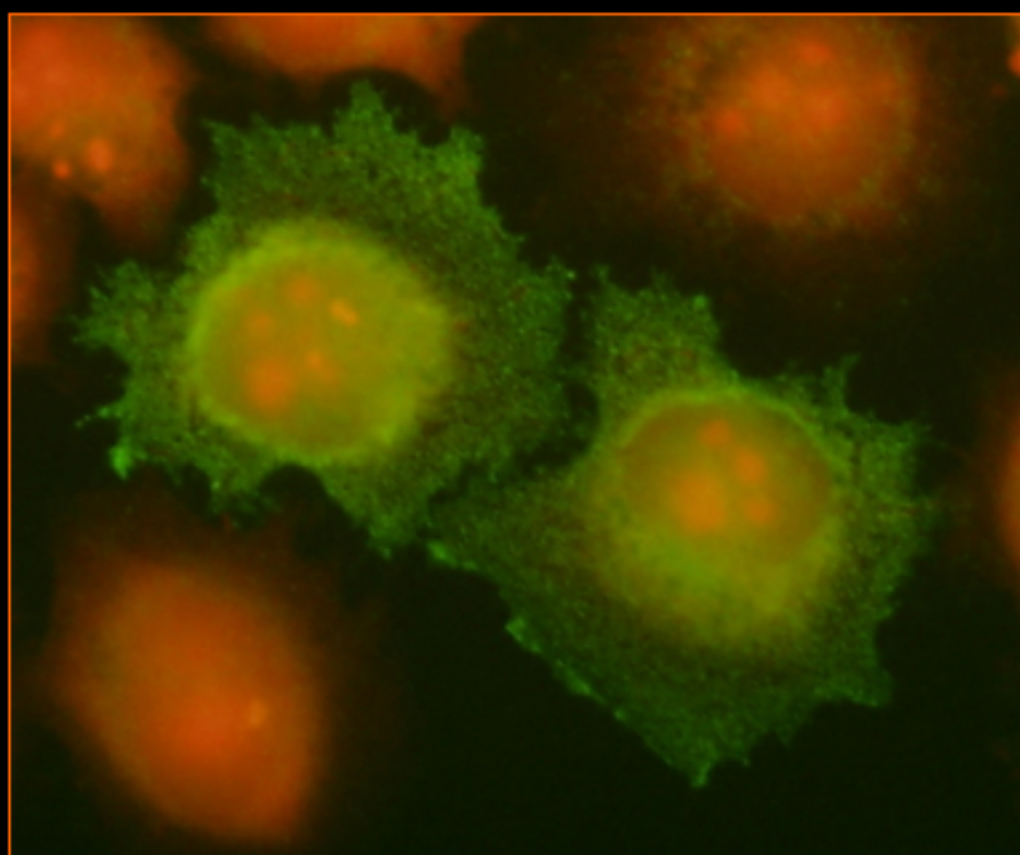


**MECANISMES DE
SENYALITZACIÓ
INTRACEL·LULAR REGULATS
PER LA PROTEÏNA p19 H-Ras**



MARIA CAMATS MALET



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
UNITAT DE CIÈNCIES**

**MECANISMES DE SENYALITZACIÓ INTRACEL·LULAR
REGULATS PER LA PROTEÏNA p19 H-Ras**

Maria Camats Malet

2008



**Consell Superior d'Investigacions
Científiques**



**Institut d'Investigacions
Biomèdiques de Barcelona**



**Universitat Autònoma de Barcelona
Departament de Bioquímica
i Biologia Molecular**

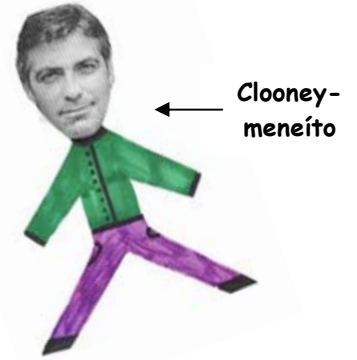
MECANISMES DE SENYALITZACIÓ INTRACEL·LULAR REGULATS PER LA PROTEÏNA p19 H-Ras

Memòria presentada per optar
al grau de Doctor en Ciències
Biològiques, per la Universitat
Autònoma de Barcelona, per
Maria Camats Malet

Aquest treball s'ha realitzat a l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (libB), a les instal·lacions del Centre d'Investigació i Desenvolupament (CID-CSIC), sota la direcció de la Dra. Montserrat Bach-Elías i sota la tutoria del Dr. Francesc Xavier Avilés i Puigvert. Bellaterra, 2008

Dra. Montserrat Bach-Elías

Dr. Francesc Xavier Avilés Puigvert



Hi ha moltes maneres d'agrair l'esforç i la paciència que els ha calgut a la gent que ha estat al meu costat durant tot aquest temps. A vegades tens la sort de poder comptar amb tantes persones, que es crea una llista interminable de noms, situacions i anècdotes...



Però per mi només n'hi ha una de vàlida, i és aquella que es fa des de l'emoció i els sentiments. Per tant, vull donar les gràcies a tothom que ha fet possible aquest petit projecte de la meua vida, tan a nivell personal com laboral, i que ara forma part dels meus records més intensos... perquè una imatge val més que mil paraules, no?



Moltes gràcies, Montse, per creure en mi i en el projecte que varem començar... m'has ensenyat a estimar la "petita" ciència, la del cada dia, pas a pas. I per ensenyar-me a abordar el meu treball d'estudi des de mil i una perspectives, d'una forma original i molt autèntica...



També desitjo tota la sort del món a les meves companyes de laboratori, la Mariette i la Marlen. El laboratori de les M!!! Amb vosaltres he creat un lligam Congo-Cuba-Mèxic-Catalunya molt difícil d'oblidar... estic segura que us anirà tot molt bé, moltes gràcies per oferir-me els vostres consells i somriures!



Per a la resta, prefereixo deixar a l'aire simples paraules que no podrien captar tota l'essència del que sento. Només dir-vos que sense vosaltres, jo no seria aquesta persona que coneixeu, perquè m'emporto un trosset de cadascú de vosaltres. Un petó de colors i molta llum!



*“veiem la llum del capvespre ataronjada i violeta perquè arriba massa
cansada de lluitar contra l'espai i el temps”*

Albert Einstein

A la Henrietta Lacks

A la meua família

I a tothom que algun dia m'ha estimat

NOMENCLATURA

| | | | |
|------------------|---|--------|---|
| ' | minut | DDO | <i>double-dropout</i> |
| '' | segon | DEPC | Dietilpirocarbonat |
| 3'ss | 3' splice site | DH | <i>Dbl homology</i> |
| 4EBP1 | <i>eukaryote initiation factor E4 binding protein 1</i> | DMEM | medi Eagle modificat de Dulbecco |
| 5'ss | 5' splice site | DMSO | Dimetil Sulfoxid |
| Ac | Anticòs | DNA | àcid desoxiribonucleic (<i>desoxiribonucleic acid</i>) |
| AF6 | <i>Activation Factor 6</i> | dNTP | nucleòtid |
| APS | <i>Amonium Persulfat</i> | DO | <i>Dropout</i> |
| ATF | Factors de transcripció activadors (<i>activating transcription factors</i>) | dsRNA | molècules llargues de doble cadena de RNA |
| ATP | <i>Adenosine-5'-triphosphate</i> | EDTA | àcid etilendiaminotetracètic |
| bp | punt de ramificació (<i>branch point</i>) | eIF | Factors d'iniciació de la síntesis de proteïnes en eucariotes (eukaryotic initiation factors) |
| BSA | <i>Bovine Serum Albumin</i> | EJC | <i>exon junction complex</i> |
| Ca ²⁺ | Calci | ELISA | <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> |
| cAMP | Adenosina-3',5'-monofosfat cíclic (<i>Cyclic AMP</i>) | Elk-1 | Gen similar a <i>Ets (Ets-like gene 1)</i> |
| CBC | <i>cap binding complex</i> | ERK | <i>extracellular signal regulated kinase</i> |
| CBP | <i>cap binding protein</i> | ESE | <i>exonic splicing enhancers</i> |
| Cdc25 | cicle de divisió cel·lular 25 (<i>cell division cycle</i>) | ESS | <i>exonic splicing suppressors</i> |
| Cdc42 | cicle de divisió cel·lular 42 (<i>cell division cycle</i>) | EST | <i>expressed sequence tag</i> |
| CDK | Cinasa depenent de ciclina (<i>cyclin-dependent kinases</i>) | FACS | <i>Fluorescent-Activated Cell Sorting</i> |
| cDNA | DNA complementari | FBS | Fetal Bovine Serum |
| cel | cèl·lula | FITC | <i>fluorescein isothiocyanate</i> |
| CFP | <i>Cyan Fluorescent Protein</i> | fmols | femtomol |
| CHAPS | <i>Cholamidopropyl)dimethyl ammonio)-1-Propanesulfonic Acid</i> | FoxO1 | <i>Forkhead Transcription Factor</i> |
| cm | centímetre | FRET | <i>fluorescence resonance energy transfer</i> |
| cm ² | centímetre quadrat | g | gram |
| CMV | Citomegalovirus | g. | times gravity |
| CREB | <i>CyclicAMP response element binding protein</i> | GAP | <i>GTPase activating proteins</i> |
| C-t | Carboxi terminal | GAPDH | gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa |
| C _T | <i>Threshold Cycle</i> | GDP | guanosina 5'-difosfat |
| C-ter | Carboxi terminal | GEF | Factor d'intercanvi de guanina (<i>Guanine Exchange Factor</i>) |
| Cy3 | Cianina 3 | gel 2D | gel en 2 dimensions |
| Cy5 | Cianina 5 | GFP | Proteïna verd fluorescent (<i>green fluorescent protein</i>) |
| Cys | Cisteïna | Grb2 | <i>Growth factor receptor binding protein 2</i> |
| D.O. | Densitat òptica | GRF | <i>Guanine Nucleotide Releasing Factors</i> |
| DAG | Diacilglicerol | GST | gens supressors de tumors |
| DBD | domini d'unió al DNA (<i>DNA Binding Domain</i>) | GTP | guanosina 5'-triphosphate |
| | | h | hora |
| | | Ha-MSV | virus de sarcoma murí Harvey |

| | | | |
|---------------|--|---------------------------|--|
| HDM2 | MDM2 humà (<i>human MDM2</i>) | mm | mil·límetre |
| HeLa | Henrietta Lacks | mM | millimolar |
| hnRNA | RNA heterogènic nuclear (<i>heterogeneous nuclear RNA</i>) | MMR | errors d'aparellament postreplicatius (<i>mismatch repair</i>) |
| hnRNP | RNA de les partícules de processament (<i>heterogeneous nuclear ribonucleoproteins</i>) | mRNA | missatger de l'àcid ribonucleic |
| H-Ras | <i>v-Ki-ras2 Harvey rat sarcoma viral protein homolog</i> | mTOR | diana de rapamicina en mamífers (<i>mammalian Target of Rapamycin</i>) |
| H-ras | <i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i> | mut | mutant |
| HVR | regió hipervariable (<i>hypervariable region</i>) | mW | milivat |
| IDX | <i>intron D exon</i> | n | nombre de mostres |
| IF | immunofluorescència | NAS | <i>nonsense-associated altered splicing</i> |
| IL-1 | Interleukina 1 | N.C. | Nivell de Canvi (<i>Fold Change</i>) |
| IP | Iodur de Propidi | neo | neomicina |
| IPG | <i>Inositolphosphate Glycan</i> | NER | reparació per escissió de nucleòtids (<i>nucleotide excision repair</i>) |
| ISE | <i>intronic splicing enhancers</i> | NES | senyal d'exportació nuclear (<i>nuclear export sequence</i>) |
| ISS | <i>intronic splicing suppressors</i> | NF1 | Factor nuclear de transcripció 1 (<i>nuclear factor 1</i>) |
| JNK | Cinasa N-terminal de jun. (<i>Jun N-terminal kinase</i>) | NHEJ | <i>Non-Homologue Extreme Junctions</i> |
| Jun | Oncogèn aïllat de un virus de sarcoma d'aus (<i>avian sarcoma virus 17</i> , el nom ve de "ju-nana", 17 en japonès) | NIS | <i>Non-Immune Serum</i> |
| kDa | kiloDalton | NLS | Seqüència de localització nuclear (<i>nuclear localization sequence</i>) |
| KH | Motiu d'homologia a K (<i>K homology motif</i>) | nm | nanòmetre |
| Ki-MSV | virus de sarcoma murí Kirsten | NMD | <i>Non-Sense Mediated Decay</i> |
| KO | <i>knock-out</i> | N-t | amino-terminal |
| K-Ras | <i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral protein homolog</i> | nt | nucleòtid |
| l | litre | °C | graus centígrads |
| LB | <i>Luria Bertani Medium</i> | OD | domini d'oligomerització (<i>oligomerization domain</i>) |
| LONG. | Longitud | OH | grup hidroxil |
| M | Molar | ORC | Complex de reconeixement de l'origen (<i>Origin Recognition Complex</i>) |
| mA | mil·liampere | p- | fosfo |
| MAPK | <i>mitogen activated protein kinase</i> | p | probabilitat |
| MAXP1 | ortòleg de Rata de Nore1 | p27^{Kip1} | inhibidor de ciclins depenent de cinases |
| MDM2 | dobles minuts murins (<i>murine double minute 2</i>) | p53 | Proteïna anti-oncogènica, supressora de tumores |
| MEK | <i>mitogen activated protein extracellular signal regulated kinase</i> | p63 | membre de la família de la proteïna p53 |
| mg | mil·ligram | p73 | membre de la família de la proteïna p53 |
| min | minuts | p120GAP | <i>p120 GTPase activating protein</i> |
| miRNAs | microRNAs | pb | parell de bases |
| mitj. | valor mig | PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| ml | mil·lilitre | PCR | Reacció en cadena de la polimerasa (<i>Polimerase Chain Reaction</i>) |

| | | | |
|------------------|--|---------------|--|
| PDE4D5 | fosfodiesterasa específica d'AMP cíclic | RT-PCR | PCR en Temps Real (<i>Real Time PCR</i>) |
| PDK | <i>Phosphatidyl-inositol dependent protein kinase</i> | SAM | <i>sterile alpha motif</i> |
| PH | Domini d'homologia a plecstrina (<i>plekstrin homology domains</i>) | SAPK | Proteïna cinasa activada per estrès (<i>Stress activated protein kinase</i>) |
| Pi | fosfat inorgànic | SD | <i>Synthetic Droupout</i> |
| pI | Punt Isoelèctric | SDS | <i>sodium dodecyl sulfate</i> |
| PI3K | Fosfatidil inositol 3 cinasa | sec. | segon |
| PIP2 | Fosfatidil-inositol-4,5-bisfosfat | SH2 | Domini d'homologia src tipus 2 (<i>src homology type 2 domain</i>) |
| PIP3 | Fosfatidil-inositol-3,4,5-trisfosfat | SH3 | Domini d'homologia src tipus 3 (<i>src homology type 3 domain</i>) |
| PKC | Proteïna cinasa C (<i>Protein kinase C</i>) | siRNA | <i>small interfering RNA strands</i> |
| PLC | Fosfolipasa C | Slit3 | <i>slit homolog 3 (Drosophila)</i> |
| PLD1 | Fosfolipasa D1 | snRNPs | <i>small nuclear ribonucleoproteins</i> o 'snurps' |
| PM | Pes Molecular | SOB | <i>Super Optimal Broth</i> |
| PMSF | <i>phenylmethanesulphonylfluoride</i> | SOC | <i>Super Optimal Catabolite repression</i> |
| PMT | <i>photomultiplier tube</i> | SOS | <i>son of sevenless</i> |
| polyA | poliadenosines | SR | Partícula de reconeixement de la senyal (<i>signal recognition particle</i>) |
| pre-miRNA | precursor del miRNA | Src | Oncogèn derivat del virus de sarcoma de Rous |
| pri-miRNA | precursor del pre-miRNA | SSC | <i>sodium chloride-sodium citratein</i> |
| PTB | <i>polypirimidine tract binding protein</i> | SSPE | <i>Sodium Chloride, Sodium Hydrogen Phosphate, EDTA</i> |
| PTC | <i>premature stop codon</i> | T | Temperatura |
| PTP | Receptor de Proteïna Tirosina-Fosfatasa | TAD | domini transactivador (<i>transactivation domain</i>) |
| QDO | <i>quadruple-dropout</i> | TAE | Tris Acetat EDTA |
| Rac | Proteïna cinasa relacionada amb les cinasas A i C (<i>related to kinases A and C protein kinase</i>) | TBS | <i>Tris Buffered Saline</i> |
| RACK | <i>receptors for activated C-kinase</i> | TCF | factor del complex ternari (<i>ternari comlex factor</i>) |
| Raf | Factor activat per ras (<i>ras activated factor 1</i>) | TCTP | <i>Translationally controlled tumor protein</i> |
| RalGDS | <i>Ral guanine nucleotide dissociation stimulator</i> | TEMED | N,N,N,N'-tetrametilnediamina |
| ras | <i>retrovirus associated sequences</i> | TER | RNA telomerasa |
| RBD | Domini d'unió a RNA (<i>RNA binding domain</i>) | TERT | Trascriptasa inversa de la telomerasa (<i>Telomerase reverse transcriptase</i>) |
| RISC | <i>RNA-induced silencing complex</i> | TFB | <i>Transformation Buffer</i> |
| RNAPolIII | RNA polimerasa II | TM° | Temperatura de fusió (<i>melting temperature</i>) |
| RNA | àcid ribonucleic (<i>ribonucleic acid</i>) | TNF | Factor de necrosis tumoral α (<i>Tumor Necrosis Factor α</i>) |
| RNAi | RNA interferència | Tp | Temperatura específica de cada parell d'encebadors |
| RNP | Ribonucleoproteïna | TRAP | <i>Telomeric Repeat Amplification Protocol</i> |
| rpm | revolucions per minut | | |
| RRM | <i>RNA recognition motif</i> | | |
| RS | Domini ric en Serina i Arginina | | |
| RSK | Cinasa de la S6 ribosomal (Ribosomal S6 kinase) | | |

| | | | |
|----------------|---|-------------|--|
| TRF | Factor de unió a la repetició telomèrica (<i>Telomeric repeat binding factor</i>) | VEGF | factor de creixement vascular endotelial |
| TSC | complex d'esclerosi tuberosa (<i>tuberous sclerosis complex</i>) | w/v | <i>weight/volume</i> |
| U | unitats | WB | Western Blot |
| U2AF | <i>U2 auxiliary factor</i> | wt | proteïna salvatge (<i>wild-type</i>) |
| UsnRNAs | <i>U-rich small nuclear RNAs</i> | YEP | <i>Yeast Extract-Phosphate Medium</i> |
| UTR | Regions no traduïdes del mRNA (<i>untranslated regions</i>) | YFP | <i>Yellow Fluorescent Protein</i> |
| UV | Ultraviolat | YPD | <i>Yeast Peptone Dextrose</i> |
| V | Volt | µm | micròmetre |
| | | µM | micromolar |
| | | µg | microgram |

AMINOÀCIDS

| | | | | | |
|------------|----------|---------------|------------|----------|--------------|
| Ala | A | Alanina | Leu | L | Leucina |
| Arg | R | Arginina | Lys | K | Lisina |
| Asp | N | Aparragina | Met | M | Metionina |
| Asp | A | Àcid aspàrtic | Phe | F | Fenilalanina |
| Cys | C | Cisteïna | Pro | P | Prolina |
| Gln | Q | Glutamina | Ser | S | Serina |
| Glu | G | Àcid glutàmic | Thr | T | Treonina |
| Gly | G | Glicina | Trp | W | Triptòfan |
| His | H | Histidina | Tyr | Y | Tirosina |
| Ile | I | Isoleucina | Val | V | Valina |

ÍNDICE

ÍNDIX GENERAL

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓ | 1 |
| 1. CÀNCER | 3 |
| 2. LES PROTEÏNES RAS | 6 |
| 2.1 Activació i localització diferencial | 8 |
| 2.2 Estructura i bioquímica de les GTPases | 10 |
| 2.3 Les proteïnes GAP | 12 |
| 2.4 Les proteïnes GEF | 13 |
| 2.5 Vies de senyalització | 15 |
| 2.5.1 La via Ras/Raf/MAPK | 15 |
| 2.5.2 La via PI3K/Akt | 16 |
| 2.5.3 La via de RalGDS | 16 |
| 2.5.4 La via JNK/SAPK | 17 |
| 2.6 La proteïna p19 H-Ras | 18 |
| 3. LA REACCIÓ DE <i>SPLICING</i> | 20 |
| 3.1 El <i>spliceosome</i> | 22 |
| 3.2 Factors constitutius del <i>splicing</i> | 23 |
| 3.3 El <i>splicing</i> de tipus AT-AC | 25 |
| 3.4 El <i>trans-splicing</i> | 25 |
| 3.5 El <i>splicing</i> alternatiu | 26 |
| 3.5.1 La regulació del <i>splicing</i> alternatiu | 28 |
| 3.5.2 Els codons de terminació prematurs | 30 |
| 3.5.3 Els codons de stop prematurs i el <i>splicing</i> alternatiu | 30 |
| 4. miRNA i RNA INTERFERÈNCIA | 31 |
| 4.1 Mecanisme molecular | 32 |
| 4.2 El processament dels miRNAs | 34 |
| 4.3 Aplicacions tecnològiques | 34 |
| 5. LA PROTEÏNA RACK1 | 35 |
| 6. LA PROTEÏNA p73 | 39 |
| 7. TUBEROUS SCLEROSIS COMPLEX (TSC) | 42 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| 8. | TELOMERASA i CICLE CEL·LULAR | 44 |
| 8.1. | Els Telòmers | 44 |
| 8.2. | Cicle cel·lular | 47 |
| | OBJECTIUS | 51 |
| | RESULTATS | 55 |
| 1. | p19 H-Ras incrementa l'activitat PKC i activa ERK1 | 57 |
| 2. | p19 indueix activitat telomerasa i regula el <i>checkpoint</i> G1/S | 65 |
| 3. | p19 regula el creixement cel·lular i l'expressió de gens metastàtics | 73 |
| 4. | p19 regula l'expressió específica de miRNAs | 76 |
| 5. | Efecte sobre l'índex de <i>splicing</i> del gen <i>c-H-ras</i> | 80 |
| 6. | Regulació de la via de senyalització TSC | 84 |
| | DISCUSSIÓ | 89 |
| | CONCLUSIONS | 107 |
| | MATERIALS I MÈTODES | 111 |
| | A. Materials | 113 |
| 1. | Material biològic | 113 |
| 1.1. | Bactèries | 113 |
| 1.2. | Llevat | 113 |
| 1.3. | Cultiu cel·lular | 113 |
| 2. | Plasmidis, oligonucleòtids i construccions | 113 |
| 2.1. | Plasmidis | 113 |
| 2.2. | Oligonucleòtids | 114 |
| 2.3. | Construccions | 115 |
| 2.3.1. | Vectors per a assaigs de fluorescència i FRET | 115 |
| 2.3.2. | Vector per a la sobreexpressió en cèl·lules de mamífer | 116 |
| 2.3.3. | Vectors per assaigs de doble-híbrid en llevat | 117 |

| | | |
|-----------|---|-----|
| 2.3.4. | Vector per a RNAi | 118 |
| 3. | Anticossos | 119 |
| 4. | Medis de cultiu | 120 |
| 4.1. | Bacteris | 120 |
| 4.2. | Llevat | 120 |
| 4.3. | Cèl·lules de mamífer | 121 |
| 5. | Tampons i solucions | 121 |
| 5.1. | Relacionats amb proteïnes | 121 |
| 5.2. | Relacionats amb els àcids nucleics | 122 |
| B. | Mètodes | 123 |
| 1. | Cultiu cel·lular | 123 |
| 1.1. | Transfecció transitòria | 124 |
| 1.2. | Interferència del RNA (RNAi) | 125 |
| 2. | Cultiu en llevat | 126 |
| 2.1 | Creixement i Manteniment rutinari | 127 |
| 2.2 | Transformació de plàsmids | 127 |
| 3. | Tècniques proteiques | 127 |
| 3.1. | Gels desnaturalitzants d'acrilamida per a proteïnes (SDS/PAGE) | 127 |
| 3.1.1. | Obtenció del lisat cel·lular | 127 |
| 3.1.2. | Electroforesi unidimensional | 128 |
| 3.1.3. | Transferència de proteïnes (<i>Western-blot</i>) | 129 |
| 3.1.4. | Anticossos | 131 |
| 3.1.5. | Tinció amb Comassie Blue | 132 |
| 3.2. | Gels bidimensionals | 132 |
| 3.2.1. | Obtenció del lisat cel·lular | 132 |
| 3.2.2. | Electroforesi bidimensional | 133 |
| 3.2.3. | <i>Spot Picking</i> , Processament proteic i Espectrometria de Masses | 134 |
| 4. | Anàlisi i manipulació d'àcids nucleics | 134 |
| 4.1. | Extracció de RNA total | 134 |
| 4.2. | Obtenció de DNA plasmídic | 135 |
| 4.2.1. | Minipreparacions | 135 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 4.2.2. | Maxipreparacions | 135 |
| 4.3. | Subclonatge de fragments de DNA en plasmidis | 135 |
| 4.3.1. | Reaccions de modificació del DNA | 135 |
| 4.3.2. | Electroforesi en gel d'agarosa no desnaturalitzant | 136 |
| 4.3.3. | Purificació de DNA a partir de gels d'agarosa | 136 |
| 4.3.4. | Preparació i transformació de cèl·lules competents d' <i>E.coli</i> | 137 |
| 4.4. | PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) | 138 |
| 4.4.1. | Condicions generals de PCR | 138 |
| 4.4.2. | Clonatge de fragments de DNA amplificats per PCR | 139 |
| 4.4.3. | RT-PCR | 139 |
| 4.4.4. | Reacció de PCR en Temps Real (Real-Time PCR) | 140 |
| 4.5. | Microarrays de DNA | 143 |
| 4.5.1 | Microarray de miRNA | 147 |
| 5. | Microscopia | 148 |
| 5.1. | Fixació i muntatge de les cèl·lules | 148 |
| 5.2. | Immunocitoquímica | 148 |
| 5.3. | Fluorescence resonance energy transfer (FRET) | 149 |
| 5.4. | Observació al microscopi | 150 |
| 6. | Anàlisi de Cicle Cel·lular i Apoptosi per Citometria de Flux | 151 |
| 6.1. | Determinació de l'apoptosi | 152 |
| 6.2. | Assaigs de cicle cel·lular | 153 |
| 7. | Assaigs enzimàtics | 154 |
| 7.1. | Quantificació de l'activitat telomerasa | 154 |
| 7.2. | Quantificació de l'activitat PKC | 156 |
| | BIBLIOGRAFIA | 157 |
| | ANNEXES | 183 |
| 1. | ANNEX 1 | 185 |
| | Possibles gens diana dels miRNA | |
| 2. | ANNEX 2 | 190 |
| | Western Blots | |

ÍNDEX DE FIGURES

INTRODUCCIÓ

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 1 | Capacitats adquirides del càncer. | 4 |
| Figura 2 | Vies paral·leles de tumorigènesi. Diferents seqüències cronològiques del procés de tumorigènesi. | 5 |
| Figura 3 | Conservació de seqüència entre diferents isoformes Ras. | 9 |
| Figura 4 | Canvis estructurals en la molècula Ras segons la unió de nucleòtid GTP o GDP. | 11 |
| Figura 5 | Esquema del cicle regulatori del producte p21 del gen <i>ras</i> . | 12 |
| Figura 6 | Resum de les vies de transducció de senyal de Ras. | 17 |
| Figura 7 | Splicing alternatiu del gen <i>H-ras</i> . | 18 |
| Figura 8 | Seqüències aminoacídiques codificades per l'exó IDX. | 19 |
| Figura 9 | Transesterificació. | 21 |
| Figura 10 | Ensamblatge del <i>spliceosoma</i> . | 23 |
| Figura 11 | Tipus de <i>splicing</i> alternatiu. | 27 |
| Figura 12 | Seqüències reguladores del <i>splicing</i> alternatiu. | 28 |
| Figura 13 | Models per al silenciament d'un exó per part de PTB o hnRNP A1. | 29 |
| Figura 14 | Model de la biogènesi dels miRNAs. | 33 |
| Figura 15 | Model de la proteïna RACK1 amb les repeticions WD. | 36 |
| Figura 16 | Els membres de la família de p53. | 40 |
| Figura 17 | Control diferencial dels promotors de TAp73 i Δ Np73. | 41 |
| Figura 18 | Esquema de la via Akt/TSC/mTOR. | 43 |
| Figura 19 | Regulació i vies implicades amb TCTP. | 43 |
| Figura 20 | Estructura dels telòmers en llevat i en humans. | 46 |
| Figura 21 | Representació del cicle cel·lular. | 48 |
| Figura 22 | Regulació de l'activitat telomerasa durant el cicle cel·lular. | 49 |

RESULTATS

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 23 | Experiments de FRET (<i>fluorescence resonance energy transfer</i>). | 58 |
| Figura 24 | Localització subcel·lular de la proteïna p19 H-Ras endògena en diferents tipus cel·lulars. | 59 |
| Figura 25 | La mutació W164A destrueix la unió p19/RACK1. | 61 |
| Figura 26 | p19 H-Ras i PKC β II col·localitzen a la regió perinuclear. | 63 |

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 27 | p19 H-Ras incrementa l'activitat PKC. | 64 |
| Figura 28 | Activació de ERK1/2 (p44/42 MAPK) mitjançant la sobreexpressió de p19. | 65 |
| Figura 29 | Interacció de p19 H-Ras amb p73. | 66 |
| Figura 30 | Assaig de doble-híbrid en llevat per estudiar la unió dels mutants de p19 amb 73 α . | 67 |
| Figura 31 | p19 H-Ras i p73 α col·localitzen al nucli. | 67 |
| Figura 32 | p19 H-Ras incrementa l'activitat telomerasa mitjançant p73. | 69 |
| Figura 33 | p19 H-Ras incrementa el percentatge de cèl·lules en G1 i retarda la transició G1/S. | 70 |
| Figura 34 | p19 H-Ras provoca un increment dels nivells de FoxO1 cel·lulars. | 71 |
| Figura 35 | La sobreexpressió de p19 H-Ras no provoca apoptosi. | 72 |
| Figura 36 | Valors d'expressió gènica en cèl·lules HeLa sobreexpressant p19 o p19mut. | 73 |
| Figura 37 | Comprovació dels resultats de l'array mitjançant Western Blot. | 75 |
| Figura 38 | El silenciament del miRNA 206 inhibeix la parada en G1 provocada per la sobreexpressió de p19 H-Ras. | 79 |
| Figura 39 | Esquema de les sondes TaqMan utilitzades en l'experiment de PCR en Temps Real. | 81 |
| Figura 40 | p19 regula el seu propi <i>splicing</i> alternatiu. | 82 |
| Figura 41 | El mutant p21Q61L afavoreix la inclusió de IDX. | 83 |
| Figura 42 | Gel 2D tenyit on es mostren dos dels espots seqüenciats. | 85 |
| Figura 43 | Regulació de la via de senyalització TCTP. | 86 |
| Figura 44 | El silenciament de p19 provoca una davallada en els nivells cel·lulars de nm23-H1. | 88 |

DISCUSSIÓ

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 45 | Model de les vies regulades per p19. | 92 |
| Figura 46 | Model de regulació de la telomerasa a través de p53 i p73. | 98 |

MATERIALS I MÈTODES

| | | |
|------------------|--|-----|
| Figura 47 | Plasmidis que codifiquen per proteïnes fluorescents. | 115 |
| Figura 48 | Mapa del vector pRK5. | 116 |
| Figura 49 | Mapa dels vectors per als assaigs de doble-híbrid. | 117 |
| Figura 50 | Mapa del vector per a l'assaig de RNAi. | 118 |
| Figura 51 | Interferència del RNA. | 126 |
| Figura 52 | Síntesi de cDNA. | 139 |
| Figura 53 | Principi d'acció de les sondes TaqMan. | 141 |
| Figura 54 | Incubació d'arrays. | 143 |

| | | |
|------------------|--------------|-----|
| Figura 55 | Assaig TRAP. | 155 |
|------------------|--------------|-----|

ANNEXES

| | | |
|------------------|---|-----|
| Figura 56 | p19 H-Ras no activa SAPK/JNK ni p38MAPK. | 190 |
| Figura 57 | La sobreexpressió de p19 H-Ras no varia els nivells de RACK1. | 190 |
| Figura 58 | Els nivells de 4EBP1 així com de la forma activa (p-E4BP1 Thr37/45) es mantenen constants amb la sobreexpressió de p19 H-Ras. | 190 |
| Figura 59 | Nivells de profilina al sobreexpressar p19 H-Ras. | 191 |

ÍNDIX DE TAULES

INTRODUCCIÓ

| | | |
|----------------|---|----|
| Taula 1 | Conseqüències de la unió de RACK1 sobre l'activitat catalítica de certs enzims. | 38 |
|----------------|---|----|

RESULTATS

| | | |
|----------------|--|----|
| Taula 2 | Assaig de doble híbrid en llevat. | 62 |
| Taula 3 | Resum dels gens amb una expressió diferencial més significatius. | 74 |
| Taula 4 | miRNAs regulats quan sobreexpressem p19 H-Ras. | 77 |
| Taula 5 | miRNAs regulats quan sobreexpressem p19mut. | 78 |

MATERIALS I MÈTODES

| | | |
|-----------------|---|-----|
| Taula 6 | Resum dels encebadors utilitzats per als diferents clonatges. | 114 |
| Taula 7 | Volums necessaris per preparar un gel d'acrilamida. | 128 |
| Taula 8 | Anticossos Western. | 132 |
| Taula 9 | Esquema dels cicles de PCR. | 138 |
| Taula 10 | Esquema dels cicles de PCR en Temps Real. | 142 |
| Taula 11 | Anticossos utilitzats en els assaigs d'immunocitoquímica. | 149 |
| Taula 12 | Fluorocroms utilitzats en els assaigs de FRET. | 150 |

ANNEXOS

| | | |
|-----------------|--|-----|
| Taula 13 | Possibles gens diana dels miRNAs regulats per la sobreexpressió de p19. | 185 |
| Taula 14 | Possibles gens diana dels miRNAs regulats per la sobreexpressió de p19mut. | 186 |

INTRODUCCIÓ

En els últims anys s'han produït canvis en la biologia molecular que ens permeten optimitzar el tractament de malalties associades a vàries disfuncions cel·lulars. Totes les innovacions tecnològiques i en el camp de la genètica molecular preparen el camí per a la comprensió i l'anàlisi funcional que es deriva de la informació continguda en el genoma humà. Així mateix, l'estudi d'alguns dels múltiples successos moleculars que es donen en el procés multifactorial del càncer permeten oferir una nova apreciació dels factors pronòstics al temps que s'identifiquen individus amb una gran susceptibilitat a desenvolupar determinats tipus de càncer. En aquesta tesi s'ha aprofundit en l'estudi de p19 H-Ras, una de les proteïnes codificades per l'oncogèn *ras*, i s'ha intentat entendre com aquesta regula els diferents mecanismes cel·lulars estudiats. Així doncs, aquesta introducció pretén oferir una visió general de l'ampli espectre de successos moleculars involucrats durant la seva regulació.

1. CÀNCER

El cos humà funciona com una societat o ecosistema en el qual s'identifiquen els individus amb les cèl·lules, les quals són governades per unes normes establertes al llarg de bilions d'anys d'evolució, i podríem afirmar que aquesta societat és altament altruista: són capaços d'alentir o de perdre la seva capacitat proliferant, fins i tot de suïcidar-se, pel bé col·lectiu. Un procés cancerigen bàsicament es pot resumir com aquell en que les cèl·lules mutants individuals proliferen a expenses de les seves cèl·lules veïnes, provocant, al final, el col·lapse de tot el sistema. Així doncs, al llarg de l'evolució els animals han anat creant sistemes de protecció que vetllen per al compliment de les "normes socials" de la societat o organisme en qüestió.

Durant els últims temps, la recerca en el càncer ha generat una enorme quantitat d'informació i l'ha mostrat com una malaltia que comporta canvis dinàmics en el genoma. Actualment es tendeix a pensar en el procés tumoral com un procés de múltiples etapes, on cadascuna reflecteix les alteracions genètiques que condueixen la transformació progressiva de les cèl·lules normals a derivats cel·lulars cada cop més malignes. S'ha demostrat que tot aquest conjunt d'etapes és necessari per trencar els

múltiples sistemes de protecció que regulen la proliferació i l'homeòstasi cel·lular. Aquests sistemes manifesten una enorme complexitat molecular, que s'ha vist incrementada per l'elevat grau d'interrelació entre les diferents vies cel·lulars. Per tant, la comprensió dels sistemes de control cel·lulars passa també per la caracterització d'aquelles interaccions que modifiquen la resposta final en vies de senyalització específiques.

Per establir les normes generals que governen el procés de transformació de les cèl·lules normals cap a una cèl·lula tumoral s'han proposat diverses hipòtesis, de les quals se'n poden destacar dues: la formulada per Hanahan i Weinberg, situada en un context més cel·lular (Hanahan *et al.* 2000), i una altra plantejada per Vogelstein i Kinzler (Vogelstein *et al.* 2004), situada en un context més genètic. Els primers autors suggereixen que la gran quantitat de canvis en la cèl·lula tumoral són la manifestació de sis alteracions essencials en la fisiologia cel·lular: autosuficiència en senyals de creixement, insensibilitat als senyals inhibitoris de creixement, insensibilitat a la mort cel·lular programada (apoptosi), potencial replicatiu il·limitat, manteniment de l'angiogènesi i invasió tissular i metàstasi (figura 1).

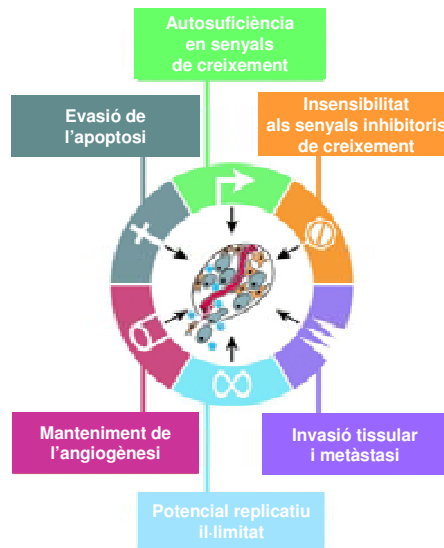


Fig 1: Capacitats adquirides del càncer (Hanahan *et al.* 2000)

En la segona proposta, Vogelstein i Kinzler destaquen que, a diferència d'altres malalties genètiques, el càncer no es pot atribuir al defecte d'un sol gen. Els autors defensen que hi ha tres grans grups de gens responsables del procés tumoral: **oncògens**, **gens supressors de tumors (GST)** i **gens estabilitzadors**. La mutació en un oncògen implica una expressió constitutiva o activa en determinades circumstàncies. Generalment, una mutació somàtica activadora en un dels al·lels és suficient per adquirir un avantatge en el creixement cel·lular. En canvi, les mutacions en GST redueixen el producte gènic, i normalment es necessita la mutació dels dos al·lels per tal de conferir un avantatge selectiu. Els oncògens i els GST contribueixen al procés tumoral tot augmentant el nombre de cèl·lules tumorals a través de l'estimulació de la divisió cel·lular, la inhibició de l'apoptosi o esquivant els diferents controls del cicle cel·lular. Però els gens estabilitzadors mantenen els nivells d'alteracions genètiques baixos, per tant la seva inactivació accelera l'acumulació d'alteracions, que poden afectar a tots els gens. Igual que en el cas dels GST, ambdós al·lels han d'estar mutats per tal de conferir avantatge selectius.

Els camins pels quals les cèl·lules normals esdevenen malignes són molt variables, i l'adquisició d'aquestes noves capacitats biològiques pot produir-se en temps diferents, tant en tumors d'un mateix tipus com d'origens diferents. De totes formes, les conseqüències biològiques finals són compartides per tots els tipus diferents de càncer (figura 2).

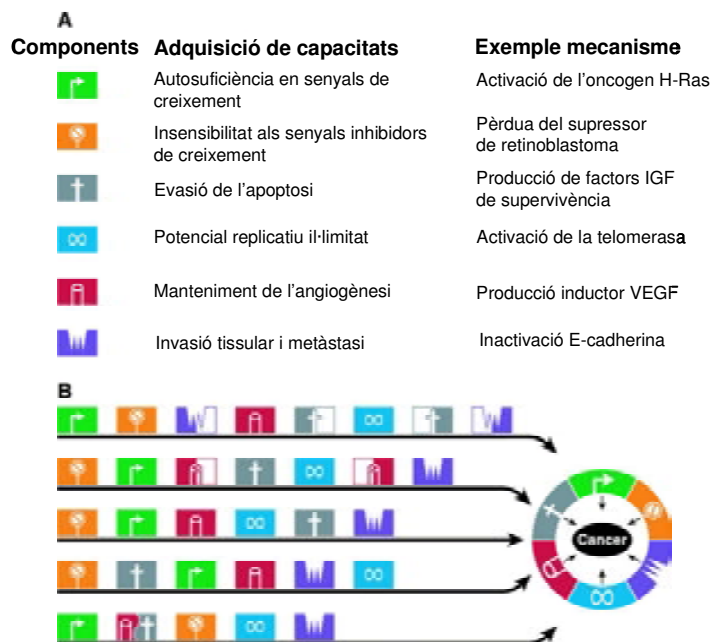


Fig. 2: A) Vies paral·leles de tumorogènesi. B) Diferents seqüències cronològiques del procés de tumorogènesi (Hanahan *et al.* 2000).

Existeixen diferents models que intenten explicar la poca freqüència de mutació en cèl·lules normals i el gran nombre de mutacions en cèl·lules tumorals. Un d'ells va proposar, ja fa trenta anys, la presència d'un fenotip mutador que vindria determinat per la mutació de gens clau en el manteniment de l'estabilitat genòmica (gens mutadors) i provocaria un augment significatiu en la velocitat d'adquisició de noves mutacions, és a dir, una inestabilitat genòmica (Loeb 2001; Loeb *et al.* 1974). Alguns autors han suggerit que l'adquisició d'aquesta inestabilitat genòmica és absolutament necessària per a la generació de les múltiples mutacions presents en el càncer. Tanmateix, altres autors diuen que una velocitat de mutació normal, associada a ones d'expansió clonal, és suficient per desencadenar un procés tumoral. La inestabilitat genòmica pot tenir el seu origen en la pèrdua de funcions genètiques que alteren processos fonamentals per a la viabilitat cel·lular, com ara replicació, reparació i recombinació del DNA. Això es demostra per fenotips de reparació dels errors d'aparellament postreplicatius (MMR) o efectes en la reparació per escissió de nucleòtids (NER). L'alteració en MMR causa un augment en la velocitat de mutació espontània, concretament inestabilitat en seqüències microsatèl·lit, i una forta predisposició hereditària al càncer (Perucho 1996).

2. LES PROTEÏNES RAS

Un dels oncogèns més estudiats és el gen *ras*. Les proteïnes codificades per aquest gen, presents en tots els organismes eucariòtics (s'han identificat en mamífers, ocells, insectes, mol·luscs, plantes, fongs i llevat) amb un elevat grau de conservació, són reguladors essencials de nombroses funcions fisiològiques, com el creixement i la diferenciació cel·lular. Els oncogèns *ras* van ser descoberts inicialment com a gens transformants dels virus de sarcoma murí Harvey i Kirsten (Ha-MSV, Ki-MSV) (Harvey 1964; Kindig *et al.* 1967), però no va ser fins a principis dels anys 80 quan es van identificar al·lels mutats de gens *ras* com a oncogèns dominants en varis tipus de tumors humans. L'anàlisi molecular d'aquests genomes retrovirals va indicar que el virus de sarcoma murí contenia gens que no estaven presents en el seu virus parental: gens que havien passat al genoma víric des de l'hoste. Les proteïnes codificades eren unes molècules de ~21 kDa; seguidament es van descobrir versions no transformants dels

gens *ras* al genoma eucariota i, més important, les formes normals i les oncogèniques difereixen en un sol parell de bases.

En mamífer existeixen tres gens *ras*: *H-ras*, *N-ras* i *K-ras*, la caracterització dels quals, tant a nivell genètic com proteic, ha donat lloc a importants avenços en l'estudi de la transducció de senyals cel·lulars, ja sigui en processos normals o tumorals (Barbacid 1987; Malumbres *et al.* 1998; Reuther *et al.* 2000). El pre-mRNA del gen *K-ras* és processat en dos mRNA obtinguts a partir d'una reacció d'*splicing* alternatiu sobre els exons 4A o 4B, donant lloc a dues proteïnes diferents, **K-Ras4A** i **K-Ras4B**, respectivament (McGrath *et al.* 1983; Pells *et al.* 1997). El pre-mRNA del gen *H-ras* també sofreix una reacció d'*splicing* en els codons *IX* i *E4A*, donant lloc a les proteïnes **p19** i **p21**, respectivament (Barbier *et al.* 2007; Cohen *et al.* 1989; Guil *et al.* 2003a; Guil *et al.* 2003b).

