helenius, 2011). S'ha demostrat la seva implicació en el *sorting* de membranes cap a Golgi i cap a MVBs.

L'altre lípid majoritari en aquest compartiment és l'LBPA, aquest es troba enriquit sobretot en els MVBs, així com en la membrana dels lisosomes. A diferència de la majoria de fosfolípids, aquest lípid sembla ser que no es sintetitza al reticle endoplasmàtic o al Golgi, sinó que ho fa *in situ* a la membrana dels MVBs (Bohdanowicz and Grinstein, 2013).

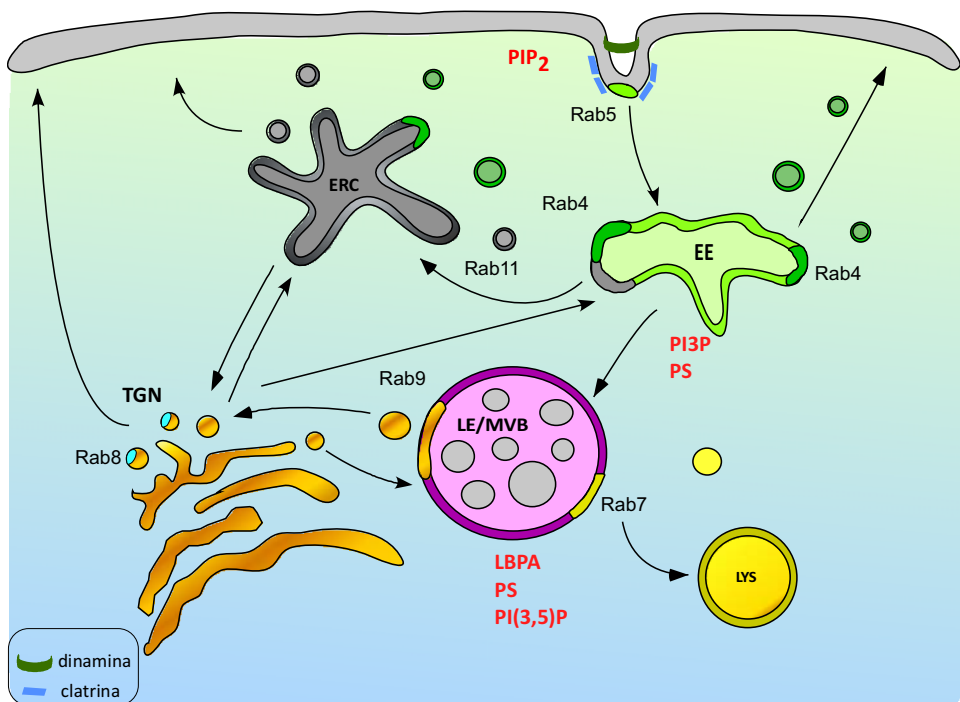
El pH dels endosomes tardans és una mica més àcid (pH = 5.5-6.0) que el dels primerencs, cosa que pot afavorir l'acció de certes hidrolases (Maxfield and McGraw, 2004). Aquesta major acidesa es dona gràcies a la cooperació de dues bombes de

protons l'H<sup>+</sup>-ATPasa i la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa, les qual poden inhibir-se amb la Bafilomicina A1 com es mostra a l'apartat de resultats.

### 1.4.4- Lisosomes

Una de les principals funcions dels lisosomes és la digestió del material que s'ha endocitat. La formació dels lisosomes representa una intersecció entre la via endocítica i l'exocítica. El material endocitat des de l'exterior de la cèl·lula passa pels EE i els LE, tal i com s'ha comentat anteriorment. Aquests últims poden madurar fins a convertir-se en lisosomes els qual es caracteritzen sobretot, per tenir un pH intraluminal molt baix, aproximadament de 5.0. Aquest pH afavoreix l'acció de les hidrolases les quals permetran la digestió del material a l'interior de la vesícula.

Aquestes hidrolases àcides provenen de vesícules que es formen a la cara *trans* del Golgi. Mitjançant el receptor mannosà-6-fosfat, les hidrolases àcides es recluten en vesícules les quals es podran fusionar amb els endosomes i un cop madurin a lisosomes, el pH àcid d'aquests activarà les hidrolases permetent la degradació del seu contingut. (Fig. 5) (GM).



**Figura 5.** Esquema representatiu de la diferents microdominis dels principals Rabs. (adaptat de (Stenmark, 2009).

## 1.5- ENDOCITOSI I SENYALITZACIÓ

En molts casos s'assumeix que els principals processos de senyalització es donen en la membrana plasmàtica, però cada vegada més es pensa en els endosomes com a plataformes de senyalització i no només com una via d'atenuació de la senyal de molts receptors com els RTKs. L'endocitosi permet a les cèl·lules controlar on i quan es pot donar la senyalització. Els receptors de membrana són els primers sensors de les senyals provinents del medi extracel·lular, per tant qualsevol variació en els seus nivells en la membrana plasmàtica portarà conseqüències en la senyalització intracel·lular.

En sistemes on els receptors activats són internalitzats ràpidament, l'habilitat del receptor per senyalitzar després de ser endocitat és molt importat per assegurar una intensitat de senyalització adequada. Aquesta capacitat de senyalització requereix que aquests receptors puguin mantenir-se actius al llarg de la via endocítica com ara l'EGFR, que es manté fosforilat en tot el seu tràfic a través dels compartiments endocítics. La detecció als endosomes de tots els components de la cascada de senyalització de la via de les MAPK (*ERK*)-*mitogen activated protein kinase*), que inclou Grb2, Shc, Sos1 (*Son of sevenless*), proteïnes Ras, Raf, MEK1 i MEK2 (*MAPK/ERK kinase-1 i 2, respectivament*), posa en evidència que la senyalització de l'EGFR continua en aquests orgànuls (Sorkin and von Zastrow, 2009). Depenent de la població d'endosomes, aquests poden senyalitzar de manera diversa. La senyalització d'AKT per exemple, s'ha demostrat que és específica dels endosomes primerencs positius per la proteïna APPL i no pas pels positius per EEA-1 (Zoncu et al., 2009). El mecanisme pel qual succeeix aquesta activació no és del tot clar, però es creu que un augment en la presència de la proteïna APPL als endosomes, podria provocar un retard en el tràfic del receptor RTK i per tant, un augment en l'activació d'ERK.

Moltes proteïnes, com ara les proteïnes Ras, utilitzen els endosomes per a propagar i regular la seva senyal, tal com es detallarà en l'apartat 2.4.1 d'aquesta secció. Mentre que HRas i NRas poden activar la senyalització d'ERK als endosomes primerencs (Jura et al., 2006), KRas pot continuar senyalitzant, no només des dels endosomes primerencs sinó que ho continua fent als tardans. De fet, al nostre Departament s'ha descrit com la senyalització d'EGFR a través de KRas, pot donar-se en aquests endosomes activant el complexe p14/MP1/MEK1 (Lu et al., 2009).

Hi ha certes proteïnes que senyalitzen de manera específica des de la membrana dels endosomes proporcionant una resposta concreta en aquests orgànuls que no es dona, o es dona en menor proporció, a la membrana plasmàtica. L'habilitat dels endosomes primerencs en reclutar proteïnes que uneixen els PI3P és usada, per exemple, pel receptor TGF- $\beta$  (*Tumor Necrosis Factor-  $\beta$* ). La internalització d'aquest receptor promou el seu reclutament als dominis FYVE de les proteïnes SARA (*SMAD*

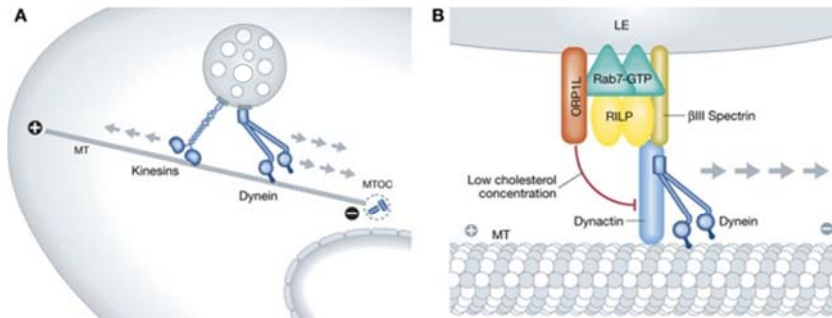
*anchor for receptor activation*). Al seu torn, SARA s'associa a la proteïna SMAD2 i aquest complexe promou la fosforilació d'SMAD2 pel receptor TGF- $\beta$  en els endosomes. Aleshores SMAD2 es dissocia del complexe format i interacciona amb SMAD4 amb la qual es translocarà al nucli per iniciar la transcripció de certs gens, com el de la furina (Blanchette et al., 2001; Hayes et al., 2002; Tsukazaki et al., 1998).

Joffre *et al.* descriuen com la senyalització dels receptors RTKs des dels endosomes, pot regular la tumorigènesi. Suggereixen que els mutants constitutivament actius del receptor c-Met són oncogènics, no només perquè es troben activats, sinó perquè poden senyalitzar des dels endosomes. Aquesta senyalització perllongada vindria donada per un augment de l'endocitosi dels mutants juntament amb una menor degradació d'aquest, fet que suggereix un bescanvi d'aquests receptors entre la membrana plasmàtica i els endosomes, on estarien constantment actius. Per tant postulen que aquesta senyalització sostinguda en els endosomes és la responsable de generar la transformació de les cèl·lules (Joffre et al., 2011).

## **1.6- MOVIMENT DELS ENDOSOMES**

Els endosomes són orgànuls mòbils, i la seva mobilitat està lligada a la seva maduració. Durant la seva formació, els endosomes primerencs estan sotmesos a una mobilitat més aviat reduïda però a mida que maduren els seus moviments esdevenen més llargs, la majoria direccionats cap al nucli (Huotari and Helenius, 2011).

La mobilitat dels endosomes depèn de les proteïnes motores dineïnes i kinesines que mouen els endosomes cap a extrems oposats dels microtúbuls (Fig. 6A) (Murray et al., 2000; Soppina et al., 2009). KIF16B és una de les kinesines més ben estudiades, encarregada de direccionar els endosomes primerencs cap a la perifèria cel·lular. S'uneix als EE gràcies al seu domini PX, d'unió a PI3P, quan Rab5 està en la seva forma activa. Pel que fa als LE, KIF3A és l'encarregada del seu moviment, ja que una inhibició d'aquesta provoca una acumulació de LE a la regió perinuclear (Brown et al., 2005). De fet, els endosomes tardans, mitjançant les dineïnes, aporten el seu material cap a la zona perinuclear. Aquesta unió LE-dineïna és dependent de l'activació de Rab7, que en la seva forma activa, uneix el seu efector RILP, ORPL1L i  $\beta$ III-spectina. Aquest complexe és necessari per a la unió de la dineïna i els endosomes tardans (Fig 6B).



**Figura 6. Mobilitat dels endosomes.** (A) Les dineïnes i kinesines són les encarregades de transportar els endosomes cap a extrems oposats dels microtúbuls. (B) Rab7-GTP és necessari per a la unió dels endosomes tardans a les dineïnes a través de RILP (Huotari and Helenius, 2011).

S'ha vist que el citoesquelet d'actina té un paper indirecte en el moviment dels endosomes. Gruenberg *et al.* ja havien demostrat que la disrupció d'actina provoca un bloqueig en el transport dels EE cap als LE (Gruenberg *et al.*, 1989), però recentment s'ha vist com la cortactina, proteïna nucleadora d'actina, és necessària per a la segregació dels endosomes (Ohashi *et al.*, 2011). Així doncs, tant l'actina com la cortactina estan relacionades amb el reciclatge i el transport dels endosomes cap a la regió perinuclear en coordinació amb els microtúbuls. Així ho demostraven Ohashi *et al.* quan en tractar cèl·lules amb latrunculina B (droga despolimeritzadora d'actina), els endosomes podien fer moviments aleatoris i curts, i quan tractaven amb nocodazol (despolimeritzador de microtúbuls) no observaven direccionament en el moviment d'aquests orgànuls (Ohashi *et al.*, 2011). En resum, els microtúbuls estan involucrats en els transport a llarga distància dels endosomes, mentre que l'actina i la cortactina estarien relacionades amb els moviments curts d'aquests orgànuls i coordinarien la interacció entre els endosomes i els microtúbuls.

La proteïna CLIP-170 també és coneguda per la seva unió a l'extrem positiu dels microtúbuls i per la seva implicació en el moviment de vesícules a través d'aquests, com per exemple els melanosomes. En aquestes vesícules, CLIP-170 s'hi uneix de manera indirecta a través d'una proteïna adaptadora i al mateix temps, s'uneix als microtúbuls gràcies a EB1. Aquesta interacció facilita que els melanosomes puguin interaccionar amb les dineïnes i desplaçar-se (Lomakin *et al.*, 2009).

## 1.7- ENDOCITOSI I MOBILITAT CEL·LULAR

Tots els tipus cel·lulars han de reconèixer el medi que els envolta i adaptar-se a aquest. En aquesta adaptació hi participen el citoesquelet i molècules de senyalització que es relocalitzen en la cèl·lula per tal de conferir especificitat de la senyalització en l'espai. El compartiment de reciclatge està íntimament relacionat amb aquesta redistribució de molècules a l'interior de la cèl·lula (Sigismund et al., 2012). S'ha demostrat que els endosomes de reciclatge tenen especial rellevància en processos de migració quimotàctica on la cèl·lula ha de reorientar-se polaritzant els receptors de membrana plasmàtica en direcció cap al punt de destí. Això s'aconsegueix dirigint les molècules necessàries mitjançant els endosomes de reciclatge. S'ha demostrat que, inhibint la via de reciclatge dependent de Rab11, la migració de les cèl·lules es torna aleatòria i aquestes perden la direcció, possiblement per la deslocalització de formació de lamel·lipodis (Prigozhina and Waterman-Storer, 2006).

L'exocitosi també juga un paper important en la migració cel·lular, ja que el tràfic d'integrines cap a la superfície cel·lular té lloc mitjançant vesícules exocítiques, i aquests receptors són fonamentals per a la migració cel·lular. Un dels aspectes clau de l'endocitosi en la migració cel·lular és la formació d'agrupaments d'integrines en la membrana plasmàtica, anomenades adhesions focals. Durant la migració cel·lular hi ha una renovació constant de les proteïnes en les adhesions focals, que formen el front d'avanç (Sigismund et al., 2012). Rab5 està íntimament relacionada amb la migració cel·lular i la capacitat invasiva de les cèl·lules. Mendoza *et al.* descriuen que el cicle de fosforilació i defosforilació a la Tyr-397 de FAK es veu accelerat per Rab5. A més, demostren com en inhibir l'expressió de Rab5 hi ha una menor exocitosi de metall proteases (MMPs), que es tradueix en una menor invasió cel·lular (Mendoza et al., 2013).

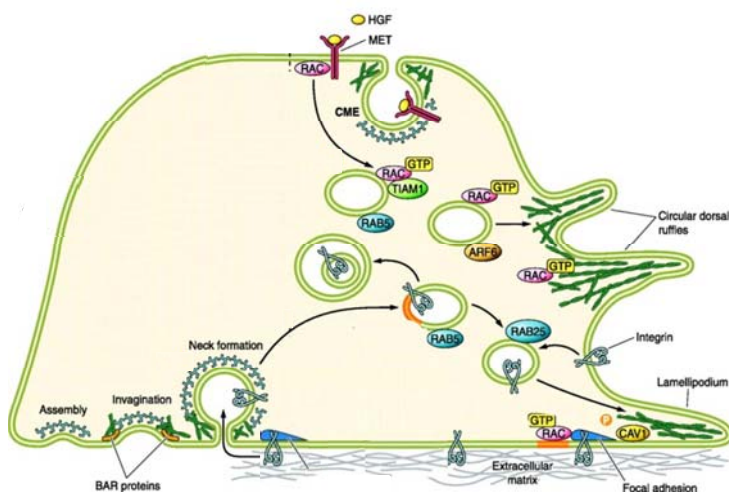
Els receptors RTK són els més ben estudiats pel que fa a la migració cel·lular, i les integrines estan íntimament relacionades amb la senyalització d'aquests receptor ja que, en diverses vies de senyalització, els RTKs només poden activar-se si es donen les adhesions focals. D'altra banda, aquestes adhesions focals mediades per les integrines només es poden donar, en molts casos, de manera dependent de factors de creixement. Un altre mecanisme per iniciar la senyalització cap a l'exterior de la cèl·lula és mobilitant, de manera molt ràpida, el pool d'integrines que es troba en els endosomes perquè aquestes puguin tornar a localitzar-se a la membrana plasmàtica i desenvolupar aquí la seva funció (Sigismund et al., 2012).

Diversos estudis descriuen la relació entre el tràfic del receptor EGFR i les integrines  $\alpha\beta3$  i  $\alpha5\beta1$ . Després de la interacció amb la matriu extracel·lular (*Extracellular matrix*, ECM), l'heterodímer  $\alpha\beta3$  és internalitzat i dirigit als endosomes de reciclatge positius per Rab11 gràcies a la proteïna RCP (*Rab coupling*

*protein*). És en aquests endosomes on es bescanvia l'integrina  $\alpha\beta3$  per l' $\alpha5\beta1$  que s'unirà a l'RCP. Aquest mecanisme resulta útil per a retornar l' $\alpha5\beta1$  a la membrana plasmàtica. Quan aquesta integrina heterodimeritza, desencadena la senyalització de RhoA que es tradueix en una major formació de lamel·lipodis i mobilitat cel·lular. El bescanvi d'integrines de la proteïna RCP no només permet la unió a l'integrina  $\alpha5\beta1$  sinó que a més, permet la unió al receptor d'EGF que es reciclarà conjuntament amb la integrina cap a la membrana plasmàtica (White et al., 2007) (Fig. 22).

El grup del Dr. Giorgio Scita va descriure la importància de l'activació de Rac1 per a la remodelació del citoesquelet d'actina a la membrana plasmàtica, i com aquesta activació de Rac1 té lloc en els endosomes mitjançant l'activitat de Rab5. L'activació de Rab5 promou l'endocitosis de Rac1 i el seu GEF Tiam1 als endosomes primerencs. Un cop activat, el Rac1-GTP es dirigeix a través del compartiment de reciclatge, a llocs específics de la membrana plasmàtica, des d'on s'activa la senyalització. (Palamidessi et al., 2008). La migració de tipus mesenquimal es dona gràcies a la presència de lamel·lipodis rics en Rac1 i l'activació de metall proteasses (Wolf and Friedl, 2006).

L'atenuació de receptors és també essencial per a la correcta migració cel·lular. Les cèl·lules migratòries es desplacen gràcies a gradients de factors quimiotàctics. Un exemple és la quimiotaxis EGFR-dependenta que es dona en cèl·lules de carcinoma de mama, tal com descriuen Bailly *et al.* En aquest estudi demostren com la internalització del EGFR i la seva degradació fan que la cèl·lula cada cop sigui més insensible al gradient de EGF fins que s'atura al lloc de destinació, on la concentració de lligand EGF és molt superior (Bailly et al., 2000). De fet, en les cèl·lules migratòries se sol donar l'endocitosis depenent de clatrina, que va lligada a un reciclatge ràpid, al front d'avanç. En canvi la CIE té lloc a la part posterior de la cèl·lula. Això estaria conferint a la cèl·lula un senyalització restringida espacialment.





**Figura 22. Interconnexió entre endocitosi i remodelació d'actina mitjançant Rac1.** La coordinació entre l'endocitosi, el tràfic de membrana i la migració cel·lular és necessària per a la formació d'estructures com les ondulacions de membrana o els lamel·lipodis. Adaptat de (Sigismund et al., 2012).

## 1.8- ENDOCITOSI I CÀNCER

Les cèl·lules cancerígenes no són molt diferents de les normals. Les diferències sorgeixen quan es desregulen una sèrie de mecanismes en les cèl·lules normals que donen lloc a fenotips diferents (Mellman and Yarden, 2013).

L'atenuació de la senyalització dels receptors de membrana sovint es veu alterada en aquestes cèl·lules, com és el cas dels receptors RTKs (Sorkin and von Zastrow, 2009). La sobreexpressió de certs receptors en molts càncers fa que la seva atenuació sigui inviable. Per exemple, en el cas del receptor d'EGF, quan aquest es troba sobreexpressat en la membrana plasmàtica la seva dimerització augmenta i això promou la unió del seu lligand i, per tant, incrementa la seva senyalització (Chung et al., 2010). En altres situacions, les proteïnes es troben mutades. És el cas del receptor EGFRvIII, un mutant de l'EGFR que, tot i no unir el seu lligand, aquest es troba actiu de manera basal i per tant confereix un fenotip oncogènic (Nagane et al., 1996). A diferència del receptor d'EGF, aquest mutant no pot internalitzar de manera eficient i seguir la via de degradació sinó que, un cop internalitzat, es recicla cap a la membrana plasmàtica (Grandal et al., 2007).

Les cèl·lules cancerígenes agressives tenen un estrès oxidatiu elevat degut al pH acídic del seu entorn el qual augmenta les espècies reactives d'oxigen (ROS) (Riemann et al., 2011). S'ha vist que l'activitat excessiva dels receptors RTK produeix radicals lliures. D'altra banda, s'ha demostrat que el peròxid d'oxigen provoca la fosforilació i activació del receptor d'EGF de manera alternativa a la seva activació per lligand, augmentant així la seva senyalització (Gamou and Shimizu, 1995) i fent-lo insensible a inhibidors del receptor (Filosto et al., 2011). De fet, els receptors activats per ROS no segueixen la via de degradació sinó que es reciclen cap a la membrana plasmàtica, cosa que els permet senyalitzar de manera continuada. A més, en condicions d'hipòxia, el receptor d'EGF perllonga la seva activació ja que la fusió dels EE es veu inhibida i per tant el temps que roman el receptor en la via endocítica es veu incrementat. Aquest fet és causat per la baixa transcripció de Rabaptina-5, un efector de Rab5 que permet la fusió entre EE i, per tant, la seva maduració a LE i lisosomes (Wang et al., 2009).

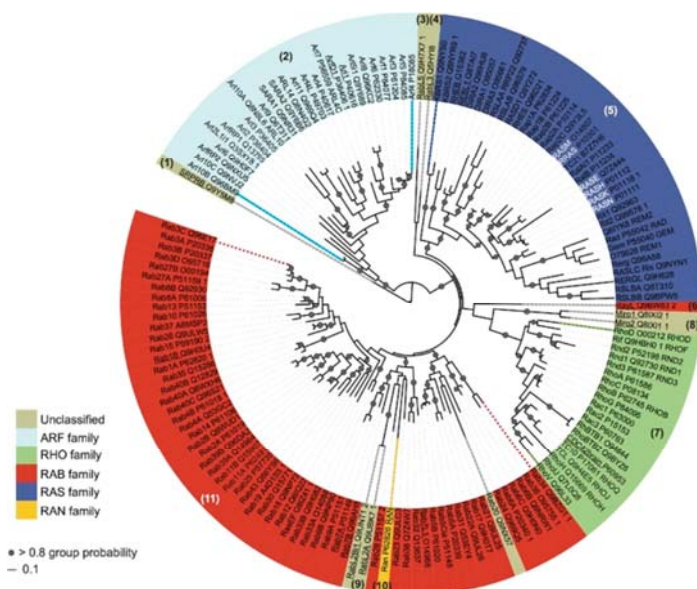
Un altre exemple de l'estreta relació que hi ha entre l'endocitosi i el càncer és el paper que Erb-2 juga en aquest procés. ErbB2 forma part de la família de receptors Erb. Es troba sobreexpressat en diversos càncers essent un marcador de malignitat

capaç de desencadenar una senyalització prolongada de les MAPK en la membrana plasmàtica retenint Raf1 en aquesta (Zhang et al., 2002). A més, Erb-2 és un dimeritzador important del receptor d'EGF i quan ho fa, la via d'internalització i degradació d'aquest es veu impedida, reciclant-lo cap a la membrana plasmàtica en la seva forma activa des d'on pot continuar senyalitzant (Cornelissen et al., 2011).

Diverses condicions microambientals en la cèl·lula poden canviar la senyalització de certs receptors com el d'EGF i, per tant, modificar la senyalització, la supervivència cel·lular i la tumorigènesi.

## 2- SUPER FAMÍLIA DE LES RAS GTPASES

La família de les Ras GTPases comprèn un total de 150 membres fins el dia d'avui. Aquests es coneixen com a *small* GTPases pel seu petit tamany (20 - 40 kDa) i es classifiquen en cinc famílies: Ras, Rho, Rab, Arf i Ran (Fig 7).



**Figura 7. Dendrograma de la família de les Ras GTPases.** La llargària de les branques és proporcional a les diferències entre les seqüències que es comparen. Les diferents subfamílies estan indicades amb colors diferent: RAS (blau marí), RHO (verd), Ran (groc), ARF (blau cel) i RAB (vermell) (Rojas et al., 2012).

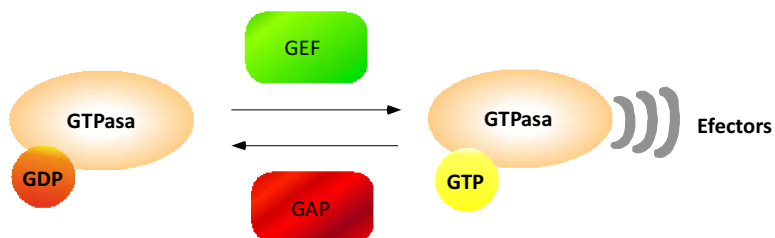
Els membres de la subfamília de **RAS**, estan implicats en nombrosos processos biològics com la proliferació cel·lular, la supervivència i la migració. De fet l'activitat GTPasa de Ras, va ser la primera en ser descoberta i des de llavors aquesta proteïna oncogènica ha servit de model per a definir les *small* GTPases. La subfamília de **RHO** ha estat vinculada en processos de remodelació del citoesquelet i polarització cel·lular. Les proteïnes **RAB** són la subfamília més extensa de la superfamília de RAS. Estan involucrades en processos de tràfic intracel·lular, en la regulació del moviment de vesícules i en la fusió d'aquestes. Les funcions de la subfamília d'**ARF** són més diverses ja que es veuen implicades en la regulació de fosfolípids i també en la remodelació del

citoesquelet així com en la regulació del tràfic intracel·lular. Per últim, les proteïnes de la subfamília **RAN** estan involucrades en el transport nuclear. Aquesta subfamília està composta per només un membre que és present en totes les cèl·lules eucariotes. En plantes, en canvi, se'n troben diverses còpies. (Rojas et al., 2012).

## 2.1- SEMBLANCES ENTRE LES DIFERENTS SUBFAMÍLIES

La super família de les proteïnes RAS presenta una diversitat molt gran. Tot i així, hi ha certes parts en la seva estructura que s'han mantingut al llarg de l'evolució, com per exemple, els dominis G. Aquests permeten la unió amb d'altres proteïnes de manera específica i amb gran afinitat (Colicelli, 2004; Wennerberg et al., 2005). De fet, la diversitat d'aquesta superfamília rau en el fet que cada subfamília té diferents efectors i reguladors. Tot i així, algunes de les GTPases comparteixen efectors, encara que les seves funcions acaben essent diferents, per tant hi ha un altre nivell de regulació per a la seva especificitat (Kiel et al., 2007; Barnekow et al., 2009).

Una de les semblances entre els membres d'aquesta superfamília és el mecanisme d'activació i desactivació. Aquest comporta un canvi de conformació de la proteïna que ve donat per la unió d'un nucleòtid (GTP o GDP) en les regions anomenades switch I i switch II. L'activitat GTPasa intrínseca d'aquestes proteïnes és més aviat baixa. Qui realment controla el seu estat d'activació són les proteïnes GEF (*guanin-nucleotid-exchange factor*), que promouen la unió del GTP activant les proteïnes, i les GAP (*GTPase activating factor*), que hidrolitzen el GTP accelerant l'activitat GTPasa intrínseca de les proteïnes Ras (Fig. 8). Tant les GEFs com les GAPs estan regulades per les GDIs (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*). Aquestes actuen inhibint el bescanvi de GDP a GTP unint-se específicament a les GDP-GTPases. S'han descrit diverses GDIs per a les famílies de RHO i RAB però no per a altres subfamílies.

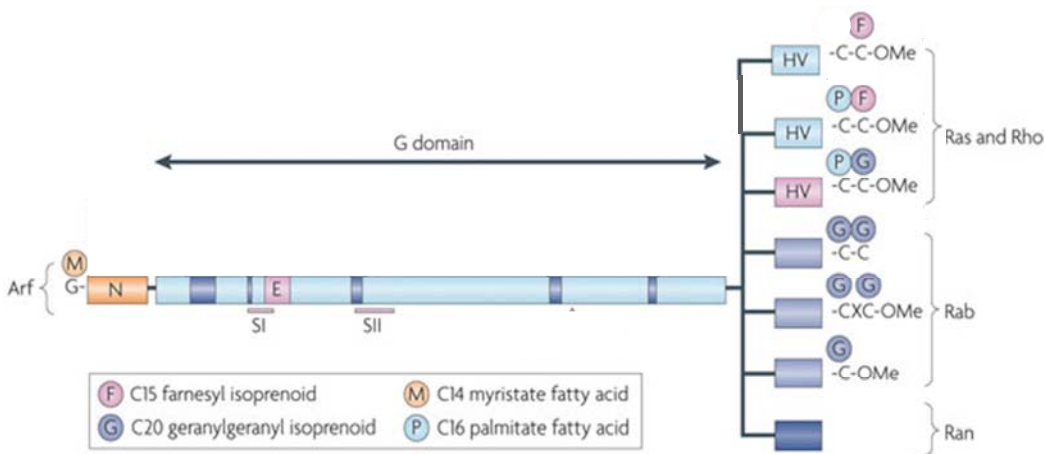


**Figura 8. Model de l'activació de les GTPases.** Un cop les proteïnes GEF han realitzat el bescanvi de GDP per GTP, la GTPasa pot desencadenar un seguit de senyalitzacions.

A més, molts membres d'aquesta superfamília pateixen una sèrie de modificacions lipídiques post-traduccionals les qual ajuden a les proteïnes a interaccionar amb les membranes. Aquestes modificacions, en el cas de les famílies RAS, RHO i RAB, tenen lloc a l'extrem C-terminal, a la cisteïna de la seqüència CAAX (C=Cys, A= aminoàcid alifàtic i X= qualsevol aminoàcid). En canvi, les subfamílies ARF i RAN poden miristoïlar-se a la part N-terminal (Fig.9).

Les proteïnes Ras es sintetitzen al citosol com a proteïnes hidrofíliques, però pateixen una sèrie de modificacions lipídiques que les conduiran a les diferents membranes cel·lulars (Fig. 9). Les proteïnes Ras contenen una seqüència CAAX a la part C-terminal de la seva estructura, per això formen part del que es coneix com a proteïnes CAAX. Aquest domini és clau per a dur a terme les modificacions post traduccionals i ancorar finalment les proteïnes a la diferents membranes cel·lulars.

La seqüència CAAX per si sola serveix com a substrat per a les preniltransferases, per tant, la primera modificació que pateix aquesta regió és la prenilació a la cisteïna de la seqüència CAAX (Seabra et al., 1991). Les proteïnes que contenen aquesta modificació solen localitzar-se al reticle endoplasmàtic, facilitant així l'acció de l'enzim Rce1 (*Ras and a-factor converting enzyme 1*), que elimina els aminoàcids AAX deixant només la cisteïna prenilada. Encara al reticle, l'enzim Icmt (*isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase*) metila el grup  $\alpha$ -carboxil del grup farnesilcisteïna (veure figura 11 , apartat 2.2).



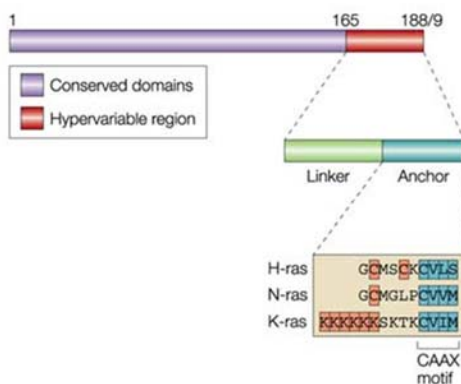
**Figura 9. Esquema general de l'estructura de les small GTPases.** Adaptat de (Vigil et al., 2010)

## 2.2- LES PROTEÏNES RAS (HRAS, NRAS I KRAS)

Els gens *ras* van ser els primers oncogens en relacionar-se amb els càncers humans. Els genomes de les cèl·lules humanes codifiquen per tres gens *ras*: *H-ras*, *N-ras* i *K-ras*. En el cas del gen *K-ras*, pot fer un *splicing* alternatiu que dona lloc a dues isoformes diferents: KRas4A i KRas4B que difereixen especialment en la part anomenada hipervariable de l'extrem C-terminal i en l'expressió a diferents teixits, essent més elevada la quantitat de KRas4B (en aquesta tesi referida com a **KRas**). Tot i que majoritàriament les isoformes de Ras es troben en la membrana plasmàtica, cadascuna d'elles pot localitzar-se en dominis específics d'aquesta i també en diverses endomembranes. La seva localització determina les diferències biològiques entre elles (Henis et al., 2009).

### 2.2.1- Diferències en les modificacions post-traduccionals de les tres isoformes de Ras

La incorporació del grup prenil a l'extrem C-terminal de les proteïnes Ras, no és suficient per a la seva localització a les membranes, sinó que es necessita una segona senyal per a poder-ho fer. En les isoformes de Ras es poden diferenciar dues regions en la seva estructura, un domini globular conservat a la part N-terminal, amb una homologia del 90%, i una regió a la part C-terminal, que presenta un 15% d'homologia entre elles, que reb el nom de regió hipervariable (HVR) (Fig. 10). Aquesta regió és la que caracteritza cadascuna de les isoformes. És aquí on es troba la seqüència CAAX abans comentada, i on es troba la segona senyal necessària per al direccionalment de les proteïnes Ras.



**Figura 10. Comparació de les seqüències de les proteïnes HRas, NRas i KRas.** La regió hipervariable de les proteïnes Ras presenten diferències en la segona senyal que les conduirà cap a les membranes. (Hancock, 2003).

Aquesta segona senyal és diferent per a cadascuna de les tres isoformes. En el cas d'NRas és una palmitoilació que té lloc a la C181, mentre que en l'HRas són dues palmitoilacions a les cisteïnes 181 i 184. La palmitoilació té lloc al Golgi gràcies a l'acció de l'enzim DHHC9-GPC16 (*DHHC domain-containing-9 Golgi complex-associated protein of 16kDa*), i facilita l'accés de les proteïnes a llocs de membrana rics en colesterol (Henis et al., 2009). La palmitoilació, al contrari que la farnesilació, és reversible. Mentre que la palmitoilació implica una associació més estable a les membranes, el fet de ciclar entre els estats palmitoilat /despalmitoilat permet que les proteïnes no s'acumulin en certs dominis de membrana (Laude and Prior, 2008) (Fig. 11).

KRas però, no es palmitoil·la sinó que conté una regió polibàsica de sis lisines adjacent a la seqüència CAAX (K175-K180) (Fig.11) (Hancock, 2003). Aquesta regió polibàsica confereix a KRas una regió carregada positivament capaç d'interaccionar amb fosfolípids negatius de les membranes cel·lulars. S'ha demostrat que ni el grup farnesil ni la cua polibàsica per si soles són suficients per poder translocar KRas a les bicapes lipídiques, sinó que KRas necessita de les dues senyals per a poder-ho fer (Silvius et al., 2006). Les segones senyals de Ras comentades, confereixen una especificitat a l'hora de senyalitzar des de les membranes, ja que segons el lípid que contenen poden trobar-se en uns microdominis o uns altres.

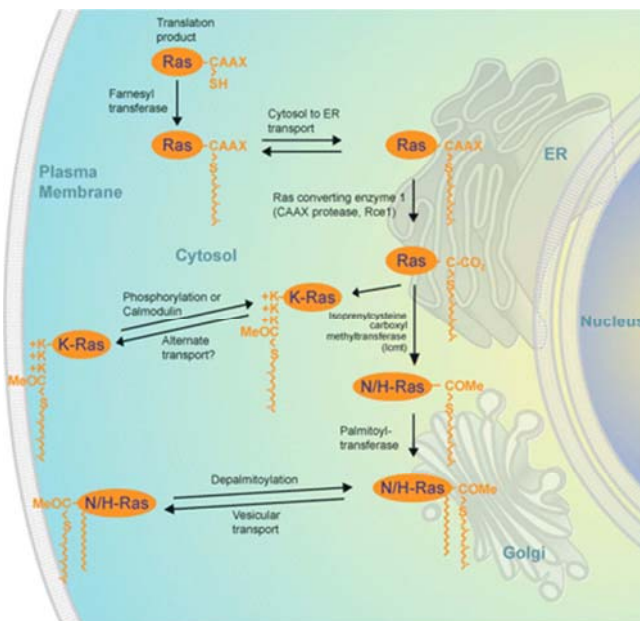


Figura 11. Processament del domini CAAX de les proteïnes Ras. (Wright and Philips, 2006)

### 2.2.2- Segregació espacial de la proteïnes Ras

La membrana plasmàtica és heterogènia, comprèn tota una sèrie de subdominis on hi interaccionen lípids i proteïnes de manera específica. Aquestes interaccions confereixen la formació de diferents dominis, entre els quals es troben els dominis ordenats o *lipid raft*. Les proteïnes Ras es distribueixen i s'agrupen de manera específica en aquests dominis segons les seves modificacions post-traduccionals formant els anomenats *nanoclusters* (Hancock, 2003). Aquesta distribució espacial a la cara interna de la membrana plasmàtica confereix a les proteïnes una gran fidelitat de senyalització (Henis et al., 2009).

L'HRas, que queda retingut a la membrana degut als seus dos grups palmitoïls i el grup farnesil (veure Fig. 11), pateix una segregació lateral segons el seu estat d'activació. L'HRas-GDP es troba majoritàriament en els dominis ordenats rics en colesterol, els *lipid rafts*, mentre que la seva forma activa (HRas-GTP) es localitza en microdominis desordenats lliures de colesterol. En canvi, KRas que només té un grup farnesil i una regió polibàsica, es troba en microdominis desordenats independentment del seu estat d'activació (Fig. 12) (Plowman et al., 2008).

Recentment, s'ha descrit que la forma oncogènica de KRas segrega en dominis de membrana desordenats diferents segons el seu estat de fosforilació en la serina 181 i que, en els dominis on KRas està fosforilat, també hi col·localitza la PI3K i el Raf1 actiu (Barcelo et al., 2013). En el cas d'N-Ras, aquesta es troba preferentment en dominis ordenats quan es troba unit al GTP i en els desordenats quan ho està al GDP.

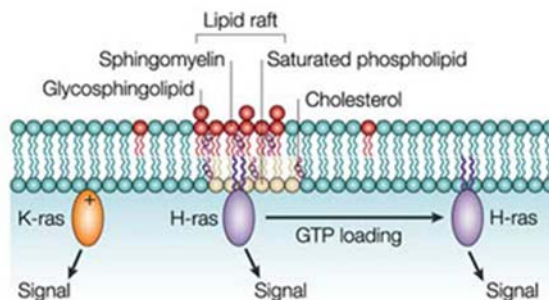


Figura 12. Segregació espacial de KRas i HRas en la membrana plasmàtica. (Hancock, 2003)

## 2.3- KRAS

### 2.3.1- Modificacions post-traduccionals

La regió hipervariable de KRas, tal com s'ha comentat anteriorment, conté una càrrega positiva neta de sis lisines a més del grup farnesil del domini CAAX. S'ha demostrat que certes proteïnes prenilades poden interaccionar de manera directa amb els microtúbuls, i que KRas ho fa de manera específica ja que H-Ras i altres proteïnes



prenilades no uneixen tubulina. De fet, aquesta unió amb la tubulina es dona gràcies a la cua polibàsica de sis lisines que té KRas (Chen et al., 2000).

Però a part de les modificacions irreversibles que tenen lloc a l'extrem C-terminal (veure introducció, apartat 2.2), KRas pot patir una sèrie de modificacions post-traduccionals les quals són reversibles i modulen la seva activitat oncogènica. Aquestes modificacions en la proteïna tenen com a objectiu fer-la més específica en la seva senyalització i la seva funció. La ubiquïtinització de KRas a la Lys-147, per exemple, impedeix l'activitat d'hidròlisi del GTP de la seva GAP i promou l'associació d'alguns efectors (Sasaki et al., 2011). Aquest mecanisme d'activació de KRas sembla ser específic d'aquesta Lys-147, ja que la ubiquïtinització en altres lisines no indueixen cap defecte en la hidròlisi de les GAP (Baker et al., 2013). L'acetilació a la Lys-104 en canvi, promou la inhibició de KRas impeding l'associació de certes GEFs com ara Sos1, per tant s'atenua la proliferació cel·lular (Yang et al., 2012). Aquesta tesi, però, s'ha centrat només en la fosforilació de la Ser-181 de KRas ja que afecta a la regió polibàsica.

#### 2.3.1.1-Fosforilació de la Ser-181

Una part de l'estudi d'aquesta tesi s'ha centrat en la fosforilació en la Ser-181. Ballester *et al.* hipotetitzaven que la Ser-181 podia ser la diana de la fosforilació que patia KRas després de tractar les cèl·lules amb èsters de forbol (Ballester et al., 1987). Anys més tard es va demostrar que efectivament aquesta era la serina fosforilada per la PKC, que està localitzada a la regió PBR de KRas (Alvarez-Moya et al., 2010; Bivona et al., 2006). La fosforilació d'aquest aminoàcid promou que KRas tingui una càrrega neta positiva menor i que, per tant, la seva unió amb la membrana plasmàtica disminueixi, desplaçant-se així a les endomembranes com ara als mitocondris (Bivona et al., 2006). Per altra banda, s'ha demostrat que la fosforilació de la Ser-181 de la forma activa de KRas no influeix de manera important en l'associació a la membrana plasmàtica, però és necessària per la proliferació, la mobilitat i la transformació en cèl·lules dejunades (Alvarez-Moya et al., 2010) així com en cèl·lules inoculades en ratolins (Barcelo et al., 2013). Tal com es comentarà més endavant, la fosforilació de KRas a la Ser-181 pot regular la interacció amb altres proteïnes com PRA1, PDE o CaM.

#### 2.3.2- Dinàmica de KRas

Silvius *et al.*, mitjançant l'herterodimerització de proteïnes recombinants de KRas sensibles a rapamicina (FRB2-CFP-KRas i mitoRFP-FKBP3), demostraven que la dissociació de KRas de la membrana plasmàtica es donava en qüestió de minuts, tot i que es posava en dubte si la permeabilitat de la rapamicina podria estar alterant els resultats obtinguts en la dinàmica (Silvius et al., 2006).

De totes maneres, hi ha controvèrsia en el grau en que la dissociació de KRas de la membrana plasmàtica pugui ser el factor clau en la dinàmica d'aquesta GTPasa. També s'ha descrit que el seu bescanvi entre la membrana plasmàtica i el citosol és molt ràpid, amb un temps de vida mig (*half time*, HT) de 1,5 segons (Yokoe and Meyer, 1996). Però estudis posteriors revelen que tant KRas com la resta d'isoformes són força estables en la membrana plasmàtica i que només difonen lateralment en aquesta, però que no es bescanvien amb el citosol (Niv et al., 1999; Niv et al., 2002). D'altra banda hi ha estudis que demostren com les diferents modificacions post-traduccionals, i interaccions de KRas amb altres proteïnes, provoquen el bescanvi d'aquesta entre la membrana i el citosol (Bhagatji et al., 2010; Vartak and Bastiaens, 2010).

### 2.3.3- Principals proteïnes d'unió a l'extrem C-terminal de KRas

S'ha descrit que la interacció de KRas amb diverses proteïnes com la PDE $\delta$  (Chandra et al., 2012), la CaM (Villalonga et al., 2001), PRA1 (Hutt et al., 2000) o la Galectina-3 (Elad-Sfadia et al., 2004) podrien estar modulant la dinàmica de KRas en la membrana plasmàtica.

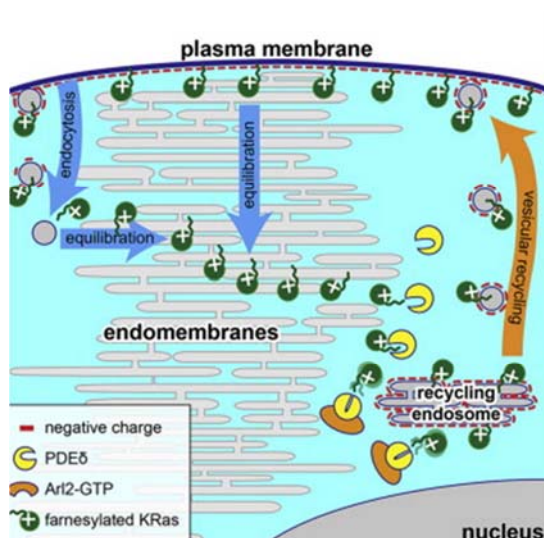
#### 2.3.3.1- Subunitat $\delta$ de la fosfodiesterasa 6 (PDE $\delta$ )

Amb el descobriment de les proteïnes RhoGDI com a xaperones de proteïnes Rho que contenen el grup geranilgeranil, l'interès per trobar una proteïna encarregada de solubilitzar KRas de la membrana plasmàtica va anar creixent. La PDE $\delta$  conté una butxaca hidrofòbica molt similar a la de les proteïnes RhoGDI, que interacciona específicament amb el grup prenil de les proteïnes Rap i Ras. Mentre que moltes subunitats de la PDE6 estan localitzades a la retina, la subunitat  $\delta$  s'expressa de manera ubiqua (Philips, 2012). Chandra *et al.* van identificar la PDE $\delta$  com una GDI-*like solubilizing factor* (GSF) que modula la senyalització de les proteïnes Ras. La PDE $\delta$  pot unir-se al grup farnesil de KRas incrementant d'aquesta manera la seva solubilització cap al citosol des de les endomembranes. Aquesta difusió permet que la cinètica de les proteïnes KRas solubilitzades augmenti i puguin dirigir-se a la membrana plasmàtica més ràpidament ja que la interacció amb aquesta és més forta i desplaçaria la PDE $\delta$  (Chandra et al., 2012).

De totes maneres també s'ha descrit que, mitjançant el grup prenil de KRas, la sobreexpressió de la PDE $\delta$  fa augmentar la dissociació de KRas, tant en la seva forma activa com inactiva, de la membrana plasmàtica, mentre que la inhibició de l'expressió de la PDE $\delta$  la fa disminuir (Bhagatji et al., 2010).

Recentment, els estudis del Dr. Philippe Bastiaens, descriuen que la PDE $\delta$  és al·lostèricament regulada per Arl2/3 i que la forma activa d'Arl2/3, localitzada al compartiment endocític de reciclatge (ERC), ajuda a les proteïnes Ras farnesilades a

dissociar-se de PDE $\delta$  per poder tornar a la membrana plasmàtica a través de transport vesicular des de l'ERC, regulant així el seu tràfic entre membranes (Fig. 13) (Schmick et al., 2014).



**Figura 13.** Esquema del cicle de solubilització de KRas per la PDE $\delta$ . (Schmick et al., 2014)

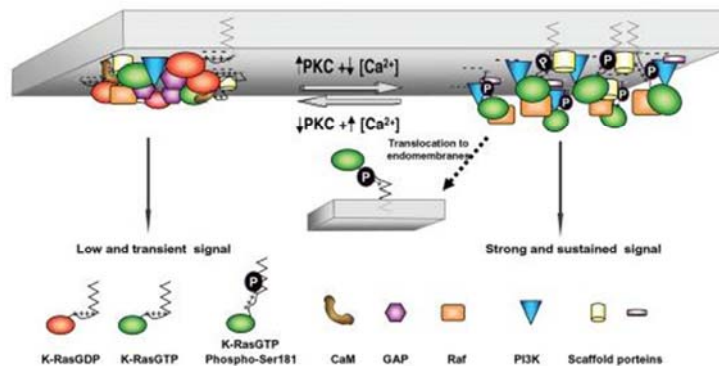
### 2.3.3.2- Calmodulina (CaM)

La CaM és una proteïna d'unió a calci de 148 aminoàcids que actua com a segon missatger en la traducció de diverses senyals intracel·lulars i regula diferents processos cel·lulars. Les seves funcions vénen determinades per la interacció amb proteïnes d'unió a CaM (CaMBP), l'activitat de les quals depèn d'aquesta unió (Agell et al., 1998). Les CaMBPs agrupen un gran nombre de proteïnes com la *CaM-dependent kinase-II* (CaMKII), la calcineurina, l'espectrina, la hnRNP A2 i la p21<sup>cip1</sup>. La majoria de les interaccions de la CaM amb les CaMBPs són dependents de calci. L'extrem C-terminal de la CaM uneix el calci amb gran afinitat ( $K_d 10^{-7}$  M), mentre que l'extrem N-terminal ho fa amb baixa afinitat ( $K_d 10^{-6}$  M). El fet que els nivells de  $K_d$  es trobin entre els nivells de concentració del calci intracel·lulars, fa que sigui un bon sensor de canvis en el calci intracel·lular (Weinstein and Mehler, 1994). El domini d'unió a la CaM de moltes proteïnes consisteix en una seqüència de 20 aminoàcid que té forma d' $\alpha$ -hèlix amfipàtica (James et al., 1995).

El grup de la Dra. Neus Agell (Barcelona) va descriure KRas com una CaMBP i la importància de la CaM en la seva senyalització des de la membrana plasmàtica. Han demostrat com la inhibició de la CaM facilita l'activació de KRas i, donat que la CaM només pot unir-se a la isoforma KRas4B, descriuen la CaM com una proteïna diferencial en la regulació de la senyalització de les proteïnes Ras (Villalonga et al., 2001). Recentment han demostrat que la CaM inhibeix la fosforilació de la Ser-181 de

KRas, la qual és important per a la seva localització i senyalització en la membrana (Alvarez-Moya et al., 2010; Barcelo et al., 2013). Així doncs, quan KRas està en el seu estat actiu (KRas-GTP) pot ser fosforilat per la PKC, sempre i quan la CaM no ho impedeixi. D'altra banda la fosforilació de la Ser-181 impedeix la unió de KRas a la CaM (Fig. 14).