Si ens basem en comparacions entre les seves seqüències primàries, les proteïnes Ras comparteixen tres regions. La primera és l'extrem N-terminal i consta de 86 aminoàcids, els quals són 100% idèntics en totes les isoformes Ras. En aquesta regió es troba el domini d'unió a efectors (els aminoàcids 32 al 40), el qual és el lloc crític d'interacció amb totes les dianes conegudes de Ras. Els següents 80 aminoàcids defineixen una segona regió que divergeix una mica entre les diferents proteïnes Ras de mamífer, tot i que conserven un 85% d'homologia. Per últim, la regió C-terminal (també coneguda com a regió hipervariable o *hypervariable region*, HVR) comença a l'aminoàcid 165 i no mostra cap similitud entre les isoformes, excepte en el motiu CAAX (C, cisteïna; A, aminoàcid alifàtic; X, metionina o serina) a l'extrem més terminal, el qual és present en totes les proteïnes Ras (excepte la **p19 H-Ras**, com veurem més endavant) i que dirigeix el processament post-traduccional (figura 3).

2.1 Activació i localització diferencial

Una de les característiques principals de les proteïnes Ras és la seva funció com a transductors de senyal a través de la membrana cel·lular, en concret de factors de creixement. El seu principal paper és apropar a la membrana determinats complexos proteics de forma transitòria, els quals activaran cascades enzimàtiques per coordinar la transcripció, migració cel·lular, endocitosi, supervivència cel·lular i progressió del cicle cel·lular, diferenciació, senescència i altres.

Com hem esmentat abans, les diferents isoformes de les proteïnes Ras mostren un alt nivell d'homologia i les diferències majors es donen a la regió hipervariable a l'extrem C-terminal. La regió HRV consta d'uns 25 aminoàcids, els quals sofreixen modificacions post-traduccionals indispensables per a permetre l'ancoratge de Ras a la cara interna de la membrana plasmàtica (Hancock *et al.* 2005). Aquestes modificacions comprenen la farnesilació de la Cys186 del motiu CAAX terminal de forma irreversible (Clarke 1992), la proteòlisi dels darrers 3 residus i la carboximetil·lació de la Cys farnesilada, malgrat que estudis d'immunofluorescència han demostrat que el mutant H-*ras* p21^{Val12} es localitza també en el nucli de cèl·lules cotransformades amb p53^{Val 135}, tant *in vitro* com *in vivo* (Wurzer *et al.* 2001) encara que no queda clar si aquest senyal nuclear és degut a la p19 H-Ras. Aquesta farnesilació s'ha observat en totes les proteïnes Ras, i és essencial per a la seva funció biològica (Hancock *et al.* 1990) però no suficient per a l'ancoratge a la membrana plasmàtica. **H-**, **N-** i **K-Ras** sofreixen modificacions addicionals: **H-Ras** té una palmitilació en C181 i C184, **N-Ras** en C181 i **K-Ras** no en té cap. En canvi, **K-Ras** té una regió polibàsica formada per lisines, que es creu que interacciona amb grups carregats negativament de la membrana plasmàtica. Mentre que les formes palmitilades **H-** i **N-Ras** entren a la via d'exocitosi a través del complex de Golgi per arribar a la membrana plasmàtica, **K-Ras 4B** no (figura 3).

Per altra banda, la localització de Ras en la membrana també depèn d'aquestes modificacions post-traduccionals. Així, s'ha vist que H-Ras es localitza en illots lipídics rics en caveolina (Mineo *et al.* 1996; Song *et al.* 1996), mentre que K-Ras es localitza en zones desorganitzades de la membrana (Prior *et al.* 2001), evidenciant que K-Ras i H-Ras actuen en diferents microdominis de la membrana plasmàtica. Aquesta localització

pot regular la proximitat de diferents tipus de receptors i de GEFs (*Guanine Exchange Factors*), provocant que existeixin diferències en la susceptibilitat de l'activació de Ras per diferents estímuls. Aquest model seria un dels punts inicials per a explicar les diferències de senyalització entre les diferents formes Ras. Per exemple, s'ha observat que la localització de Ras en illots lipídics és essencial per a l'activació d'efectors com Raf-1 i PI3K (Jaumot *et al.* 2001). I anàlisis bioquímiques i de microscòpia electrònica de caveoles aïllades han mostrat la presència de tots els components de la cascada Raf-MEK-ERK/MAPK (Liu *et al.* 1997).

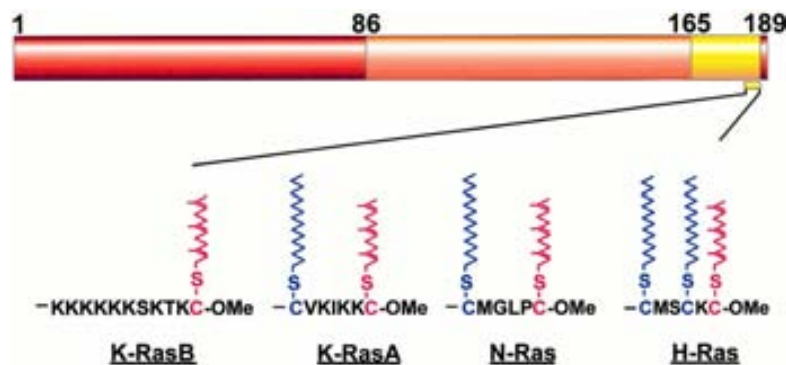


Fig. 3: Conservació de seqüència entre diferents isoformes Ras. Els graus d'homologia es representen en un gradient que va des del groc al vermell, passant pel taronja (vermell és un 100% d'homologia). Els residus cisteïna palmitilada es representen en blau, i els residus cisteïna farnesilada en rosa (Bar-Sagi 2001).

Estudis recents han demostrat que el ratolins *knock-out* (KO) pel gen *H-ras* són viables, indicant que aquest no és indispensable per a la embriogènesi (Esteban *et al.* 2001). També s'han descrit diferents mutacions als gens *ras*, principalment als codons **12**, **13** i **61**, que insensibilitzen la proteïna a l'acció dels factors GAP i per tant l'activen constitutivament. Aquestes mutacions són presents en molts càncers humans, arribant fins a un 30% la proporció de tumors que contenen proteïnes Ras permanentment activades (Bos *et al.* 1989). S'han identificat en carcinomes de bufeta, pit, còlon, fetge, ronyó, pulmó, ovari, pàncrees i estómac; en tumors hematopoètics limfoides i mieloides; i en tumors d'origen mesenquimàtic com fibrosarcomes i rabdomiosarcomes. En altres tumors com melanomes, teratocarcinomes, neuroblastomes i gliomes també s'ha demostrat l'existència de gens *ras* oncogènics (Barbacid 1987). A més a més, les mutacions en el gen *H-ras* estan implicades en el síndrome de Costello, una rara malaltia que afecta múltiples òrgans (Dereure 2006; Gripp *et al.* 2006).

L'anàlisi de l'expressió de les isoformes Ras revela variacions significatives entre teixits, així com entre diferents fases del desenvolupament. En rata, **H-Ras** està altament expressat en cervell, múscul i pell i poc en fetge, mentre que **K-Ras** es troba en nivells alts a l'intestí, pulmó i timus. **N-Ras** es troba bàsicament en testicle i timus. Així doncs, aquesta variabilitat suggereix que les diferents isoformes Ras duen a terme diferents papers en funció del tipus cel·lular i del teixit. Estudis de *knock-down* en ratolí mostren un paper essencial de **K-Ras** durant el desenvolupament, però no de **H-** o **N-Ras** (Esteban *et al.* 2001; Johnson *et al.* 1997; Koera *et al.* 1997).

A més a més, la implicació dels gens *ras* en càncers humans no es limita a la seva activació per mutacions puntuals: l'expressió a nivells anormalment alts de productes *ras* també pot contribuir a la formació de tumors, degut a anomalies en les seqüències reguladores o per amplificació del gen. Anàlisis quantitatives indiquen que els nivells de transcrit *ras* en un 50% de tumors humans són de 2 a 10 vegades més alts que en els teixits control (Spandidos 1984; Spandidos *et al.* 1984a; Spandidos *et al.* 1984b; Spandidos *et al.* 1984c). Així doncs, s'han realitzat múltiples aproximacions per a desenvolupar teràpies antitumorals focalitzades en les proteïnes Ras i les seves vies efectores.

2.2. Estructura i bioquímica de les GTPases

Les proteïnes Ras pertanyen a la gran família de les *small* GTPases, les quals tenen entre 20 i 29 kDa, comparteixen homologies i motius comuns i tenen una estructura terciària semblant, formada per 6 làmines β rodejades per hèlix α . De fet, aquesta família és el principal membre de la superfamília de les *small GTP binding proteins*, també anomenades *Ras-like GTPases*. S'han identificat més de 150 membres d'aquesta superfamília en genomes de mamífer (Colicelli 2004; Wennerberg *et al.* 2005), i s'ha dividit en 5 subfamílies: **Ras**, **Rho**, **Rab**, **Arf** i les subunitats **G α** de les proteïnes heterotrimèriques G. En canvi, Channin Der i els seus col·laboradors classifiquen les proteïnes **Ran** com una altra subfamília (Wennerberg *et al.* 2005). Però tots conclouen en incloure **Rap**, **Ral**, **Rheb** i altres GTPases dins la subfamília de les proteïnes Ras. Finalment **M-Ras**, **R-Ras** i **E-Ras** pertanyen també a la subfamília Ras, ja

que utilitzen almenys una de les vies efectores de Ras (Marte *et al.* 1997; Rodriguez-Viciano *et al.* 2006; Takahashi *et al.* 2003).

Les GTPases s'expressen amb ubiquïtat i alternen entre una forma unida a GDP inactiva i una conformació activa unida a GTP (figura 4). Aquest cicle és regulat estrictament per diferents proteïnes anomenades **GEF** (*guanine nucleotide exchange factors*), que promouen l'activació de Ras, i els factors **GAP** (*GTPase activating proteins*), els quals acceleren l'activitat d'hidròlisi de GTP intrínseca de les proteïnes Ras, inactivant-les (Malumbres *et al.* 1998).

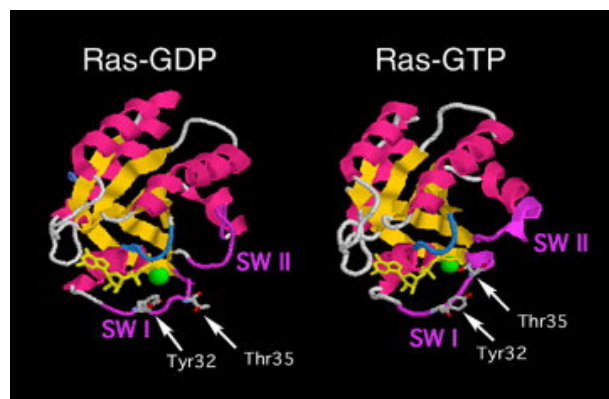


Fig. 4: Canvis estructurals en la molècula Ras segons la unió de nucleòtid GTP o GDP (Rajalingam *et al.* 2007)

Sense activació externa les proteïnes Ras es troben predominantment en forma inactiva unides a GDP, ja que aquesta unió és forta i té una velocitat de dissociació baixa. L'activació té lloc amb l'ajuda dels anomenats **GEFs**, els quals acceleren la velocitat de dissociació del GDP (figura 5). Degut al fet que en les cèl·lules hi ha més GTP que GDP, una vegada el GDP no està present, les proteïnes Ras agafen GTP cel·lular i es queden majoritàriament en forma activa (unides a GTP). Una vegada activades, les proteïnes Ras poden interaccionar amb les molècules efectores i crear un senyal bioquímic que es transmet en forma de cascada per interaccions i/o modificacions d'altres proteïnes. De fet s'anomenen efectors les proteïnes que interaccionen fortament amb la forma activa. El retorn cap a l'estat inactiu es basa en el fet que les proteïnes lligadores de GTP també tenen certa activitat GTPasa que hidrolitza el GTP cap a GDP+Pi. Aquesta activitat GTPasa, intrínseca de les proteïnes Ras, es veu accelerada pels **GAPs** (que poden ser només proteïnes reguladores o bé els mateixos efectors).

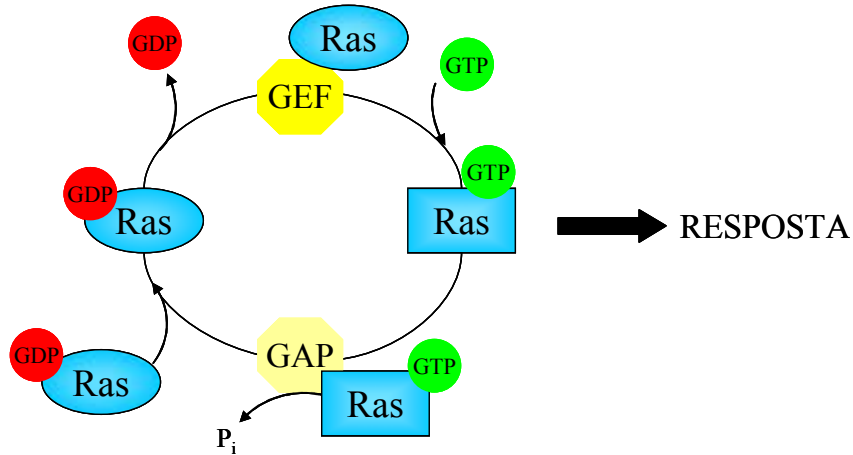


Fig. 5: Esquema del cicle regulador del producte p21 del gen *ras*.

2.3 Les proteïnes GAP

Fins ara s'han descobert sis proteïnes GAP diferents en mamífers, que regulen negativament Ras a través de l'estimulació de l'activitat GTPasa: **p120GAP**, **NF1**, **GAP1^m**, **GAP1IP4BP**, **CAPRI** i **RASAL**. La sobreexpressió de GAPs està associada amb una reducció de Ras-GTP endògena i pot prevenir l'activitat transformant provocada per la sobreexpressió de Ras normal o per oncògens. De totes formes, les proteïnes GAP no afecten l'activitat potencialment transformant d'alguns mutants Ras com aquelles en els codons 12,13 ó 61. L'anàlisi d'aquests mutants ha demostrat que les mutacions al domini efector de Ras inhabiliten la proteïna en la seva resposta a GAP, i per tant Ras es troba en la forma activa constitutivament.

La proteïna **p120GAP** va ser la primera de la família que es va identificar. A part del domini catalític, aquesta proteïna conté dominis SH2, SH3 i PH i motius d'unió a fosfolípids. En efecte, evidències inicials van suggerir que les unions Ras-GAP es trobaven en complexos amb els receptors tirosina-cinases (Kazlauskas *et al.* 1990). Yang i els seus col·laboradors van demostrar que es requeria la digestió parcial de Ras-GAP mitjançant la caspasa 3 per a activar **Akt** i la supervivència de la cèl·lula sota condicions d'estrès (Yang *et al.* 2004). **NF1** actua com a supressor de tumors. S'ha observat que els

nivells intracel·lulars de neurofibromina són regulats dinàmicament per la via ubiquitina-proteosoma (Cichowski *et al.* 2003). La degradació es dona ràpidament en resposta a factors de creixement i requereix seqüències adjacents al domini catalític de **NF1**. Així doncs, fibroblasts d'embrions de ratolí deficientes per **NF1** mostren una activitat constitutiva de Ras i **ERK**, i proliferen en resposta a baixos nivells de factors de creixement. Estudis recents suggereixen un paper crucial de **NF1** en l'activació de **mTOR**, una proteïna serina/treonina cinasa altament conservada que regula el creixement cel·lular i la proliferació en llevats, insectes i mamífers (Johannessen *et al.* 2005).

La Ras-GAP **CAPRI** és estimulada per concentracions intracel·lulars elevades de Ca^{2+} , donant lloc a una atenuació de l'activació de Ras i de **MAPK** (Lockyer *et al.* 2001). Un altre membre de la família que respon a nivells elevats de Ca^{2+} és **RASAL**, que és altament expressada en cèl·lules fol·liculars de la tiroides i en la medul·la adrenal. **RASAL** oscil·la entre el citosol i la membrana plasmàtica en resposta a pics de Ca^{2+} (Yang *et al.* 2000).

2.4 Les proteïnes GEF

Encara que els efectors de Ras-GTP més ben caracteritzats són **Raf-1**, **RalGDS** (que és un factor de tipus GEF per a la GTPasa Ral) i la fosfatidilinositol-3-cinasa (**PI3K**), s'ha descrit que Ras pot interactuar amb un ampli espectre de factors implicats en cascades de transducció de senyal que actuen en múltiples processos cel·lulars (Vojtek *et al.* 1998) entre ells **Sos** i **Cdc25** (homòleg de Sos en *Saccharomyces cerevisiae*). Tal com hem dit abans, per a l'activació de tots ells, sembla ser indispensable l'ancoratge de Ras a la cara interna de la membrana plasmàtica, ancoratge que és possible per tot un seguit de modificacions post-traduccionals que pateix la cua C-terminal de la proteïna. Es podrien dividir tots els factors GEFs en tres grups: **SOS**, **Ras-GRF** i **Ras-GRP**.

La regió central de **Sos** (~200 aminoàcids) és similar a la mateixa regió de Cdc25 i és la que catalitza l'activitat d'intercanvi de GTP. Per altra banda, la regió C-terminal rica en prolines de Sos s'uneix a dominis SH3 de Grb2, i aquest complex Sos-Grb2 interactua amb receptors tirosina-cinases, unint les senyals externes de creixement cel·lular i l'activació de Ras. Les proteïnes Sos tenen uns dominis DH (*Dbl homology*) i PH (*pleckstrin homology*) que promouen l'intercanvi de nucleòtids guanina en la família de les **Rho GTPases** i participen en la interacció proteïna-proteïna i proteïna-lípid, respectivament. A més a més, el domini DH de Sos és capaç d'estimular l'intercanvi de nucleòtids guanina en **Rac**, i en els dos casos (Ras i Rac) aquesta activitat seria inhibida per la unió del domini PH a PI3K. Així, Sos uniria l'activació de Ras i Rac mitjançant els seus diferents dominis i les seves interaccions dependrien de la via de senyalització de **PI3K**.

Les **Ras-GRFs** (*RAS-Guanine Nucleotide Releasing Factors*) comparteixen un 80% d'homologia i tenen una estructura modular comuna: un domini d'intercanvi de nucleòtids guanina C-terminal i els dominis DH i PH al centre de la proteïna (Mitin *et al.* 2005). A més a més, a l'extrem N-terminal hi tenen un domini IQ (un motiu d'unió a calmodulina que conté residus I i Q) necessari per a la seva activació. La seva activitat GEF es produeix gràcies a l'associació de Ca^{2+} -calmodulina amb el domini IQ.

Les proteïnes **Ras-GRPs** (*RAS-Guanine Nucleotide Releasing Proteins*) són també membres de la família GEF i inicialment es van clonar a partir de cervell i de teixits limfoides (Ebinu *et al.* 1998). Tenen dominis d'unió a calci i diacilglicerol, aquest últim permetent el seu reclutament a la membrana plasmàtica, i estan associats amb endomembranes, així com els seus diferents membres activen les isoformes Ras de forma diferencial: **GRP1** i **GRP3** es localitzen a l'aparell de Golgi i activen les formes Ras associades a aquest orgànul (Caloca *et al.* 2003), mentre que **GRP2** activa K- i N-Ras (Clyde-Smith *et al.* 2000).

2.5 Vies de senyalització

Malgrat la seva aparent simplicitat en quant a nombre de components de la mateixa família i la seva estructura molecular, les propietats com a factors de senyalització cel·lular de les proteïnes Ras són força complexes (Bar-Sagi 2001). Les GTPases Ras són interruptors moleculars localitzats a la membrana plasmàtica que regulen varies vies de senyalització. Per tant, una sola molècula Ras pot promoure l'estimulació de diferents efectes biològics com la proliferació, l'arranjament del citoesquelet, o la supervivència cel·lular (figura 6).

Les proteïnes Ras actuen com a punt central de moltes vies de transducció de senyals extracel·lulars cap al citoplasma i el nucli, entre les que caldria destacar les vies de **Raf/MEK/Erk** (progressió cel·lular, regulació de l'apoptosi i transcripció de gens), **RalGDS** (tràfic de proteïnes en Golgi i formació de vesícules), **PI3K** (controla proliferació cel·lular, supervivència i canvis metabòlics) i **Rho** (organització del citoesquelet d'actina i la via de les **JNK**). Per altra banda, un altre aspecte aparentment contradictori de Ras és la seva activitat com a regulador del cycle cel·lular, induint l'expressió de molècules inhibidores del cycle cel·lular com **p53** i **p16**. Es podria dir que Ras juga temporalment diferents papers específics segons la fase en la que es trobi la cèl·lula, particularment durant la fase G1 del cycle, ja que pot induir a la proliferació però també té punts en comú amb vies inhibidores del cycle cel·lular.

2.5.1. La via Ras/Raf/MAPK

Aquesta via és una de les més importants per a la proliferació cel·lular. Varis dels factors clau de creixement i protooncogèns que transdueixen els senyals que promouen el creixement i la diferenciació cel·lular ho fan a través d'aquesta via (Fang *et al.* 2005; Pearson *et al.* 2001). Els primers efectors de Ras identificats en mamífers van ser la família de cinases Raf (Moodie *et al.* 1993; Vojtek *et al.* 1993). D'aquesta forma Raf forma part d'un sistema de senyalització que transdueix els senyals des de la superfície cel·lular fins al nucli. Raf-1 és una serina/treonina cinasa (MAPKKK) que integra el senyal extracel·lular des del complex receptor Ras fins a una cascada de cinases citosòliques per fosforilació i activació de la MEK (MAPKK), que a la vegada fosforila i activa, exclusivament, a ERK1/2 (p44 i p42 MAPK), que finalment regulen varies

proteïnes citoplasmàtiques (com cdk5 i proteïnes del citoesquelet) i nuclears (CREB, Elk-1) i altera l'expressió gènica (Pearson *et al.* 2001).

2.5.2. La via PI3K/Akt

La fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) és una proteïna cinasa formada per molècules adaptadores p85 i per la subunitat catalítica p110, a la que Ras s'uneix i activa en una interacció que necessita GTP (Rodríguez-Viciano *et al.* 1994). PI3K catalitza la fosforilació del fosfatidilinositol (4,5)-bifosfat (PIP2) per formar fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfat (PIP3) com a resposta a molts factors de creixement i citosines. Aquest segon missatger s'uneix a moltes proteïnes que contenen un domini d'homologia de pleckstrina, el qual facilita la interacció amb PIP3. PI3K i els seus productes lipídics actuen en vies que controlen la proliferació i supervivència cel·lular i els canvis metabòlics, sovint a través de dues cinases, PDK1 i Akt (també anomenada PKB). PDK1 és important per l'activació de molts membres de la família de serina/treonina cinases AGC, incloent a la mateixa Akt, però també d'altres com p70S6K, algunes PKCs i RSK. Al mateix temps, Akt controla la supervivència, creixement i cicle cel·lular així com el metabolisme mitjançant fosforilacions activadores o inhibidores a un gran nombre de diferents substrats (Shaw *et al.* 2006). PI3K s'inhibeix per la fosfatasa lipídica PTEN, que treu el fosfat D3 a PIP3 per limitar i acabar la senyalització de PI3K a les cèl·lules (Maehama *et al.* 1998). Existeix una alta freqüència de mutacions somàtiques de PTEN en diferents tipus de càncer, a més de mutacions germinals en síndromes de càncer hereditaris i dominants com les síndromes de Cowden o de Bannayan-Zonana (Shaw *et al.* 2006).

2.5.3. La via de RalGDS

Tal com hem dit abans, RalGDS forma part de la família d'intercanviadors de nucleòtids de Ral, una GTPasa de la família Ras. RalGDS estimula l'intercanvi de GDP per GTP de Ral, que queda estimulada i, juntament amb Akt, inhibeix els factors de transcripció *forkhead* de la família FoxO (De Ruiter *et al.* 2001), i activa a RalBP1 i a la fosfolipasa D1 (PLD1), que està implicada en la formació de vesícules i en el tràfic a l'aparell de Golgi.

2.5.4. La via JNK/SAPK

Aquesta via és homòloga a la via Raf/MEK/Erk, però sembla ser activada per estímuls diferents. Entre els estímuls extracel·lulars que l'activen es troben les citosines pro-inflamatòries, la llum UV, certs factors de transcripció, inhibidors de la síntesi de proteïnes i l'estrès osmòtic (Derijard *et al.* 1994). Les citosines inflammatòries com el TNF- α i IL-1 sembla ser que l'activarien mitjançant les proteïnes de la família Rac/Rho. La MEKK1 activada fosforila a SEK (també coneguda com MKK4), la qual alhora activa JNK (SAPK). JNK s'uneix fortament a la regió terminal de c-jun i fosforila les serines 63 i 73. Mitjançant aquesta via s'activen els factors de transcripció ATF2 i TCF/EIk1.

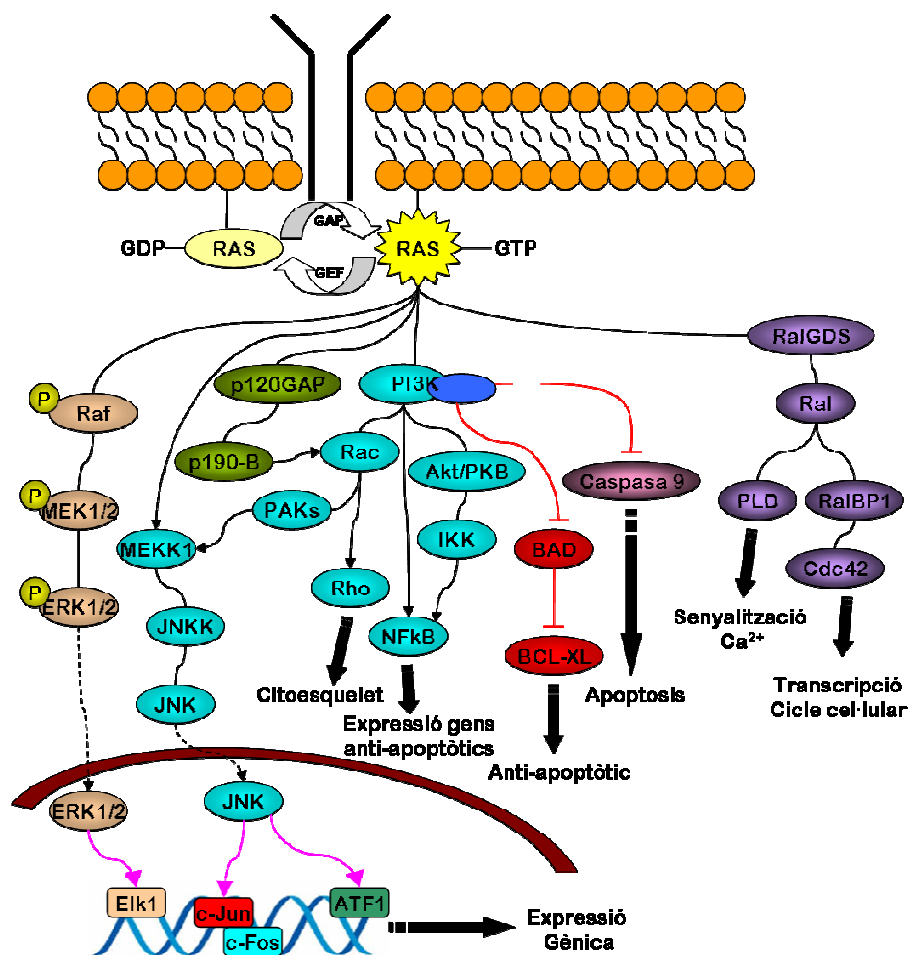


Fig. 6: Resum de les vies de transducció de senyal de Ras.

2.6 La proteïna p19 H-Ras

L'any 1989, el grup de A. D. Levinson va detectar que *c-H-ras* pateix una reacció de *splicing* alternatiu en el darrer exó codificant (Cohen *et al.* 1989), cas que també s'ha detectat posteriorment en el gen *c-K-ras* (Wang *et al.* 2001). El gen *c-H-ras* està estructurat en 4 exons codificants (anomenats 1, 2, 3 i 4), i dos exons no codificants, l'exó 0 (en el 5'UTR) i l'exó 4B (en el 3'UTR). Les regions intròniques que els separen es denominen A-E. El nou exó alternatiu, de 82 nucleòtids, es troba dins de l'intró D, entre els exons 3 i 4, i es va denominar **IDX** (*intron D exon*). En el gen normal, doncs, el pre-mRNA de *c-H-ras* és processat en dos mRNA, mRNA p21, que exclou IDX, i mRNA p19, que inclou IDX i que codifica per una proteïna més curta, de 19 kDa, degut a la presència d'un codó de stop en pauta (figura 7). El codó de stop faria que la proteïna p19 H-Ras presentés una cua C-terminal diferent de la resta de proteïnes Ras, sense el motiu CAAX i per tant amb un processament post-traducciona teòricament diferent, que implicaria que p19 H-Ras no es localitzés en la membrana (figura 8).

S'ha observat que aquest *splicing* alternatiu és regulat per **hnRNP A1**, proteïnes **SR** i la proteïna **helicasa p68** (Guil *et al.* 2003b). L'existència de la proteïna p19 H-Ras va ser descrita anteriorment pel mateix grup (Guil *et al.* 2003a), demostrant que el mRNA p19 alternatiu era estable i tan abundant com el mRNA p21 en tots els teixits i línies cel·lulars humanes i de rata estudiats mitjançant seqüències exòniques antisentit marcades radioactivament: el mRNA p21 era detectat amb una seqüència contra l'exó E4A, i el mRNA p19 amb una seqüència anti-IDX.

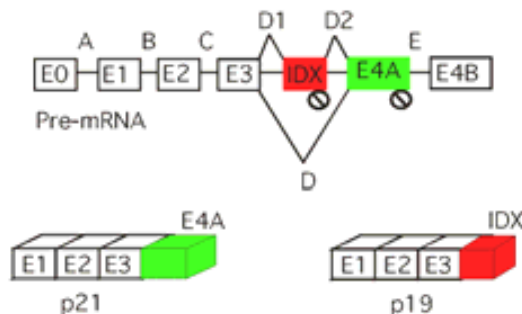


Fig. 7: Splicing alternatiu del gen *H-ras*.

A l'estudiar la localització cel·lular de p19 H-Ras i comparar-la amb la de p21 H-Ras mitjançant experiments d'immunolocalització o transfecció transitòria de les proteïnes unides a la molècula fluorescent GFP, es va veure que p19 H-Ras no s'acumulava a la membrana plasmàtica sinò que es distribuïa entre el citosol i el nucli de cèl·lules HeLa i COS-1. Concretament s'observà més intensitat en el nucli, on es podia veure en alguns casos un patró de fluorescència puntejat. També es varen fer assaigs d'unió a GTP que mostraven una clara disminució d'activitat d'unió a GTP respecte la proteïna p21 H-Ras, segurament degut a la falta de dos importants llocs d'unió a GTP situats a l'exó E4A. Els assaigs posteriors de doble-híbrid en llevat mostraren l'absència d'interacció entre p19 H-Ras i dos efectors de p21 H-Ras, **Raf1** i **Rin1**, però també s'observà la unió de p19 H-Ras amb la proteïna *scaffolding* (proteïna adaptadora de senyal) **RACK1**, fet que suggeria l'associació de p19 H-Ras amb complexos multiproteics per a participar en una via de senyalització específica. A més a més, p19 H-Ras no interaccionava amb p21 H-Ras en aquests assaigs, però era capaç d'interaccionar amb ella mateixa, indicant una possible dimerització de la proteïna.

```

Human   GSRSGSSSSSGLWDPPGPM (20)
Monkey  VSRSGSGSSSGLWDPPGPM (20)
Cow     GSRSGSGSSSGLWDPPGPP (20)
Pig    GSRSGSGSGSGLWDPPGPP (20)
Rabbit GSRSGSGSSSGLWDPPGPM (20)
Hamster GSRSGSGSSSGLWDPPGPM (20)
Rat     GSRSGSGSSSGLWDPPGPM (20)
Mouse1  GSRSGS_S_SGLWDPPSPGTHVTQRPSSWRGGCLLYTSP (38)
Mouse2  GSRSGS_S_  GLWDPPSPGTHVTQRPSSWRGGCLLYTSP
Mouse3  GSRSGS_S_SGLWGPPSPGTHVTQRPSSWRGGCLLYTSP
Consensus *****
GSRSGSGSSSGLWDPPGPMTHVTQRPSSWRGGCLLYTSP
1                               20                               40

```

Fig. 8: Seqüències aminoacídiques codificades per l'exó IDX. En diferents espècies, alineades amb el programa MacMolly Tetra.

3. LA REACCIÓ DE *SPLICING*

Les regions codificants, o exons, de la majoria de transcrits primaris generats per la RNA polimerasa II estan separades per regions no codificants, o introns, que constitueixen la major part de la longitud dels pre-mRNAs. Els exons són units entre ells i els introns són eliminats en una reacció que es coneix com a *splicing* (Sharp 1994). El *splicing* és un procés nuclear que pot ocórrer co-transcripcionalment i que és imprescindible per tal de generar els mRNAs correctes que seran exportats al citoplasma i traduïts en proteïnes. La reacció de *splicing* s'ha caracteritzat des de llevat fins a mamífer i implica l'acció concertada i dinàmica d'un elevat nombre de factors proteics i ribonucleoproteics que reconeixen, de manera acuradíssima, els extrems intrònics/exònics que s'han d'unir per a formar el transcrit madur.

En mamífers els introns solen ser llargs i constitueixen el 90% de la llargada dels pre-mRNAs (el nombre d'introns presents pot variar des de 0 fins a més de 50). Els exons es troben enmig dels introns i representen les úniques seqüències que romandran en el transcrit un cop aquest hagi estat processat. L'eliminació dels introns durant la reacció de *splicing* depèn del reconeixement de tota una sèrie de seqüències al llarg del pre-mRNA que indueixen l'ensamblatge dels factors de *splicing* en un macrocomplex catalític anomenat *spliceosome*, responsable del tall d'introns i la unió dels exons per a formar el transcrit madur.

Però el procés en metazous és complex: una de les teories és la hipòtesi de la “**definició de l'exó**” (Berget 1995; Robberson *et al.* 1990), la qual proposa que en els pre-mRNAs amb introns llargs (cas dels eucariotes), la maquinària de *splicing* busca un parell de llocs de tall relativament junts mitjançant la interacció de proteïnes entre els llocs 3' i 5' de l'exó.

Les seqüències més importants per al *splicing* es troben conservades en les fronteres intró/exó, i les podem dividir en dues zones:

- A l'extrem 5' de l'intró, al voltant del lloc de tall 5', (donador d'*splicing* o 5'ss, 5' *splice site*), hi trobem la **seqüència consensus pGU**, envoltada per una seqüència *consensus* menys conservada.
- A l'extrem 3' de l'intró, (acceptor d'*splicing* o 3'ss, 3' *splice site*), hi ha tres seqüències conservades: l'anomenat **lloc de ramificació** (*branch site*), l'adenosina del qual constitueix el punt de ramificació (bp, *branch point*) i té un paper principal a la reacció d'*splicing*; aquest és precedit per una regió rica en pirimidines de longitud variable; i finalment una seqüència terminal **AG**, també envoltada per una seqüència *consensus* menys conservada.

La reacció de *splicing* consta de dues transesterificacions (figura 9). En la primera, el grup 2'-OH l'adenosina del punt de ramificació ataca nucleofilicament l'enllaç fosfodièster de l'extrem 5'ss. Aquest enllaç és trencat i se'n forma un de nou, 2'-5' entre la guanosina inicial de l'intró i l'adenosina del bp, quedant alliberat el primer exó, i l'intró adopta una estructura ramificada de llaç o *lariat*, encara unit a l'exó de l'extrem 3'. La segona reacció és un atac nucleofilic de l'enllaç fosfodièster del 3'ss per part del grup 3'-OH final de l'exó lliure, provocant el desplaçament de l'intró en forma de *lariat* i la unió dels dos exons per un nou enllaç 3'-5' (Padgett *et al.* 1984; Ruskin *et al.* 1984). Després del *splicing*, l'intró alliberat en forma de *lariat* és linealitzat sota l'acció d'enzims desramificadors que tallen específicament l'enllaç fosfodièster 2'-5' i posteriorment és degradat per nucleases en el mateix nucli (Ruskin *et al.* 1985).

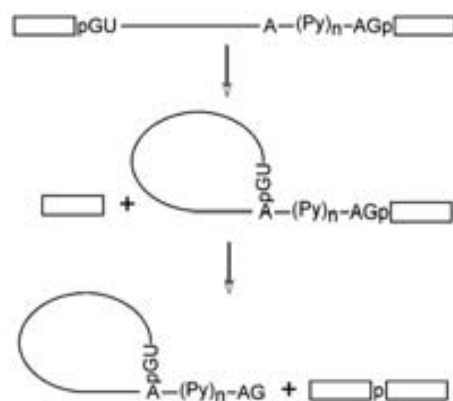


Fig. 9: Transesterificació. Les dues reaccions de transesterificació nuclear de pre-ARNm (Black 2003)

3.1. El *spliceosome*

Com hem comentat anteriorment, el *spliceosome* és un macrocomplex catalític responsable del tall d'introns i la unió dels exons per a formar el transcrit madur. Aquest està format per 5 ribonucleoproteïnes petites nuclears (snRNPs, *small nuclear ribonucleoproteins* o '*snurps*') i més de 100 factors proteics, que interaccionen directament amb el pre-mRNA o bé entre ells per formar el complex catalític madur (Staley *et al.* 1998). Les **snRNPs** són complexos formats per una fracció ribonucleica rica en uridines (els RNAs nuclears petits rics en uridines o **UsnRNAs**, *U-rich small nuclear RNAs*) i una fracció proteica que s'associa de forma molt estable al voltant dels UsnRNAs.

Durant l'ensamblatge de l'*spliceosome*, **U1 snRNP** s'uneix al 5'ss per aparellament de bases entre el lloc d'*splicing* i el **U1 snRNA**. Els elements 3'ss són envoltats per un conjunt de proteïnes especials: **SF1** s'uneix a la seqüència conservada del lloc de ramificació; la subunitat de 65 kDa del factor **U2 (U2AF)** s'uneix a la zona de polipirimidines, i la subunitat de 35 kDa de **U2AF** interacciona directament amb el dinucleòtid AG que marca l'extrem 3' de l'intró. Anàlisis *in vitro* de l'ensamblatge del *spliceosome* en extractes nuclears de mamífer han permès caracteritzar la seva seqüència dinàmica de formació (figura 10). El *spliceosome* es forma a partir de precomplexos, l'ordre dinàmic del qual és $H \rightarrow E \rightarrow A \rightarrow B \rightarrow C$.

- El complex H no és pròpiament de *splicing*, ja que correspon als transcrits de RNA naixent associat amb proteïnes de l'heterogeni de forma inespecífica i amb alguna UsnRNP laxament unida.
- El complex E es forma quan hi ha el primer reconeixement dels punts de tall per part de **U1snRNP**, el qual interacciona amb el 5'ss mitjançant l'aparellament de bases del seu RNA amb l'extrem 5' intrònic.
- El complex A es forma amb l'entrada de **U2snRNP** i altres factors generals de *splicing*.
- Els complexos B/C representen ja l'*spliceosome* madur. La seva formació requereix l'entrada de **U4/U5/U6snRNP** en forma de tripartícula, i llavors es produeix un rearranjament per formar el complex C, en el qual la interacció de

U1snRNP al 5'ss és substituïda per **U6snRNP** i les proteïnes **U1** i **U4snRNP** surten del complex. Aquest últim complex és el que catalitza les dues reaccions de transesterificació de que consta la reacció de *splicing*.

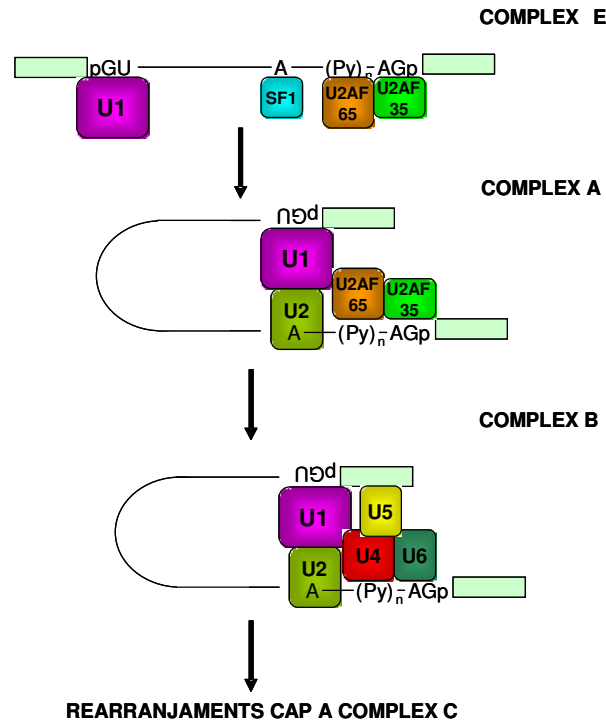


Fig. 10: Ensamblatge del *spliceosoma*. Visió esquemàtica de l'ensamblatge del *spliceosome in vitro* (Black 2003)

3.2. Factors constitutius del *splicing*

Hem dit que la reacció de *splicing* és catalitzada per un complex ribonucleoproteic, el *spliceosome*, que s'ensambla i es desensambla contínuament al voltant dels extrems 5'ss i 3'ss que s'hauran d'unir. A part de les snRNPs, existeixen molts altres factors no ribonucleoproteics que participen en el procés de *splicing*. Tot seguit passem a descriure els elements més importants:

Les proteïnes **SR** participen en varis passos de l'ensamblatge del *spliceosome*, i funcionen com a factors essencials de *splicing* i factors de regulació (Graveley 2000). Tot i que mostren certes similituds en les seves funcions essencials, poden tenir diferents

activitats en el *splicing* alternatiu, i s'han observat efectes letals en *knockouts* (disrupció dirigida d'un gen) de proteïnes SR (Ring *et al.* 1994; Xu *et al.* 2005). Tenen una estructura modular amb un o dos dominis RRM (*RNA recognition motif*) a l'extrem N-terminal que s'uneixen al RNA, i dominis C-terminal rics en residus arginina i serina (dominis RS). A més d'unir-se al RNA, les proteïnes SR interaccionen entre elles i amb d'altres proteïnes a través del seu domini RS, d'una manera que sembla dependent de l'estat de fosforilació en què es trobin els residus de serina d'aquest domini (Wang *et al.* 1998). Tant la hiper- com la hipofosforilació de les proteïnes SR provoca una inhibició del *splicing*, i la modulació dels nivells de fosforilació de les SR pot ser important en el control del *splicing*.

Els dominis RRM i RS també els trobem en factors de *splicing* com **U2AF65** (*U2 auxiliary factor 65 kDa*) i **U2AF35**, els quals s'uneixen a la zona de polipirimidines i al dinucleòtid AG que marca l'extrem 3' de l'intró, respectivament. El factor **SF1** s'uneix a la seqüència conservada del lloc de ramificació i pot interactuar amb U2AF65, d'una manera mútuament estabilitzadora.

Uns altres factors de regulació són la família de ribonucleoproteïnes nuclears de l'heterogeni (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*, **hnRNPs**). Aquests s'uneixen als àcids nucleics de cadena senzilla i empaqueten inicialment els transcrits naixents de pre-mRNA en partícules d'uns 230 nucleòtids de llargada. Disposen de dominis RRM i KH d'unió al RNA, així com dominis auxiliars que sovint estan involucrats en interaccions proteïna-proteïna, i tenen funcions diverses en el metabolisme del pre-mRNA i del mRNA (Dreyfuss *et al.* 2002; Krecic *et al.* 1999). Les hnRNPs que fins al moment s'han implicat en la regulació específica del *splicing* són les proteïnes **A1**, **A2/B1**, **H**, **F**, **I** (més coneguda com **PTB**, *polypyrimidine tract binding protein*), i **K**.

Finalment, les **helicases** dependents d'ATP són les encarregades dels múltiples arranjaments conformacionals que depenen d'energia durant la reacció de *splicing*, i les proteïnes **CBP80** i **CBP20** (*cap binding protein 80* i *20*, respectivament) s'uneixen a l'estructura de caputxó de l'extrem 5' dels pre-mRNAs sintetitzats per la RNA Pol II, formant el dímer **CBC** (*cap binding complex*).

3.3. El *splicing* de tipus AT-AC

S'han descrit alguns casos d'introns que no tenen als seus extrems les seqüències conservades descrites anteriorment sinó que com a 5'ss presenten el dinucleòtid AT, i en el 3'ss el dinucleòtid AC. A més, aquests introns són processats per una maquinària de *splicing* una mica diferent a la descrita fins ara, en què els UsnRNPs U1 i U2 són substituïts per l'U11 i U12snRNPs, respectivament, i la funció de l'U4/U6snRNP la duu a terme el U4/U6atac. L'U5snRNP està conservat en els dos sistemes (Tarn *et al.* 1996). L'estructura secundària dels UsnRNAs del tipus AT-AC és semblant als seus equivalents en el *splicing* majoritari GU-AG, i el reconeixement dels punts de tall, la definició de l'exó i els aparellaments RNA-RNA es mantenen.

S'han trobat introns de tipus AT-AC a *A. Thaliana*, *D. melanogaster*, *X. laevis* i a diferents mamífers.

3.4. El *trans-splicing*

Es coneix com a *trans-splicing* el tall d'introns i unió d'exons que es troben en molècules de RNAs diferents. És una reacció equivalent a la que hem vist fins ara (que també podríem anomenar de *cis-splicing*), però amb les seqüències donadores i acceptores de *splicing* en pre-mRNAs diferents. El *trans-splicing* es va caracteritzar inicialment a nematodes, trematodes, tripanosomàtids i a *Euglena* (Tessier *et al.* 1991), en els quals una seqüència comuna és introduïda a 5' de molts transcrits per *trans-splicing*. També a *C. elegans* s'estima que un 20% dels transcrits es processen per *trans-splicing*. En mamífers s'ha descrit algun cas en què l'aparició d'exons repetits en el transcrit madur responia a fenòmens de *trans-splicing* natural (Caudevilla *et al.* 1998; Frantz *et al.* 1999; Takahara *et al.* 2000) i s'ha establert la capacitat de molts substrats de *cis-splicing* d'actuar com a trans-donadors o trans-acceptors *in-vitro* (Codony *et al.* 2001).

3.5. El *splicing* alternatiu

El processament d'un mateix pre-mRNA de manera diferencial per a generar diverses isoformes del transcrit madur és el que es coneix com a *splicing* alternatiu. Aquest és una eina per a ampliar el poder codificant dels gens, ja que sovint l'existència de diferents isoformes de mRNA comporta la síntesi de diferents productes proteics. A finals dels anys 70, es va començar a proposar que diferents combinacions d'exons podrien ser processades a partir d'un mateix transcrit immadur, generant-se a partir d'un sol gen diferents isoformes de mRNA (Gilbert 1978). Des d'aleshores la informació sobre nous casos de *splicing* alternatiu només ha fet que multiplicar-se, i la seqüenciació completa de diversos genomes ha posat en evidència no només la importància qualitativa del *splicing* alternatiu en l'expressió gènica, sinó també la seva abundància (Hanke *et al.* 1999). Anàlisis de EST (*expressed sequence tag*) i bases de dades de cDNA estimen que ~ 40-60% dels gens humans sofreixen *splicing* alternatiu (Modrek *et al.* 2002).

Avui en dia se sap que el *splicing* alternatiu és present en tots els organismes eucariotes. El nombre relativament escàs de gens humans (~35000) en comparació a altres organismes menys complexos han fet suposar que el *splicing* alternatiu era, junt amb d'altres modificacions post-transcripcionals i post-traduccionals, un dels principals responsables de la major complexitat humana. Però aquesta idea pot ser parcialment correcta: segurament el *splicing* alternatiu és un dels principals generadors de múltiples funcions proteiques a partir d'un sol gen, però un estudi demostra que la proporció de gens que presenten isoformes alternatives és similar entre humans i altres mamífers i altres organismes. L'estudi proposa que la incidència del *splicing* alternatiu en la creixent complexitat de les espècies no estaria tan relacionada amb l'abundància global del fenomen com amb el tipus de gen en què es dona més varietat d'isoformes (Brett *et al.* 2002).

En un típic mRNA multiexònic, el patró d'*splicing* pot variar, encara que la majoria d'exons són constitutius: sempre sofreixen una reacció de *splicing* i són inclosos al mRNA final (figura 11). De totes formes trobem casos d'exons regulats que a vegades s'inclouen i a vegades s'exclouen del mRNA final, i s'han anomenat exons casset. En alguns casos, exons casset múltiples són mútuament excloents, produint mRNAs que

sempre inclouen una o varies opcions d'exons, però no totes. En aquests sistemes, existeixen mecanismes especials que promouen l'elecció d'un exó o un altre.

L'extrem 5' dels exons d'un mRNA pot variar en funció d'inicis de transcripció alternatius i del *splicing* alternatiu. De forma similar, l'extrem 3' dels exons també pot variar combinant el *splicing* alternatiu i punts de poliadenilació alternatius (la maquinària per al control de la poliadenilació sembla similar a la del *splicing*). I finalment, alguns casos importants de *splicing* es donen per un fracàs a l'hora d'eliminar un intró, un patró de *splicing* anomenat retenció d'intró (*intron retention*). Alguns pre-mRNAs sovint tenen posicions múltiples susceptibles de sofrir *splicing* alternatiu, donant lloc a una família de proteïnes a partir d'un sol gen (Black 2003).

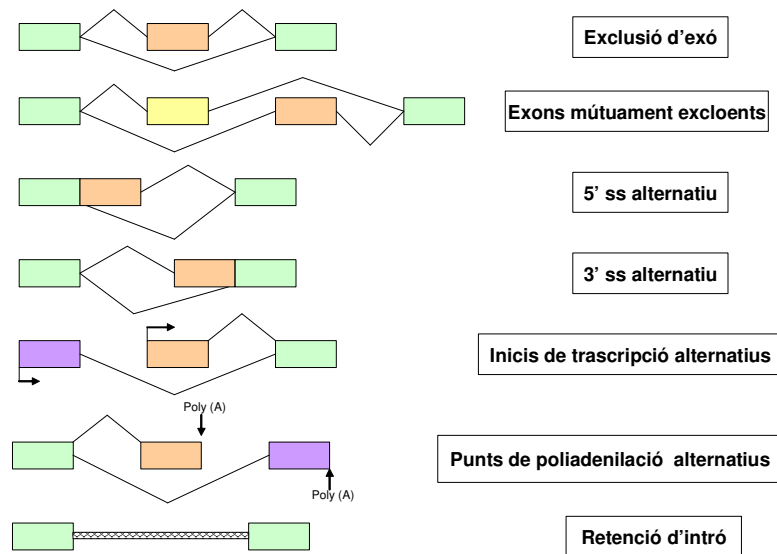


Fig. 11: Tipus de *splicing* alternatiu.

Les conseqüències del *splicing* alternatiu en la proteïna traduïda poden ser variades: petits canvis en la seqüència peptídica poden alterar la unió dels lligands, l'activitat enzimàtica, la regulació al·lostèrica o la localització proteica. En altres gens, la inserció o delecio d'un fragment de seqüència que no alteri la pauta de lectura pot provocar l'aparició o desaparició d'un domini de la proteïna. Els canvis genètics basats en el *splicing* alternatiu són importants en molts processos cel·lulars i de desenvolupament, incloent la determinació del sexe, apoptosi, orientació de l'axó,

excitació i contracció cel·lular, i d'altres. Els errors en la regulació del *splicing* estan implicats en moltes malalties com serien l'atròfia muscular espinal o SMA (*spinal muscular atrophy*) (Hofmann *et al.* 2002) o el parkinsonisme i demència fronto-temporal associats al cromosoma 17 (FTDP17 o *fronto-temporal dementia and parkinsonism associated with chromosome 17*) (Varani *et al.* 1999).

3.5.1. La regulació del *splicing* alternatiu

A més a més dels llocs de *splicing consensus*, altres elements auxiliars poden influir en el *splicing* alternatiu. Aquests es poden classificar segons la seva localització i activitat com activadors de *splicing* exònics i intrònics (**ESEs**, *exonic splicing enhancers* i **ISEs**, *intronic splicing enhancers*, respectivament) i inhibidors de *splicing* exònics i intrònics (**ESSs**, *exonic splicing suppressors* i **ISSs**, *intronic splicing suppressors*, respectivament) (figura 12). L'efecte activador consisteix sovint en un reclutament de factors de *splicing* constitutius cap als llocs de tall a través d'interaccions proteïna-proteïna, mentre que la inhibició pot ser deguda a una ocupació d'aquests llocs per unió dels factors inhibidors, constriccions estèriques o bloqueig de l'acció de seqüències activadores. L'exclusió o inclusió d'un exó es decideix pel balanç de forces final entre aquestes influències competents, el qual ve determinat per les concentracions relatives de proteïnes activadores o inhibidores que s'uneixen al RNA (Matlin *et al.* 2005; Smith *et al.* 2000).

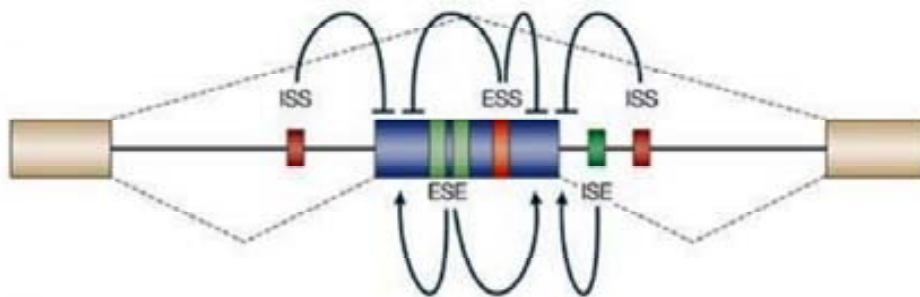


Fig. 12: Seqüències reguladores del *splicing* alternatiu (Matlin *et al.* 2005).

El fet que almenys un 15% i potser fins a un 50% de les malalties humanes d'origen genètic sorgeixen de mutacions ja sigui en seqüències *consensus* o en els més variables elements auxiliars, ens il·lustra la importància d'una reacció de *splicing* exacta per al bon funcionament cel·lular.

Les **hnRNPs A1, H i I (PTB)** són les que s'han relacionat amb més casos de control alternatiu, encara que els mecanismes concrets d'actuació s'han descrit només en pocs exemples. hnRNP A1 i PTB podrien actuar de manera similar en els dos casos en què indueixen una exclusió de l'exó del mRNA, i s'han proposat dos mecanismes d'actuació d'aquestes proteïnes per a definir el silenciament de la zona (figura 13):

- 1) la unió a banda i banda de l'exó silenciada el segresta en un llaç que l'allunya de la resta del pre-mRNA.
- 2) la unió a una zona d'alta afinitat i l'oligomerització de factors a partir d'aquest punt travessant tot l'exó antagonitza la seva definició.

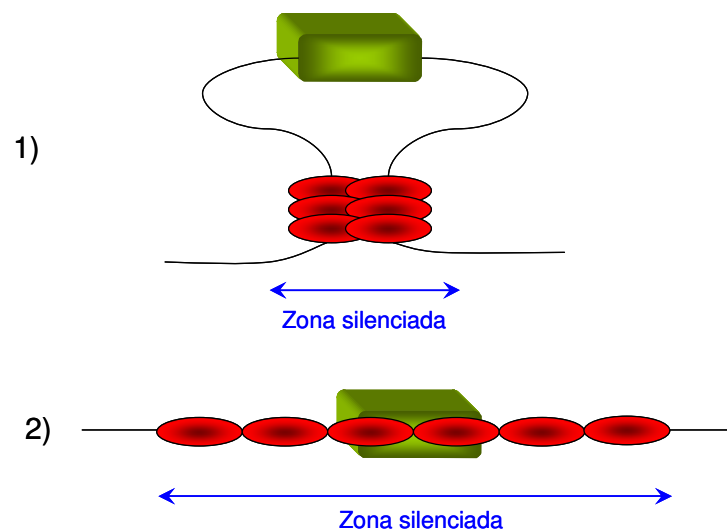


Fig. 13: Models per al silenciament d'un exó per part de PTB o hnRNP A1. En vermell es representen les proteïnes PTB o A1, en verd l'exó silenciada (tesi de Sònia Guil, 2002).

3.5.2. Els codons de terminació prematurs

La majoria de reaccions de *splicing* poden afectar la seqüència codificant, la meitat d'aquestes alterant la pauta de lectura (Clark *et al.* 2002) i una tercera part donant lloc a reaccions de **NMD** (*Non-Sense Mediated Decay*) sobre la molècula de RNA (Lewis *et al.* 2003). El fenomen pel qual un codó de stop en un missatger madur és considerat com a prematur (**PTC**, *premature stop codon*) i indueix la ràpida degradació del RNA abans de ser traduït és conegut amb el nom de degradació mitjançant codons sense sentit o NMD. És un procés descrit des de llevat fins a humans (Hentze *et al.* 1999). La presència d'un PTC en el mRNA pot ser deguda a diferents causes:

- reordenaments en el DNA
- mutacions sense sentit o canvis en la pauta de lectura dels gens
- errors durant la transcripció o *splicing*

Normalment són reconeguts com a PTC els codons de stop que es troben més de 55 nucleòtids cap a 5' de l'última unió exó-exó. El complex EJC (*exon junction complex*) es situa després del *splicing* a ~20 nucleòtids de les unions exó-exó, també en sentit 5'. Així doncs, en la majoria dels mRNAs el codó de stop es trobarà després de l'últim EJC, i el ribosoma, durant l'elongació traduccional, haurà anat desplaçant a tots els EJC abans de trobar-se amb el codó de stop i el complex de post-terminació que l'acompanya. Aquest complex de terminació provoca l'alliberament del ribosoma i la conseqüent finalització de la traducció. En subseqüents rondes de traducció, en els mRNAs ja no hi són presents els EJCs i el missatger és immune a NMD. En canvi, en el cas que hi hagi present un stop prematur (amb el seu complex de post-terminació) abans d'un EJC, el ribosoma s'hi aturarà i ja no serà capaç de desplaçar els darrers EJC. Sembla que interaccions entre aquests EJCs i components del complex de post-terminació són les que desencadenaran el senyal de degradació del mRNA.

3.5.3. Els codons de stop prematurs i el *splicing* alternatiu

S'ha definit el *splicing* alternatiu associat a codons sense sentit (NAS, *nonsense-associated altered splicing*) com aquell fenomen que exclou del transcrit madur els

exons que contenen PTCs, mentre que en el transcrit salvatge aquests exons serien inclosos constitutivament en el mRNA.

Els mRNAs que contenen PTCs són un problema per la cèl·lula, ja que codifiquen per proteïnes truncades que poden ser dominants negatius o tenir menys activitat que la proteïna salvatge. S'ha estimat que un 30% dels desordres genètics en humans són resultat de mutacions que donen lloc a PTCs (Frischmeyer *et al.* 1999). A part de la via NMD comentada anteriorment, existeix una segona resposta cel·lular per prevenir la producció de proteïnes truncades: la via NAS, una resposta que incrementa els nivells de transcrits generats per splicing alternatiu que han escapat de la degradació provocada per PTC (Maquat 2002; Valentine 1998). Es podria considerar que NMD i NAS funcionen com a respostes complementàries (Wang *et al.* 2002).

4. miRNA i RNA INTERFERÈNCIA

El mecanisme conegut com a RNA interferència (**RNAi**) és un procés pel qual s'inhibeix l'expressió gènica mitjançant la degradació de molècules de RNA específiques o dificultant la transcripció de gens específics. Les seves dianes són sovint RNAs de virus i transposons (probablement una forma innata de resposta immune), encara que també intervenen regulant el desenvolupament i el manteniment del genoma. L'any 1998 Andy Fire i Craig Mello van utilitzar la RNAi com a tècnica experimental, descobrint que va ser guardonat amb el Premi Nobel de Fisiologia i Medicina l'any 2006 (Fire *et al.* 1998). Tot i que la biologia de la RNAi encara no es coneix del tot, ha esdevingut una potent tècnica experimental i s'ha utilitzat sovint en teràpia gènica (Bumcrot *et al.* 2006). Les molècules que juguen un paper principal en aquest procés són els **siRNA** (*small interfering RNA strands*), els quals tenen seqüències complementàries a la cadena de RNA que volen silenciar. Els siRNA “guien” les proteïnes de la via de la RNAi cap a la molècula de mRNA diana i la tallen en porcions petites que no es poden traduir. Un altre tipus de molècules de silenciament produïdes pel mateix genoma serien els miRNAs (microRNAs), que actuarien de la mateixa forma.

4.1. Mecanisme molecular

La via de la RNAi s'inicia amb l'enzim **Dicer**, una RNAsa III que talla les molècules llargues de doble cadena de RNA (dsRNA) en fragments curts de 20-25 pb, juntament amb la seva proteïna dsRBD complementària (Saito *et al.* 2005). Una de les dues cadenes de cada fragment, coneguda com a cadena guia o *guide strain*, s'incorpora en el complex **RISC** (*RNA-induced silencing complex*) i s'aparella amb seqüències complementàries, mentre que l'altra cadena, *anti-guide strain* o *passenger strain* es degrada durant l'activació del complex RISC (Gregory *et al.* 2005). El resultat més estudiat d'aquest procés de reconeixement és el silenciament gènic. Aquest es dona quan la cadena guia s'aparella específicament amb una molècula de mRNA i indueix la seva degradació per part d'**argonauta**, el component catalític del complex RISC.

Quan els dsRNAs són exògens (provinents d'una infecció vírica o per manipulacions en el laboratori), el RNA s'importa directament al citoplasma i allí és on pateix la digestió per part de Dicer. Però els dsRNAs també poden ser endògens, expressant-se a partir de gens codificants de RNA, i es coneixen com a **miRNAs**. Els dos tipus de molècules convergeixen al complex RISC en el citoplasma, el qual realitza el silenciament gènic.

4.2. El processament dels miRNAs

Els microRNAs (miRNAs) són RNAs de ~21 nucleòtids de llargada que controlen l'expressió gènica a nivell post-transcripcional en metazous i en plantes. S'ha predit que al voltant d'uns 1000 miRNAs funcionen en humans, possiblement regulant ~30% dels gens. L'expressió de molts d'ells depèn del teixit o de l'estadi de desenvolupament, i el seu patró d'expressió es veu alterat en moltes patologies (Voorhoeve *et al.* 2007). En els últims temps, els miRNAs s'han erigit com a importants reguladors de la traducció i la degradació dels mRNAs, i fins i tot recentment s'han descobert alguns miRNAs que funcionen com a supressors de metàstasis en diferents tipus de càncers humans (Esquela-Kerscher *et al.* 2006; Tavazoie *et al.* 2008).

En animals la producció de miRNAs madurs es dona en dos passos, cada un d'ells catalitzat per una endonucleasa ribonucleasa III (RNAsa III) juntament amb una proteïna d'unió a RNAs de doble cadena (figura 14). En primer lloc **Drosha**, una RNAsa III nuclear, trenca els extrems del **pri-miRNA** (molècula llarga de RNA transcrita a partir de gens endògens) per alliberar un llaç d'uns 70 pb, el precursor del miRNA (**pre-miRNA**) (Lee *et al.* 2003; Lee *et al.* 2002). El correcte processament dels pri-miRNA per part de Drosha requereix una proteïna dsRBD coneguda com Pasha en *Drosophila*, Pash-1 en *C. elegans* i DGCR8 en mamífers. Llavors, el pre-miRNA resultant s'exporta del nucli al citoplasma per la proteïna **Exportina 5/RanGTP**, on sofreix les mateixes modificacions que els siRNAs.

Els siRNAs que s'originen a partir de precursors llargs dsRNAs es diferencien dels miRNAs en que aquests, especialment en animals, s'aparellen de forma incompleta a la seva diana i inhibeixen la traducció de diferents mRNAs amb seqüències similars. En canvi, els siRNAs s'aparellen perfectament i indueixen la digestió de la diana. En *Drosophila* i *C. elegans*, els dos tipus es processen per proteïnes argonauta i enzims Dicer diferents (Okamura *et al.* 2004).

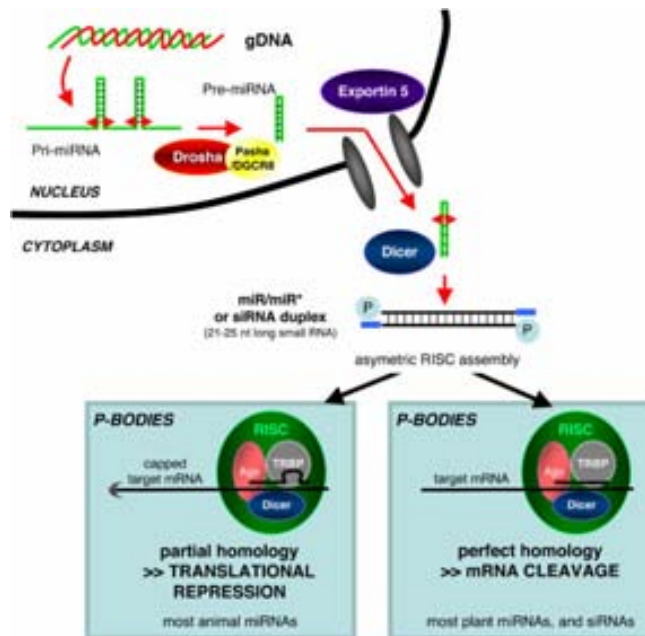


Fig. 14: Model de la biogènesi dels miRNAs (Saumet *et al.* 2006)

4.3. Aplicacions tecnològiques

La via de la RNAi s'ha explotat sovint en biologia experimental per a estudiar la funció de gens en cultius cel·lulars i *in vivo* en organismes model. Es sintetitza una doble cadena de RNA complementària al gen d'interès i s'introdueix en la cèl·lula o organisme, on és reconegut com a material genètic exògen i activa la via de la RNAi. Utilitzant aquest mecanisme, es pot provocar una disminució dràstica de l'expressió del gen diana, i l'estudi d'aquest efecte pot evidenciar el rol fisiològic del producte gènic que hem interferit. Aquesta tècnica s'anomena sovint *knockdown* o silenciament, ja que no aboleix totalment l'expressió del gen en qüestió, a diferència del *knockout* on l'expressió del gen és totalment eliminada.

També s'ha utilitzat la RNAi en la teràpia gènica. Encara que és difícil introduir dsRNAs en cèl·lules de mamífer degut a la resposta d'interferó, l'ús de siRNAs ha donat més bons resultats. Entre les primeres aplicacions clíniques es troba el tractament de varis desordres neurològics (Raoul *et al.* 2006; Sah 2006), i també és una teràpia efectiva per a revertir danys induïts en fetge de ratolí (Zender *et al.* 2003). Altres usos clínics es centren en les teràpies antivirals, incloent la inhibició de l'expressió gènica viral en cèl·lules canceroses (Jiang *et al.* 2002), el silenciament de receptors del virus d'immunodeficiència adquirida (HIV), el silenciament de gens d'Hepatitis A i B (Jia *et al.* 2006; Kusov *et al.* 2006) o el silenciament de l'expressió de gens del virus *influenza* (Li *et al.* 2006a).

La RNAi també s'ha vist com una via prometedora per a tractar el càncer tot silenciant gens altament expressats en cèl·lules tumorals o gens involucrats en la divisió cel·lular (Izquierdo 2005; Putral *et al.* 2006).

5. LA PROTEÏNA RACK1

La regulació espacial i temporal de la transducció de senyals cel·lulars s'obté mitjançant la col·locació pròxima d'enzims de la mateixa o diferents vies gràcies a complexos de senyalització (Burack *et al.* 2000; Pawson *et al.* 1997). Aquesta unió sovint depèn de l'estimulació cel·lular i la porten a terme les anomenades proteïnes adaptadores de senyal, les quals contenen almenys dos dominis responsables de les interaccions proteïna-proteïna. L'acció de les proteïnes adaptadores es pot dividir en dos tipus: 1) adaptadores que ancoren l'enzim a un lloc cel·lular pròxim al seu substrat o lluny d'enzims amb funcions cel·lulars oposades i 2) adaptadores que uneixen diferents enzims d'una mateixa via de transducció de senyal. Així, enzims específics es troben pròxims als seus substrats, incrementant-ne la seva afinitat.

RACK1 és una proteïna de la família de proteïnes adaptadores del senyal anomenades RACKs (*receptors for activated C-kinase*) que participa en la senyalització cel·lular via PKC. En concret, RACK1 és el membre de la família que té especificitat per la isoforma PKC β II (Ron *et al.* 1994). Té un pes molecular de 36 kDa i conté 7 repeticions internes Trp-Asp 40 (WD40) altament conservades en moltes espècies, (incloses plantes) les quals formen una estructura d'hèlix on cada braç està format per làmines β (figura 15). A cada braç li correspon un lloc d'unió a diferents proteïnes. L'ampli ventall de dominis que permeten a diferents proteïnes unir-se a RACK1 encara està lluny de determinar, però es coneixen bé els dominis SH2 (Chang *et al.* 1998) i PH (Koehler *et al.* 2001; Rodriguez *et al.* 1999). Els dominis PH poden unir-se a fosfoinositols, i els dominis SH2 interaccionen amb residus de fosfotirosina en proteïnes diana.

La proteïna RACK1 es va identificar originàriament com una proteïna ancoradora de la **proteïna cinasa C (PKC)** activada (Ron *et al.* 1994), i s'ha vist que juga un paper central en la regulació de respostes biològiques crítiques mitjançant l'aproximació de diferents factors que actuen en una mateixa via, com seria el cas de la via de les proteïnes **MAPK** (Schechtman *et al.* 2001; Sklan *et al.* 2006). Les PKCs convencionals (α , β I, β II, i γ) són proteïnes cinases dependents de calci i diacilglicerol (DAG), i són activades per la hidròlisi del fosfatidilinositol 4,5-bifosfat, que augmenta

els nivells de calci i DAG (Mellor *et al.* 1998). Però dins la família de PKCs també existeixen PKCs independents de calci (δ , ϵ , η , θ , i μ) i independents de DAG i calci (ζ i λ). Almenys part del lloc d'unió a RACK1 es troba al domini C2 de PKC. La interacció PKC-RACK1 no només permet dirigir la proteïna PKC a la localització cel·lular adequada, també es pensa que permet mantenir PKC en la seva conformació activa (Dorn *et al.* 2002), i s'ha demostrat que els senyals cel·lulars dependents de PKC juguen un paper important en varis tipus de càncer.

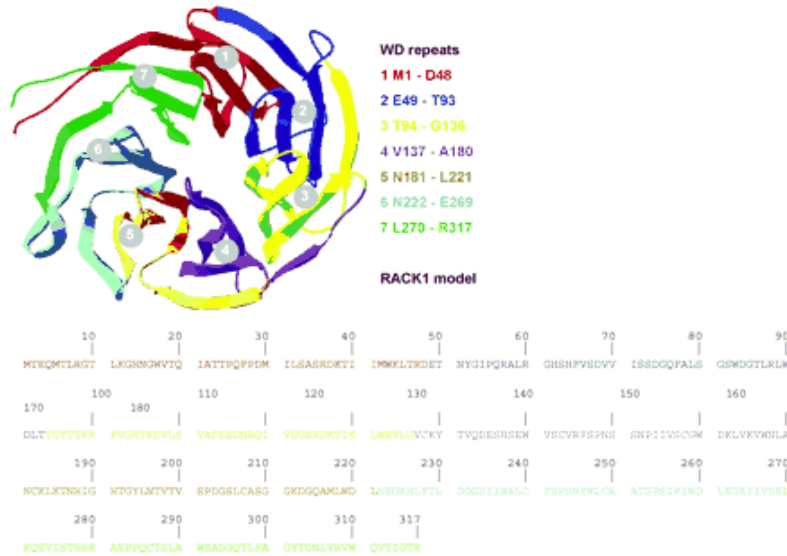


Fig. 15: Model de la proteïna RACK1 amb les repeticions WD (McCahill *et al.* 2002)

Mitjançant escombrats de llevat per doble-híbrid s’han identificat diferents proteïnes que interaccionen amb RACK1, gràcies a les 7 repeticions del motiu WD40 (implicat en interaccions proteïna-proteïna). La majoria contenen un domini C2, igual que les proteïnes PKCs. Entre aquestes es troben:

- 1) la **fosfolipasa C γ (PLC γ)** (Ron *et al.* 1995), enzim que genera DAG quan les cèl·lules són activades per factors de creixement. Per tant, RACK1 ha de col·localitzar PKC β II prop de PLC γ activat, ja que aquest és l’enzim que genera l’activador de PKC, la molècula DAG.
- 2) **p120 GAP** (“p120 GTPase activating protein”) (van der Geer *et al.* 1997), el fragment GAP de la qual també conté un domini SH2. Diversos estudis han

demostrat que GAP s'uneix a RACK1 de forma saturable, i encara que el domini C2 facilita la translocació de GAP en resposta a calci (Gawler *et al.* 1995), la deleció del fragment que conté aquest domini no inhibeix la unió a RACK1, suggerint l'existència d'altres dominis relacionats en la unió.

- 3) la proteïna **dinamina-1** (conté un domini PH), implicada en el reciclatge de vesícules de clatrina. RACK1 incrementa l'activitat GTPasa intrínseca de la dinamina-1 *in vitro* i augmenta la capacitat de PKC β II de fosforilar-la. Així doncs, RACK1 no només actua com una proteïna adaptadora que col·localitza PKC β II amb el seu substrat (dinamina-1), sinó que també és un modulador directe de l'activitat enzimàtica de la dinamina-1.
- 4) la **tirosina-cinasa Src** (domini SH), reguladora del creixement i diferenciació cel·lular juntament amb PKC β II (Schechtman *et al.* 2001; Sklan *et al.* 2006). Chang i els seus col·laboradors demostraren que el domini SH2 de c-Src s'unia directament a RACK1 (Chang *et al.* 1998).
- 5) el receptor de proteïnes **tirosina-fosfatases (PTP μ)** (Mourton *et al.* 2001). Cal destacar que la interacció de PTP μ amb RACK1 s'inhibeix si s'expressa de forma constitutiva Src, suggerint que la unió de PTP μ i Src a RACK1 és mútuament excloent.
- 6) **PDE4D5** (fosfodiesterasa específica d'AMP cíclic) (Yarwood *et al.* 1999), interacció que suggereix la idea de RACK1 involucrada en la regulació de vies activades per l'adenil ciclase. A més a més, una de les funcions de RACK1 podria ser el control de les interaccions en vies de senyalització involucrades en la coordinació d'adhesió cel·lular, moviment i divisió, i la unió PKC β II-RACK1 estaria relacionada amb la resposta immune, mitjançant la formació d'anions superòxids per part de cèl·lules fagocítiques com els neutròfils (Korchak *et al.* 2001).

- 7) La **subunitat β de la integrina**, important en l'adhesió cel·lular (Reszka *et al.* 1992). RACK1 podria ser un regulador de l'adhesió cel·lular col·localitzant PKC amb el seu substrat.

A més a més d'incrementar la concentració efectiva del substrat o de l'activador d'un enzim particular en una via de senyalització, la unió de l'enzim a l'adaptador pot incrementar, disminuir o no alterar l'activitat catalítica intrínseca d'aquest enzim. Alguns d'aquests efectes es poden veure a la següent taula:

| Unió a RACK1 | Efectes sobre l'activitat enzimàtica |
|----------------|--|
| PKC β II | Increment d'activitat (Csukai <i>et al.</i> 1997; Ron <i>et al.</i> 1994) |
| PLC γ | Disminució de l'activitat catalítica (Disatnik <i>et al.</i> 1994) |
| Dinamina-1 | Increment de l'activitat GTPasa (Rodriguez <i>et al.</i> 1999) |
| Src | Disminució de l'activitat tirosina kinasa (Chang <i>et al.</i> 1998) |
| PTP μ | No determinat |
| PDE4E5 | Disminució de la sensibilitat a l'inhibidor rolipan (Yarwood <i>et al.</i> 1999) |

Taula 1: Conseqüències de la unió de RACK1 sobre l'activitat catalítica de certs enzims.

Les adaptadores també poden proporcionar un ancoratge coordinat d'enzims amb activitat similar o oposada, per a regular de forma molt acurada successos enzimàtics. I finalment, les adaptadores poden ser la “plataforma” que mou complexos de senyalització d'un lloc a un altre, de forma regulada o constitutiva (Ron *et al.* 1999).

6. LA PROTEÏNA p73

El descobriment de p73 (juntament amb p63) com un membre de la família de la proteïna p53 ha donat lloc a nombrosos estudis sobre la seva funció, regulació, i paper en la tumorigènesi (Kaghad *et al.* 1997). Anomenada sovint “el guardià del genoma”, p53 es distingeix per ser el gen més freqüentment mutat en càncers humans. La importància d'aquest gen deriva de la seva habilitat per induir tant la parada del cicle cel·lular com apoptosi, en resposta a un ampli espectre d'agents genotòxics. Degut a la seva gran homologia amb p53, la primera hipòtesi sobre la funció de p73 la va incloure dins el grup de proteïnes supressores de tumors, però presenta algunes característiques que l'allunyen d'aquest col·lectiu, ja que quasi no presenta mutacions en casos de càncer humà, al contrari de p53 (aquesta sofreix una mutació en un 50% de càncers humans, i està inactiva en almenys un 20% d'ells).

Igual que la proteïna p53, **p73** conté un domini transactivador (TAD), un domini d'unió a DNA (DBD) i un domini d'oligomerització (OD) (figura 16). La gran homologia entre els dominis DBD dels diferents membres de la família de p53 suggereix que p73 podria unir-se a les mateixes seqüències de ADN que p53. Però les proteïnes p63 i p73 són més complexes que la p53, ja que tenen diferents variants C-terminal a conseqüència del *splicing* alternatiu. En concret la variant p73 α té el domini SAM (“sterile alpha motif”), el qual s'ha vist que està relacionat en interaccions proteïna-proteïna. També fa que la p73 sigui menys sensible a la degradació per **MDM2**, proteïna responsable de la degradació de p53.

A més a més, les variants presenten diferents funcions (Marabese *et al.* 2007). Per exemple, la forma p73 α s'uneix a RACK1 i inhibeix la transcripció de Bax, MDM2 i p21, i a més a més p19 interacciona amb p73 β i inhibeix la repressió de la transcripció de p73 β mitjançada per MDM2 (Jeong *et al.* 2006). També s'ha observat que p73 α és un fort inhibidor de la telomerasa, mentre que p73 β ajuda a mantenir l'activitat telomerasa a través de l'activació de HDM2 i potser altres factors (Toh *et al.* 2005).

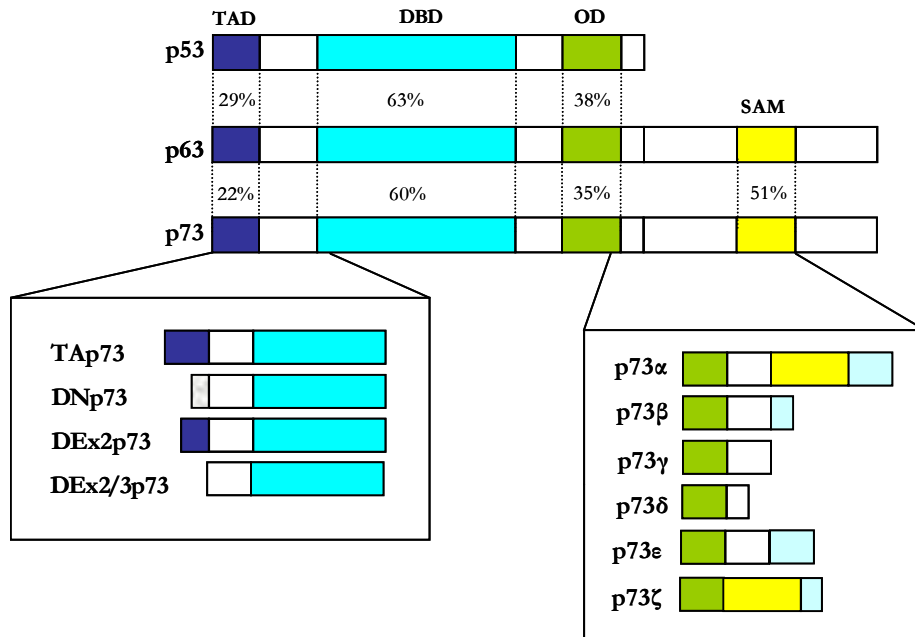


Fig. 16: Els membres de la família de p53. Existeix certa homologia en certs dominis.

La funció de p73 pot ser regulada per 1) localització subcel·lular, 2) modificacions post-traduccionals, i 3) proteïnes reguladores específiques, entre altres mecanismes. Degut a la seva funció com a factor de transcripció, la seva localització nuclear és imprescindible. Així doncs p73, igual que p53, té un senyal nucleofilic (NLS) i un senyal d'exportació nuclear (NES), i els mutants per a NLS o NES són més estables que les formes salvatges, suggerint que la correcta localització de p73 és crucial per a regular la seva estabilitat, ja que es podria donar la ubiquitinació de la proteïna en el nucli, permetent la seva posterior degradació en el citoplasma (Inoue *et al.* 2002)

Tant la p73 com la proteïna p63 estan sota el control de dos promotors, produint dos tipus de transcrit (figura 17):

- **P1** → isoforma TA (té un domini transactivador TA capaç de transactivar gens apoptòtics)
- **P2** → isoforma ΔN (funciona com a dominant negatiu de la isoforma TA i de p53, per tant és inhibidora de l'apoptosi).

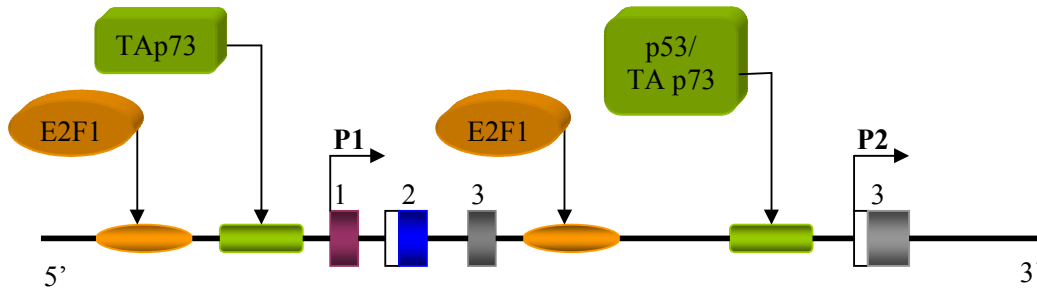


Fig. 17: Control diferencial dels promotors de TAp73 i ΔNp73.

Algunes isoformes TA poden transactivar gens diana de p53, i sobreexpressant-les s'indueix mort cel·lular, però no sempre amb la mateixa intensitat que es donaria en el cas de p53 (TA p63/p73 són menys actives que p53 perquè tenen elements reguladors al domini SAM). No obstant, s'ha pogut comprovar que un increment de p73 o p63 provoca defectes de desenvolupament a nivell neuronal (Yang *et al.* 2000) i epidèrmic (Mills *et al.* 1999; Yang *et al.* 1999), respectivament. A més a més, la sobreexpressió de p73 és suficient per a la diferenciació neuronal *in vitro* (De Laurenzi *et al.* 2000). També s'ha vist que les formes ΔN competeixen amb les formes TA pels llocs d'unió a DNA, i es dona un circuit de regulació negativa.

L'estudi del promotor de p73 ha revelat possibles llocs d'unió per a diferents isoformes de **E2F** i **AP2** (figura 17), així com per a **c-Myb**. **E2F** és un important regulador de p73, ja que experiments de co-transfecció han demostrat que E2F activa fortament el promotor de p73 (Irwin *et al.* 2000). A més a més, s'ha observat la interacció de p19 H-Ras amb l'extrem C-terminal de p73α mitjançant un escombrat d'una llibreria de llevat (Guil *et al.* 2003a) i recentment, amb p73β (Jeong *et al.* 2006).

7. TUBEROUS SCLEROSIS COMPLEX (TSC)

El complex d'esclerosi tuberosa (TSC) és una malaltia amb un patró d'herència autosòmic dominant i una penetrància del 100%, associada a la formació de tumors normalment benignes causats per mutacions en els gens supressors de tumors **TSC1** (que codifica per la proteïna **hamartina**) o **TSC2** (que codifica per la proteïna **tuberina**) (Bhaskar *et al.* 2007). El gen TSC1 es localitza en el cromosoma 9 q34 i es va descobrir l'any 1997 (van Slechtenhorst *et al.* 1997), i el gen TSC2, localitzat al cromosoma 16 p13.3, fou descobert l'any 1993 (European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium, "Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16" 1993). Els dos supressors de tumors actuen segons la hipòtesi de Knudson, la qual consisteix en la inactivació d'una de les còpies d'un únic gen candidat com a causa d'una alteració genètica (ex. mutació puntual), seguit per la pèrdua de la segona còpia degut a una deleció (Knudson 1971).

Les complicacions més serioses que ocasiona a nivell clínic són retard mental, epilèpsia i autisme, causat pel creixement de tumors en el cervell (Gomez 1991). Altres símptomes inclouen disfunció renal, anormalitats dermatològiques i problemes cardíacs. Delecions heterozigòtiques de TSC1 o TSC2 produeixen fenotips similars augmentant el risc de tumors, especialment en el fetge, on les delecions homozigòtiques de cada gen són letals per als embrions (Au *et al.* 1998; Kobayashi *et al.* 2001). Dades genètiques de *Drosophila* mostren que TSC1 i TSC2 regulen negativament el creixement cel·lular (Tapon *et al.* 2001).

Rheb, una GTPasa de la superfamília Ras, té un paper central en la via TSC, ja que TSC2 regula negativament Rheb mitjançant la seva activitat GAP (Inoki *et al.* 2003a). A més a més, la via TSC és regulada per **Akt** i **ERK** fosforilats (Bhaskar *et al.* 2007), degut a la fosforilació de TSC2 per part d'Akt i conseqüentment promovent l'acumulació de Rheb-GTP (actiu) i la inducció de **mTOR** (*mammalian target of rapamycin*) per part d'aquest (Manning *et al.* 2003). mTOR promou la fosforilació de reguladors clau de la maquinària cel·lular de traducció proteica, incloent **p70 S6K** (*p70 S6 kinasa*) i **4EBP1** (*eukaryote initiation factor E4 binding protein 1*) (figura 18).

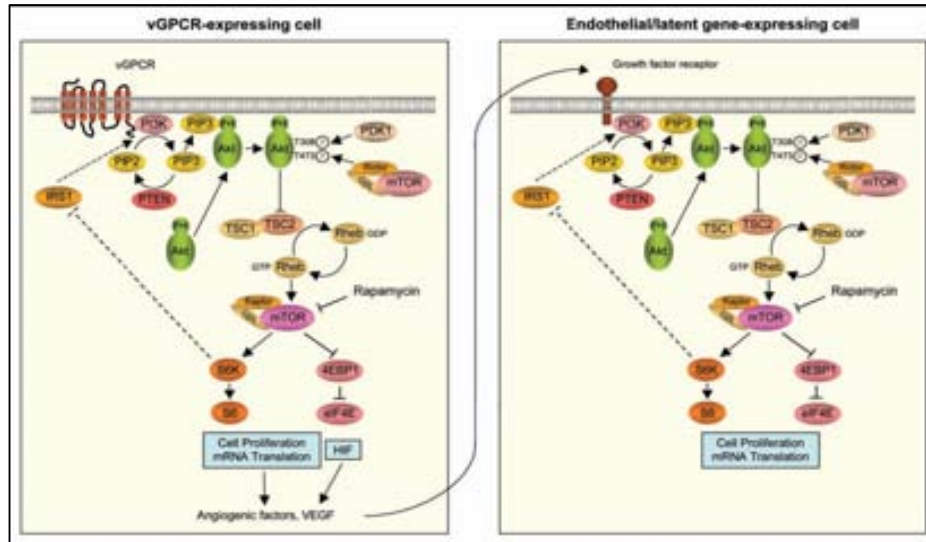


Fig. 18: Esquema de la via Akt/TSC/mTOR (Montaner 2007)

Recentment s'ha demostrat que TCTP, una proteïna altament conservada i que està sobrerregulada en varis tumors, és un factor de creixement i proliferació essencial, i té una activitat GEF sobre Rheb (Hsu *et al.* 2007). La ràpida adaptació dels nivells proteics de TCTP a les alteracions de les condicions cel·lulars implica que tant la seva síntesi com degradació estan altament regulades (Thiele *et al.* 2000), ja que es troba implicada en processos cel·lulars tan importants com el creixement cel·lular, fenotips transformants, progressió del cicle cel·lular, i protecció de la cèl·lula enfront varis tipus d'estrès i apoptosi (figura 19).