Estudis realitzats per Bhagatji *et al.* mostren com, la dissociació de la forma activa de KRas de la membrana plasmàtica, però en canvi, té molt poc efecte en la cinètica del dominant inactiu de KRas (Bhagatji et al., 2010).



**Figura 14. Model de regulació de KRas en la membrana plasmàtica per PKC i CaM.** En condicions on l'activitat de PKC és baixa i la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  elevada, KRas es troba en microdominis rics en GAPs i, per tant està inactiu. Quan KRas s'activa, pot interaccionar amb la CaM la qual impedeix que PKC pugui fosforilar KRas. En la situació contrària on hi ha una alta activitat de la PKC i baixa concentració de calci, KRas es troba preferentment fosforilat i pot difondre lateralment cap a dominis rics en PI3K o cap a les endomembranes en aquests dominis les GAPs hi són en menor concentració i per tant KRas es mantindria en estat actiu durant més temps (Alvarez-Moya et al., 2011).

### 2.3.3.3- Prenilated Rab acceptor (PRA1)

Estudis duts a terme en llevats van identifica la proteïna PRA1 com a una proteïna d'interacció amb Rab i VAMP-2, gràcies a estudis en llevats. De fet, PRA1 interacciona amb el GDP *dissociation inhibitor* 1 (GDI1) i, tot i que ho fa de manera feble, pot bloquejar l'habilitat de GDI1 d'extreure Rab3A de les membranes influenciant així en la seva senyalització. A més, la unió de PRA1 a VAMP2 pot veure's impedida per Rab3A, indicant que aquestes tres proteïnes no poden estar formant un complex (Hutt et al., 2000). PRA1 es troba tant als endosomes, a Golgi, a les vesícules exocítiques com a la membrana plasmàtica. Figueroa *et al.* demostren que PRA1 no només interacciona amb proteïnes Rab sinó que també ho fa amb membres de la superfamília de Ras. La interacció amb aquestes necessita de certes modificacions

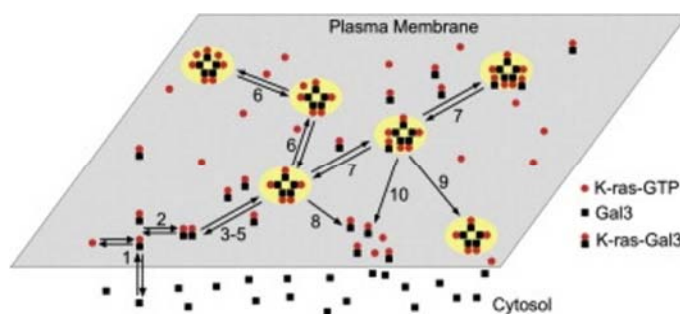
post-traduccionals com la prenilació. Els seus estudis demostren la necessitat d'un grup isoprenoide, ja sigui un grup farnesil o isoprenil per a poder interaccionar-hi i descriuen PRA1 com una proteïna escorta de les GTPases, facilitant el seu tràfic entre les endomembranes (Figueroa et al., 2001). Estudis més recents descriuen que la sobreexpressió de PRA1 augmenta, i la inhibició de la seva expressió disminueix, la cinètica de dissociació de la membrana plasmàtica dels mutants actiu i inactiu de KRas (Bhagatji et al., 2010).

#### 2.3.3.4- Galectina-3 (Gal-3)

Les galectines formen part de la família de les lectines, amb especificitat pels  $\beta$ -galactòsids. Estan involucrades en diversos processos cel·lulars com l'adhesió o la proliferació. S'assumeix l'existència d'una relació directa entre els nivells de galectines i el grau de malignitat en gliomes humans (Camby et al., 2001). La galectina-3 s'associa preferentment a la forma activa de KRas gràcies a la regió HVR i de manera selectiva, ja que la unió amb H-Ras i N-Ras és molt més feble Elad-Sfadia *et al.* descriuen com, la inhibició de la Galectina-3 augmenta l'activació d'ERK i la capacitat de transformació de KRasG12V, però no pas la de Raf1 ni PI3K. Per tant, al contrari del que passa amb la Galectina-1, la unió KRas-GTP/Gal-3 augmenta l'activitat de Raf1 i de PI3K però disminueix l'activitat d'ERK, possiblement generant una segona senyal inhibidòria. Aquests experiments aportaven un nou mecanisme de control sobre la durada i la selectivitat de la senyalització de KRas (Elad-Sfadia et al., 2004).

Tal com s'ha comentat anteriorment, la formació de *nanoclusters* de la membrana plasmàtica de KRas és essencial per a la seva senyalització. En aquestes agrupacions hi és present, entre d'altres proteïnes, la galectina-3. De fet, s'ha desenvolupat un model matemàtic que posa de manifest que la presència de galectina-3 al citosol determina la magnitud dels *nanoclusters* de la membrana plasmàtica del KRas actiu (KRasG12V) (Fig. 15) (Tian et al., 2010).

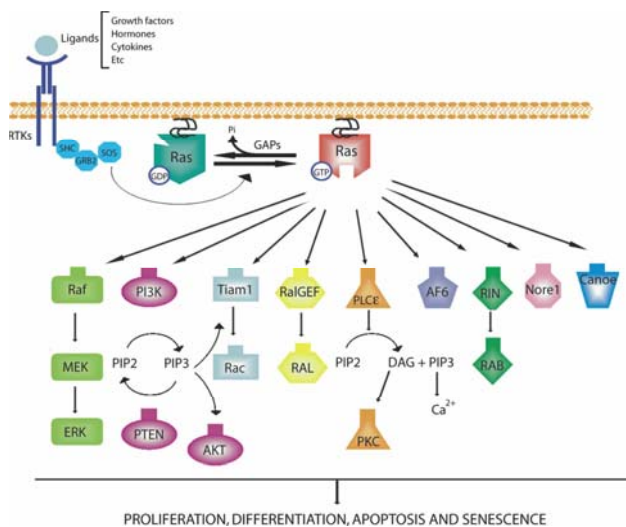
Bhagatji *et al.* van demostrar que la dissociació de la membrana plasmàtica de la forma activa de KRas era més ràpida quan s'inhibien els nivells de galectina-3 (Bhagatji et al., 2010).



**Figura 15. Model de difusió i col·lisió de KRas per a la formació de *nanoclusters* de membrana.** En aquest model es proposa que KRas-GTP difon de manera atzarosa per la membrana plasmàtica. La galectina-3 es troba al citosol a no ser que sigui reclutada pel KRas actiu (1). Aquest reclutament promou la formació de dímers (2) i subseqüentment pentàmers (3-5). La formació de microdominis amb una estequiometria major és possible gràcies a la col·lisió de KRas-GTP o Gal-3 amb els pentàmers (6,7). Els pentàmers poden disgregar-se en monòmers de KRas-GTP i complexes KRas/Gal-3 (8-10) o bé per la pèrdua de molècules de KRas o complexes KRas/Gal-3 (6,7,9) (Tian et al., 2010).

### 2.3.4- Vies de senyalització de KRas

La senyalització de les proteïnes Ras regula diferents processos cel·lulars com la proliferació, la diferenciació o l'apoptosi (Malumbres and Barbacid, 2003). La forma activa de KRas (KRas-GTP) és capaç d'interaccionar amb múltiples efectors activant així diferents vies de senyalització. L'activació de proteïnes per part de KRas pot ser de dues maneres: o bé KRas interacciona directament amb les proteïnes efectores estimulando la capacitat catalítica d'aquestes, o bé actua com una proteïna adaptadora reclutant proteïnes efectores i per exemple, localitzant-les a les membranes on podran interaccionar amb altres proteïnes senyalitzadores o lípids (Omerovic et al., 2007). Avui en dia es coneixen diversos efectors de KRas com: Raf, PI3K, RalGDS, p120GAP, PLCε, PKCζ, Tiam1, Rin1, RASSF, Nore1, AF6 i la MEKK1 (Fig. 16) (Malumbres and Barbacid, 2003). Les vies més ben caracteritzades fins ara són les de Raf i PI3K .



**Figura 16. Efectors de Ras.** Un cop Ras és activat a la membrana plasmàtica pot senyalitzar a través de diferents proteïnes. Moltes d'aquestes vies de senyalització estan implicades en la proliferació cel·lular, diferenciació, apoptosi i senescència (Castellano and Downward, 2010).

### 2.3.4.1- Raf1/MEK/ERK

L'any 1993 es va demostrar per primera vegada que Ras interacciona directament amb Raf1 *in vitro* (Vojtek et al., 1993; Warne et al., 1993). A partir d'aquí Ras es va posar en el punt de mira per tal de comprendre la via de senyalització de Raf1. Aquesta via de senyalització regula diversos processos biològics transmetent senyals des de la membrana fins al nucli, coordinant així nombroses respostes cel·lulars. L'estreta regulació de la via és important ja que la seva estimulació comporta malalties com el càncer ajudant a la progressió i metastasi dels tumors.

Es coneixen tres isoformes de Raf en cèl·lules de mamífer: A-Raf, B-Raf i C-Raf (o **Raf1**). Aquesta última va ser la primera en ser identificada i la més caracteritzada (Leicht et al., 2007). Les estructures de les tres isoformes de Raf contenen regions altament conservades (CR) amb diverses funcions cadascuna d'elles. Cal destacar la CR1, on es troba el domini d'unió a Ras (RBD), que a banda d'interaccionar amb KRas, és crucial per poder interaccionar amb els lípids de membrana. En els CR1 també s'hi troba el domini ric en cisteïnes (CRD), necessari també per unir Ras i per a la correcta autoinhibició de Raf. El cicle d'activació/inhibició de Raf és força complexe, passant per una dimerització que activa completament la proteïna (Fig. 17).

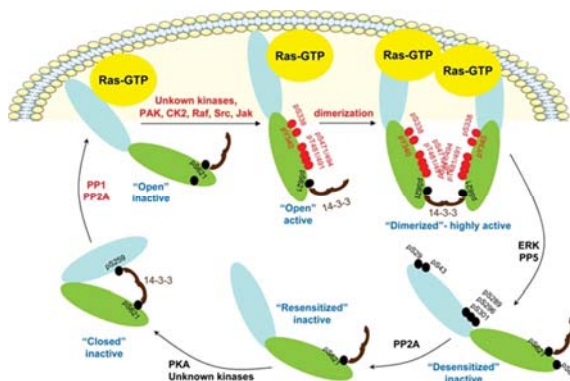


Figura 17. Esquema de l'activació de Raf1 (Leicht et al., 2007).

Un cop Raf està localitzada a la membrana, pot ser fosforilada per diverses quinasas i unir proteïnes *scaffold* com la 14.3.3 i fosforilar MEK que, al seu torn, fosforila ERK1/2. Aquesta, després de la seva dimerització pot entrar al nucli i estimular l'activitat de diferents factors de transcripció (Castellano and Downward, 2010).

Les tres isoformes de Raf poden regular la senyalització d'ERK, tot i que cadascuna d'elles ho fa de manera diversa. Per exemple, en neurones l'EGF és el principal activador de C-Raf, mentre que NGF (*nerve growth factor*) ho és de B-Raf. Les proteïnes *scaffolding* tenen un paper rellevant en la regulació de C-Raf, moltes d'elles com ara KSR (*kinase supressor of Ras*), CNK (*multidomain connector- enhacer of KSR*) o

SUR8 (*leucine-rich-repeat protein supressor of Ras mutations-8*), regulen l'eficiència d'interacció entre C-Raf i MEK (Wellbrock et al., 2004).

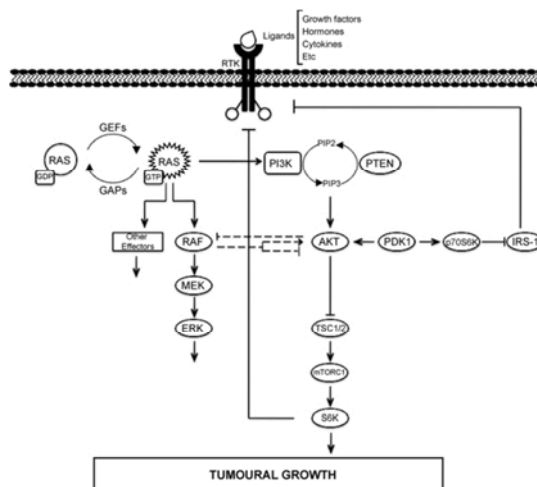
### 2.3.4.2- PI3K/AKT

Aquesta és la segona via de senyalització de Ras més estudiada i juga un paper molt important en la proliferació i la supervivència cel·lular.

Quan la PI3K es troba en estat actiu, pot convertir els PIP<sub>2</sub> en PIP<sub>3</sub>. Aquest últim permet que Akt/PKB pugui reclutar-se a la membrana plasmàtica i ser fosforilada per les quinases PDK1 i PDK2 provocant la seva activació. El gran antagonista d'aquesta via és la fosfatasa PTEN que, mitjançant la seva capacitat catalítica intrínseca, redueix el pool de PIP<sub>3</sub> convertint-lo un altre cop en PIP<sub>2</sub> (Castellano and Downward, 2010). De fet, PTEN és un gen supressor de tumors amb un paper dual com a fosfatasa ja que té activitat fosfatasa tant per proteïnes com per lípids. Les cèl·lules amb un defecte en l'activació de PTEN contenen alts nivells de PIP<sub>3</sub> i els efectors més activats (Nakanishi et al., 2014).

També s'ha descrit que el reclutament de la PI3K als endosomes és dependent d'EGF i de Ras i que això és essencial per a la seva activació en aquest compartiment (Tsutsumi et al., 2009).

Experiments duts a terme en ratolins genèticament modificats que no contenen la subunitat reguladora de la PI3K (p85) i que contenen la mutació activa de KRas (KRasG12V) de manera induïble, mostren com la inhibició de la via de la PI3K atura la tumorigènesi induïda per KRasG12V fins a nivells semblants als dels ratolins amb una PI3K *wild type*. En canvi, en ratolins que tenen la PI3K *wild type* els tumors induïts per KRasG12V no reverteixen a no ser que també se'ls inhibeixi la via de MEK. Aleshores la regressió dels tumors si que era molt elevada. Això suggeriria una interacció entre les vies PI3K i MEK activades per KRas (Fisher et al., 2001; Jackson et al., 2001) (Fig.18).





**Figura 18. Interacció entre les vies de Raf i PI3K.** Un cop Ras es troba en els seu estat actiu, pot senyalitzar a través de Raf1 i PI3K, entre d'altres efectors. Raf1 pot inhibir-se per Akt en diferents situacions com la diferenciació del múscul o en determinats càncers de mama. Al seu torn, Akt pot activar-se per Raf1 en determinades situacions. Un altre punt de connexió entre aquestes dues vies és mTORC1, que quan es troba inhibit, provoca una senyalització de l'RTK que acabarà per activar ERK i AKT. Una activació anormal de totes dues vies induïx la formació de tumors (Castellano and Downward, 2010).

## 2.4- COMPARTIMENTALITZACIÓ DE LA SENYAL DE LES PROTEÏNES RAS

Les plataformes de senyalització per excel·lència han estat la membrana plasmàtica i els endosomes, però el fet és que tant el Golgi, el reticle endoplasmàtic (RE), com els mitocondris, són capaços de desenvolupar aquest paper.

### 2.4.1- Ras des dels endosomes

La primera evidència de senyalització des dels endosomes va donar-se a partir del fraccionament cel·lular on l'estimulació amb EGF o insulina feia variar la presència de certes proteïnes com Raf1, Grb2, Sos (Di Guglielmo et al., 1994; Pol et al., 1998). A més, el descobriment que en cèl·lules deficientes en CDE hi havia una disminució de l'activitat d'ERK, va canviar la visió que es tenia dels endosomes com atenuadors dels senyals provinents de la membrana plasmàtica (Kranenburg et al., 1999; Mor and Philips, 2006). Diversos mètodes s'han usat per demostrar l'activitat dels receptors després de la seva internalització. Per exemple, en el cas del lligand EGF, aquest queda unit al seu receptor quan es troba en els endosomes, a diferència del lligand TGF- $\alpha$ , permetent la senyalització sostinguda al llarg de la via endocítica fins als lisosomes. De fet, Sorkin *et al.* que el receptor d'EGF era actiu als endosomes mitjançant experiments de FRET entre YFP-Grb2 i CFP-EGFR (Sorkin et al., 2000). També s'ha demostrat l'activitat del receptor d'EGF mitjançant la microinjecció d'anticossos antifosfotirosina conjugats amb un acceptor de FRET, en cèl·lules transfectades amb GFP-EGFR (Wouters and Bastiaens, 1999).

En diversos estudis, mitjançant l'expressió de proteïnes de fusió fluorescentes, s'ha descrit la localització de les proteïnes Ras en aquests orgànuls. L'activació de Ras en els endosomes es va descriure mitjançant l'expressió de YFP-RBD i CFP-Ras, els quals col·localitzaven en aquestes vesícules juntament amb l'EGF (Jiang and Sorkin, 2002). Posteriorment, al nostre Departament es va descriure com KRas és capaç de continuar senyalitzant als endosomes tardans gràcies al complex p14-MP1 (Lu et al., 2009).

Estudis realitzats amb el mutant negatiu de la dinamia (DynK44A), posen de manifest la dependència de l'endocitosi i del reciclatge dels endosomes per a

l'activació de Raf/MEK/ERK en aquests orgànuls en el cas d'HRas, però no per KRas (Roy et al., 2002).

#### 2.4.2- Ras des del Golgi

Chiu *et al.* van descriure com, després de l'estimulació amb factors de creixement, H/NRas podien localitzar-se de manera activa tant al Golgi com a la membrana plasmàtica. Però la cinètica d'activació de Ras en els dos compartiments era diferent. Mentre que l'activació en la membrana plasmàtica era ràpida i transitòria, al Golgi es donava al cap de 20 minuts i era sostinguda (Chiu et al., 2002). Com que es coneix l'existència d'un transport retrògrad des dels endosomes cap al Golgi, es va suggerir que l'arribada de Ras en aquest orgànul podria ser mitjançant el transport vesicular. Posteriorment, es va demostrar que la translocació de la proteïna RasGRP1 (una GEF de Ras) al Golgi, gràcies a un augment del calci intracel·lular, era la responsable de l'activació de Ras en aquest orgànul (Mor and Philips, 2006). Aquesta activació de Ras es dona mitjançant l'activació de la PLC $\gamma$ , la qual promou la hidròlisi de PIP $_2$  i la formació de DAG (diacilglicerol) i IP $_3$  (inositolsfosfats). L'IP $_3$  produeix l'augment de calci lliure intracel·lular que activa la proteïna RasGRP1. L'activació de les proteïnes Ras a Golgi poden induir la diferenciació de cèl·lules PC12 o la transformació de fibroblasts (Bivona et al., 2003), per tant la senyalització de Ras des del Golgi té una important funció biològica i ho fa per diferents vies de senyalització que en la membrana plasmàtica.

Però aquest no és l'únic mecanisme de regulació de l'activitat de H/NRas al Golgi. La palmitoilació/depalmitoilació d'H/NRas permet a aquestes proteïnes bescanviar contínuament entre l'aparell de Golgi i la membrana plasmàtica, on s'inicia la seva senyalització (Rocks 2005). Les isoformes de Ras palmitoilades no són les úniques que poden trobar-se a Golgi. Estudis realitzats en neurones de l'hipocamp estimulades amb glutamat, demostren com GFP-KRasG12V transloca des de la membrana plasmàtica fins a diverses endomembranes, entre elles el Golgi, de manera dependent de calci (Fivaz and Meyer, 2005). La importància de la seva senyalització aquí encara no està clara, i només s'ha pogut observar en neurones.

#### 2.4.3- Ras des del reticle endoplasmàtic (RE)

Quan H/NRas presenten deficiències en la palmitoilació s'acumulen al RE i al citosol enlloc de trobar-se al Golgi. De fet, la coexpressió de mutants de Ras no palmitoilables i el mutant GFP-RBD (mutant de Raf1 que conté el domini d'unió a Ras) s'acumulaven al RE. L'explicació del perquè Ras podia activar-se, tot i estar al RE, la van descriure Arozarena *et al.* Els seus estudis demostraven com les Ras GRFs (GEFs de Ras regulades per calci que s'expressen en neurones) translocaven ràpidament al reticle endoplasmàtic i activaven el Ras localitzat en aquest (Arozarena et al., 2004).

El fet que només el Ras no palmitoïlat es trobi al reticle endoplasmàtic fa plantejar-se la importància de la localització de les proteïnes Ras en aquests compartiment i la seva senyalització des d'aquí. Sobering *et al.* van descriure, en *Saccharomyces cerevisiae*, un inhibidor de Ras associat al RE, Eri1. Aquesta proteïna és un component de la GPI-GlcNAc transferasa i s'uneix al Ras actiu (Ras-GTP) al reticle endoplasmàtic. De fet, el Ras actiu inhibia aquest enzim, convertint-lo en el primer efector regulat negativament per Ras (Sobering *et al.*, 2003). Donat que en certes malalties hematopoiètiques l'enzim GPI-GlcNAc transferasa hi està involucrat, la senyalització de Ras en aquest compartiment té una especial rellevància.

#### **2.4.4- Ras des dels mitocondris**

Demory *et al.* descrivien que la translocació de c-Src als mitocondris succeïa de manera semblant a com ho feia l'EGFR, i que l'activitat catalítica del receptor d'EGF i de c-Src, així com l'endocitosi i la localització als mitocondris d'aquests, són necessàries per l'activació de CoxII, proteïna relacionada amb la cadena oxidativa, en aquests orgànuls. En canvi, el tractament amb EGF redueix els nivells intracel·lulars d'ATP i l'activitat Cox, que regula la sortida del citocrom c de la cèl·lula durant l'apoptosi. Amb aquests resultats presentaven un model on l'EGF és capaç de regular la funció dels mitocondris, fet que pot tenir conseqüències en la supervivència cel·lular (Demory *et al.*, 2009).

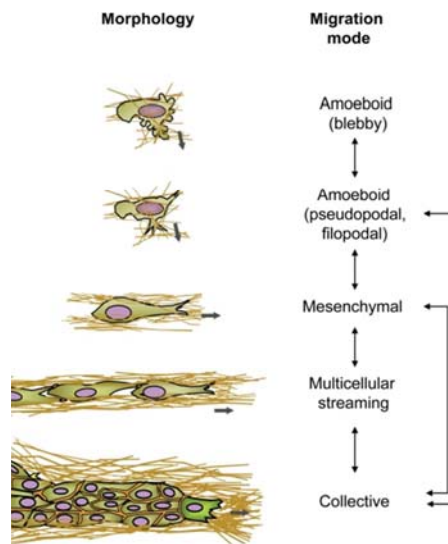
Altres components de la via de les MAPK han estat localitzats en mitocondris. De fet, les tres isoformes de Ras (HRas, NRas i KRas) s'han descrit en aquests orgànuls en cèl·lules T murines depenents d'IL-2 (Rebollo *et al.*, 1999). S'ha descrit com la fosforilació de KRas per PKC a la seva regió polibàsica provoca una pèrdua d'afinitat de KRas per la membrana plasmàtica permetent la seva translocació cap a les endomembranes, entre elles la dels mitocondris (Mor and Philips, 2006).

Quan KRas es troba fosforilat a la Ser-181, pot induir apoptosi mitjançant la via de Bcl-XL. Així ho demostren Bivona *et al.* quan al tractar les cèl·lules amb briostatina (antagonista de la PKC), aquestes no es transformaven (Bivona *et al.*, 2006).

## 3- MOBILITAT CEL·LULAR

### 3.1- MIGRACIÓ I INVASIÓ CEL·LULAR

La migració cel·lular és un procés complex i heterogeni que duen a terme totes les cèl·lules nucleades. Per a alguns tipus cel·lulars com ara les neurones o els fibroblasts, la migració és un procés transitori que finalitza quan comença l'especialització cel·lular. Per a d'altres tipus de cèl·lules com els leucòcits, la migració està integrada en la seva funció. La progressió del càncer és un procés complex que, per a la migració de les cèl·lules tumorals, inclou la interacció proteolítica de les cèl·lules amb la matriu extracel·lular (ECM). Les cèl·lules invasives es troben amb diverses barreres estructurals a l'hora de migrar. Hi ha diversos tipus de migració que Friedl *et al.* classifiquen segons les cèl·lules es moguin de manera individual o col·lectiva (Fig. 19) (Friedl, 2004).



**Figura 19. Tipus de migració.** La nomenclatura de migració intersticial es basa en la típica morfologia cel·lular (rodona o allargada) i el patró de moviment (individualment o col·lectivament). Cada tipus de migració està regit per mecanismes moleculars específics, la regulació dels quals pot fer variar el tipus de migració. Les transicions de migracions més ben estudiades són les de tipus mesenquimal a amoeboid o la transició de migració col·lectiva a individual (Friedl, 2004).

Hi ha diversos factors que indueixen a la diferent migració de les cèl·lules i un d'ells és el medi en que es troben, ja que el contingut en lligands pot ésser molt variable, així com la densitat de l'ECM. En resposta a aquests determinants, el

citoesquelet d'actina de les cèl·lules s'adapta de manera molt dinàmica a l'espai on es troba la cèl·lula (Grinnell, 2008). Per evitar els impediments físics que confereix el medi on es troben les cèl·lules, aquestes desenvolupen una sèrie de protusions (diferents per a la migració en 2D o 3D) que promouran l'adhesió de la cèl·lula i el moviment d'aquesta a través de l'ECM (Paluch et al., 2006).

### 3.1.1- Migració en 2D vs 3D

La progressió del càncer és un procés complex que inclou la migració associada a la proteòlisi de la matriu extracel·lular per part de les cèl·lules cancerígenes. Les regions de les cèl·lules cancerígenes que duen a terme aquests processos proteolítics són diferents segons la composició, les dimensions i l'estructura de l'ECM que es troba en contacte amb la cèl·lula (Wolf and Friedl, 2009). Les cèl·lules invasives es poden trobar amb espais molt diversos durant la seva migració tals com superfícies en 2D o 3D.

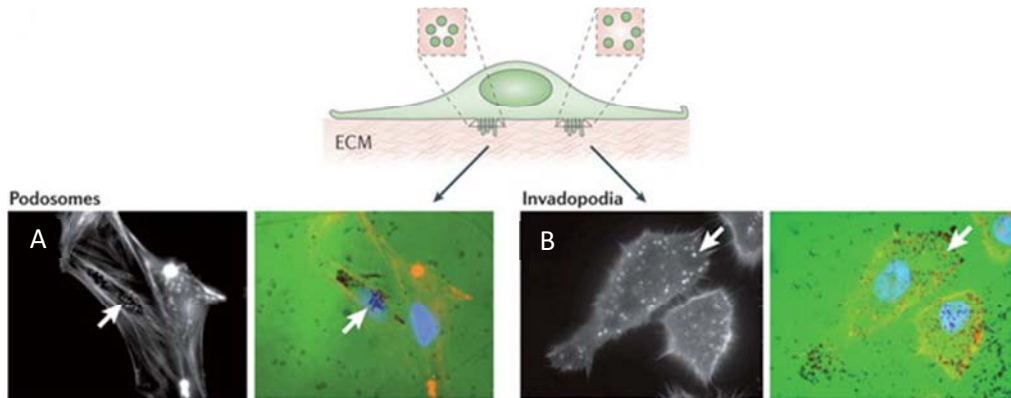
#### 3.1.1.1-Migració en 2D

Les superfícies en 2D solen comprendre membranes basals que contenen laminina, col·lagen IV i d'altres proteïnes estructurals localitzades sota els epitelis o l'endoteli de la pell, ventricles del cervell, vasos sanguinis, etc (Wolf and Friedl, 2009). Per a l'estudi *in vitro* de models de migració en 2D en cultius cel·lulars s'usen substrats com ara la fibronectina, matrigel o la gelatina. Les estructures proteolítiques presents en les cèl·lules d'aquests cultius són bàsicament els lamelipodis, les adhesions focals i un front d'avanç.

Els lamel·lipodis són estructures que s'estenen a la part frontal de la cèl·lula que migra. Són estructures riques, entre d'altres proteïnes, en la metall proteasa MT1-MMP (Linder, 2007). També s'hi observen podosomes a la part basal de la cèl·lula, que són estructures *dot-like* riques en actina. Els podosomes es solen trobar en cèl·lules monocítiques com els macròfags, osteoclasts i en cèl·lules dendrítiques immadures. Tot i així, també poden observar-se en altres tipus cel·lulars com ara les cèl·lules endotelials o cèl·lules del múscul llis (Linder and Kopp, 2005). És molt probable que la funció principal dels podosomes sigui l'adhesió cel·lular ja que estableixen contacte amb el substrat i són estructures riques en integrines d'adhesió que només es formen en aquests punts de contacte amb el substrat (Linder and Aepfelbacher, 2003). Tot i que la funció principal d'aquest tipus d'estructures sigui l'esmentada, els podosomes també s'han relacionat amb la migració i la invasió de les cèl·lules

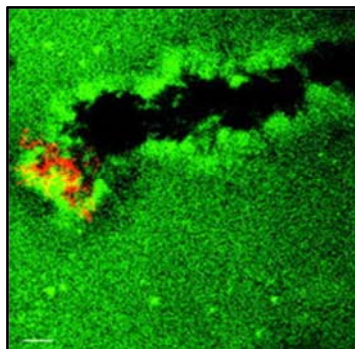
Cal diferenciar els podosomes dels invadopodis, que són estructures tubulars fines que van perpendiculars a la membrana basal i solen estar presents en cèl·lules transformades. Mentre que els podosomes solen tenir unes mides d'entre 0.5-1 µm de diàmetre i 0.2-0.4 µm de profunditat, els invadopodis poden arribar a tenir un

diàmetre de fins a 8  $\mu\text{m}$  i poden elongar-se a través de la matriu extracel·lular fins a diversos micròmetres (McNiven et al., 2004). Ambdues formacions són riques en la metall proteasa MT1-MMP (Fig. 20).



**Figura 20.** Imatges de podosomes i d'invadopodis en cèl·lules transformades (B) o no (A) (Murphy and Courtneidge, 2011).

Una altra característica dels cultius en 2D és que les cèl·lules van deixant un rastre al seu pas pel suport on es trobin, és l'anomenat *microtrack*. Aquest és el resultat de la degradació proteolítica que ha fet la cèl·lula al seu pas (Fig. 21) (Wolf and Friedl, 2009).



**Figura 21. Microtrack.** Cèl·lules MDA-MB que expressen HA-tagged ARF6(Q67L), plantades en gelatina fluorescent durant 24h (Tague et al., 2004).

### 3.1.1.2- Migració en 3D

En els assajos fets en cultius amb matrius 3D, les cèl·lules adopten una morfologia més natural que no pas en els experiments fets en 2D. Les cèl·lules que migren en 3D, poden fer-ho de dues maneres: en forma mesenquimal o ameboide.

Durant la migració cel·lular en 3D el front d'avanç de les cèl·lules s'allarga i interacciona amb l'ECM mentre diverses proteïnes amb funció proteolítica, com la metall proteasa MT1-MMP, es focalitzen en aquests punts de contacte (Wolf et al., 2003). En aquest cas es poden distingir dos grups d'MT1-MMP. En el pseudopodi anterior es formen agrupacions de la metall proteasa de durada curta, mentre que en les espines i el front d'avanç, aquests grups duren més estona. Una de les funcions de l'MT1-MMP és la de degradar l'ECM perquè la cèl·lula pugui avançar a través d'aquesta.

En aquest tipus de migració les cèl·lules pateixen una sèrie de deformacions degudes a la pressió de les fibres de l'ECM. La matriu extracel·lular envolta la cèl·lula amb el que es coneix com a cinturons de pressió, que són fibres de la pròpia matriu que pressionen a la cèl·lula. Com a mecanisme per a poder migrar malgrat aquestes resistències físiques de l'ECM, la cèl·lula promou l'agrupació de proteïnes com l'MT1-MMP i la  $\beta$ 1-integrina, que permetran la proteòlisi de les fibres de l'ECM en aquests punts, deixant el pas lliure per a poder migrar (Wolf and Friedl, 2009).

## **3.2- METALL PROTEASES DE LA MATRIU EXTRACEL·LULAR (MMPs)**

La família de les metall proteases és extensa i la seva classificació pot variar segons es faci per la seva funció, la seva evolució, el nom del gen que les codifica o bé el tipus d'aminoàcids que contenen en la seva part catalítica. Si es té en compte el substrat pel qual tenen afinitat i la seva estructura, es poden classificar aquestes proteïnes en els grups que es detallen en la taula següent (Taula 1). Part dels estudis realitzats en aquesta tesi s'han centrat en la possible connexió de KRas i la metall proteasa MT1-MMP.

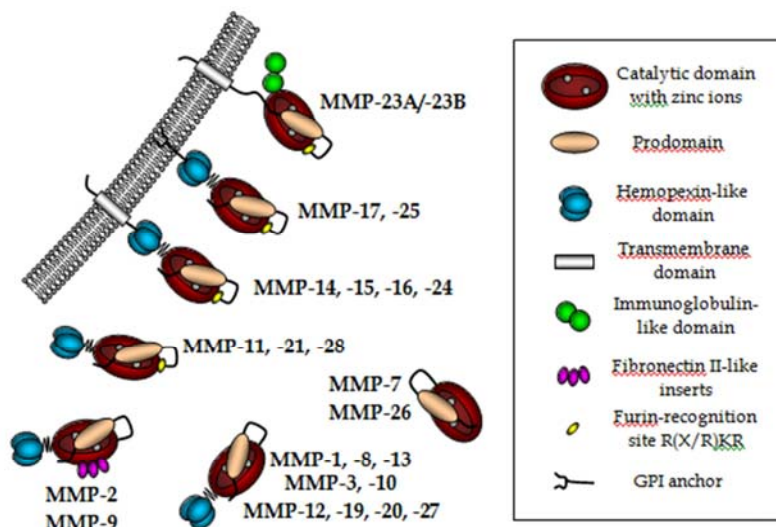
TIPUS	MMP	CARACTERÍSTIQUES	SUBSTRATS
Col·lagenases	MMP-1, MMP-8, MMP-13		Col·lagen fibril·lar
Gelatinases	MMP-2, MMP-9	Tenen el domini CBD d'unió al col·lagen	Col·lagen I i IV
Stromelisines	MMP-3, MMP-10, MMP-11		Col·lagen IV
Martilisines	MMP-7, MMP-26	No tenen el domini hemopexina	Col·lagen IV
Transmembrana (MT-MMP)	MMP-14 ( <b>MT1-MMP</b> ), MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25	Presenten una regió transmembrana i una cua citosòlica petita	Col·lagen I fibril·lar (només la MMP-14 i la MMP-16)
Sense classificar	MMP-12, MMP-19, MMP-21, MMP-28		

**Taula 1. Classificació de les MMPs segons el tipus de substrat i l'estructura** (Sbardella et al., 2012).

La seva funció principal, entre d'altres, és degradar la matriu extracel·lular (ECM). Tot i que existeixen diferents tipus de MMPs, tenen grups estructurals en comú:

- *Domini pro-actiu*: format per 80 aminoàcids. És el responsable de deixar en latència l'enzim quan el grup sulfidril de la part N-terminal interacciona amb un ió de  $Zn^{2+}$ . Algunes MMPs (MT1-MMP, MMP-11 i MMP-28) són activades per la furina en el seu tràfic cap a la membrana plasmàtica. Aquesta activació es dona pel reconeixement de la furina del domini pro-actiu.
- *Domini catalític*: Es troba situat entre el domini pro-actiu i els dominis d'hempexina de la cua C-terminal. També s'anomena *hinge region* o *spacer*. Aquest domini és essencial per a estabilitzar l'enzim i per a la correcta degradació del substrat. Conté diversos llocs de reconeixement que varia segon la metall proteasa.
- *Domini hemopexina*: es troba situat a l'extrem C-terminal de la proteïna. Està format per 4 fulles  $\beta$  en forma de barril. La seva funció rau en les interaccions proteïna-proteïna. És el lloc de reconeixement dels TIMPs, els inhibidors de les MMPs.





**Figura 23.** Esquema representatiu de l'estructura general dels principals dominis de les MMPs (Tomasz Grzela, 2011).

La matriu extracel·lular confereix a les cèl·lules informació en cas d'infiltració d'un patogen, o d'alteracions en la integritat del teixit, etc. Aquesta informació es dona gràcies a la degradació dels components que formen l'ECM, com el col·lagen. El col·lagen de tipus I és el principal component de la matriu extracel·lular. A part de conferir força mecànica als teixits, aquest és un reservori i regulador de citocines que s'alliberen i, a més, fa d'organitzador i promotor de l'activació de proteases de membrana importants per a la degradació del col·lagen, com la MT1-MMP (Tam et al., 2004). Tot i que la MT1-MMP té activitat col·lagenasa, la seva capacitat de degradació de la gelatina és bastant minsa. En canvi, passa el contrari amb la MMP-2, que es defineix com una gelatinasa. La diferència entre col·lagen i gelatina recau en el fet que el primer està format per un seguit de proteïnes fibril·lars i és el component majoritari de l'ECM dels teixits de mamífers. La gelatina en canvi, és un producte de la descomposició del col·làgen, derivada de l'extracció artificial d'aquests teixits. Normalment la gelatina s'utilitza per a estudis de degradació de l'ECM i invasió cel·lular.

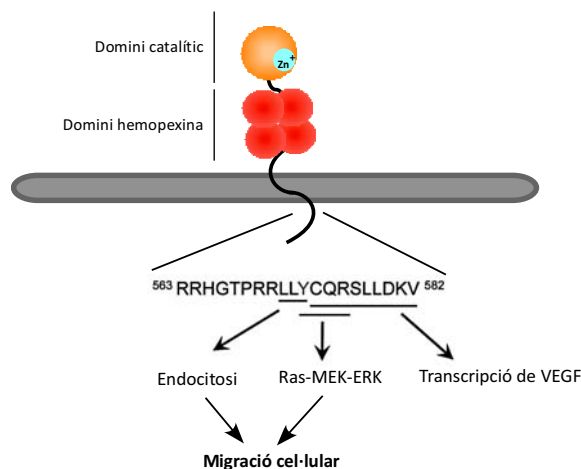
### 3.3- TIPUS D'MMPs

#### 3.3.1- MT1-MMP

Forma part del subgrup de MT-MMPs (metall proteases transmembrana) que comprèn 25 membres (Taula 1). Tenen una funció essencial en la coordinació de la degradació de l'ECM, tumorigènesi, angiogènesi i invasió cel·lular. La cua

citoplasmàtica, que no totes les proteïnes d'aquest subgrup contenen, té importància en la senyalització, la localització subcel·lular de la proteïna, en el tràfic i en la dimerització de les MT-MMPs. En el cas de la MT1-MMP, aquesta cua citoplasmàtica pot interaccionar amb Ras i activar així la via de senyalització de MEK-ERK (Fig. 24)(Gingras and Beliveau, 2010). El seu domini pro-actiu actua com una xaperona intramolecular, i té especial rellevància en l'activació de la pro-MMP-2 (Pavlaki et al., 2002). Seguidament a aquest domini, aquestes MMPs tenen un lloc de reconeixement de la furina, el qual és una diana per a aquesta proteïna al Golgi, durant el tràfic de la MT-MMP des del reticle endoplasmàtic cap a la membrana plasmàtica (Hotary et al., 2000; Zucker et al., 2003). S'han descrit altres vies d'activació de la MT1-MMP, com ara a partir de convertases i proteïnes localitzades a la membrana plasmàtica, com la plasmina en el cas de la MT1-MMP.

La MT1-MMP és, sense dubte, la MT-MMP més estudiada del seu subgrup. Se la coneix també com MMP-14. El fet de tenir un domini extracel·lular i una cua citoplasmàtica fan que la MT1-MMP sigui l'única amb la capacitat de modificar el microambient extracel·lular així com d'estar en contacte al mateix temps amb el citosol. Aquesta metall proteasa és la més promiscua pel que fa a la varietat de substrats que pot degradar. Així doncs tan pot degradar gelatina, col·lagen (tipus I, II i III), fibrina, laminina (I i V), fibronectina, vitronectina o aggrecà (Sbardella et al., 2012). A més, també té la capacitat de tallar el receptor CD44 promovent així la migració cel·lular (Kajita et al., 2001) (Fig. 24).



**Figura 24. Esquema de la MT1-MMP.** Representació esquemàtica dels diferents dominis de la MT1-MMP. Es subratllen els aminoàcids implicats en l'endocitosi, la transcripció del gen VEGF i l'activació d'ERK. Adaptat de (Gingras and Beliveau, 2010).

L'MT1-MMP pot trobar-se al llarg de tota la via endocítica. Tan pot entrar per la via dependent de clatrina (Remacle et al., 2003) o a través de les caveoles (Annabi et al., 2001) gràcies a la palmitoilació de la seva cua citoplasmàtica (Anilkumar et al., 2005). Un cop internalitzada i localitzada als endosomes primerencs, aquesta és capaç de reciclar cap a la membrana plasmàtica, tant per la via Rab-4 com Rab-11 (Remacle et al., 2005), o bé degradar-se mitjançant els lisosomes (Takino et al., 2003b). Recentment, Rossé *et al.* han descrit el reciclatge de l'MT1-MMP des dels endosomes tardans cap al Golgi a través de l'activació de la PKC iota atípica (αPKCi). Aquesta quinasa, present en els endosomes positius per MT1-MMP, pot fosforilar la cortacina que embolcalla els endosomes, fet que afavoreix la interacció d'aquesta amb la dinamina-2, proteïna que promou l'escissió de membranes (Rosse et al., 2014).

A més, quan l'MT1-MMP es troba al Golgi, pot ser activada mitjançant la furina, l'expressió de la qual ve donada per una convergència de les vies de senyalització de Ras i TGF-β (Blanchette et al., 2001). Un cop activada pot continuar el seu viatge cap a la membrana plasmàtica a través de vesícules positives per Rab8 (Bravo-Cordero et al., 2007) i VAMP-7 (Steffen et al., 2008) a través de microtúbuls (Remacle et al., 2005) (Fig. 25). Quan la MT1-MMP està en forma activa, pot interaccionar amb els seus inhibidors, els TIMPs (*Tissue inhibitors of Metalloproteases*) formant el complexe necessari per activar la MMP2 (detallat en l'apartat 3.3.1).

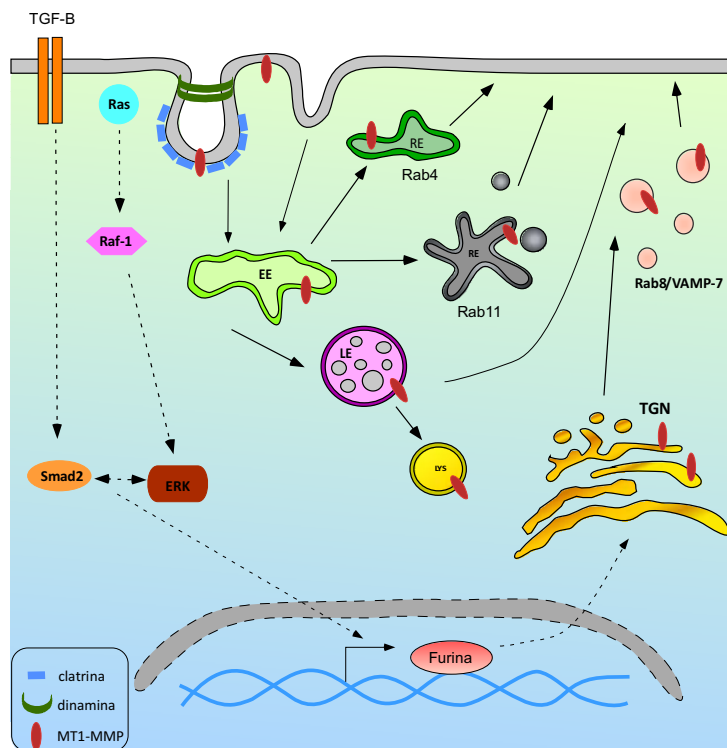


Figura 25. Esquema representatiu del reciclatge ( → ) i activació ( ---> ) de la MT1-MMP.

Diversos estudis posen de manifest el fet que la MT1-MMP no només ha de tenir capacitat proteolítica per a ella mateixa, sinó que ha de poder col·locar-se al lloc adequat per a poder dur a terme la seva funció. Estudis duts a terme per Hotary K. *et al.*, demostraven la importància de la cua citosòlica d'MT1-MMP per a la degradació de la matriu extracel·lular i com la part extracel·lular d'aquesta proteïna *per se* tampoc pot funcionar de manera correcte (Hotary et al., 2000). Curiosament, si la funció catalítica de la proteïna es veu inhibida, aquesta pot seguir conferint a la cèl·lula capacitat invasiva, tot i que en menor grau. Així ho demostren Li *et al.* en transfectar un mutant de MT1-MMP al qual s'ha bescanviat la seva part proteolítica per la d'una col·lagenasa no relacionada com la MMP-1, la qual no confereix a la cèl·lula capacitat invasiva (Li et al., 2008). Això estaria indicant que és tant o més important la localització a la membrana plasmàtica de la MT1-MMP que no pas la seva capacitat proteolítica per tal que la cèl·lula pugui invair. Així com la MT3-MMP i la MT5-MMP, la MT1-MMP és capaç d'activar les gelatinases MMP-2 i MMP-9 controlant així els processos cancerígens (Takino et al., 2003a).

S'han dut a terme diversos estudis d'aquesta proteïna on es descriu la seva funció en diferents processos biològics i fisiopatològics. Els ratolins deficientes per MT1-MMP, s'ha vist que pateixen artritis, fibrosi en teixits tous, dimorfisme cranioencefàlic i mort prematura (Zhou et al., 2000). Aquests resultats posen en evidència la gran importància de l'MT1-MMP durant el desenvolupament. Però no tan sols aquí és important el seu correcte funcionament, ja que aquesta proteïna està involucrada en molts tipus de càncers com ara el de còlon, mama, cervell, coll d'úter i ovari (Sabeh et al., 2004).

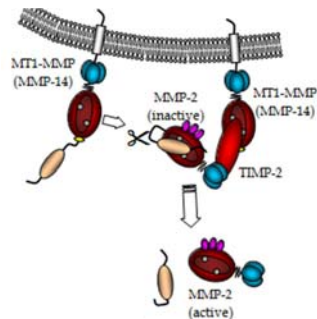
### 3.4- MMPs ACTIVADES PER MT1-MMP

#### 3.4.1- MMP-2

Forma part de les gelatinases (Taula 1). Aquest nom ve donat per a la seva afinitat pel col·làgen desnaturalitzat, anomenat també gelatina. Al ser també un proenzim, la podem trobar en dues formes diferent: 72 i 62 kDa segons estigui inactiva o activa, respectivament. Es troba expressada en gairebé tots els teixits cel·lulars humans i principalment en fibroblasts i cèl·lules epitelials. La part catalítica i el domini hemopexina són idèntics a les altres MMP. Però té una particularitat diferent: el domini CBD (*col·lagen binding domain*). Les gelatinases estan involucrades en processos inflamatoris i en la progressió de tumors (Sbardella et al., 2012).

El seu mecanisme d'activació pot donar-se de dues maneres diferents. La primera és l'autoactivació de la proteïna per alteracions en el medi extracel·lular (disulfits, surfactants com l'SDS, oxidants.), que exposen el domini catalític de manera

que aquest provoca l'activació de la proteïna alliberant-la del seu pro-domini (Hadler-Olsen et al., 2011). En el segon model que s'ha proposat hi intervenen la MT1-MMP i TIMP-2. TIMP-2 fa de pont entre la MT1-MMP i la MMP2 ja que el seu extrem N-terminal inactiva la MT1-MMP mentre que l'extrem C-terminal s'uneix al domini hemopexina de la MMP-2. En aquest punt, una altra molècula de MT1-MMP s'uneix al complexe TIMP-2/pro-MMP2/MT1-MMP activant la MMP2 (Fig. 26) (Tomasz Grzela, 2011).



**Figura 26. Activació de la MMP2 per la MT1-MMP (Tomasz Grzela, 2011).**

# **MATERIALS I MÈTODES**



# 1- MATERIALS

## 1.1- ANTICOSSOS:

A continuació es detallen els anticossos que s'han utilitzat tant en les immunofluorescències com en els westerns blot. S'indica la proteïna que reconeixen, el seu origen, la casa comercial i la dilució a la que s'ha utilitzat (Taula I).

ANTICÒS 1ari	ESPÈCIE	CASA COMERCIAL	DILUCIÓ WB	DILUCIÓ IF
Actina	mo	Abcam	1:800	-
cortactina	mo	Upstate	-	1:200
EEA-1	mo	BD Bioscience	1:2500	1:75
GFP	rb	Abcam	1:1000	-
KRas	mo	Sta. Cruz	1:500	-
LBPA	mo	Echelon	-	1:20
MT1-MMP	mo	Millipore	-	1:75
MT1-MMP	rb	Millipore	1:500	-
P-MAPK	rb	Cell Signalling	1:1000	-
P-Ser338 Raf1	mo	Upstate	1:500	1:75
P-cRaf1	mo	BD Bioscience	1:000	1:75
RFP	rb	Cell signalling	1:500	-
tubulina	mo	Sigma	-	1:150

ANTICÒS 2ari WB	CASA COMERCIAL	DILUCIÓ
anti-mo-HRP	Bio-Rad,(Cat.170-6516)	1:3000
prot-A-HRP	Zymed,( Cat.10-1023)	1:10.000

ANTICÒS 2ari IF	CASA COMERCIAL	DILUCIÓ
Go-anti-mo-A 488	Molecular Probes A1101	1 : 500
Go-anti-mo-A 594	Molecular Probes, A1105	1 : 500
Go-anti-mo-FITC	Sigma, F9259	1 : 100
Go-anti-rb-A 488	Molecular Probes, A1108	1 : 500
Go-anti-rb-FITC	Sigma, F0382	1 : 100
Go-anti-rb-A 594	Molecular Probes, A11012	1 : 500

**Taula 1. Anticossos primaris i secundaris utilitzats.** Se'n detalla la casa comercial, l'origen i la dilució per a western blot i immunofluorescència ( - = no s'ha utilitzat).



## 1.2- REACTIUS:

A la taula 2 es detallen els reactius utilitzats en aquesta tesi.

Producte	Concentració	Funció	Casa Comercial
EGF	100 ng/mL	l·ligand de l'EGFR	Sigma- E4127
EGF-TRITC	200 ng/mL	l·ligand fluorescent de l'EGFR	Molecular Probes-E-3481
EGF-A647	200 ng/mL	l·ligand fluorescent de l'EGFR	Lab Technologies
HGF	100 ng/mL	L·ligand de l'HGFR	Sigma
Nocodazole	30 $\mu$ M	inhibidor de la polimerització dels microtúbuls	Calbiochem 487928
Wortmanina	10 $\mu$ M	inhibidor de PI3K	Calbiochem 681675
W13	5 $\mu$ g/mL	inhibidor de la calmodulina	Calbiochem 681636
Bafilomicina A1	30 ng/mL	Inhibidor de la bomba vacuolar de H <sup>+</sup> ATPasa	Sigma B-1793-10UG
Fibronectina	10 $\mu$ g/mL	proteïna adherent de l'ECM	Sigma F0895-1MG
Gelatina	2 mg/ml	derivat del colagen de l'ECM	Sigma G2500-100G
DAPI	1 $\mu$ g/ml	marcador del nucli	Molecular Probes

**Taula 2. Productes utilitzats en els tractaments de les cèl·lules.**

## 1.3- PLÀSMIDS:

Tant per l'anàlisi de la dinàmica de KRas com per l'estudi d'aquesta proteïna en diverses funcions cel·lulars, es van fer una sèrie de proteïnes recombinants que es detallen a la següent taula. El vector on es clonaren els diferents DNAs va ser pEGFP-C1 (Clontech) en les diferents variants de proteïnes fluorescents (GFP, cherry, cerulean, venus).

Mutant	Primers	Enzims
GFP-KRas $\Delta$ CAAX	F: 5' CAGATCTCGAGCTCAAATGACTGAATATAAACTT 3' R: 5' CCGGTGGATCCCGGGTCACTTTGTCTTTGAC 3'	SacI/SmaI
GFP-KRasPBR6KG	F: 5' GGACGAGCTGTACAAGTCCGGAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGG 3' R: 5' CCGGTGGATCCCGGGTTACATAATTACACACTTTGTCTTTGAGCCACCCGCTCCGCCACCACCATCTTTGCTC3'	BspE1/SmaI
GFP2xFYVE-KRasS17N $\Delta$ CAAX	F: 5' CAGATCTCGAGCTCAAATGACTGAATATAAACT TG 3' R: 5' CCG GTG GAT CCC GGG TCA CTT TGT CTT TGAC 3'	SacI/SmaI
GFP2xFYVE-KRasG12V $\Delta$ CAAX	F: 5' CAGATCTCGAGCTCAAATGACTGAATATAAACTTG 3' R: 5' CCGGTGGATCCCGGGTCACTTTGTCTTTGA C 3'	SacI/SmaI
GFP-KRas176-177-178Q	F: 5' GATCCGGTGGATCCCGGGCCTTACATAATTACACACTTTGTCTTTGACTGTTCTGCTTTTGTTTACCATCTTTGC 3' R: 5' CACATGGTCTGGAGTTCGTG3'	BsrG1/BamHI
GFP-KRaswt/G12V/S17N-geranil	F: 5' CGAGCTGTACAAGTCCGGAATGACTGAATATAAACTTG 3' R: 5' CTAGATCCGGTGGATCCCGGGTTACAACAGCAGACACTTTGTCTTTGA 3'	BspE1/SmaI

**Taula 3. cDNAs clonats i utilitzats en els diferents experiments.**

## 2- MÈTODES

### 2.1- CULTIUS CEL·LULARS

A la taula següent es descriuen els diferents tipus cel·lulars que s'han utilitzat en els diferents experiments. S'indica el nom de la línia cel·lular, l'origen i les condicions en que es cultiven. Totes les línies utilitzades s'han fet créixer en una atmosfera amb el 5% de CO<sub>2</sub>, una temperatura de 37°C i en condicions d'esterilitat. Els medis usats s'han suplementat amb aminoàcids no essencials (1:100 de MEM-Eagle *Non essential* amino acids solutiona 100x, Biological Industries), L-Glutamina 4mM, piruvat 1 mM (Sigma) i penicil·lina 50 U/ mL/ Estreptomicina 50 µg/mL i 10 % de FBS (*Foetal Bovine Serum*) o DBS (*Donor Bovine Serum*). En el cas del medi per a dejunar les cèl·lules, aquest no conté FBS però sí els aminoàcids i l'antibiòtic. A la taula següent s'especifiquen les particularitats per a cada tipus cel·lular utilitzat.

LÍNIA CEL·LULAR	ORIGEN	MEDI
COS-1	Ronyó de mono verd immortalitzades	DMEM, 10% FBS
HeLa	Carcinoma de cèrvix	DMEM, 10% FBS
Vero	Fibroblasts de ronyó de mono	DMEM, 10% FBS
3T3-NIH wt8	Fibroblasts de ratolí que expressen l'EGFR wt	DMEM, 10% DBS
HT1080	Fibrosarcoma humà	DMEM, 10% FBS

**Taula 4. Tipus cel·lulars utilitzats.**

### 2.2- TRANSFECCIONS

#### 2.2.1- DNA

Per expressar proteïnes de manera transitòria a les cèl·lules s'han fet servir dos protocols diferents segons l'experiment. En casos on es volia usar les mostres per a microscopia, el mètode de transfecció utilitzat ha estat *Effectene Transfection Reagent* de Qiagen (301427), segons les especificacions del fabricant. En casos on es pretenia obtenir una elevada eficiència i alts nivells d'expressió de la proteïna transfectada, com el cas dels fraccionaments cel·lulars per a l'obtenció de fraccions d'endosomes, s'ha utilitzat Lipofectamina LTX (Invitrogen 15338-100). En ambdós casos els experiments s'han realitzat 24 hores després de la transfecció.

A continuació es detallen els diferents DNAs utilitzats en les diverses transfeccions.

NOM	VECTOR	ORIGEN
GFP-KRas wt	pEGFPC1	-
GFP-KRasG12V	pEGFPC1	-
cerulean-KRasG12V	mCeruleanC1	-
venus-KRasG12V	vCeruleanC1	-
GFP-KRas S17N	pEGFPC1	-
GFP-HRas wt	pEGFPC1	-
GFP-HRas G12V	pEGFPC1	-
GFP-HRas N17	pEGFPC1	-
GFP-2xFYVE	pCORON	-
cerulean-2xFYVE	mCeruleanC1	-
venus-2xFYVE	vCeruleanC1	-
GFP-2xFYVE KRaswt ΔCAAX	pCORON	-
GFP-2xFYVE KRasG12V ΔCAAX	pCORON	-
GFP-2xFYVE KRasS17N ΔCAAX	pCORON	-
GFP-KRasG12V-S181D	pEGFPC1	-
GFP-KRasN17-S181D	pEGFPC1	-
GFP-KRasΔCAAX	pEGFPC1	-
GFP-KRasPBR6KG	pEGFPC1	-
GFP-KRasPBR3KQ	pEGFPC1	-
cherry-Lact C2	mCherry C1	Dr. Sergio Grinstein
cerulean-LacC2	mCeruleanC1	-
venus-LactC2	vCeruleanC1	-
cherry MT1-MMP	mCherryC1	Dr. Giorgio Scita
pECFP-Rab5	pECFP-C1	Dr. Alexander Sorkin

**Taula 5. cDNA's utilitzats.** es detallen els DNAs utilitzats en aquesta tesi i el seu origen. (- = clonat al laboratori).

### 2.2.2- RNA

Per tal d'inhibir el KRas endogen, així com la PDE $\delta$  mitjançant la transfecció d'RNA de transferència, s'ha seguit el protocol de la Lipofectamina RNAiMAX (Invitrogen 13778-075), que es detalla a continuació (per a una placa de 6 pous):

- en dos eppendorfs diferents s'hi posa:
  1. 2  $\mu$ l d'RNAi (20 nM) + 250  $\mu$ L Optimem (Gibco)
  2. 7,5  $\mu$ l Lipofectamina<sup>®</sup> + 250  $\mu$ l Optimem
- es barregen els dos continguts (1 + 2) i es fa un vòrtex
- 20 minuts a temperatura ambient
- s'afegeix la barreja d'RNAi, Lipofectamina i Optimem, a les cèl·lules que prèviament hauran estat en un medi sense antibiòtics.

## 2.3- TÈCNiques BIOQUÍMIQUES

### 2.3.1- Electroforesi

La tècnica d'electroforesi permet separar proteïnes de diferents pesos moleculars presents a la mostra. Els gels d'acrilamida utilitzats són discontinus i consten de dues parts:

- *empaquetador*: aquest gel serveix per tal de concentrar les mostres i que tota la proteïna que aquesta contingui pugui avançar al mateix temps. Té un percentatge d'acrilamida baix (3.6 %) i un pH de 6.8.
- *resoltiu*: la funció d'aquest gel és la de separar les proteïnes que conté la mostra segons el pes molecular que tinguin. El seu percentatge d'acrilamida és variable en funció del pes molecular de les proteïnes que es vulguin separar, el rang sol ser de 5-15 % i el seu pH és de 8.8.

Abans de carregar les mostres al gel, aquestes s'han de barrejar amb tampó de mostra (2 % SDS, 10 % glicerol i 0.1 mg/ml blau de bromofenol) a una proporció 1:3 (tampó: mostra líquida). En cas que s'hagi fet una immunoprecipitació (IP), es posa el tampó de mostra 1x directament a les boles de sefarosa que contenen l'immunoprecipitat. Seguidament s'incuben les mostres a 100 °C durant 4 minuts en un bany sec. En cas de no procedir a carregar les mostres el mateix dia, aquestes poden mantenir-se a -20 °C, bullint-les un altre cop a 100 °C durant un minut quan es vulgui realitzar l'electroforesi.

### 2.3.2- Western Blot

Aquesta tècnica permet detectar proteïnes de manera específica mitjançant anticossos. Prèviament, després de l'elaboració d'un gel d'acrilamida, aquestes proteïnes han d'haver estat transferides a una membrana de nitrocel·lulosa, en la qual aplicarem la tècnica del *western blot*.

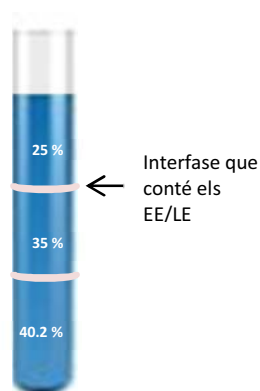
- Es fan tres rentats amb TBST (20 nM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.005 % Tween-20) d'aquesta membrana
- Bloqueig amb 5 % de llet en pols desnatada en TBST durant 45 minuts.
- Tres rentats, de 5 minuts cadascun, amb TBST.
- Incubació amb l'anticòs primari (diluït en TBST) durant 1-2 hores, depenent de l'anticòs.
- Tres rentats, de 5 minuts cadascun, amb TBST.
- Incubació de l'anticòs secundari (diluït en TBST) durant 1 hora, en cas de que aquest reconegui anticossos generats en ratolí, i durant 25 minuts en cas que reconegui anticossos generats en conill.
- 3 rentats, de 5 minuts cadascun, amb TBST.
- Un últim rentat en TBS (20 nM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl).

Un cop acabat el *western blot*, la detecció de l'anticòs secundari es realitza gràcies a que aquest està conjugat amb HRP (*horseradish peroxidase*). Aquesta proteïna reacciona amb l'ECL (*Enhanced Chimioluminescence*) que s'afegeix a la membrana (1:1) durant 1 minut. Això desencadena una reacció lumínica als llocs de la membrana ocupats per a la proteïna d'interès. Finalment la llum, generada per la reacció s'utilitza per velar un film fotogràfic (Super RX Fuji Medical X-Ray film, Fujifilm) que s'observa després de revelar.

### 2.3.3- Fraccionament cel·lular

Aquesta és una de les tècniques més emprades per a separar orgànuls que tenen densitats diferents, en aquest cas s'han separat endosomes primerencs (EE) i tardans (LE) d'altres orgànuls de la membrana plasmàtica i del citosol. En aquesta tesi, s'ha usat la tècnica d'aïllament d'endosomes per gradient discontinu de sacarosa. A partir de la transfecció de tres plaques de 150 cm<sup>2</sup> es recullen les cèl·lules mitjançant un tampó d'homogeneïtzació (imidazole 3 nM, sacarosa 250 nM, pH 7,4 i inhibidors de proteases). Seguidament es fa una centrifugació a 1000 x g durant 15 minuts amb la qual s'obté un *pellet* de cèl·lules que resuspenem amb el mateix *buffer*. Aquest *pellet* s'homogeneïtza fent 10 passades per una xeringa 22-*gauge*. Aquests homogenats es centrifuguen a 1000 x g durant 10 minuts. S'obté un PNS (sobrenedant *post-nuclear*), el qual conté tot el material de la cèl·lula excepte els nuclis. Després de quantificar el

contingut de proteïna d'aquest PNS, es barreja amb sacarosa fins a obtenir una fase de 3,9 ml amb un percentatge final de 40,2 % de sacarosa en un tub de *polyallomer* (Beckman Coulter, 331372). Seguidament s'hi afegeix les altres fases de sacarosa, de 3,9 ml cadascuna, de densitats 35% i del 25%, en aquest ordre. Un cop carregat el gradient per proteïna es fa una ultracentrifugació de 3 hores a 36.000 rpm fent servir el rotor SW41Ti, amb la qual es separen els endosomes presents en la mostra enmig de les dues últimes fases.



**Figura 1. Esquema representatiu d'un gradient de sacarosa discontinu.**

### 2.3.4- Immunoprecipitació

Aquesta tècnica permet aïllar proteïnes, tant endògenes com ectòpicament expressades, en diverses condicions experimentals. Per a dur a terme aquesta tècnica es segueixen els passos següents:

- un cop s'han realitzat els tractaments corresponents a les plaques on hi ha les cèl·lules cultivades, aquestes es renten amb PBS fred dos cops.
- Es recullen les cèl·lules amb un tampó de lisi (TGH: Tritó X-100 1 %, Glicerol 30 %, Hepes 50 mM).
- S'incuben els lisats en una nòria durant 10 minuts a 4 °C.
- Seguidament es fa una centrifugació dels lisats a 14000 x g durant 10 minuts a 4 °C.
- S'incuba el sobrenedant amb l'anticòs primari corresponent durant 2 hores.
- S'afegeixen 30 µl de proteïna A o G (segons l'anticòs primari utilitzat) unida a boles de sefarosa, i s'incuben durant 45 minuts a 4 °C.
- Es centrifuguen els lisats a 14000 x g durant 1 minut a 4°C i es renten tres cops les boles de proteïna A o G amb tampó de lisi sense inhibidors.
- finalment s'afegeix tampó de mostra i es processen les mostres mitjançant una l'electroforesi i *western blot*.

### 2.3.5- Enriquiment de membrana plasmàtica

Per tal d'obtenir fraccions cel·lulars de les mostres enriquides en membrana plasmàtica es pot fer mitjançant una sèrie de centrifugacions. En aquesta tesi interessava enriquir la fracció de membrana plasmàtica per tal de comparar els nivells de metall proteasa MT1-MMP en cèl·lules transfectades amb diferents constructs.

Per a tal efecte, es transfecten dues plaques de 150 cm<sup>2</sup> per a cada condició i, després de 24h i del tractament experimental, es lisen amb buffer HES (20 mM HEPES, 1 mM EDTA i 250 mM sacarosa). Posteriorment es passa el lisat 10 cops per una xeringa s'insulina (1 ml, 22-gauge). Es fa una primera centrifugació a 16.000 rpm durant 15 minuts, a 4 °C, usant el rotor MLA-130. El pellet que se'n obté es resuspèn en 5 ml de tampó HES (amb inhibidors de proteases). A continuació es prepara un coixí de sacarosa (1,12 M) a sobre del qual es posen amb cura els 5 ml de mostra. El gradient es centrifuga durant 70 minuts a 24.000 rpm usant el rotor SW40.1Ti. D'aquesta centrifugació s'obté una interfase, on hi ha la membrana plasmàtica enriquida, i un *pellet* que conté nuclis, mitocondris i restes cel·lulars. Per tal de fer l'enriquiment d'aquesta fracció, fem una altra centrifugació. Aquest cop a 28.000 rpm durant 45 minuts a 4°C, amb el rotor MLA-130. Resuspenem el pellet amb 100 µl de tampó de mostra com a màxim per poder carregar-ho en un gel d'acrilamida.

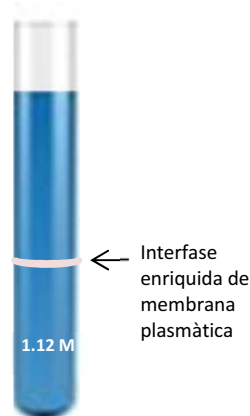


Figura 2. Esquema representatiu d'una gradient discontinu per a enriquir membrana plasmàtica.



## 2.4- TÈCNIQUES DE MICROSCÒPIA

### 2.4.1- Col.localització

Per a l'estudi de col·localització de dues o més proteïnes, és necessari que totes elles s'expressin en nivells semblants i s'han d'usar, en tots els casos, les mateixes condicions a l'hora de prendre imatges al microscopi. En aquesta tesi s'ha fet servir un microscopi confocal espectral (Leica TCS SP5) acoplat a una càmera DMI6000 (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Alemanya) per a l'anàlisi de col·localització. Un cop obtingudes les imatges, es va fer ús d'una macro del software Image J (National Institute of Health) que van posar a punt l'Anna Bosch i la Dra. Maria Calvo dels Serveis Científicotècnics de la UB. Aquesta macro genera una imatge binària dels píxels que col·localitzen, és a dir, genera imatges on els píxels tenen valors 0 o 1. Aquestes noves imatges obtingudes es multipliquen cadascuna pel canal verd o vermell, segons d'on provenguin. Això genera una màscara on només es mostren els píxels dels dos canals que col·localitzen. La macro només té en compte la fluorescència dels endosomes de com a màxim 3  $\mu\text{m}$ , i descarta completament la fluorescència de la membrana plasmàtica. Així doncs, ens permet obtenir la quantificació de les dues proteïnes, en aquest cas EGF-TRITC i KRas, en els endosomes (Fig. 3).

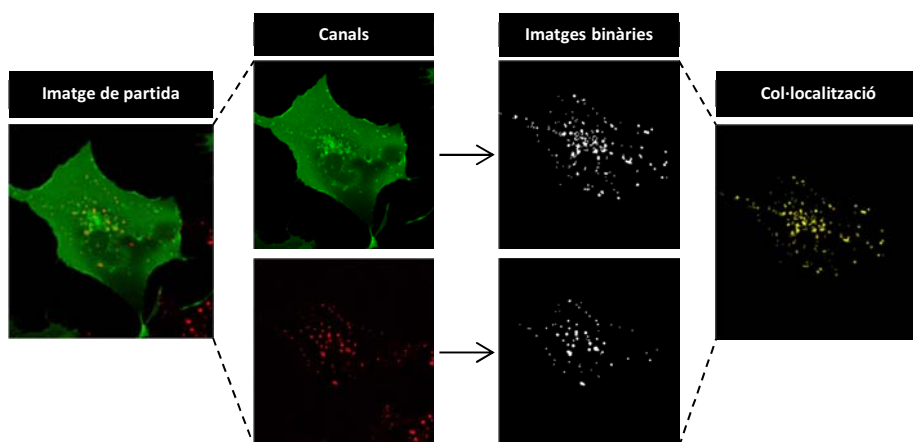


Figura 3. Esquema dels passos més importants que realitza la macro.

### 2.4.2- Immunocitoquímica

Aquesta és una tècnica que s'usa en cèl·lules fixades i que ens permet detectar, mitjançant anticossos, la localització subcel·lular de proteïnes. Per determinar les proteïnes d'interès s'usen anticossos específics i posteriorment un anticòs secundari conjugat amb algun fluoròfor que ens permet poder observar aquella proteïna mitjançant el microscopi de fluorescència. Per a dur a terme la immunofluorescència es segueixen els passos que es detallen a continuació:

- en primer lloc es fixen les cèl·lules amb 4 % de paraformaldehid durant 10 minuts.
- Seguidament es permeabilitzen, ja sigui amb 0,1 % Tritó X-100 en PBS durant 3 minuts o bé amb 0,1 % saponina en PBS durant 5 minuts.
- es renten tres cops amb PBS i seguidament es fa un bloqueig amb l'1 % de BSA en PBS durant 20 minuts en cas d'haver permeabilitzat amb tritó, o bé amb un 0,02 % saponina i 1 % BSA en PBS durant 5 minuts, en cas d'haver-ho fet amb saponina prèviament.
- Incubació de l'anticòs primari durant 1 hora a temperatura ambient. Els anticossos es preparen amb un 0,1% de BSA amb o sense saponina (0,02 %) en PBS, depenent si se n'ha usat anteriorment o no.
- després de tres rentats amb PBS, es fa la incubació amb l'anticòs secundari durant 30 minuts a temperatura ambient.
- seguidament els cubreobjectes es renten amb PBS i es fa un *rinse* amb H<sub>2</sub>O abans de muntar-los en mowiol.

### 2.4.3- Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)

Una de les tècniques més utilitzades per tal de determinar la dinàmica d'una proteïna, és la de FRAP. Aquesta tècnica es basa en determinar la recuperació de la fluorescència d'una proteïna fluorescent després del seu fotopapagat, permetent determinar el temps que triga una proteïna en bescanviar-se amb una altra per exemple en la membrana dels endosomes. La tècnica de FRAP dona una idea del recanvi que té aquesta proteïna. Per a aquest propòsit, es van transfectar cèl·lules COS-1 amb diverses proteïnes de fusió fluorescentes i es van fer créixer en cubreobjectes de 25 mm. Després de 24 hores, un cop comprovada la correcta expressió, es munten aquests cubreobjectes en una cambra Attofluor (Invitrogen). Els experiments de FRAP es van fer incubant les cèl·lules a 37 °C i 5% CO<sub>2</sub> i amb medi DMEM 0 % durant una hora i un tractament de 20-45 minuts amb EGF-TRITC o EGF-A647. Els vídeos obtinguts amb aquesta tècnica es van prendre amb el microscopi confocal de Leica TCS SP5 (Leica Microsystems Heidelberg GmbH) usant l'objectiu APO63x de glicerol (NA 1.3). Les imatges per GFP, Cherry o TRITC i Alexa-647 es van prendre usant les longituds d'ona d'emissió i excitació que es detallen en la següent taula:

Canal	Emissió (nm)	Excitació (nm)
<b>GFP</b>	488	500-550
<b>cherry o TRITC</b>	561	571-610
<b>Alexa-647</b>	633	633-700

**Taula 6. Longituds d'ona d'excitació i emissió utilitzades per a les proteïnes fluorescentes indicades.**

Per obtenir una gran rapidesa de detecció de la recuperació de la fluorescència de les proteïnes, es va haver de comprometre la resolució del vídeos. Per aquest motiu es va agafar un format de 256x56 nm de píxel de tamany 60 nm, el *pinhole* es va obrir fins a 1.5 AU. En tots els casos les imatges es van agafar en intervals de 86 ms usant Leica Fly Mode a 1400Hz durant 10-15 segons. El fotoapagat (*bleach*) es va fer de tot l'endosoma sencer per tal d'evitar la difusió lateral de proteïna en el mateix endosoma. Per realitzar l'anàlisi del FRAP, es van fotoapagar àrees en els endosomes (ROI, *region of interest*) de 0.28  $\mu\text{m}$  i només es van agafar endosomes d'entre 3 i 5  $\mu\text{m}^2$ . Finalment les imatges es van analitzar amb els programes LAS-AF Lite i Image J (WayneRasband,NIH).

Per a cadascun del temps, la intensitat de fluorescència de la ROI de l'última imatge abans del fotoapagat, va ser calculada en un full d'Excel (Microsoft, Redmond, WA, EEUU) de la següent manera:

$$I_{rel} = (T_0 * I_t) / (T_t * I_0)$$

on  $T_0$  és la mitjana d'intensitats a temps zero d'una àrea no fotoapagada de la cèl·lula,  $T_t$  és la mitjana d'intensitats a temps t d'una àrea no fotoapagada,  $I_0$  és la mitjana d'intensitats en la ROI a temps 0 i  $I_t$  és la mitjana d'intensitats en la ROI a temps t. La *Mobile Fraction* (MF) en la ROI es va determinar segons:

$$MF = (I_{end} - I_{post}) / (I_0 - I_{post})$$

on  $I_{end}$  és la mitjana d'intensitats en la ROI al final de l'experiment,  $I_{post}$  és la mitjana d'intensitats en la ROI després del fotoapagat i  $I_0$  és la mitjana d'intensitats en la ROI a temps 0. Les curves del FRAP es van determinar amb l'equació exponencial *1-phase* del programa Prism (GraphPad, San Diego, CA, EEUU) per tal d'obtenir el temps de recuperació de la meitat de la fluorescència ( $t_{1/2}$ ):

$$Ft = A(1 - \exp^{-\lambda * x}) + B$$

on A és la MF en la ROI, B és la fluorescència de la ROI després del fotoapagat, x és el temps i  $\lambda$  és l'índex de recuperació de la fluorescència a partir d'on es calcula el  $t_{1/2}$ . El *Half Time* (HT) es defineix com el temps per bescanviar la meitat de la MF entre les regions fotoapagades i les que no, i es calcula segons:

$$HT = \ln 2 / \lambda$$

Tots els experiments de FRAP que es comparen es van dur a terme el mateix dia.

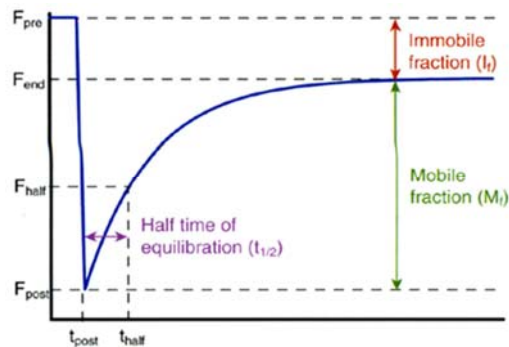


Figura 4. Esquema dels paràmetres analitzats en un experiment de FRAP.

#### 2.4.4- Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

La tècnica de FRET es basa en la transferència d'energia entre dos fluorocroms que estan en estat d'excitació. El fluorocrom que transmet l'energia es coneix com a donador, i aquell que rep aquesta energia és l'anomenat acceptor.

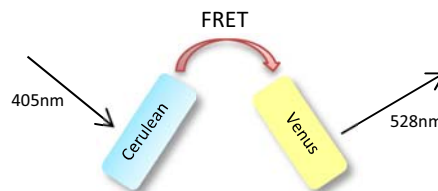


Figura 5. Esquema representatiu de com funciona la tècnica de FRET.

L'eficiència d'aquesta tècnica depèn principalment del grau de solapament entre els espectres d'emissió i absorció dels dos fluorocroms (acceptor i donador), és a dir, quant més es solapin els seus espectres d'emissió i absorció, millor eficiència s'obtindrà. Per tal d'augmentar l'eficiència de FRET en un experiment s'han de tenir en compte els següents punts:

- l'acceptor i el donador han d'estar entre 10 i 100 Å de distància entre ells.
- els espectres d'emissió i absorció s'han de solapar
- els dipols del donador i l'acceptor han d'estar orientats en paral·lel.

Per als experiments fets en aquesta tesi, es van transfectar cèl·lules COS-1 amb les proteïnes fluorescents venus i cerulean fusionades a les proteïnes d'interès. Les imatges s'han pres en un microscopi confocal Leica TCS SL (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany) equipat amb una càmera DMIRE invertida, un làser d'Argó i un objectiu de 63x d'oli d'immersió. Es va usar la tècnica de FRET-AB (FRET- *Acceptor Photobleaching*), on s'apaga la llum de l'acceptor i es mira si la llum emesa pel donador incrementa o resta igual. Les imatges es van adquirir de manera seqüencial línia per línia, usant els làsers 458 i 514 nm i usant els següents rangs de detecció per al cerulean i el venus respectivament: 465-510nm i 525-650nm, amb un *pinhole* de 1,5 *Airy units*. Les imatges es van adquirir en format 512 x 512, *line average* de 2, un zoom de 2 i un tamany de 230x230 nm de píxel. El fotoapagat de l'acceptor es va dur a terme amb el mateix sistema d'escanejat i de zoom en una àrea de ROI de 20x20 µm amb el làser 514, amb una *line average* de 2.

En aquestes condicions, un 80% de l'acceptor s'apaga. Les condicions de fotoapagat van ser les mateixes per a totes les imatges ( fotomultiplicadors, làsers, zoom, velocitats...). La comparació d'experiments de FRET entre diferents proteïnes recombinants es va fer sempre amb la mateixa proporció d'acceptor-donador (2:3). L'eficiència de FRET ( $FRET_{eff}$ ) es va calcular normalitzant la diferència d'intensitats entre el donador post ( $D_{post}$ ) i el *prebleach* ( $D_{pre}$ ) a l'àrea foto-apagada amb la fórmula següent:

$$FRET_{eff} = (D_{post} - D_{pre}) / D_{post}$$

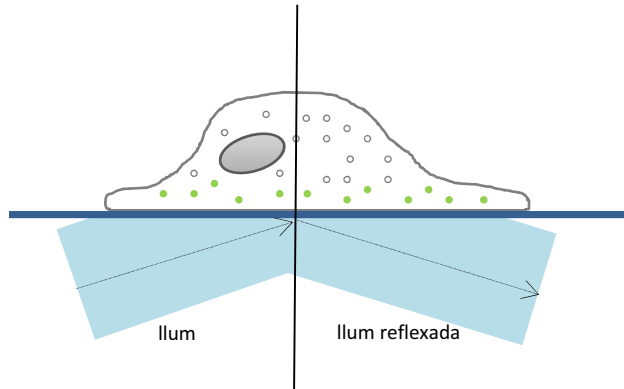
L'anàlisi d'imatges es va fer amb els programes Image J (Wayne Rasband, NIH) i Image Processing Leica Confocal.

#### **2.4.5- Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF)**

La tècnica de TIRF permet veure processos que es duen a terme a la membrana de les cèl·lules. El fet que la llum, a diferència d'un microscopi d'epifluorescència, incideixi a la mostra amb un determinat angle, fa que només aquells processos que tenen lloc al voltant de la membrana plasmàtica siguin visibles, eliminant així la fluorescència que pugui venir de l'interior de la cèl·lula (Fig.6). El microscopi usat va ser AM TIRF MC *based on* AF7000 DMI6000 B Microscope (Leica) amb una càmera acoblada Andor iXon DU-885. Els làsers utilitzats van ser 488, 561 i l'objectiu el HCX PL APO 63X/1.47 NA.

Aquesta tècnica es pot usar per a fer experiments *in vivo* o bé amb cèl·lules fixades. En ambdós casos les cèl·lules es van plantar en cubres de 25mm i es va procedir a la transfecció tal i com s'ha explicat anteriorment. Els vídeos es van prendre durant 30 minuts aproximadament i, per tal de no danyar tant les cèl·lules amb la

fluorescència, es prengueren imatges cada 20 segons. El gruix de la cèl·lula que es va detectar era de 150 nm. Els experiments duts a terme amb aquest microscopi van ser realitzats al laboratori del Dr. Giorgio Scita.



**Figura 6. Esquema de la tècnica de TIRF.** La llum incident ho fa en un angle determinat, la qual cosa permet veure processos que tene lloc només a la membrana plasmàtica (punts verds).

#### 2.4.6- Video microscòpia

Per a poder fer els experiments *in vivo* del moviment d'endosomes, hem fet servir un microscopi confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems Heidelberg GmbH) usant l'objectiu APO63X de glicerol (NA 1.3) acoplat a un sistema de regulació de temperatura a 37°C i de CO<sub>2</sub> (5%). Es fan créixer les cèl·lules, que expressen les proteïnes d'interès, en cubreobjectes de 25mm. Abans de procedir a fer l'experiment, es dejunen les cèl·lules durant una hora amb medi sense FBS. Un cop passat aquest temps, es fa el tractament corresponent. Les imatges es prenen de manera seqüencial per tal d'evitar l'excitació d'un fluoròfor amb un làser que no és el seu. El GFP, cherry i EGF647 es van excitar amb els següents làsers: 488, 561, 633, amb les finestres de detecció : 500-555nm, 571-625nm i 640-700nm respectivament.

En el cas dels experiments de *cell tracking* les cèl·lules es planten directament a la placa de 6 pous, on prèviament s'hi ha fet una capa de fibronectina perquè les cèl·lules pugin moure's millor, 8 hores abans de procedir a l'experiment. S'utilitza el mateix tipus de microscopi confocal però en aquest cas, s'usa l'objectiu de 20X i es prenen imatges durant 14 hores amb un interval de temps entre imatges de 7 minuts per tal d'evitar la fototoxicitat de les cèl·lules. També s'ha usat el microscopi d'*spinning disc*, que permet captar imatges a alta velocitat i, per tant, tenir resultats més acurats d'aquelles vesícules que es mouen a gran velocitat. Es va usar aquest microscopi per enregistrar el moviment dels endosomes en les diferents condicions experimentals. Els experiments de *spinning disc* es van dur a terme en un microscopi confocal Ultra VIEW

VoX spinning disc (Perkin Elmer) equipat amb un microscopi invertit EclipseTi (Nikon) i una càmera C9100-50 emCCD (Hamamatsu). El software usat en aquest cas va ser el Volocity (Improvision, Perkin Elmer). Aquest sistema està equipat amb una cambra OkoLab per mantenir la temperatura a 37°C i un 5% de CO<sub>2</sub> apropiats per a treballar amb cèl·lules vives. Les imatges van ser preses fent diferents Z-stacks de 1 µm de gruix i cada 7 segons durant 10 minuts amb un objectiu d'oli de 60x (Nikon Plan Apo VC, NA 1.4). El tamany de píxel va ser de 0.24x0.24 nm. Els experiments duts a terme amb aquest microscopi van ser realitzats al laboratori del Dr. Giorgio Scita.

#### 2.4.7- Degradació de la matriu extracel·lular

Una de les característiques de les cèl·lules que són invasives, és la capacitat que tenen de degradar la matriu extracel·lular. Per poder quantificar aquesta degradació es planten les cèl·lules en cubreobjectes els quals prèviament s'han tractat amb una gelatina conjugada a un fluoròfor, fent una capa (*coating*). En el nostre cas es va fer servir kit Alexa Fluor 594 protein Labeling Kit (A10239) de Molecular Probes, per conjuguar la gelatina al fluoròfor. Un cop conjugada la gelatina amb el fluoròfor, es fa un coating dels cubres de la manera següent:

- posar 20 µL de gelatina ja conjugada segons la casa comercial, i posar el cubre de 12mm de diàmetre a sobre. Es deixa durant 10 minuts com a màxim a temperatura ambient.
- retirar els cubres amb molt de compte i posar-los en glutaraldehid, de manera que els cobreixi.
- tapar la placa per protegir-la de la llum i posar-la 15 minuts a 4°C.
- fer 3 rentats amb PBS.
- posar borat sòdic fins que cobreixi els cubres i deixar-ho 15 minuts a temperatura ambient.
- fer tres rentats amb PBS i afegir el medi corresponent a les cèl·lules que s'utilitzin. Deixar-ho a 37°C com a mínim una hora.

D'aquesta manera quan les cèl·lules degraden aquesta gelatina, deixen un espai buit no fluorescent, permetent així la quantificació de la fluorescència de la gelatina degradada. Les cèl·lules es planten sobre el cubreobjectes, o sobre una placa (Ibidi) en cas de fer vídeo microscopia, 24 hores després de ser transfectades i es deixa que degradin la gelatina com a mínim 6 hores, depenent del tipus cel·lular.

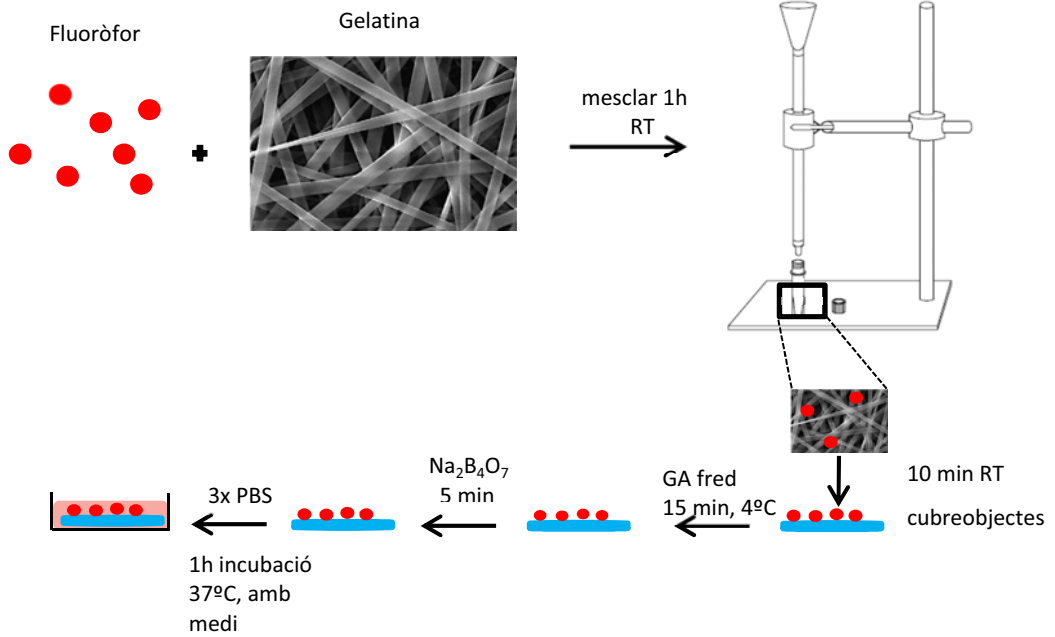


Figura 7. Preparació de cobreobjectes amb gelatina conjugada.

## 2.5- ANÀLISI ESTADÍSTIC

Tots els anàlisis han estat duts a terme mitjançant el programa GraphPad Prism 5.0. Si no es detalla el contrari, tots els anàlisis es van fer mitjançant una T de Student. Es mostren les mitjanes  $\pm$  SEM.





# ANTECEDENTS I OBJECTIUS



Les diferents isoformes de Ras s'associen a la membrana plasmàtica de manera específica que els assegura una localització concreta a cadascuna d'elles així com una dinàmica única. La mobilitat de les proteïnes Ras en la membrana plasmàtica és el resultat de la difusió lateral, del bescanvi amb el citosol i dels processos d'endocitosi i exocitosi.

En el cas de KRas s'han publicat resultats divergents pel que fa a la seva dinàmica en la membrana plasmàtica. S'ha descrit que la seva dissociació és el que contribueix majoritàriament en la seva dinàmica i que aquest recanvi es dona en un temps mig (*Half Time*, HT), molt curt de 1,5 segons (Yokoe and Meyer, 1996). Altres estudis demostren, en canvi, que la mobilitat de KRas en la membrana plasmàtica es dona només per difusió lateral i no pas per un bescanvi amb el citosol (Niv et al., 1999; Niv et al., 2002).

Diferents grups confirmen però, que certes modificacions post-traduccionals poden modular el bescanvi entre els *pools* de KRas de la membrana plasmàtica i del citosol en detriment de la difusió lateral (Bhagatji et al., 2010; Vartak and Bastiaens, 2010). Finalment, s'han descrit diverses proteïnes que, mitjançant la seva unió a KRas, estarien modulant la dinàmica d'aquesta com per exemple la subunitat  $\delta$  de la fosfodiesterasa 6 (PDE $\delta$ ), la *prenylated Rab protein acceptor protein 1* (PRA1), la calmodulina (CaM) o la galectina-3 (Bhagatji et al., 2010, Philips, 2012 #7033; Chandra et al., 2012; Fivaz and Meyer, 2005; Philips, 2012). Tot i que la dinàmica de KRas en la membrana plasmàtica ha estat àmpliament analitzada, no existeixen estudis del reclutament i dinàmica de KRas en els endosomes.

Lu *et al.* demostraven la presència de KRas al llarg de tota la via endocítica i com aquest manté la seva capacitat de senyalització en els endosomes, tant primerencs com tardans (Lu et al., 2009). De fet, en els darrers anys s'ha descrit els endosomes com a importants plataformes de senyalització per a diferents receptors i lligands.

No es coneix, però, la rellevància que té la presència i senyalització de KRas en els endosomes i el possible paper en la regulació de diferents processos cel·lulars, com la proliferació o la mobilitat cel·lular. El paper dels endosomes en el transport i reciclatge de la metall proteasa MT1-MMP cap a la membrana plasmàtica, la qual té una gran importància en la progressió de tumors, ha estat descrit per diversos grups. Aquesta proteïna és la col·lagenasa més ben caracteritzada de la seva família i el seu paper en la invasió cel·lular ha estat àmpliament estudiat (Bravo-Cordero et al., 2007; Steffen et al., 2008; Williams and Coppolino, 2011). Amb aquests antecedents i el propòsit d'estudiar la dinàmica de KRas en els endosomes així com les funcions que pot desenvolupar en aquests orgànuls es van definir els següents objectius per aquesta tesi:

1. Caracteritzar el reclutament de KRas als endosomes i el paper que desenvolupa el seu estat d'activació.
2. Analitzar la dinàmica de KRas en els endosomes primerencs i tardans.
3. Estudiar la funcionalitat de KRas en els endosomes primerencs, concretament en els processos de mobilitat d'aquests orgànuls i de la mobilitat cel·lular.

# **RESULTATS**

## **APARTAT I**

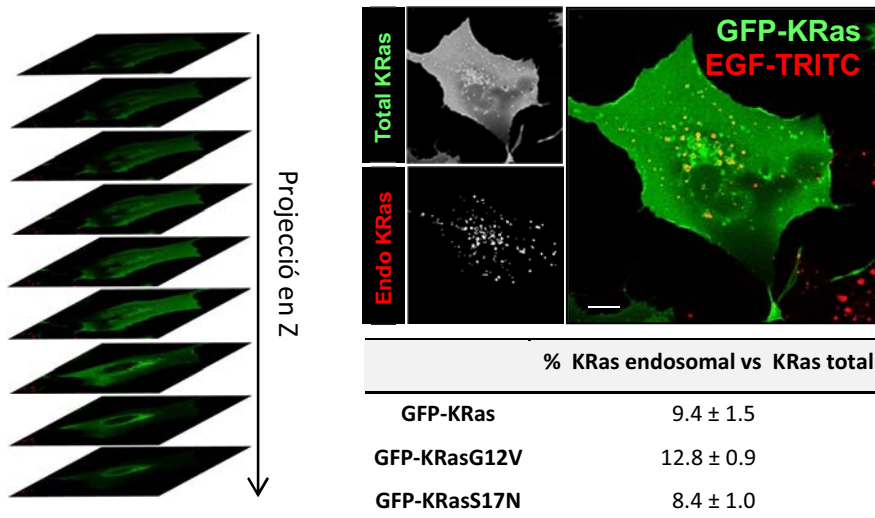


# 1- RECLUTAMENT DE KRAS ALS ENDOSOMES

## 1.1- DETECCIÓ DE KRAS EN ELS ENDOSOMES

El compartiment endocític pot representar una continuïtat funcional de la membrana plasmàtica permetent que continuï la senyalització generada en aquesta, també pot actuar com a plataforma de senyalització intracel·lular específica i a més a més pot regular la destinació de complexos de senyalització cap als lisosomes per a la seva degradació. S’ha determinat la presència de proteïnes GTPases als endosomes, les quals són importants per la senyalització intracel·lular. Entre aquestes proteïnes es troba KRas4B (d’ara en endavant anomenada **KRas**). Estudis previs a aquesta tesi, havien descrit que l’activació del receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR) provocava un augment del reclutament de KRas als endosomes, augmentant així la capacitat de senyalització del receptor (Lu et al., 2009).

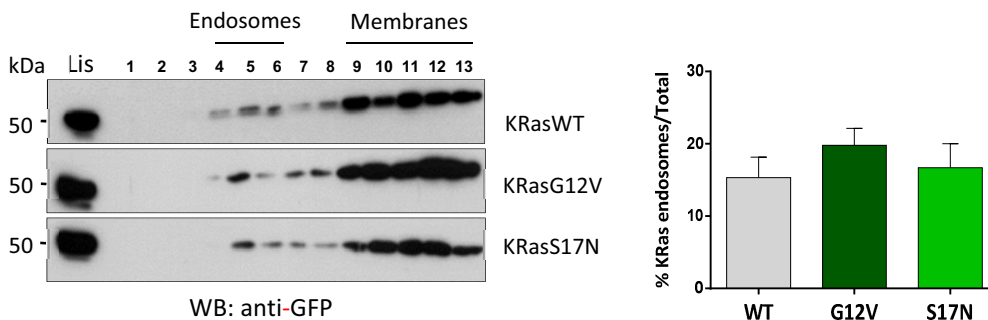
Un primer objectiu d’aquesta tesi va ser quantificar la proporció de KRas present als endosomes i analitzar si era modificada pel seu estat d’activació mitjançant tècniques bioquímiques i de microscòpia. Amb aquesta finalitat es va expressar la proteïna KRas *wild-type*, o els mutants constitutivament actiu i inactiu (KRasG12V i KRasS17N, respectivament) units a la proteïna fluorescent verda (GFP) en cèl·lules COS-1. Després d’una hora de dejú, les cèl·lules es van estimular amb EGF covalentment conjugat amb TRITC (EGF-TRITC) durant 20 minuts i la proporció de KRas present als endosomes (positius per EGF-TRITC) respecte del total es va determinar per microscòpia confocal utilitzant el programa d’anàlisi d’imatges *ImageJ* (Fig. 1).





**Figura 1. KRas és reclutat als endosomes independentment del seu estat d'activació.** Cèl·lules COS-1 van ser transfectades amb els diferents mutants de KRas indicats, dejunades durant una hora i tractades amb EGF-TRITC (200 ng/ml) durant 20 minuts. Després de fixar-les en cubres de 25 mm, es van prendre imatges al microscopi confocal en diferents plans en Z amb els canals verd i vermell de manera seqüencial. La col·localització entre les imatges dels dos canals es va dur a terme mitjançant el programa Image J, tal i com es mostra a la imatge representativa. La taula mostra la quantificació del percentatge del KRas endosomal respecte el KRas total de la cèl·lula. (n=15, mitjana ± SEM) (Barra = 10 µm).

La quantificació mostra que aproximadament un 10 % del total de KRas es troba en endosomes marcats amb EGF. Aquesta proporció no varia significativament entre els diferents mutants actiu i inactiu, indicant que l'estat d'activació de KRas no modifica el seu reclutament als endosomes (Fig. 1). Resultats similars es van obtenir en quantificar, per *western blot* i densitometria, el percentatge dels diferents mutants de KRas presents en els endosomes purificats mitjançant tècniques de fraccionament cel·lular per gradients de sucrosa (Fig. 2). A més, els percentatges de KRas obtinguts en els endosomes (~15-20 %) eren similars als nivells de KRas endogen determinats prèviament al laboratori (Lu et al., 2009). Per tant validen el fet d'estudiar KRas en aquests orgànuls a partir de les proteïnes recombinants fusionades amb GFP.



**Figura 2. Quantificació dels nivells de KRas als endosomes.** Detecció per western blot dels nivells dels diferents mutants indicats de KRas en les fraccions obtingudes mitjançant fraccionament cel·lular i gradient de sacarosa. El gràfic mostra el percentatge de KRas detectat a les fraccions endosomals respecte del total (n = 3, mitjana ± SEM).

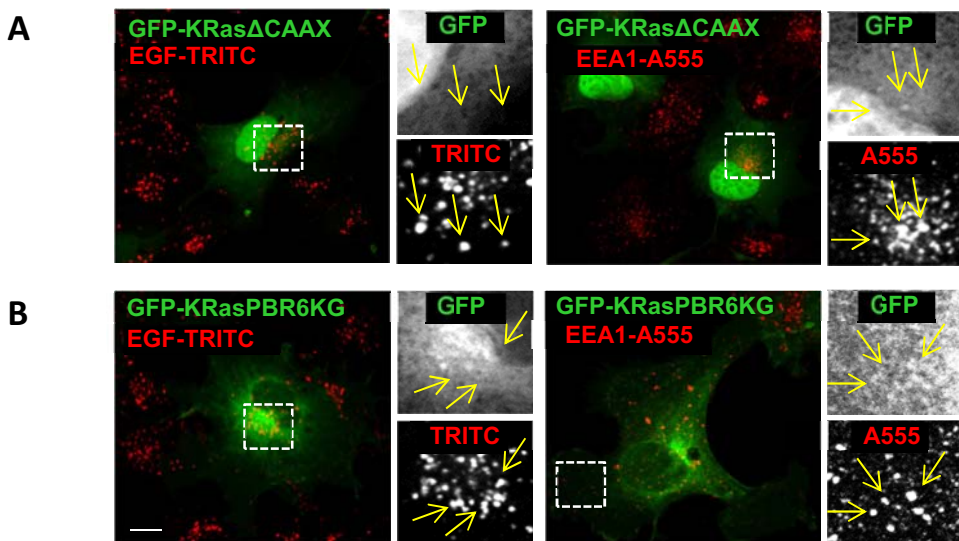
## 1.2- SENYALS DE KRAS IMPLICADES EN LA SEVA LOCALITZACIÓ EN ELS ENDOSOMES

Un estudi genòmic dut a terme pel grup del Dr. Tobias Meyer, va revelar que 48 GTPases eren presents a la membrana plasmàtica i que la majoria d'aquestes contenia

una cua polibàsica al seu extrem C-terminal. En el cas de KRas van descriure que aquesta regió polibàsica de sis lisines (PBR) era necessària per portar la proteïna a la membrana (Heo et al., 2006). En la mateixa línia, al grup del Dr. Ian Prior definien aquesta cua polibàsica com a imprescindible per tal que les proteïnes Ras poguessin senyalitzar de manera correcte (Laude and Prior, 2008).