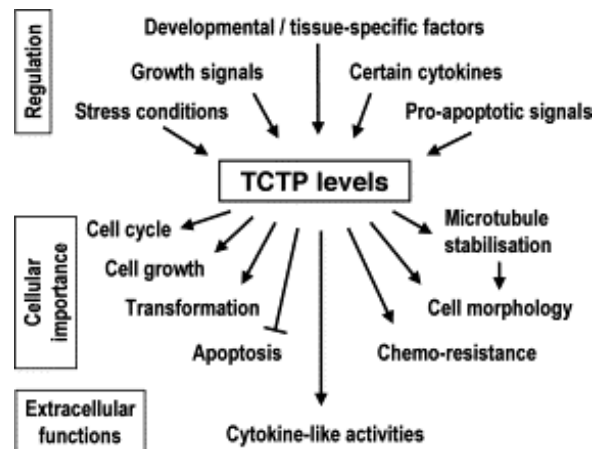


Fig. 19: Regulació i vies implicades amb TCTP (Bommer *et al.* 2004)

De fet són varis els estudis que demostren la seva importància a nivell de creixement i divisió cel·lular: 1) La sobreexpressió de TCTP en cèl·lules de mamífer provoca un retard en la progressió del cycle cel·lular i un menor creixement (Gachet *et al.* 1999), 2) el *knockdown* de TCTP en *Caenorhabditis elegans* dona un fenotip amb menor creixement (Kamath *et al.* 2003), 3) La sobreexpressió de TCTP mutada en els seus llocs de fosforilació per la cinasa mitòtica **Plk** provoca la disrupció de la mitosi (Yarm 2002), 4) En llevat, el silenciament de TCTP també provoca alteracions en el cycle cel·lular, 5) La baixada en els nivells de TCTP està associada a la reversió de cèl·lules transformants (Tuynder *et al.* 2002).

Encara que els nivells d'expressió de TCTP en tumors tendeixen a ser alts comparats amb teixits normals, TCTP no és una proteïna específica tumoral. Però s'ha demostrat que durant la reversió de cèl·lules amb fenotip maligne, els nivells de TCTP es redueixen considerablement i la inhibició de l'expressió de TCTP provoca la supressió del fenotip maligne (Tuynder *et al.* 2002), aspecte que relaciona TCTP amb els processos cancerígens. També és interessant el fet que els nivells de TCTP es redueixen amb l'activació de **p53** (Tuynder *et al.* 2002) i que s'aconsegueix l'estabilització de TCTP a través de la proteïna anti-apoptòtica **MCL1** (Zhang *et al.* 2002).

8. TELOMERASA i CICLE CEL·LULAR

8.1. Els Telòmers

Els telòmers són complexes formats per seqüències de repeticions de guanina i proteïnes associades, que engloben i protegeixen els extrems dels cromosomes eucariotes contra la fusió cromosòmica, la recombinació, i la degradació dels DNAs terminals (Blackburn 2001). Les molècules lineals de DNA com els cromosomes eucariotes necessiten mecanismes especials a part de les DNA polimerases per a completar la replicació dels seus extrems. Sense aquests mecanismes, el desgast del

DNA cromosòmic terminal dóna lloc a la pèrdua d'informació genètica i porta a la senescència cel·lular.

Els telòmers de la majoria d'eucariotes estan formats per dos tipus de seqüències de DNA. Una d'elles, denominada seqüència telomèrica, repetició telomèrica o repetició terminal, constitueix l'extrem de la cadena d'ADN del cromosoma, mitjançant la repetició en tàndem d'un oligonucleòtid curt. Generalment aquesta seqüència telomèrica és més rica en G en una de les cadenes, la que forma l'extrem 3', que sobresurt uns 12-16 nucleòtids sobre la cadena que dóna l'extrem 5' (*overhang*)(van Steensel *et al.* 1998). Aquest extrem sobresortint és reconegut per proteïnes lligants del telòmer **TBP** (*telomere binding proteins*) que actuen com a caputxa protectora d'aquest DNA terminal.

En humans, el DNA del telòmer està constituït per repeticions hexamèriques del tipus TTAGGG, les quals estan repetides entre 150 i 2000 vegades. Durant el procés d'envelliment es dóna un escurçament de la longitud dels telòmers, i les disminucions solen ser de l'ordre de 10 a 200 pb per any segons el tipus de teixit. Les estructures telomèriques també es caracteritzen perquè acaben en una cadena senzilla d'uns 150-200 nucleòtids que envolta les seqüències riques en G, formant una espècie de caputxó. S'ha de destacar que encara que la seqüència telomèrica es troba conservada en molts organismes, la mida del 3' terminal o *overhang* és específic de cada espècie, així com moltes de les proteïnes encarregades de l'elongació dels telòmers. Això indica que la longitud del telòmer ha estat una de les característiques més importants per al manteniment de la integritat cromosòmica i a més a més evidencia les diferents adaptacions de les diferents espècies als dictàmens de la seva biologia cel·lular. Un altre aspecte que resulta interessant és la observació de que la majoria de proteïnes d'unió als telòmers estan implicades en la reparació de trencaments dobles de DNA (Lundblad 2000).

La primera proteïna telomèrica en humans que va ser descoberta fou **TRF1** (Zhong *et al.* 1992), la qual actua com a inhibidor indirecte de la telomerasa per a controlar la longitud del telòmer, unint-se a ell en forma d'homodímer. **TRF2** és una altra proteïna que comparteix homologia amb **TRF1** (Broccoli *et al.* 1997), la inhibició de la qual dóna lloc a la pèrdua de l'*overhang* ric en G i a la fusió covalent dels extrems

cromosòmics tot mantenint la seqüència telomèrica (van Steensel *et al.* 1998). Altres proteïnes específiques de seqüència poden unir-se i protegir la cadena rica en G. Aquestes inclouen la proteïna α/β en ciliats, la Pot1 en humans i la Cdc13p en *S. cerevisiae*, així com Rap1 i Tin2 (figura 20). Les proteïnes principals de la via NHEJ (*Non-Homologue Extreme Junctions*) de reparació de dobles trencaments **Ku80/70** i **DNA-PKcs** també participen en la biologia telomèrica. **Ku80** interacciona amb TRF1, TRF2 i la telomerasa, regulant negativament aquesta última. A més a més participa en les fusions terminals entre telòmers curts mitjançant NHEJ, així com en l'apoptosi massiva de cèl·lules germinals associada a l'escurçament telomèric.

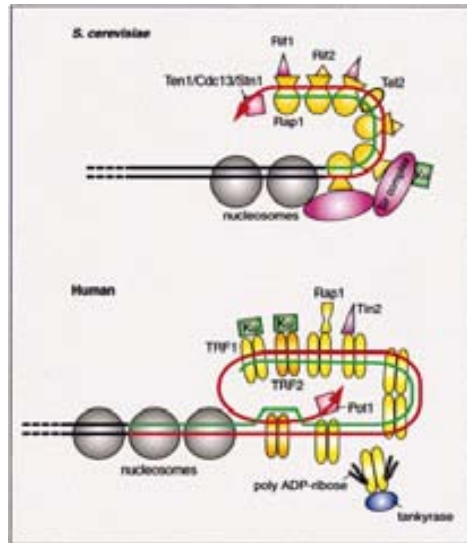


Fig. 20: Estructura dels telòmers en llevat i en humans. La línia vermella representa les seqüències riques en G sintetitzades per la telomerasa (aquesta interacciona amb l'extrem 3' *overhang*). La línia verda representa la seqüència complementària rica en C de les repeticions telomèriques. Les línies negres, el DNA subteloquímic. L'extrem 3' terminal en humans pot tenir varies formes: unit a la proteïna Pot1 o formant un llaç T (Blackburn 2001).

La telomerasa és un enzim RNP (*ribonucleoprotein*) codificat pel gen *Tert* que compensa la inhabilitat de la DNA polimerasa per replicar completament els extrems dels cromosomes lineals. Per fer-ho, utilitza com a motlle una seqüència de RNA complementària a les repeticions telomèriques TTAGGG, ja que té activitat transcriptasa inversa. L'enzim telomerasa consta d'una RNA telomerasa (**TER**), una transcriptasa inversa (**TERT**) i altres components associats, els quals varien entre els diferents eucariotes. La telomerasa catalitza dues reaccions, les quals són fortament dependents TERT i TER: polimeritza el DNA telomèric, i també té una activitat endonucleasa que digereix el DNA aparellat a l'extrem 5' del motlle de RNA telomèric (Blackburn 2000).

Sorprenentment, l'expressió de la telomerasa està restringida en els humans a les cèl·lules germinals (Kim *et al.* 1994). Així doncs, l'escurçament continu dels telòmers que es dona durant la divisió de les cèl·lules somàtiques podria ser un “rellotge biològic” que desencadena programes genètics relacionats amb l'edat cel·lular i la senescència (Blasco 2005; Collins *et al.* 2002). A més a més, la falta d'expressió de telomerasa podria ser una barrera natural contra l'adquisició de capacitat proliferant continua de les cèl·lules tumorals. L'expressió diferencial de la telomerasa entre els teixits somàtics i les cèl·lules cancerígenes ha fet que la telomerasa sigui una diana potencial per al tractament del càncer, ja sigui 1) inhibint directa o indirectament l'activitat enzimàtica de la telomerasa, 2) immunoteràpia utilitzant hTERT com a antigen associat a tumors o 3) teràpia gènica amb gens suïcides sota el control del promotor de la telomerasa (Morin 1996; Zimmermann *et al.* 2007).

8.2. Cicle cel·lular

El cicle cel·lular és el procés universal mitjançant el qual les cèl·lules es reproduïxen, pas imprescindible pel creixement i el desenvolupament de tots els organismes vius (Nurse 2000). Els successos més importants del cicle cel·lular són aquells relacionats amb la còpia i la divisió del material hereditari, i això comprèn la replicació del DNA cromosòmic i la separació dels cromosomes replicats durant la mitosi. Les bases moleculars del control del cicle cel·lular estan altament conservades des dels eucariotes unicel·lulars simples fins als metazous complexos. La precisió amb la qual s'executen els processos del cicle cel·lular assegura la supervivència dels organismes vius, mentre que la pèrdua d'aquesta precisió incrementa la inestabilitat genòmica, factor important en la formació del càncer.

El cicle cel·lular eucariota es pot dividir entre la **fase S** o de **síntesi**, durant la qual es replica el DNA, i la **fase M** o **mitosi**, en la que es separen els cromosomes replicats. Aquestes dues fases estan separades per dos intervals o *gaps* anomenats **G1** (entre M/S) i **G2** (entre S/M) (figura 21). En procariotes la replicació cromosòmica i la divisió no necessiten estar separades temporalment, es poden solapar durant el cicle cel·lular per a un creixement més ràpid. A més a més, sembla ser que la separació entre els dos processos i el seu control es produí durant l'aparició de les cèl·lules eucariotes.

Introducció

El cicle cel·lular mitòtic és modificat cap a un cicle meiòtic durant la formació dels gàmetes sexuals, donant lloc a una reducció en el nombre de cromosomes que és essencial per a la reproducció sexual, i per incrementar la variació genètica que dona lloc a l'evolució.

El control del cicle cel·lular regula el començament de la fase S i la fase M, i assegura que aquests es produeixin en el moment adequat, coordinats amb el creixement cel·lular. També corregeix els errors que es puguin ocasionar durant la divisió cel·lular. Es necessiten enzims com les topoisomereses, helicases, lligases, primases i polimerases per desunir les dues cadenes de DNA i sintetitzar-ne noves còpies. Aquests enzims treballen junts en complexes de replicació, els quals generen forquilles de replicació bidireccionals. L'inici de la replicació es troba en zones específiques anomenades **origen de replicació**, definides per seqüències de DNA concretes. Els orígens de replicació dels eucariotes superiors reflecteixen, però, estructures més complexes com són els **ORCs** o *Chromatin associated origin recognition complexes*, estructures nuclears d'ordre superior. A més a més, en diferents punts del cicle cel·lular la cèl·lula revisa si una fase en concret s'ha executat correctament abans de procedir a la següent, concepte anomenat *checkpoint* (Hartwell *et al.* 1989). Aquest mecanisme permet el bloqueig de la mitosi per a reparar un DNA danyat, per exemple, i ajuda a assegurar l'èxit de la transmissió genètica.

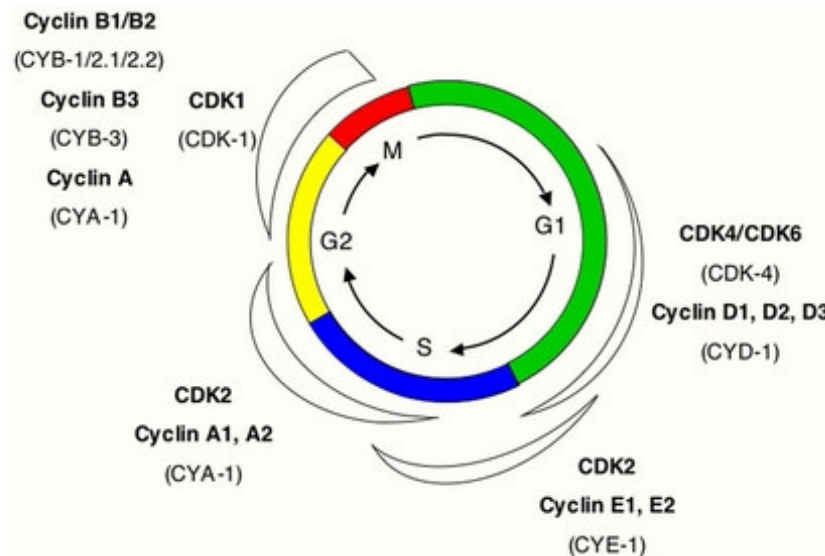


Fig. 21: Representació del cicle cel·lular (van den Heuvel 2005)

Les **ciclins** són proteïnes implicades en la regulació del cicle cel·lular tot variant la seva expressió segons la fase del cicle. Formen part de les cinases ciclina-dependents (**CDKs** o *cyclin-dependent kinases*) juntament amb una subunitat catalítica proteïnica, i s'ha vist que són reguladors universals des del llevat als organismes superiors. Les CDKs actuen com a “motors del cicle cel·lular” o *cell cycle engines*, conduint les cèl·lules a través de les diferents fases del cicle. Diferents CDKs controlen el començament de la fase S i la fase M (van den Heuvel *et al.* 1993) (figura 21) i l'increment de l'activitat d'aquestes poden avançar els esdeveniments. Les CDKs es poden regular per l'accessibilitat a les subunitats ciclina, per canvis en la fosforilació del lloc catalític controlats per Cdc25 i Wee1, i per associació amb inhibidors de CKI (Nurse 1990).

L'enzim telomerasa és una ribonucleoproteïna íntimament lligada a la progressió del cicle cel·lular. També s'ha observat que la diferenciació de les cèl·lules tumorals està associada a una regulació negativa de l'activitat telomerasa. Com que la telomerasa es necessita pel manteniment dels telòmers, ha d'estar activa durant la fase de replicació del DNA (fase S) però no necessàriament durant les fases no replicatives del cicle cel·lular com poden ser la fase G2/M. A mesura que les cèl·lules progressen a través de la fase G1/S, l'activitat de la telomerasa incrementa gradualment (Brunori *et al.* 2005; Zhu *et al.* 1996) (figura 22).

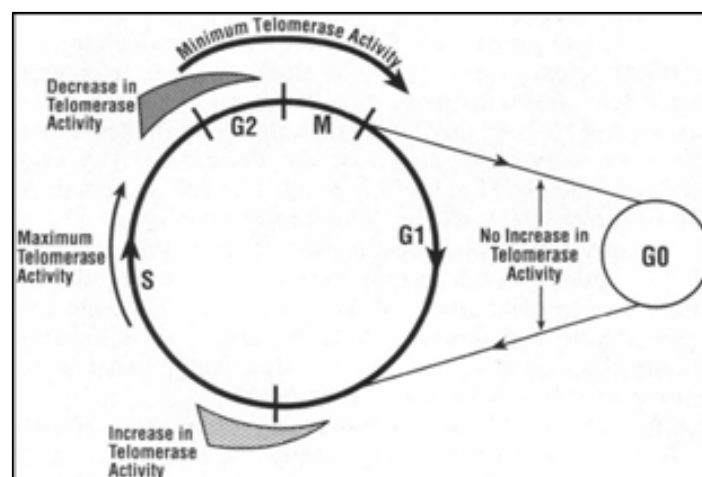


Fig. 22: Regulació de l'activitat telomerasa durant el cicle cel·lular (Zhu *et al.* 1996).

Un mal funcionament de la maquinària del cicle cel·lular pot comportar un creixement cel·lular incontrolat, principal característica d'un procés neoplàsic. En aquest sentit, les desregulacions en la maquinària del cicle cel·lular objectivades en les cèl·lules malignes pròpies de diversos tumors humans, ha comportat l'estudi i assaig de noves teràpies antitumorals basades en el coneixement i la funció dels diversos components del cicle cel·lular . Aquest és, sense cap dubte, un camp emergent en la recerca biomèdica la qual té com a una de les seves prioritats fonamentals la lluita contra el càncer.

OBJECTIUS

Al moment d'iniciar aquest treball, les dades existents sobre la proteïna p19 H-Ras es limitaven a estudis molt centrats en la regulació del *splicing* alternatiu del gen c-H-ras, en concret de la via alternativa d'inclusió de l'exó IDX (Barbier *et al.* 2007; Cohen *et al.* 1989; Guil *et al.* 2003b). Les investigacions realitzades en el nostre laboratori descriuen els factors proteics implicats en aquest procés, i es desestimava la hipòtesi de la possible inestabilitat del missatger codificant per la proteïna p19 (el qual inclouria l'exó IDX) tot quantificant l'abundància del seu missatger i demostrant l'existència del seu producte proteic en diferents teixits. El nostre grup d'investigació també demostrà diverses possibles interaccions de p19 H-Ras amb diferents proteïnes mitjançant un escombrat d'una llibreria de llevat, entre les quals destacava la de RACK1, ja que es comprovà mitjançant experiments d'immunocol·localització i de coimmunoprecipitació (Guil *et al.* 2003a). Així doncs, el projecte inicial d'aquesta tesi era continuar l'estudi funcional i estructural de la proteïna p19 H-Ras, tot partint de les dades existents, per conèixer millor el seu paper a nivell cel·lular i les seves vies de regulació.

Objectius específics:

- Analitzar la localització i distribució cel·lular de p19 H-Ras en diferents tipus cel·lulars.
- Estudiar la naturalesa de les interaccions p19/RACK1 i p19/p73, i determinar les possibles vies enzimàtiques regulades per p19 H-Ras a través d'aquestes interaccions.
- Realitzar un anàlisi comparatiu del perfil global d'expressió gènica, mitjançant microarrays, de cèl·lules HeLa on s'ha sobreexpressat la proteïna p19.
- Analitzar l'expressió diferencial de miRNAs en cèl·lules HeLa estimulades per la sobreexpressió de p19 H-Ras.
- Estudiar l'efecte de p19 H-Ras en el propi procés de *splicing* alternatiu del gen c-H-ras.

RESULTATS

1. p19 H-Ras incrementa l'activitat PKC i activa ERK1

En primer lloc, vam confirmar la col·localització de p19 i RACK1 mitjançant experiments de FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) amb la col·laboració de la Dra. Mònica Pons del servei de microscòpia confocal del Centre d'Investigació i Desenvolupament del CSIC, per tenir una evidència més de la interacció *in vivo* entre RACK1 i p19 H-Ras. Les cèl·lules HeLa foren cotransfectades amb els vectors pECFP-RACK1 i pEYFP-p19 (la molècula CFP funciona com a donadora, i la molècula YFP com a acceptora), utilitzant com a control negatiu cèl·lules cotransfectades amb pECFP-RACK1 i pEYFP per calcular el FRET basal, i com a controls de creuaments de senyal vam transfectar cèl·lules amb els plasmidis pECFP-RACK1 i pEYFP-p19 per separat. Aquests valors els restem a la imatge FRET crua per obtenir la imatge FRET corregida. En aquests estudis, el làser d'excitació del donador (CFP) fou de 458 nm i la finestra que capta la senyal és l'interval 468-510 nm, i en el cas de l'acceptor (YFP) es va utilitzar el làser d'excitació 514 nm i la finestra és 527-600 nm. El programa utilitzat per a realitzar els càlculs és el Leica Confocal Software (LCS). Val a dir que abans d'obtenir dades fiables vam haver d'assajar diferents condicions experimentals per tenir una transfecció que ens permetés observar les cèl·lules en un estat òptim per obtenir FRET. Els nostres assaigs ens van portar a concloure que transfectant 600 fmols de plasmidi, incubant amb lipofectamina 5 h i observant les preparacions al cap de 24 h obteníem una transfecció d'un 40%, suficient per a realitzar l'experiment de FRET. Tal i com es pot veure a la figura 23, vam obtenir uns valors de FRET d'un 15% a la regió perinuclear, fet que coincideix amb les nostres observacions anteriors que ens mostraven una acumulació de p19 H-Ras en aquesta zona mitjançant experiments d'immunolocalització amb l'anticòs contra p19 H-Ras (SP57) (figura 24).

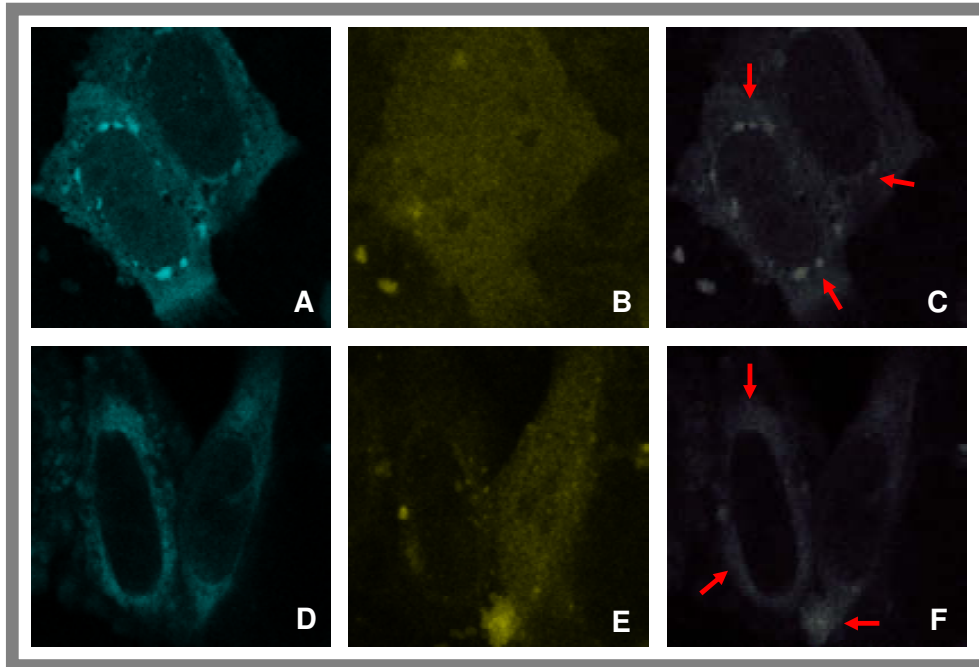


Fig. 23: Experiments de FRET (*fluorescence resonance energy transfer*). Cèl·lules HeLa transfectades transitòriament amb els vectors pECFP-RACK1 i pEYFP-p19 simultàniament, per comprovar si es dona FRET entre les dues molècules. En els panells A i D, imatge de microscòpia confocal de fluorescència on s'observa la molècula CFP-RACK1, i en el panell B i E s'observa la molècula YFP-p19. En els panells C i F, imatges on s'observa els punts cel·lulars on hem observat més FRET teòric. Les fletxes vermelles indiquen llocs on els valors són més alts. Els càlculs de FRET s'han realitzat segons la descripció del següent article (Gimferrer *et al.* 2003)

Per altra banda, també vàrem estudiar diferents tipus cel·lulars per immunodetecció indirecta amb l'anticòs SP1. Així, vam poder detectar diferències entre els diferents tipus cel·lulars que vam analitzar, sobretot destacant l'alta presència de p19 prop del complex de Golgi/Reticle endoplasmàtic en cèl·lules Raji, H9 i Molt-4 (figura 24). Curiosament, en les cèl·lules Molt-4 podem observar unes estructures en forma d'anella, però ens caldria estudiar més a fons l'origen d'aquests marcatges tan concrets, potser utilitzant diferents anticossos específics de cada orgànul cel·lular.

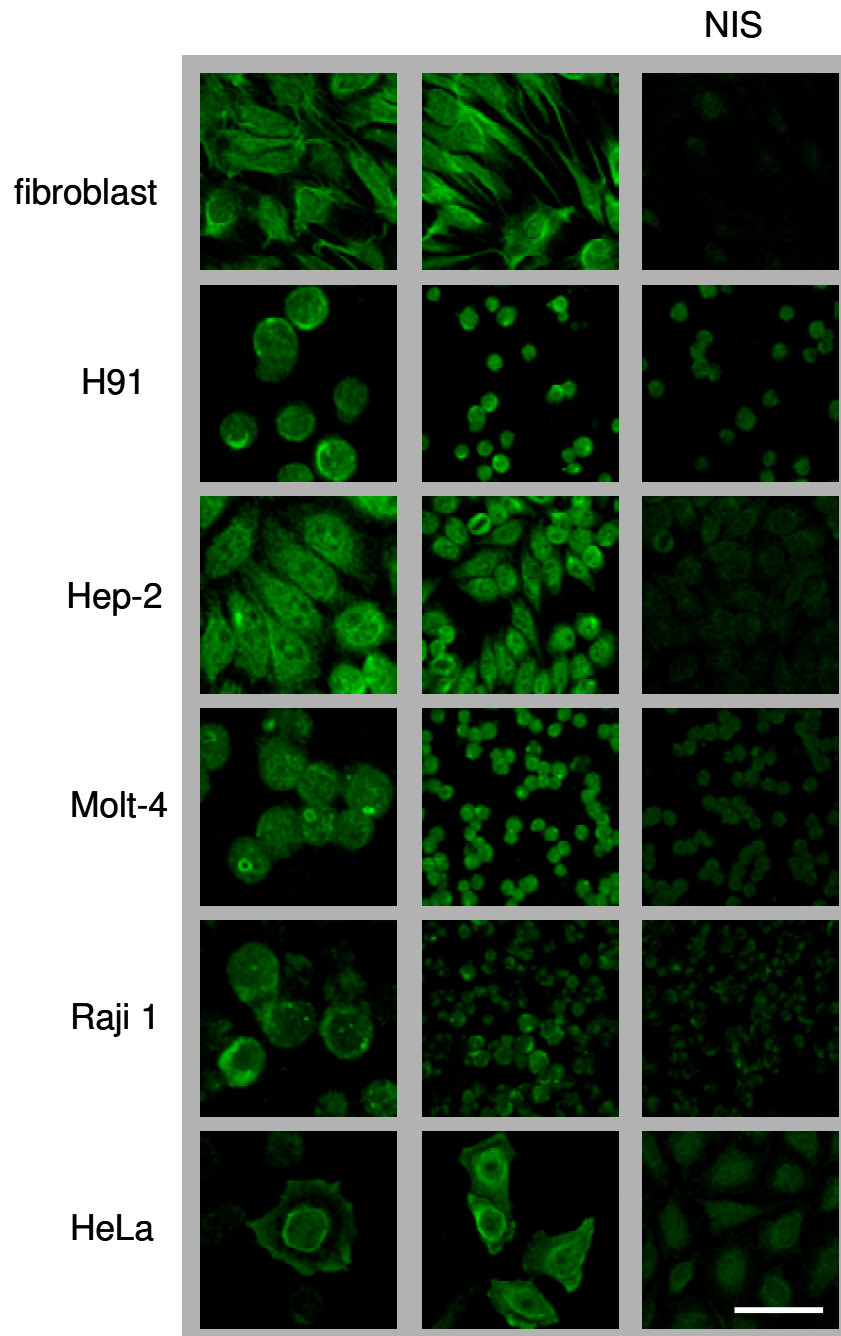


Fig. 24: Localització subcel·lular de la proteïna p19 H-Ras endògena en diferents tipus cel·lulars utilitzant immunofluorescència indirecta (IF) amb l'anticòs SP1 (1/200). Els panells NIS són els controls negatius amb el sèrum pre-immune. La detecció per immunofluorescència es realitzà amb un anticòs secundari anti-conill unit marcat amb fluoresceïna (*fluorescein-labeled anti-rabbit, FITC*) a una dilució 1/3000. Barra = 20 µm.

Els gens *ras* adquireixen propietats transformants mitjançant mutacions puntuals en la seva seqüència codificant (Barbacid 1987; Malumbres *et al.* 1998; Reuther *et al.* 2000). La major part de mutacions es poden dividir en dos grups segons la seva acció resultant: disminuir l'activitat GTPasa o facilitar l'intercanvi GDP/GTP. La disminució de l'activitat GTPasa està associada a les mutacions en les posicions **12, 13, 59, 61 i 63**. Aquestes mutacions redueixen l'activitat GTPasa intrínseca de la proteïna i la fan resistent als factors GAP, per tant el resultat són proteïnes Ras activades constitutivament. En el cas del codó 12, la substitució de **Gly¹²** per un altre aminoàcid (exceptuant la prolina) produeix un trencament de l'estructura hèlix α del domini N-terminal de les proteïnes Ras, creant un domini rígid que no pot interaccionar eficientment amb la regió fosfat de la molècula GTP. L'altre grup seria el que provoca un augment d'intercanvi de nucleòtids guanina, associat amb les mutacions en les posicions **16, 17, 116, 117, 119, 144 i 146**. Un altre domini implicat també en la unió a nucleòtids guanina inclouria el residu **Arg¹⁶⁴**: la seva substitució per Ala¹⁶⁴ causaria una pèrdua de l'activitat unidora a GTP. Per altra banda, hi ha altres dominis que juguen un paper fonamental en el reconeixement dels efectors. Un exemple seria la substitució de **Asp³⁸** per Ala³⁸, que reduiria l'efecte biològic de les proteïnes Ras (elimina l'activitat transformant del mutant **Leu⁶¹**).

Així doncs, vam escollir diverses mutacions descrites en p21 H-Ras per incloure-les en p19 H-Ras i així poder observar el seu possible efecte sobre la interacció amb RACK1: **Gly¹²∧Val¹²** (dominant positiu), **Gly¹⁵∧Ala¹⁵** (dominant positiu), **Ser¹⁷∧Asn¹⁷** (dominant negatiu), **Ser³⁹∧Ile³⁹**, **Gln⁶¹∧Leu⁶¹** (dominant positiu) i **Gly³⁸/Ile³⁹∧Asp³⁸/Ser³⁹** (dominant negatiu). A l'hora de mutar la regió C-terminal, corresponent a l'exó IDX (l'única regió que varia respecte la proteïna p21 H-Ras), vam escollir mutacions en regions molt conservades, com el domini WD, descrit en altres proteïnes per jugar un paper fonamental en les interaccions proteïna-proteïna. També vam decidir mutar la regió rica en serines 157-160, ja que la seqüència de la proteïna humana és la que presenta més residus serina (més endavant no descartem eliminar totalment la regió rica en serina per veure'n els efectes). Les mutacions realitzades foren **Ser¹⁶⁰∧Ala¹⁶⁰**, **Trp¹⁶⁴∧Ala¹⁶⁴** i **Asp¹⁶⁵∧Gly¹⁶⁵**. Vam triar com aminoàcids substituïts residus apolars petits com l'alanina, i en el cas de la substitució d'un àcid aspàrtic per una glicina, és l'aminoàcid que trobem en la seqüència endògena de p19 c-H-Ras de ratolí

(NIH3T3) analitzada anteriorment (Guil *et al*, 2003a). La mutagènesi es va realitzar per el mètode de QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene).

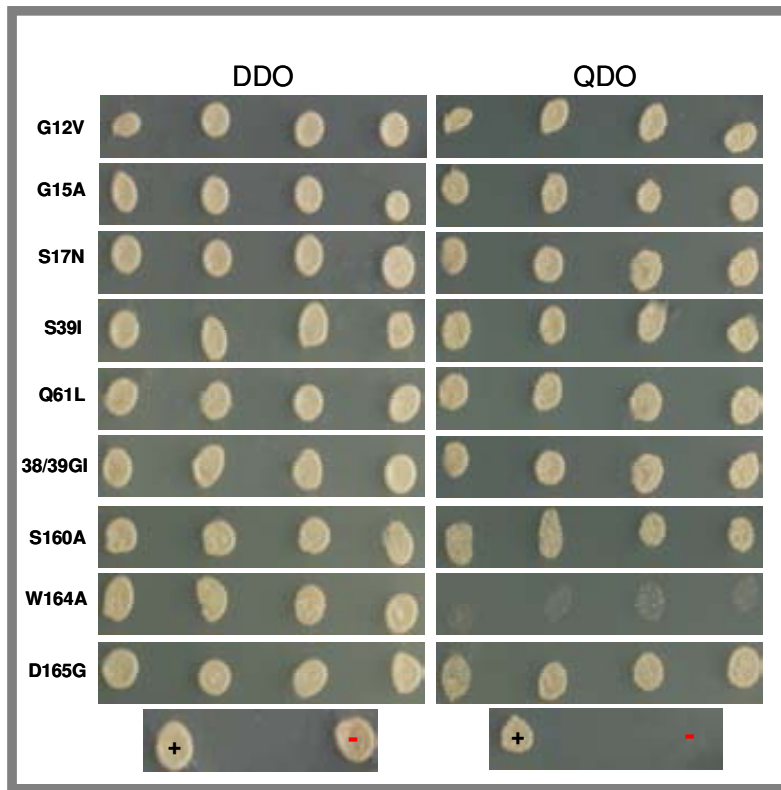


Fig. 25: La mutació W164A destrueix la unió p19/RACK1. Assaig de doble-híbrid en llevat per estudiar la unió dels mutants de p19 amb RACK1. S'han utilitzat medis selectius per a llevat: DDO (-Leu/-Trp) i QDO (-Leu/-Trp/-His/-Ade). La soca utilitzada ha estat la AH109 expressant el GAL4 DNA BD (vector pGBKT7) clonat als mutans de p19, fusionada amb la Y187 expressant GAL4 AD (vector pGADT7) clonat a RACK1. El control positiu és la interacció p19wt X RACK1, i el control negatiu és la interacció p21 X RACK1.

Vam realitzar assaigs de doble-híbrid en llevat per analitzar la interacció entre RACK1 i les diferents variants de p19 H-Ras mutada. Els llevats transformats amb els plasmidis pGBKT7-p19 mutada (soca de llevat AH109) i pGADT7-RACK1 C-terminal (soca de llevat Y187) van créixer en medi selectiu -Leu -Trp (DDO) per detectar les colònies doblement transformades, i en medi -Leu -Trp -His -Ade (QDO) per detectar les possibles interaccions entre les dues proteïnes. Una alíquota de cultiu saturat de cada soca cotransformada es va plaquejar en cada placa de medi selectiu i es va incubar a 30°C durant 5 dies. De totes les mutacions realitzades, no vam observar cap alteració de la interacció amb RACK1 en les comunes amb la proteïna p21 H-Ras, ni tampoc vam observar cap canvi significatiu en la variació del nombre de serines ni en la substitució de Asp¹⁶⁵. En canvi, vam comprovar que no es dona interacció quan mutem el codó 164, o sigui quan mutem el domini WD relacionat amb la interacció proteïna-proteïna (figura 25). També vam voler comprovar si degut a la diferent localització cel·lular de p19 H-Ras respecte p21 H-Ras, i a la seva pèrdua d'activitat unidora a GTP, la proteïna p19 H-

Ras era capaç d'interaccionar amb els mateixos efectors, GAPs i GEFs que la seva proteïna germana p21 H-Ras. S'ha descrit la interacció de p21 H-Ras amb aquestes molècules mitjançant altres tècniques diferents, tot i que s'ha descrit una interacció per doble híbrid en llevat entre p21^{G15A} i yCdc25 (Vojtek *et al.* 1993). Nosaltres vam intentar veure la interacció de p21 H-Ras i alguns activadors coneguts d'aquesta molècula en llevat, però els resultats foren negatius. La nostra experiència anterior ens indicava que a vegades és difícil observar interaccions mitjançant doble-híbrid en llevat utilitzant molècules grans (>70 kDa). Per tant, vam clonar només les seqüències de cada proteïna que codificaven per la zona relacionada amb la unió a proteïnes, però no vam aconseguir observar les interaccions abans descrites. La proteïna p19 H-Ras tampoc mostra cap interacció no sols amb alguns dels activadors de p21, si no amb cap dels efectors de p21 H-Ras que vam analitzar (taula 2). De totes formes, aquests resultats concorden amb el fet que p19 no es troba a la membrana plasmàtica (figura 24), i per tant podrien indicar que p19 no interfereix en l'activitat de p21 mitjançant una competició directa amb els seus efectors i activadors.

| | Raf1 | MAXP1 | AF6 | PI3K | RalGDS | p19 | RACK1 | Vector buit |
|-----------|------|-------|-----|------|--------|-----|-------|-------------|
| p21 H-Ras | + | + | + | - | + | - | - | - |
| p19 H-Ras | - | - | - | - | - | + | + | - |

Taula 2: Assaig de doble híbrid en llevat, per estudiar la possible unió de p19 als efectors de p21. La marca + indica interacció. Com a controls hem utilitzat la mateixa proteïna p19, RACK1 i el vector buit

Tenint evidències clares de la interacció de RACK1 i p19 H-Ras (el mutant confirma aquesta interacció i ens dóna un possible dominant negatiu), vam procedir a estudiar les possibles vies enzimàtiques regulades per p19 H-Ras. Tal com hem comentat abans, RACK1 forma part d'una família de proteïnes adaptadores que uneixen diferents enzims d'una mateixa via de transducció de senyal. Ja que RACK1 és el membre de la família que té especificitat per PKC β II, i a més a més s'ha descrit una localització cel·lular similar entre les dues proteïnes (Lopez-Bergami *et al.* 2005), el nostre següent pas va ser estudiar si p19 H-Ras i PKC β II mostraven un patró de distribució semblant. Vam observar que les dues proteïnes col·localitzaven a la regió

perinuclear (figura 26), zona que prèviament ens havia donat una senyal de FRET més intensa. Aquests resultats ens suggerien que p19 H-Ras, RACK1 i PKC β II podrien formar un complex proteic multimèric que permetria les interaccions entre les tres proteïnes, i per tant podrien formar part d'una mateixa via de senyalització.

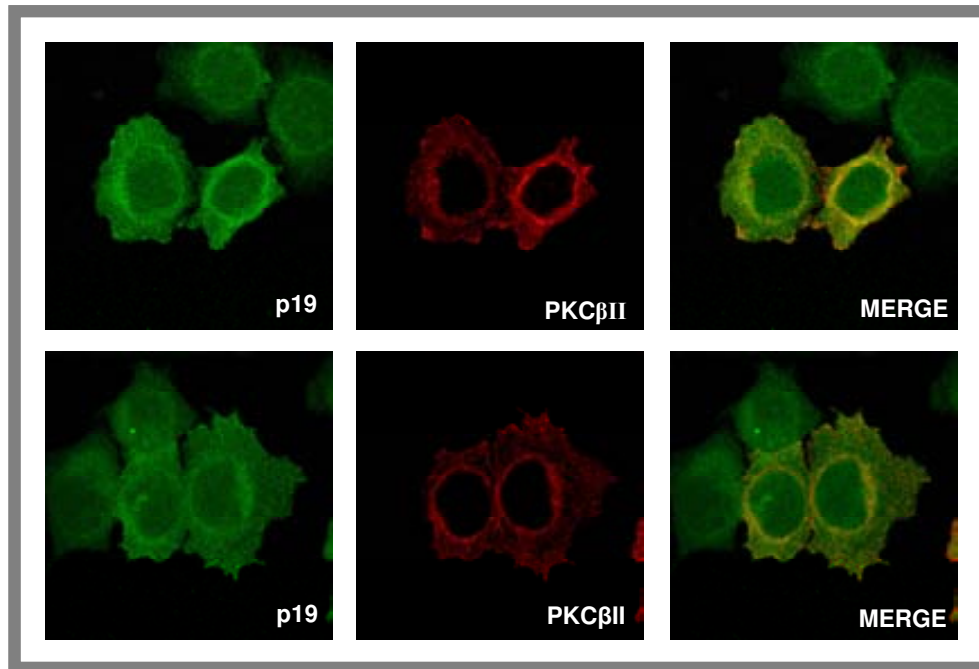
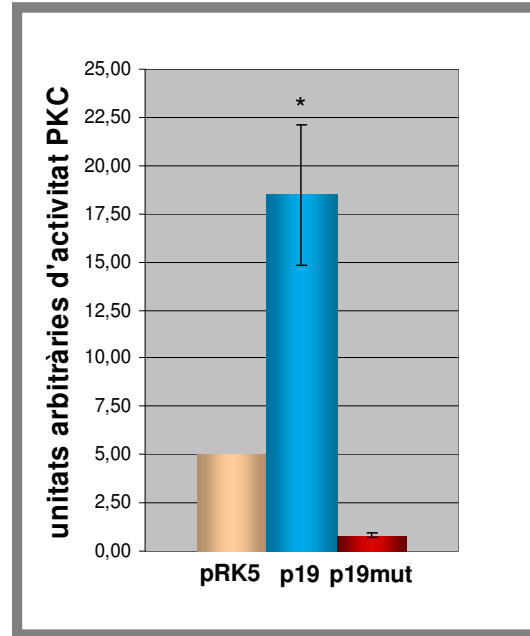


Fig. 26: p19 H-Ras i PKC β II col-localitzen a la regió perinuclear. Col·localització de p19 i p73 α en cèl·lules HeLa sobreexpressant ambdues proteïnes. La detecció es va realitzar mitjançant IF amb anticossos específics contra conill i ratolí, respectivament. Els anticossos secundaris són Alexa Fluor® 488 F(ab')₂ contra conill (p19), o Alexa Fluor® 555 F(ab')₂ contra ratolí (PKC β II). Les imatges MERGE mostren la col·localització dels dos anticossos secundaris.

A continuació vam analitzar la regulació de l'activitat de PKC β II en cèl·lules HeLa sobreexpressant p19 o el mutant W164A (p19mut) de forma transitòria, i vam comparar els resultats amb cèl·lules transfectades amb el vector buit. Com es mostra a la figura 27, la sobreexpressió de p19 provoca un increment de l'activitat de les PKCs, en concret observem una activitat enzimàtica 3-4.5 vegades superior a la que trobem en les cèl·lules control. A més a més, l'activitat no sols recupera els seus nivells normals quan sobreexpressem p19W164A, sinó que disminueix respecte el control. Així doncs, aquest resultat ens reforçà la idea de que p19mut fossi una forma dominant-negativa de la proteïna p19, i que probablement era necessària la unió a RACK1 per activar PKC. Però, quins efectes tenia l'activació de PKC per part de p19 a nivell cel·lular?

Fig. 27: p19 H-Ras incrementa l'activitat PKC. Assaig d'activitat PKC en cèl·lules HeLa sobreexpressant de forma transient p19, p19mut o el vector sol. L'activitat PKC es mostra en unitats arbitràries, les quals són directament proporcionals als valors d'absorbància de l'assaig ELISA obtinguts amb un substrat de la peroxidasa (o-fenilenediamina més H_2O_2) a 492 nm. El valor del tractament amb el vector sol s'ha fixat en 5 i s'ha considerat com a activitat basal de PKC. S'ha dut a terme experiments independents per triplicat (n=3, t-test * p<0.001).



Les dades fins ara obtingudes ens suggerien un possible paper de p19 H-Ras en algunes de les principals cascades de senyalització cel·lular, ja que l'activació de PKC mitjançant esters de forbol o per DAG activa al menys dos vies MAPK: la cinasa regulada per senyals extracel·lulars (ERK) i la via de JNK. La cascada de senyalització cel·lular Raf/MEK/ERK s'expressa de forma ubiqua en cèl·lules de mamífer (Schonwasser *et al.* 1998), però a diferència de les proteïnes ERKs, les quals s'activen per agents mitògens, les JNKs s'activen a causa de estrès cel·lular i per citosines inflammatòries (Ip *et al.* 1998). Així doncs vam voler estudiar els nivells de fosforilació de ERK1/2, p38MAPK $\alpha/\beta/\gamma$ i JNK1/2/3 en cèl·lules sobreexpressant p19 o bé p19mut. La figura 28 i la figura 56 annexes mostren els resultats dels Western Blots realitzats per detectar les proteïnes fosforilades. La sobreexpressió de la proteïna p19 indueix només la fosforilació de ERK1 (sense afectar els nivells totals d'ERK)(figura 28A), mentre que no vam observar canvis significatius en els nivells de proteïna ERK2, p38MAPK $\alpha/\beta/\gamma$ i JNK1/2/3 fosforilades (figura 56 annexes). Aquesta dada es veu reforçada per la observació de la disminució de p-ERK1 en cèl·lules *knock-down* per a p19 H-Ras (figura 28B) sense afectar significativament la fosforilació de JNK, confirmant-nos el paper regulador de p19 H-Ras a l'hora d'activar la cascada de les MAPK. Per a obtenir el silenciament gènic de p19 H-Ras vam utilitzar el sistema pSUPER RNAi (veure materials i mètodes).