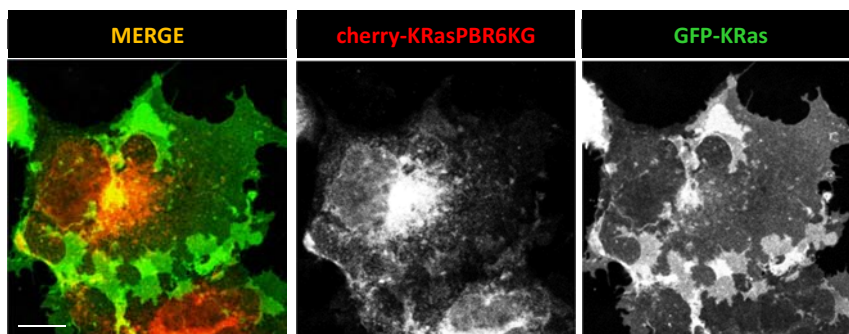
Per tal de determinar la implicació de la cua C-terminal en el reclutament de KRas als endosomes, es van transfectar cèl·lules COS-1 amb mutants de la proteïna KRas que, o bé no contenen la seqüència CAAX (GFP-KRas $\Delta$ CAAX) i per tant no podien farnesilar-se, o bé tenien la regió polibàsica mutada amb aminoàcids neutres (GFP-KRasPBR6KG).

El resultat va ser una deslocalització de KRas en ambdós casos, ja que cap dels mutants col·localitza amb EEA-1 (*Early Endosome Antigen 1*) ni amb l'EGF-TRITC dels endosomes primerencs (Fig. 3). Mentre que el mutant GFP-KRas $\Delta$ CAAX mostra una localització majoritàriament nuclear (Fig. 3A), el mutant GFP-KRasPBR6KG es troba principalment en el citosol i també presenta una intensa localització perinuclear (Fig.3B).



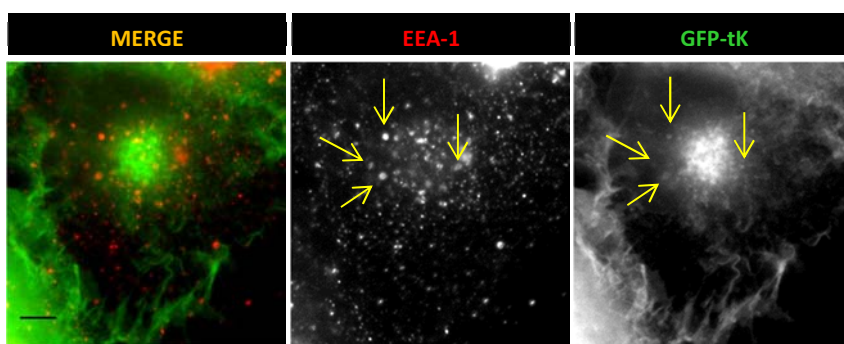
**Figura 3. La farnesilació i la regió PBR de KRas són necessaris per conduir-lo cap als endosomes. (A, B)** Anàlisi de la localització de GFP-KRas $\Delta$ CAAX (A) o GFP-KRasPBR6KG (B) en cèl·lules COS-1 dejunades durant 1 hora i tractades amb EGF-TIRTC (200 ng/ml). Col·localització intracel·lular d'ambdós mutants amb l'EGF-TRITC i l'EEA-1 detectat per immunofluorescència. Es mostren imatges amplificades de les àrees senyalades amb un requadre puntejat (Barra = 10  $\mu$ m).

A més, la coexpressió de GFP-KRaswt i el mutant cherry-KRasPBR6KG en cèl·lules estimulades amb EGF mostra com les dues proteïnes presenten una localització molt diferent. A diferència del KRas wt, el mutant KRasPBR6KG presenta una localització perinuclear molt important i no es troba a la membrana plasmàtica (Fig. 4).



**Figura 4. La regió polibàsica de KRas és important per a la seva correcte localització.** Cèl·lules COS-1 van ser transfectades amb GFP-KRaswt i cherry-KRasPBR6KG i tractades amb EGF (100 ng/ml) durant 20 minuts abans de ser fixades. (Barra = 10 µm)

La importància de la regió hipervariable, la qual conté tant el grup farnesil com la regió PBR, en la correcta localització de KRas es va confirmar en expressar el mutant GFP-tK descrit pel grup del Dr.Hancock. Aquest mutant només conté els últims 17 aminoàcids de l'extrem C-terminal de KRas (Apolloni et al., 2000). En la Figura 5 s'observa que el GFP-tK és reclutat de manera efectiva en els endosomes primerencs, ja que col·localitza amb l'EEA-1.



**Figura 5. La regió hipervariable és suficient pel reclutament de KRas als endosomes.** Col·localització per immunofluorescència del GFP-tK amb els endosomes primerencs (EEA-1) en cèl·lules COS-1 (Barra = 5 µm).

Aquests resultats estan en consonància amb els articles anteriorment comentats i posa de manifest la importància i la necessitat de totes dues senyals, la regió PBR i el farnesil, per tal que KRas pugui reclutar-se a la membrana d'aquests orgànuls.



# **RESULTATS**

## **APARTAT II**



## 2- ESTUDI DE LA DINÀMICA D'ASSOCIACIÓ-DISSOCIACIÓ DE KRAS EN ELS ENDOSOMES

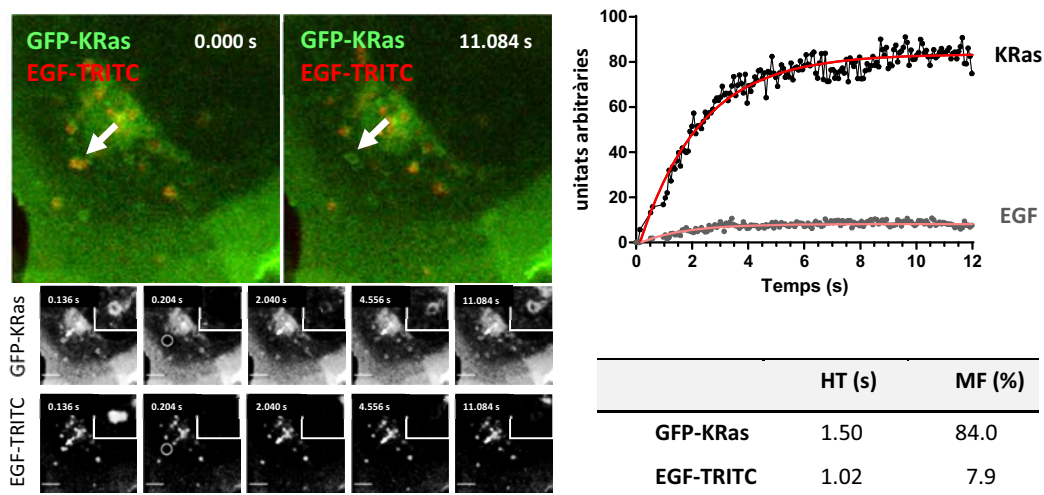
### 2.1- DINÀMICA DE KRAS EN LA MEMBRANA DELS ENDOSOMES

Els resultats anteriors corroboren la presència de KRas en el compartiment endocític i la importància i necessitat tant de la cua polibàsica com del grup farnesil per a la correcta localització de KRas en aquests orgànuls. Seguidament es va determinar l'origen i la dinàmica del KRas en aquest compartiment. La contribució del transport vesicular respecte el transport directe des del citosol en la incorporació del KRas en els endosomes no estava fins ara caracteritzada. És probable que KRas pugui arribar al compartiment endocític a través d'endocitosi depenent de clatrina mitjançant transport vesicular des de la membrana plasmàtica (Lu et al., 2009). Però també és factible que, gràcies a la regió hipervariable de l'extrem C-terminal de KRas, aquest pugui ser reclutat de manera directa a la membrana dels endosomes des del citosol, mitjançant el seu grup farnesil i la interacció directa de la regió polibàsica (PBR) amb els fosfolípids negatius de la membrana endosomal.

Per tal de determinar l'origen i la dinàmica del KRas que es troba en els endosomes es va posar a punt una tècnica, microscòpia de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*), que permetia analitzar amb detall la dinàmica de proteïnes en la membrana dels endosomes. Aquesta tècnica, explicada en detall a la secció de Materials i Mètodes, permet apagar de manera irreversible la fluorescència de les proteïnes fluorescents expressades que es troben a tot l'endosoma i determinar-ne la recuperació durant un temps concret. L'anàlisi posterior de les dades obtingudes mitjançant microscòpia de FRAP permet conèixer la fracció de proteïnes mòbils (MF, *mobile fraction*) i el temps mig de recuperació d'aquesta fracció (HT, *half time*) en els endosomes. La tècnica de FRAP pot permetre distingir el percentatge de molècules que arriben, per difusió des del citosol o per transport vesicular, als endosomes.

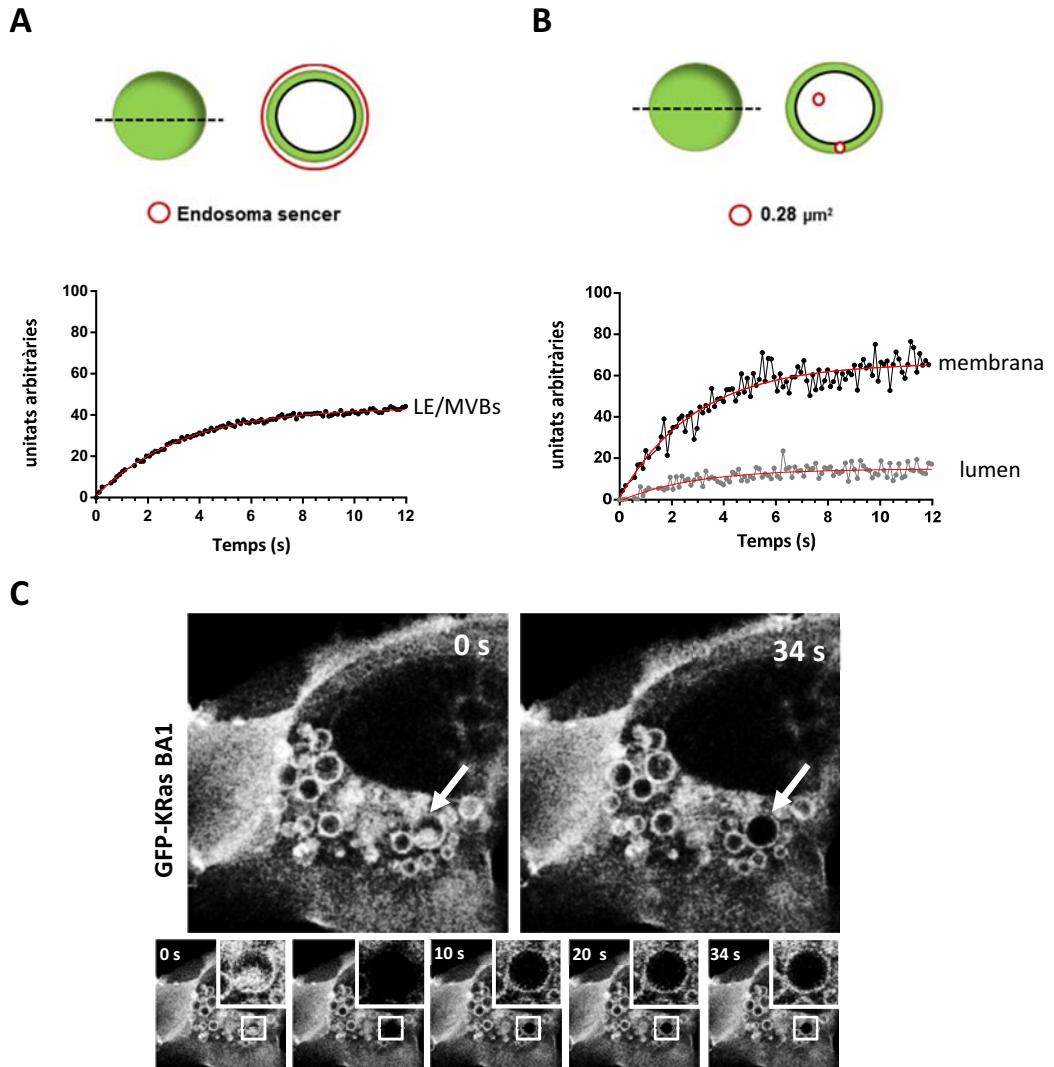
La figura 6 mostra la recuperació del GFP-KRas en la membrana d'endosomes que contenen EGF-TRITC després de 20 minuts d'estimulació amb EGF (endosomes primerencs, EE). És important senyalar la ràpida recuperació de KRas en aquestes membranes, arribant a bescanviar-se el 84 % de molècules en menys de 10 segons. Aquest resultat contrasta amb la gairebé inexistència de recuperació de l'EGF-TRITC.





**Figura 6. KRas té una recuperació ràpida i gairebé total en els endosomes primerencs.** Cèl·lules COS-1 van ser transfectades amb GFP-KRas i tractades amb EGF-TRITC durant 10-20 minuts. Es va fer l'experiment de FRAP tal i com es detalla en l'apartat de Materials i Mètodes en l'endosoma que contenia EGF-TRITC (fletxa). Es mostren imatges confocals d'abans i després del FRAP. Els inserts mostren imatges representatives obtingudes en diferents temps de l'experiment. La taula mostra els paràmetres, HT i MF, obtinguts en aquest FRAP.

Abans de realitzar un anàlisi exhaustiu mitjançant FRAP de diferents mutants, i en diferents condicions experimentals, es va posar a punt aquesta tècnica aprofitant la localització de KRas als endosomes tardans després del tractament amb bafilomicina A1 (BA1) (Lu et al., 2009). La BA1, al inhibir la bomba vacuolar de protons  $H^+$ -ATPasa i la conseqüent degradació proteica als lisosomes (van Weert et al 1995 JCB; Recchi and Chavrier 2006 Nat Cell Biol), indueix endosomes tardans engrandits i menys mòbils. Per tant, facilita i simplifica la posada a punt del FRAP en els endosomes. A la figura 7 es pot observar que el FRAP del GFP-KRas, en els endosomes després del tractament amb BA1, desemmascara dos *pools* de KRas amb dinàmiques diferents, un unit a la membrana i un altre al lumen de l'endosoma. L'anàlisi de FRAP de tot l'endosoma (HT~ 3.3 s, MF ~ 48.1 %, Fig. 7A) correspon a la recuperació de fluorescència d'aquests diferents *pools* determinats al quantificar ROIs (Region of Interest,  $0.28 \mu m^2$ ) col·locats a la membrana (HT~ 2.6 s, MF~ 66 %) o al lumen (HT~ 2.6 s, MF~ 16 %) de l'endosoma (Fig. 7B). Els resultats mostren que la fluorescència del lumen no es recupera en absolut en el temps de l'experiment i per tant infravalora la ràpida recuperació que es dona a la membrana. Per aquest motiu, les successives quantificacions de FRAP es realitzaren de ROIs ( $0.28 \mu m^2$ ) situades a la membrana d'endosomes que havien estat foto-apagats en la seva totalitat en cèl·lules no tractades amb Bafilomicina A1.

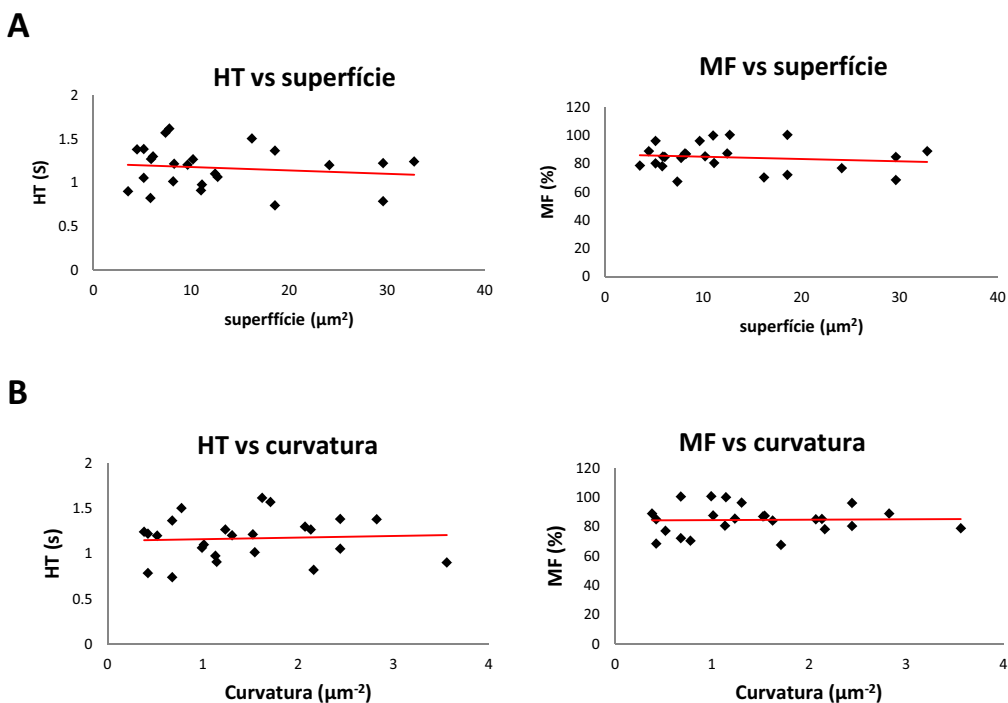


**Figura 7. Diferències del FRAP de GFP-KRas en el lumen i en la membrana dels endosomes.** Cèl·lules COS-1 van ser transfectades amb GFP-KRas i tractades amb BA1 durant 16 hores. Després d'una hora de dejú, van ser tractades 30 minuts amb EGF-TRITC (200 ng/ml). **(A)** Recuperació de GFP-KRas analitzant l'àrea de l'endosoma sencer. **(B)** Anàlisi de FRAP de ROIs ( $0.28 \mu\text{m}^2$ ) situats a la membrana o al lumen de l'endosoma. **(C)** Imatges representatives dels experiment de FRAP realitzat a (A,B). La fletxa indica l'endosoma que s'ha foto-apagat, els requadres mostren la recuperació de fluorescència en els temps indicats d'aquest endosoma.

En la realització d'aquests experiments de FRAP amb BA1 s'observen diferències en la dinàmica de KRas respecte dels endosomes analitzats en la figura 6, que no estaven tractats amb BA1. Aquests resultats s'anitzaran amb més detall a l'apartat 2.6. Una diferència notable entre endosomes és la seva mida. En aquest sentit, i tenint en compte que la població d'endosomes entre cèl·lules i en una mateixa

cèl·lula és molt variable, es va analitzar si paràmetres com la mida de l'endosoma i/o la seva curvatura de membrana podien influir en la dinàmica de KRas.

Per tal de determinar si la mida dels endosomes podria influenciar en el temps de recuperació de la proteïna, es va fer una relació entre el HT o la MF de KRas i la superfície de diferents endosomes (Fig. 8A). Com s'observa al gràfic, en el rang dels endosomes analitzats, no hi ha dependència entre aquests paràmetres. A més de la mida de l'endosoma, s'ha de tenir en compte que la curvatura de la membrana d'aquest orgànul podria estar influenciant en la dinàmica de la proteïna estudiada. Per avaluar l'impacte d'aquest paràmetre en el cas de KRas, es va representar la HT o la MF de diferents endosomes i les diferents curvatures Gaussians que aquests tenien (Fig. 8B). La curvatura es va determinar segons la inversa del quadrat del radi d'un endosoma. Sembla ser que, les diferents curvatures que els endosomes poden tenir degut a la seva mida no influeixen en la MF i HT de KRas.



**Figura 8.** La HT i la MF de KRas en els endosomes és independent de la superfície i la curvatura d'aquests. Gràfics representatius de diversos experiments de FRAP on es mostra el HT i MF respecte la superfície (A) o la curvatura Gaussiana (B) dels endosomes analitzats.

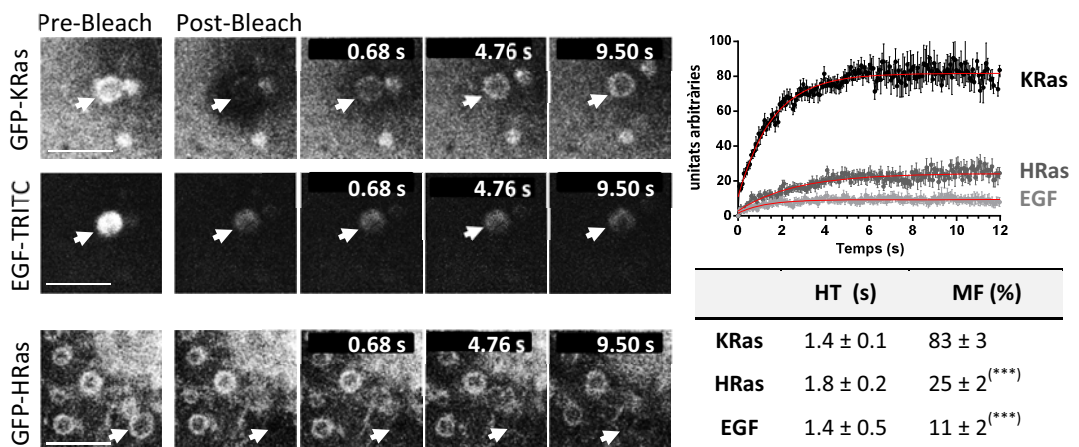
És important remarcar que en apagar la fluorescència de l'endosoma sencer s'evita la recuperació de fluorescència que podria venir de la difusió lateral de les proteïnes en el mateix pla de la membrana endosomal, tal com pot passar en els FRAPs

realitzats en la membrana plasmàtica. Així doncs, la recuperació de fluorescència a l'endosoma només pot venir donada gràcies a transport vesicular o per recanvi amb el *pool* de KRas citosòlic.

## 2.2- DIFUSIÓ O TRANSPORT VESICULAR?

La ràpida i gairebé total recuperació de KRas en els endosomes observada en els experiments de l'apartat 2.1, apuntava a la hipòtesi que KRas estigués incorporant-se a la membrana d'aquests orgànuls directament des del citosol enlloc de fer-ho per transport vesicular. Per excloure aquesta última possibilitat es van comparar les dinàmiques d'associació-dissociació de GFP-KRas amb les d'EGF-TRITC i GFP-HRas mitjançant experiments de FRAP en endosomes primerencs. L'EGF permet determinar la dinàmica del seu receptor transmembrana i l'HRas és una GTPasa coneguda per establir-se en la membrana plasmàtica mitjançant els dos grups palmitoils, a més del grup farnesil, per tant és probable que només arribi als endosomes mitjançant transport vesicular.

La figura 9 mostra els resultats de FRAP de les diferents proteïnes en endosomes marcats amb EGF-TRITC després de 20 minuts d'estimulació i per tant en endosomes primerencs (EE). Mentre que tant l'EGF com l'HRas tenen una recuperació gairebé inexistente, el HT de KRas és molt ràpid (HT ~ 1.4 s) i la seva fracció mòbil és gairebé total (MF ~ 84 %). És a dir, que el 84 % de les molècules de GFP-KRas que hi havia a la membrana de l'endosoma han estat reemplaçades en aproximadament 3 segons. Aquest resultat és perfectament compatible amb la idea que la majoria de les molècules de KRas que arriben al compartiment endocític poden fer-ho directament des del citosol, a través d'un *switch* electrostàtic, on es veuria implicada molt probablement la regió polibàsica (PBR).

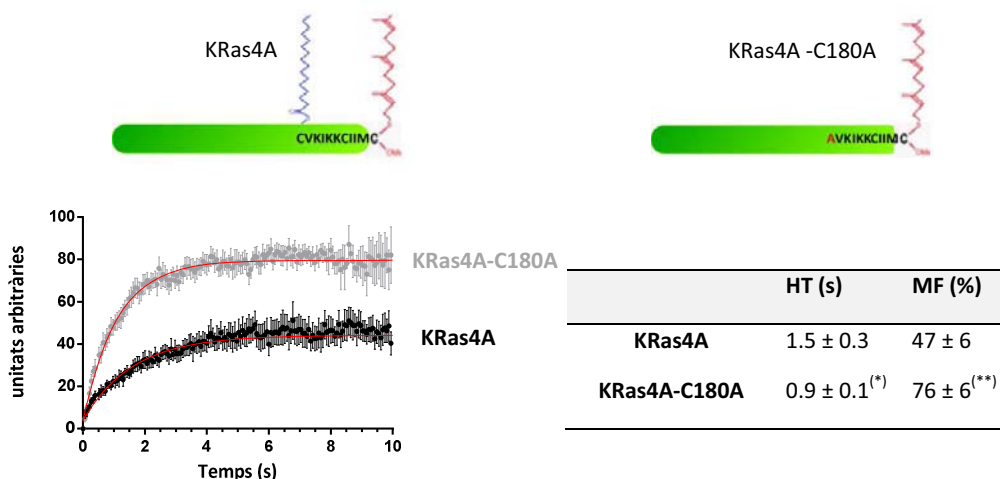


**Figura 9. Comparació dels FRAPs d'HRas i EGF amb el de KRas en EE.** Cèl·lules COS-1 van ser transfectades amb GFP-HRas o GFP-KRas, i van ser tractades amb EGF-TRITC (200 ng/μl) durant 20 minuts després d'una hora de dejú. Les imatges són una mostra representativa de la recuperació de les dues GTPases així com de l'EGF. La taula mostra els valors de recuperació d'HRas, KRas i EGF (n = 15 endosomes, mitjanes ± SEM, Barres = 2 μm) (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

A diferència del KRas, la majoria d'HRas s'incorporaria als endosomes mitjançant el transport vesicular, ja que gràcies als seus dos grups palmitoils l'associació a la membrana d'aquests orgànuls és més estable, tal com s'ha comentat anteriorment.

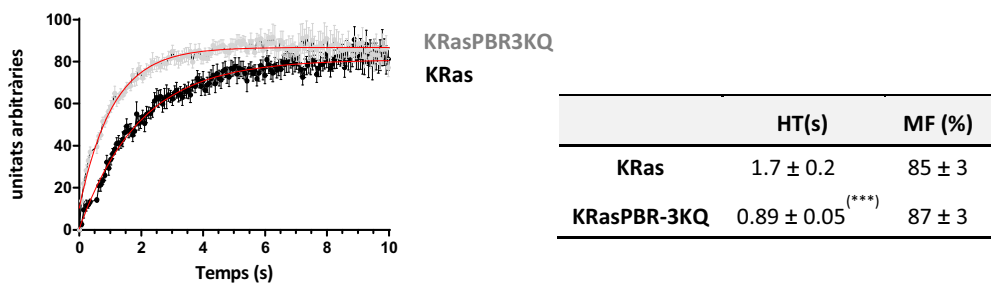
En aquest sentit també es va analitzar la cinètica del KRas4A i el mutant no palmitoïlable KRas4A-C180A. Els estudis de Laude *et al.* caracteritzen la regió hipervariable de KRas4A com la regió estabilitzadora de la proteïna a la membrana, però que aquesta és insuficient sinó s'acompanya d'almenys una palmitoïlació (Laude and Prior, 2008). Aquests resultats van donar peu a plantejar-se la hipòtesi que el KRas4A, degut a la seva palmitoïlació i farnesilació, pogués ancorar-se de manera més estable a la membrana que no pas KRas, el qual només pot farnesilar-se. Així doncs, es va analitzar la recuperació del KRas4A en els endosomes primerencs. La recuperació de KRas4A va ser bastant menor que no pas la de KRas (HT~ 1.5 s, MF~ 47 %), segurament per una major interacció de la regió hipervariable del KRas4A, degut al grup palmitoil, amb la membrana endosomal (Fig. 10). Seguint aquesta idea, el mutant no-palmitoïlable de KRas4A (GFP-KRas4A-C180A), el qual s'uneix a les membranes gràcies al seu grup farnesil i a una regió polibàsica menor a la de KRas4B amb només 3 càrregues positives, hauria de tenir una recuperació major i més ràpida a la membrana dels endosomes que no pas el KRas4A. En efecte, com s'observa a la figura 10, el mutant no palmitoïlable és molt mòbil (MF ~ 76 %) i ràpid (HT ~ 0.9 s).

**A**



**Figura 10. La palmitoilació del KRas4A estabilitza l'associació a la membrana dels endosomes.** (A) Anàlisi del FRAP dels GFP-KRas4A i GFP-KRas4A-C180A en endosomes de cèl·lules COS-1 dejunades durant una hora i tractades amb EGF-TRITC (200 ng/ml, 20 minuts).

De fet, quan es redueixen les càrregues positives de la PBR de KRas a només tres lisines (GFP-KRasPBR3KQ), que són les càrregues mínimes que ha de tenir KRas per interaccionar amb la membrana (Roy et al., 2002), la cinètica d'aquest nou mutant és molt més ràpida que la forma wild type, i similar al mutant GFP-KRas4A-C180A (Fig. 11). Cal remarcar però, que la MF de les dues proteïnes recombinants GFP-KRasPBR3KQ i GFP-KRaswt, no varia, la qual cosa vol dir que el percentatge de recuperació de les dues proteïnes és el mateix, però que la forma mutada pot fer-ho de manera més ràpida (Fig. 11). Aquest resultat reforça la importància que tenen les sis càrregues positives de KRas en la dinàmica d'associació a la membrana dels endosomes.



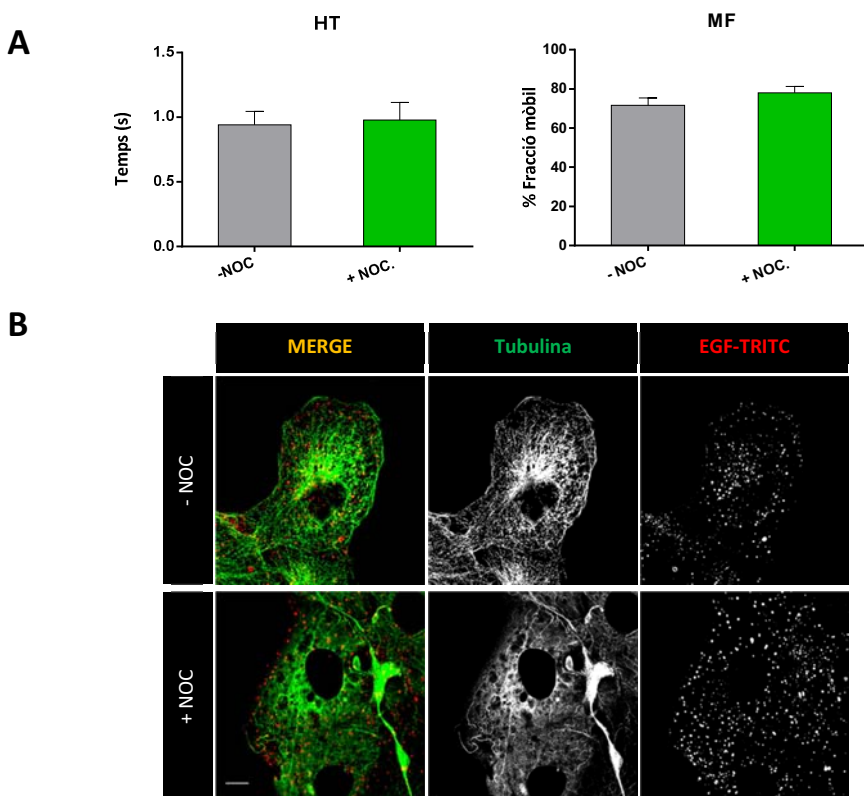
**Figura 11. La càrrega neta de la regió PBR de KRas és important per la dinàmica d'aquest en els endosomes.** Cèl·lules COS-1 van ser transfectades amb GFP-KRas i GFP-KRasPBR-3KQ i dejunades 1 hora després de 24 hores de transfecció. L'experiment de FRAP es va realitzar durant 10-20 minuts d'estimulació amb EGF-647. La taula mostra els resultats de l'anàlisi del FRAP (n = 10 endosomes, mitjanes ± SEM) (\*\*\*) (p < 0.001).

Els resultats obtinguts amb el mutant KRas4A, conjuntament amb els obtinguts per l'HRas, estan d'acord amb els cicles de palmitoilació/depalmitoilació de les diferents isoformes de Ras (HRas, NRas i KRas4A). La palmitoilació incrementa l'afinitat de les proteïnes Ras per les membranes i afavoreix el transport vesicular, en canvi, quan es depalmitoilien per tioesterases, perden afinitat per aquestes i es permet la reorganització a totes les membranes cel·lulars (Rocks et al., 2005) (Vartak and Bastiaens, 2010).

La implicació dels microtúbuls en el transport vesicular ha estat àmpliament demostrada (Loubery et al., 2008; Nielsen et al., 1999) i també s'ha descrit la interacció de KRas amb els microtúbuls (Chen et al., 2000). Per tal de descartar el transport

vesicular de KRas als endosomes mitjançat per microtúbuls, i/o la possibilitat que el KRas utilitzi la unió als microtúbuls per arribar en aquests orgànuls des del citosol, es van tractar les cèl·lules amb l'agent despolimeritzador de microtúbuls nocodazol durant 30 minuts i es van realitzar els experiments de FRAP (Fig. 12A). L'efecte del nocodazol en la despolimerització dels microtúbuls es va comprovar mitjançant immunofluorescència, utilitzant l'anticòs ant-tubulina i pel canvi de distribució subcel·lular de les vesícules endocítiques positives per EGF-TRITC (Fig. 12B).

No es van trobar diferències entre la recuperació de GFP-KRas de les cèl·lules tractades amb nocodazol i les cèl·lules control (HT =  $0.9 \pm 0.2$ , MF =  $78 \pm 4$  % i HT =  $0.9 \pm 0.1$ , MF =  $72 \pm 3$  %, respectivament). Els resultats suggereixen que els microtúbuls no estan implicats en el tràfic de KRas cap als endosomes descartant el transport vesicular com a principal vehicle de KRas cap als endosomes. Els resultats mostrats donen força al fet que KRas arribi a la membrana dels endosomes a través d'una difusió directa des del citosol i de manera independent dels microtúbuls.



**Figura 12. Els microtúbuls no estan implicats en la dinàmica de KRas als endosomes. (A)** Cèl·lules COS-1 transfectades amb GFP-KRas van ser tractades o no amb nocodazol ( $30 \mu\text{M}$ ) durant 30 minuts previ dejú d'una hora. Els gràfics mostren els resultats de FRAP realitzats segons el que es detalla a la secció de Materials i Mètodes ( $n = 16$  endosomes, mitjanes  $\pm$  SEM).

(B) Cèl·lules COS-1 tractades amb nocodazol durant 30 minuts (30 µM) i amb EGF-TRITC (200 ng/ml) 20 minuts abans de ser fixades.

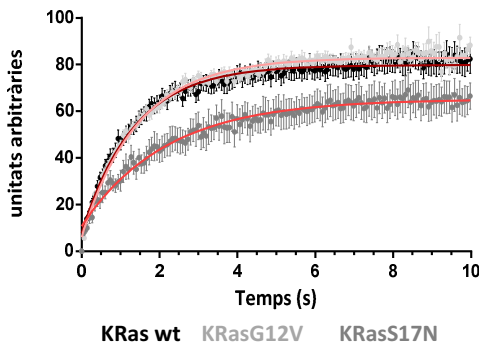
## 2.3- ANÀLISI DE LA INFLUÈNCIA DEL DOMINI GLOBULAR EN LA DINÀMICA DE KRAS

### 2.3.1- Efecte de l'estat d'activació de KRas

Amb el propòsit d'analitzar el comportament del KRas actiu i inactiu en els endosomes, es van expressar els mutants GFP-KRas, GFP-KRasG12V i GFP-KRasS17N (*wild type*, actiu i inactiu, respectivament) en cèl·lules COS-1 i es va procedir a fer experiments de FRAP després d'un tractament de 20 minuts amb EGF-TRITC.

Com a resultat d'aquests experiments s'observa que quan KRas es troba en la seva forma inactiva (S17N) és molt més resident a la membrana dels endosomes, és a dir que té una mobilitat menor. La seva HT més elevada i la MF menor respecte a la forma activa de KRas (G12V) indica que l'estat d'activació de KRas influeix en l'associació de la GTPasa a les membranes d'aquests orgànuls (Fig. 13).

A més de les diferències entre les formes activa i inactiva de KRas, un altre resultat a tenir en compte és que la forma *wild type* de KRas, té un comportament similar a la forma activa KRasG12V. Això podria indicar que la major part del KRas que es troba als endosomes primerencs està actiu.



	HT (s)	MF (%)
KRas wt	1.4 ± 0.1	82 ± 5
KRasG12V	1.1 ± 0.1	80 ± 3
KRasS17N	2.2 ± 0.2 (***)	64 ± 5 (**)

**Figura 13. L'estat d'activació de KRas determina la seva dinàmica en la membrana dels endosomes.** Experiment representatiu de FRAP d'endosomes per als diferents mutants actiu i inactiu de KRas en cèl·lules COS-1. La taula recull la quantificació de la recuperació d'aquestes proteïnes (n= 10-15 endosomes, mitjanes ± SEM) (\*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001).

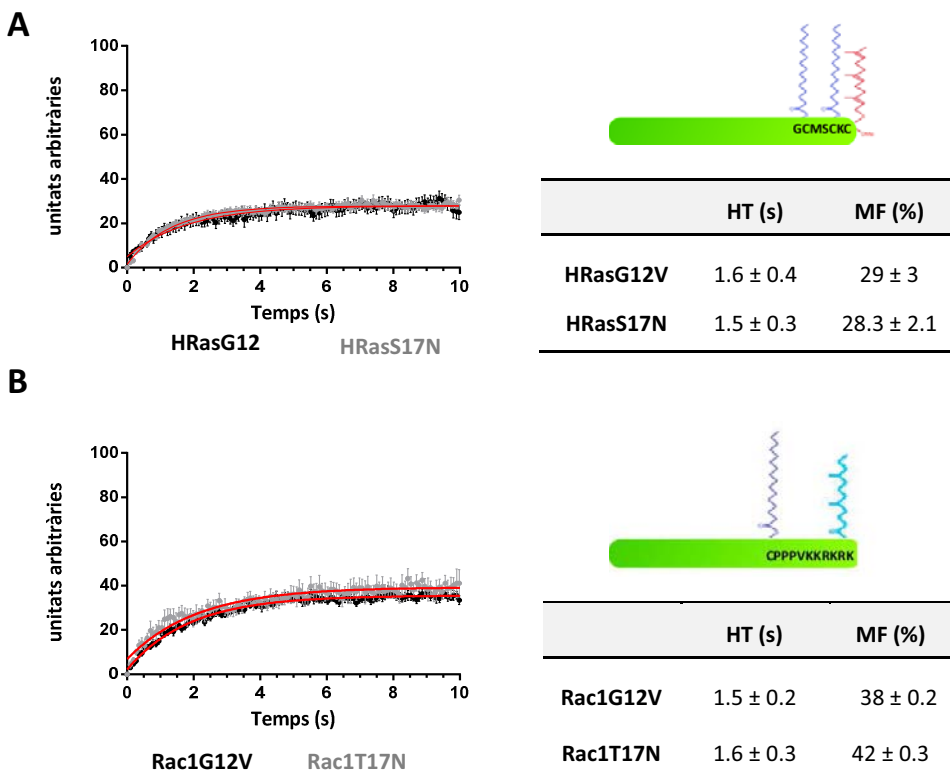
Cal destacar que les diferències entre els mutants actiu i inactiu són específiques del KRas localitzat en endosomes, ja que no es van observar en FRAPs realitzats en la membrana plasmàtica (dades no mostrades). Potser el motiu de no



veure diferències en la membrana plasmàtica és perquè la dinàmica d'intercanvi entre el KRas unit a la membrana i el *pool* citosòlic és poc important o queda emmascarada per la ràpida difusió lateral d'ambdós mutants en aquesta membrana.

### 2.3.2- Comparació amb altres GTPases

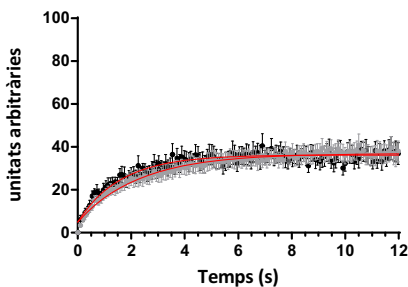
Amb l'interès de comprovar si altres GTPases es comportaven igual que KRas o si les diferències en la mobilitat dels estats actiu i inactiu eren exclusives d'aquesta proteïna, es van dur a terme experiments de FRAP transfectant cèl·lules COS-1 amb els diferents mutants actiu i inactiu d'altres GTPases (Fig. 14). L'estudi de la dinàmica dels diferents mutants d'HRas (GFP-HRasG12V i GFP-HRasS17N) demostraren que les dues formes eren igual d'immòbils, sense diferències entre elles (Fig. 14A). Aquest fet concordaria amb que, mentre que la unió de GTP promou la difusió lateral d'HRas, des dels lípids *raft* cap als *non-raft*, la seva influència en la dissociació de la membrana plasmàtica és mínima (Gorfe et al., 2007). Posteriorment es va estudiar la dinàmica de l'associació-dissociació d'una altra GTPasa, Rac1, proteïna que presenta una cua polibàsica a la seva regió C-terminal similar a KRas. En aquest cas tampoc es van trobar diferències significatives entre els mutants actiu i inactiu (GFP-Rac1G12V i GFP-Rac1T17N, respectivament) (Fig. 14B). A més a més, tal i com es pot veure en el gràfic, la seva recuperació comparada amb la de KRas és molt baixa i similar al KRas4A.



**Figura 14. Anàlisi de les dinàmiques dels mutants actiu i inactiu d'HRas i Rac1. (A, B)** Experiments representatius de FRAP per a les diferents GTPases. Es van transfectar cèl·lules COS-1 amb els mutants actiu i inactiu d'HRas (GFP-HRasG12V i GFP-HRasS17N) (A) i de Rac1 (GFP-RacG12V i GFP-Rac1T17N) (B). Els experiments es van dur a terme amb cèl·lules dejunades durant una hora i posteriorment tractades amb EGF-TRITC durant 10-20 minuts. (n=10-15 endosomes) (\*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001).

Una de les causes de la menor mobilitat de Rac1 (actiu i inactiu) respecte el KRas, pot venir donada, tal com ha descrit el grup del Dr. Miguel del Pozo (Madrid), pel fet que Rac1 es palmotoïla a la cisteïna 178. D'altra banda, un altre motiu d'aquestes diferències entre les dues GTPases podria ser el fet que Rac1, en comptes de farnesilar-se es geranil-geranila, i el grup geranil (20 C) pot unir-se més fortament a la bicapa lipídica que no pas el grup farnesil (15 C) que té KRas (Bhagatji et al., 2010; Shahinian and Silvius, 1995; Silvius et al., 2006).

Per tal de veure la importància del grup farnesil/geranil en l'associació a la membrana endosomal, es va analitzar la dinàmica de mutants KRas als quals se'ls havia canviat el farnesil per un grup geranil (GFP-KRasG12V-geranil i GFP-KRasS17N-geranil). La recuperació d'aquests nous mutants és bastant menor, assemblant-se a la de Rac1 (Fig. 15). A més, cal destacar que amb el canvi del grup farnesil pel grup geranil no s'observen diferències entre els mutants actiu i inactiu. Una possible explicació és que la forta associació que confereix el grup geranil dificulta l'observació dels canvis en la dinàmica entre els mutants actiu i inactiu.



	HT (s)	MF (%)
KRasG12V-geranil	1.2 ± 0.2	38.6 ± 0.1
KRasS17N-geranil	1.1 ± 0.1	39.6 ± 0.1

**Figura 15. Importància del grup farnesil per a la dinàmica de KRas en la membrana dels endosomes.** Experiment representatiu de FRAP en cèl·lules COS-1 transfectades amb els mutants GFP-KRasG12V-geranil i GFP-KRasS17N-geranil després de ser dejunades durant una hora i tractades amb EGF-TRITC (200 ng/ml) durant 10-20 minuts (n = 10-15 endosomes, mitjanes ± SEM).

### 2.3.3- Implicació de Sos1

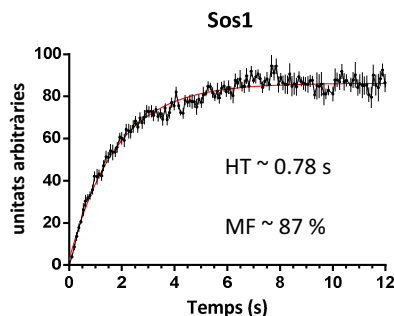
Una possible explicació perquè els mutants actiu i inactiu de KRas es comportin diferent en associar-se a la membrana dels endosomes podria ser que alguna proteïna estigués interaccionant i retenint KRas de manera diferent segons quin sigui el seu estat d'activació. Per exemple, alguna de les proteïnes GEF que s'encarreguen de bescanviar el GDP pel GTP. Aquestes podrien unir el mutant GFP-KRasS17N provocant una retenció major d'aquest a la membrana al no poder bescanviar el GDP.

Per tal de comprovar si es donaven canvis en la dinàmica de KRas degut a la presència d'alguna GEF, es va coexpressar el GEF Sos1 fusionat amb cherry (cherry-Sos1), una de les GEFs més estudiades i importants de les proteïnes Ras, juntament amb els mutants de KRas actiu i inactiu en cèl·lules COS-1. Els resultats dels corresponents experiments de FRAP, demostraven que la dinàmica de KRas no estaria influenciada per la presència de Sos1 en la membrana dels endosomes (Fig. 16A). A més, la ràpida i total recuperació de Sos1 en la membrana dels endosomes no afavoreix la idea que pugui ser la causa de la retenció de KRas en aquestes endomembranes (Fig. 16B).

**A**

	HT (s)	MF (%)
KRasG12V	0.90 ± 0.06	78.02 ± 0.15
KRasG12V+cherry-Sos1	1.02 ± 0.15	78.6 ± 3.2
KRasS17N	1.8 ± 0.3	64 ± 1
KRasS17N+cherry-Sos1	1.8 ± 0.2	70 ± 1

**B**

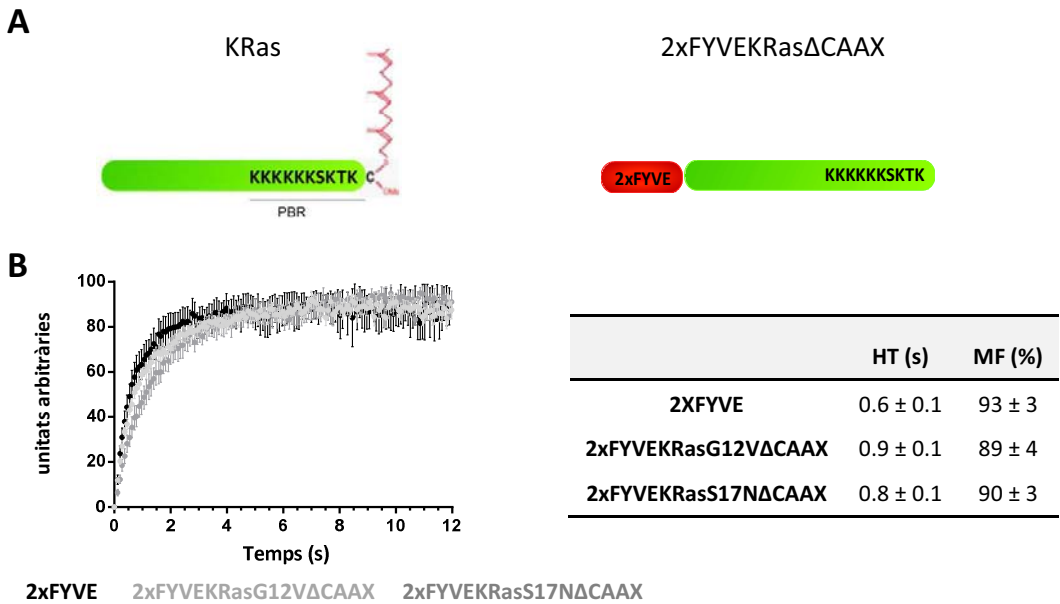


**Figura 16. Sos1 no modifica l'associació de KRas en els endosomes. (A)** La taula mostra els resultats dels experiments de FRAP duts a terme en cèl·lules transfectades amb els mutants actiu i inactiu de KRas i co-transfectades o no amb cherry-Sos1. L'estadística es va realitzar entre les condicions que contenen Sos1 i els seus respectius controls (n = 10-15 endosomes, mitjanes ± SEM). **(B)** El gràfic mostra una ràpida recuperació de cherry-Sos1 (n = 1).

### 2.3.4- Efecte del direccionalment de KRas als endosomes mitjançant la seqüència 2xFYVE

Per tal de determinar si les diferències observades en la dinàmica dels mutants actiu i inactiu de KRas eren degudes a la interacció d'alguna altra molècula, independentment de la seva inserció en la membrana a través del farnesil, es van fer unes proteïnes recombinants de KRas que tenien la característica d'unir-se als PI3P de

la membrana dels endosomes primerencs gràcies a la seqüència 2xFYVE introduïda a l'extrem N-terminal de KRas. A més, aquests mutants tenien la seqüència CAAX delectada, per la qual cosa no podien farnesilar-se (Fig. 17A). La figura 17B mostra com, quan els mutants actiu i inactiu de KRas es troben direccionats als endosomes i no poden inserir-se a la bicapa lipídica d'aquests, les diferències entre les seves dinàmiques desapareixen. Aquests resultats posen de manifest la importància de la regió C-terminal de KRas en la dinàmica de KRas ja que sense el grup farnesil, no existeixen diferències en les dinàmiques dels diferents mutants.

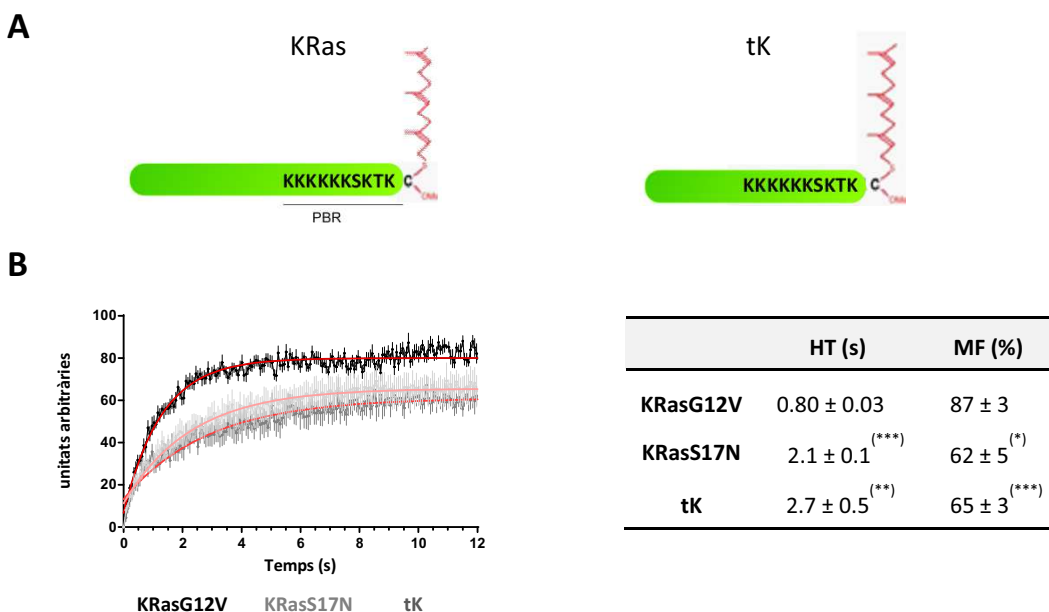


**Figura 17.** El direccionament de KRas als endosomes mitjançant la seqüència 2xFYVE, impedeix les diferències entre els mutants actiu i inactiu. FRAP d'endosomes en cèl·lules COS-1 que expressen el GFP-2xFYVE o els mutants actiu o inactiu de KRas, GFP2xFYVEG12VΔCAAX o GFP2xFYVES17NΔCAAX i tractades amb EGF-TRITC (200 ng/ml) després d'una hora de dejú (n= 10-12 endosomes, mitjanes ± SEM).

### 2.3.5- La unió de GTP/GDP a KRas modifica la seva dinàmica en la membrana dels endosomes

Degut a les diferències observades en les dinàmiques dels mutants actiu i inactiu, es va analitzar el paper del domini globular de KRas. Per saber si la unió de GTP/GDP podia estar influenciant en la dinàmica de KRas es va usar el mutant GFP-tK, descrit pel grup del Dr. John Hancock. Aquest mutant només conté els últims 17 aminoàcids de l'extrem C-terminal de KRas per tant, no pot unir-se a GTP/GDP (Apolloni et al., 2000) (Fig. 18A). Els resultats dels experiments de FRAP duts a terme en endosomes positius per GFP-tK mostren com la seva recuperació és similar a la del mutant inactiu de KRas

(GFP-KRasS17N), suggerint que la unió de GTP al domini globular de KRas estaria facilitant la dissociació d'aquesta proteïna de la membrana dels endosomes (Fig. 18B).



**Figura 18. Comparativa de la dinàmica d'associació del tK, G12V i S17N.** Anàlisi de FRAP de cèl·lules COS-1 transfectades amb GFP-KRasG12V, GFPKRasS17N i GFP-tK. La taula mostra les diferències en la cinètica d'associació als endosomes entre els diferents mutants (n = 10-15 endosomes) (mitjanes ± SEM) (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001).

Sembla ser que tant el domini d'unió a la membrana (el grup farnesil i la regió PBR) com l'estat d'activació de KRas són claus per a la regulació de la seva dinàmica d'associació. L'estat d'activació podria estar influenciant la interacció de la cua C-terminal de KRas a la membrana endosomal a través de proteïnes d'unió, de certes modificacions post-traduccionals, o bé d'algun canvi conformacional.

## 2.4- ANÀLISI DE LA IMPLICACIÓ DE LA PART C-TERMINAL DE KRAS EN LA SEVA DINÀMICA EN ELS ENDOSOMES

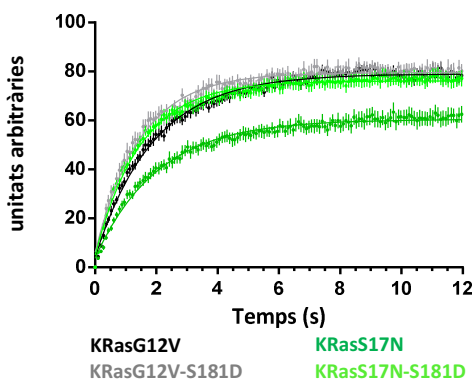
La interacció del KRas a la membrana dels endosomes depèn de la regió polibàsica i del grup farnesil. Per tant, proteïnes d'unió a la regió PBR o al farnesil, així com canvis post-traduccionals produïts en la regió PBR, podrien modular l'associació de KRas als endosomes. Tot seguit s'analitzen alguns d'aquest canvis, així com la influència d'algunes proteïnes d'interacció amb KRas en la seva dinàmica.

### 2.4.1- Modificacions post-traduccionals de KRas. Fosforilació de la Ser-181.

Ballester *et al.* descriuen la fosforilació de KRas. El seu estudi demostrava que la Ser-181 de la regió PBR de KRas és un dels llocs de fosforilació de la PKC (Ballester et al., 1987). Aquesta fosforilació, adquisició d'un grup fosfat carregat negativament, fa canviar la càrrega neta positiva de la regió PBR i en aquest sentit pot disminuir l'afinitat d'interacció de KRas amb els fosfolípids àcids de la membrana endosomal. A més, tal com han descrit altres grups, aquesta fosforilació pot regular la interacció de diverses proteïnes amb l'extrem C-terminal de KRas, positivament en el cas de la subunitat  $\delta$  de la fosfodiesterasa 6 (PDE $\delta$ ), i negativament en el cas de la calmodulina (CaM), afectant també d'aquesta manera l'associació de KRas a les membranes (Chandra et al., 2012; Fivaz and Meyer, 2005).

Per determinar la importància que exerceix la fosforilació de la Ser-181 en la dinàmica de KRas, es van expressar els mutants actiu i inactiu mimètics de fosforilació, Ser-181 mutada a Asp, en cèl·lules COS-1 (GFP-KRasG12V-S181D i GFP-KRasS17N-S181D, respectivament) i es van fer experiments de FRAP després de 20 minuts de tractament amb EGF-TRITC. La taula de la figura 19 mostra com el mutant inactiu de KRas és més lent i molt més immòbil que no pas l'actiu, tal com s'ha mostrat anteriorment. Però en canvi en els mutants mimètics de fosforilació de la Ser-181 aquestes diferències desapareixen, presentant cinètiques similars al GFP-KRasG12V.

Els resultats suggereixen que la fosforilació de la Ser-181 de la regió PBR de KRas podria estar implicada en l'associació diferencial dels mutants actiu i inactiu a la membrana dels endosomes.



	HT (s)	MF (%)
KRasG12V	1.27 ± 0.06	80 ± 2
KRasS17N	1.52 ± 0.02 <sup>(*)</sup>	60.6 ± 0.6 <sup>(****)</sup>
KRasG12V-S181D	1.0 ± 0.1 <sup>(*)</sup>	80 ± 2
KRasS17N-S181D	1.01 ± 0.05 <sup>(**)</sup>	76 ± 3

**Figura 19. La fosforilació de la Ser-181 pot jugar un paper important en l'associació de KRas en els endosomes.** Anàlisi del FRAP dels mutants actiu i inactiu de KRas i els seus corresponents mimètics de fosforilació (GFP-KRasG12V, GFP-KRasS17N, GFP-KRasG12VS181D, i GFP-KRasS17NS181D, respectivament). Les cèl·lules van ser dejunades una hora abans de ser

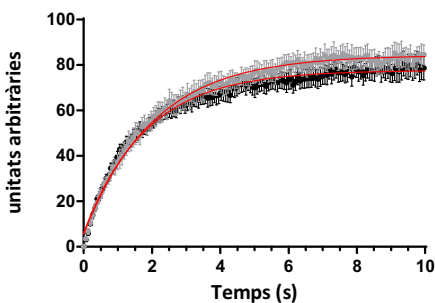
tractades amb EGF-TRITC durant 20 minuts. (n = 10 - 15 endosomes) (mitjanes ± SEM). L'anàlisi estadístic es va fer respecte el mutant GFP-KRasG12V (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001).

### 2.4.2- Implicació de la Calmodulina en la dinàmica de KRas

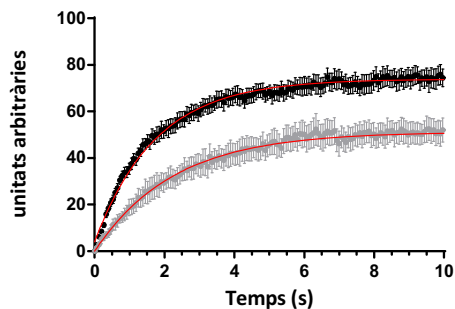
El grup de la Dra. Neus Agell del nostre Departament, ha descrit i caracteritzat la interacció de la calmodulina (CaM) amb KRas. La CaM s'uneix al KRas actiu i, en aquesta unió, la regió polibàsica i el grup farnesil són essencials. A més, s'ha descrit que quan KRas es troba fosforilat en la Ser-181, la unió a CaM es veu inhibida (Alvarez-Moya et al., 2011).

En base a aquests resultats es va estudiar la dinàmica dels mutants actius mimètic de fosforilació i no-fosforilable (GFP-KRasG12V-S181D i GFP-KRasG12V-S181A respectivament) en presència o no de W13, inhibidor de la CaM. El propòsit d'aquests experiments era veure si, en absència de la fosforilació de la Ser-181, la CaM podia estar unint-se a la regió PBR i modular així l'associació de KRas a la membrana. En la figura 20 s'observa com la presència de W13 no té cap efecte en la dinàmica del KRas mimètic de fosforilació, però en canvi sí que altera la dinàmica del KRas no fosforilable, essent més lenta la seva dissociació de l'endosoma en absència de CaM.

Així doncs, és possible que la unió de la CaM a la regió polibàsica de KRas provoqui una major dissociació de KRas de la membrana dels endosomes. Aquests resultats estarien amb línia amb el fet que la CaM pot afavorir la dissociació de KRas de la membrana plasmàtica (Bhagatji et al., 2010; Fivaz and Meyer, 2005).



KRasG12V-S181D KRasG12V-S181D + W13



KRasG12V-S181A KRasG12V-S181A + W13

	HT (s)	MF (%)
KRasG12V-S181D	1.12 ± 0.06	80 ± 4
KRasG12V-S181D +W13	1.4 ± 0.1	88 ± 3

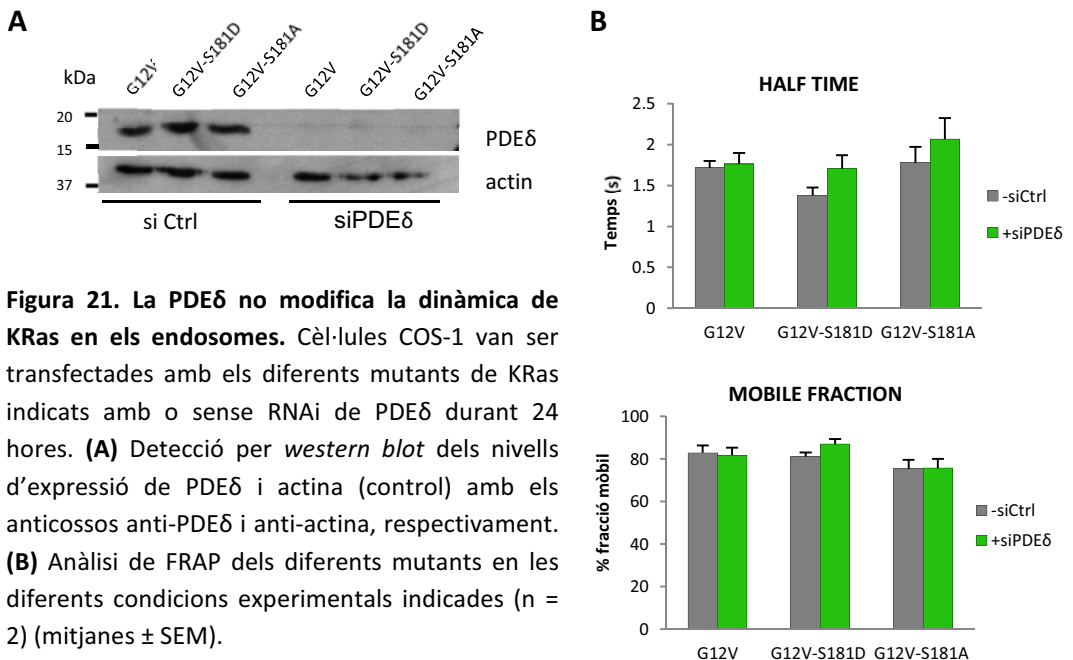
	HT (s)	MF (%)
KRasG12V-S181A	1.37 ± 0.08	74 ± 3
KRasG12V-S181A +W13	1.9 ± 0.2 <sup>(*)</sup>	57 ± 4 <sup>(*)</sup>

**Figura 20. La CaM pot modular la dinàmica de KRas en la membrana dels endosomes.** FRAP d'endosomes amb els mutants GFP-KRasG12VS181D o GFP-KRasG12VS181A i tractats o no amb W13 (30  $\mu$ M, 5 min) després del tractament amb EGF-TRITC (200 ng/ml, 10-20 minuts) (n = 10-15 endosomes) (mitjanes  $\pm$  SEM) (\*p < 0.05).

### 2.4.3- Estudi de la implicació de la PDE $\delta$ en la dinàmica de KRas

S'ha descrit que la PDE $\delta$  s'uneix als grups farnesil de diverses GTPases i pot facilitar la dissociació d'aquestes de les membranes. Estudis realitzats per Bhagatji *et al.* demostraven que la inhibició de l'expressió de PDE $\delta$  reduïa considerablement la dissociació dels mutants actiu i inactiu de KRas a la membrana plasmàtica (Bhagatji *et al.*, 2010). Estudis posteriors descriuen el paper de la PDE $\delta$  com una proteïna *GDI-like*, demostrant el seu efecte solubilitzador de KRas de les endomembranes i dirigint-la cap a la membrana plasmàtica un altre cop. Així doncs es descriu el paper de la PDE $\delta$  com una proteïna organitzadora de la localització de KRas (Chandra *et al.*, 2012).

Donat que la fosforilació en la Ser-181 de KRas facilita la unió de la PDE $\delta$  (Schmick *et al.*, 2014), es va plantejar la hipòtesi que aquesta proteïna pogués estar influenciant en la dinàmica del KRas actiu, possiblement fosforilat, fent que la seva dissociació de la membrana dels endosomes fos més ràpida. Per això es van transfectar cèl·lules COS-1 amb l'RNAi de PDE $\delta$  i es van dur a terme experiments de FRAP amb els diferents mutants de KRas. Els resultats mostren que en absència de PDE $\delta$  no es modifica la dinàmica de KRas en els endosomes (Fig. 21B).



**Figura 21. La PDE $\delta$  no modifica la dinàmica de KRas en els endosomes.** Cèl·lules COS-1 van ser transfectades amb els diferents mutants de KRas indicats amb o sense RNAi de PDE $\delta$  durant 24 hores. **(A)** Detecció per *western blot* dels nivells d'expressió de PDE $\delta$  i actina (control) amb els anticossos anti-PDE $\delta$  i anti-actina, respectivament. **(B)** Anàlisi de FRAP dels diferents mutants en les diferents condicions experimentals indicades (n = 2) (mitjanes  $\pm$  SEM).



Tot i que no es pot descartar que altres proteïnes estiguin regulant la dinàmica d'associació de KRas a les membranes endosomals, com per exemple PRA1 (*prenylated Rab protein acceptor protein 1*) (Bhagatji et al., 2010), els resultats obtinguts suggereixen que la possible fosforilació de la Ser-181 o la interacció de la CaM a la regió PBR poden disminuir la interacció electrostàtica del KRas actiu amb els fosfolípids negatius de les membranes dels endosomes per afavorir-ne la dissociació.

## 2.5- PAPER DELS FOSFOLÍPIDS EN EL RECLUTAMENT DE KRAS A LA MEMBRANA DELS ENDOSOMES.

### 2.5.1- Fosfatidilinositol 3 fosfat (PI3P)

El fosfatidilinositol-3 fosfat (PI3P) és un fosfolípid negatiu característic de la membrana dels endosomes primerencs. La presència d'aquest fosfolípid es deu al fet que Rab5 activa la Vps34, una fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) de classe III encarregada d'incrementar la producció dels PI3P a la membrana dels endosomes (Murray et al., 2002). Aquest lípid permet la unió de molècules que contenen el domini FYVE (acrònim de les proteïnes d'on prové aquest residu, FYVE: Fab1, YOTB, Vac1 i EEA1), tals com l'EEA-1 o l'Hrs (*Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*). La transfecció de la proteïna de fusió GFP-2xFYVE derivada de la proteïna Hrs ha estat àmpliament utilitzada per fer un seguiment dels PI3P dels endosomes primerencs en cèl·lules de mamífer (Gillooly et al., 2000).

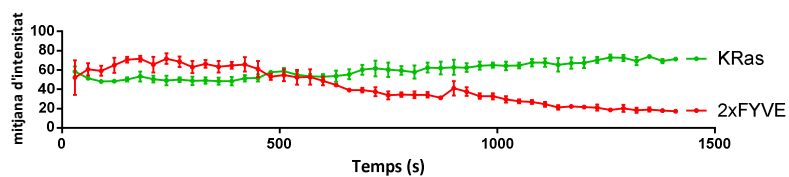
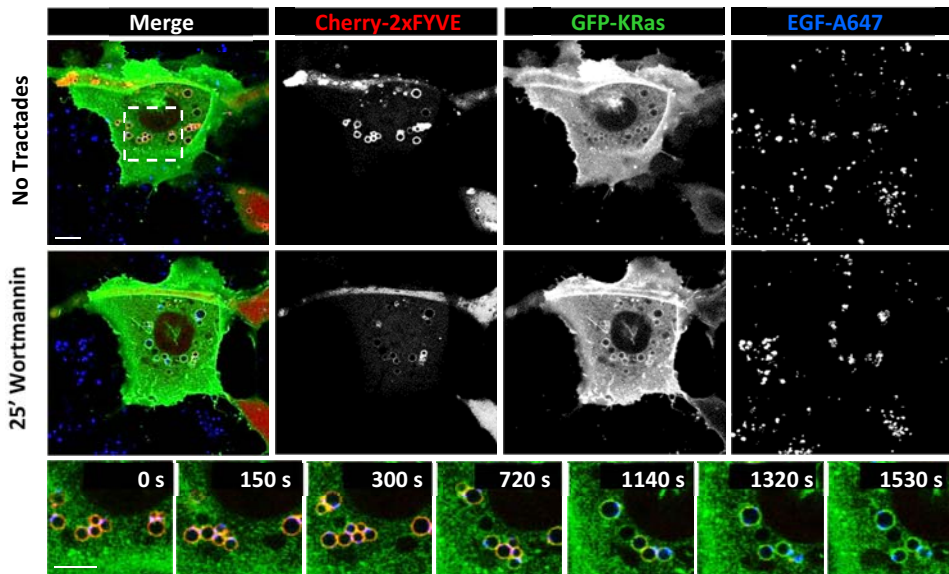
Per tal d'analitzar el paper d'aquest fosfolípid en la incorporació de KRas als endosomes es va inhibir la producció de PI3P mitjançant wortmanina, un inhibidor general de PI3Ks. Es van fer experiments de videomicroscòpia amb cèl·lules expressant el cherry-2xFYVE i el GFP-KRas. Les cèl·lules, prèviament dejunades, es van tractar amb EGF-647 durant deu minuts i posteriorment amb wortmanina durant 25 minuts. Les imatges de la figura 22 mostren com, mentre el GFP-KRas es manté als endosomes primerencs durant el tractament amb wortmanina, la sonda cherry-2xFYVE perd aquesta localització (Fig. 22A). D'altra banda, experiments de FRAP fets en les mateixes condicions mostren que la dinàmica d'associació-dissociació de KRasG12V en endosomes tractats amb wortmanina no varia (Fig. 22B).

Cal tenir en compte que per aconseguir la dissociació del 2xFYVE (sensor de PI3P) dels endosomes, van ser necessàries dosis elevades de wortmanina (10  $\mu$ M). La wortmanina és una droga fotosensible i que per tant, el seu efecte pot veure's afectat per la llum del làser al llarg del temps, fent necessàries concentracions elevades d'aquesta. La necessitat d'aquesta elevada dosi podria explicar-se perquè la PI3K-II (PI3KC2 $\alpha$ ) estigués col·laborant en la formació del fosfolípid PI3P en els EE. Aquesta

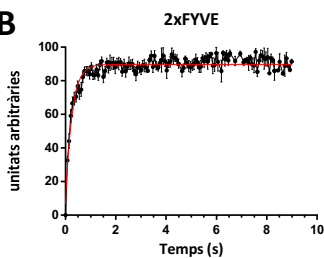
classe de PI3K és deu cops més resistent a la inhibició per wortmanina que no pas altres PI3Ks (Prior and Clague, 1999; Vanhaesebroeck et al., 2001).

De totes maneres, es pot concloure que el PI3P no és necessari per reclutar KRas a la membrana dels endosomes. Tot i que no es pot descartar que pugui jugar un paper secundari quan altres lípids de membrana no són presents, o que en absència de PI3P, altres fosfolípids negatius participen en el reclutament de KRas, com per exemple la fosfatidilserina (PS).

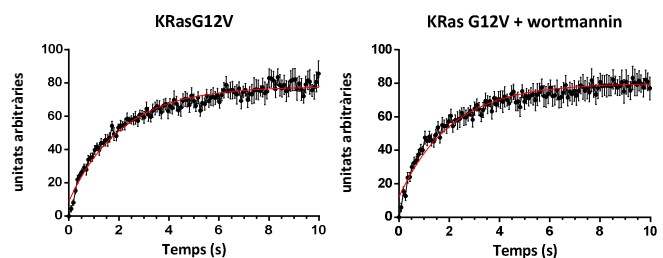
**A**



**B**



**C**



**Figura 22. Els PI3P no estan involucrats en el reclutament de KRas a la membrana dels endosomes.** (A) Experiment de videomicroscòpia realitzats en cèl·lules COS-1 que co-expressaven cherry-2xFYVE i GFP-KRasG12V i tractades amb EGF-647 (200 ng/ml) i wortmanina (10  $\mu$ M) durant 25 minuts. Imatges dels canals de GFP, cherry i 647 abans i després del tractament amb wortmanina. Es mostra una selecció d'imatges durant el tractament amb wortmanina (Barra = 2  $\mu$ m). (B, C) Experiment de FRAP en cèl·lules que expressaven cherry-2xFYVE (B) o GFP-KRasG12V abans i després de ser tractades amb wortmanina (C).

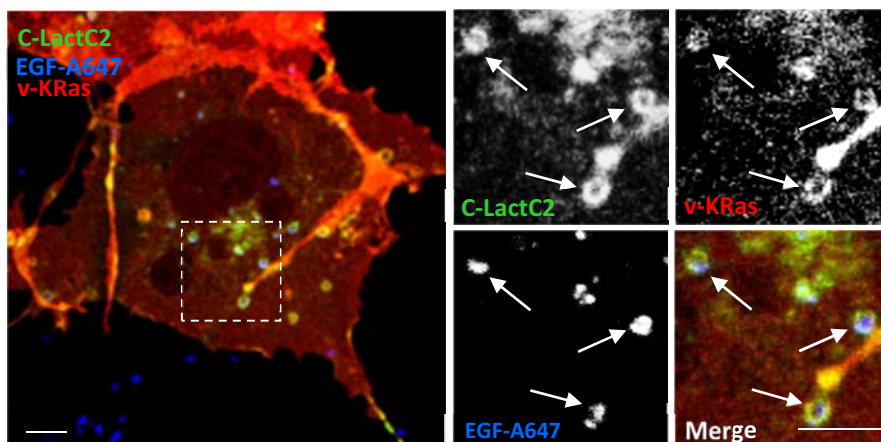
### 2.5.2- Fosfatidilserina (PS)

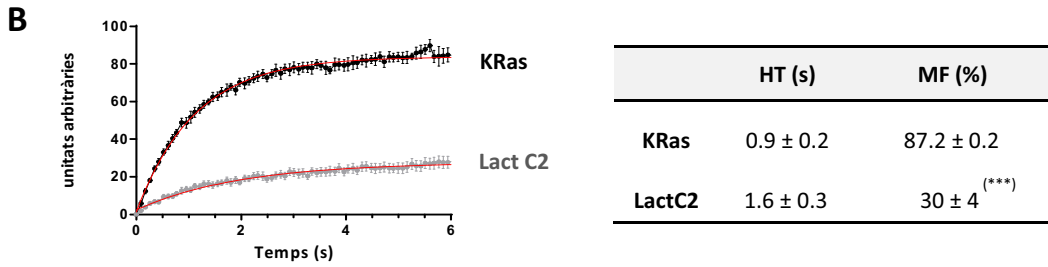
Un altre fosfolípid negatiu present a la membrana dels endosomes és la fosfatidilserina. La seva distribució intracel·lular ha estat analitzada gràcies a una sonda que conté el domini C2 de la lactadherina (LactC2) que s'uneix específicament a la PS (Yeung et al., 2008).

En base a aquests estudis, es van co-transfectar cèl·lules COS-1 amb nivells baixos de cerulean-LactC2, sonda amablement cedida pel Dr. Sergio Grinstein, i venus-KRas. En la figura 23A es pot observar que ambdues proteïnes co-localitzen en endosomes positius per EGF-647 (20 minuts). Aquest resultat està en consonància amb el recentment publicat pel grup del Dr. John Hancock, on descriuen una major localització de KRas en els endosomes quan la incorporació de PS des dels endosomes a la membrana plasmàtica es troba inhibida (Cho et al., 2012).

Els experiments de FRAP, realitzats en aquells endosomes on col·localitzen cherry-LactC2 i GFP-KRas, mostren una recuperació total de KRas i en canvi molt baixa per a la sonda cherry-LactC2 (Fig. 23B). El baix recanvi de la sonda pot evidenciar un metabolisme lent de la PS, que facilitaria l'associació de KRas.

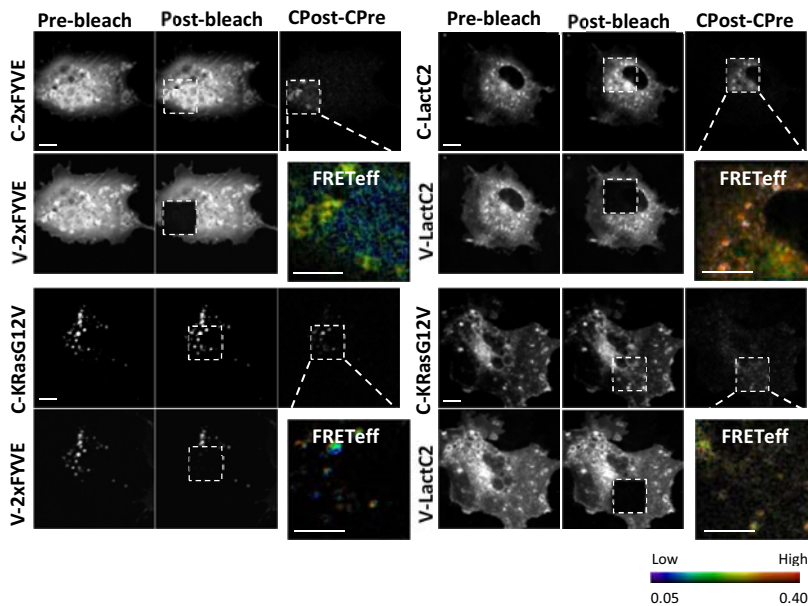
A

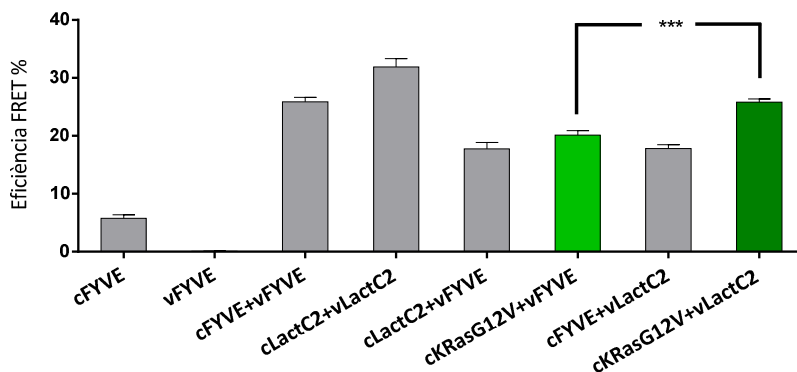




**Figura 23. Col-localització entre KRas i LactC2 en els endosomes.** (A) Cèl·lules COS-1 van ser cotransfectades amb mVenus-KRas i mCerulean-LactC2, i tractades amb EGF-647 durant 20 minuts després d'un dejuni d'una hora. Les imatges van ser adquirides amb el microscopi confocal Leica (SP5) amb els corresponents canals. Les fletxes indiquen llocs de col-localització entre les dues proteïnes i l'EGF-647 en els endosomes (Barres = 2 μm). (B) Experiment de FRAP en endosomes que contenen ambdues proteïnes i positius per EGF-647 (n = 15 endosomes) (\*\*p < 0.001).

D'altra banda es va analitzar, mitjançant microscòpia de FRET, la proximitat de KRas a la PS i també al PI3P dels endosomes. El mètode emprat va ser FRET-Acceptor photobleaching (FRET-APB) (Materials i Mètodes) i es va fer comparant les parelles mCerulean-KRas i mVenus-LactC2 (marcador de PS) o bé mVenus-2xFYVE (marcador dels PI3P). A la figura 24 es mostren els resultats obtinguts d'aquest experiment on es pot observar una major eficiència de FRET en la parella mCerulean-KRas i mVenus-LactC2 en comparació amb la parella mCerulean-KRas i mVenus-2xFYVE. Aquests resultats suggereixen que KRas té preferència pels dominis de membrana enriquits amb PS.

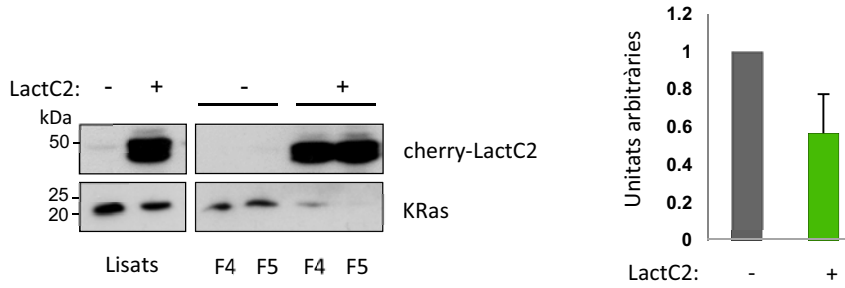




**Figura 24. KRas té preferència per dominis PS positius.** Cèl·lules COS-1 van ser tranfectades amb mCerulean-KRasG12V i /o el sensor de PI3P (mCerulean- o mVenus-2xFYVE) o la sonda per PS (mCerulean- o mVenus-LactC2) per a la realització de l'assaig de FRET-APB (Materials i Mètodes). Les àrees foto-apagades es troben en requadres puntejats. Les imatges mostren les condicions de *pre-bleach* i *post-bleach* així com les d'eficiència de FRET. El gràfic mostra el percentatge de l'eficiència de FRET-APB de les diferents parelles de proteïnes recombinants. Les diferències estadístiques entre les parelles cKRasG12V-vFYVE i cKRasG12V-vLactC2 van ser realitzades mitjançant el test d'ANOVA (n= 15-20 cèl·lules/condició) (mitjanes ± SEM) (\*\*\*) p < 0.001).

Finalment, per confirmar el paper de la PS en el reclutament de KRas als endosomes, es van realitzar experiments de competència sobreexpressant cherry-LactC2 en cèl·lules COS-1 i determinant la quantitat de KRas endogen present en els endosomes respecte del total de KRas de la cèl·lula. Les fraccions purificades d'endosomes es van obtenir mitjançant tècniques de fraccionament cel·lular i per gradient de sacarosa. La quantitat de KRas endogen d'aquestes fraccions i dels lisats va ser determinada per *western blot*. En la figura 25 es pot comprovar com el cherry-LactC2 està present a les fraccions d'endosomes i que, quan aquestes condicions es donen, el KRas endògen hi és en molt poca quantitat en comparació amb la condició control on no hi ha la sonda sobreexpressada.

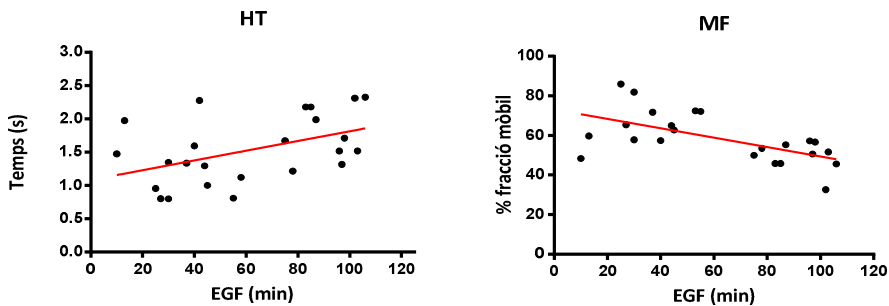
Aquests resultats, juntament amb els anteriors resultats de videomicroscòpia i FRET-APB, suggereixen que la fosfatidilserina contribueix de forma més important en el reclutament de KRas a la membrana dels endosomes que no pas els PI3P.



**Figura 25. El lípid PS participa en el reclutament de KRas als endosomes.** L'expressió de cherry-LactC2 fa disminuir els nivells endògens de KRas a les fraccions d'endosomes (F4 i F5) obtingudes per gradient de sacarosa (Materials i Mètodes). El gràfic mostra la relació normalitzada de KRas en les fraccions d'endosomes i el total en les cèl·lules control i sobre expressant LactC2 (n = 2, mitjanes ± SEM).

## 2.6- DIFERÈNCIES EN LA DINÀMICA DE KRAS EN ENDOSOMES PRIMERENCS I TARDANS

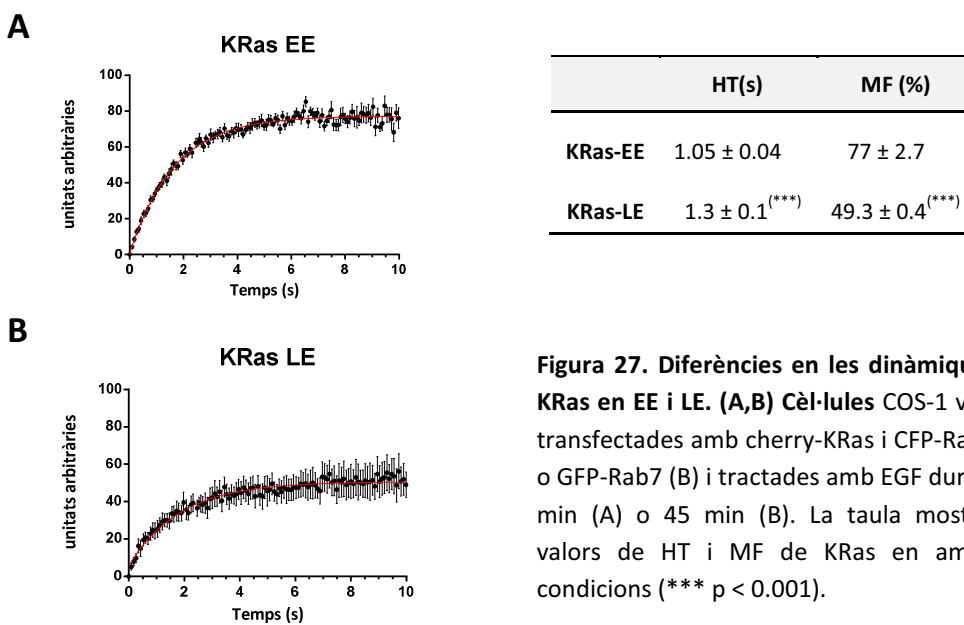
Els resultats obtinguts en els apartats anteriors mostren les dinàmiques de KRas i la importància de la PS en el seu reclutament en els endosomes primerencs. Amb l'objectiu d'analitzar el recanvi de KRas al llarg de la via endocítica, es van transfectar cèl·lules COS-1 amb GFP-KRas i es van tractar amb EGF-TRITC durant 120 minuts, després d'una hora de dejuni. Com que l'EGF un cop internalitzat arriba als EE i és dirigit cap als LE i finalment als lisosomes, es van realitzar experiments de FRAP del KRas que colocalitzava amb l'EGF-TRITC en els endosomes a diferents temps d'estimulació. En la figura 26 s'observa com el HT i la MF de GFP-KRas varia amb el temps, tenint un recanvi més ràpid i sent més mòbil en temps curts d'estimulació amb EGF. Els resultats obtinguts suggereixen diferents dinàmiques de KRas en EE i en LE.



**Figura 26. La dinàmica de KRas varia al llarg de la via endocítica.** Es van realitzar els experiments de FRAP d'endosomes a diferents temps en cèl·lules COS-1 que expressaven GFP-KRas tractades amb EGF-TRITC (200 ng/ml) durant 120 minuts.

La via endocítica es caracteritza per diversos marcadors moleculars al llarg d'aquesta. Per exemple, Rab5 és una marcador d'endosomes primerencs (EE), així com *early endosomes antigen-1* (EEA-1) o el PI3P. D'altra banda, Rab7 està enriquit en els endosomes tardans (LE), com també ho està el fosfolípid PI(3,5)P<sub>2</sub> i l'LBPA (*lysobisphosphatidic acid*). (Gruenberg, 2001; Huotari and Helenius, 2011; Scita and Di Fiore, 2010).

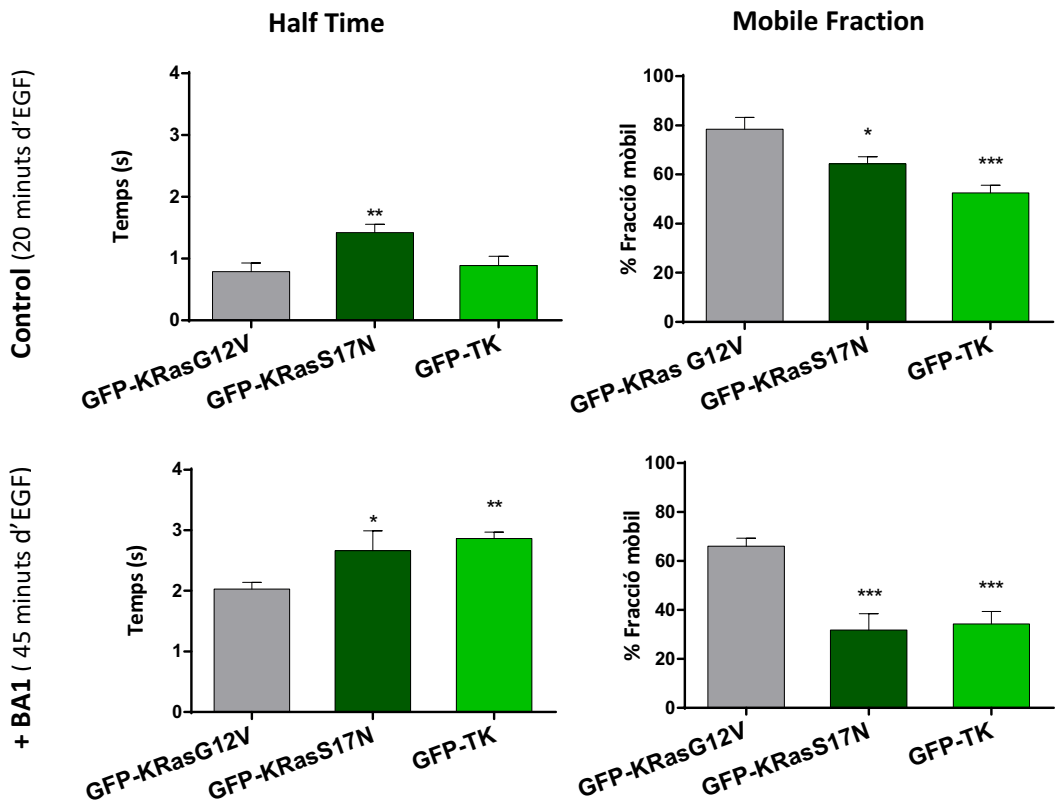
Es va estudiar la dinàmica de KRas en cèl·lules que co-expresaven cherry-KRas i CFP-Rab5 (EE) o bé GFP-Rab7 (LE) per tal de confirmar les diferències en cada tipus d'endosoma. Els resultats mostren com en endosomes primerencs, positius per Rab5, KRas té una major mobilitat que no pas en endosomes tardans, positius per Rab7 (MF~76.7 i MF~54.1, respectivament) (Fig. 27).



**Figura 27. Diferències en les dinàmiques de KRas en EE i LE. (A,B) Cèl·lules COS-1 van ser transfectades amb cherry-KRas i CFP-Rab5 (A) o GFP-Rab7 (B) i tractades amb EGF durant 20 min (A) o 45 min (B). La taula mostra els valors de HT i MF de KRas en ambdues condicions (\*\*\*) p < 0.001.**

Anteriorment s'han comentat les diferències en les cinètiques entre les formes activa i inactiva de KRas en els endosomes primerencs on el dominant negatiu (KRasS17N), així com també el domini tK, presentaven una menor dissociació que el mutant actiu (KRasG12V). Existeix la possibilitat que en els endosomes tardans, a diferència dels EE, el percentatge de KRas inactiu fos més important. Això explicaria la menor dissociació de KRas observada en els LE (Rab7) respecte als EE (Rab5) de la figura 27. Per analitzar aquesta possibilitat, es van transfectar cèl·lules COS-1 amb els mutants actiu i inactiu de KRas i el mutant GFP-tK. En la figura 28 s'observa com les diferències en les cinètiques dels tres mutants (KRasG12V, KRasS17N i tK) obtingudes

en els EEs, es mantenen o fins i tot són més importants en els LE (obtinguts després d'un tractament amb BA1).



**Figura 28.** Les diferències en les dinàmiques del KRas actiu i inactiu es mantenen en els endosomes tardans. Cèl·lules COS-1 van ser transfectades amb GFP-KRasG12V, GFP-KRasS17N o GFP-tK i tractades o no amb BA1 durant 16 hores. El FRAP en les cèl·lules control es va realitzar després de 20 minuts d'estimulació amb EGF-TRITC i el de les cèl·lules tractades amb BA1 després de 45 minuts (n = 15 endosomes) (mitjanes ± SEM) (\*p < 0.1, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001).

Els resultats indiquen que possiblement alguna característica molecular diferencial entre els dos tipus d'endosomes estaria regulant la dissociació de KRas. En aquest sentit, resultats encara preliminars que no es presenten en aquesta tesi, semblen indicar que la presència de fosfatidilinositol 3,5 bifosfat (PI3,5P<sub>2</sub>) en els LE (fosfolípid més negatiu que la PS dels EE), podria facilitar una interacció electrostàtica més forta amb la regió PBR i la retenció a la membrana del KRas.





# **RESULTATS**

## **APARTAT III**



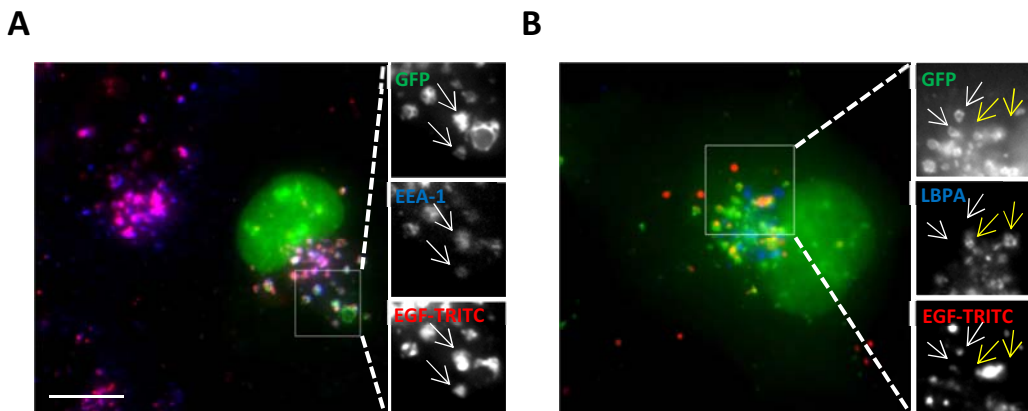
### 3- IMPLICACIÓ DEL KRAS DELS ENDOSOMES EN DIVERSOS PROCESSOS CEL·LULARS.

Un altre objectiu d'aquesta tesi ha estat analitzar la funció de KRas en els endosomes. En particular determinar el paper del KRas, localitzat en els endosomes primerencs, en la regulació de diferents processos cel·lulars com la migració, mobilitat o la invasió.

#### 3.1- DIRECCIONAMENT DE KRas ALS EE, VALIDACIÓ DE NOUS MUTANTS.

Per tal d'analitzar específicament el paper de KRas en endosomes primerencs es van dissenyar mutants de KRas dirigits a aquests endosomes. Aquestes noves proteïnes recombinants es van aconseguir introduint el pèptid senyal 2xFYVE, de direccionalment als EE (Gillooly et al., 2000), entre el GFP i la part N-terminal de la proteïna. Tal com s'ha comentat en el capítol anterior, el 2xFYVE s'uneix de manera específica als fosfolípids PI3P de la membrana dels endosomes primerencs. A més, també es va eliminar la seqüència CAAX de la part C-terminal de KRas per evitar la unió a altres membranes, com per exemple, a la membrana plasmàtica. D'aquesta manera el KRas endogen quedava com a *background* en totes les condicions i, qualsevol efecte diferencial observat provindria degut al KRas expressat, per tant a la seva senyalització en els endosomes.

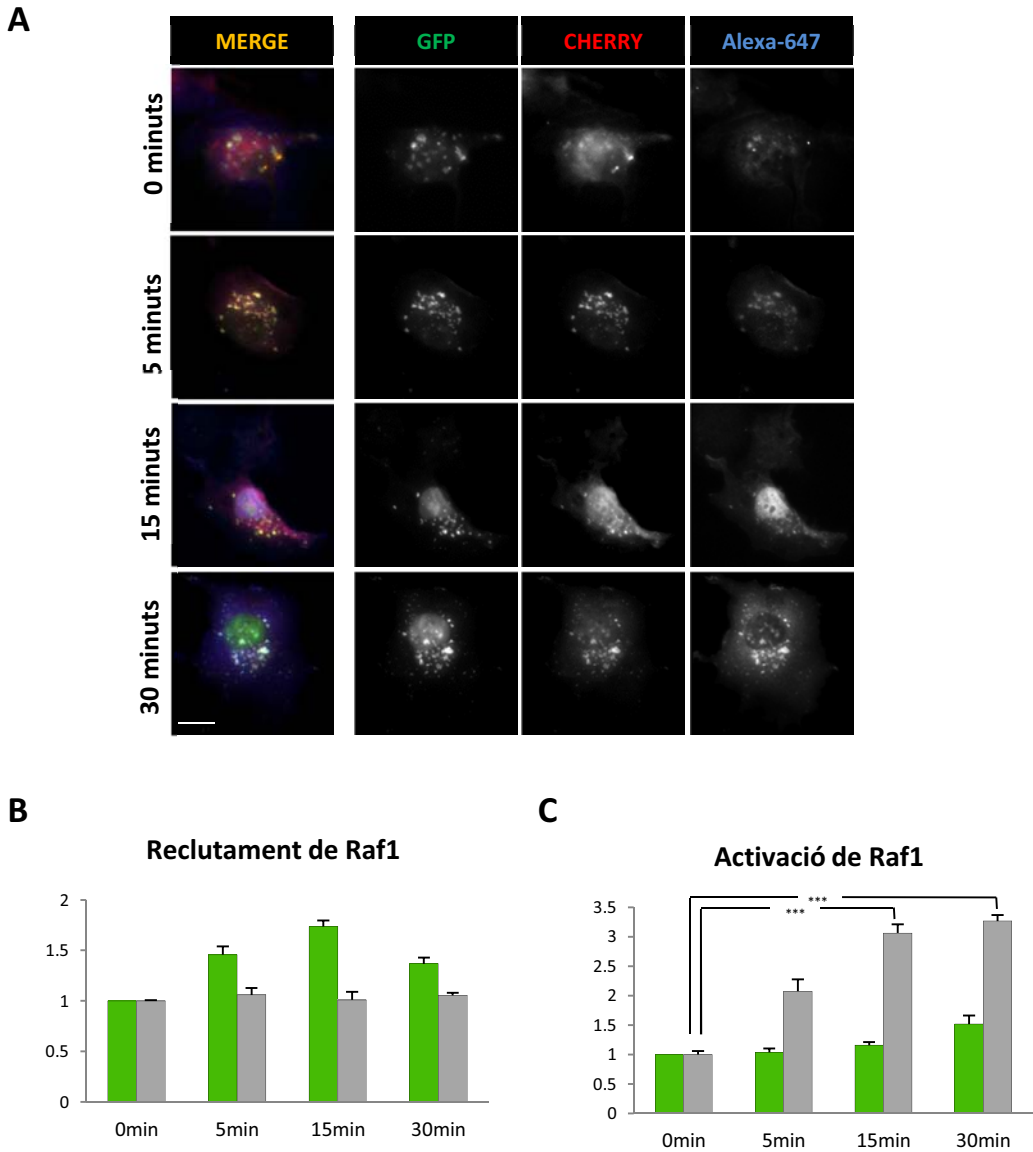
La localització específica d'aquests mutants en endosomes primerencs es va validar transfectant cèl·lules COS-1 i mirant la seva col·localització amb EEA-1 o LBPA (marcadors específics dels endosomes primerencs i tardans, respectivament). La figura 29 mostra una elevada col·localització entre el GFP-2xFYVEKRas $\Delta$ CAAX i els endosomes primerencs (EEA-1), però no pas amb els tardans (LBPA). Els mateixos resultats van ser obtinguts per als diferents mutants G12V i S17N.