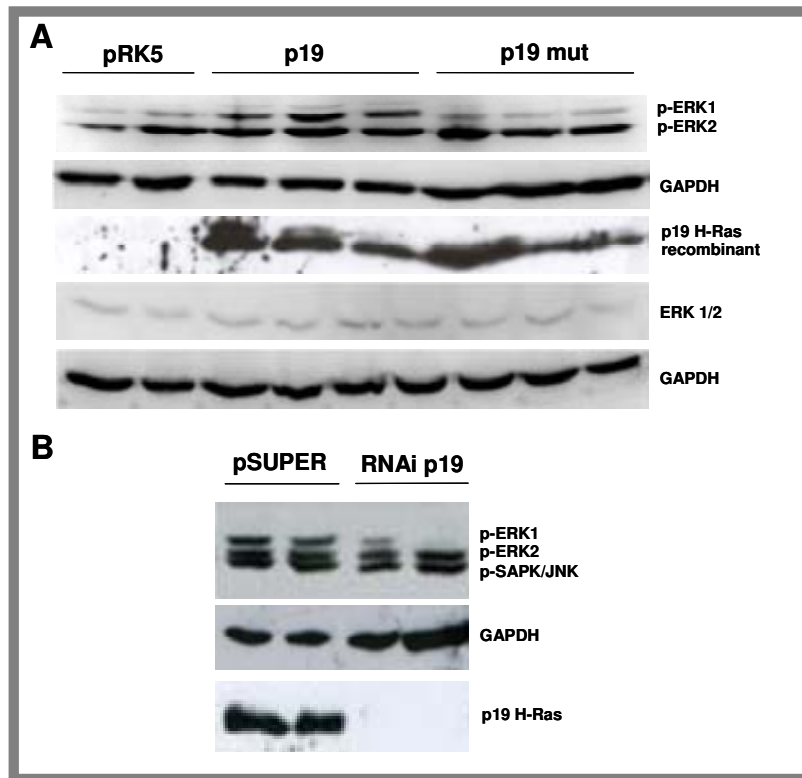


Fig. 28: Activació de ERK1/2 mitjançant la sobreexpressió de p19. A) Western Blot detectant la fosforilació de ERK1 en extractes cel·lulars totals de cèl·lules HeLa transfectades transitòriament amb els vectors pRK5, pRK5-p19 i pRK5-p19mut. Els extractes proteics es van obtenir en tres experiments independents. Es va utilitzar la GAPDH com a control intern. B) Western Blot amb anticossos anti-p-ERK1/2, anti-p-JNK i anti-p19 sobre extractes proteics de cèl·lules HeLa on prèviament hem silenciat p19 H-Ras, en dos experiments independents.

2. p19 indueix activitat telomerasa i regula el *checkpoint* G1/S

Una altra de les proteïnes que vam trobar en l'escorbrat de la llibreria de llevat (Guil *et al.* 2003a) fou l'extrem C-terminal de la proteïna p73 α , homòloga de la proteïna p53 supressora de tumors. I recentment s'ha descrit la interacció de p19 H-Ras amb una altra de les isoformes de p73, la proteïna p73 β , tot inhibint la repressió de la transcripció de p73 β mitjançada per MDM2, una oncoproteïna que es sobreexpressa en molts càncers humans (Jeong *et al.* 2006). Totes aquestes interaccions van ser validades prèviament mitjançant co-immunoprecipitació. Seguint la línia dels resultats preliminars obtinguts, vam voler comprovar la interacció de p19 i p21 amb p73 α i p73 β mitjançant assaigs de doble-híbrid en llevat. Vam utilitzar l'extrem C-terminal de les dues isoformes (la

Resultats

nomenclatura emprada és C-t p73 α , que comprèn els nucleòtids 1441-1912, i C-t p73 β , que va des del nucleòtid 1441 fins als nucleòtids del codó de *stop*), ja que són les regions que contenen la zona d'unió a proteïnes. Com es pot observar a la figura 29A, p19 s'uneix tan a p73 α com a p73 β , però no observem interacció d'aquestes dues proteïnes amb p21. Aquests resultats ens porten a pensar que la interacció de p19 amb p73 és específica i que la zona d'unió a p19 es troba en la seqüència que comparteixen p73 α i p73 β (figura 30B). En concordança amb les dades obtingudes, p19 no interacciona amb p53 (figura 30C), ja que no té la seqüència comuna amb p73 α/β . En aquest cas també vam realitzar assaigs amb els mutants abans testats (figura 29) observant que la interacció de p19 i p73 es veia truncada en el cas del mutant W164A, una altra mostra més de la possibilitat de que p19mut sigui un dominant negatiu. Per altra banda, podem observar com el mutant S17N tampoc interaccionava amb p73, mentre que en el cas de RACK1 mutant no afectava a la interacció.

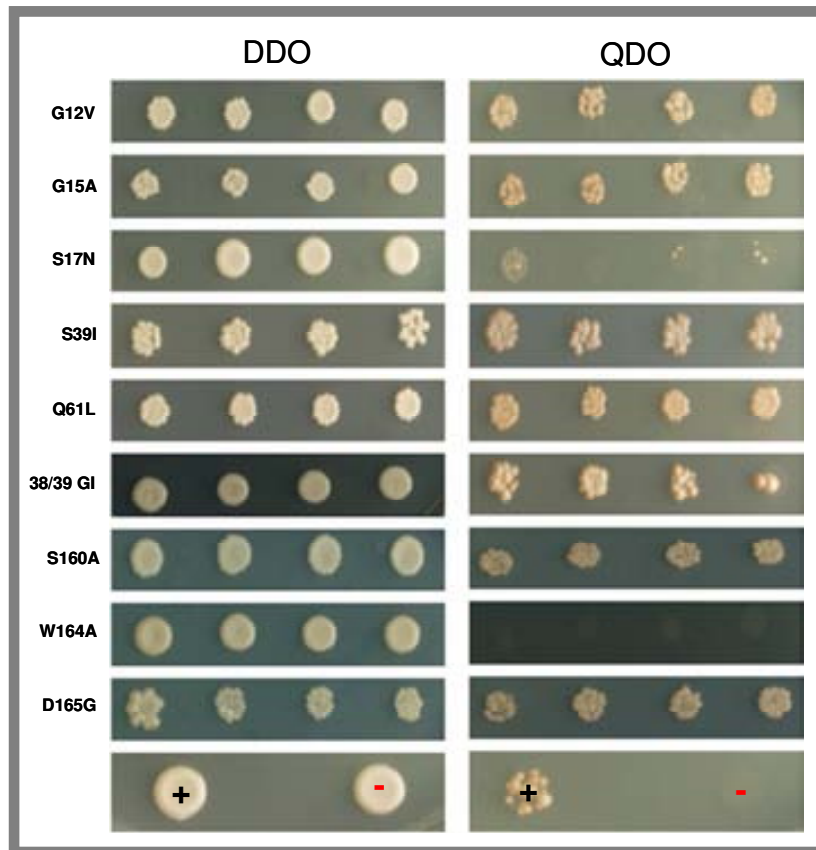


Fig. 29: Assaig de doble-híbrid en llevat per estudiar la unió dels mutants de p19 amb p73 α . S'han utilitzat medis selectius per a llevat: DDO (-Leu/-Trp) i QDO (-Leu/-Trp/-His/-Ade). La soca utilitzada ha estat la AH109 expressant el GAL4 DNA BD (vector pGBKT7) clonat als mutants de p19, fusionada amb la Y187 expressant GAL4 AD (vector pGADT7) clonat a p73 α . El control positiu és la interacció p19wt X p73 α , i el control negatiu és la interacció p21 X p73 α .

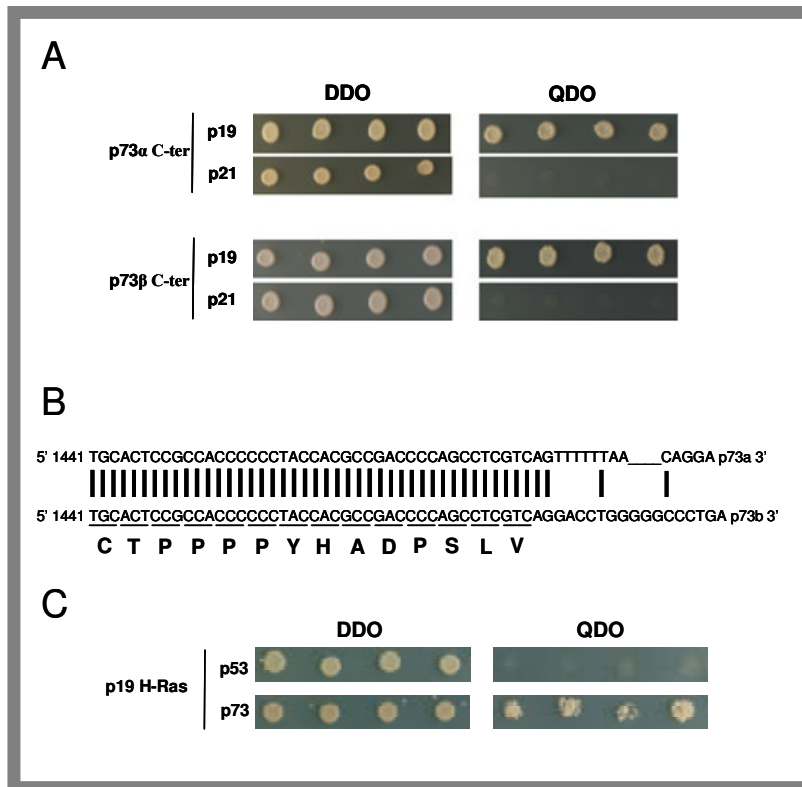


Fig.30: Interacció de p19 H-Ras amb p73. A) Assaig de doble-híbrid en llevat per estudiar la unió de p19 i p21 H-Ras amb l'extrem C-terminal de p73α/β. p19 i p21 s'han clonat en el vector pGBKT7, i l'extrem C-terminal de p73α/β en el vector pGADT7. El vector pGADT7-p73α conté els nucleòtids de l'extrem C-terminal 1441-1912, i el vector pGADT7-p73β conté els nucleòtids 1441-1457. El creixement en medi QDO indica interacció entre les dues proteïnes. B) Comparació de la seqüència nucleotídica entre p73α i p73β. C) Assaig de doble-híbrid en llevat per comparar la unió de p73 i de p53 a p19 H-Ras.

També vam realitzar assaigs de microscòpia en cèl·lules HeLa, observant la col·localització de les dues proteïnes dins el nucli (figura 31).

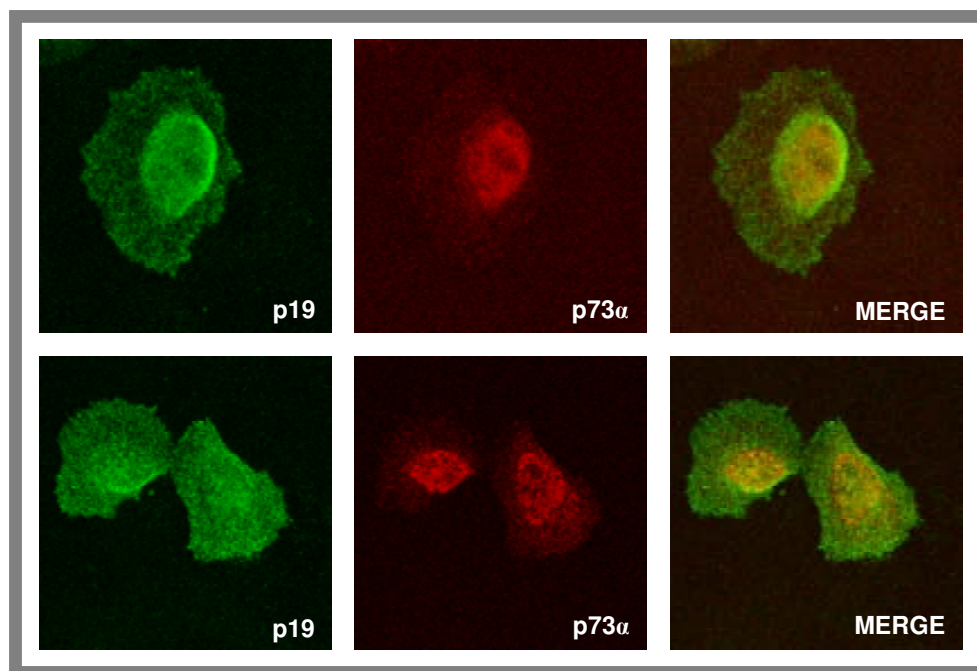


Fig. 31: p19 H-Ras i p73α col·localitzen al nucli. Col·localització de p19 i p73α en cèl·lules HeLa sobreexpressant ambdues proteïnes. La detecció es va realitzar mitjançant IF amb anticossos específics contra conill i ratolí, respectivament. Els anticossos secundaris són Alexa Fluor® 488 F(ab')₂ contra conill (p19), o Alexa Fluor® 555 F(ab')₂ contra ratolí (p73α). Les imatges MERGE mostren la col·localització dels dos anticossos secundaris.

Les evidències en els últims anys han mostrat que p73 pot compartir algunes funcions amb p53, però d'altres no. A més a més, no totes les isoformes de p73 tenen la mateixa funció cel·lular (Marabese *et al.* 2007). Per exemple, p73 α és un potent inhibidor de la telomerasa, mentre que p73 β ajuda a mantenir l'activitat telomerasa a través de l'activació per HDM2 o altres dianes (Toh *et al.* 2005). Degut a que p19 s'uneix a ambdues molècules, es va intentar quantificar l'activitat telomerasa en cèl·lules HeLa sota l'efecte de la sobreexpressió de p19 o p19mut per tal d'esbrinar l'efecte de la interacció p73/p19. Per fer-ho es va utilitzar un kit que combina el protocol TRAP (*Telomeric Repeat Amplification Protocol*) amb la detecció no-radioactiva dels productes generats per PCR (ELISA). Tal i com es pot observar a la figura 32A, vam detectar un increment de l'activitat telomerasa enzimàtica en cèl·lules amb un alt nivell de p19, resultat que es veia disminuït si la proteïna sobreexpressada era la mutada. Aquestes dades ens indiquen que p19, segurament a través de la unió a diferents isoformes de p73, és un activador de la telomerasa.

Per a confirmar aquest efecte, vam procedir a quantificar l'activitat telomerasa de cèl·lules HeLa sobreexpressant p19 H-Ras on prèviament havíem silenciats la proteïna p73 mitjançant un siRNA diana específic d'aquesta molècula (p73 siRNA (h), Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Les cèl·lules HeLa primer es van transfectar amb siRNA p73 durant dos dies en condicions de cultiu cel·lular normals, i després es van transfectar amb els vectors pRK5 o pRK5-P19. Després de 24 hores, es van recollir i es va analitzar l'activitat telomerasa dels extractes. Els resultats obtinguts ens indiquen clarament que p19 regula l'activitat telomerasa a través de p73, ja que l'activitat telomerasa disminueix quan silenciem un 50% p73 (figura 32B).

L'enzim telomerasa es troba estrictament regulat durant el cicle cel·lular (Brunori *et al.* 2005; Zhu *et al.* 1996), per tant vam voler constatar quins estadis del cicle cel·lular podien veure's modificats per la sobreexpressió de p19. Per fer-ho, vam utilitzar la tècnica de la citometria de flux, la qual ens permetia separar les cèl·lules que sobreexpressaven la p19 (aquesta estava conjugada a la molècula fluorescent GFP) i analitzar-ne l'estadi cel·lular mitjançant la quantificació del DNA. Com es pot observar la figura 33, la sobreexpressió de p19 incrementa un 25% el percentatge de cèl·lules en G1, a més de mantenir les cèl·lules en aquest estadi durant més temps. De fet, s'ha

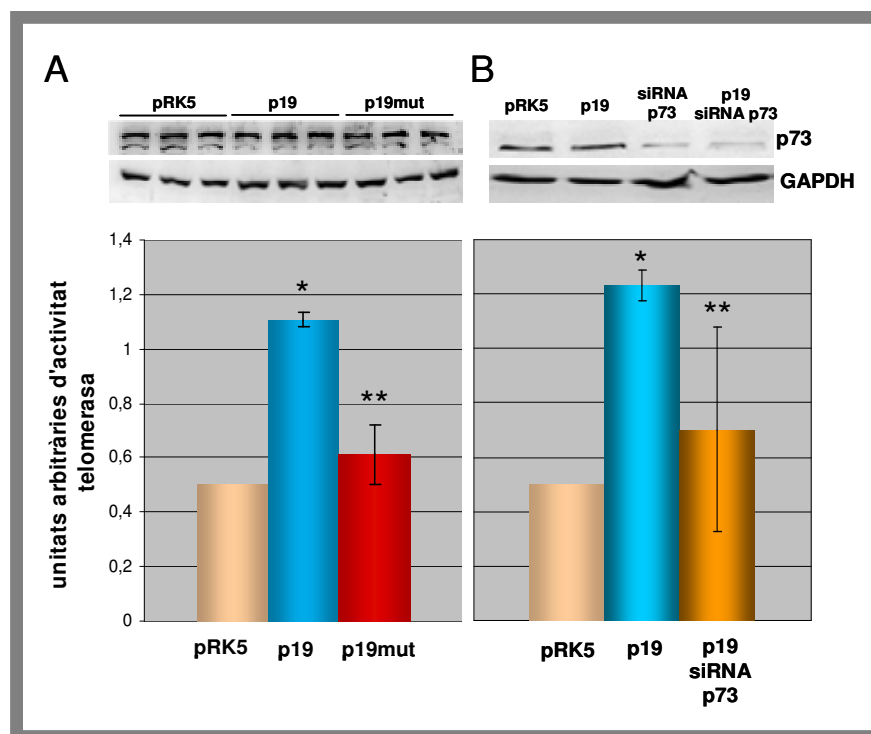


Fig. 32: p19 H-Ras incrementa l'activitat telomerasa mitjançant p73. **A)** Assaig d'activitat telomerasa en cèl·lules HeLa sobreexpressant de forma transiènt p19, p19mut o el vector sol. L'activitat telomerasa es mostra en unitats arbitràries, les quals són directament proporcionals als valors d'absorbància de l'assaig ELISA obtinguts amb un substrat de la peroxidasa (3,3', 5, 5'-tetrametilbenzidina) a 450 nm. El valor del tractament amb el vector sol s'ha fixat en 0,5 i s'ha considerat com a activitat basal de telomerasa. S'ha dut a terme tres experiments independents per triplicat (n=3, t-test * p<0.001, ** p<0.001), així com anàlisis de Western Blot amb Ac anti-p73 i GAPDH com a control intern. **B)** Assaig d'activitat telomerasa en de cèl·lules HeLa sobreexpressant p19 H-Ras on prèviament hem silenciat la proteïna p73, en comparació a cèl·lules transfectades transitoriament amb el vector sol, el vector codificant per p19 o els siRNA per a p73. L'activitat telomerasa es mostra en unitats arbitràries, les quals són directament proporcionals als valors d'absorbància de l'assaig ELISA obtinguts amb un substrat de la peroxidasa (3,3', 5, 5'-tetrametilbenzidina) a 450 nm. El valor del tractament amb el vector sol s'ha fixat en 0,5 i s'ha considerat com a activitat basal de telomerasa. S'ha dut a terme tres experiments independents per triplicat (n=3, t-test * p<0.001; ** p<0,05 degut a una certa variabilitat en les dobles transfeccions i en l'eficiència de la RNAi), així com anàlisis de Western Blot. Mitjanes dels valors de quantificació respecte la GAPDH mitjançant el programa Multi Gauge V3.0: pRK5=3,8; p19=3,66; siRNA p73=1,83; p19/siRNA p73=1,6.

descriu que el retard en la transició de la fase G1 a la fase S es correlaciona amb un augment de l'activitat telomerasa (Zhu *et al.* 1996), i recentment s'ha publicat que ERK activat també regula el retard G1/S (Villanueva *et al.* 2007), aspecte que concorda amb els nostres resultats anteriors. Si aquestes dades les afegim a les ja donades, podríem concloure que la proteïna p19 té un paper important en la regulació del pas de G1 a S, tot induint un retard en la progressió del cicle cel·lular.

Per a corroborar aquests resultats vam analitzar alguns marcadors moleculars de cicle cel·lular, com FoxO1 o p27^{kip1}, mitjançant anàlisis de Western Blot en cèl·lules HeLa sobreexpressant p19 H-Ras o el seu mutant. Els membres de la família de factors

de transcripció FKHR (FoxO) actuen com a supressors de tumors induint la parada del cicle cel·lular (Arden 2004), i són regulats negativament per la cinasa PI3K, ja que aquesta promou la seva exclusió nuclear. A més a més, aquesta regulació negativa es dona mitjançant la fosforilació per part de la serina/treonina cinasa Akt/PKB (Burgering *et al.* 2002). També s'ha descrit que l'increment en l'expressió dels membres FoxO dona lloc a una activació de p27^{kip1}, un inhibidor de cicle cel·lular. Tal com esperàvem, els nostres assaigs ens van mostrar un increment de proteïna FoxO total en cèl·lules amb un alt nivell de p19 (figura 34), tot i que no vam poder observar un canvi en l'expressió de p27^{kip1} (resultats no mostrats).

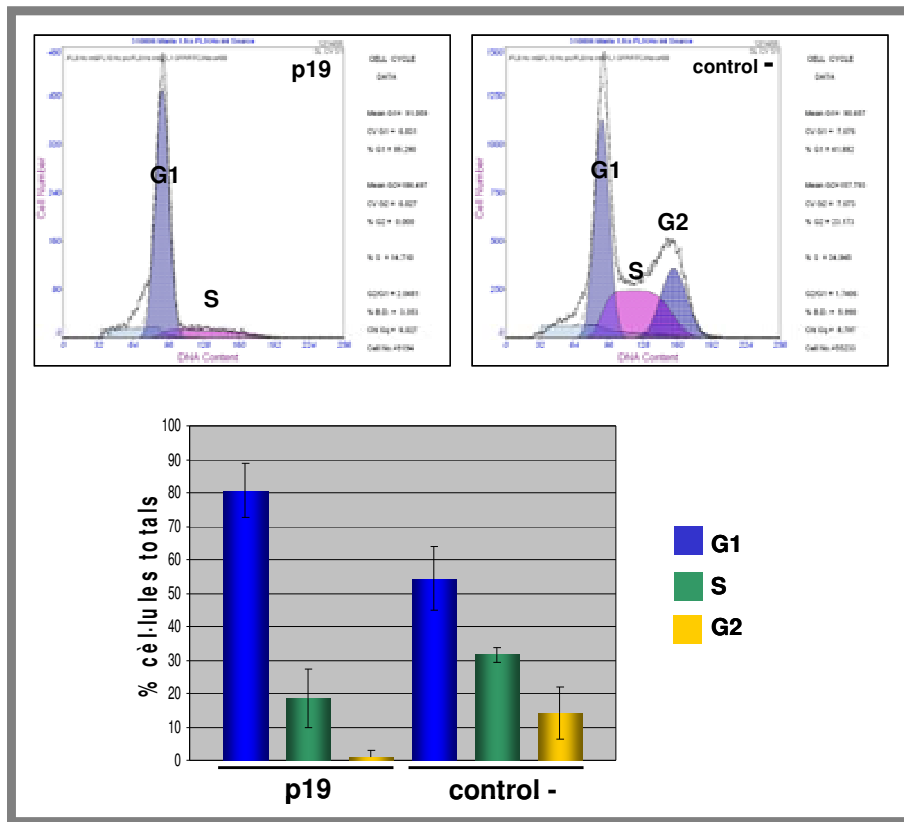


Fig. 33: p19 H-Ras incrementa el percentatge de cèl·lules en G1 i retarda la transició G1/S. Anàlisi del cicle cel·lular mitjançant FACS (*Fluorescent-Activated Cell Sorting*) en cèl·lules HeLa sobreexpressant p19 amb el vector pEGFP-p19. Les cèl·lules GFP – es corresponen a les cèl·lules no transfectades, i per tant les que no sobreexpressen p19 (control negatiu). El perfil de cèl·lules transfectades amb GFP sola és idèntic al de les cèl·lules GFP. Els coeficients de variances són: p19=7,23; control negatiu=8,8.

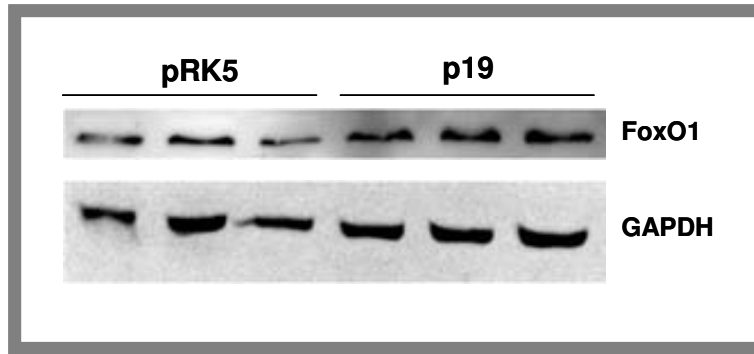


Fig. 34: p19 H-Ras provoca un increment dels nivells de FoxO1 cel·lulars. Western Blot detectant la proteïna FoxO1 total en extractes cel·lulars totals de cèl·lules HeLa transfectades transitòriament amb els vectors pRK5, pRK5-p19 i pRK5-p19mut. Els extractes proteics es van obtenir en tres experiments independents. Es va utilitzar la GAPDH com a control intern. Mitjanes dels valors de quantificació respecte la GAPDH mitjançant el programa Multi Gauge V3.0: pRK5=2,12; p19=4,23.

Al llarg del nostre treball experimental ja havíem pogut observar que la sobreexpressió de p19 no provocava apoptosi, almenys de forma evident. De totes maneres, vam voler comprovar les nostres impressions mitjançant la tinció de cèl·lules HeLa transfectades amb el vector pRK5-p19 i pRK5-p19W164A amb Anexina V conjugada a FITC i IP, i efectivament no vam observar un índex més alt d'apoptosi respecte el control (figura 35).

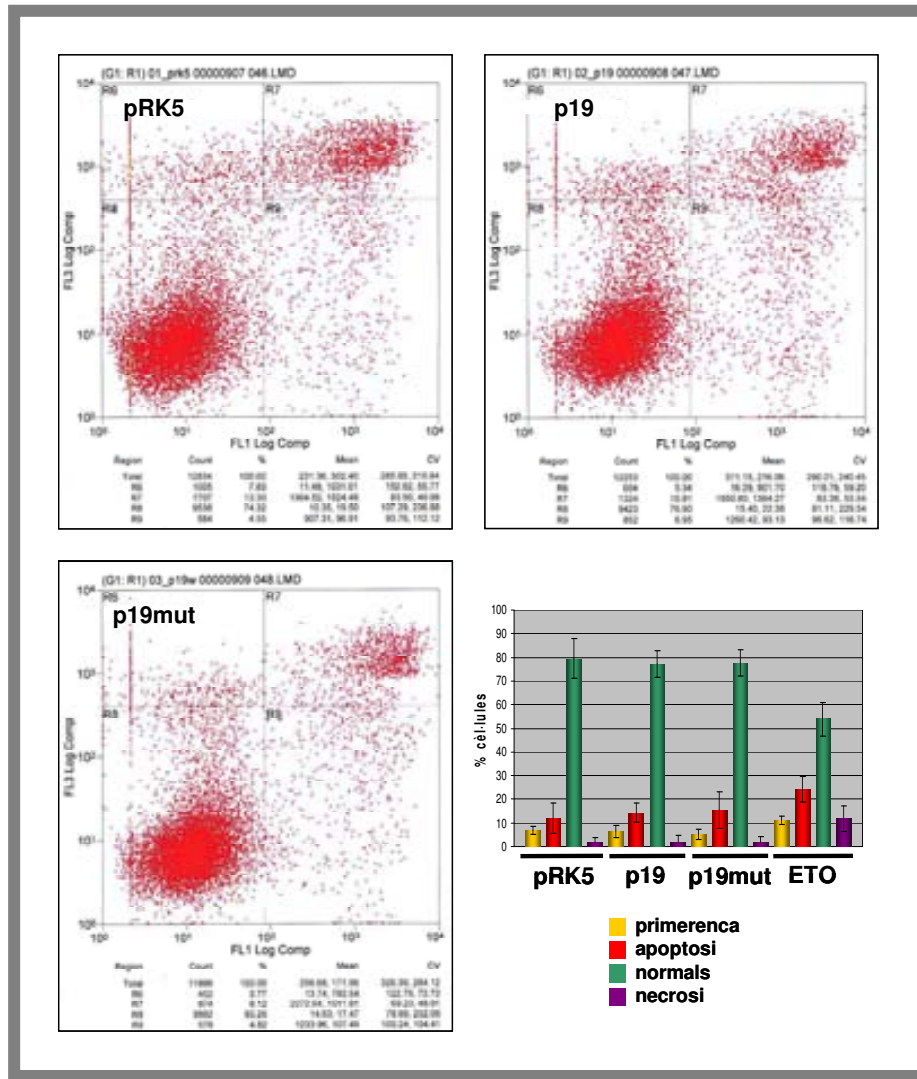


Fig. 35: La sobreexpressió de p19 H-Ras no provoca apoptosi. Assaig d'apoptosi en cèl·lules HeLa transfectades amb els vectors pRK5, pRK5-p19, pRK5-p19W164A i cèl·lules HeLa tractades amb Etoposide 100 µM (control positiu d'apoptosi). En els histogrames es pot observar les cèl·lules apoptòtiques primerenques (R6), apoptòtiques (R7), normals (R8) i necròtiques (R9). S'ha utilitzat la tinció amb Annexina V-FITC i Iodur de Propidi (IP). Les cèl·lules s'han analitzat en un aparell Epics XL flow cytometer (Coulter Corporation, Miami, Florida, USA). L'excitació de la mostra es va dur a terme amb un làser d'argó estàndard de 15 mW a 488 nm. Al costat es mostra els percentatges de cèl·lules en cada estadi.

3. p19 regula el creixement cel·lular i l'expressió de gens metastàtics

Per dur a terme una avaluació més completa de la funció de p19 H-Ras, vam analitzar l'expressió diferencial de 22.000 gens humans en cèl·lules HeLa prèviament transfectades amb el vector de sobreexpressió de la proteïna p19 (pRK5-p19), i els resultats foren validats comparant-los amb els de cèl·lules sobreexpressant el seu homòleg mutant (p19W164A). En els dos assaigs es va considerar que l'expressió basal dels cDNA de cèl·lules transfectades amb el vector buit era 1 (N.C.=1)(Nivell de Canvi) (figura 36). La quantificació de la resposta transcripcional de cèl·lules HeLa amb un alt nivell de p19 comparada a la de cèl·lules sobreexpressant el mutant p19mut ha servit per analitzar un anàlisi funcional dels gens expressats diferencialment. La taula 3 mostra els resultats en forma de N.C. i s'han considerat com a gens significatius aquells amb una expressió diferencial ≥ 1.5 .

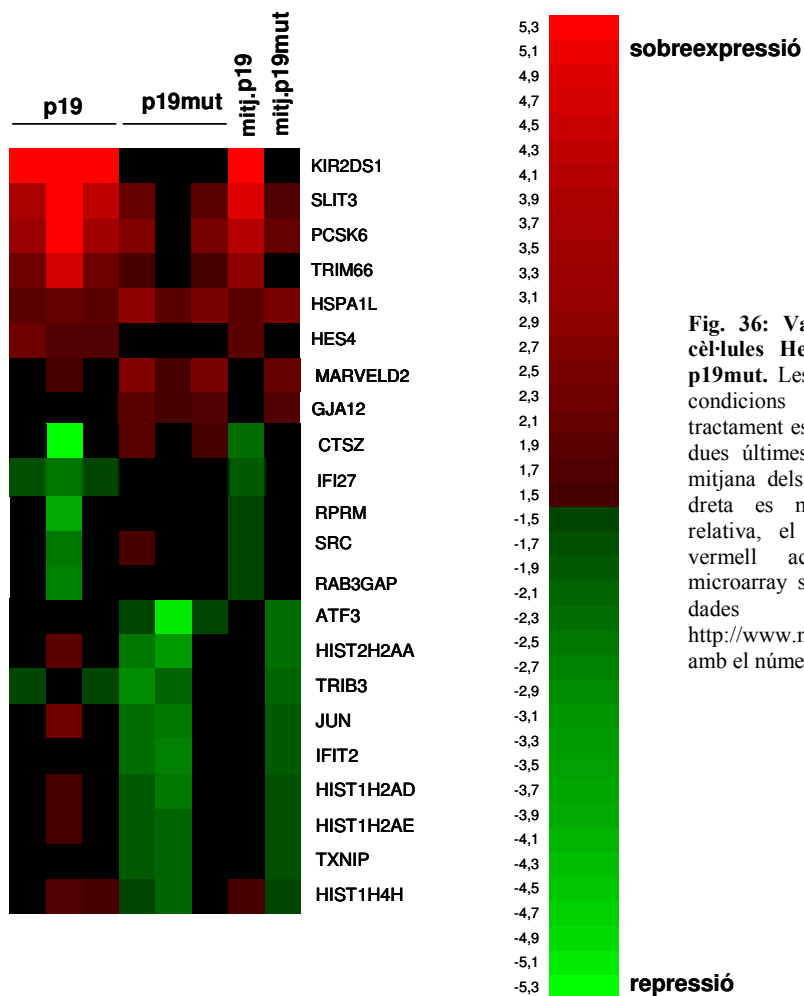


Fig. 36: Valors d'expressió gènica en cèl·lules HeLa sobreexpressant p19 o p19mut. Les columnes corresponen a les condicions experimentals, i cada tractament es va analitzar per triplicat. Les dues últimes columnes corresponen a la mitjana dels valors de les mostres. A la dreta es mostra el rang d'expressió relativa, el verd indica repressió i el vermell activació. Les dades del microarray s'han dipositat en el banc de dades

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/> amb el número d'accés **GSE12059**

| <i>Símbol</i> | <i>Número</i> | <i>Nom del gen</i> | Log_2 p19 | Log_2 p19mut | N.C. p19 | N.C. p19mut | N.C. (p19- p19mut) |
|---|---------------|---|-----------------------|--------------------------|-------------|----------------|-----------------------|
| gens induïts per la sobreexpressió de p19 | | | | | | | |
| KIR2DS1 | NM_014512 | killer cell immunoglobulin-like receptor | 2,63 | 0,38 | 6,2 | 1,3 | 4,8 |
| SLIT3 | NM_003062 | slit homolog 3 (<i>Drosophila</i>) | 2,29 | 0,80 | 4,9 | 1,7 | 2,8 (RT) |
| PCSK6/PACE4 | NM_002570 | proprotein convertase subtilisin/kexin type 6 | 2,05 | 1,10 | 4,1 | 2,1 | 2,0 |
| TRIM66/TIF1D | AB002296 | mRNA KIAA1298 protein | 1,6 | 0,50 | 3,0 | 1,4 | 2,2 |
| HES4 | NM_021170 | hairy and enhancer of split 4 (<i>Drosophila</i>) | 0,98 | 0,24 | 2,0 | 1,2 | 1,7 |
| gens induïts per la sobreexpressió de p19mut * | | | | | | | |
| MARVELD2/TRIC | NM_144724 | MARVEL domain containing 2 | 0,53 | 1,2 | 1,4 | 2,3 | 1,6 |

| <i>Símbol</i> | <i>Número</i> | <i>Nom del gen</i> | Log_2 p19 | Log_2 p19mut | N.C. p19 | N.C. p19mut | N.C. (p19- p19mut) |
|---|---------------|--|-----------------------|--------------------------|-------------|----------------|-----------------------|
| gens reprimits per la sobreexpressió de p19 | | | | | | | |
| CTS2/CTSX | NM_001336 | cathepsin Z | -1,23 | 0,56 | -2,3 | 1,5 | -3,5 |
| IFI27 | NM_005532 | interferon, alpha-inducible protein 27 | -0,97 | -0,43 | -2 | -1,34 | -1,5 |
| RPRM | NM_019845 | represso, TP53 dependant G2 arrest mediator candidate | -0,71 | 0,15 | -1,6 | 1,1 | -1,8 |
| SRC | NM_005417 | v-src sarcoma (Schmidt-Rupin A-2) viral oncogene homolog (avian) | -0,65 | 0,09 | -1,6 | 1 | -1,7 (WB) |
| RAB3GAP1 | NM_012233 | RAB3 GTPase-activating protein | -0,64 | 0,02 | -1,5 | 1,02 | -1,6 |
| gens reprimits per la sobreexpressió de p19mut * | | | | | | | |
| ATF3 | NM_004024 | activating transcription factor 3 | 0,14 | -1,24 | 1,1 | -2,4 | -2,6 |
| TRIB3/SINK | NM_021158 | tribbles homolog 3 (<i>Drosophila</i>) | -0,47 | -1,1 | -1,4 | -2,1 | -1,5 |
| JUN | NM_002228 | v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian) | 0,49 | -1 | 1,4 | -2 | -2,8 (WB) |
| IFIT2 | NM_001547 | interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2 | -0,01 | -1 | -1 | -2 | -2 |
| TXNIP/VDUP1 | NM_006472 | thioredoxin interacting protein | 0,01 | -0,82 | 1 | -1,8 | -1,8 |
| HIST2H2AA | NM_003516 | histone 2, H2aa | 0,47 | -1,21 | 1,4 | -2,3 | -3,2 |
| HIST1H2AD | NM_021065 | histone 1, H2ad | 0,35 | -0,9 | 1,3 | -1,9 | -2,4 |
| HIST1HDAE | NM_021052 | histone 1, H2ae | 0,36 | -0,9 | 1 | -1,8 | -2,3 |
| HIST1H4H | NM_003543 | histone 1, H4h | 0,62 | -0,73 | 1,53 | -1,7 | -2,53 |

Taula 3: Resum dels gens amb una expressió diferencial més significatiu. Log_2 és el valor log_2 del nivell de canvi en l'expressió del gen del tractament pRK5-p19 comparat primer amb el vector buit pRK5, i després amb el tractament pRK5-p19mut en l'array de ESTs. * Log_2 és el valor log_2 del nivell de canvi en l'expressió del gen del tractament pRK5-p19mut comparat primer amb el vector buit pRK5, i després amb el tractament pRK5-p19 en l'array de ESTs. RT indica confirmació mitjançant PCR en Temps Real. WB indica confirmació mitjançant Western Blot.

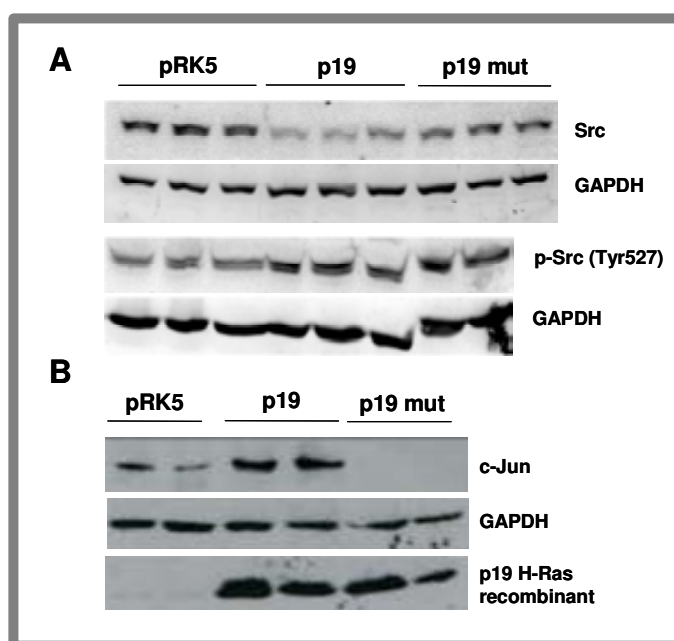
En primer lloc, observem que p19 induïx la transcripció del gen **Slit3** unes 2.8 vegades respecte les cèl·lules control. Aquesta activació es va revalidar mitjançant PCR en temps real utilitzant encebadors específics dissenyats amb el programa PrimerExpress 2.0. (la seqüència dels oligos, així com la longitud del fragment amplificat, es troben detallats en la taula 9 d'aquesta memòria). Com a gen control s'utilitzà el gen de la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH). Els resultats obtinguts ens mostraren un increment de 5 vegades quan sobreexpressessem p19, mentre

que aquest increment es veia reduït en el cas de la sobreexpressió de p19mut (observem només un increment de 3.8 vegades). Slit3 fou un dels primers gens utilitzats a l'hora d'estudiar el fenomen de l'*splicing* (Berget *et al.* 1977; Chow *et al.* 1977; Sharp 1994) i fa poc s'ha vist que és una proteïna reguladora de la motilitat cel·lular a través de l'activació de la via Rac/Cdc42, la qual inclou un intercanvi GTP/GDP (Tanno *et al.* 2007), tot enllaçant Slit3 en els processos de patogènesi del càncer (del Peso *et al.* 1997).

Un altre gen que es veu afectat per la regulació de p19 H-Ras és **c-Src**, ja que s'expressa uns 1.7 cops menys en presència d'alts nivells de p19. Aquests resultats els vam validar mitjançant anàlisis de Western Blot (figura 37A). La tirosina-cinasa Src participa en un ampli ventall de vies de senyalització que controlen la proliferació, diferenciació, adhesió i supervivència cel·lular (Abram *et al.* 2000), per tant la seva desregulació dóna lloc a processos oncogenics. Es coneix que c-Src és una de les proteïnes d'unió a RACK1, proteïna que inhibeix l'activitat cinasa de c-Src (Mamidipudi *et al.* 2004). A més a més, l'observació en els nostres assaigs de l'augment de la forma inactiva de Src (fosforilada en el residu Tyr527) quan sobreexpressem p19 (figura 37A) ens corrobora l'efecte de RACK1 sobre aquesta activitat cinasa. En aquest cas, però, el mutant també presenta un índex més elevat de p-Src (Tyr527), tot i que la relació de proteïna fosforilada respecte Src total és més baixa.

Fig. 37: Comprovació dels resultats de l'array mitjançant Western Blot.

A) Repressió de la proteïna Src durant sota la sobreexpressió de p19 H-Ras. Anàlisi en Western Blot on es detecta la proteïna Src total i la seva forma fosforilada (inactiva) en extractes proteics de cèl·lules HeLa transfectades transitòriament amb els vectors pRK5, pRK5-p19 i pRK5-p19mut. Els extractes foren obtinguts en 3 experiments independents. Mitjanes dels valors de quantificació respecte la GAPDH mitjançant el programa Multi Gauge V3.0. Src: pRK5=3,25; p19=1,16; p19mut= 1,9; p-Src: pRK5=1,59; p19=2,22; p19mut=2,36 **B) Inducció de la proteïna Jun sota la sobreexpressió de p19 H-Ras.** Anàlisi en Western Blot on es detecta la proteïna Jun total en extractes proteics de cèl·lules HeLa transfectades transitòriament amb els vectors pRK5, pRK5-p19 i pRK5-p19mut. Els extractes foren obtinguts en 2 experiments independents. En ambdós casos, es va detectar la proteïna GAPDH com a control intern.



En el nostre anàlisi de la resposta transcripcional del gen *c-H-ras* sota l'estímul de p19 o p19mut vam poder identificar dos grups de gens relacionats funcionalment: 1) proteïnes estructurals de la cromatina, i 2) proteïnes que pertanyen i/o regulen el complex de transcripció AP-1, com seria el cas de c-Jun, ATF3, TRIB3, i TXNIP. Dins del primer grup, cal remarcar que molts dels gens codificants d'histones inhibits per p19mut pertanyen al mateix *cluster* (locus 6p21.3), suggerint una regulació coordinada a nivell de transcripció. En el cas del complex AP-1, el gen **ATF3** codifica per un membre de la família de factors activadors de la transcripció/cAMP dependents (ATF/CREB) i és induït per diferents situacions d'estrès fisiològic (Liang *et al.* 1996). Quan sobreexpresssem p19mut observem una davallada de 2.6 vegades respecte el control, mentre que no veiem cap canvi en el cas de la sobreexpressió de p19 (aquesta davallada també fou confirmada per PCR en temps real, obtenint una bona concordança entre els resultats).