**Figura 29. Col·localització entre GFP-2xFYVEKRas $\Delta$ CAAX i EEA-1 o LBPA. (A, B)** Imatges de cèl·lules COS-1 transfectades amb GFP-2xFYVEKRas $\Delta$ CAAX i tractades amb EGF-TRITC durant 20 minuts (A) o 45minuts (B). Detecció dels endosomes EE i LE per immunofluorescència amb anticossos anti EEA-1 (A) o anti LBPA (B) i els corresponents secundaris conjugats amb Alexa-647. Les fletxes blanques indiquen la col·localització entre el GFP, l'EEA-1 i l'EGF (A) o el GFP i l'EGF (B), les fletxes grogues indiquen la col·localització entre l'EGF i l'LBPA (Barra = 10  $\mu$ m).

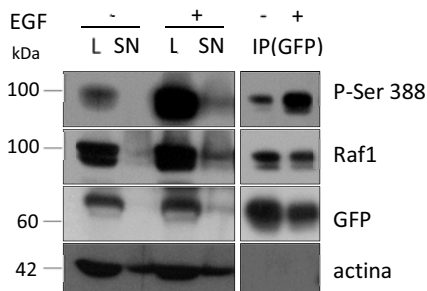
Un cop corroborada la correcta localització dels nous mutants, es va comprovar si KRas, a part d'estar dirigit als endosomes primerencs, era funcional. Per a confirmar la correcta activació de KRas en els endosomes es va analitzar el reclutament i l'activació d'un dels efectors de KRas més ben estudiats, Raf1, mitjançant tècniques bioquímiques i de microscòpia. Es van co-transfectar cèl·lules COS-1 amb els mutants *wild type* o actiu de KRas dirigit als endosomes primerencs (GFP-2xFYVEKRas $\Delta$ CAAX i GFP-2xFYVEKRasG12V $\Delta$ CAAX, respectivament) i cherry-Raf1, i es van estimular les cèl·lules amb EGF a diferents temps (Fig. 30A). Per tal de quantificar el Raf1 reclutat als endosomes, indicatiu de l'estat actiu de Ras, es va quantificar la relació entre les intensitats de fluorescència de Raf1 (canal vermell) i el GFP (canal verd) (Fig 30B). A més, mitjançant tècniques d'immunofluorescència, es va procedir a analitzar l'estat de d'activació de Raf1, usant l'anticòs anti-fosfo-Serina-338 de Raf1 ja que la fosforilació de la Ser-338 de Raf1 està directament relacionada amb la seva activació. Per determinar el grau d'activitat de Raf1 es va realitzar la relació entre les intensitats dels canals de P-Ser338 (Alexa-647) i Raf1 (Alexa-555, vermell) (Fig. 30C), que es va dur a terme mitjançant el programa Image J.

Tal i com mostren les imatges i la posterior quantificació, el reclutament de Raf1 en els endosomes primerencs augmenta en el temps amb l'estimulació d'EGF. A més, la fosforilació de Raf1 a la serina-338 també augmenta al llarg del temps en resposta a l'EGF.



**Figura 30. Reclutament i activació de Raf1 en els endosomes primerencs. (A)** Cèl·lules COS-1 van ser transfectades amb cherry-Raf1 i GFP-2xFYVEKRasΔCAAX tractades amb EGF durant 0, 5, 15 o 30 minuts. La detecció de P-Raf1 es va dur a terme mitjançant l'anticòs de conill anti Raf1-PSer-338 i un anticòs secundari conjugat amb Alexa-647 (Barra = 10 μm). **(B)** Quantificació del reclutament de cherry-Raf1 en endosomes positius per GFP-2xFYVEKRasΔCAAX (verd) o GFP-2xFYVEKRasG12VΔCAAX (gris), relació calculada entre les intensitats dels canals FITC (KRas) i Cy3 (Raf1). **(C)** Quantificació de la fosforilació del Raf1 reclutat als endosomes mitjançant la relació entre les intensitats dels canals Cy3 (Raf1) i alexa-647 (P-Ser388-Raf1) (n = 7 cèl·lules per condició) (mitjanes ± SEM) (\*\*\*) (\*\*\*p < 0.001).

El reclutament i l'activació de Raf1 en els endosomes promogut pel KRas dirigit a aquests orgànuls, també es va analitzar bioquímicament per immunoprecipitació i *western blot*. Es van transfectar cèl·lules COS-1 amb GFP-2xFYVE-KRas $\Delta$ CAAX i cherry-Raf1 i es va fer un tractament amb EGF de 30 minuts. El KRas es va immunoprecipitar utilitzant un anticòs anti GFP i la quantitat de Raf1 co-immunoprecipitada, així com la seva fosforilació en la Ser-338, es van detectar per *western blot* amb els anticossos específics corresponents (Fig. 31). Els resultats mostren com l'estimulació amb EGF incrementa els nivells de fosforilació de Raf1.



**Figura 31. Activació de Raf1 pel KRas dirigit a endosomes.** Cèl·lules COS-1 van ser transfectades amb GFP-2xFYVEKRas $\Delta$ CAAX i tractades, o no, amb EGF durant 30 minuts. La immunoprecipitació de KRas es va dur a terme amb un anticòs anti-GFP i la detecció de KRas, Raf1, P-Ser-338-Raf1 i actina dels immunoprecipitats (IP), lisats (L) o sobrenedants d'IP (SN) es va realitzar mitjançant western blot usant els respectius anticossos primaris indicats (anti-fosfo-Ser338, anti-Raf1, anti-GFP i anti actina).

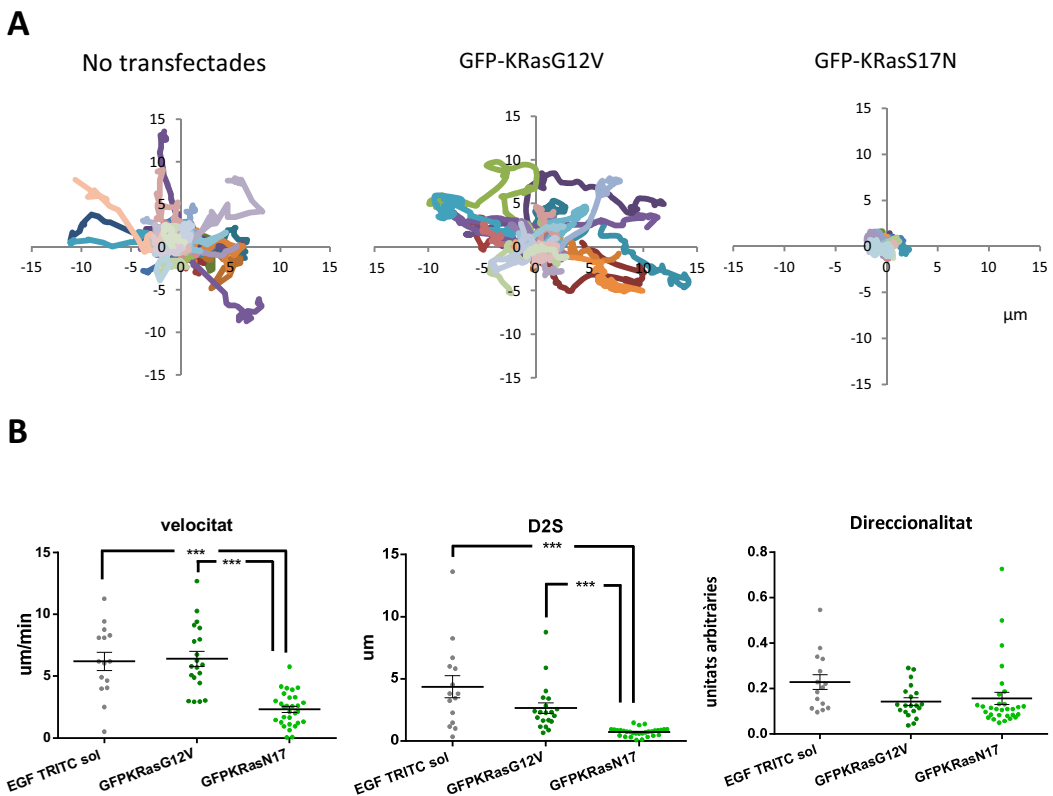
Aquests resultats, juntament amb la quantificació anterior, validen la validació l'ús dels nous mutants de KRas direccionats als endosomes primerencs per a poder estudiar la funció de KRas en aquests orgànuls.

### 3.2- IMPLICACIÓ DE KRAS EN LA MOBILITAT DELS ENDOSOMES

#### 3.2.1- Efecte de l'expressió dels mutants actiu i inactiu de KRas en la mobilitat dels endosomes

En primer lloc, es va analitzar el paper dels mutants actiu i inactiu de KRas, no direccionats als endosomes, en la mobilitat d'aquests orgànuls en cèl·lules COS-1 tractades amb EGF durant 20 minuts. Aquests experiments es van dur a terme amb tècniques de videomicroscòpia, registrant el moviment dels endosomes primerencs durant tres minuts (Cordonnier et al., 2001). L'anàlisi del moviment d'aquests endosomes es va realitzar amb el plugin MJTrack del programa Image J.

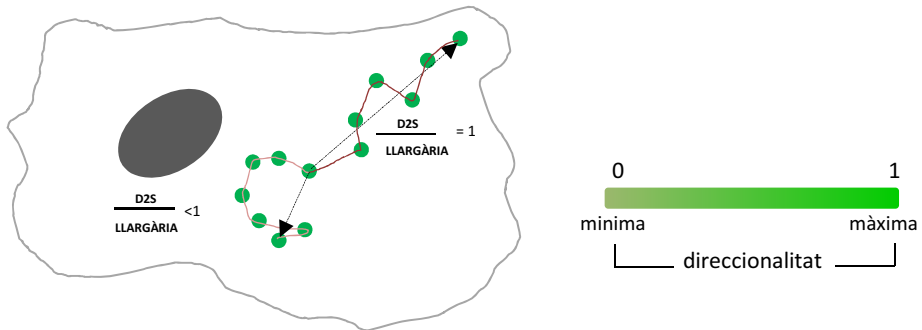
Els diagrames de la figura 32A mostren els recorreguts dels endosomes en cada condició experimental. S'observa com els endosomes de les cèl·lules que expressen el dominant negatiu de KRas (GFP-KRasS17N) tenen una menor mobilitat que les cèl·lules no transfectades o les que expressen el mutant de KRas constitutivament actiu (KRasG12V). La figura 32B mostra la quantificació dels diferents paràmetres obtinguts de la mobilitat dels endosomes: velocitat ( $\mu\text{m}/\text{min}$ ), distància neta recorreguda (D2S, *Distance to Start*,  $\mu\text{m}$ ) i direccionalitat (D2S/llargària del recorregut).



**Figura 32. La inhibició de KRas afecta a la mobilitat dels endosomes.** Cèl·lules COS-1 van ser transfectades amb diferents mutants de KRas (G12V i S17N) durant 24 hores. Es van dejunar amb medi DMEM 0% FBS durant una hora i posteriorment van ser tractades durant 20 minuts amb EGF-TRITC (200 ng/ml). La mobilitat dels endosomes es va enregistrar mitjançant videomicroscopia durant 3 minuts amb el microscopi confocal Leica-SP5 (SCT-UB). **(A)** Representació dels diferents recorreguts dels endosomes en cada condició d'un experiment representatiu de tres independents. **(B)** Quantificació dels diferents paràmetres obtinguts en els recorreguts ( $n = 15\text{-}20$  endosomes, mitjanes  $\pm$  SEM). L'estadística es va fer mitjançant un anàlisi ANOVA (\* $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).



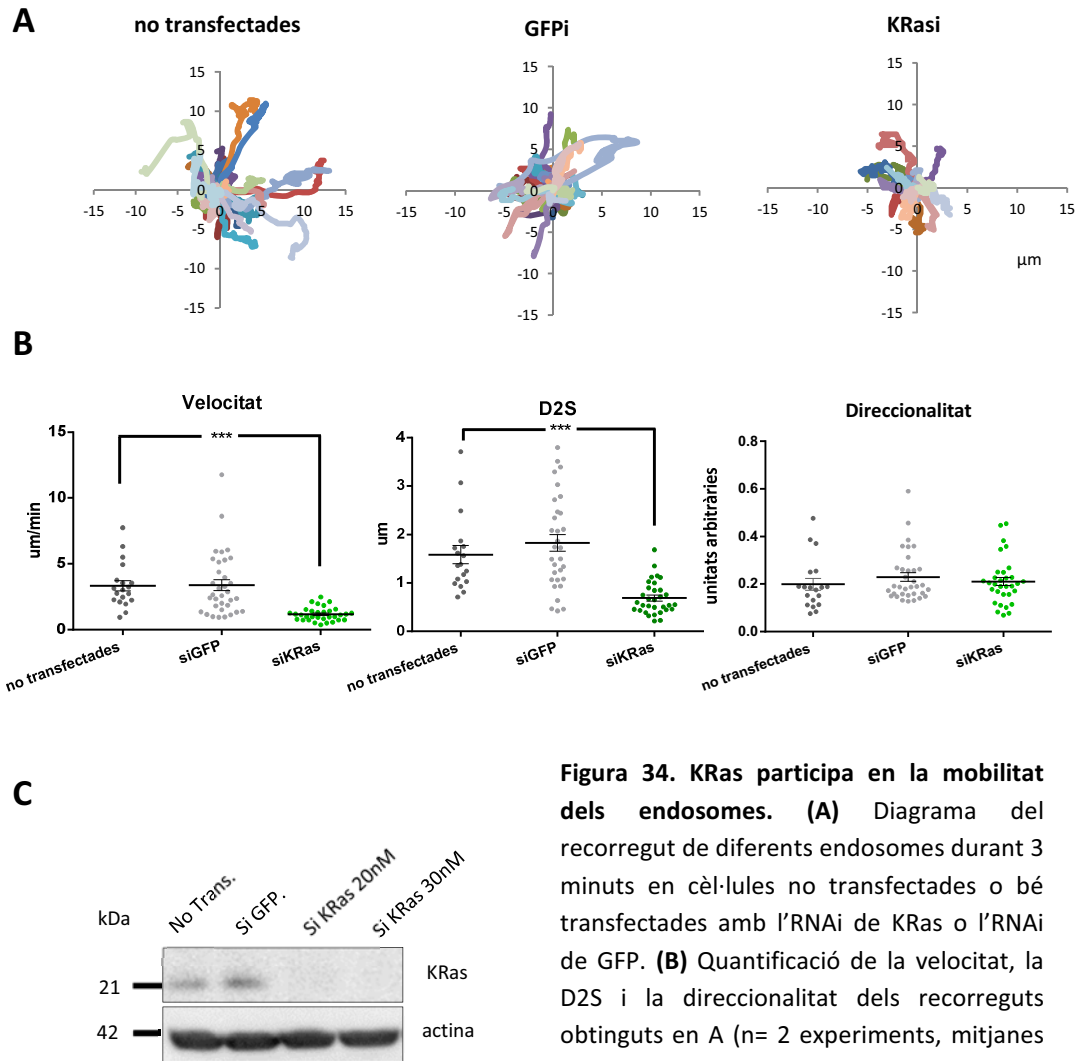
La direccionalitat dels endosomes es determina realitzant la relació entre la D2S (*distance to start*) i la longitud del recorregut (Fig 33). En cas que aquesta relació sigui propera a 1, es considera que hi ha direccionalitat en el moviment. Si per contra s'apropa a 0, es considera un moviment a l'atzar. En condicions normals s'espera que la majoria d'EE madurin a LE i que per tant, es dirigeixin des de la perifèria cel·lular cap a la zona perinuclear. En cap de les condicions, el moviment sembla estar direccionat. Això podria ser degut a un temps curt de captació d'imatges, el qual no ens permet arribar a veure la direcció d'aquests endosomes.



**Figura 33. Esquema representatiu de la relació entre els paràmetres D2S i longitud.** Si el resultat de la relació és proper a 0, es considera que el moviment és a l'atzar. Si, en canvi, el resultat és molt proper a 1, el moviment dels endosomes està direccionat.

Un cop demostrada la menor mobilitat dels endosomes primerencs quan es transfecta el dominant negatiu de KRas, es va determinar la importància del KRas endogen en la mobilitat d'aquest orgànuls. Així doncs, es va inhibir l'expressió del KRas endogen mitjançant l'RNAi de KRas. Es van transfectar cèl·lules COS-1 amb l'RNAi de KRas, o el control GFPi, i es van dur a terme experiments de moviment d'endosomes mitjançant videomicroscòpia.

Els resultats de la figura següent mostren que la mobilitat dels endosomes és molt menor en aquelles cèl·lules que l'expressió del KRas endogen està fortament inhibida (Fig. 34). Això estaria indicant un paper rellevant de la senyalització de KRas en la regulació de la mobilitat d'aquests orgànuls.



**Figura 34. KRas participa en la mobilitat dels endosomes.** (A) Diagrama del recorregut de diferents endosomes durant 3 minuts en cèl·lules no transfectedes o bé transfectedes amb l'RNAi de KRas o l'RNAi de GFP. (B) Quantificació de la velocitat, la D2S i la direccionalitat dels recorreguts obtinguts en A (n= 2 experiments, mitjanes ± SEM) (\*\*p<0.001). (C) Detecció per *western blot* dels nivells de KRas endogen després de 24 hores de transfecció amb els RNAi indicats.

### 3.2.2- Estudi del moviment dels endosomes en cèl·lules que expressen els diferents mutants 2xFYVEKRas

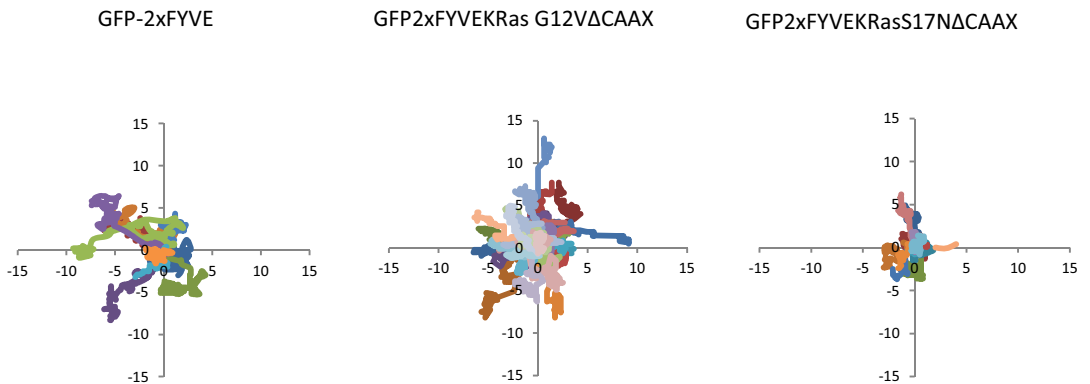
Un cop demostrat, en l'apartat 3.1, que els mutants de KRas dirigits als endosomes primerencs són perfectament vàlids per a l'estudi d'aquesta GTPasa en aquests orgànuls, es va procedir a analitzar com afectaven a la mobilitat dels endosomes.

Part d'aquest estudi es va realitzar en col·laboració amb el Dr. Giorgio Scita durant una estada breu al seu laboratori. Es van dur a terme experiments de mobilitat

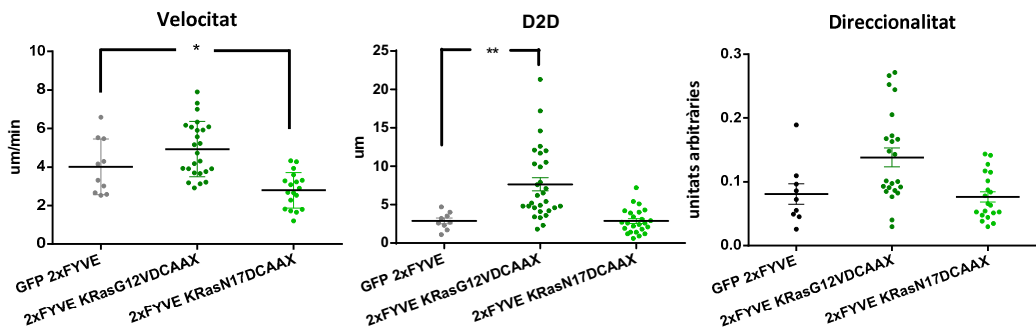
d'endosomes mitjançant tècniques de videomicroscòpia en els que es va fer servir un microscopi de *spinning disc* el qual està dissenyat per obtenir una adquisició molt ràpida d'imatges i permet, per tant, captar moviments ràpids d'endosomes que es mouen en diferents plans (Materials i Mètodes).

Així doncs, es van transfectar cèl·lules COS-1 amb els mutants 2xFYVE-KRas i es van tractar amb EGF-TRITC (20 minuts). Les imatges es van prendre durant 10 minuts. Els gràfics de la figura 35A mostren els diferents recorreguts dels endosomes positius pels diferents mutants i l'EGF-TRITC. Les diferències de mobilitat trobades en l'apartat 3.2.1 entre els endosomes de cèl·lules transfectades amb els mutants actiu i inactiu de KRas es mantenen quan el KRas està localitzat en els endosomes, essent menor la velocitat dels endosomes d'aquelles cèl·lules que sobreexpressen el dominant negatiu de KRas dirigit als endosomes primerencs (GFP-2xFYVE-KRasS17NΔCAAX). En la figura 34B es mostren les quantificacions dels diferents paràmetres obtinguts en els recorreguts: velocitat ( $\mu\text{m}/\text{min}$ ), distància neta recorreguda (D2S,  $\mu\text{m}$ ) i direccionalitat (D2S/longitud del recorregut).

**A**

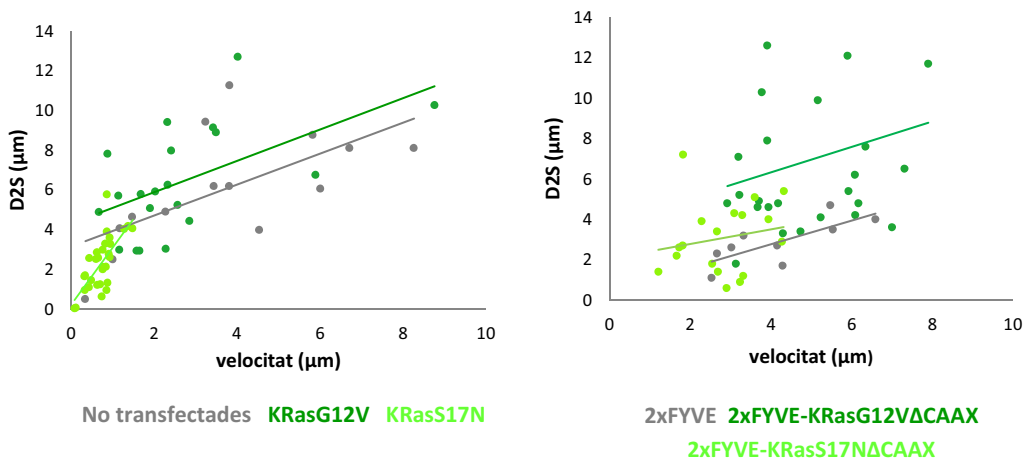


**B**



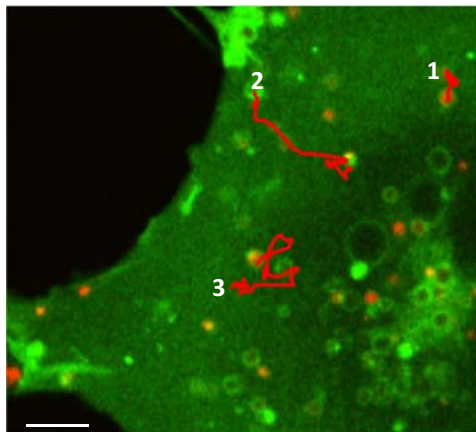
**Figura 35. El mutant actiu i l'inactiu de KRas dirigits als endosomes, afecten la mobilitat d'aquests orgànuls.** Cèl·lules COS-1 van ser transfectades amb els mutants de KRas dirigits als endosomes durant 24h i tractades amb EGF-TRITC després d'una hora de dejú. Les imatges van ser enregistrades cada 7 segons durant 10 minuts amb el microscopi spinning disc (n = 2), tal i com s'explica la secció de Materials i Mètodes. **(A)** Diagrames representant els diferents recorreguts dels endosomes positius per EGF-TRITC en cada condició experimental indicada. **(B)** Els gràfics mostren la velocitat, el direccionament i la D2S del moviment dels endosomes representats al panell A (n=15-20 endosomes, mitjanes ± SEM) (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01).

Dels gràfics anteriors també es conclou que, en cap cas, hi ha un direccionament dels endosomes, igual que passava al mesurar aquests paràmetres amb els mutants no dirigits als endosomes. En la figura 36 es representen les D2S i les velocitats per a cadascun dels endosomes en les diferents condicions experimentals i es pot observar que la velocitat i el recorregut dels endosomes són proporcionals, a més velocitat més recorregut fa un endosoma. Això passa tant en els mutants no dirigits com en els dirigits als endosomes.



**Figura 36. La D2S augmenta amb la velocitat dels endosomes.** Els gràfics representen la D2S vs la velocitat dels endosomes quantificats en les figures 32 i 35. Es mostren les línies de tendència en cada condició experimental.

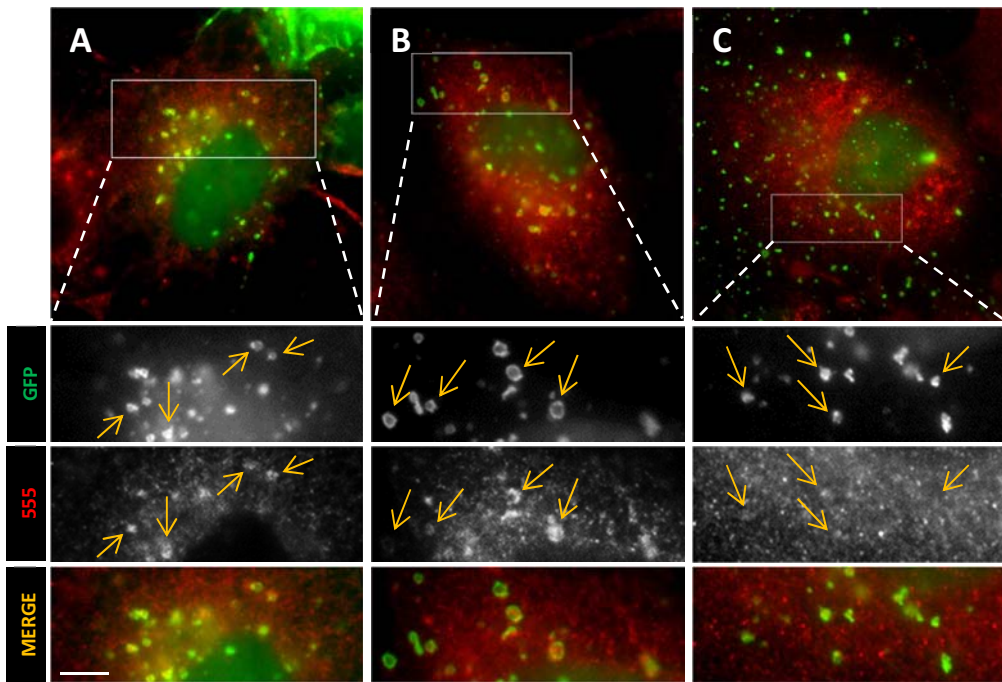
La majoria d'endosomes són altament dinàmics i capaços de moure's bidireccionalment al llarg del citosol. A més, alguns d'ells mentre es mouen poden aturar-se per uns segons i continuar després en la direcció on anaven, o fins i tot canviar la direcció (Fig. 37).



**Figura 37.** Imatge representativa dels diferents tipus de recorreguts que presenten els endosomes. (1) immòbil, (2) direccional cap al nucli, (3) aleatori i bidireccional. Cèl·lules COS-1 transfectades amb GFP-KRas G12V i tractades amb EGF-TRITC després d'una hora de dejuni. (Barra = 5 µm)

Segons els estudis fets en lisosomes per Cordonnier *et al.*, aquells que recorren distàncies més llargues ho fan a través dels microtúbuls, en canvi els moviments curts i aleatoris es donarien principalment gràcies al citoesquelet d'actina (Cordonnier *et al.*, 2001). Kaksonen *et al.* van demostrar mitjançant videomicroscòpia, com la cortactina impulsava els endosomes (Kaksonen *et al.*, 2000). Estudis més recents confirmen la implicació de la cortactina en el moviment dels endosomes ja que en la seva absència, la polimerització d'actina al voltant d'aquests orgànuls no es dona i, per tant, el moviment dels EE queda inhibit. Per tant, es descriu la cortactina com a proteïna reguladora de l'actina als EE (Ohashi *et al.*, 2011).

Amb aquests antecedents, es va comprovar la presència de cortactina al voltant dels endosomes. La cortactina es va detectar mitjançant la tècnica d'immunofluorescència en cèl·lules COS-1 transfectades amb els mutants actiu i inactiu de 2xFYVE-KRas i el seu respectiu control (GFP2xFYVE). La figura 38 mostra una major presència de cortactina al voltant dels endosomes positius per GFP2xFYVE-KRasG12VΔCAAX i per GFP2xFYVE respecte dels endosomes positius pel dominant negatiu (GFP2xFYVE-KRasS17NΔCAAX).



**Figura 38. Detecció de l'acumulació de cortactina al voltant dels endosomes positius pel mutant de KRas dirigit en aquests orgànuls.** Cèl·lules COS-1 plantades en cobreobjectes de 12 mm i transfectades amb GFP2xFYVE (A), GFP2xFYVE-KRasG12VΔCAAX (B) i GFP2xFYVE-KRasS17NΔCAAX (C) durant 24 hores. Tractament amb EGF durant 25 minuts. Detecció de cortactina per immunofluorescència amb anti-cortactina i el secundari Alexa-555, vermell (1/200) (Barra = 3µm).

Aquests resultats són preliminars i per tant, seran necessaris futurs experiments per a determinar la implicació de la cortactina, l'actina i els microtúbuls en les diferències observades en la mobilitat dels endosomes primerencs quan s'expressen els mutants actiu i inactiu de KRas. Tot i així apuntarien la possibilitat que el KRas actiu en els endosomes pogués regular la mobilitat dels endosomes a través de la modificació de l'associació dels endosomes al citoesquelet d'actina.

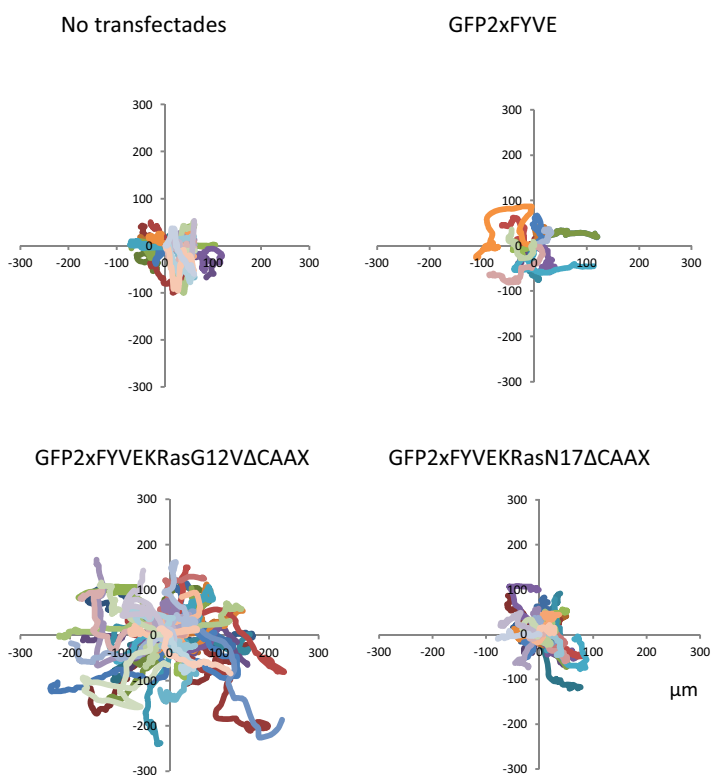
### 3.3- EFECTE DE L'EXPRESSIÓ DELS DIFERENTS MUTANTS DE 2xFYVEKRAS EN LA MOBILITAT CEL·LULAR

Diversos treballs relacionen els endosomes amb la mobilitat cel·lular. En aquest sentit es va analitzar el paper de KRas en la mobilitat cel·lular, es va escollir treballar amb cèl·lules Vero entre totes les altres línies cel·lulars testades (NIH-3T3, HeLa, COS-1)

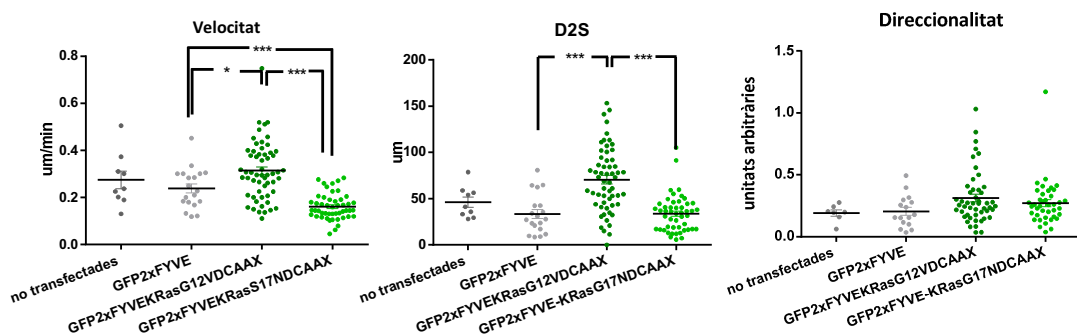
perquè presenten una mobilitat més elevada. Així doncs, es va analitzar el moviment de cèl·lules Vero que expressaven els diferents mutants de KRas dirigits als endosomes. Mitjançant microscòpia confocal, es van dur a terme experiments de videomicroscòpia durant 13 hores, tal i com es detalla a la secció de Materials i Mètodes.

Els resultats mostren com les cèl·lules que sobre expressen el mutant constitutivament actiu als endosomes (GFP-2xFYVEKRasG12VΔCAAX), tenen una major mobilitat (Fig. 39). En canvi, el dominant negatiu de KRas (GFP-2xFYVEKRasS17NΔCAAX) sembla que redueixi la mobilitat cel·lular.

**A**



**B**



**Figura 39. Diferències en la mobilitat cel·lular per l'expressió dels diferents mutants de 2xFYVEKRas.** Cèl·lules Vero van ser transfectades amb els diversos mutants de 2xFYVEKRas durant 24h i plantades en una cambra IBIDI de 8 pous 6 hores abans d'enregistrar el moviment cel·lular. Les imatges es van prendre cada 10 minuts durant 13 hores amb el microscopi confocal (Leica SP5). L'anàlisi del moviment es va realitzar mitjançant el programa Image J (n=2) (\*p < 0.1, \*\*\*p < 0.001).

### **3.4- IMPLICACIÓ DEL KRAS ENDOSOMAL EN LA DEGRADACIÓ DE LA MATRIU EXTRACEL·LULAR**

Diversos grups han descrit el paper dels endosomes en el transport i reciclatge de la metall proteasa MT1-MMP, la qual té una gran rellevància en la progressió de tumors. Aquesta proteïna és la gelatinasa més ben estudiada de la seva família i el seu paper en la invasió cel·lular ha estat àmpliament caracteritzat (Bravo-Cordero et al., 2007; Steffen et al., 2008; Williams and Coppolino, 2011).

#### **3.4.1- Distribució d'MT1-MMP en la membrana cel·lular**

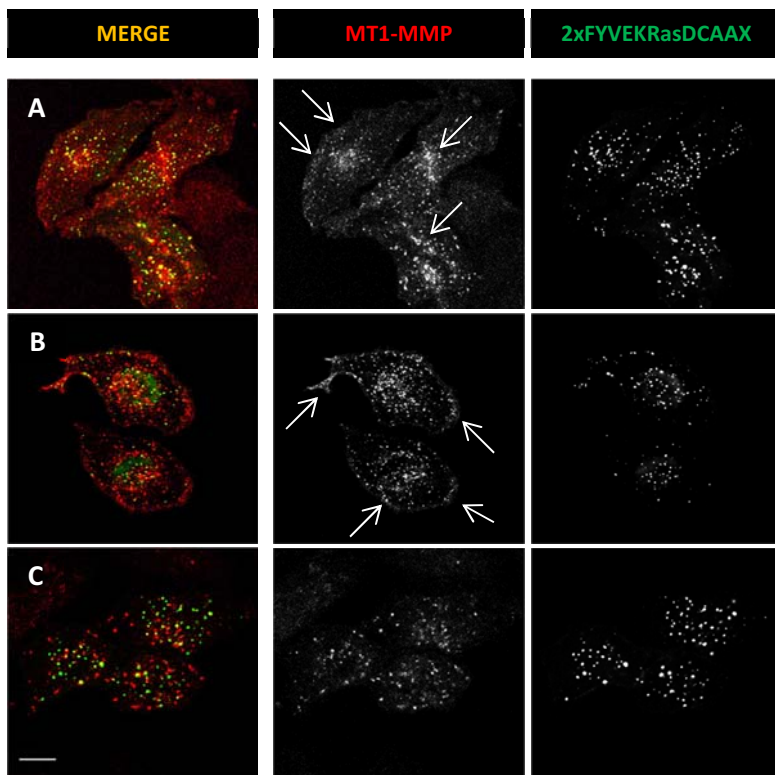
Ellerboek *et al.* descriuen que l'acumulació d'integrines a la membrana plasmàtica provoca una activació de MT1-MMP i que el fet que estigui localitzada en determinats llocs de la superfície cel·lular permet la interacció amb proteïnes de les adhesions focals (Ellerboek et al., 2001). Per altra banda Ueda *et al.* van demostrar que la inhibició de l'expressió d'MT1-MMP mitjançant RNAi era suficient per disminuir la capacitat invasiva de certes línies cel·lulars (Ueda et al., 2003). En aquesta part de la tesi es va plantejar la possibilitat que la senyalització de KRas pogués influenciar en la localització de l'MT1-MMP, ectòpicament expressada, a la membrana plasmàtica.

Per analitzar el possible paper de KRas en l'aport de la metall proteasa a la membrana plasmàtica, es va estudiar la localització de l'MT1-MMP en cèl·lules HeLa, que es caracteritzen per tenir poca quantitat de metall proteasa. Això permet estudiar aquesta proteïna mitjançant la transfecció d'MT1-MMP sense la interferència de la proteïna endògena.

Es van transfectar cèl·lules HeLa amb cherry-MT1-MMP i els diferents mutants de 2xFYVE-KRas. Es tractaren amb HGF durant 40 minuts per tal de donar temps a la metall proteasa de reciclar cap a la membrana (Remacle et al., 2003) i, un cop fixades les mostres, es va mirar la distribució de la cherry-MT1-MMP en la membrana basal de les cèl·lules per microscòpia confocal.

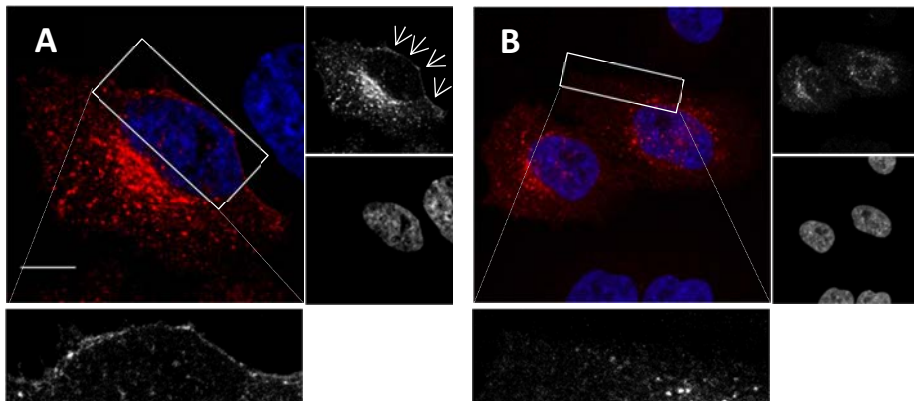


Els resultats mostren una menor presència d'MT1-MMP en la membrana plasmàtica de les cèl·lules que contenen el mutant inactiu de KRas en els endosomes, mentre en aquelles cèl·lules que contenen la forma activa de KRas, hi ha un lleuger augment de l'MT1-MMP (Fig. 40).



**Figura 40. Localització de MT1-MMP.** Cèl·lules HeLa co-transfectades amb cherry-MT1-MMP i GFP-2xFYVE (A), GFP-2xFYVEKRas $\Delta$ CAAX (B) o GFP2xFYVEKRasS17N $\Delta$ CAAX (C) i estimulades amb HGF durant 40 minuts. Les fletxes indiquen les zones de la membrana plasmàtica amb un augment de la metall proteasa. (Barra = 10  $\mu$ m)

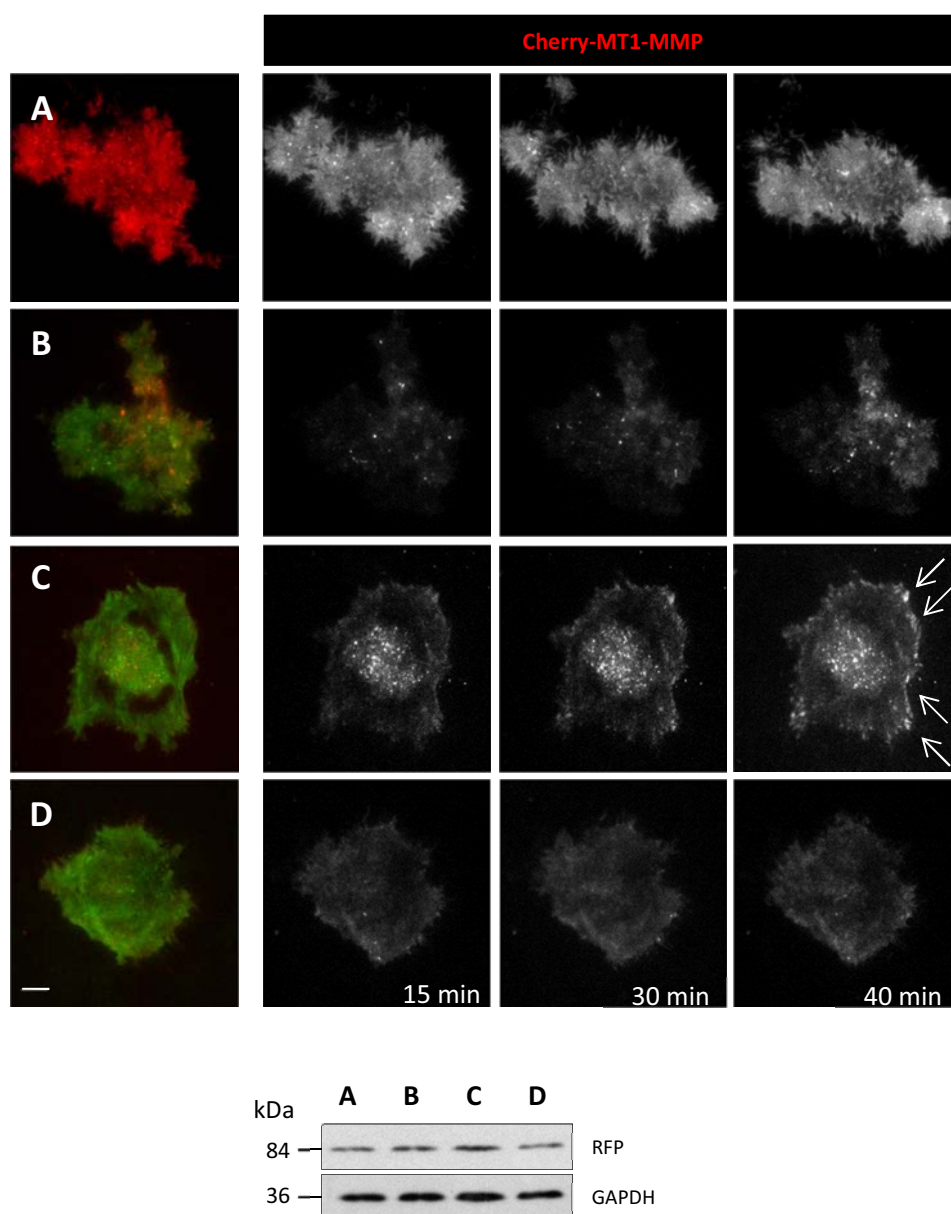
Al transfectar l'RNAi de KRas es va observar un efecte semblant a la transfecció del dominant negatiu de KRas abans comentat. Tal com es veu en les imatges de la figura 41, la inhibició de l'expressió de KRas provoca una menor localització d'MT1-MMP a la membrana plasmàtica.



**Figura 41. KRas és important per a la correcta localització d'MT1-MMP en la membrana plasmàtica.** Cèl·lules HeLa co-transfectades amb cherry-MT1-MMP i l'RNAi de GFP (A) o de KRas (B) durant 24 hores, dejunades i tractades amb HGF (100ng/ml, 40 minuts). (Barra =10  $\mu$ m)

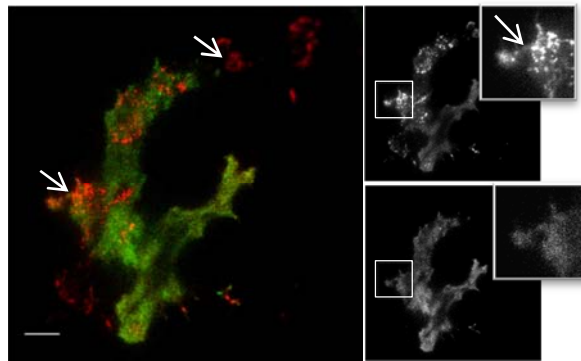
Per tal d'analitzar la incorporació *in vivo* de la metall proteasa a la membrana plasmàtica, es va fer ús d'un microscopi TIRF (*Total Internal Reflection Fluorescence*). Aquest microscòpi permet veure processos que tenen lloc a la membrana. En aquest cas es van agafar 150 nm de gruix de la cèl·lula. Es va fer un experiment de videomicroscòpia amb cèl·lules HeLa que expressaven els diferents mutants de KRas dirigits als endosomes primerencs i cherry-MT1-MMP, estimulades amb HGF durant els 40 minuts de duració del video.

Tal com mostren les imatges de la figura 42, hi ha un augment de la MT1-MMP a la membrana plasmàtica quan aquesta està co-transfectada amb GFP-2xFYVEKRasG12V $\Delta$ CAAX respecte el control 2xFYVE, després de 40 minuts d'estimulació amb el factor de creixement. En canvi, quan la metall proteasa està co-transfectada amb el dominant negatiu de KRas, la seva localització a la membrana plasmàtica és menor (Fig. 42).



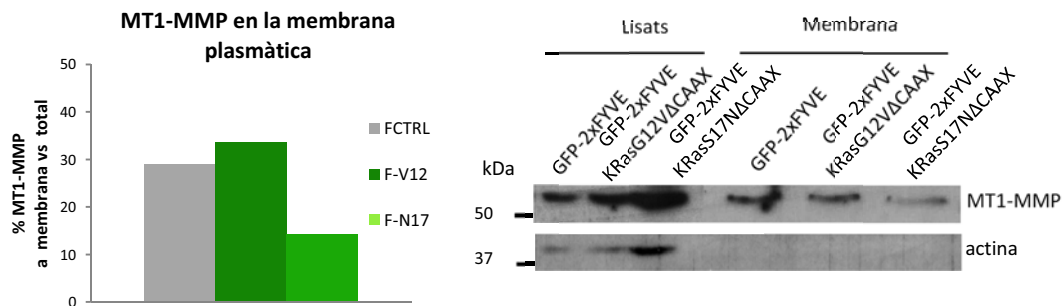
**Figura 42. Observació de la localització de MT1-MMP a la membrana plasmàtica per TIRF.** Cèl·lules HeLa transfectades amb cherry-MT1-MMP (A) i amb GFP-2xFYVE (B), o GFP-2xFYVEKRasG12VΔCAAX (C) o GFP-2xFYVEKRasS17NΔCAAX (D), tractades amb HGF durant 40 minuts després d'una hora de dejuni. Les imatges van ser adquirides amb un microscopi TIRF (Materials i Mètodes). Les fletxes blanques indiquen els llocs d'acumulació de MT1-MMP a la membrana plasmàtica. Els nivells d'expressió de cherry-MT1-MMP i dels diferents mutants de GFP-2xFYVE es van detectar mitjançant western blot amb els anticossos indicats (anti-RFP i anti-GAPDH, control) (Barra = 10 μm).

La degradació de la matriu extracel·lular (ECM) es dona gràcies, en part, a la formació d'invadopodis a la part ventral de les cèl·lules. Aquestes estructures s'observen fonamentalment en cèl·lules tumorals. Els invadopodis es caracteritzen per ser estructures força estables, que duren més d'una hora (Murphy and Courtneidge, 2011). La formació d'invadopodis només s'ha observat en cèl·lules HeLa transfectades amb l'MT1-MMP i el mutant actiu de KRas dirigit als endosomes (Fig. 43), mentre que no s'observa la formació d'aquests en transfectar la metallproteasa amb el control GFP-2xFYVE o el mutant inactiu de KRas dirigits als EE (dades no mostrades).



**Figura 43. Formació d'invadopodis en cèl·lules transfectades amb el dominant actiu de KRas als endosomes.** Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb GFP2xFYVEKRasG12VΔCAAX i tractades amb HGF durant 40 minuts després d'una hora de dejuni. Les fletxes blanques indiquen invadopòdis. Els requadres mostren la imatge ampliada d'aquestes estructures (Barra = 10 μm).

Aquestes diferències de nivells d'MT1-MMP en la membrana plasmàtica també van ser mesurades per tècniques bioquímiques, en aquest cas es van usar cèl·lules HT1080 de fibrosarcoma ja que tenen uns nivells endògens elevats de la metall proteasa. D'aquesta manera només calia transfectar el KRas dirigit als endosomes i veure'n l'efecte a la membrana plasmàtica. Mitjançant fraccionament cel·lular i gradients de sucrosa es varen obtenir fraccions enriquides de membrana plasmàtica d'aquestes cèl·lules (veure Materials i Mètodes). Seguidament es van quantificar els nivells d'MT1-MMP de les fraccions que contenien la membrana plasmàtica respecte el lisat total mitjançant densitometria (Fig 44). Tot i que és només un experiment preliminar, s'observa que quan el KRas present a endosomes està en la seva forma inactiva, la quantitat d'MT1-MMP a la membrana és menor. Aquests resultats estan d'acord amb l'anàlisi per microscopia TIRF mostrats anteriorment.



**Figura 44. La inhibició de KRas fa disminuir els nivells de MT1-MMP en la membrana plasmàtica en cèl·lules HT1080.** Cèl·lules HT10880 sembrades en plaques de 150 mm i transfectades amb els diferents mutants de KRas indicats. Les cèl·lules van ser tractades amb EGF (100 ng/ml) durant 40 minuts i, posteriorment es va procedir a fer un enriquiment de membrana plasmàtica mitjançant un fraccionament cel·lular per gradient de sacarosa (Materials i Mètodes).

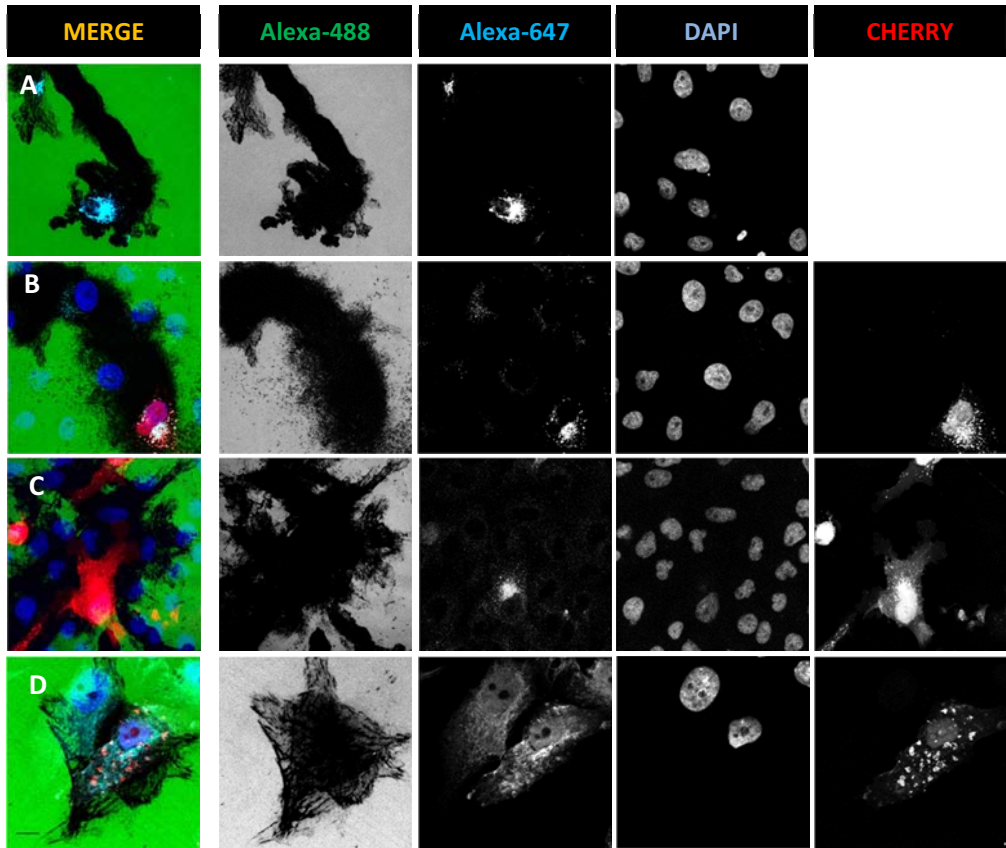
### 3.4.2- Estudi de la degradació de la matriu extracel·lular

Les diferències en la localització de l'MT1-MMP en la membrana plasmàtica, observades en les diferents condicions experimentals, poden comportar canvis en la degradació de la matriu extracel·lular (ECM). Un mètode àmpliament utilitzat per determinar aquests canvis és analitzar la degradació de gelatina fluorescent gràcies a l'activitat gelatinasa que presenta MT1-MMP.

La tècnica es basa en plantar cèl·lules en cobreobjectes que prèviament havien estat coberts amb gelatina conjugada a un fluoròfor, en aquest cas Alexa-488 o Alexa-594 (Materials i Mètodes), i analitzar la pèrdua de fluorescència per microscòpia. Es van usar cèl·lules Vero co-transfectades amb HA-MT1-MMP i els cherry2xFYVE-KRas $\Delta$ CAAX corresponents, 24 hores després d'haver sembrat les cèl·lules en els cobreobjectes, es van tractar amb EGF durant 40 minuts per estimular l'activació de la metall proteasa i es van deixar que duguessin a terme la degradació abans de fixar-les. La detecció de la metall proteasa es va fer per immunofluorescència, usant un anticòs anti-HA i un anticòs secundari conjugat amb Alexa-647.

Les imatges següents demostren que les cèl·lules Vero transfectades amb HA-MT1-MMP tenen una gran capacitat de degradació, i com aquesta es veu incrementada quan les cèl·lules co-expressen la metall proteasa amb el mutant actiu de KRas (GFP-2xFYVEKRasG12V $\Delta$ CAAX). En canvi, les cèl·lules que sobreexpressen el mutant inactiu (GFP-2xFYVEKRasS17N $\Delta$ CAAX) presenten uns nivells de degradació de la gelatina molt menors (Fig 45).

A



B

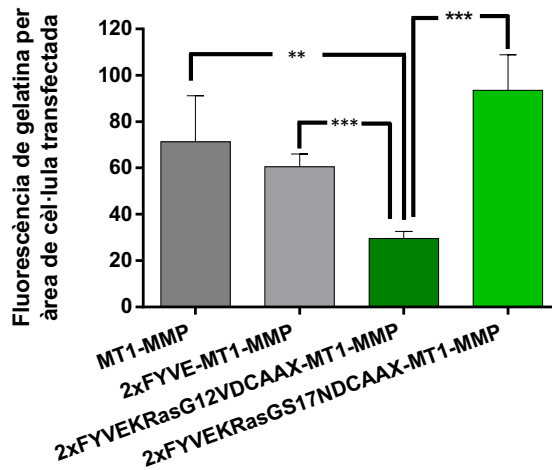
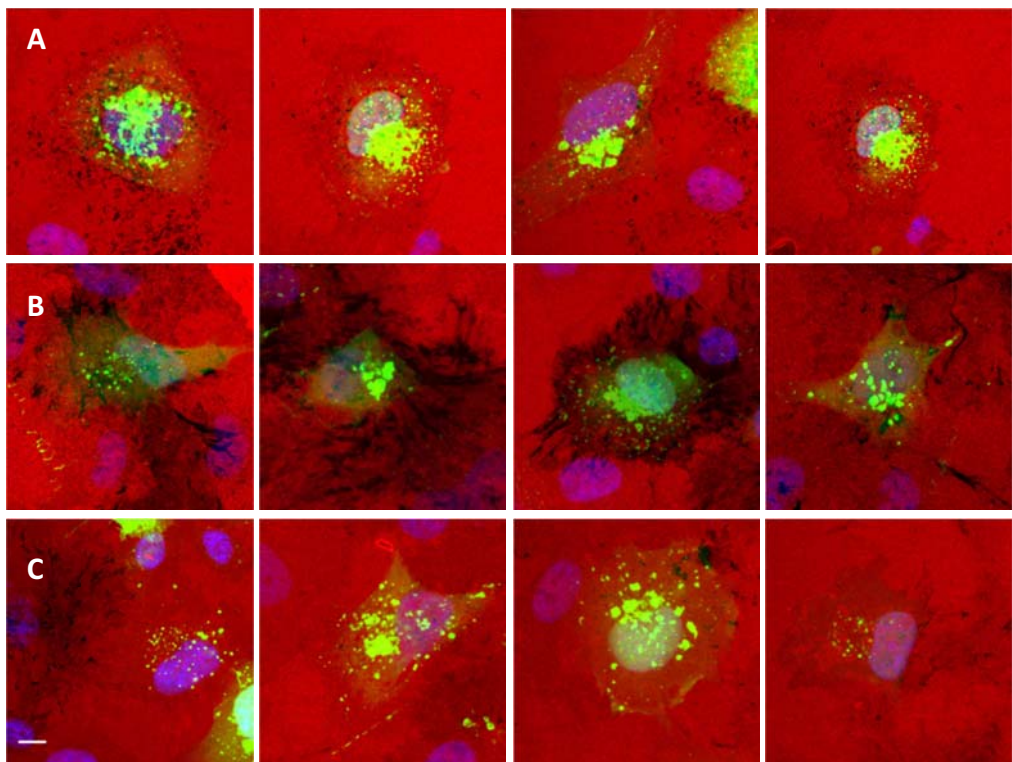


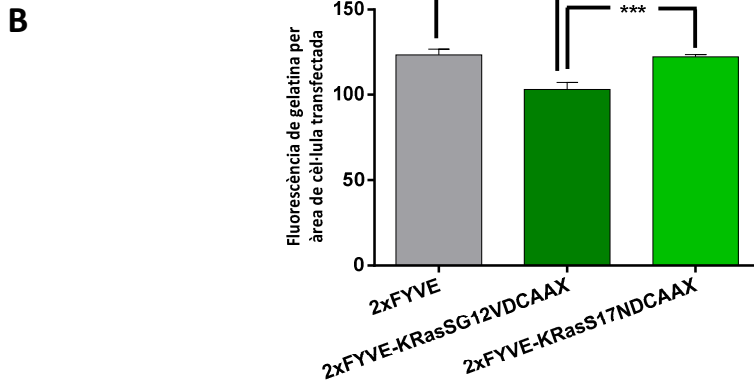
Figura 45. El dominant actiu de KRas augmenta la degradació a través de MT1-MMP en cèl·lules Vero. (A) Cèl·lules Vero transfectades amb HA-MT1-MMP (A) i cherry-2xFYVE (B), cherry-2xFYVEKRasG12VΔCAAX (C) o cherry-2xFYVEKRasS17NΔCAAX (D). La degradació es va

dur a terme durant 16 hores. Es va fer un tractament amb EGF durant 40 minuts prèviament a la fixació dels cubreobjectes. Detecció de la metall proteasa amb l'anticòs anti-HA i un secundari conjugat amb Alexa-647. (Barra = 10 µm) **(B)** Quantificació de la fluorescència de la gelatina en cada condició (\*p < 0.05) (n =2 ).

Per tal d'evitar la variabilitat dels nivells de metall proteasa condicionats a les transfeccions transitòries, es va decidir repetir els mateixos experiments amb cèl·lules que tinguessin nivells endògens elevats d'MT1-MMP, tals com les HT1080. El resultat obtingut va ser el mateix que per a les cèl·lules Vero, tot i que la degradació de l'ECM és menor que quan es transfecta la metall proteasa com anteriorment s'ha descrit. S'ha de tenir present que el temps de degradació per a les HT1080 va ser de 6 hores. La figura següent mostra la degradació de la gelatina quan es transfecten les cèl·lules HT1080 amb els diferents mutants 2xFYVEKRasΔCAAX. A la figura s'observa una major degradació de la gelatina en aquelles cèl·lules que sobreexpressen el mutant actiu de KRas als endosomes (GFP-2xFYVEKRasG12VΔCAAX).

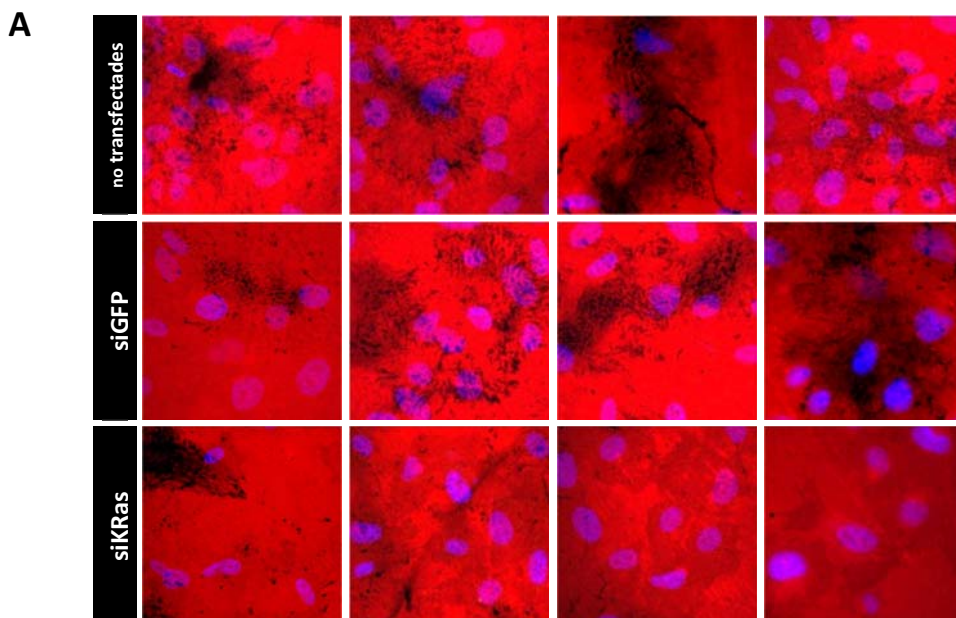
**A**



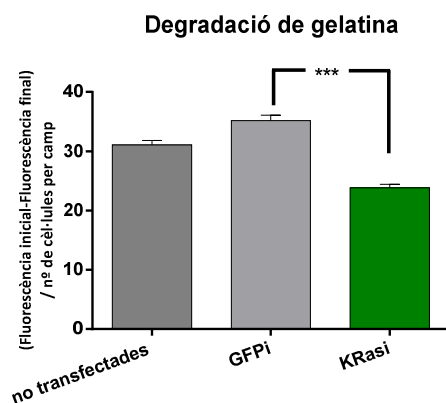


**Figura 46. El mutant actiu de KRas augmenta la degradació de la gelatina en cèl·lules HT1080.** (A) Cèl·lules HT1080 transfectades amb GFP-2xFYVE (A), GFP-2xFYVEKRasG12VΔCAAX (B) o GFP-2xFYVEKRAS17NΔCAAX (C). Després de 5 hores d’haver plantat les cèl·lules en cobreobjectes recoberts de gelatina fluorescent, les cèl·lules es van dejunar una hora i estimular amb EGF durant 40 minuts. Posteriorment es van fixar i muntar per a la seva observació al microscopi d’epifluorescència (Materials i Mètodes) (Barra = 10 μm). (B) Quantificació normalitzada de la fluorescència de la gelatina en cada condició (n = 2) (\*\*\*) p < 0.001).

Per últim es va voler confirmar la rellevància que tenia KRas en la degradació de l’ECM i per això es van transfectar cèl·lules HT1080 amb l’RNAi de KRas i el seu control (GFPi). Resultats encara preliminars de la figura 47 indiquen com l’absència de KRas en les cèl·lules impedeix que aquestes puguin degradar correctament la matriu extracel·lular.





**B**

**Figura 47. KRas és important per a la degradació de la matriu extracel·lular. (A)** Cèl·lules HT1080 transfectades o no amb els RNAi de GFP o KRas. Les cèl·lules es van plantar 6 hores abans de ser fixades. Després de cinc hores, es van dejunar durant una hora en medi DMEM 0%, i seguidament es van tractar amb EGF (100 ng/ml) durant 40 minuts. Posteriorment es van fixar i muntar per a la seva observació al microscopi d'epifluorescència (Materials i Mètodes). (Barra = 10  $\mu$ m). **(B)** Quantificació normalitzada de la fluorescència de la gelatina no degradada en cada condició (n = 2) (\*p < 0.05).

Serán necessaris experiments addicionals per tal d'esbrinar la influència de la senyalització i localització de KRas en els endosomes en la presència i l'activitat de la MT1-MMP a la membrana plasmàtica.

## DISCUSSION



Així com s'ha fet en l'apartat de resultats, la discussió s'estructura en tres apartats. En els dos primers s'analitzen els resultats referents al reclutament i la dinàmica de KRas en els endosomes mentre que en el tercer s'aprofundeix en l'anàlisi de l'estudi de les funcions de KRas en diversos processos cel·lulars.

## 1- RECLUTAMENT DE KRAS ALS ENDOSOMES

Els resultats obtinguts demostren que el reclutament de KRas als endosomes primerencs no és dependent del seu estat d'activació ja que, tant si el KRas es troba en la seva forma activa o inactiva, pot trobar-se a la membrana d'aquests orgànuls en igual proporció.

En estudis previs realitzats al nostre laboratori es va descriure la presència de KRas al llarg de la via endocítica i com aquesta localització podia afavorir la seva capacitat de senyalització (Lu et al., 2009). En la figura 1 de l'apartat 1.1 d'aquesta tesi, s'observa un petit increment del reclutament del KRasG12V respecte el KRasS17N en els endosomes primerencs. Aquestes diferències, tot i no ser significatives, podrien ser degudes a l'activació de RIN1 a través de KRasG12V. Estudis realitzats per Tall *et al.* demostren que l'activació de Rab5 per RIN1, a través del Ras actiu, augmenta la fusió entre endosomes i per tant la superfície d'aquests (Tall et al., 2001). Per tant, les diferències observades mitjançant tècniques bioquímiques i de microscòpia, podrien venir donades per un augment de superfície endosomal al expressar el dominant actiu de KRas.

Els percentatges de KRas endosomal trobats per tècniques bioquímiques o de microscòpia no són exactament iguals, essent més elevats en el cas del fraccionament cel·lular. Aquest biaix es pot entendre si es té en compte que, mentre en els experiments realitzats per microscòpia només es tenien en compte els endosomes primerencs marcats amb EGF-TRITC, en el fraccionament cel·lular es mesuren conjuntament les dues poblacions d'endosomes, EE i LE.

Els resultats obtinguts juntament amb els descrits per Lu *et al.* (Lu et al., 2009), proporcions similars de KRas endògen o l'expressat ectòpicament en el compartiment endocític, validen el fet de treballar amb aquests mutants de KRas fusionats a la proteïna fluorescent verda (GFP) per estudiar-ne les diferents dinàmiques en els endosomes.

S'ha descrit que per la correcta localització de KRas en la membrana plasmàtica és necessària tant la seva regió polibàsica com el grup farnesil que es troben a l'extrem C-terminal de la proteïna. En l'apartat 2.1 es mostra la importància d'aquesta regió de sis lisines així com també de la seqüència CAAX de KRas per conduir

la proteïna cap a la membrana dels endosomes. A més, el mutant de KRas que conté la regió polibàsica neutralitzada (KRasPBR6KG) presenta una localització força perinuclear. S'ha intentat col·localitzar aquest mutant amb marcadors del reticle endoplasmàtic (RE), l'aparell de Golgi i dels cossos lipídics però els resultats van ser negatius. Recentment, però, el grup del Dr. Philippe Bastiaens ha descrit que la localització perinuclear d'aquest mutant coincideix amb els endosomes de reciclatge positius per Rab11. Aquest mutant, a diferència del KRas *wild type*, es dissocia fàcilment de totes les membranes gràcies a la PDE $\delta$ , localitzant-se majoritàriament en el citosol i també en el compartiment de reciclatge on es troba Arl2/3 que promou la dissociació del complex KRas-PDE $\delta$  (veure secció Introducció, figura 13). Tot i que en aquesta tesi no s'ha observat una influència de la PDE $\delta$  en la dinàmica de KRas (*wild type*, actiu o inactiu) (veure apartat 2.4.3, secció de Resultats), no es pot excloure que tingui un paper rellevant en la solubilització de KRasPBR6KG.

## 2- ESTUDI DE LA DINÀMICA D'ASSOCIACIÓ-DISSOCIACIÓ DE KRAS EN ELS ENDOSOMES

En aquest capítol s'ha descrit com la ràpida associació-dissociació de KRas en la membrana dels endosomes primerencs es dona en qüestió de segons, i com es veu afectada pel seu estat d'activació. També es posa de manifest la importància de la regió polibàsica (PBR) de KRas per a la seva dinàmica en aquests orgànuls. Contràriament al que es demostra en els endosomes en aquesta tesi, els estudis de Silvius *et al.* mostren com, a partir de l'heterodimerització dependent de rapamicina de FRB2-CFP-KRas i mitoRFP-FKBP3, la dissociació de KRas de la membrana plasmàtica es dona en l'ordre de minuts. Els mateixos autors comentaven que la cinètica de permeabilització de la rapamicina podia estar influenciant en aquesta lenta dissociació observada de KRas de la membrana plasmàtica (Silvius *et al.*, 2006). De fet són diversos els grups que descriuen un bescanvi ràpid de KRas entre la membrana plasmàtica i el citosol (HT~ 1,5 s) (Yokoe and Meyer, 1996). Aquests resultats estan amb línia amb els obtinguts per Leventis i Silvius on, mitjançant models de vesícules *in vitro*, descriuen que la regió hipervariable de KRas interacciona amb les bicapes lipídiques de vesícules de manera molt ràpida, amb una HT de l'ordre de segons (Leventis and Silvius, 1998).

Pel que fa a la difusió lateral de KRas en la membrana plasmàtica i el seu bescanvi amb el *pool* de KRas citosòlic també hi ha controvèrsia en la literatura. De fet Niv *et al.* postulen que la dinàmica de KRas en la membrana plasmàtica ve donada per la difusió lateral en aquesta i no pas per un intercanvi amb el citosol (Niv *et al.*, 1999). Posteriorment, Vartak *et al.* indicaven que aquesta difusió lateral pot veure's modificada per les modificacions post-traduccionals que pateix KRas (Vartak and Bastiaens, 2010). En aquest context, aquesta tesi mostra un bon model *in vivo* per a analitzar el bescanvi de KRas entre el citosol i la membrana dels endosomes mitjançant FRAP, ja que la difusió lateral s'ha evitat en fotoapagar els endosomes sencers. Per tant, la ràpida recuperació de KRas en la membrana d'aquests orgànuls molt probablement és deguda a l'arribada de KRas directament des del citosol.

A diferència del KRas4B, la isoforma KRas4A no conté la cua polibàsica de sis lisines a l'extrem C-terminal sinó que només té tres càrregues positives i, a més, pot palmitoïllar-se en aquesta regió, obtenint així la segona senyal per a poder localitzar-se i estabilitzar-se a les membranes. La cua polibàsica i el grup palmitoïl faciliten la localització de KRas4A a la membrana plasmàtica (Laude and Prior, 2008). En la secció de Resultats (apartat 2.2) es mostra com el KRas4A té un recanvi més lent i menor amb el citosol que no pas el KRas4B. El HT més elevat i la menor MF podrien ser degudes a que, gràcies al grup palmitoïl que conté, pot quedar més retingut en la membrana

endosomal. En canvi, la recuperació del mutant de KRas4A no palmitoilable (GFP-KRas4A-C180A), és molt ràpida i gairebé es recupera en la seva totalitat en els endosomes. Aquests resultats reforcen la idea que la part C-terminal de KRas està implicada en la ràpida recuperació. Aquesta ràpida recuperació es deu al fet que no conté el grup palmitoil que l'ancora a la membrana lipídica dels endosomes com té el KRas4A. A més, el mutant no palmitoilable té una cinètica de dissociació de la membrana endosomal més ràpida que no pas el KRas4B, que tampoc pot palmitoilarse però que conté una cua polibàsica de sis lisines enlloc de les tres que conté el GFP-KRas4A-C180A. Per tant, aquesta ràpida recuperació del mutant no palmitoilable de KRas4A es pot entendre si es té en compte que conté una menor càrrega neta positiva a la regió PBR que li permet interaccionar amb la membrana de l'endosoma de manera més dèbil. Aquests resultats estan en consonància amb el estudi de Laude *et al.* on descriuen la importància de la palmitoilació en la regió hipervariable de les proteïnes Ras per a la seva localització subcel·lular (Laude and Prior, 2008). Una altra evidència de la importància de la càrrega neta positiva de les sis lisines de la cua polibàsica per a la dinàmica de KRas en els endosomes, es mostra amb els experiments de FRAP amb el mutant GFP-KRasPBR3KQ. Aquest mutant, el qual conté només tres de les sis lisines en aquesta regió, té una recuperació més ràpida en la membrana dels endosomes que el KRaswt probablement degut a la seva menor interacció amb els lípids negatius de la membrana dels endosomes.

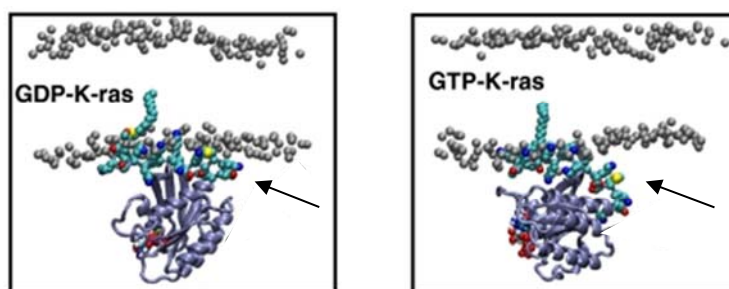
Els estudis de *Silvius et al.* demostren que la forma inactiva de KRas té una dissociació més ràpida de la membrana plasmàtica que no pas la forma activa (Silvius et al., 2006). Aquests resultats, aparentment contradictoris amb els obtinguts en aquesta tesi en la membrana dels endosomes, es poden explicar tenint en compte els estudis posteriors d'aquest grup on mostren com la galectina-3 inhibeix la dissociació de KRasG12V de la membrana plasmàtica (Silvius et al., 2006). Aquests resultats es basen en altres experiments on es descriu la galectina-3 com una xaperona de KRas que pot unir-se al grup farnesil d'aquest quan està a la membrana plasmàtica (Ashery et al., 2006) i que s'uneix selectivament a la forma activa de KRas (Elad-Sfadia et al., 2004). Aquesta podria ser la causa que, en la membrana plasmàtica, la forma activa de KRas quedi més retinguda que no pas la inactiva. En els endosomes no s'ha descrit la presència de la galectina-3 i, per tant, no existiria una major retenció del KRas actiu respecte de l'inactiu. De fet, en els endosomes s'observa precisament el contrari.

Les diferències observades entre les dinàmiques de la isoforma de KRas en els seus diferents estats d'activació, no s'han vist en altres GTPases com HRas o Rac1. En el cas de l'HRas, els resultats coincideixen amb el que s'ha descrit, mentre que la unió de GTP promou la difusió lateral d'HRas, des dels lípids *raft* cap als *non-raft*, la seva influència en la dissociació de la membrana plasmàtica és mínima (Gorfe et al., 2007). Això s'explicaria per la presència dels dos grups palmitoils a la regió C-terminal d'HRas,

que no presenta KRas i que, en establir fortament HRas a la membrana, impedeix els efectes provocats per l'estat d'activació. Aquests grups lipídics faciliten la unió amb la bicapa lipídica dels endosomes. De fet, la dissociació d'HRas d'aquesta bicapa depèn del seu cicle d'acilació, el qual és independent del seu estat d'activació (Rocks et al., 2005).

En el cas de Rac1, que tampoc presenta diferències en la dissociació dels dos mutants, també s'ha descrit que pot palmitoïlar-se, fet que explicaria la major afinitat per la membrana dels endosomes que no pas KRas (Navarro-Lerida et al., 2012). A més, Rac1 presenta un grup geranil a l'extrem C-terminal. Aquest grup lipídic, al tenir més carbonis (20C), facilita una interacció més forta de la proteïna a la membrana d'aquests orgànuls. Aquest fet estaria provocant que Rac1 fos més resident que no pas KRas, la qual presenta només un grup lipídic en aquesta regió de només 15 carbonis. Per tant, les dues modificacions post-traduccionals de Rac1 podrien explicar la menor MF en la membrana dels endosomes primerencs. De fet, el mutant de KRas geranilat (KRas-geranil) no presenta diferències entre els mutants actiu i inactiu, probablement degut a la presència d'aquest grup lipídic que estaria unint amb major intensitat KRas a la membrana. No es pot descartar, però, que aquestes diferències entre els mutants es segueixin donant, tot i que en menor grau, però que degut a la sensibilitat del FRAP, en les nostres condicions experimentals, no es puguin determinar.

Abankwa *et al.* mostren imatges de com l'orientació de la regió PBR de KRas respecte la membrana plasmàtica canvia segons la proteïna estigui en estat actiu o inactiu (unida a GTP o GDP respectivament), essent la orientació d'aquesta cua més lliure respecte a la membrana quan KRas es troba unit a GTP (Fig. 1) (Abankwa et al., 2010). Els seus resultats posen de manifest el fet que segons l'estat d'activació de KRas, aquest podria unir-se amb més o menys afinitat a la membrana dels endosomes. (veure figura 13, resultats apartat 2.3.1).



**Figura 1.** L'orientació de la regió PBR de KRas canvia segons estigui unit a GTP/GDP. Adaptat de (Abankwa et al., 2010).



Les diferències en les dinàmiques dels mutants actiu i inactiu de KRas en els endosomes es podrien explicar per la implicació d'alguna proteïna que interaccioni de manera diferent amb KRas segons el seu estat d'activació. Donat que les proteïnes GEFs són les encarregades de bescanviar el GDP pel GTP, i que Sos1 és una de les GEFs més ben caracteritzades de KRas, es va plantejar la hipòtesi que aquesta pogués modificar la seva dinàmica. Els resultats de FRAP sobreexpressant Sos1 i KRas, juntament amb la ràpida i gairebé total recuperació de Sos1 en la membrana endosomal, descarten la implicació d'aquesta GEF en l'associació-dissociació de KRas en els endosomes primerencs.

Diversos grups han demostrat que la interacció de diferents proteïnes d'unió a la regió PBR o al farnesil, així com canvis post-traduccional produïts en la regió PBR, poden modular l'associació de KRas a la membrana plasmàtica, tals com la CaM o la PDEδ (Chandra et al., 2012; Fivaz and Meyer, 2005). Els resultats presentats demostren la importància de la fosforilació en la Ser-181 de KRas en la dinàmica de la proteïna en els endosomes. El fet que el dominant negatiu de KRas mimètic de fosforilació (GFP-KRasS17NS181D) tingui una dinàmica semblant al mutant actiu de KRas (GFP-KRasG12V), suggereix que la fosforilació pot estar impedita i que és possible que el KRas actiu, a diferència de l'inactiu, es trobi majoritàriament fosforilat.

Anteriorment al nostre Departament s'ha descrit que la fosforilació de la Ser-181 de KRas inhibeix la seva unió amb la CaM (Lopez-Alcala et al., 2008). També s'ha demostrat que la CaM afavoreix la dissociació de KRas de la membrana plasmàtica (Bhagatji et al., 2010; Fivaz and Meyer, 2005). En aquesta tesi es mostra aquest mateix efecte en la membrana dels endosomes ja que, en absència de CaM, el recanvi de KRas en la membrana d'aquests orgànuls és menor quan KRas no és fosforilable. En canvi, quan KRas es troba fosforilat, la presència de la CaM no afecta el seu recanvi. Així es postula que la CaM s'estaria unint a la regió PBR quan aquesta no està fosforilada provocant una major dissociació de KRas en la membrana dels endosomes ja que, molt probablement, aquesta unió dificultaria la interacció entre les càrregues positives de la PBR de KRas i els lípids negatius de la membrana dels endosomes.

Recentment, s'ha descrit la PDEδ com una proteïna solubilitzadora de KRas, dissociant-lo de la membrana plasmàtica. La PDEδ uneix el grup prenil de les proteïnes Ras i s'ha descrit que la seva sobreexpressió augmenta, mentre que la seva inhibició disminueix, l'associació de KRas de la membrana plasmàtica. Però les dinàmiques d'associació-dissociació són similars per als mutants actiu i inactiu de KRas (Bhagatji et al., 2010). Això descartaria la PDEδ com a responsable de les diferències entre les dinàmiques dels mutants de KRas en la membrana plasmàtica. Tot i així, el grup del Dr. Philippe Bastiaens descriu que KRas, es troba fortament unit a la membrana plasmàtica i que no interacciona amb la PDEδ expressada ectòpicament. Mostren com el mutant

actiu fosforilat de KRas perd afinitat per la membrana plasmàtica en sobreexpressar la PDE $\delta$  (Chandra et al., 2012). De fet, quan KRas es troba fosforilat a la Ser-181 de la regió PBR, la seva afinitat per la membrana dels endosomes disminueix (veure apartat 2.4.3). Per tant els resultats mostrats per Chandra *et al.* encaixarien en la hipòtesi que es proposa en aquesta tesi, on la fosforilació de la Ser-181 de KRas promou una dissociació més ràpida de la membrana dels endosomes i que, a més, la majoria del KRas que es troba en els endosomes deu estar fosforilat. En els experiments detallats en l'apartat 2.4.3 es demostra que, en la membrana dels endosomes primerencs, la PDE $\delta$  no influeix en la dinàmica de KRas ja que la inhibició de la seva expressió no altera els paràmetres de HT i MF de cap dels mutants de KRas (KRasG12V, KRasG12VS181D o KRasG12VS181A). Els resultats obtinguts en aquesta tesi en cèl·lules COS-1, es veuen reforçats per experiments duts a terme en cèl·lules HepG2 (resultats no mostrats) que es caracteritzen per no tenir PDE $\delta$  (Wilson and Smyth, 2006), on veuen diferències en les dinàmiques dels mutants actiu i inactiu de KRas. Així doncs, almenys en les condicions experimentals dutes a terme en aquesta tesi, es pot descartar la PDE $\delta$  com a moduladora de la dinàmica de KRas en els EE.

Una altra aproximació per determinar si la interacció d'alguna proteïna o lípid dels endosomes podia estar intervenint en la dinàmica diferencial entre el KRas actiu i inactiu en aquests orgànuls ha estat el direccionament de KRas a la membrana dels endosomes primerencs. Per a dur-ho a terme, es va fer ús de la seqüència 2xFYVE. En introduir aquesta seqüència a l'extrem N-terminal i deleccionar la seqüència CAAX dels diferents mutants (actiu i inactiu) de KRas, les diferències en la recuperació entre els mutants desapareixia. Aquests resultats demostren que la inserció i el reclutament a la membrana dels endosomes mitjançant la regió polibàsica i el grup farnesil de KRas és necessària per a que les diferències entre els mutants actiu i inactiu de KRas puguin donar-se.

Després d'observar la necessitat de la regió C-terminal de KRas per a la seva dinàmica, es va voler comprovar si la part globular de la proteïna podia estar igualment implicada en la seva associació. Els resultats mostren com el mutant GFP-tK, que només conté els últims 17 aminoàcids de KRas, es comporta de manera similar que el mutant inactiu de KRas. Aquest resultat demostra com la unió de GTP a la part globular de KRas és necessària per observar el canvi en les dinàmiques d'associació a la membrana dels mutants de KRas. Així doncs es pot concloure que ambdues parts (N- i C-terminal) estan implicades en la dinàmica de KRas. Possiblement el fet que el GTP s'uneixi a la proteïna està influenciant en la cua C-terminal, ja sigui provocant un canvi conformacional i deixant la regió polibàsica més exposada tal i com mostren les simulacions d'Abankwa *et al.* (Abankwa et al., 2010) (Fig. 1) o bé influenciant en certes modificacions post-traduccional de la proteïna o bé potenciant la unió d'altres proteïnes a l'extrem C-terminal de KRas que puguin modular la seva dinàmica.

La membrana dels endosomes, tal com es detalla en la Introducció, és rica en fosfolípids negatius on KRas podria unir-se potencialment. En aquesta tesi s'ha mostrat, tant amb experiments amb wortmanina, de FRET com amb assajos de competició per bioquímica, que KRas té preferència per unir-se a la PS abans que als PI3P. Tot i així, la implicació de PI3P en la dinàmica d'associació de KRas no pot descartar-se ja que, en absència de PS molt probablement podria unir-se a d'altres fosfolípids i, com que els PI3P tenen una gran presència en la membrana d'aquests orgànuls, podria veure's incrementada la unió de KRas a aquests. De fet, resultats (no mostrats en aquesta tesi) obtinguts per tècniques bioquímiques de competició on es sobreexpressa el LactC2 d'unió a la PS, mostren com en les fraccions endosomals d'un gradient de sacarosa hi ha menys KRas endògen si les cèl·lules es tracten amb wortmanina (inhibidor de la formació de PI3P) que si no estan tractades. Aquests resultats estarien indicant que quan la PS es troba poc accessible, KRas podria unir-se als PI3P però que aquests no serien els fosfolípids preferents de KRas.

S'ha de tenir en compte que la concentració de wortmanina, usada per inhibir la PI3K i la formació de PI3P, en els diversos experiments de microscòpia ha estat elevada. Una possible explicació podria ser que, tot i que per inhibir la PI3K de classe III (Vps34) dels endosomes es necessitin concentracions baixes de wortmanina, altres PI3K, com per exemple del tipus II, són més resistents a la inhibició per aquesta droga i poden contribuir en la formació de PI3P en els endosomes. (Maffucci and Falasca, 2014; Shin et al., 2005). Una altra possibilitat és que la wortmanina és una droga molt fotosensible i que, a mida que es prenen imatges a l'hora de fer els vídeos, el seu efecte es va perdent.

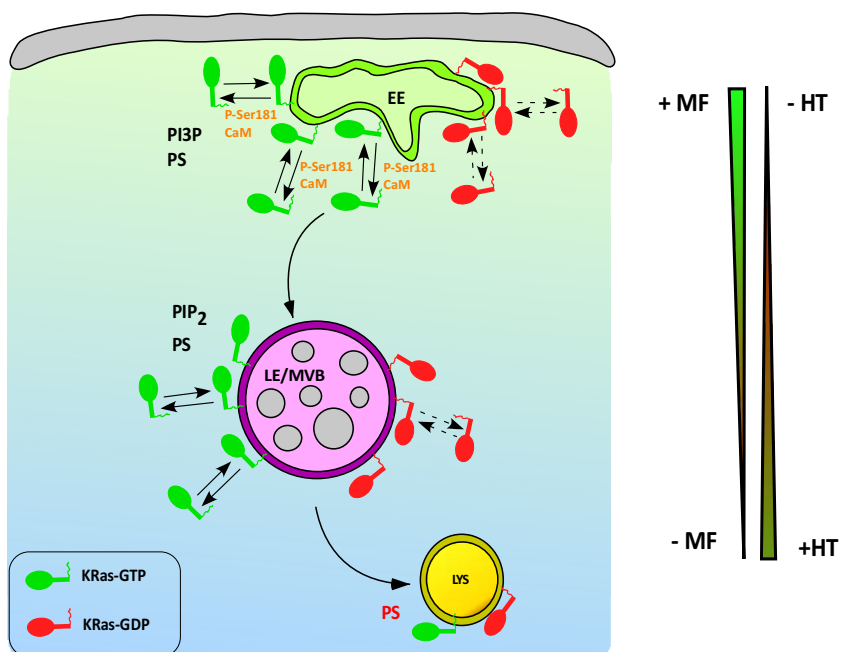
D'altra banda, no es pot descartar que un altre fosfolípid negatiu com és l'àcid fosfatídic, pugui tenir també algun paper en el reclutament de KRas als endosomes.

La presència de KRas al llarg de tota la via endocítica va ser descrita per Lu et al. Els seus estudis demostraven que l'estimulació amb EGF incrementava el KRas als endosomes i que podia, a més, trobar-se tant en EE com en LE, així com en els lisosomes (Lu et al., 2009). Tal i com s'ha descrit anteriorment, les membranes dels EE i dels LE presenten proteïnes i lípids diferents que els caracteritzen. Mentre que els EE són rics en PI3P i PS, en la membrana dels LE s'hi troba, a més de la PS, el fosfolípid PI(3,5)P<sub>2</sub> que es diferencia per tenir més càrrega negativa (veure la secció de Resultats, apartat 2.6).

En aquesta tesi s'ha demostrat que la dinàmica de KRas varia segons el compartiment endocític on es trobi, essent més lent en els endosomes tardans que en els primerencs. Aquesta menor recuperació de KRas en els endosomes tardans podria ser degut a la major presència del fosfolípid PI(3,5)P<sub>2</sub> en la membrana d'aquests endosomes. Al ser un fosfolípid més negatiu, podria estar reclutant amb més afinitat KRas. Tot i tenir una cinètica més lenta i menys mòbil en els LE, les diferències entre els

mutants actiu i inactiu de KRas es mantenen. Aquests resultats donen importància a l'estat d'activació de KRas com a modulador de l'associació a la membrana dels endosomes, tant primerencs com tardans.

Així doncs es postula un model d'associació de KRas a les membranes dels endosomes en el qual, quan KRas està en la seva forma activa la seva cinètica és més ràpida i té una MF més elevada, i quan es troba en la forma inactiva, aquesta cinètica es veu disminuïda. La fosforilació en la Ser-181 o la unió de CaM a la regió PBR en el KRas actiu, podrien ser la causa de les diferents cinètiques d'associació entre el KRas actiu i l'inactiu. Les diferències entre ambdós mutants es mantenen al llarg de la via endocítica tot i ser més ràpid i més mòbil en els EE que no pas en els LE (Fig. 2).



**Figura 2. Model esquemàtic de la dinàmica de KRas en els diferents compartiments endocítics.** En els EE, el KRas actiu (KRas-GTP) estaria bescanviant contínuament amb el *pool* de KRas citosòlic amb una HT petita i una MF elevada, mentre que en estat inactiu ho faria amb una menor rapidesa i MF també menor. En els LE, en canvi, tot i que la forma activa de KRas continua essent més ràpida i més mòbil que no pas el KRas inactiu, les HT d'ambdues proteïnes són més elevades i les MF més petites que en els EE.

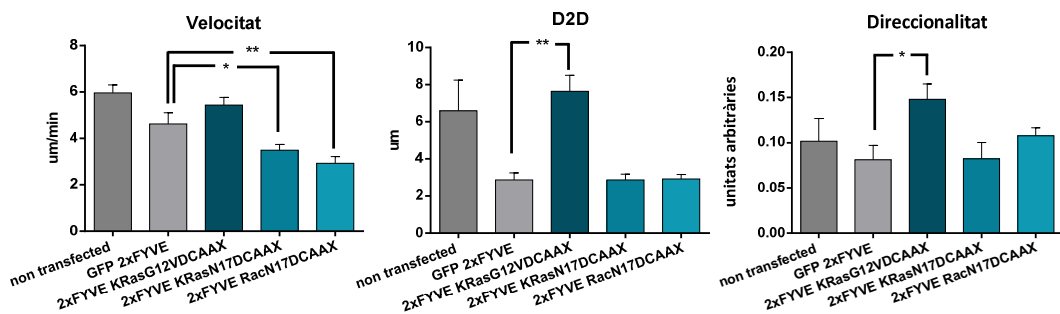
### 3- IMPLICACIÓ DE KRAS DELS ENDOSOMES EN DIVERSOS PROCESSOS CEL·LULARS.

Tot i que els mutants de KRas direccionats als endosomes mitjançant la seqüència 2xFYVE van ser correctament validats per a poder usar-los en els diferents experiments (veure secció de Resultats, apartat 3.1), s'ha de tenir present que una sobreexpressió de 2xFYVE pot comportar modificacions en la fusió dels endosomes i això pot fer variar la maduració d'aquests que es tradueix en una major grandària. Aquest efecte en la maduració dels EE ve donat perquè, tal com s'ha descrit en la introducció, els PI3P són importants pel reclutament de proteïnes que contenen el domini 2xFYVE o PX per promoure la fusió dels endosomes, per la mobilitat d'aquests i per a la seva maduració així com per a fer una distribució correcta de les proteïnes que contenen els endosomes. Així doncs, una sobreexpressió incontrolada de 2xFYVE podria estar inhibint l'accessibilitat als PIP3 de manera que això influencés en la funcionalitat dels EE. Per això és important realitzar sempre els experiments en paral·lel amb el control GFP-2xFYVE, per a poder determinar que qualsevol diferència en els resultats vingui donada pel mutant de KRas i no pas per l'expressió del 2xFYVE.

La implicació dels microtúbuls en el moviment de vesícules tals com els endosomes o els lisosomes ha estat descrita (Matteoni and Kreis, 1987; Nielsen et al., 1999) i en aquesta tesi s'han confirmat aquests resultats al fer experiments de FRAP en presència de nocodazol. En els experiments de videomicroscòpia realitzats s'han observat diversos tipus de moviments dels endosomes. Mentre que alguns endosomes presentaven moviments llargs i més aviat direccionats, altres tenien moviments curts i atzarosos. Segons Cordonnier *et al.* els lisosomes es mouen de manera ràpida i direccional a través dels microtúbuls i en els moviments atzarosos i amb pauses, hi intervenen els filaments d'actina. En tractar les cèl·lules amb citocalasina D, els filaments d'actina formen agregats en els quals els lisosomes hi queden retinguts. Quan tracten amb latrunculina A, la probabilitat que els lisosomes s'uneixin als filaments d'actina disminueix degut a la despolimerització d'aquests i per tant perden la seva direccionalitat i es mouen de manera atzarosa (Cordonnier et al., 2001).

A més, Tobias *et al.* descriuen que l'actina és propulsora del moviment dels endosomes, nucleant-se al voltant d'aquests i formant el que s'anomenen cometes d'actina (Zech et al., 2012). Tal i com s'ha comentat en l'apartat 3.2.2, la cortactina està implicada en la nucleació d'actina en la membrana i en els endosomes. El fet d'observar una major concentració de cortactina al voltant dels endosomes que contenen el mutant actiu de 2xFYVEKRas indica que d'alguna manera KRas podria estar regulant aquesta polimerització als endosomes i provocar un major moviment d'aquests. Com que un dels efectors de KRas és Rac1, es va pensar en una connexió

entre ambdues proteïnes en els endosomes per tal d'activar la polimerització d'actina o la mobilitat d'aquests orgànuls. De fet, Palamidessi *et al.* han descrit la importància dels endosomes per a la correcta activació de Rac1 gràcies al seu GEF Tiam-1, i que un cop activada aquesta GTPasa, podia influenciar en la polimerització d'actina al *leading edge* de les cèl·lules (Palamidessi *et al.*, 2008). Per determinar si Rac1 podia tenir alguna conseqüència en la mobilitat dels endosomes es varen transfectar cèl·lules COS-1 amb el dominant negatiu de Rac1 dirigit als endosomes primerencs, i es va procedir a fer experiments de mobilitat d'endosomes. Els resultats, tot i que encara molt preliminars, mostren com la mobilitat dels endosomes queda reduïda en cèl·lules transfectades amb els dominants negatius tant de KRas com de Rac1 (GFP-2xFYVEKRasS17NΔCAAX i GFP-2xFYVERac1T17NΔCAAX, respectivament). En cap dels casos s'observa una direccionalitat dels endosomes (Fig. 3).



**Figura 3. Influència de Rac1 en la mobilitat dels endosomes.** Cèl·lules COS-1 transfectades amb els mutants de KRas dirigits als endosomes primerencs (GFP-2xFYVE, GFP-2xFYVEKRasG12VΔCAAX i GFP-2xFYVE KRasS17NΔCAAX), o el dominant negatiu de Rac1 també dirigit en aquest orgànuls (GFP-2xFYVERac1T17NΔCAAX). Cèl·lules tractades amb EGF-TRITC (200 ng/ml) durant 10 minuts (n = 15-20 endosomes, mitjanes ± SEM) (\*p<0.05, \*\*p<0.01).

Aquests resultats obren la possibilitat que Rac1, a través de la seva activació per Tiam-1 gràcies a KRas, sigui el responsable d'aquesta major concentració de cortactina al voltant dels endosomes observada en cèl·lules que expressen el KRas actiu i, per tant, una major polimerització d'actina podria fer moure els endosomes. De totes maneres, seran necessaris més experiments per poder relacionar Rac1 amb els efectes observats en activar KRas.

En l'apartat 3.3 del Resultats s'ha demostrat una major mobilitat cel·lular quan les cèl·lules expressen la forma activa de KRas als endosomes (GFP-2xFYVEKRasG12VΔCAAX) i una disminució de la seva velocitat quan expressen el dominant negatiu. Aquestes diferències podrien venir donades per la polimerització d'actina als lamel·lipidis de les cèl·lules. Quan KRas es troba en la seva forma activa, és

capaç de senyalitzar i un dels seus efectors millor coneguts és Rac1. Aquesta proteïna, tal i com s'ha descrit anteriorment, està íntimament relacionada amb la polimerització d'actina a la membrana plasmàtica. Rac1, en activar-se en els endosomes, pot anar a la membrana plasmàtica on augmentarà la polimerització d'actina al front d'avanç de les cèl·lules i promourà el moviment cel·lular (Palamidessi et al., 2008). Pot ser que KRas sigui la clau d'aquesta major activació de Rac1 als endosomes, a través de Tiam1, i per tant de la major polimerització d'actina al front d'avanç de les cèl·lules.

D'altra banda, proteïnes com la metall proteasa MT1-MMP estan també relacionades amb la migració cel·lular. L'endocitosi de la MT1-MMP pot donar-se per la via dependent de clatrina o bé de manera independent d'aquesta (Remacle et al., 2003). Diversos estudis han proposat una regulació a curt termini de la MT1-MMP a la membrana plasmàtica, dependent del tràfic intracel·lular. Aquest és un mecanisme que permet garantir la presència de la metall proteasa en llocs específics de la membrana plasmàtica en cèl·lules migratòries (Jiang et al., 2001; Uekita et al., 2001).