Una de les observacions més remarcables és la inhibició de **c-Jun** (amb un valor de -2.8) provocada per la sobreexpressió de p19mut. Prèviament el grup del doctor Lopez-Bergami havia demostrat que l'activació de c-Jun està regulada per RACK1 a través de la seva unió al complex RACK1-JNK (Lopez-Bergami *et al.* 2005). Al validar el nostre resultat mitjançant Western Blot, observem que la sobreexpressió de p19 incrementa els nivells proteics de c-Jun però en canvi p19mut disminueix els nivells de c-Jun per sota del nivell basal (figura 37B). Tal com havíem comentat anteriorment, no hem observat un increment de Jun ni JNK fosforilats en cèl·lules HeLa sobreexpressant p19, dada que ens indica que la presència d'alts nivells de c-Jun cel·lulars no s'ha de correlacionar forçosament amb una activació d'aquesta. De fet s'ha descrit la sobreexpressió del gen c-Jun sense un increment de la proteïna fosforilada en cèl·lules tumorals de pacients amb limfoma de Hodgkin (Mathas *et al.* 2002) i amb leucèmia mieloide aguda (Rangatia *et al.* 2003).

4. p19 regula l'expressió específica de miRNAs

L'anàlisi de la resposta transcripcional de cèl·lules HeLa sota la sobreexpressió de p19 ens va portar a creure que p19 podia regular l'expressió d'altres gens de forma indirecta. La llista d'estudis que demostren que els miRNAs tenen un paper crític en la iniciació i progressió del càncer augmenta cada dia, i s'ha vist que molts miRNAs mostren un patró d'expressió alterat en processos cancerígens (Voorhoeve *et al.* 2006). Aquesta observació fa dels miRNAs uns candidats força "atractius" com a reguladors post-transcripcionals de grups de gens. Com a exemple trobem el cas de la família de miRNAs *let-7*, els quals tenen com a diana els oncogenes Ras en càncers de fetge, o el cas de *miR-15a* i *miR-16-1*, els quals regulen Bcl2 en leucèmies limfoides cròniques (Negrini *et al.* 2008).

Per tant vam decidir analitzar l'expressió diferencial de miRNAs en col·laboració amb el grup del doctor George Adrian Calin (Liu *et al.* 2004). En aquest cas també vam decidir comparar els resultats obtinguts amb la sobreexpressió de p19 respecte el mutant (sempre validant-los respecte el control, el vector buit). Les dades del microarray s'han dipositat en el Microarray Bank www.ebi.ac.uk amb el número d'accés E-TABM-494. Concretament, en cèl·lules amb un alt nivell de p19 vam observar un increment en l'expressió dels següents miRNAs: *miR-342*, *miR-206*, *miR-330*, *miR-138* i *miR-99b* (taula 4), i molts d'ells tenien com a possibles dianes varis factors de *splicing*.

| miRNA | Nivell de Canvi | Gens diana per aquest miRNA |
|--------------------|-----------------|---|
| <i>hsa-miR-342</i> | 4.98 (*2.40) | BCL2L1, BCL2L2, CSK, FOSB, IBRDC2, MAP3K7IP2, RAP2B, RASA1, RASSF1, SF4, SLA |
| <i>hsa-miR-206</i> | 3.37 (*1.00) | ARHGAP21, CDK6, CDK9, DDX5, FOSB, JUND, MAP3K3, MET, MTSS1, RASA1, SFRS1, SFRS10, SFRS3, SFRS3, SFRS7, SFRS9, SFRS7 |
| <i>mmu-miR-330</i> | 2.07 (*1.00) | CDC42, CDK11, DICER1, E2F1, GAS7, MAP2K1, PIK3R1, PRKCA/PKCα, PRKCB1/PKCβ 1, PRKCE/PKCϵ, SFRS1, SFRS10, SFRS2, SFRS7, SFRS8, SFRS9, SLITRK4, SNRPD3 |
| <i>mmu-miR-138</i> | 2.61 (*1.60) | AIFM2, CCND3, CCNE1, DDX3X, MAP2K7, TCTP, MAPK4, MYBBP1A, TP53BP2, TP53INP1, TP53INP2, TP73L/p63 |
| <i>hsa-miR-99b</i> | 2.18 (*1.00) | MYCBP2, RalGPS1A |

Taula 4: miRNAs regulats quan sobreexpressem p19 H-Ras. (*) indica el valor obtingut en les mostres p19mut. Els gens diana estan descrits en <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences> utilitzant els programes MIRANDA, TARGETSCAN i PICTAR-VERT.

Tanmateix ens va sorprendre la resposta quan sobreexpressem el mutant, ja que aquest indueix l'expressió de 21 miRNAs que no es veuen alterats en el cas de p19: *miR-145*, *miR-377*, *miR-294*, *miR-373**, *miR-302*, *miR-196b*, *miR-185*, *miR-342*, *miR-213*, *miR-147*, *miR-219*, *miR-361*, *miR-449*, *miR-32*, *miR-16*, *miR-138*, *miR-383*, *miR-30c*, *miR-331* i *miR-122a* (taula 5).

| miRNA | Nivell de Canvi | Gens diana per aquest miRNA |
|---------------------|-----------------|---|
| <i>mmu-miR-145</i> | 4.80 | CDK6, MAP3K7IP3, BCL11B, RAB15, RAP2B, MDM1 |
| <i>mmu-miR-377</i> | 3.90 | ARHGAP21, , BCL2L1, , H3F3A, HRAS, MADD, MAP4K5, MARK3, PPARA, PRKCA, PRKCM, RAB1A, RABGAP1, RAP2A, RHOTB2, SFRS1, TP73L |
| <i>mmu-miR-294</i> | 3.60 | MLLT6, PAK7 |
| <i>hsa-miR-373*</i> | 3.50 | ARHGEF10, ARHGEF18, ARHGEF5, ARID4B, BCL2L11, BMF, CCND2, CDK11, DDX3X, DHX40, FAIM, H3F3A, MAP3K11, MAPK13, MAPK9, MARK1, MARK4, MYST3, PIK3CA, PRKCB1, RAB11A, RAB22A, RAB6A, RAB7, RABGAP1, RASSF2, RBBP7, RGL1, SLITRK3, TP53INP1, TXNIP |
| <i>mmu-miR-302</i> | 2.80 | BCL2L11, E2F2, MAP3K14, MAP3K2, MARK4, PIK3CA, PRKCB1, RAB11A, RAB14, RAB22A, RAB6A, RABGAP1, RALGDS, RAPH1, RASSF2, SLITRK3, SUV39H1, TP53INP1, TXNIP |
| <i>mmu-miR-196b</i> | 2.50 | DICER1, GAS7, MAP4K3, NRAS, RAB2L, RAB39B, RASSF3 |
| <i>hsa-miR-185</i> | 2.40 | ARHGEF1, ARHGEF4, ARHGEF6, BAK1, BMF, CASP14, CDC42, CTSK, DDX6, EPHB2, HDAC4, HDAC5, JUND, MADD, PPARA, RAB14, RAB15, RAB35, RAB37, RAB7, RHOA, RHOG, RHOG, RHOT1, RSU1, SF1, SFRS3, TBRG4 |
| <i>hsa-miR-342</i> | 2.40 | FOSB, CDK6, FOXK2, E2F3, SRF, MAP3K1, MDM1, MYCBP, FOXP1, CDK6, MAP3K7IP3 |
| <i>hsa-miR-213</i> | 2.30 | SFRS1, TFAP2B |
| <i>hsa-miR-147</i> | 2.00 | RAB6B, MAP3K7IP3 |
| <i>hsa-miR-219</i> | 2.00 | FOXJ3 |
| <i>hsa-miR-361</i> | 2.00 | BCLAF1, ERG, SP1, YWHAB |
| <i>mmu-miR-449</i> | 1.80 | NOTCH1, DDX17, ARHGAP26, E2F3, CCNE2, RAB43, RRAS, FOXP1 |
| <i>mmu-miR-32</i> | 1.80 | BCL11A, RAB14, DDX3Y, BCL11B, BCL2L11, MAP2K4, MAP3K1 |
| <i>mmu-miR-136</i> | 1.70 | PTEN, KRAS, MAP2K4, RABGAP1L, CDC42SE2, MDM1, MAP3K7, MAP4K3, PRKCQ, RAB1A, CAPRIN1, CDK6, PARP16, MAP3K7IP3 |
| <i>mmu-miR-138</i> | 1.70 | FOXP4, MYB, MAPKAPK3, FOXP1 |
| <i>mmu-miR-383</i> | 1.70 | RAPH1 |
| <i>hsa-miR-30c</i> | 1.70 | PRKACB, MAP3K7IP3, RASSF2, RAB15 |
| <i>mmu-miR-331</i> | 1.60 | KSR1, MAP2K7 |
| <i>hsa-miR-122a</i> | 1.60 | MAP3K12, CCNG1, MAP3K2, DICER1 |

Taula 5: miRNAs regulats quan sobreexpressem p19mut.

Ens va interessar especialment l'alteració de l'expressió de *miR-206*, ja que recentment el grup del Dr. Massagué ha observat una forta inhibició transcripcional d'aquest en varies línies humanes de cèl·lules metastàtiques, i ha demostrat l'habilitat de suprimir la metastasi de varis òrgans en casos de càncer de pit tot restablint la seva

expressió (Tavazoie *et al.* 2008). Així doncs vam procedir a analitzar el cicle cel·lular de cèl·lules HeLa amb una expressió reduïda de *miR-206*, conjuntament amb la sobreexpressió de la proteïna p19. Per fer-ho vam realitzar transfeccions transitòries de cèl·lules HeLa utilitzant els vectors pEGFP-p19 i pSUPER-anti-*miR-206*.

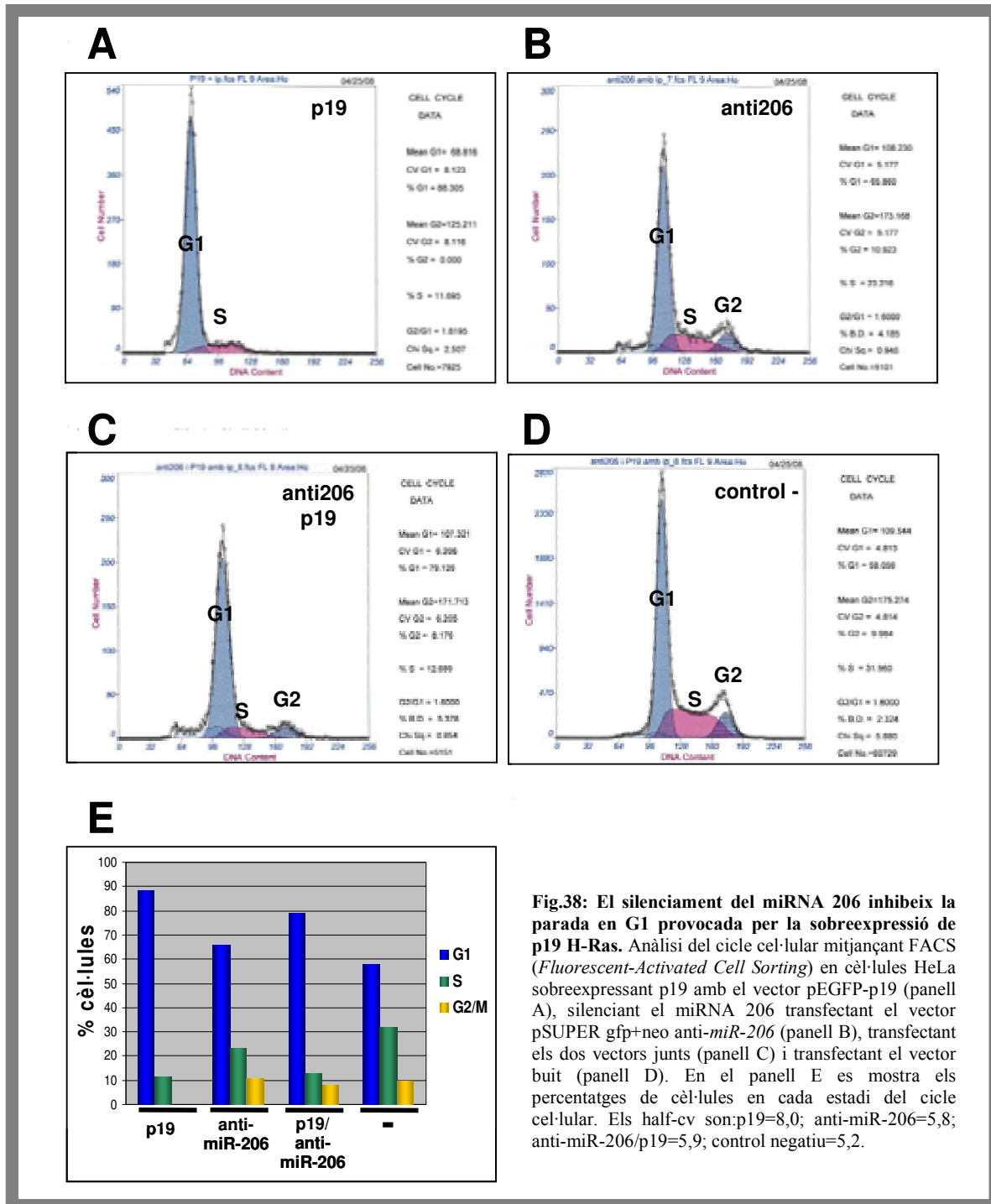


Fig.38: El silenciament del miRNA 206 inhibeix la parada en G1 provocada per la sobreexpressió de p19 H-Ras. Anàlisi del cicle cel·lular mitjançant FACS (Fluorescent-Activated Cell Sorting) en cèl·lules HeLa sobreexpressant p19 amb el vector pEGFP-p19 (panell A), silenciant el miRNA 206 transfectant el vector pSUPER gfp+neo anti-*miR-206* (panell B), transfectant els dos vectors junts (panell C) i transfectant el vector buit (panell D). En el panell E es mostra els percentatges de cèl·lules en cada estadi del cicle cel·lular. Els half-cv són: p19=8,0; anti-miR-206=5,8; anti-miR-206/p19=5,9; control negatiu=5,2.

Tal com esperàvem, la inhibició de *miR-206* suprimeix la capacitat de p19 d'incrementar el percentatge de cèl·lules en G1, dada que ens suggereix que p19 regula la transició de G1 a S mitjançant *miR-206* (figura 38). L'increment del *miR-206* sota la sobreexpressió de p19 s'ha comprovat mitjançant assaigs de PCR en Temps Real, observant un increment de 2 cops en els nivells de *miR-206* quan sobreexpressem p19 H-Ras.

5. Efecte sobre l'índex de *splicing* del gen *c-H-ras*

Anteriorment hem esmentat que varis dels miRNAs que veien incrementada la seva expressió en presència de p19 podrien regular el procés de *splicing*, ja que entre les dianes d'aquests miRNAs trobem diferents factors de *splicing* com algunes proteïnes SR, la proteïna SF4 o la p68 RNA helicasa (DDX5). Per altra banda, el nostre grup havia realitzat una estimació de la rellevància del *splicing* alternatiu de *c-H-ras* en la seva expressió, tot quantificant l'abundància de les dues isoformes de *c-H-ras* en sistemes i teixits cel·lulars diferents (Guil *et al.* 2003a), i vam procedir a investigar si els mateixos productes del gen *c-H-ras* podien regular el seu propi *splicing*.

Les proteïnes SR pertanyen a una família ben caracteritzada de proteïnes involucrades en el procés de *splicing* constitutiu i alternatiu (Fu 1995; Tacke *et al.* 1999). El seu mecanisme d'acció implica la unió d'algunes seqüències de RNA (normalment encebadors exònics) a través dels seus motius de reconeixement de RNA i del reclutament d'altres factors de *splicing*, tot estimulant l'eficiència de *splicing* de llocs adjacents SS dèbils (Achsel *et al.* 1996; Gallego *et al.* 1997; Hertel *et al.* 1998; Sun *et al.* 1993). A més a més, les proteïnes SR també poden actuar de forma independent a la unió a RNA, tot promovent l'ancoratge de factors generals de *splicing* en la xarxa d'interaccions proteïna-proteïna que formen part del *spliceosome* madur (Blencowe *et al.* 1998), i el nostre grup havia descrit que les proteïnes SR (SFRs) estimulen la inclusió de l'exó alternatiu IDX i, conseqüentment, l'expressió de p19 (Guil *et al.* 2003b). Estudis més recents han ampliat la informació que teníem del procés de regulació del *splicing* alternatiu del gen *c-H-ras* tot evidenciant com la proteïna p68

RNA helicasa (DDX5) inhibeix l'expressió de p19 i redueix la inclusió, mentre que altres factors com SC-35 (SFRS2) i SRp40 (SFRS5) activen considerablement la inclusió de IDX *in vivo* (Guil *et al.* 2003b). La proteïna p68 RNA helicasa forma part d'una gran família de proteïnes altament conservades, anomenades *DExH/D box of putative RNA helicases*, la funció principal de les quals és separar les dobles cadenes de RNA. En concret, s'ha vist que p68 RNA helicasa és essencial per al *splicing* del pre-mRNA *in-vitro* (Liu 2002).

Mitjançant les bases de dades MIRANDA, TARGETSCAN i PICTAR-VERT direccionades a <http://microsarna.sanger.ac.uk/sequences>, vam identificar les possibles dianes dels miRNAs estudiats. Entre d'altres, SC-35 i altres proteïnes SR com UsnRNP són diana de mmu-miR-330; SF4 és diana de hsa-miR-342, i la proteïna p68 RNA helicasa és diana de hsa-miR-206 (taules 13 i 14 annexos). Amb l'objectiu de provar si la sobreexpressió de p19 afectava el propi *splicing* alternatiu del gen H-*ras*, vam dissenyar un experiment de PCR en Temps Real per quantificar la relació de còpies de mRNA p21 respecte el de H-Ras endogen total. Per fer-ho vam emprar dues sondes TaqMan dirigides contra la frontera dels exons E4A-E4B del gen c-H-*ras* (per a detectar les còpies de mRNA H-Ras endogen totals) i contra la frontera dels exons E3-E4A (per a detectar les còpies de mRNA p21), i s'utilitzaren cèl·lules HeLa sobreexpressant p19 de forma transitòria (figura 39).

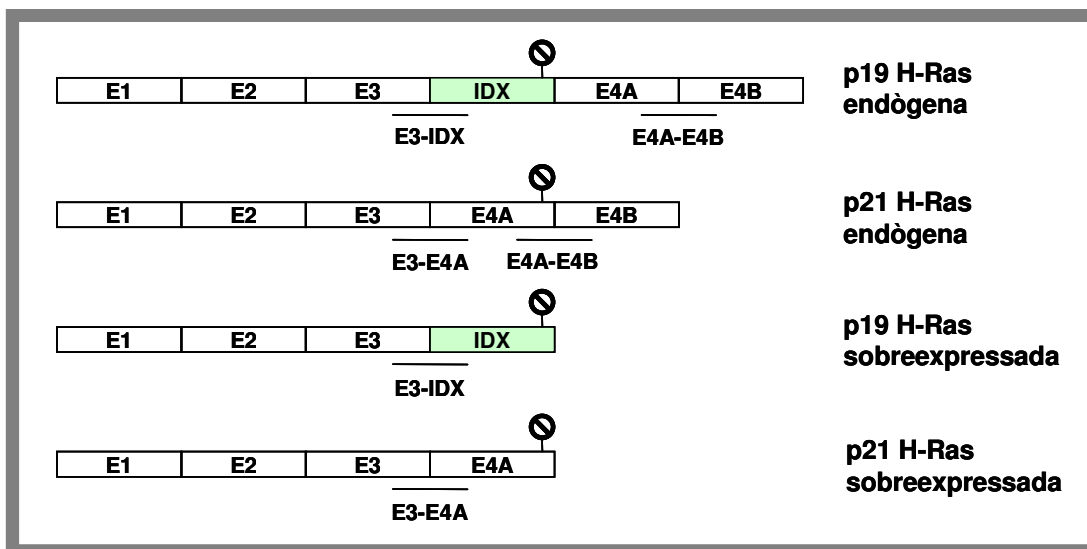


Fig. 39: Esquema de les sondes TaqMan utilitzades en l'experiment de PCR en Temps Real per a determinar els nivells de mRNA p19 i p21 endògens, i de l'expressió de mRNA H-Ras total. E3-IDX, E3-E4A i E3-E4B reconeixen els mRNAs p19 H-Ras endògen, p21 H-Ras endògen i ambdós, respectivament. Les sondes E3-E4A i E4A-E4B es van utilitzar en els assajos sobreexpressant p19, i les sondes E3-IDX i E4A-E4B en els assajos sobreexpressant el mutant p21Q61L.

Com es pot observar a la figura 40A, la sobreexpressió de p19 incrementa els nivells de missatger H-Ras total i de p21 endògens unes 7,25 i 5,4 vegades respectivament, mentre que quan sobreexpressem el mutant aquesta activació desapareix, tot retornant als nivells basals d'expressió. Amb aquestes dades vam calcular l'índex de *splicing*, o el que és el mateix, el percentatge de *splicing* alternatiu que dona lloc a mRNA p21 respecte el total de mRNAs generats a partir del gen *c-H-ras* (E3-E4A/E4A-E4B), i vam comprovar que aquest índex era menor en cèl·lules sobreexpressant p19 (figura 40B), però en canvi incrementava un 10% respecte el control negatiu en el cas de la sobreexpressió de p19mut.

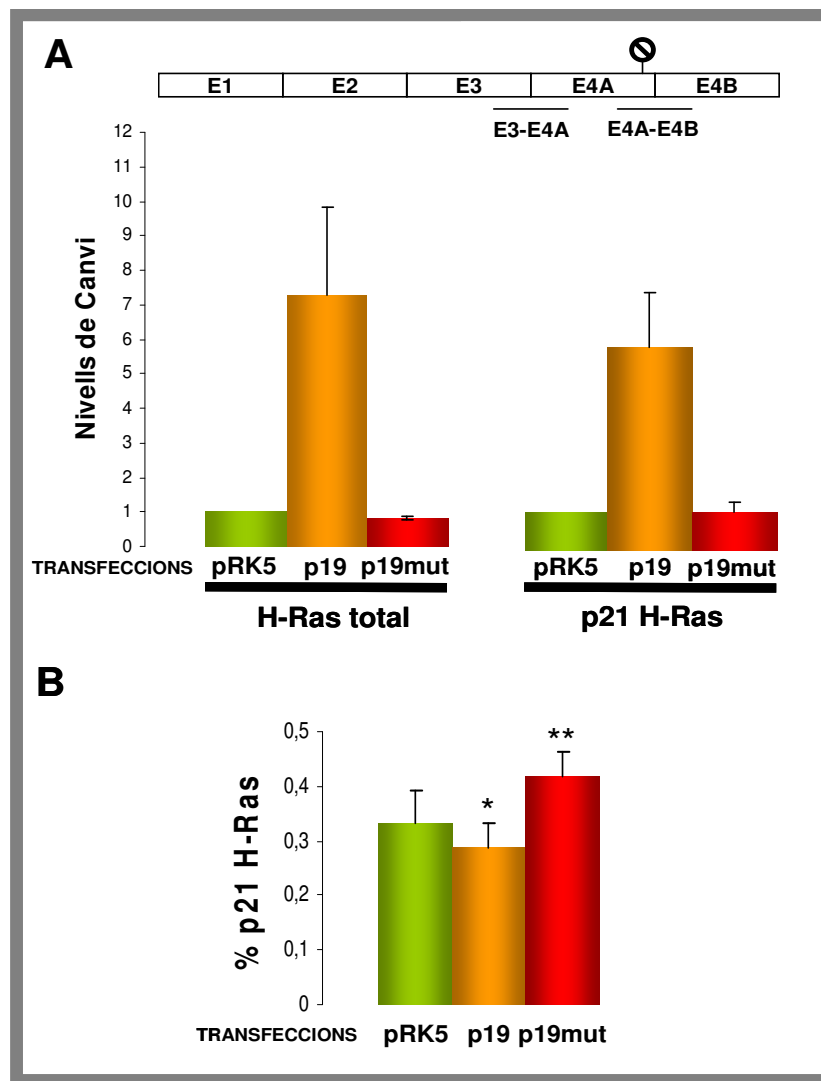


Fig. 40: p19 regula el seu propi *splicing* alternatiu. **A)** Quantificació dels nivells de mRNA de proteïna H-Ras total (TaqMan E4A-E4B) i p21 (TaqMan E3-E4A) en cèl·lules HeLa sobreexpressant p19 o p19mut. S'han realitzat tres experiments independents per triplicat i s'han calculat les desviacions estàndard. Els valors del tractament amb el vector sol s'han fixat en 1. **B)** Percentatge de *splicing* alternatiu p21/H-Ras total (TaqMan E3-E4A/TaqMan E4A-E4B). Aquest s'ha obtingut de cada experiment individual de la fig. 39A. (n=3, * p<0,07; ** p<0,08).

Aquests resultats ens porten a la conclusió de que el mutant podria variar els nivells de p19:p21 regulant el *splicing* alternatiu del gen *c-H-ras*, tot afavorint l'eficiència en l'eliminació de l'exó IDX per donar lloc a molècules mRNA p21; en canvi p19 actuaria directament regulant l'expressió total de H-Ras, però no variaria de forma significativa els nivells p19:p21, ja que aquest índex es mantindria. A partir d'aquí, també vam voler estudiar l'efecte d'un mutant de p21 H-Ras sobre l'índex de *splicing* del gen. El mutant p21(Q61L), present en línies cel·lulars tumorals, és un activador constitutiu de la via de senyalització Ras i està considerat com un dels mutants activadors de p21 més potents, ja que aquesta mutació disminueix l'activitat GTPasa i incrementa l'intercanvi GDP/GTP (Lowy *et al.* 1993). Així doncs, vam realitzar l'experiment anterior però aquest cop utilitzant el vector pRK5-p21(Q61L) per transfectar cèl·lules HeLa, i les sondes TaqMan E3-IDX (dirigida contra la frontera dels exons E3 i IDX per a detectar les còpies de mRNA p19) i E4A-E4B. A la figura 41A es mostren els resultats en termes relatius.

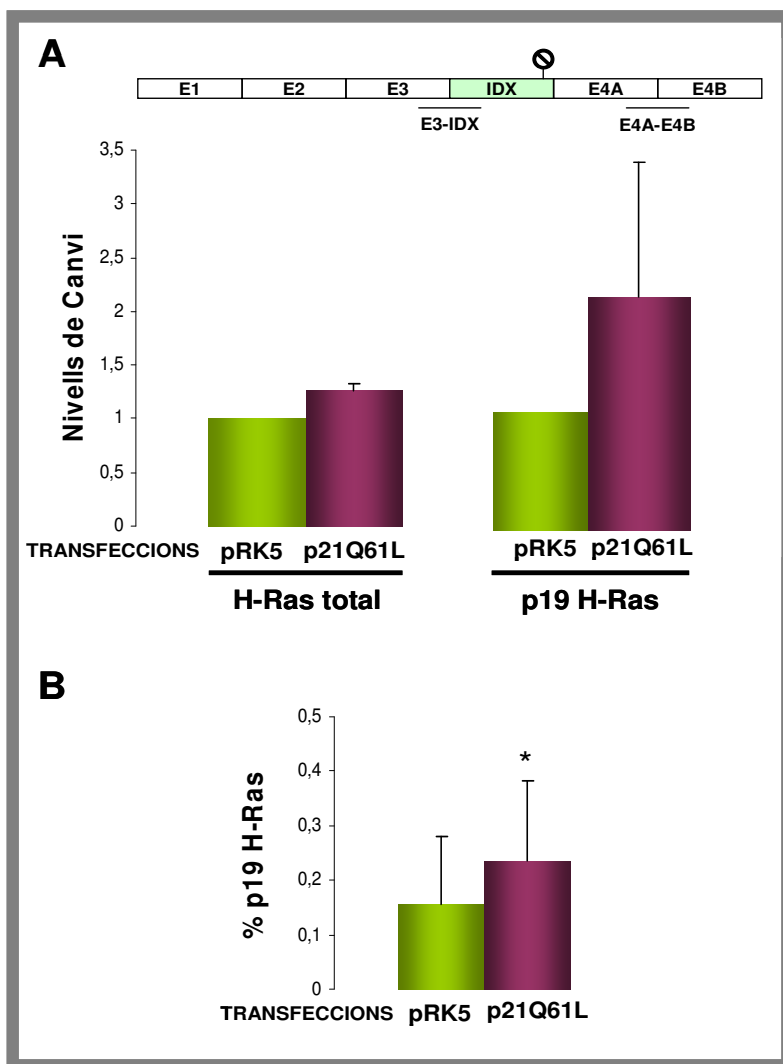


Fig. 41: El mutant p21Q61L afavoreix la inclusió de IDX.

A) Quantificació dels nivells de mRNA de proteïna H-Ras total (TaqMan E4A-E4B) i p19 (TaqMan E3-IDX) en cèl·lules HeLa sobreexpressant p21Q61L. S'han realitzat tres experiments independents per triplicat. Els valors del tractament amb el vector sol s'ha fixat en 1.

B) Percentatge de *splicing* alternatiu p19/H-Ras total (TaqMan E3-IDX/TaqMan E4A-E4B). Aquest s'ha obtingut de cada experiment individual de la fig. 40A, els valors del tractament amb el vector sol s'ha fixat en 15% i s'han calculat les desviacions estàndard (n=3, * p<0.09).

La sobreexpressió de p21(Q61L) incrementa el doble l'expressió de p19 endògena, mentre que els nivells de H-Ras totals no varien significativament. D'altra banda, al panell B podem veure que els alts nivells de p19 endògena són deguts a l'increment en l'índex de *splicing* (%p19/H-Ras total) en presència de p21(Q61L), resultat que ens indica que aquest mutant activador pot alterar tant l'expressió de p19 com el *splicing* alternatiu del gen *c-H-ras*. D'aquesta manera, els resultats anteriors semblen indicar que p19 actuaria en un mecanisme resposta per a compensar l'activació permanent de p21 dins la cèl·lula.

6. Regulació de la via de senyalització TSC

Fins ara, els nostres anàlisis mitjançant diferents tipus d'arrays ens havien aportat una font d'informació considerable basada en la resposta transcripcional del gen *c-H-ras* sota diferents estímuls. Però paral·lelament vam decidir analitzar el perfil proteòmic de cèl·lules HeLa sota les mateixes condicions, les quals comportaven una sobreexpressió transitòria de la proteïna p19 H-Ras. Per fer-ho, vam realitzar un estudi proteòmic mitjançant anàlisis electroforètics bidimensionals amb extractes cel·lulars de cèl·lules HeLa transfectades transitòriament amb els vectors pRK5 (control negatiu) o pRK5-p19. Vam procedir a microseqüenciar els spots corresponents a proteïnes amb un patró diferencial respecte el control, i vam identificar quatre proteïnes l'expressió de les quals es veu incrementada en presència de p19 H-Ras: **TCTP** (*Translationally Controlled Tumor Protein*) (figura 42A), la cinasa **nm23-H1** (el factor nm23 d'inhibició de metàstasi) (figura 42B), la **profilina 1** (inhibidor de la polimerització de l'actina) i **PSMB6** (unitat del proteosoma). A més a més, vam confirmar l'abundància de p19 en la mostra positiva microseqüenciant l'spot corresponent a la proteïna p19, i els seus pèptids digerits van confirmar que pertanyien a la família H-Ras. D'altra banda, en els anàlisis de Western Blot només vam poder confirmar l'activació de TCTP (figura 43A), mentre que en el cas de les altres proteïnes no vam observar diferències significatives entre els tractaments (figura 59 annexes).

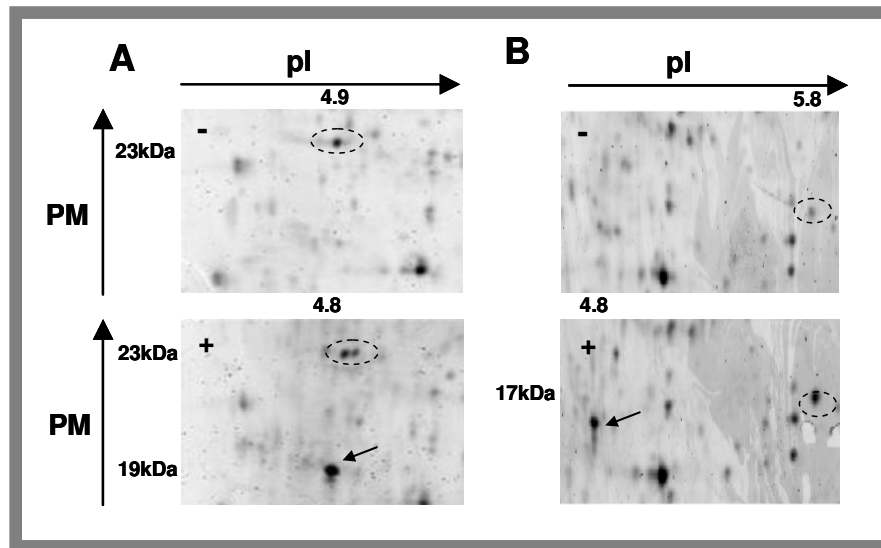


Fig. 42: Gel 2D tenyit on es mostren alguns dels spots seqüenciats. A) Gel on detectem la presència de TCTP. Control negatiu, extractes proteics de cèl·lules HeLa transfectades amb el vector buit. El cercle marca el spot corresponent a TCTP (pI 4.9 i PM 23kDa), i la fletxa mostra el spot corresponent a p19 sobreexpressada (pI 4.8 i PM 19 kDa), els quals es van comprovar mitjançant microseqüenciació. **B)** Gels on detectem la presència de nm23-H1. Extractes proteics de cèl·lules HeLa sobreexpressant p19. El cercle marca el spot corresponent a nm23-H1 (pI 5.8 i PM 17kDa) i la fletxa mostra el spot corresponent a p19 sobreexpressada. Tots els spots es van comprovar mitjançant microseqüenciació. *La proteïna p19 corre de forma anòmala, com es pot comprovar al panell B+.

TCTP és una proteïna altament conservada en tots els organismes eucariotes, i la seva expressió és estrictament regulada tant a nivell transcripcional i traduccional per un ampli espectre d'estímuls extracel·lulars com poden ser els factors de creixement (Bommer *et al.* 2004). La inhibició de la seva expressió provoca la supressió del fenotip maligne (reversió tumoral) i una reorganització cel·lular. Per tant, la disminució del nivell de TCTP representa un factor crític a l'hora de permetre a la cèl·lula revertir (Tuynder *et al.* 2002). Per altra banda, una sobreexpressió de TCTP en cèl·lules mamàries provoca creixement lent i retard en la progressió del cicle cel·lular (Gachet *et al.* 1999). Estudis recents han demostrat que TCTP pot tenir una activitat GEF (*guanine nucleotide exchange factors*) envers Rheb (Hsu *et al.* 2007), una proteïna unidora de GTP de la superfamília *Ras-like GTPases*, present de forma activa en la via de senyalització cel·lular TSC. Un dels aspectes crucials d'aquesta via és la molècula Akt, donat que la presència d'alts nivells d'Akt activada inhibeix el dímer format per TSC2/TSC1, el qual exerceix una activitat GAP sobre la proteïna Rheb, tot permetent l'activació de mTOR (Bhaskar *et al.* 2007). D'altra banda, l'activació de mTOR és important per a la secreció del factor de creixement vascular endotelial (VEGF), el qual és un important factor pro-oncogen que incrementa el creixement dels vasos sanguinis contigus als tumors (Treins *et al.* 2002).

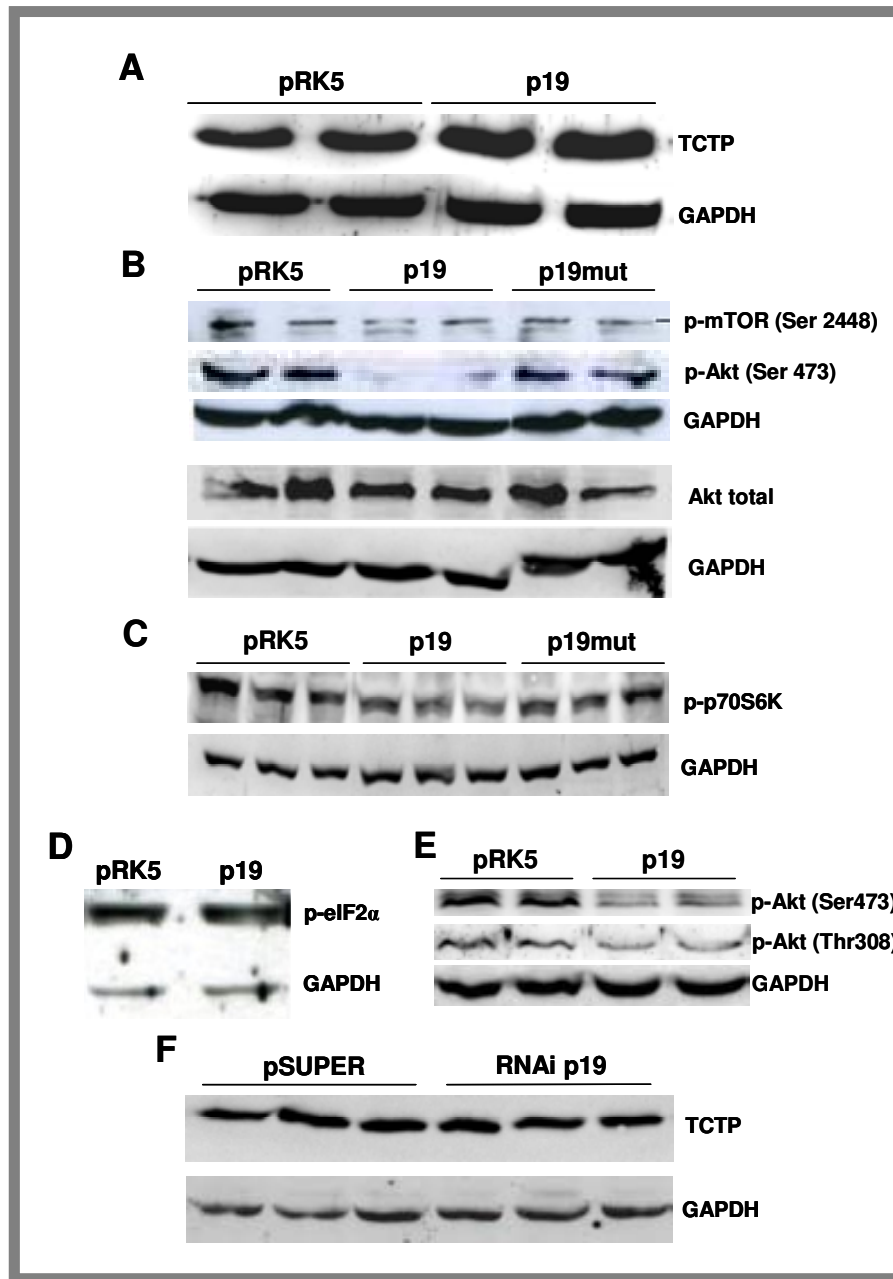


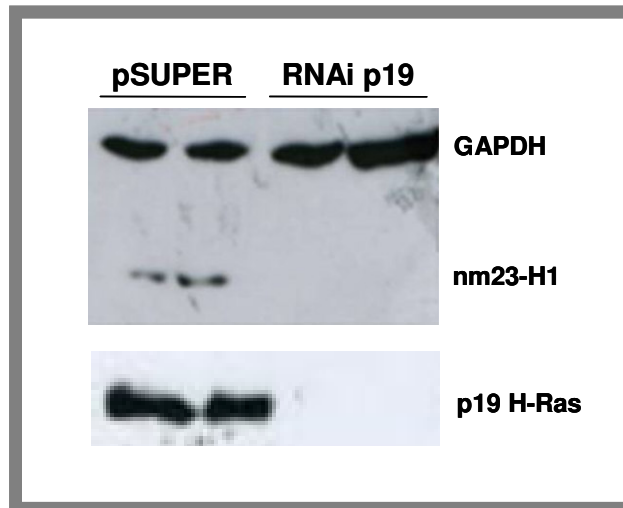
Fig. 43: Regulació de la via de senyalització TCTP. **A)** Western Blot amb anticòs anti-TCTP sobre extractes proteics de cèl·lules HeLa transfectades amb el vector buit (carrils pRK5, control negatiu) o sobreexpressant p19 (carrils p19), en dos experiments independents. Mitjanes dels valors de quantificació respecte la GAPDH mitjançant el programa Multi Gauge V3.0: pRK5=5,93; p19=9,5 **B)** Western Blot amb anticossos anti-p-mTOR (Ser2448), anti-p-Akt (Ser473) i anti-Akt sobre extractes proteics de cèl·lules HeLa transfectades amb el vector buit (pRK5, control negatiu), sobreexpressant p19 o p19mut, en dos experiments independents. **C)** Western Blot anti-p70S6K sobre extractes proteics de cèl·lules HeLa transfectades amb el vector buit (pRK5, control negatiu), sobreexpressant p19 o p19mut, en tres experiments independents. Mitjanes dels valors de quantificació respecte la GAPDH mitjançant el programa Multi Gauge V3.0. p-p70S6K: pRK5=5,43; p19=2,6; p19mut=3,5 **D)** Western Blot amb anticossos anti-p-eIF2α sobre extractes proteics de cèl·lules HeLa transfectades amb el vector buit (pRK5, control negatiu) o sobreexpressant p19. **E)** Western Blot amb anticossos anti-p-Akt (Ser473) i anti-p-Akt (Thr308) sobre extractes proteics de cèl·lules HeLa transfectades amb el vector buit (pRK5, control negatiu) o sobreexpressant p19, en dos experiments independents. Mitjanes dels valors de quantificació respecte la GAPDH mitjançant el programa Multi Gauge V3.0. p-Akt (Thr308): pRK5=1,13; p19=0,54; p-Akt (Ser473): pRK5=3,7; p19=2. **F)** Western Blot amb anticòs anti-TCTP sobre extractes proteics de cèl·lules HeLa on prèviament hem silenciat p19 H-Ras, en tres experiments independents. *En tots els experiments s'ha utilitzat GAPDH com a control de càrrega intern.

Així doncs, vam preguntar-nos si p19 tenia efectes sobre els nivells d'activació d'Akt, comprovant que la sobreexpressió de p19 inhibeix la fosforilació d'Akt en ambdós residus Ser473 i Thr308 (figura 43B i E), i també inhibeix el factor p70S6K (la fosforilació de la qual vé regulada per mTOR) (figura 43E)(Nojima *et al.* 2003), ja que els seus nivells de fosforilació són menors en cèl·lules sobreexpressant p19 H-Ras (figura 43C). Tot i això, no vam obtenir resultats conclusius a l'analitzar els nivells de fosforilació de mTOR en la Ser2448, potser degut a la baixa especificitat de l'anticòs utilitzat (figura 43B).

En canvi, s'ha vist que nivells alts de mRNA TCTP poden activar un mecanisme de defensa viral, l'activació induïble per interferó mitjançada per la proteïna cinasa PKR, com a resposta a l'estructura secundària intrínseca dsRNA TCTP (Bommer *et al.* 2002). La proteïna PKR (també anomenada eIF2 α cinasa) és un supressor tumoral potencial, i està involucrada en vies de senyalització que regulen varis processos cel·lulars com el creixement i la diferenciació cel·lular, la resposta a l'estrès i l'apoptosi (Tan *et al.* 1999). Per tant, el nostre següent pas fou investigar si l'increment en l'expressió de TCTP era suficient per activar PKR, i la nostra estratègia va ser estudiar la fosforilació d'un dels membres de la seva cascada de senyalització cel·lular. Com es veu a la figura 43D, la sobreexpressió de p19 H-Ras no sembla activar la cinasa PKR induïble per dsRNA, ja que no observem la hiperfosforilació del factor eIF2 α , resultat que ens indica que l'increment de TCTP no és un estímul suficient per activar PKR. Aquesta dada es veu reforçada per la observació de la disminució de p-ERK1/2 en cèl·lules *knock-down* per a p19 H-Ras (figura 28B) sense afectar significativament la fosforilació de JNK ni els nivells proteics de TCTP (figures 28B i 43F), confirmant-nos el paper regulador de p19 H-Ras en la via TSC. Addicionalment, vam realitzar experiments de PCR en temps real per comprovar que la RNAi estava dirigida contra les molècules de p19 de forma específica. Les dades obtingudes ens mostraven una davallada del 60% en els nivells de mRNA p19 (sonda E3-IDX) mentre que els nivells de mRNA p21 (sonda E3-E4A) no mostraven cap variació significativa, tot corroborant la direccionalitat de la RNAi realitzada.