En aquesta tesi, mitjançant microscòpia confocal i TIRF, s'ha demostrat com l'expressió de la forma activa de KRas als endosomes augmenta la presència de MT1-MMP a la membrana plasmàtica de cèl·lules HeLa. A més, quan s'inhibeix l'expressió de KRas no s'observa la metall proteasa en la membrana plasmàtica. Aquests resultats fan pensar en una regulació del reciclatge de la MT1-MMP cap a la membrana plasmàtica a través de KRas. L'endocitosi facilitada per la presència de Ras actiu es dona gràcies en part a l'activació de Rab5 a través de RIN1 (Tall et al., 2001). Per tant podria ser que KRas, al estar actiu als endosomes promogui una major endocitosi que faria incrementar l'entrada de MT1-MMP a la cèl·lula. Això provocaria la necessitat d'un reciclatge ràpid de la metall proteasa per recuperar els nivells d'aquesta proteïna a llocs específics de la membrana plasmàtica. De fet, el reciclatge ràpid des dels endosomes cap a la membrana plasmàtica es dona gràcies als endosomes de reciclatge positius per Rab4 que provéne dels endosomes positius per Rab5, en els quals es troba KRas.

Pel que fa la degradació de la matriu extracel·lular, s'ha demostrat que quan el KRas es localitza en els endosomes en el seu estat actiu, es dona una major degradació de la gelatina. Aquests resultats es veuen reforçats amb la inhibició de l'expressió de KRas, mitjançant la transfecció de l'RNAi de KRas, que comporta una inhibició d'aquesta degradació.

Els estudis duts a terme per Vuoriluoto *et al.* mostren que l'expressió de KRasG12V correlaciona amb un increment de l'expressió d'MT1-MMP així com de l'integrina  $\alpha 2\beta 1$  a la membrana plasmàtica i com la seva localització aquí comporta una major invasivitat dels tumors (Vuoriluoto et al., 2011). A més, en cèl·lules pancreàtiques s'ha demostrat com la metall proteasa MT1-MMP coopera amb KRasG12V per promoure fibrosi pancreàtica mitjançant la senyalització de TGF- $\beta$

(Krantz et al., 2011). Per altra banda, Blanchette *et al.* han descrit una interacció entre les vies de senyalització d'ERK i els Smads en l'activació del gen de la furina, important per a l'activació de l'MT1-MMP a l'aparell de Golgi, mitjançant el factor de creixament TGF- $\beta$ 1 (Blanchette et al., 2001). En aquesta tesi es postula que els efectes observats al expressar la forma activa de KRas, poden ser deguts a la seva activació en els endosomes.

Amb els resultats obtinguts en aquesta part de la tesi, i els antecedents que hi ha en la bibliografia, es postula el següent model on el KRas actiu que es troba en els endosomes estaria jugant un paper en la migració cel·lular a través de l'activació de Rac1 en els endosomes i per altra banda, de manera encara desconeguda, incrementaria els nivells de la metallproteasa en la membrana plasmàtica promovent la invasió cel·lular (Fig. 4). Seran necessaris futurs experiments per a esbrinar si ambdues vies estan interrelacionades i de quina manera poden fer-ho.

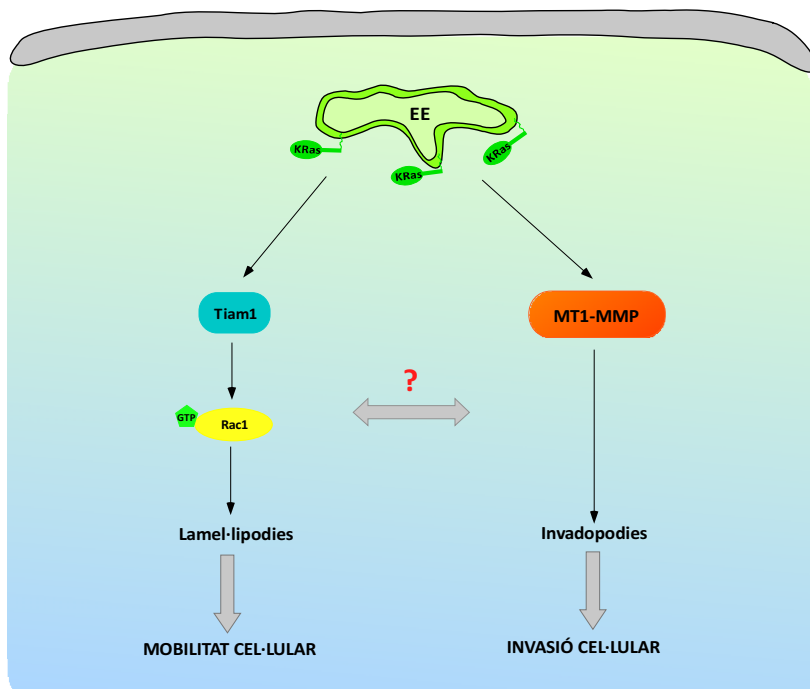


Figura 4. Model de la implicació de KRas en els endosomes en la mobilitat i la invasió cel·lulars.





## **C**ONCLUSIONS



1. L'estat d'activació de KRas no modifica la seva proporció en els endosomes.
2. El grup farnesil i la regió polibàsica són necessaris pel reclutament de KRas als endosomes.
3. KRas intercanvia ràpidament entre el citosol i les membranes dels endosomes a través d'una interacció electrostàtica que es dona entre la seva regió polibàsica i els fosfolípids àcids dels endosomes, principalment la fosfatidilserina.
4. L'estat d'activació influencia la dinàmica d'associació de KRas als endosomes. KRas actiu és més mòbil que l'inactiu tant en els endosomes primerencs com en els tardans.
5. La fosforilació de la Ser-181 o la unió de la calmodulina al KRas actiu poden explicar les diferències en la mobilitat respecte el KRas inactiu.
6. KRas participa en la mobilitat dels endosomes induïda per EGF.
7. El KRas actiu en els endosomes augmenta la mobilitat cel·lular.
8. L'activitat de KRas afavoreix la localització de la MT1-MMP en la membrana plasmàtica i, en conseqüència, la degradació de la matriu extracel·lular.



## REFERÈNCIES



- Abankwa, D., A.A. Gorfe, K. Inder, and J.F. Hancock. 2010. Ras membrane orientation and nanodomain localization generate isoform diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:1130-1135.
- Agell, N., R. Aligue, V. Alemany, A. Castro, M. Jaime, M.J. Pujol, E. Rius, J. Serratosa, M. Taules, and O. Bachs. 1998. New nuclear functions for calmodulin. *Cell calcium*. 23:115-121.
- Alvarez-Moya, B., C. Barcelo, F. Tebar, M. Jaumot, and N. Agell. 2011. CaM interaction and Ser181 phosphorylation as new K-Ras signaling modulators. *Small GTPases*. 2:99-103.
- Alvarez-Moya, B., C. Lopez-Alcala, M. Drosten, O. Bachs, and N. Agell. 2010. K-Ras4B phosphorylation at Ser181 is inhibited by calmodulin and modulates K-Ras activity and function. *Oncogene*. 29:5911-5922.
- Anilkumar, N., T. Uekita, J.R. Couchman, H. Nagase, M. Seiki, and Y. Itoh. 2005. Palmitoylation at Cys574 is essential for MT1-MMP to promote cell migration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 19:1326-1328.
- Annabi, B., M. Lachambre, N. Bousquet-Gagnon, M. Page, D. Gingras, and R. Beliveau. 2001. Localization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in caveolae membrane domains. *The Biochemical journal*. 353:547-553.
- Apolloni, A., I.A. Prior, M. Lindsay, R.G. Parton, and J.F. Hancock. 2000. H-ras but not K-ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway. *Molecular and cellular biology*. 20:2475-2487.
- Arozarena, I., D. Matallanas, M.T. Berciano, V. Sanz-Moreno, F. Calvo, M.T. Munoz, G. Egea, M. Lafarga, and P. Crespo. 2004. Activation of H-Ras in the endoplasmic reticulum by the RasGRF family guanine nucleotide exchange factors. *Molecular and cellular biology*. 24:1516-1530.
- Ashery, U., O. Yizhar, B. Rotblat, G. Elad-Sfadia, B. Barkan, R. Haklai, and Y. Kloog. 2006. Spatiotemporal organization of Ras signaling: ramosomes and the galectin switch. *Cellular and molecular neurobiology*. 26:471-495.
- Bailly, M., J. Wyckoff, B. Bouzahzah, R. Hammerman, V. Sylvestre, M. Cammer, R. Pestell, and J.E. Segall. 2000. Epidermal growth factor receptor distribution during chemotactic responses. *Molecular biology of the cell*. 11:3873-3883.
- Baker, R., S.M. Lewis, A.T. Sasaki, E.M. Wilkerson, J.W. Locasale, L.C. Cantley, B. Kuhlman, H.G. Dohlman, and S.L. Campbell. 2013. Site-specific monoubiquitination activates Ras by impeding GTPase-activating protein function. *Nature structural & molecular biology*. 20:46-52.
- Ballester, R., M.E. Furth, and O.M. Rosen. 1987. Phorbol ester- and protein kinase C-mediated phosphorylation of the cellular Kirsten ras gene product. *The Journal of biological chemistry*. 262:2688-2695.
- Barcelo, C., N. Paco, A.J. Beckett, B. Alvarez-Moya, E. Garrido, M. Gelabert, F. Tebar, M. Jaumot, I. Prior, and N. Agell. 2013. Oncogenic K-ras segregates at spatially distinct plasma membrane signaling platforms according to its phosphorylation status. *Journal of cell science*. 126:4553-4559.



- Benmerah, A., C. Lamaze, B. Begue, S.L. Schmid, A. Dautry-Varsat, and N. Cerf-Bensussan. 1998. AP-2/Eps15 interaction is required for receptor-mediated endocytosis. *The Journal of cell biology*. 140:1055-1062.
- Bhagatji, P., R. Leventis, R. Rich, C.J. Lin, and J.R. Silvius. 2010. Multiple cellular proteins modulate the dynamics of K-ras association with the plasma membrane. *Biophysical journal*. 99:3327-3335.
- Bivona, T.G., I. Perez De Castro, I.M. Ahearn, T.M. Grana, V.K. Chiu, P.J. Lockyer, P.J. Cullen, A. Pellicer, A.D. Cox, and M.R. Philips. 2003. Phospholipase Cgamma activates Ras on the Golgi apparatus by means of RasGRP1. *Nature*. 424:694-698.
- Bivona, T.G., S.E. Quatela, B.O. Bodemann, I.M. Ahearn, M.J. Soskis, A. Mor, J. Miura, H.H. Wiener, L. Wright, S.G. Saba, D. Yim, A. Fein, I. Perez de Castro, C. Li, C.B. Thompson, A.D. Cox, and M.R. Philips. 2006. PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis. *Molecular cell*. 21:481-493.
- Blanchette, F., N. Rivard, P. Rudd, F. Grondin, L. Attisano, and C.M. Dubois. 2001. Cross-talk between the p42/p44 MAP kinase and Smad pathways in transforming growth factor beta 1-induced furin gene transactivation. *The Journal of biological chemistry*. 276:33986-33994.
- Bohdanowicz, M., and S. Grinstein. 2013. Role of phospholipids in endocytosis, phagocytosis, and macropinocytosis. *Physiological reviews*. 93:69-106.
- Bravo-Cordero, J.J., R. Marrero-Diaz, D. Megias, L. Genis, A. Garcia-Grande, M.A. Garcia, A.G. Arroyo, and M.C. Montoya. 2007. MT1-MMP proinvasive activity is regulated by a novel Rab8-dependent exocytic pathway. *The EMBO journal*. 26:1499-1510.
- Brown, C.L., K.C. Maier, T. Stauber, L.M. Ginkel, L. Wordeman, I. Vernos, and T.A. Schroer. 2005. Kinesin-2 is a motor for late endosomes and lysosomes. *Traffic*. 6:1114-1124.
- Brown, F.D., A.L. Rozelle, H.L. Yin, T. Balla, and J.G. Donaldson. 2001. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. *The Journal of cell biology*. 154:1007-1017.
- Camby, I., N. Belot, S. Rorive, F. Lefranc, C.A. Maurage, H. Lahm, H. Kaltner, Y. Hadari, M.M. Ruchoux, J. Brotchi, Y. Zick, I. Salmon, H.J. Gabius, and R. Kiss. 2001. Galectins are differentially expressed in supratentorial pilocytic astrocytomas, astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastomas, and significantly modulate tumor astrocyte migration. *Brain pathology*. 11:12-26.
- Castellano, E., and J. Downward. 2010. Role of RAS in the regulation of PI 3-kinase. *Current topics in microbiology and immunology*. 346:143-169.
- Chandra, A., H.E. Grecco, V. Pisupati, D. Perera, L. Cassidy, F. Skoulidis, S.A. Ismail, C. Hedberg, M. Hanzal-Bayer, A.R. Venkitaraman, A. Wittinghofer, and P.I. Bastiaens. 2012. The GDI-like solubilizing factor PDEdelta sustains the spatial organization and signalling of Ras family proteins. *Nature cell biology*. 14:148-158.

- Chen, Z., J.C. Otto, M.O. Bergo, S.G. Young, and P.J. Casey. 2000. The C-terminal polylysine region and methylation of K-Ras are critical for the interaction between K-Ras and microtubules. *The Journal of biological chemistry*. 275:41251-41257.
- Chiu, V.K., T. Bivona, A. Hach, J.B. Sajous, J. Silletti, H. Wiener, R.L. Johnson, 2nd, A.D. Cox, and M.R. Philips. 2002. Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nature cell biology*. 4:343-350.
- Cho, K.J., J.H. Park, A.M. Piggott, A.A. Salim, A.A. Gorfe, R.G. Parton, R.J. Capon, E. Lacey, and J.F. Hancock. 2012. Staurosporines disrupt phosphatidylserine trafficking and mislocalize Ras proteins. *The Journal of biological chemistry*. 287:43573-43584.
- Chung, I., R. Akita, R. Vandlen, D. Toomre, J. Schlessinger, and I. Mellman. 2010. Spatial control of EGF receptor activation by reversible dimerization on living cells. *Nature*. 464:783-787.
- Colicelli, J. 2004. Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. 2004:RE13.
- Cordonnier, M.N., D. Dauzonne, D. Louvard, and E. Coudrier. 2001. Actin filaments and myosin I alpha cooperate with microtubules for the movement of lysosomes. *Molecular biology of the cell*. 12:4013-4029.
- Cornelissen, B., S. Darbar, R. Hernandez, V. Kersemans, I. Tullis, P.R. Barber, S. Smart, B. Vojnovic, R. Reilly, and K.A. Vallis. 2011. ErbB-2 blockade and prenyltransferase inhibition alter epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor trafficking and enhance (111)In-DTPA-hEGF Auger electron radiation therapy. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 52:776-783.
- D'Souza-Schorey, C., and P. Chavrier. 2006. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 7:347-358.
- Damke, H., T. Baba, D.E. Warnock, and S.L. Schmid. 1994. Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *The Journal of cell biology*. 127:915-934.
- Demory, M.L., J.L. Boerner, R. Davidson, W. Faust, T. Miyake, I. Lee, M. Huttemann, R. Douglas, G. Haddad, and S.J. Parsons. 2009. Epidermal growth factor receptor translocation to the mitochondria: regulation and effect. *The Journal of biological chemistry*. 284:36592-36604.
- Devereaux, K., C. Dall'Armi, A. Alcazar-Roman, Y. Ogasawara, X. Zhou, F. Wang, A. Yamamoto, P. De Camilli, and G. Di Paolo. 2013. Regulation of mammalian autophagy by class II and III PI 3-kinases through PI3P synthesis. *PloS one*. 8:e76405.
- Di Guglielmo, G.M., P.C. Baass, W.J. Ou, B.I. Posner, and J.J. Bergeron. 1994. Compartmentalization of SHC, GRB2 and mSOS, and hyperphosphorylation of Raf-1 by EGF but not insulin in liver parenchyma. *The EMBO journal*. 13:4269-4277.
- Eisenberg, E., and L.E. Greene. 2007. Multiple roles of auxilin and hsc70 in clathrin-mediated endocytosis. *Traffic*. 8:640-646.

- Elad-Sfadia, G., R. Haklai, E. Balan, and Y. Kloog. 2004. Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity. *The Journal of biological chemistry*. 279:34922-34930.
- Ellerbroek, S.M., Y.I. Wu, C.M. Overall, and M.S. Stack. 2001. Functional interplay between type I collagen and cell surface matrix metalloproteinase activity. *The Journal of biological chemistry*. 276:24833-24842.
- Figueroa, C., J. Taylor, and A.B. Vojtek. 2001. Prenylated Rab acceptor protein is a receptor for prenylated small GTPases. *The Journal of biological chemistry*. 276:28219-28225.
- Filosto, S., E.M. Khan, E. Tognon, C. Becker, M. Ashfaq, T. Ravid, and T. Goldkorn. 2011. EGF receptor exposed to oxidative stress acquires abnormal phosphorylation and aberrant activated conformation that impairs canonical dimerization. *PLoS one*. 6:e23240.
- Fisher, G.H., S.L. Wellen, D. Klimstra, J.M. Lenczowski, J.W. Tichelaar, M.J. Lizak, J.A. Whitsett, A. Koretsky, and H.E. Varmus. 2001. Induction and apoptotic regression of lung adenocarcinomas by regulation of a K-Ras transgene in the presence and absence of tumor suppressor genes. *Genes & development*. 15:3249-3262.
- Fivaz, M., and T. Meyer. 2005. Reversible intracellular translocation of KRas but not HRas in hippocampal neurons regulated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin. *The Journal of cell biology*. 170:429-441.
- Friedl, P. 2004. Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Current opinion in cell biology*. 16:14-23.
- Fujimoto, T. 1996. GPI-anchored proteins, glycosphingolipids, and sphingomyelin are sequestered to caveolae only after crosslinking. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 44:929-941.
- Gamou, S., and N. Shimizu. 1995. Hydrogen peroxide preferentially enhances the tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor. *FEBS letters*. 357:161-164.
- Gillooly, D.J., I.C. Morrow, M. Lindsay, R. Gould, N.J. Bryant, J.M. Gaullier, R.G. Parton, and H. Stenmark. 2000. Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *The EMBO journal*. 19:4577-4588.
- Gingras, D., and R. Beliveau. 2010. Emerging concepts in the regulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase activity. *Biochimica et biophysica acta*. 1803:142-150.
- GM, C. . *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. . *Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000*. .
- Goh, L.K., F. Huang, W. Kim, S. Gygi, and A. Sorokin. 2010. Multiple mechanisms collectively regulate clathrin-mediated endocytosis of the epidermal growth factor receptor. *The Journal of cell biology*. 189:871-883.
- Gong, Q., C. Huntsman, and D. Ma. 2008. Clathrin-independent internalization and recycling. *Journal of cellular and molecular medicine*. 12:126-144.

- Gorfe, A.A., M. Hanzal-Bayer, D. Abankwa, J.F. Hancock, and J.A. McCammon. 2007. Structure and dynamics of the full-length lipid-modified H-Ras protein in a 1,2-dimyristoylglycero-3-phosphocholine bilayer. *Journal of medicinal chemistry*. 50:674-684.
- Grandal, M.V., R. Zandi, M.W. Pedersen, B.M. Willumsen, B. van Deurs, and H.S. Poulsen. 2007. EGFRvIII escapes down-regulation due to impaired internalization and sorting to lysosomes. *Carcinogenesis*. 28:1408-1417.
- Grinnell, F. 2008. Fibroblast mechanics in three-dimensional collagen matrices. *Journal of bodywork and movement therapies*. 12:191-193.
- Gruenberg, J. 2001. The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2:721-730.
- Gruenberg, J., G. Griffiths, and K.E. Howell. 1989. Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. *The Journal of cell biology*. 108:1301-1316.
- Gundelfinger, E.D., M.M. Kessels, and B. Qualmann. 2003. Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosis. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 4:127-139.
- Hadler-Olsen, E., B. Fadnes, I. Sylte, L. Uhlin-Hansen, and J.O. Winberg. 2011. Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. *The FEBS journal*. 278:28-45.
- Hancock, J.F. 2003. Ras proteins: different signals from different locations. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 4:373-384.
- Hancock, J.F., H. Paterson, and C.J. Marshall. 1990. A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell*. 63:133-139.
- Hayes, S., A. Chawla, and S. Corvera. 2002. TGF beta receptor internalization into EEA1-enriched early endosomes: role in signaling to Smad2. *The Journal of cell biology*. 158:1239-1249.
- Henis, Y.I., J.F. Hancock, and I.A. Prior. 2009. Ras acylation, compartmentalization and signaling nanoclusters (Review). *Molecular membrane biology*. 26:80-92.
- Heo, W.D., T. Inoue, W.S. Park, M.L. Kim, B.O. Park, T.J. Wandless, and T. Meyer. 2006. PI(3,4,5)P3 and PI(4,5)P2 lipids target proteins with polybasic clusters to the plasma membrane. *Science*. 314:1458-1461.
- Hotary, K., E. Allen, A. Punturieri, I. Yana, and S.J. Weiss. 2000. Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3. *The Journal of cell biology*. 149:1309-1323.
- Howes, M.T., M. Kirkham, J. Riches, K. Cortese, P.J. Walser, F. Simpson, M.M. Hill, A. Jones, R. Lundmark, M.R. Lindsay, D.J. Hernandez-Deviez, G. Hadzic, A. McCluskey, R. Bashir, L. Liu, P. Pilch, H. McMahon, P.J. Robinson, J.F. Hancock, S. Mayor, and R.G. Parton. 2010. Clathrin-independent carriers form a high capacity endocytic sorting system at the leading edge of migrating cells. *The Journal of cell biology*. 190:675-691.

- Hsu, J.M., C.T. Chen, C.K. Chou, H.P. Kuo, L.Y. Li, C.Y. Lin, H.J. Lee, Y.N. Wang, M. Liu, H.W. Liao, B. Shi, C.C. Lai, M.T. Bedford, C.H. Tsai, and M.C. Hung. 2011. Crosstalk between Arg 1175 methylation and Tyr 1173 phosphorylation negatively modulates EGFR-mediated ERK activation. *Nature cell biology*. 13:174-181.
- Huotari, J., and A. Helenius. 2011. Endosome maturation. *The EMBO journal*. 30:3481-3500.
- Hutt, D.M., L.F. Da-Silva, L.H. Chang, D.C. Prosser, and J.K. Ngsee. 2000. PRA1 inhibits the extraction of membrane-bound rab GTPase by GDI1. *The Journal of biological chemistry*. 275:18511-18519.
- Jackson, E.L., N. Willis, K. Mercer, R.T. Bronson, D. Crowley, R. Montoya, T. Jacks, and D.A. Tuveson. 2001. Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes & development*. 15:3243-3248.
- James, P., T. Vorherr, and E. Carafoli. 1995. Calmodulin-binding domains: just two faced or multi-faceted? *Trends in biochemical sciences*. 20:38-42.
- Jiang, A., K. Lehti, X. Wang, S.J. Weiss, J. Keski-Oja, and D. Pei. 2001. Regulation of membrane-type matrix metalloproteinase 1 activity by dynamin-mediated endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98:13693-13698.
- Jiang, X., and A. Sorkin. 2002. Coordinated traffic of Grb2 and Ras during epidermal growth factor receptor endocytosis visualized in living cells. *Molecular biology of the cell*. 13:1522-1535.
- Joffre, C., R. Barrow, L. Menard, V. Calleja, I.R. Hart, and S. Kermorgant. 2011. A direct role for Met endocytosis in tumorigenesis. *Nature cell biology*. 13:827-837.
- Jovanovic, O.A., F.D. Brown, and J.G. Donaldson. 2006. An effector domain mutant of Arf6 implicates phospholipase D in endosomal membrane recycling. *Molecular biology of the cell*. 17:327-335.
- Jura, N., E. Scotto-Lavino, A. Sobczyk, and D. Bar-Sagi. 2006. Differential modification of Ras proteins by ubiquitination. *Molecular cell*. 21:679-687.
- Kajita, M., Y. Itoh, T. Chiba, H. Mori, A. Okada, H. Kinoh, and M. Seiki. 2001. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *The Journal of cell biology*. 153:893-904.
- Kaksonen, M., H.B. Peng, and H. Rauvala. 2000. Association of cortactin with dynamic actin in lamellipodia and on endosomal vesicles. *Journal of cell science*. 113 Pt 24:4421-4426.
- Kirkham, M., A. Fujita, R. Chadda, S.J. Nixon, T.V. Kurzchalia, D.K. Sharma, R.E. Pagano, J.F. Hancock, S. Mayor, and R.G. Parton. 2005. Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles. *The Journal of cell biology*. 168:465-476.
- Kranenburg, O., I. Verlaan, and W.H. Moolenaar. 1999. Dynamin is required for the activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase by MAP kinase kinase. *The Journal of biological chemistry*. 274:35301-35304.

- Krantz, S.B., M.A. Shields, S. Dangi-Garimella, E.C. Cheon, M.R. Barron, R.F. Hwang, M.S. Rao, P.J. Grippo, D.J. Bentrem, and H.G. Munshi. 2011. MT1-MMP cooperates with Kras(G12D) to promote pancreatic fibrosis through increased TGF-beta signaling. *Molecular cancer research : MCR*. 9:1294-1304.
- Laude, A.J., and I.A. Prior. 2008. Palmitoylation and localisation of RAS isoforms are modulated by the hypervariable linker domain. *Journal of cell science*. 121:421-427.
- Lawe, D.C., V. Patki, R. Heller-Harrison, D. Lambright, and S. Corvera. 2000. The FYVE domain of early endosome antigen 1 is required for both phosphatidylinositol 3-phosphate and Rab5 binding. Critical role of this dual interaction for endosomal localization. *The Journal of biological chemistry*. 275:3699-3705.
- Leicht, D.T., V. Balan, A. Kaplun, V. Singh-Gupta, L. Kaplun, M. Dobson, and G. Tzivion. 2007. Raf kinases: function, regulation and role in human cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 1773:1196-1212.
- Leventis, P.A., and S. Grinstein. 2010. The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annual review of biophysics*. 39:407-427.
- Leventis, R., and J.R. Silvius. 1998. Lipid-binding characteristics of the polybasic carboxy-terminal sequence of K-ras4B. *Biochemistry*. 37:7640-7648.
- Li, X.Y., I. Ota, I. Yana, F. Sabeh, and S.J. Weiss. 2008. Molecular dissection of the structural machinery underlying the tissue-invasive activity of membrane type-1 matrix metalloproteinase. *Molecular biology of the cell*. 19:3221-3233.
- Linder, S. 2007. The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends in cell biology*. 17:107-117.
- Linder, S., and M. Aepfelbacher. 2003. Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends in cell biology*. 13:376-385.
- Linder, S., and P. Kopp. 2005. Podosomes at a glance. *Journal of cell science*. 118:2079-2082.
- Lomakin, A.J., I. Semenova, I. Zaliapin, P. Kraikivski, E. Nadezhkina, B.M. Slepchenko, A. Akhmanova, and V. Rodionov. 2009. CLIP-170-dependent capture of membrane organelles by microtubules initiates minus-end directed transport. *Developmental cell*. 17:323-333.
- Lopez-Alcala, C., B. Alvarez-Moya, P. Villalonga, M. Calvo, O. Bachs, and N. Agell. 2008. Identification of essential interacting elements in K-Ras/calmodulin binding and its role in K-Ras localization. *The Journal of biological chemistry*. 283:10621-10631.
- Loubery, S., C. Wilhelm, I. Hurbain, S. Neveu, D. Louvard, and E. Coudrier. 2008. Different microtubule motors move early and late endocytic compartments. *Traffic*. 9:492-509.
- Lu, A., F. Tebar, B. Alvarez-Moya, C. Lopez-Alcala, M. Calvo, C. Enrich, N. Agell, T. Nakamura, M. Matsuda, and O. Bachs. 2009. A clathrin-dependent pathway leads to KRas signaling on late endosomes en route to lysosomes. *The Journal of cell biology*. 184:863-879.

- Maffucci, T., and M. Falasca. 2014. Analysis, regulation, and roles of endosomal phosphoinositides. *Methods in enzymology*. 535:75-91.
- Malumbres, M., and M. Barbacid. 2003. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nature reviews. Cancer*. 3:459-465.
- Marks, B., M.H. Stowell, Y. Vallis, I.G. Mills, A. Gibson, C.R. Hopkins, and H.T. McMahon. 2001. GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis. *Nature*. 410:231-235.
- Matteoni, R., and T.E. Kreis. 1987. Translocation and clustering of endosomes and lysosomes depends on microtubules. *The Journal of cell biology*. 105:1253-1265.
- Maxfield, F.R., and T.E. McGraw. 2004. Endocytic recycling. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 5:121-132.
- McMahon, H.T., and E. Boucrot. 2011. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 12:517-533.
- McNiven, M.A., M. Baldassarre, and R. Buccione. 2004. The role of dynamin in the assembly and function of podosomes and invadopodia. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 9:1944-1953.
- Mellman, I., and Y. Yarden. 2013. Endocytosis and cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 5:a016949.
- Mendoza, P., R. Ortiz, J. Diaz, A.F. Quest, L. Leyton, D. Stupack, and V.A. Torres. 2013. Rab5 activation promotes focal adhesion disassembly, migration and invasiveness in tumor cells. *Journal of cell science*. 126:3835-3847.
- Miaczynska, M., S. Christoforidis, A. Giner, A. Shevchenko, S. Uttenweiler-Joseph, B. Habermann, M. Wilm, R.G. Parton, and M. Zerial. 2004. APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell*. 116:445-456.
- Mor, A., and M.R. Philips. 2006. Compartmentalized Ras/MAPK signaling. *Annual review of immunology*. 24:771-800.
- Murphy, D.A., and S.A. Courtneidge. 2011. The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 12:413-426.
- Murray, J.T., C. Panaretou, H. Stenmark, M. Miaczynska, and J.M. Backer. 2002. Role of Rab5 in the recruitment of hVps34/p150 to the early endosome. *Traffic*. 3:416-427.
- Murray, J.W., E. Bananis, and A.W. Wolkoff. 2000. Reconstitution of ATP-dependent movement of endocytic vesicles along microtubules in vitro: an oscillatory bidirectional process. *Molecular biology of the cell*. 11:419-433.
- Nagane, M., F. Coufal, H. Lin, O. Bogler, W.K. Cavenee, and H.J. Huang. 1996. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer research*. 56:5079-5086.

- Nakanishi, A., Y. Kitagishi, Y. Ogura, and S. Matsuda. 2014. The tumor suppressor PTEN interacts with p53 in hereditary cancer (Review). *International journal of oncology*. 44:1813-1819.
- Naslavsky, N., R. Weigert, and J.G. Donaldson. 2004. Characterization of a nonclathrin endocytic pathway: membrane cargo and lipid requirements. *Molecular biology of the cell*. 15:3542-3552.
- Navarro-Lerida, I., S. Sanchez-Perales, M. Calvo, C. Rentero, Y. Zheng, C. Enrich, and M.A. Del Pozo. 2012. A palmitoylation switch mechanism regulates Rac1 function and membrane organization. *The EMBO journal*. 31:534-551.
- Nielsen, E., F. Severin, J.M. Backer, A.A. Hyman, and M. Zerial. 1999. Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nature cell biology*. 1:376-382.
- Niv, H., O. Gutman, Y.I. Henis, and Y. Kloog. 1999. Membrane interactions of a constitutively active GFP-Ki-Ras 4B and their role in signaling. Evidence from lateral mobility studies. *The Journal of biological chemistry*. 274:1606-1613.
- Niv, H., O. Gutman, Y. Kloog, and Y.I. Henis. 2002. Activated K-Ras and H-Ras display different interactions with saturable nonraft sites at the surface of live cells. *The Journal of cell biology*. 157:865-872.
- Ohashi, E., K. Tanabe, Y. Henmi, K. Mesaki, Y. Kobayashi, and K. Takei. 2011. Receptor sorting within endosomal trafficking pathway is facilitated by dynamic actin filaments. *PLoS one*. 6:e19942.
- Oku, N., N. Yamaguchi, N. Yamaguchi, S. Shibamoto, F. Ito, and M. Nango. 1986. The fusogenic effect of synthetic polycations on negatively charged lipid bilayers. *Journal of biochemistry*. 100:935-944.
- Omerovic, J., A.J. Laude, and I.A. Prior. 2007. Ras proteins: paradigms for compartmentalised and isoform-specific signalling. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 64:2575-2589.
- Palamidessi, A., E. Frittoli, M. Garre, M. Faretta, M. Mione, I. Testa, A. Diaspro, L. Lanzetti, G. Scita, and P.P. Di Fiore. 2008. Endocytic trafficking of Rac is required for the spatial restriction of signaling in cell migration. *Cell*. 134:135-147.
- Paluch, E., C. Sykes, J. Prost, and M. Bornens. 2006. Dynamic modes of the cortical actomyosin gel during cell locomotion and division. *Trends in cell biology*. 16:5-10.
- Park, K.Y., J.Y. Jung, J. Park, J.U. Hwang, Y.W. Kim, I. Hwang, and Y. Lee. 2003. A role for phosphatidylinositol 3-phosphate in abscisic acid-induced reactive oxygen species generation in guard cells. *Plant physiology*. 132:92-98.
- Parton, R.G., and M.A. del Pozo. 2013. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 14:98-112.
- Pavlaki, M., J. Cao, M. Hymowitz, W.T. Chen, W. Bahou, and S. Zucker. 2002. A conserved sequence within the propeptide domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase is critical for function as an intramolecular chaperone. *The Journal of biological chemistry*. 277:2740-2749.



- Pelkmans, L., T. Burli, M. Zerial, and A. Helenius. 2004. Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell*. 118:767-780.
- Pellinen, T., and J. Ivaska. 2006. Integrin traffic. *Journal of cell science*. 119:3723-3731.
- Philips, M.R. 2012. Ras hitchhikes on PDE6delta. *Nature cell biology*. 14:128-129.
- Piper, R.C., I. Dikic, and G.L. Lukacs. 2014. Ubiquitin-dependent sorting in endocytosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 6.
- Plowman, S.J., N. Ariotti, A. Goodall, R.G. Parton, and J.F. Hancock. 2008. Electrostatic interactions positively regulate K-Ras nanocluster formation and function. *Molecular and cellular biology*. 28:4377-4385.
- Pol, A., M. Calvo, and C. Enrich. 1998. Isolated endosomes from quiescent rat liver contain the signal transduction machinery. Differential distribution of activated Raf-1 and Mek in the endocytic compartment. *FEBS letters*. 441:34-38.
- Pol, A., R. Luetterforst, M. Lindsay, S. Heino, E. Ikonen, and R.G. Parton. 2001. A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance. *The Journal of cell biology*. 152:1057-1070.
- Prigozhina, N.L., and C.M. Waterman-Storer. 2006. Decreased polarity and increased random motility in PtK1 epithelial cells correlate with inhibition of endosomal recycling. *Journal of cell science*. 119:3571-3582.
- Prior, I.A., and M.J. Clague. 1999. Localization of a class II phosphatidylinositol 3-kinase, PI3KC2alpha, to clathrin-coated vesicles. *Molecular cell biology research communications : MCBRC*. 1:162-166.
- Rebollo, A., D. Perez-Sala, and A.C. Martinez. 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.
- Remacle, A., G. Murphy, and C. Roghi. 2003. Membrane type I-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is internalised by two different pathways and is recycled to the cell surface. *Journal of cell science*. 116:3905-3916.
- Remacle, A.G., D.V. Rozanov, P.C. Baciuc, A.V. Chekanov, V.S. Golubkov, and A.Y. Strongin. 2005. The transmembrane domain is essential for the microtubular trafficking of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *Journal of cell science*. 118:4975-4984.
- Ridley, A.J., and A. Hall. 1992. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*. 70:389-399.
- Riemann, A., B. Schneider, A. Ihling, M. Nowak, C. Sauvant, O. Thews, and M. Gekle. 2011. Acidic environment leads to ROS-induced MAPK signaling in cancer cells. *PloS one*. 6:e22445.
- Rocks, O., A. Peyker, M. Kahms, P.J. Verveer, C. Koerner, M. Lumbierres, J. Kuhlmann, H. Waldmann, A. Wittinghofer, and P.I. Bastiaens. 2005. An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms. *Science*. 307:1746-1752.

- Rojas, A.M., G. Fuentes, A. Rausell, and A. Valencia. 2012. The Ras protein superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *The Journal of cell biology*. 196:189-201.
- Rosse, C., C. Lodillinsky, L. Fuhrmann, M. Nourieh, P. Monteiro, M. Irondelle, E. Lagoutte, S. Vacher, F. Waharte, P. Paul-Gilloteaux, M. Romao, L. Sengmanivong, M. Linch, J. van Lint, G. Raposo, A. Vincent-Salomon, I. Bieche, P.J. Parker, and P. Chavrier. 2014. Control of MT1-MMP transport by atypical PKC during breast-cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111:E1872-1879.
- Roy, S., B. Wyse, and J.F. Hancock. 2002. H-Ras signaling and K-Ras signaling are differentially dependent on endocytosis. *Molecular and cellular biology*. 22:5128-5140.
- Sabeh, F., I. Ota, K. Holmbeck, H. Birkedal-Hansen, P. Soloway, M. Balbin, C. Lopez-Otin, S. Shapiro, M. Inada, S. Krane, E. Allen, D. Chung, and S.J. Weiss. 2004. Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. *The Journal of cell biology*. 167:769-781.
- Sabharanjak, S., P. Sharma, R.G. Parton, and S. Mayor. 2002. GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway. *Developmental cell*. 2:411-423.
- Saffarian, S., E. Cocucci, and T. Kirchhausen. 2009. Distinct dynamics of endocytic clathrin-coated pits and coated plaques. *PLoS biology*. 7:e1000191.
- Sasaki, A.T., A. Carracedo, J.W. Locasale, D. Anastasiou, K. Takeuchi, E.R. Kahoud, S. Haviv, J.M. Asara, P.P. Pandolfi, and L.C. Cantley. 2011. Ubiquitination of K-Ras enhances activation and facilitates binding to select downstream effectors. *Science signaling*. 4:ra13.
- Sbardella, D., G.F. Fasciglione, M. Gioia, C. Ciaccio, G.R. Tundo, S. Marini, and M. Coletta. 2012. Human matrix metalloproteinases: an ubiquitarian class of enzymes involved in several pathological processes. *Molecular aspects of medicine*. 33:119-208.
- Schmick, M., N. Vartak, B. Papke, M. Kovacevic, D.C. Truxius, L. Rossmannek, and P.I. Bastiaens. 2014. KRas localizes to the plasma membrane by spatial cycles of solubilization, trapping and vesicular transport. *Cell*. 157:459-471.
- Scita, G., and P.P. Di Fiore. 2010. The endocytic matrix. *Nature*. 463:464-473.
- Shahinian, S., and J.R. Silvius. 1995. Doubly-lipid-modified protein sequence motifs exhibit long-lived anchorage to lipid bilayer membranes. *Biochemistry*. 34:3813-3822.
- Shin, H.W., M. Hayashi, S. Christoforidis, S. Lacas-Gervais, S. Hoepfner, M.R. Wenk, J. Modregger, S. Uttenweiler-Joseph, M. Wilm, A. Nystuen, W.N. Frankel, M. Solimena, P. De Camilli, and M. Zerial. 2005. An enzymatic cascade of Rab5 effectors regulates phosphoinositide turnover in the endocytic pathway. *The Journal of cell biology*. 170:607-618.

- Sigismund, S., S. Confalonieri, A. Ciliberto, S. Polo, G. Scita, and P.P. Di Fiore. 2012. Endocytosis and signaling: cell logistics shape the eukaryotic cell plan. *Physiological reviews*. 92:273-366.
- Silvius, J.R., P. Bhagatji, R. Leventis, and D. Terrone. 2006. K-ras4B and prenylated proteins lacking "second signals" associate dynamically with cellular membranes. *Molecular biology of the cell*. 17:192-202.
- Sobering, A.K., M.J. Romeo, H.A. Vay, and D.E. Levin. 2003. A novel Ras inhibitor, Eri1, engages yeast Ras at the endoplasmic reticulum. *Molecular and cellular biology*. 23:4983-4990.
- Sonnichsen, B., S. De Renzis, E. Nielsen, J. Rietdorf, and M. Zerial. 2000. Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *The Journal of cell biology*. 149:901-914.
- Soppina, V., A.K. Rai, A.J. Ramaiya, P. Barak, and R. Mallik. 2009. Tug-of-war between dissimilar teams of microtubule motors regulates transport and fission of endosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:19381-19386.
- Sorkin, A., M. McClure, F. Huang, and R. Carter. 2000. Interaction of EGF receptor and grb2 in living cells visualized by fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy. *Current biology : CB*. 10:1395-1398.
- Sorkin, A., and M. von Zastrow. 2009. Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 10:609-622.
- Stan, R.V. 2002. Structure and function of endothelial caveolae. *Microscopy research and technique*. 57:350-364.
- Steffen, A., G. Le Dez, R. Poincloux, C. Recchi, P. Nassoy, K. Rottner, T. Galli, and P. Chavrier. 2008. MT1-MMP-dependent invasion is regulated by TI-VAMP/VAMP7. *Current biology : CB*. 18:926-931.
- Stenmark, H. 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 10:513-525.
- Swanson, J.A. 1989. Phorbol esters stimulate macropinocytosis and solute flow through macrophages. *Journal of cell science*. 94 ( Pt 1):135-142.
- Swanson, J.A. 2008. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 9:639-649.
- Tague, S.E., V. Muralidharan, and C. D'Souza-Schorey. 2004. ADP-ribosylation factor 6 regulates tumor cell invasion through the activation of the MEK/ERK signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:9671-9676.
- Takino, T., N. Koshikawa, H. Miyamori, M. Tanaka, T. Sasaki, Y. Okada, M. Seiki, and H. Sato. 2003a. Cleavage of metastasis suppressor gene product KiSS-1 protein/metastin by matrix metalloproteinases. *Oncogene*. 22:4617-4626.
- Takino, T., H. Miyamori, N. Kawaguchi, T. Uekita, M. Seiki, and H. Sato. 2003b. Tetraspanin CD63 promotes targeting and lysosomal proteolysis of membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Biochemical and biophysical research communications*. 304:160-166.

- Tall, G.G., M.A. Barbieri, P.D. Stahl, and B.F. Horazdovsky. 2001. Ras-activated endocytosis is mediated by the Rab5 guanine nucleotide exchange activity of RIN1. *Developmental cell*. 1:73-82.
- Tam, E.M., T.R. Moore, G.S. Butler, and C.M. Overall. 2004. Characterization of the distinct collagen binding, helicase and cleavage mechanisms of matrix metalloproteinase 2 and 14 (gelatinase A and MT1-MMP): the differential roles of the MMP hemopexin c domains and the MMP-2 fibronectin type II modules in collagen triple helicase activities. *The Journal of biological chemistry*. 279:43336-43344.
- Thomsen, P., K. Roepstorff, M. Stahlhut, and B. van Deurs. 2002. Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking. *Molecular biology of the cell*. 13:238-250.
- Tian, T., S.J. Plowman, R.G. Parton, Y. Kloog, and J.F. Hancock. 2010. Mathematical modeling of K-Ras nanocluster formation on the plasma membrane. *Biophysical journal*. 99:534-543.
- Tomasz Grzela, B.B.a.M.L. 2011. Matrix metalloproteinases in aortic aneurysm - executors or executioners? Etiology, Pathogenesis and Pathophysiology of Aortic Aneurysms and Aneurysm Rupture.
- Traub, L.M. 2005. Common principles in clathrin-mediated sorting at the Golgi and the plasma membrane. *Biochimica et biophysica acta*. 1744:415-437.
- Tsakazaki, T., T.A. Chiang, A.F. Davison, L. Attisano, and J.L. Wrana. 1998. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell*. 95:779-791.
- Tsutsumi, K., Y. Fujioka, M. Tsuda, H. Kawaguchi, and Y. Ohba. 2009. Visualization of Ras-PI3K interaction in the endosome using BiFC. *Cellular signalling*. 21:1672-1679.
- Ueda, J., M. Kajita, N. Suenaga, K. Fujii, and M. Seiki. 2003. Sequence-specific silencing of MT1-MMP expression suppresses tumor cell migration and invasion: importance of MT1-MMP as a therapeutic target for invasive tumors. *Oncogene*. 22:8716-8722.
- Uekita, T., Y. Itoh, I. Yana, H. Ohno, and M. Seiki. 2001. Cytoplasmic tail-dependent internalization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase is important for its invasion-promoting activity. *The Journal of cell biology*. 155:1345-1356.
- Vanhaesebroeck, B., S.J. Leever, K. Ahmadi, J. Timms, R. Katso, P.C. Driscoll, R. Woscholski, P.J. Parker, and M.D. Waterfield. 2001. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annual review of biochemistry*. 70:535-602.
- Vartak, N., and P. Bastiaens. 2010. Spatial cycles in G-protein crowd control. *The EMBO journal*. 29:2689-2699.
- Vigil, D., J. Cherfils, K.L. Rossman, and C.J. Der. 2010. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nature reviews. Cancer*. 10:842-857.
- Villalonga, P., C. Lopez-Alcala, M. Bosch, A. Chiloeches, N. Rocamora, J. Gil, R. Marais, C.J. Marshall, O. Bachs, and N. Agell. 2001. Calmodulin binds to K-Ras, but not to H- or N-Ras, and modulates its downstream signaling. *Molecular and cellular biology*. 21:7345-7354.

- Vojtek, A.B., S.M. Hollenberg, and J.A. Cooper. 1993. Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell*. 74:205-214.
- Vuoriluoto, K., G. Hognas, P. Meller, K. Lehti, and J. Ivaska. 2011. Syndecan-1 and -4 differentially regulate oncogenic K-ras dependent cell invasion into collagen through alpha2beta1 integrin and MT1-MMP. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 30:207-217.
- Wang, Y., O. Roche, M.S. Yan, G. Finak, A.J. Evans, J.L. Metcalf, B.E. Hast, S.C. Hanna, B. Wondergem, K.A. Furge, M.S. Irwin, W.Y. Kim, B.T. Teh, S. Grinstein, M. Park, P.A. Marsden, and M. Ohh. 2009. Regulation of endocytosis via the oxygen-sensing pathway. *Nature medicine*. 15:319-324.
- Warne, P.H., P.R. Viciana, and J. Downward. 1993. Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. *Nature*. 364:352-355.
- Weinstein, H., and E.L. Mehler. 1994. Ca(2+)-binding and structural dynamics in the functions of calmodulin. *Annual review of physiology*. 56:213-236.
- Wellbrock, C., M. Karasarides, and R. Marais. 2004. The RAF proteins take centre stage. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 5:875-885.
- Wennerberg, K., K.L. Rossman, and C.J. Der. 2005. The Ras superfamily at a glance. *Journal of cell science*. 118:843-846.
- White, D.P., P.T. Caswell, and J.C. Norman. 2007. alpha v beta3 and alpha5beta1 integrin recycling pathways dictate downstream Rho kinase signaling to regulate persistent cell migration. *The Journal of cell biology*. 177:515-525.
- Williams, K.C., and M.G. Coppelino. 2011. Phosphorylation of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and its vesicle-associated membrane protein 7 (VAMP7)-dependent trafficking facilitate cell invasion and migration. *The Journal of biological chemistry*. 286:43405-43416.
- Wilson, S.J., and E.M. Smyth. 2006. Internalization and recycling of the human prostacyclin receptor is modulated through its isoprenylation-dependent interaction with the delta subunit of cGMP phosphodiesterase 6. *The Journal of biological chemistry*. 281:11780-11786.
- Wolf, K., and P. Friedl. 2006. Molecular mechanisms of cancer cell invasion and plasticity. *The British journal of dermatology*. 154 Suppl 1:11-15.
- Wolf, K., and P. Friedl. 2009. Mapping proteolytic cancer cell-extracellular matrix interfaces. *Clinical & experimental metastasis*. 26:289-298.
- Wolf, K., I. Mazo, H. Leung, K. Engelke, U.H. von Andrian, E.I. Deryugina, A.Y. Strongin, E.B. Brocker, and P. Friedl. 2003. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *The Journal of cell biology*. 160:267-277.
- Wouters, F.S., and P.I. Bastiaens. 1999. Fluorescence lifetime imaging of receptor tyrosine kinase activity in cells. *Current biology : CB*. 9:1127-1130.
- Wright, L.P., and M.R. Philips. 2006. Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras. *Journal of lipid research*. 47:883-891.
- Yang, M.H., S. Nickerson, E.T. Kim, C. Liot, G. Laurent, R. Spang, M.R. Philips, Y. Shan, D.E. Shaw, D. Bar-Sagi, M.C. Haigis, and K.M. Haigis. 2012. Regulation of RAS

- oncogenicity by acetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109:10843-10848.
- Yeung, T., G.E. Gilbert, J. Shi, J. Silvius, A. Kapus, and S. Grinstein. 2008. Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. *Science*. 319:210-213.
- Yokoe, H., and T. Meyer. 1996. Spatial dynamics of GFP-tagged proteins investigated by local fluorescence enhancement. *Nature biotechnology*. 14:1252-1256.
- Zech, T., S.D. Calaminus, and L.M. Machesky. 2012. Actin on trafficking: could actin guide directed receptor transport? *Cell adhesion & migration*. 6:476-481.
- Zhang, L., M. Bewick, and R.M. Lafrenie. 2002. EGFR and ErbB2 differentially regulate Raf-1 translocation and activation. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 82:71-78.
- Zhou, Z., S.S. Apte, R. Soininen, R. Cao, G.Y. Baaklini, R.W. Rauser, J. Wang, Y. Cao, and K. Tryggvason. 2000. Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97:4052-4057.
- Zoncu, R., R.M. Perera, D.M. Balkin, M. Pirruccello, D. Toomre, and P. De Camilli. 2009. A phosphoinositide switch controls the maturation and signaling properties of APPL endosomes. *Cell*. 136:1110-1121.
- Zucker, S., D. Pei, J. Cao, and C. Lopez-Otin. 2003. Membrane type-matrix metalloproteinases (MT-MMP). *Current topics in developmental biology*. 54:1-74.