Donada la regulació de l'expressió de varis gens involucrats en la metàstasi per part de p19 H-Ras (taula 3), i la presència de la cinasa nm23-H1, un important marcador de metàstasi activat per p53 (Rahman-Roblick *et al.* 2007) en el patró proteic de p19 observat mitjançant els gels 2-D, vam procedir a analitzar si nm23-H1 era un possible candidat a ser regulat per la proteïna p19. Per això es va dur a terme anàlisis de Western Blot per observar l'efecte tant de la sobreexpressió com del silenciament de p19 en els nivells de nm23-H1. Tal com hem comentat abans, no ens va ser possible observar l'increment de nm23-H1 mitjançant Western Blot, però sí que vam notar una gran davallada en els nivells proteics de nm23-H1 al realitzar la RNAi de p19 H-Ras (figura 44A), reforçant-nos la idea de la possible funció de p19 com a factor de protecció de la metàstasi.

Fig. 44: El silenciament de p19 provoca una davallada en els nivells cel·lulars de nm23-H1.
A) Western Blot detectant els nivells de nm23-H1 en extractes cel·lulars totals de cèl·lules HeLa transfectades transitòriament amb els vectors pSUPER o pSUPER RNAi p19. Els extractes proteïcs es van obtenir en dos experiments independents. Es va utilitzar la GAPDH com a control intern.



DISCUSSION

El protooncogen *c-H-ras* és el un dels membres de la família Ras que, juntament amb *K-ras*, multiplica el seu potencial genètic donant lloc a dues proteïnes amb funcions diferents però complementàries a l'hora de regular la progressió cel·lular. Aquest fenomen es dona mitjançant el procés anomenat *splicing* alternatiu, un dels principals mecanismes de què disposen les cèl·lules eucariotes per expandir i diversificar el repertori de funcions proteiques dins la limitació del genoma cel·lular. I en el cas de *c-H-ras*, els nivells de la forma alternativa són molt més elevats que en el cas de *K-ras*, assenyalant importants implicacions biològiques.

Tradicionalment, les proteïnes Ras s'han descrit com a GTPases que alternen entre una forma unida a GDP inactiva i una conformació activa unida a GTP, i que són capaces de regular varies respostes cel·lulars com la proliferació, la diferenciació o el creixement cel·lular. En canvi p19 H-Ras no mostra aquesta activitat d'unió a GTP, tot suggerint mecanismes força diferents a l'hora d'actuar a nivell cel·lular. Com a tall d'exemple, no es localitza a la membrana plasmàtica com l'altra forma codificant del gen *c-H-ras*, p21, degut a la pèrdua de l'exó E4A que conté el motiu CAAX. Aquesta podria ser la raó per la qual no observem interacció entre p19 i diferents efectors coneguts de p21, descartant la teoria d'una possible competició citoplasmàtica entre p19 i p21. En aquest treball hem iniciat l'estudi de les funcions de p19 H-Ras i els processos cel·lulars on intervé, per intentar donar una visió global de la informació funcional per la qual codifica el gen *c-H-ras*.

La figura 45 presenta un nou model de la funció de p19 H-Ras en el qual, tal com es demostra en aquest estudi, les interaccions p19-RACK1 i p19-p73 juguen un paper central en la regulació dels processos cel·lulars on intervé p19. Després de comprovar la col·localització cel·lular de p19 H-Ras i RACK1 mitjançant experiments d'immunofluorescència i FRET, i donat que RACK1 és una proteïna que participa en la senyalització cel·lular via PKC, vam procedir a estudiar quin efecte podia tenir la unió p19-RACK1 sobre l'activitat d'aquesta. Les nostres dades ens han mostrat que p19 activa PKC ja sigui a través del seu paper en la unió RACK1-PKC tot formant un complex proteic multimèric, o actuant directament sobre la proteïna PKC soluble. A més a més, l'observació de la col·localització de PKC β II i p19 H-Ras en la zona perinuclear, juntament amb la col·localització RACK1-PKC en la mateixa zona (Lopez-Bergami *et al.* 2005) ens reforça aquesta hipòtesi.

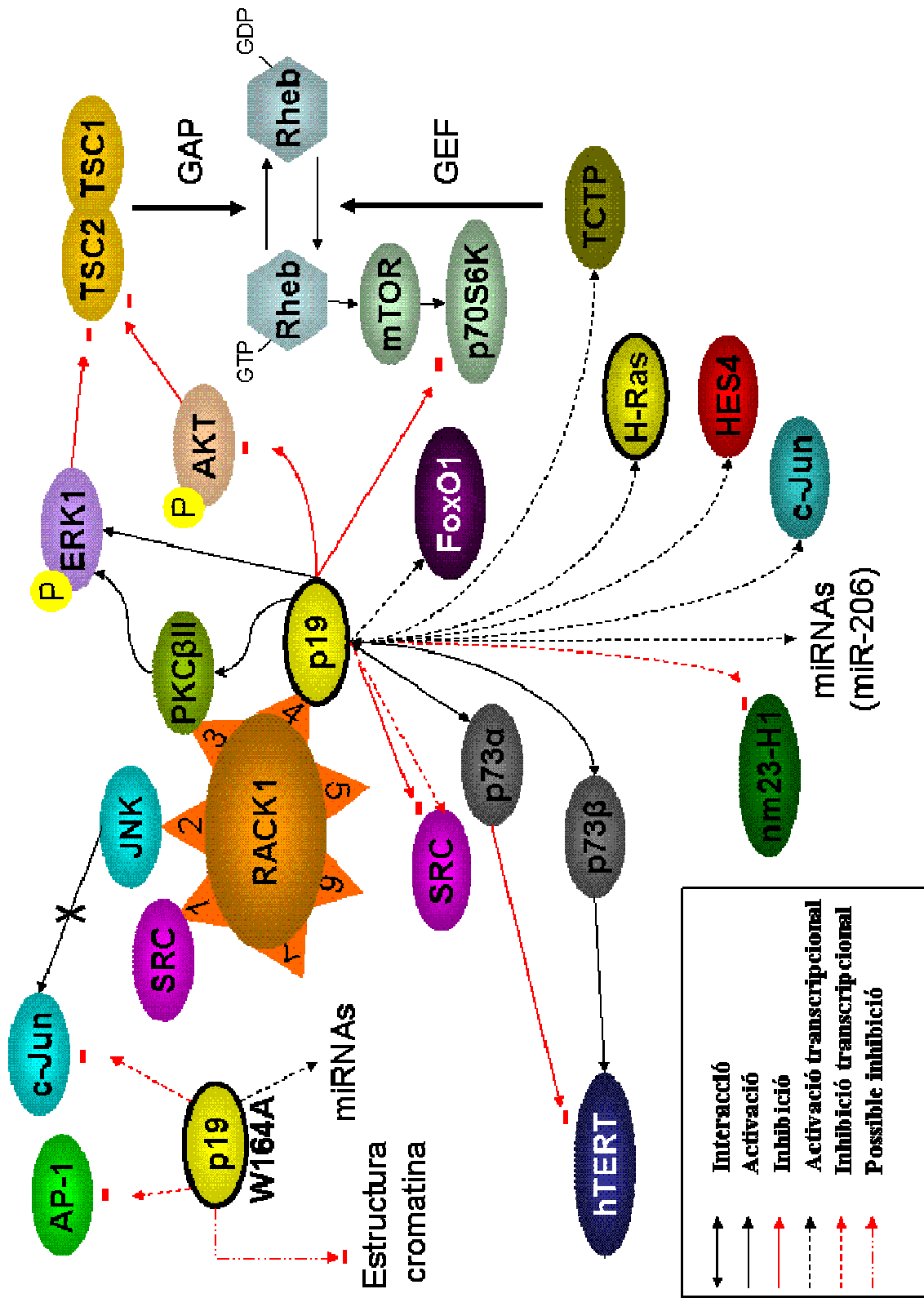


Fig. 45: Vies de senyalització regulades per p19 H-Ras

Al mateix temps, hem aprofundit en l'estudi de la interacció entre RACK1 i p19 H-Ras tot realitzant assaigs de doble-híbrid en llevat amb variants de p19 que contenen mutacions puntuals descrites en els gens *ras* amb propietats transformants. Tal com hem comentat en la introducció, RACK1 és una proteïna de la família de proteïnes adaptadores del senyal anomenades RACKs (*receptors for activated C-kinase*) que participa en la senyalització cel·lular via PKC (proteïna cinasa C). Detectàrem que l'aminoàcid W164 és essencial per a la unió de p19 i RACK1, i per tant vam creure que aquesta zona de la seqüència de p19 H-Ras també seria crítica per a l'activació de PKC. Els nostres assaigs d'activitat PKC ens van confirmar les nostres suposicions, ja que observem que l'activitat PKC disminueix per sota dels nivells basals quan sobreexpressem la proteïna p19 amb una mutació en aquest residu (p19mut). Per tant, el mutant W164A podria ser un dominant negatiu de la forma p19 salvatge?

El fet que p19 H-Ras presenti un model d'unió similar amb la proteïna p73 (on el residu W164 també resulta essencial en la unió a aquesta proteïna) ens podria consolidar aquesta idea, però el no trobar el mutant W164A en cap dels tumors estudiats ens dirigeix més aviat a considerar W164A com una mutació revertent de la funció de p19 H-Ras, sense que aquest hagi de presentar forçosament les característiques que defineixen un dominant negatiu. Per exemple, una de les característiques definides per a un dominant negatiu és que aquest s'uneixi a algun factor comú i n'eviti l'activació tot competint amb la proteïna salvatge, i tampoc no tenim cap evidència de que es doni aquest fet en el cas del mutant p19 W164A. A més a més, la unió p19-p73 també necessita d'un residu serina a la posició 17, tal com es mostra en els assaigs de doble-híbrid amb p73 i les diferents variants de p19 H-Ras. La mutació S17N en les proteïnes p21 codificades pels gens H-, N- i K- dona lloc a formes inhibidores dominants, les quals tenen major afinitat per les proteïnes GEFs (*Guanine Exchange Factor*) que la pròpia p21 Ras salvatge (Feig 1999). Aquests mutants no poden interaccionar amb els efectors de Ras, i per tant formen complexos inactius que segresten aquests factors tot bloquejant l'activitat cel·lular de les formes Ras endògenes. El descobriment de que el residu S17 és un aminoàcid crucial en les dues isoformes codificades pel gen *c-H-ras* accentua les possibles conseqüències negatives de la presència de mutacions en els oncògens *ras*.

Per altra banda, l'activació de la via de senyalització JNK (*Jun N-terminal kinase*) a través de PKC està ben documentada (Ip *et al.* 1998; Schonwasser *et al.* 1998) i recentment s'ha publicat que RACK1 serveix com a molècula adaptadora entre PKC i JNK. Tradicionalment s'havia estudiat l'estimulació de JNK a través de l'estrès causat per la llum UV o per les formes H-Ras activades (Derijard *et al.* 1994) i la seva implicació en l'activació del factor de transcripció c-Jun. Però no va ser fins més tard que es va descobrir el mecanisme concret que proposava RACK1 com a nexa d'unió entre les dues molècules (Lopez-Bergami *et al.* 2005). En aquest sentit, les nostres dades ens indiquen que els alts nivells d'activitat PKC produïts per p19 no provoquen la fosforilació de la cinasa JNK (figura 55 annexes), i per tant tampoc del factor de transcripció c-Jun. Aquests resultats estan d'acord amb estudis previs que indicaven que l'activació de PKC i la seva unió a RACK1 no és suficient per a activar JNK, i que es requereix un segon estímulo com ara la via MKK4/7 (Lopez-Bergami *et al.* 2005). Per tant, hem de considerar que aquest possible segon estímulo no seria activat per p19 H-Ras.

En canvi sí que veiem com p19 H-Ras provoca la inhibició de l'expressió d'una altra proteïna implicada en la regulació de l'activitat de PKC via RACK1, la proteïna oncogènica Src. De fet, l'activació de PKC promou la fosforilació de RACK1 i la consegüent unió de Src a aquesta proteïna adaptadora tot inhibint l'activitat cinasa de Src (Chang *et al.* 2001; Mamidipudi *et al.* 2004). Aquí, però, caldria esmentar que la inhibició de l'activitat de Src que nosaltres observem (l'increment de la fosforilació de Src en el residu Tyr527) sols sembla ser parcialment dependent de la unió p19-RACK1, ja que la sobreexpressió del mutant també provoca un increment de p-Src (Tyr527). De totes formes, la proporció de p-Src inactiu respecte Src total és clarament més baixa quan sobreexpressem p19mut. Per tant, malgrat no obtenir una total recuperació de l'activitat cinasa de Src, sí que observem com el mutant reverteix (no de forma total) l'efecte causat per p19 H-Ras. Aquesta és una altra dada que ens reafirma la importància d'aquesta mutació, i en general podríem concloure que p19 H-Ras redueix els nivells de Src cel·lulars susceptibles de ser activats.

El conjunt d'aquestes observacions ens portaria a pensar en una possible regulació de Src de forma conjunta per RACK1 i p19, on un dels efectes de la davallada de c-Src seria el retard de la transició G1/S en el cicle cel·lular, ja que Src indueix el

trànsit per G1 i l'entrada a la fase S tot suprimint tant p27 (inhibidor de CDK) com induint p21 i les ciclines D1, E i A (Riley *et al.* 2001; Sinibaldi *et al.* 2000), totes elles components crítiques en la regulació del cycle cel·lular. D'altra banda, l'observació d'una aturada del cycle en la fase G1 quan sobreexpressem p19 H-Ras està d'acord amb els resultats obtinguts per Mamidipudi i col·laboradors (Mamidipudi *et al.* 2004), els quals detecten el mateix efecte en cèl·lules amb nivells baixos de Src. Curiosament, la sobreexpressió de p19 H-Ras té un efecte similar a l'observat per Mamidipudi quan sobreexpressem RACK1, és a dir, es produeix una inhibició de l'activitat Src i la resultant aturada parcial del cycle cel·lular en G1. Malgrat tot, la figura 56 annexes posa de manifest que la sobreexpressió de p19 no varia els nivells cel·lulars de RACK1, i per tant els efectes que observem en el cycle cel·lular es deuen únicament a l'acció de p19. A més, el fet de trobar clarament uns nivells més elevats de p-Src inactiu al sobreexpressar p19 ens confirma aquesta hipòtesi. Així doncs, en un futur pròxim caldrà aprofundir en l'estudi del mecanisme d'acció de p19mut, ja que la seva funció sembla ser força més complexa de la que caldria esperar.

Un dels efectes més interessants provocat per la sobreexpressió de p19 H-Ras és la hiper i hipofosforilació d'ERK1 i Akt, respectivament. En el cas d'ERK, la via de senyalització pot ser activada per mecanismes dependents o independents de PKC: en el primer cas, PKC fosforila i activa Raf, el qual desencadena la cascada Raf/MEK/ERK; en el segon cas l'activació de Raf ve donada directament per l'acció de Ras unit a GTP (Chen *et al.* 2003). Els experiments que s'han dut a terme en el nostre grup d'investigació indiquen clarament que p19 no s'uneix a Raf1 (Guil *et al.* 2003a), i per tant no seria capaç d'activar ERK a través de Raf directament. A partir d'aquesta premissa inicial, és força probable que p19 aconseguixi la fosforilació d'ERK1 tot activant la molècula PKC, i que aquesta activació sigui una peça més en el mecanisme de control de la via de regulació TSC (*Tuberous Sclerosis Complex*), com veurem més endavant.

Tot i que l'extensa identitat aminoacídica entre les dues molècules ERK i la seva aparent similar regulació espacial-temporal fan que alguns models les consideren essencialment intercanviables, com en el cas de la regulació de l'aturada en G1/S per part d'ERK activat (Villanueva *et al.* 2007), nosaltres només hem observat l'activació d'ERK1, mentre que els nivells d'ERK2 actius es mantenen constants. Encara es

desconeix gran part dels rols específics que adopta cada isoforma, tot i que estudis recents estan obrint noves vies d'investigació basades en les diferències quantitatives entre les dinàmiques de ERK1 i ERK2, i la importància d'aquestes en la seva regulació. Per exemple, s'ha vist que la sobreexpressió d'ERK1 provoca una inhibició del creixement cel·lular induït per Ras, efecte que no s'observa a l'expressar ERK2. Els resultats d'aquest estudi revelen una certa interacció entre ERK1 i ERK2 en la transducció de senyals cel·lulars depenents de Ras i la proliferació: mentre que ERK2 sembla tenir un paper positiu en el control de la proliferació cel·lular, ERK1 afectaria probablement el conjunt de senyals cel·lulars tot antagonitzant l'activitat d'ERK1 (Vantaggiato *et al.* 2006). Així doncs, el fet que sigui ERK1 i no ERK2 la proteïna regulada per p19 ens mostra un cop més l'estret lligam que hi ha entre la proteïna p19 i el control del cicle cel·lular.

D'altra banda, en els últims anys s'ha observat que un ampli espectre de càncers humans presenten formes Akt activades constitutivament. Entre els múltiples mecanismes que regulen Akt trobem senyals extracel·lulars que activen PI3K, el qual genera molècules PIP3. Les fosfatases encarregades de desfosforilar PIP3 (com PTEN) regulen negativament l'efecte d'Akt, i la manca de fosforilació de la Ser473 en les molècules d'Akt indica una inhibició de la via PI3K (Bhaskar *et al.* 2007), entre altres causes. A través de la desregulació d'Akt trobem un enllaç directe amb el mecanisme molecular que controla la malaltia del TSC, ja que Akt activa mTOR mitjançant la fosforilació de la proteïna TSC2 (Inoki *et al.* 2003a; Inoki *et al.* 2003b), la qual dona lloc a una forma inactiva (veure figura 45). Tal com hem comentat en la introducció d'aquest treball, el complex proteic TSC1/TSC2 té una activitat GAP sobre Rheb, però si aquest complex és inactiu permet l'activació de mTOR a través de Rheb. En darrer terme, mTOR exerceix un control de múltiples funcions cel·lulars en resposta a aminoàcids i factors de creixement, per exemple regulant la fosforilació de p70S6K. Aquesta és una proteïna Ser-Thr cinasa que fosforila la subunitat ribosomal S6, un dels components de la subunitat 40S dels ribosomes eucariotes. Té una important funció en la síntesi de proteïnes i en el control del creixement cel·lular durant la fase G1, a més d'estar sotmesa a una regulació força complexa: entre altres factors, es necessita una fosforilació en el seu *loop* d'activació provocada per PDK-1 (*Phosphoinositide Dependent Kinase-1*) per a la seva activació (Belham *et al.* 1999). En el cas de mTOR, el complex RAPTOR (*Regulatory Associated Protein of mTOR*) s'uneix a p70S6K a través dels seus motius

TOS (*conserved TOR signaling*), i es necessita la disrupció del complex ternari mTOR-RAPTOR-p70S6K per a una correcta fosforilació de p70S6K (Nojima *et al.* 2003).

Tot i no obtenir resultats conclouents a l'hora d'analitzar els nivells de fosforilació de mTOR entre els diferents tractaments, sí que detectem una inhibició del factor p70S6K quan sobreexpressem p19. Així doncs, finalment podríem parlar d'un procés actiu de p19 H-Ras en la inhibició de la via TSC, donat que p70S6K és la principal diana de mTOR. De totes formes, els nostres resultats ens porten a suggerir un mecanisme cel·lular en que, per una banda, p19 H-Ras inhibeix Akt (amb les conseqüències que això genera) i per l'altra estimula ERK (que resulta ser un inhibidor de Rheb a l'activar el complex TSC2/TSC1) i incrementa els nivells de proteïna TCTP, la qual té activitat GEF sobre Rheb. Això explicaria la inhibició parcial de mTOR, ja que els nivells de 4EBP1 així com de la proteïna fosforilada (p-E4BP1 Thr37/45) es mantenen constants en els diferents tractaments (figura 57 annexes). Aquesta proteïna és fosforilada per mTOR, provocant la disrupció del complex 4EBP1/eIF4E (factor d'iniciació de traducció en eucariotes) i deixant lliure la forma activa eIF4E (Gingras *et al.* 1998). D'aquesta forma, p19 es desmarca d'altres proteïnes Ras i en concret d'algunes variants oncògenes, les quals activen Akt probablement gràcies a la capacitat d'aquesta proteïna per a inhibir l'apoptosi i promoure la supervivència cel·lular (Downward 2003).

L'altre aspecte central del nostre treball ha estat l'estudi de la regulació de l'activitat telomerasa cel·lular a través de p19 H-Ras. Els nostres assaigs ens han mostrat que tant la forma α com la β de la proteïna p73 s'uneixen a p19 (Jeong *et al.* 2006), malgrat que p53 no ho fa. Per tant, això ens porta a definir la zona d'unió en l'extrem C-terminal de p73, concretament la regió comuna entre ambdues molècules α/β (també present en la isoforma p63). A més a més, aquesta interacció es veu inhibida per dues mutacions puntuals a la seqüència de p19: la mutació en el residu W164 (resultat que evidencia la importància de l'exó IDX en el control de l'activitat de p19 H-Ras), i la mutació en el residu S17. Totes aquestes dades podrien indicar que els canvis estructurals descrits per a la mutació S17N, els quals produeixen una alta afinitat a GEFs en el cas de p21, no són compartits per la proteïna p19 però en canvi els llocs aminoacídics S17N i W164A sí que són necessaris per a la unió de p73. Curiosament, la isoforma p73 α s'uneix a RACK1, i en canvi no s'observa aquesta interacció a RACK1 en el cas de p73 β i p53.

La regulació de l'activitat telomerasa a través de les diferents isoformes p73 (figura 46) és un dels camps més interessants a l'hora d'estudiar l'evolució de les cèl·lules canceroses, ja que l'activació de la telomerasa inhibeix l'escurçament dels telòmers, i per tant prevé l'apoptosi i els rearranjaments cromosòmics. Val a dir, però, que hi ha diferències funcionals significatives entre p73 α i p73 β a l'hora d'actuar sobre hTERT (Toh *et al.* 2005; Ueda *et al.* 1999), fenomen que suggereix que cada isoforma podria estar involucrada en funcions diferents i específiques. En primer lloc, p73 α és un inhibidor de l'activitat telomerasa, mentre que p73 β contribueix al manteniment de l'activitat telomerasa a través de l'activació de HDM2. Per altra banda, es necessiten uns nivells mínims de proteïna p53 per a suprimir l'activitat telomerasa ja que p53 també induïx HDM2, capaç d'inhibir p53 i d'activar dèbilment la telomerasa. Així doncs, quan es sobreexpressa p73 es suprimeix l'efecte inhibidor de p53 sobre la telomerasa degut a l'increment dels nivells de HDM2. Com a conseqüència, l'increment en l'expressió de p73 observat en varis tipus de càncer (El-Naggar *et al.* 2001) podria jugar un paper important a l'hora de contribuir en el desenvolupament de processos cancerígens, encara que no en fos la causa directa, ja que l'expressió de p73 anul·laria les funcions supressores de tumors de la molècula p53 (com seria l'inhibició de hTERT).

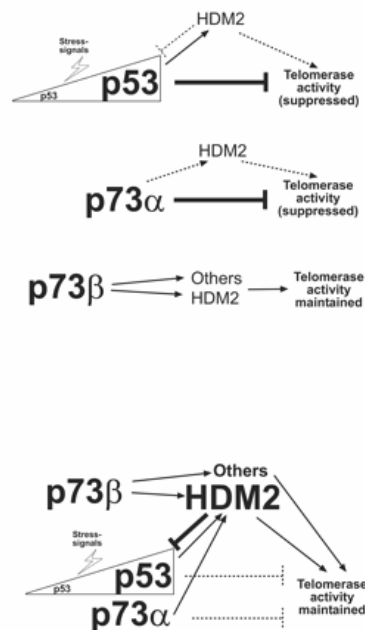


Fig. 46: Model de regulació de la telomerasa a través de p53 i p73 (Toh *et al.* 2005)

Així doncs, vam optar per analitzar si p19 H-Ras podia alterar l'activitat telomerasa mitjançant la seva unió a p73, i tal com esperàvem, vam observar un increment de l'activitat amb la sobreexpressió de p19 però no amb la forma mutada p19W164A, segurament degut a la pèrdua de la unió a p73. Evidentment, s'ha de considerar la possibilitat d'un macrocomplex p19/RACK1/p73, de forma que la unió de p19 a RACK1 provoqui un canvi conformacional que afecti d'alguna manera la unió RACK1/p73, i per tant l'acció reguladora de l'activitat telomerasa. En aquest sentit, seria interessant realitzar anàlisis cristal·logràfiques per estudiar més a fons la naturalesa d'aquestes interaccions. Per tant, el conjunt de les nostres observacions ens indica que p19 podria modificar el balanç de proteïnes p53, p73 α i p73 β actives i regular l'activitat telomerasa tot inhibint d'alguna manera p73 α (inhibidor) i activant la funció de p73 β (activador) per modular hTERT.

El control del cicle cel·lular és un punt crític a l'hora de decidir el destí final de les cèl·lules, ja que les cèl·lules de mamífer necessiten un senyal proliferatiu extracel·lular just després de la mitosi per a continuar creixent i dividint-se. Quan la cèl·lula s'ha d'afrontar a una manca de senyals extracel·lulars, ha d'escollir entre dues opcions: morir o aturar el creixement, tot entrant en una fase G1 postmitòtica. I els factors de transcripció Forkhead (Fox) són elements clau en el control de la proliferació cel·lular, actuant a través de les vies de senyalització PI3K/PKB i Ras/Ral . Així doncs, no ens ha de sorprendre l'increment dels nivells de FoxO en cèl·lules sobreexpressant p19 H-Ras, doncs aquest marcador s'associa a una inhibició de la progressió del cicle cel·lular en la transició G1/S, en part degut al control transcripcional que exerceix sobre el gen que codifica per la proteïna p27^{kip1} (Medema *et al.* 2000). En canvi, la sobreexpressió de p19 H-Ras no provoca cap retard en la transició G2/M, segurament gràcies a la repressió de la proteïna Reprimo (RPRM) que hem observat en la incubació dels nostres arrays. Aquesta proteïna és induïda per p53, i es coneix que contribueix a provocar una aturada cel·lular en G2 (Ohki *et al.* 2000; Taylor *et al.* 2001).

El retard en la transició G1/S que observem al sobreexpressar p19 es correlaciona perfectament amb l'hipofosforilació d'Akt (Kops *et al.* 2002b; Tran *et al.* 2002) i l'increment de l'activitat telomerasa en aquest punt del cicle cel·lular que evita l'entrada en apoptosi. A més a més, els autors proposen que la inactivació dels factors Forkhead a través de la via PKB en cèl·lules quiescents és un pas fonamental per a la reincorporació

en el cicle cel·lular, i contribueix a processos de transformació. També s'ha observat la manca de fosforilació en la Ser473 de la molècula Akt en cèl·lules del cervell i musculars d'animals en estat d'hibernació (Cai *et al.* 2004) i s'ha suggerit que el control del balanç entre proliferació i aturada cel·lular depèn, d'alguna manera, de mecanismes regulats per Akt. En *C. elegans* s'ha descrit un mecanisme similar, on l'hipofosforilació d'Akt produeix canvis transcripcionals del factor de transcripció FoxO (Kops *et al.* 2002a; Taub *et al.* 2003). Però a pesar de l'evident comunicació entre Akt i FoxO, també s'ha descrit l'activació dels factors Forkhead en absència de la via de senyalització PI3K/PKB (Brunet *et al.* 1999); en molts tipus cel·lulars això comporta una aturada del cicle cel·lular i un estat de quiescència però no d'apoptosi, malgrat l'absència d'activitat PKB.

En resum, les dades extretes del nostre treball ens suggereixen que p19 H-Ras indueix un estat de quiescència reversible en la cèl·lula, tot prevenint l'activació dels processos apoptòtics. A més a més, estudis recents en *S. cerevisiae* indiquen que TOR podria ser un marcador de quiescència, ja que la seva inactivació provoca certes característiques dels estats de quiescència, com la remodelació de la paret cel·lular de la cèl·lula de llevat (Gray *et al.* 2004), malgrat que cal remarcar que aquest mecanisme encara no s'ha descrit en mamífers. D'aquesta forma també s'explicaria la poca quantitat de gens (cDNAs i miRNAs) que són regulats per la sobreexpressió de p19 H-Ras, ja que si la cèl·lula entra en un estat de quiescència, els seus nivells transcripcionals han de ser molt baixos (Clayton *et al.* 2008).

La nostra segona aproximació a la funció del complex p19/p73 ve donada per la descoberta de que HES4, un factor repressor de transcripció activat per la via de senyalització de Notch, es troba induït quan sobreexpressem p19 (dades extretes a partir de l'array de cDNAs). Per altra banda, dos dels lligands del receptor de Notch (JAG1 i JAG2) es troben regulats per les proteïnes p73 i p63, però no per p53 (Sasaki *et al.* 2002), de la mateixa forma que p19 interacciona amb p73 (i probablement amb p63, tal com hem comentat) però no hem detectat interacció amb p53. I el mateix estudi ens descriu la inducció de HES1 en cèl·lules Jurkat, les quals tenen alts nivells de Notch1 (receptor de Notch), quan són cultivades amb cèl·lules transfectades amb p63, suggerint l'acció inductora de p63 sobre la via de senyalització Notch1. De totes formes, el mecanisme d'activació no és clar, i en assaigs preliminars no observem un increment de

Notch1 activat durant la sobreexpressió de p19 H-Ras (resultats no mostrats). Així doncs, hem de suposar que la inducció de HES4 que observem no es dona gràcies a l'activació de Notch1, i que per tant p19 H-Ras no intervé en la via de senyalització Notch. Caldrà aprofundir en l'estudi del mecanisme d'acció de HES4 i la seva regulació per entendre millor la funció exacta de p19.

Malgrat tot, els resultats obtinguts en la incubació del nostre array ens van proporcionar dades molt útils a l'hora de descobrir noves vies d'acció de p19 H-Ras. Entre els gens que mostren una expressió diferencial al sobreexpressar p19 trobem RAB3GAP1 (inhibit en el nostre tractament), un membre de la família de les *small* GTPases Ras: estudis recents evidencien l'existència de mutacions en aquesta proteïna en varis casos del *Warburg Micro Syndrome* (WARBMV1), una malaltia autosòmica recessiva que causa anomalies en el desenvolupament de l'ull i del sistema nerviós central (Aligianis *et al.* 2005). La importància de certes mutacions en molècules clau dels processos cancerígens està àmpliament documentada (Bar-Sagi 2001; Colicelli 2004; Downward 2003; Rajalingam *et al.* 2007; Vogelstein *et al.* 2004) i encara que de moment no s'hagi trobat la mutació W164A en la seqüència de p19 H-Ras de cap mostra tumoral, un examen més profund del comportament d'aquest mutant ens pot aportar informació força rellevant sobre la funció cel·lular de p19 H-Ras.

Un altre exemple de gens regulats pel mutant de p19 seria un *cluster* de gens codificants per histones, indicant-nos el possible rol de p19 en la regulació de l'empaquetament de la cromatina. En aquest sentit, és remarcable un treball recent del grup de la doctora Martínez-Balbás que descriu la proteòlisi que sofreix el complex CBP/p300 (dues acetiltransferases que regulen l'acetilació d'histones, a més d'actuar com a coactivadors transcripcionals) en cèl·lules NIH3T3 que sobreexpressen l'oncogen Ras 12V (Sanchez-Molina *et al.* 2006). Anteriorment s'havia proposat que p300/CBP podria tenir un paper crític en la senescència provocada per Ras, i que per tant la inactivació d'aquests coactivadors, juntament amb altres alteracions genètiques, podria donar lloc a processos tumorogènics (Deng *et al.* 2005). Així doncs, no seria estrany pensar que p19 actua a nivell transcripcional sobre gens codificants d'histones, i que la presència de p19mut evidencia la importància del correcte funcionament de la molècula p19 a l'hora d'aturar parcialment el cicle cel·lular.

També és interessant la desregulació de varis factors transcripcionals del complex AP-1 per part de p19mut, com c-Jun, ATF3, TRIB3 i TXNIP. En el cas de TRIB3, aquest pot actuar com a inhibidor d'Akt sota certes condicions (He *et al.* 2006), observació que ens ratifica el paper que juga p19 H-Ras en la via Akt/TSC/mTOR. A més a més, la inducció i repressió de l'expressió de c-Jun per part de p19 i p19mut, respectivament, ens indica que la regulació del complex AP-1 no implica forçosament la fosforilació de c-Jun, en cap dels dos residus Serina activadors, Ser63 i Ser73 (resultats no mostrats), tot i que en condicions de sobreexpressió de p19 els nivells de proteïna fosforilada respecte la proteïna total són més baixos. Aquest fenomen ja l'havíem observat anteriorment en la regulació de Src per part del mutant de p19, malgrat que en el cas de Src la proteïna fosforilada correspongui a la forma inactiva de la molècula, assenyalant implicacions funcionals molt variades. Un altre aspecte remarcable és la repressió que observem en el cas de p19mut, apuntant clarament el requeriment d'un domini W164 intacte segurament per mantenir la unió a RACK1 funcional.

El *splicing* alternatiu de c-H-ras il·lustra el complex joc que es pot establir entre factors reguladors per a obtenir el balanç final d'isoformes de mRNA (Guil *et al.* 2003b). A més a més, la presència de varis factors de *splicing* regulats per p19 en el nostre array de miRNAs ens va portar a anar un pas més enllà en el nostre treball, i vam procedir a estudiar la regulació de c-H-ras pels seus propis productes funcionals. Sorprenentment, vam descobrir que la mateixa sobreexpressió de p19 estimula l'expressió de c-H-ras i incrementa els nivells de p21 H-Ras, tot i que la taxa de *splicing* alternatiu (p21/H-Ras total) es manté en tots els tractaments de forma relativa. Aquesta activació de l'expressió també depèn de l'aminoàcid W164, ja que p19mut retorna als nivells basals l'expressió del gen c-H-ras i els nivells de p21. A més a més, observem un lleuger afavoriment del *splicing* alternatiu envers la forma p21 quan sobreexpressem el mutant.

En canvi, seguint el fil d'experiments previs en Northern Blot que ens indicaven una regulació del *splicing* alternatiu per part del mutant p21Q61L, vam observar que aquesta mutació no afectava l'expressió total del gen c-H-ras però sí la taxa p19:p21, ja que quan sobreexpressàvem p21Q61L es duplicava la quantitat de mRNA p19 en comparació al tractament control. En altres paraules, s'observa un fort mecanisme homeostàtic que s'activa quan detecta forts canvis en els nivells de p19 i p21. Aquest

mecanisme de compensació cel·lular es correlaciona amb els resultats obtinguts en ratolins *knock-out* (KO) per H-Ras (Esteban *et al.* 2001). Els ratolins són viables, i al caracteritzar els perfils d'expressió gènica de línies cel·lulars de fibroblasts obtinguts a partir d'aquests animals s'ha confirmant la presència d'activitats transcripcionals específiques associades a l'absència de *c-H-ras*, (Castellano *et al.* 2007), indicant el control diferencial de diferents xarxes enzimàtiques per part de les isoformes H-Ras. Aquestes dades, juntament amb estudis que descriuen que el KO de H-*ras* al locus K-*ras* dóna lloc a ratolins adults viables però amb cardiomiopaties, suggereixen la potencialitat de H-*ras* per mimetitzar les funcions de K-*ras* durant l'embriogènesi però no en la vida adulta (Potenza *et al.* 2005), així com la necessitat d'un mecanisme de compensació per a depassar la falta de molècules H-Ras i permetre la supervivència del ratolí KO per H-*ras*.

Recentment s'ha començat a entendre la contribució en la regulació gènica d'una nova classe de reguladors transcripcionals, els miRNAs. Tot i que només s'han elucidat les funcions biològiques d'una petita fracció de miRNAs, la majoria regula processos com el creixement cel·lular i la diferenciació tissular (Giraldez *et al.* 2005). A més a més, es coneix que els components de la maquinària dels miRNAs també estan implicats en la tumorigènesi: per exemple, l'expressió de Dicer es troba inhibida en càncer de fetge (Karube *et al.* 2005), i l'autor ho correlaciona amb una major inestabilitat genòmica i la formació de tumors, ja que Dicer està implicada en el manteniment de l'heterocromatina i el silenciament centromèric. Un altre cas seria el de les proteïnes argonauta, components essencials del complex RISC, els gens de les quals es troben deletats freqüentment en tumors Wilms renals i associats a tumors neuro-ectodermals (Carmell *et al.* 2002). Un dels miRNAs més ben estudiats, *lethal-7* (*let-7*), controla la coordinació de la diferenciació cel·lular i la proliferació en *C. elegans* (Pasquinelli *et al.* 2000; Reinhart *et al.* 2000) i mutacions en aquests gens provoquen anomalies en el progrés del cicle cel·lular i la diferenciació terminal, ambdós efectes característics de les cèl·lules tumorals (Takamizawa *et al.* 2004). Així mateix, de forma significativa el gen *c-H-ras* no només és regulat per la família de miRNAs *let-7* (Johnson *et al.* 2005), sino que el seu *splicing* alternatiu afavorint l'expressió de p19 envers la de p21 té repercussions en els nivells de varis miRNAs: dos dels miRNAs induïts per la sobreexpressió de p19 són importants focus d'estudi del càncer. En primer lloc, el *miR-342* és un dels marcadors de leucèmia aguda promielocítica (Garzon *et al.* 2007), i *miR-*

206 és un repressor de ER α en línies cel·lulars de càncer de pit, apart d'intervenir en la distròfia muscular (Adams *et al.* 2007) i estar fortament inhibit en varies línies humanes de cèl·lules metastàtiques (Tavazoie *et al.* 2008). La nostra contribució a l'estudi de la funció de *miR-206* és la descoberta del seu paper en el retard de la progressió del cicle cel·lular provocat per p19 H-Ras, ja que la inhibició de *miR-206* suprimeix la capacitat de p19 d'incrementar el percentatge de cèl·lules en G1.

Juntament amb la descoberta de la regulació del factor cinasa nm23-H1 per part de p19 H-Ras i del *miR-206*, les nostres dades recolzen un possible paper de p19 com a molècula protectora contra la progressió de la metàstasi. Malgrat que l'expressió de la cinasa nm23-H1 és divergent en varis tumors malignes, sembla haver-hi una associació entre nivells baixos de nm23-H1 i increment del potencial metastàtic en molts tipus de carcinoma, incloent el carcinoma de pit (Tee *et al.* 2006). Per altra banda, p19 estimula l'expressió de dos gens metastàtics, SLIT3 i PCSK6. Així doncs, quin seria realment el paper de p19 en els processos metastàtics? Nosaltres ens inclinem a pensar en p19 com a molècula activadora o inhibidora de la metàstasi cel·lular, on el seu paper vindria condicionat pel tipus de senyals i estímuls que rebés en un moment determinat (taula 15 annexes). A partir d'aquí, però, caldria una recerca més exhaustiva per esbrinar com la combinació de tots aquests factors pot finalment afectar la invasió/metàstasi i la motilitat cel·lular.

Entre els factors a tenir en compte també hi hauria els possibles mutants de p19 H-Ras: com hem esmentat abans, els mutants de p21 han estat àmpliament estudiats (sobretot els mutants que donen lloc a formes inhibidores dominants), però aquest no és el cas dels mutants de p19. Fins fa poc, l'única dada que es coneixia era un mutant al lloc de *splicing* 5' de l'exó IDX (en la posició 2719) aïllat a partir de línies cel·lulars T24/EJ de carcinoma de pit, consistent en un canvi d'una adenina per una guanina. Aquest mutant provoca un increment de 10 cops més missatger p21 H-Ras, amb el corresponent increment d'activitat transformant (Cohen *et al.* 1988). En el cas del mutant NIH/3T descrit recentment en el nostre grup (Guil *et al.* 2003a), es va descobrir una mutació en la seqüència de l'exó IDX de la proteïna p19 H-Ras, que constava d'un canvi en els aminoàcids WD per WG en la posició 164/165. Per altra banda, alguns dels mutants del gen H-Ras (com serien mutacions en les posicions 12 i 13) s'han identificat com a marcadors del síndrome de Costello (Dereure 2006; Gripp *et al.* 2006). Aquesta

malaltia provoca retard mental, anormalitats cardíques, musculoesquelètiques i dermatològiques, i predisposició a la formació de tumors, entre altres, ja que aquests aminoàcids estan localitzats a la regió d'unió a GTP i les mutacions en aquests llocs causen una activació constitutiva de la proteïna (Oliva *et al.* 2004). Malgrat tot, en pacients de síndrome de Costello no s'han observat mutacions en la seqüència IDX ni en el lloc inhibidor de *splicing* ras ISS1 descrit pel nostre grup d'investigació (Guil *et al.* 2003b) (comunicació personal de Katia Sol-Church). Per tant, hem de suposar que les mutacions involucrades en aquesta patologia es troben en la seqüència aminoacídica que comparteixen les dues isoformes H-Ras, i hem d'esperar una disfunció tant de p19 com de p21 per desenvolupar el síndrome de Costello, ja que aquestes mutacions afecten les funcions que comparteixen ambdues molècules.

El conjunt del nostre treball ens porta a concloure que *H-ras* és un gen força més complex del que s'havia descrit anteriorment. Les dues molècules per les quals codifica, tot i compartir un percentatge elevat de la seva seqüència, són proteïnes amb funcions diferents però alhora complementàries: p21 és un transductor de senyal que porta a la cèl·lula a un procés de divisió i creixement cel·lular, mentre que p19 evita que la cèl·lula entri en apoptosi tot mantenint-la en un estat reversible de quiescència. En un futur pròxim caldria estudiar si aquesta entrada en quiescència provocada per la molècula p19 pot ser útil a l'hora de dissenyar noves teràpies antitumorals, on la quiescència cel·lular és una conseqüència no desitjable del tractament amb agents quimioterapèutics. Durant el tractament amb quimioteràpia l'estrés oxidatiu augmenta de forma molt marcada, però paradoxalment aquest estrés oxidatiu interfereix amb el creixement dels tumors. Els alts nivells de peròxids de lípids (indicadors de l'estrés oxidatiu) comporten una perllongació de les cèl·lules cap a un estat quiescent, i els agents quimioterapèutics actuen quan les cèl·lules malignes s'estan replicant de forma constant, no quan es troben en un estat quiescent. Aquestes posseeixen més capacitat antioxidant que les cèl·lules normals, però aquest efecte es veu superat per l'estrés oxidatiu induït pels medicaments antineoplàsics. Les cèl·lules canceroses en estat G0 no es veuen afectades per aquests medicaments, ja que els radicals lliures interfereixen directament amb els efectes citotòxics dels medicaments, o sigui amb la seva activitat antineoplàsica (Passegue *et al.* 2006). A més, estudis recents han demostrat que la telomerasa té un paper en els processos leucèmics com a factor de supervivència (Li *et al.* 2006b). La seva activació té lloc independentment dels membres de la família Bcl-2, i es tradueix en una acumulació de

cèl·lules en G1, a part de permetre a les cèl·lules canceroses romandre quiescents durant la quimioteràpia i escapar dels efectes tòxics d'aquesta, amb capacitat d'emergir en el futur. Des d'una altra perspectiva, p19 H-Ras es mostra com un possible factor pro- o anti-metastàtic, i la seva funció ve altament condicionada per l'entorn cel·lular on es troba en un moment determinat.

CONCLUSIONS

- La proteïna p19 no interacciona amb cap dels efectors, GAPs i GEFs de la seva proteïna germana p21 H-Ras ja que p19 no es localitza a la membrana plasmàtica, i per tant aquesta no interfereix en l'activitat de p21 mitjançant una competició directa amb els seus efectors i activadors.
- p19 activa PKC ja sigui a través del seu paper en la unió RACK1-PKC tot formant un complex proteic multimèric, o actuant directament sobre la proteïna PKC soluble. Això provoca una activació de la cascada de les MAPK tot induint la fosforilació de ERK1 sense afectar els nivells totals d'ERK. Aquestes activacions necessiten un aminoàcid W en la posició 164 de la seqüència de p19 H-Ras, ja que aquest lloc és essencial per a la unió de p19 a RACK1 i a p73.
- Els alts nivells d'activitat PKC produïts per p19 no provoquen la fosforilació de la cinasa JNK i per tant tampoc del factor de transcripció c-Jun (membre del complex de transcripció AP-1). La inducció i repressió de l'expressió c-Jun per part de p19 i p19mut, respectivament, no implica forçosament la fosforilació de c-Jun. Curiosament, p19mut desregula altres factors transcripcionals del complex AP-1 com ATF3, TRIB3 i TXNIP.
- p19 H-Ras redueix els nivells de Src cel·lulars susceptibles de ser activats tot inhibint Src a nivell transcripcional i funcional, mentre que no afecta als nivells de RACK1. Aquesta inhibició juntament amb l'increment de FoxO, l'expressió de miR-206 i l'hipofosforilació d'Akt, provoca un retard en la progressió del cicle cel·lular, concretament en la transició G1/S, i indueix un estat de quiescència reversible en la cèl·lula.
- La proteïna p19 H-Ras modifica el balanç de proteïnes p53, p73 α i p73 β actives i regula l'activitat telomerasa tot inhibint d'alguna manera p73 α (inhibidor) i activant la funció de p73 β (activador) per modular hTERT.

Conclusions

- El control de la via de senyalització TSC per part de p19 H-Ras provoca una inhibició del factor p70S6K, com a resultat final de la regulació que aquesta exerceix sobre la fosforilació d'ERK i Akt, i l'expressió de TCTP.
- Mitjançant el manteniment dels nivells de *miR-206* i nm23-H1, i de la regulació transcripcional de varis gens metastàtics com SLIT3 i PCSK6, p19 H-Ras es presenta com a molècula capaç de condicionar la progressió de les metàstasis tissulars.
- p19 H-Ras estimula la pròpia expressió del gen *c-H-ras* i incrementa els nivells de p21 H-Ras, tot i que no varia la taxa de *splicing* alternatiu (p21/H-Ras total). Aquesta activació de l'expressió també depèn de l'aminoàcid W164, ja que p19mut retorna als nivells basals l'expressió del gen *c-H-ras* i els nivells de p21. A més a més, observem un lleuger afavoriment del *splicing* alternatiu envers la forma p21 quan sobreexpressem el mutant. vam observar que aquesta mutació no afectava l'expressió total del gen *c-H-ras* però sí la taxa p19:p21.

MATERIALS I MÈTODES

A continuació es descriuen les metodologies usades en la realització d'aquest treball experimental, així com els materials emprats.

A. Materials

1. Material biològic

En la realització d'aquest treball s'ha utilitzat bàsicament diverses soques de llevat, bacterianes i la cultius cel·lulars:

1.1. Bactèries

S'han emprat 2 soques bacterianes d'*Escherichia coli*:

- *E.coli* DH5 α , per al clonatge i obtenció de DNA plasmídic
- *E.coli* XLBlue, per al clonatge i obtenció de DNA plasmídic

1.2. Llevat

- Soca diploide de *Saccaromyces cerevisiae* AH109/Y187

1.3. Cultiu cel·lular

- Línia cel·lular HeLa derivada d'un adenocarcinoma humà de cèrvixs, amb un nivell d'expressió de p53 baix i uns nivells normals de pRB

2. Plasmidis, oligonucleòtids i construccions

2.1. Plasmidis

- pEGFP-C1**: plasmidi utilitzats per als assaigs d'immunolocalització i fluorescència (Clontech)
- pECFP-C1/pEYFP-C1**: plasmidis utilitzats per als assaigs de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) (Clontech)
- pRK5**: plasmidi utilitzat per a la sobreexpressió en cèl·lules de mamífer. Conté el promotor de citomegalovirus (CMV), que junt amb uns introns davant el nostre insert permet una expressió forta del producte desitjat.
- pGADT7**: plasmidi utilitzat per als assaigs de doble híbrid en llevat (MATCHMAKER System 3, Clontech).
- pGBKT7**: plasmidi utilitzat per als assaigs de doble híbrid en llevat (MATCHMAKER System 3, Clontech).
- pSUPER neo+gfp**: plasmidi utilitzat en assaigs de RNAi (OligoEngine).

2.2. Oligonucleòtids

| NOM | SEQÜÈNCIA (5'→3') | LONG. | TM(°C) |
|-------------------------------------|--|-------|--------|
| pEGFP-C1-IDX | | | |
| kpn2IIDXdir | AAGTCCGGAGGCAGCCGCTCTGGCTCT | 27 | 72,6 |
| IDXBamHlrev | GGTGGATCCTCACATGGGTCCCCGGGG | 27 | 74,1 |
| pEGFP-C1-p19 (E1-E3) | | | |
| kpn2Ip19dir | AAGTCCGGAATGACGGAATAAAGCTG | 27 | 63,4 |
| E3(p19)BamHlrev | GGTGGATCCTCACTGCCGGGTCTTGCC | 27 | 72,6 |
| pEGFP-C1-RACK1 | | | |
| kpn2IRACK1dir | AAGTCCGGAATGACCGAGCAAATGACC | 27 | 66,5 |
| RACK1Smarev | GGGGCGGGTACCAATAGTCACCTGCCAT | 28 | 64,5 |
| pEYFP-C1-p19 | | | |
| kpn2Ip19dir | AAGTCCGGAATGACGGAATAAAGCTG | 27 | 63,4 |
| p19BamHlrev | GGTGGATCCTCACATGGGTCCCCGGGG | 27 | 74,1 |
| pECFP-C1-RACK1 | | | |
| kpn2IRACK1dir | AAGTCCGGAATGACCGAGCAAATGACC | 27 | 66,5 |
| RACK1romrev | TCAGCGGGTACCAATAGTCACCTGCCA | 27 | 68 |
| pECFP-C1-p73α | | | |
| Kpn2Ip73αdir | CTCTCCGGAATGGCCCAGTCCACCG | 25 | 70,4 |
| p73αSallrev | ACCGTCGACTCAGTGGATCTCGGCC | 25 | 60,7 |
| pRK5-p21Q61L | | | |
| EcoRIp21Adir | TCTGAATTCATGACGGAATATAAGCTGG | 28 | 59,7 |
| p21Sallrev | CAGCTGAGTCTCTCGTGTGTGAACGTC | 28 | 65 |
| pRK5-p19 | | | |
| EcoRIp19W164Adir | TCTGAATTCATGACGGAATATAAGCTGG | 28 | 59,7 |
| p19W164ASallrev | CAGCTGCCTAGGAGTGTACCCAGGGCCC | 28 | 75,3 |
| pRK5-p19 W164A | | | |
| EcoRIp19W164Adir | TCTGAATTCATGACGGAATATAAGCTGG | 28 | 59,7 |
| p19W164ASallrev | CAGCTGCCTAGGAGTGTACCCAGGGCCC | 28 | 75,3 |
| pRK5-p73α | | | |
| HindIIIp73αdir | ATCAAGCTTATGGCCCAGTCCACCGCCA | 28 | 71,3 |
| p73αSallrev | CAGCTCGACTCAGTGGATCTCGGCCTCC | 28 | 69,2 |
| pRK5-PKCβII | | | |
| XbaIPKCβIIIdir | TCCTCTAGAACATGGCTGAC | 20 | 46,4 |
| PKCβIISallrev | ACCGTCGACTTAGCTCTTGA | 20 | 49,1 |
| pGADT7-p120GAP(714-1047AA) | | | |
| SmaIp120GAP714-1047dir | GATGGAAAAATCATGCCACAACAA | 25 | 58,1 |
| p120GAP714-1047rev | CTACCTGACATCATTGGTTTTTGTGA | 25 | 58,1 |
| pGADT7-yCdc25 (2721-4770 nt) | | | |
| EcoRIyCdc25 2721-4770dir | AGTGAATTCATGTCTTCGGTCTCCT | 25 | 61,3 |
| yCdc25 XhoIrev | CTGCAGCTCGAGTTATCGAAATAAC | 25 | 61,3 |
| pGADT7-SOS (564-1049 AA) | | | |
| SOS564-1049Salldir | CAGGTCGACCGGTACCTGGTCTTGG | 25 | 71,2 |
| SmaISOS564-1049rev | CCACCCGGGTGAGGAGCAGATGAGG | 25 | 69,5 |
| pGADT7-PI3K (110α) | | | |
| NdeIPI3K110adir | GCTCATATGCCTCCAAGACCATCATCAG | 28 | 66,6 |
| PI3K110a XhoIrev | TCATCACTCGAGTCAGTTCAAAGCATGC | 28 | 65,1 |
| pSUPER-RNAi p19 | | | |
| pos_646.HIND | GATCCCCTCTGGCTCTAGCTCCAGCTTTCA AGAGAAGCTGGAGCTAGAGCCAGATTTTGA | 60 | 70,2 |
| pos_646.HIND_As | AGCTTAAAAATCTGGCTCTAGCTCCAGCTT CTCTTGAAAGCTGGAGCTAGAGCCAGAGGG | 60 | 70,4 |
| SLIT3 | | | |
| SLIT3dir | TGCCTGGGACAAGTAGTCCG | 20 | 54,9 |
| SLIT3rev | TGCATAACCTTTCTGGCGG | 19 | 53,6 |

Taula 6: Resum dels encebadors utilitzats per als diferents clonatsges.

2.3. Construccions

A continuació es presenten els mapes de restricció de les construccions utilitzades en aquest treball, en els que s'han indicat els gens, promotors, terminadors, gens de resistència i tags de purificació. Així mateix, s'assenyalen les dianes de restricció corresponents als enzims més usats i les etapes seguides en el procés de clonatge.

2.3.1. Vectors per a assaigs de fluorescència i FRET

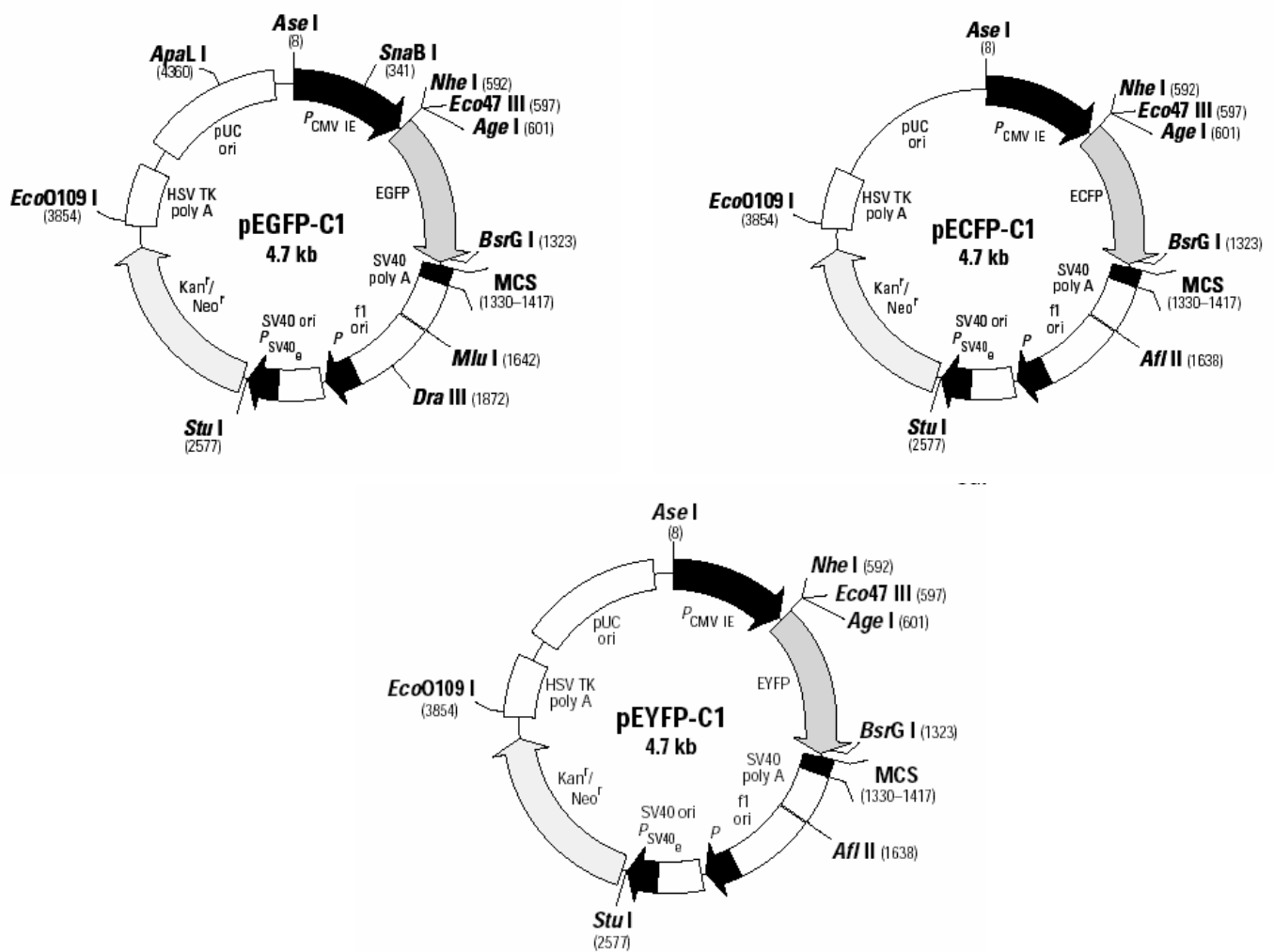


Fig. 47 Plasmidis que codifiquen per proteïnes fluorescentes.

2.3.2. Vector per a la sobreexpressió en cèl·lules de mamífer

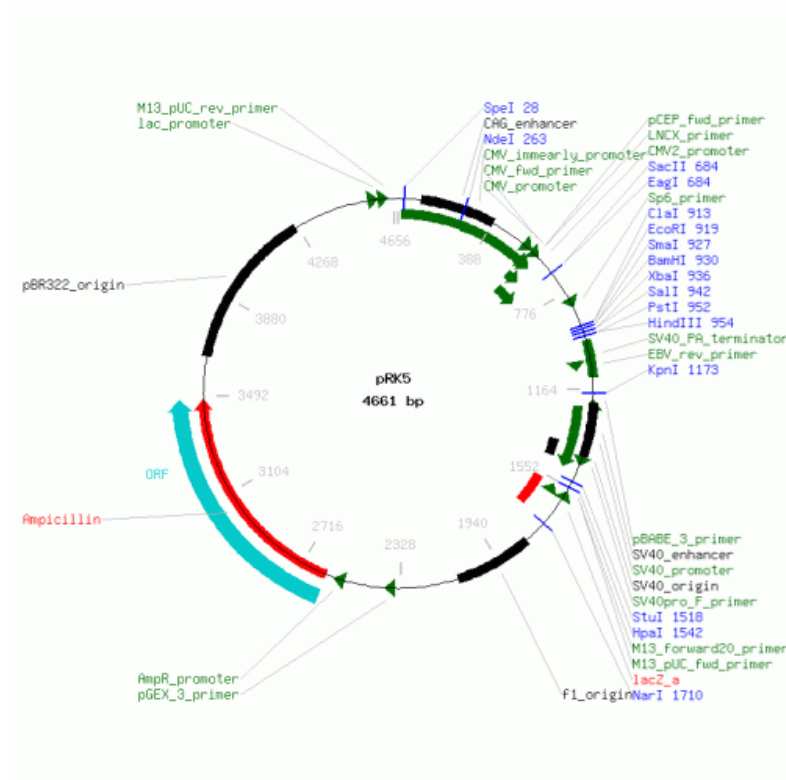


Fig. 48 Mapa del vector pRK5. Plasmidi que conté el promotor de citomegalovirus (CMV), que junt amb uns introns davant el nostre insert permet una forta expressió del producte desitjat.

2.3.3. Vectors per assaigs de doble-híbrid en llevat

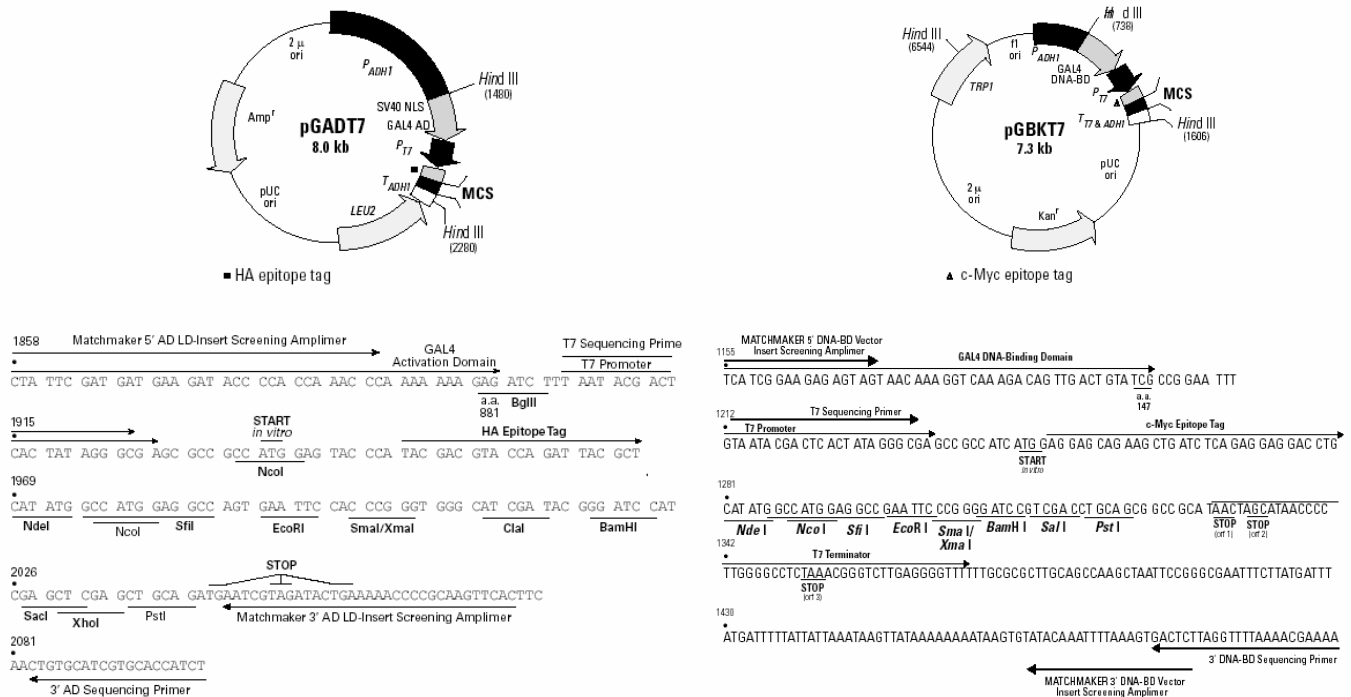


Fig. 49 Mapa dels vectors per als assaigs de doble-híbrid. Els plasmidis utilitzats provenen del kit MATCHMAKER System 3 (Clontech), on un cDNA s'expressa com a fusió del domini d'unió a DNA de GAL4 (vector pGBKT7), mentre que un altre cDNA s'expressa com a fusió al domini d'activació de GAL4 (pGADT7).

2.3.4. Vector per a RNAi

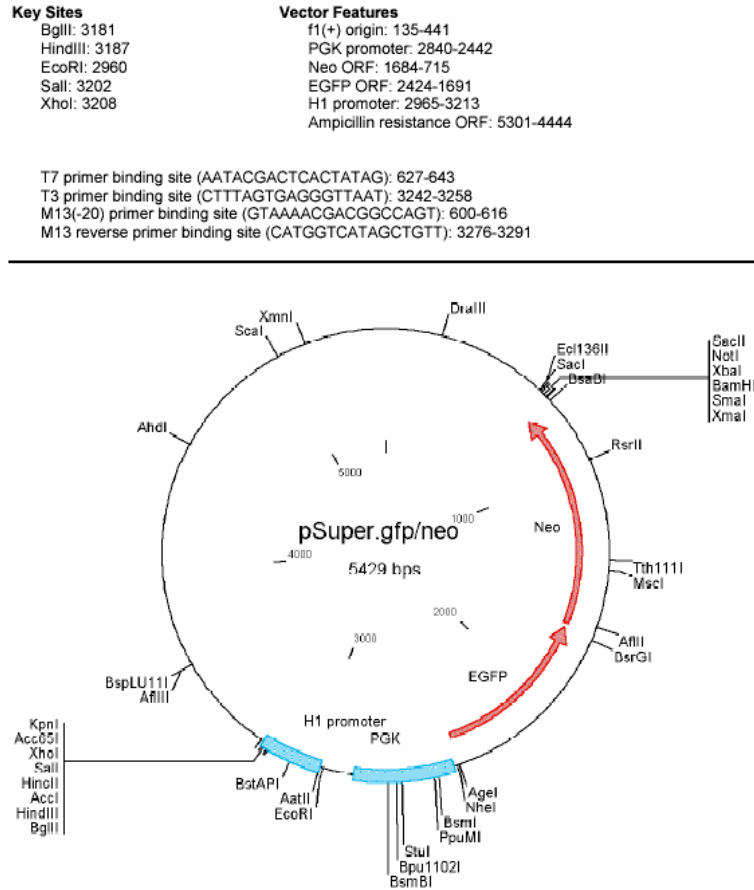


Fig. 50: Mapa del vector per a l'assaig de RNAi. Aquest plasmidi codifica per la proteïna fluorescent GFP i així permet visualitzar les cèl·lules transfectades.

3. Anticossos

En aquest treball s'han utilitzat els següents anticossos:

- **SP1**: anticòs contra la p19 H-Ras obtingut en conill, utilitzant el pèptid GSRSGSSSSSGTLWD, el qual inclou 15 dels 20 aminoàcids de la seqüència humana d'IDX, més una Cys al C-terminal
- **SP57**: anticòs contra la p19 H-Ras obtingut en conill, que només reconeix alts nivells de proteïna recombinant.
- rabbit **anti-GAPDH** (ab9485 abcam)
- mouse **anti-p73** (Ab-4 cocktail, Lab Vision Corporation)
- mouse **anti-PKC β II** (Santa Cruz Biotech)
- rabbit **anti-Jun** (Cell Signaling)
- rabbit **anti-p-Jun Ser63** (Cell Signaling)
- rabbit **anti-p-Jun Ser73** (Cell Signaling)
- rabbit **anti-TCTP** (Eurogentec)
- goat **anti-profilin-1** (Santa Cruz Biotech)
- mouse **anti-tubulina** (Santa Cruz Biotech)
- rabbit **anti-nm23 (NDPK)** (nm23-H1 (C-20): sc-343 Santa Cruz Biotech)
- rabbit **anti-p-eIF2 α S52** (Biosource)
- rabbit **anti-cleaved Notch-1** (Cell Signaling)
- rabbit **anti-p-ERK 1/2 Thr202/Tyr204 (p-p44/42 MAPK)**(Cell Signaling)
- mouse **anti-p-ERK 1/2 (p44/42 MAPK)**(Cell Signaling)
- rabbit **anti-p-mTOR Ser2448** (Cell Signaling)
- rabbit **anti-p-Akt Ser473** (Santa Cruz Biotech)
- rabbit **anti-p-Akt Thr308** (Santa Cruz Biotech)
- mouse **anti-Akt** (Cell Signaling)
- rabbit **anti-p-p70 S6 kinase Thr389** (Cell Signaling)
- rabbit **anti-FoxO1** (Cell Signalling)
- rabbit **anti-p27^{Kip1}** (Cell Signaling)
- rabbit **anti-p-p38 MAPK Thr180/Tyr182** (Cell Signaling)
- rabbit **anti-p-SAPK/JNK Thr183/Tyr185** (Cell Signaling)
- rabbit **anti-Src** (Cell Signaling)
- rabbit **anti-p-Src Tyr527** (Cell Signaling)
- goat **anti-rabbit IgG, HRP-conjugated** (Sigma)
- **α -rabbit IgG, HRP-linked antibody** (Cell Signaling)
- goat **α -mouse IgG, HRP-conjugated** (Sigma)
- Ab **Alexa Fluor[®]488** F(ab')₂ fragment of goat α -rabbit IgG (Molecular Probes)
- Ab **Alexa Fluor[®]555** F(ab')₂ fragment of goat α -mouse IgG (Molecular Probes)

4. Medis de cultiu

En aquest apartat es descriuen els medis de cultiu emprats en més d'un protocol. Els medis específics emprats en una sola tècnica es descriuen amb la metodologia corresponent.

4.1. Bacteris

Medi LB (Luria Bertani Medium): 1% Triptona (Pronadisa)
0,5% Extracte de llevat (Pronadisa)
1% NaCl (Carlo Erba)
pH 7,5 amb NaOH
Autoclavar

Per preparar medi sòlid: afegir 12 g d'agar (Pronadisa)/l medi LB, autoclavar, afegir antibiòtics (Ampicilina 100 mg/ml o Kanamicina 30 mg/ml) i plaquejar.

Medi SOB (conservació cèl·lules competents) Triptona 2 g
Extracte llevat 0,5 g
pH 7,0
Portar-ho fins a 100 ml
Autoclavar

Afegir de forma estèril:
0,25 ml 1M KCl
1 ml 1M MgCl₂
1 ml 1M Mg SO₄
0,25 ml 1M Na Cl

Medi SOC (transformacions) 100 ml SOB
+ 900 µl Glucosa 40%

4.2. Llevat

Medi YPD (Yeast Peptone Dextrose) 50g YPD (Clontech)/l
pH 6,5
Autoclavar a 121 °C 15 min

Per preparar medi sòlid 70 g YPD Agar(Clontech)/l
pH 6,5
Autoclavar a 121 °C 15 min

| | |
|---|---|
| Medi SD (Synthetic Droupout) | 26,7 g Min SD Base (Clontech)/l DO Supplement apropiat Autoclavar a 121 °C 15 min |
| Per preparar medi sòlid (Clontech)/l | 46,7 g Minimal SD Agar Base DO Supplement apropiat Autoclavar a 121 °C 15 min |

4.3. Cèl·lules de mamífer

| | |
|---|---|
| Medi DMEM (medi Eagle modificat de Dulbecco) | glutamina 200 mM 2% 4,5 g/l glucosa 3,7 g/l NaHCO ₃ |
|---|---|

Sense piruvat sòdic, suplementat amb un 10 % de sèrum de vedella (FBS, Fetal Bovine Serum) i antibiòtics (penicilina 10000U/ml i estreptomicina 10 mg/ml, SEBAK)

5. Tampons i solucions

En aquest apartat es detalla la composició dels tampons i solucions emprats en més d'un protocol.

5.1. Relacionats amb proteïnes

| | |
|-------------------------------|---|
| Tampó de lisi: | 50 mM TrisHCl pH 8.0 150 mM NaCl 0,02% azida sòdica 1% Tritó X-100 0,5% desoxicolat sòdic 0,1% SDS 5 Mm EDTA 5 µg/ml aprotinina 1 mM PMSF 100 mM ortovanadat 200 mM NaF |
| Tampó de càrrega (1X): | 1 ml tampó concentrador 4X 0,5 ml SDS 20% 250 µl β-mercaptoetanol 0,6 ml glicerina 87% |

| | |
|-----------------|--|
| TBS (1X) | 52 µl blau de bromofenol 1% Afegir H ₂ O fins a 5 ml 20 mM Tris 0,5 M NaCl pH 7,6 |
| PBS (1X) | 140 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ |

5.2. Relacionats amb els àcids nucleics

| | |
|--|--|
| Tampó de càrrega (5X): (gels no desnaturalitzants) | 50% glicerol Orange G |
| TAE (50X): | 242 g/l Tris Base 57,1 ml/l Àcid acètic glacial 100 ml/l 0,5 M EDTA (pH 8.0) |

B. Mètodes

Les construccions plasmídiques s'han obtingut segons els procediments estàndards de DNA recombinant (Sambrook & Maniatis, 1990), en que els fragments de restricció o de PCR s'han introduït en una zona determinada del plasmidi mitjançant lligació, sota el control d'algun promotor, ja sigui bacteriòfag o víric (cas dels cultius cel·lulars). Tots els plasmidis generats varen ser comprovats per seqüenciació.

Els mètodes que es descriuen a continuació corresponen a tècniques que s'han posat a punt en el transcurs d'aquest treball o bé a aquelles que resulten d'especial interès per a l'obtenció dels resultats que es presenten.

1. Cultiu cel·lular

El cultiu de línies cel·lulars, en termes generals, implica la propagació de cèl·lules immortalitzades i/o transformades sense que aquestes perdin les seves característiques bioquímiques, fisiològiques i genètiques. El manteniment de les línies cel·lulars es fa mitjançant el replaueig, que consisteix en el pas d'una part de les cèl·lules d'un flascó a un de nou amb medi fresc.

En aquest treball hem emprat la línia cel·lular HeLa, la qual creix en monocapa. Les cèl·lules en monocapa creixen adherides a la superfície, generalment plàstic. Quan la monocapa ha cobert pràcticament la totalitat de la superfície es fa necessari el replaueig, mitjançant la tripsinització, per tal d'assegurar-ne la viabilitat. La tripsinització consisteix en la disgregació cel·lular del cultiu utilitzant un procés enzimàtic i mecànic que permet la recuperació de les cèl·lules i el replaueig subsegüent. La finalitat d'aquest pas pot ser exclusivament el manteniment cel·lular o la generació d'un *stock* congelat, si bé pot respondre a un objectiu merament experimental semblant una quantitat determinada de cèl·lules en plaques adequades pel seu anàlisis.

Procediment:

- Les cèl·lules es mantenen creixent en plaques de 150 mm de diàmetre dins l'incubador.
- Un cop el cultiu assoleix el 80% de confluència es realitza la tripsinització. En una campana de flux laminar s'aspira el medi de cultiu de la placa i es renta amb uns 10 ml de PBS estèril, amb l'objectiu d'eliminar qualsevol resta de sèrum present que podria interferir en l'activitat de la tripsina.
- A continuació s'afegeix uns 2 ml de solució tripsina/EDTA i la placa es diposita entre un i cinc minuts a l'incubador, passats els quals s'analitza l'estat de disgregació a simple vista.
- Les cèl·lules es ressuspenen en uns 10 ml de DMEM + 10% FBS, inhibint-se així qualsevol acció enzimàtica posterior, i es procedeix a la disgregació mecànica amb la pipeta de plàstic.

A partir d'aquest punt el procés a seguir varia en funció del que es vulgui realitzar. Si el que es pretén és el manteniment de la línia cel·lular, es fa una dilució de la suspensió cel·lular i es plaqueja en una nova placa. En cas que es vulguin realitzar assaigs diversos, es contenen les cèl·lules per tal de sembrar-les en plaques o flascons de diferents mides en funció del disseny experimental.

És important comptabilitzar el nombre de vegades que les cèl·lules entren en contacte amb la tripsina, el que anomenem passatge, ja que a mesura que aquest augmenta és possible que algunes característiques fenotípiques del cultiu variïn. Precisament és necessari minimitzar-los al màxim i multiplicar els vials congelats amb la finalitat de mantenir una reserva de cèl·lules amb un passatge baix.

1.1. Transfecció transitòria

Per a la introducció en les cèl·lules HeLa de les diferents construccions derivades del gen *c-H-ras* hem emprat com a vehicle d'embolcall del DNA la lipofectamina, que forma unes micel·les lipídiques que afavoreixen la incorporació a les membranes i el pas a l'interior de les cèl·lules del DNA. Com a producte hem utilitzat Lipofectamine™ Reagent acompanyat de Plus™ Reagent per optimitzar la transfecció (Invitrogen).

- El dia anterior a la transfecció es plaquegen les cèl·lules per a tenir-les en el moment de la transfecció a 50-80% de confluència.
- S'incuben les cèl·lules a 37°C en un incubador de CO₂ durant 24 h.
- Pre-acomplexem el DNA amb el *Plus Reagent*: Diluïm 1 µg de DNA en 100 µl o 250 µl (plaques de 6 pouets per als assaigs de fluorescència o flascons de 25 cm² per als lisats cel·lulars, respectivament) de medi de dilució sense sèrum (DMEM) i barregem. Després afegim el *Plus Reagent* (6 o 8 µl) al DNA diluït, barregem un altre cop i incubem a temperatura ambient 15 min.
- Diluïm 4 µl o 12 µl de *Lipofectamine Reagent* en 100 o 250 µl de medi sense sèrum en un segon tub, i barregem.
- Combinem el DNA pre-acomplexat amb el *Lipofectamine Reagent*, barregem i incubem 15 min a T ambient. Mentre els complexos es formen, canviem el medi de les cèl·lules per 0,8-2 ml de medi de transfecció (DMEM sense sèrum ni antibiòtics).
- Afegim la barreja anterior DNA-Plus-Lipofectamine Reagent a cada placa amb medi de transfecció. Barregem els complexos en el medi suaument. Incubem a 37°C a 5% CO₂ durant 5 h.
- Després de 5 h d'incubació, canviem el medi de transfecció per medi complet.
- Mirem la transfecció a les 24 h (en el cas de la RNAi, mirem a les 72 h).

1.2. Interferència del RNA (RNAi)

Per a obtenir el silenciament gènic de la proteïna p19 i de *miR-206* hem utilitzat el sistema pSUPER RNAi, basat en un vector d'expressió en mamífers que provoca la síntesi intracel·lular de transcrits siRNA. El vector utilitza el promotor gènic de la polimerasa-III H1-RNA, i produeix un petit transcrit de RNA sense cua de poliadenosines (polyA), el qual té ben definits un origen de transcripció i un lloc terminal després de la segona uridina, seguida d'una fila de timidines. A més a més es talla el transcrit en el lloc terminal després d'aquesta segona uridina, donant lloc a un transcrit amb extrems similars als dels siRNA, i que conté dos extrems 3' sobresortints formats per nucleòtids T o U.

El sistema pSUPER RNAi s'utilitza per a obtenir una davallada específica de l'expressió gènica, donant lloc a una activació funcional dels gens diana. L'expressió estable dels siRNAs obtinguts mitjançant aquest vector donen lloc a una supressió persistent de l'expressió gènica. Per a silenciar un gen en concret, es construeix un clonatge a partir del vector pSUPER i un parell d'oligonucleòtids que contenen, entre altres complements, una seqüència única de 19 nucleòtids derivada del RNA missatger (mRNA) del gen diana (*N-19 target sequence*). Aquesta seqüència correspon a la cadena guia del siRNA generat pel vector pSUPER, que al mateix temps correspon a una seqüència de 19 nucleòtids del mRNA. Durant el mecanisme de la RNAi, la cadena anti-guia del dúplex siRNA s'hibrida a aquesta regió del mRNA per a processar el trencament de la molècula. El transcrit resultant es plega sobre ell mateix per a formar una estructura de llaç o *lariat*.

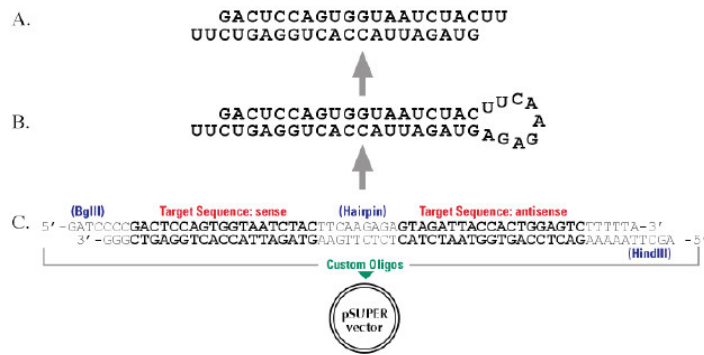


Fig. 51: Interferència del RNA. Transcripció de l'oligonucleòtid de 60 pb cap a l'estructura de RNA, processada cap a un siRNA funcional.

2. Cultiu en llevat

Les cèl·lules de *Saccharomyces cerevisiae* poden créixer en medi ric de composició desconeguda, anomenat YEP o medi sintètic amb la composició definida, anomenat SD (*Synthetic Dropout*) i per tant permet créixer selectivament les soques auxotròfiques a les quals s'haurà de complementar el medi amb el producte del gen necessari per eliminar l'auxotròfia.

Les cèl·lules de llevat poden créixer tan en medi líquid com en medi sòlid, preparats ambdós amb els mateixos components afegint agar en els medis sòlids per a la seva solidificació.

Tots els components utilitzats en els medis han de ser estèrils, ja siguin autoclavats o filtrats amb els filtres Millex de 0.22 µm (Millipore). S'esterilitzen mitjançant filtració aquells components susceptibles de fer-se malbé en ser autoclavats.

2.1 Creixement i Manteniment rutinari

La temperatura òptima de creixement de *Saccharomyces cerevisiae* és de 30°C, al ser un microorganisme microaeròfil els cultius líquids es creixen en agitació per tal d'afavorir l'intercanvi gasós i evitar la formació de grumolls. Els cultius sòlids es creixen en plaques de Petri en el medi solidificat per l'agar i segellades amb parafilm per tal d'evitar que s'assequin excessivament. Les soques de *Saccharomyces cerevisiae* es poden mantenir indefinidament en medi YPD amb glicerol al 20% amb glicerol a -80°C. Aquests estocs congelats s'anomenen glicerinat.

2.2 Transformació de plàsmids

Hem utilitzat el kit per a transformació en llevat YEASTMAKER™ Yeast Transformation System 2 (BD Biosciences), seguint les instruccions del fabricant.

3. Tècniques proteiques

3.1. Gels desnaturalitzants d'acrilamida per a proteïnes (SDS/PAGE)

3.1.1. Obtenció del lisat cel·lular

L'extracció proteica s'ha realitzat mitjançant lisat cel·lular total amb tampó de lisi. Després de tripsinitzar les cèl·lules, es renta el pellet de cèl·lules 2 cops amb 10 ml de PBS, i es resuspèn finalment en el volum adient de solució de lisi per a obtenir $6 \cdot 10^5$ cèl·lules/20 µl (es recomana carregar per cada pou del Western Blot l'extracte equivalent a unes $5-7 \cdot 10^5$ cèl·lules). Es passa la suspensió uns 6 cops per una xeringa d'insulina, i es

posa en gel 15 min. Els lisats cel·lulars es guarden a -80°C , congelant-los prèviament en nitrogen líquid.

3.1.2. Electroforesi unidimensional

L'electroforesi unidimensional en condicions desnaturalitzants (en presència de SDS) separa les proteïnes basant-se en el seu pes molecular a mesura que es mouen per la matriu d'acrilamida. La mostra de proteïnes es solubilitza bullint-la en presència de SDS i β -mercaptoetanol (que redueix els enllaços disulfur) i es carrega en el gel d'electroforesi. Els gels emprats en aquest treball corresponen al sistema clàssic descrit per Laemmli (Nature, 1970) en què un sistema discontinu de tampons de diferent pH i composició permet la concentració de la mostra de proteïnes en bandes fines que posteriorment són separades d'acord amb el seu pes molecular.

Les electroforesis es van realitzar en un aparell Vertical Mini-Gel Unit (C.B.S. Scientific C.O.) i les migracions es van realitzar a 50 V fins a la fase concentradora i a 100 V després durant unes 3 h en gels desnaturalitzants d'acrilamida a una concentració adequada a la mida de la proteïna d'interès a analitzar (normalment a 12,5% d'acrilamida), preparats tal i com es descriu a la taula següent:

| A) Gel concentrador | | B) Gel separador | | 15% | 12,5% | 10% |
|------------------------------|-----|------------------------------|--|-----|-------|-----|
| Tampó gel concentrador (ml) | 2,5 | Tampó gel concentrador (ml) | | 5 | 5 | 5 |
| Acri:bisacrilam. (29:1) (ml) | 1 | Acri:bisacrilam. (29:1) (ml) | | 7,5 | 6,25 | 5 |
| H ₂ O (ml) | 6,5 | H ₂ O (ml) | | 7,5 | 8,75 | 10 |
| Temed (μl) | 10 | Temed (μl) | | 13 | 13 | 13 |
| APS 10% (μl) | 100 | APS 10% (μl) | | 66 | 66 | 66 |

Taula 7: Volums necessaris per preparar un gel d'acrilamida. A) 10 ml de gel concentrador i B) 20 ml de gels separadors amb diferents % d'acrilamida/bisacrilamida

Tampó del gel concentrador (4X): Tris-HCl 0,5M pH 6,8
SDS 0,4%

Tampó del gel separador (4X): Tris-HCl 1,5M pH 8,8
SDS 0,4%

Tampó de migració (5X): Tris-HCl 250 mM pH 8,3
glicina 980 mM
SDS 0,5%

Procediment:

- Es renten bé els vidres i es munten amb els separadors i pinces subjectant-los. La part inferior del gel es segella amb un petit tap d'acrilamida.
- Es prepara la solució del gel separador al % adequat d'acrilamida.
- El gel separador s'aboca fins a 1 cm del final dels pouets de la pinta, s'anivella la part superior del gel amb butanol saturat en H₂O i es deixa polimeritzar durant 1 h. A continuació es prepara el gel concentrador al 4%.
- Es descarta el butanol i s'aboca el gel concentrador, col·locant la pinta alhora. El gel es deixa polimeritzar durant uns 30 min.
- Les mostres es bullen durant 10 min a 100°C en tampó de càrrega amb SDS 1x, es carreguen en el gel i es procedeix a l'electroforesi en solució d'electroforesi SDS 1x, a una intensitat de corrent constant de 15 mA.

Acabada l'electroforesi, es desmunta el sistema i el gel es pot tenyir amb Comassie Blue.

3.1.3. Transferència de proteïnes (*Western-blot*)

Aquesta tècnica aprofita la força i l'especificitat de la interacció antígen-anticòs, per a detectar i identificar proteïnes prèviament separades per mida electroforèticament. L'immunorevelat l'hem dut a terme mitjançant un anticòs secundari conjugat a peroxidasa i hem detectat la reacció quimioluminiscent corresponent.

| | |
|----------------------------------|--|
| Solució SLAB 4 2x: | Tris 50 mM glicina 380 mM SDS 0,1% |
| Solució de transferència: | Metanol 20% SLAB 4 1X |
| Solució de saturació: | llet en pols desnatada 5% Tween 20 0,1% Kathon 0,05% TBS1X |
| Solució de rentat: | Tween 20 0,1% TBS |
| Solució de luminol: | Tris-HCl 0,1 M pH 8,6-8,7 luminol sòdic (Sigma) 1,25 mM H ₂ O ₂ 2,7 mM |

Es prepara fresca i es guarda a 4°C protegida de la llum

Solució activadora o “enhancer”: 11 mg d'àcid p-hidroxi-cumàric (Sigma)
10 ml de dimetilsulfòxid (DMSO, Sigma)

Procediment:

Electrotransferència:

- El gel de proteïnes, la membrana de nitrocel·lulosa, 6 papers Whatman 3 MM i les espongetes s'equilibren en solució de transferència (SLAB 4 1x, MetOH 20%) durant 5-10 min.
- Es munta el sandvitx, col·locant des del pol negatiu al positiu: 1 esponja, 3 papers Whatman, el gel la nitrocel·lulosa, 3 papers Whatman i l'altra esponja, evitant de deixar bombolles entre cada capa. Es situa entre els elèctrodes de la cubeta de transferència, cobrint-lo amb la solució de transferència.
- Es transfereix a 4°C en agitació durant 1-3 h a 250 mA d'intensitat de corrent constant (per gels tipus Miniprotein). Alternativament, es pot transferir durant tota la nit a 40 mA. Es pot comprovar l'abast de la transferència tenyint el gel amb Comassie (no han d'aparèixer bandes), i la membrana amb solució Ponceau S (Sigma) (les proteïnes apareixen com a bandes rosades que es poden destenyir amb H₂O o PBS sense que s'afecti l'experiment posterior).

Immunorevelat amb quimioluminiscència:

- La membrana s'incuba en solució de saturació durant 30 min - 1h a T ambient en agitació.
- A continuació s'incuba amb l'anticòs primari en la dilució adequada en solució de saturació, durant 1 h 30 min a T ambient en agitació o bé tota la nit a 4°C.
- Es renta la membrana 3 vegades durant 5 min amb la solució de rentat.
- S'incuba amb l'anticòs secundari conjugat a peroxidasa en la dilució adequada en solució de saturació, durant 1 h a T ambient.

Per al revelat, es barregen 100 µl de solució activadora i 10 ml de solució de luminol immediatament abans d'usar. S'incuba la membrana en aquesta barreja durant 1 min a la foscor, se n'elimina l'excés de líquid, s'embolica amb paper Saran-Wrap i s'exposa amb films d'autoradiografia durant diferents temps per a assegurar una intensitat de senyal correcte. Quan el senyal és molt dèbil, hem utilitzat el kit comercial SuperSignal®West (Cultek S.L.U.).

3.1.4. Anticossos

Tot seguit es presenta una taula amb els diferents anticossos utilitzats en els *Western-Blots* (tal i com es descriu a l'apartat 2.2.1) i les corresponents dilucions:

| ANTICOS | SOLUCIÓ | DILUCIÓ |
|---|--|-----------------|
| sèrum de conill anti-p19 SP1 | TBS-Tween 0,1% + llet desnatada en pols 5% | 1/50 |
| sèrum de conill anti-p19 sobreexpressada SP57 | TBS-Tween 0,1% + llet desnatada en pols 5% (Western) PBS + 3% (Immunocitoquímica) | 1/1000 1/500 |
| sèrum de conill anti-GAPDH | TBS-Tween 0,1% + llet desnatada en pols 5% | 1/500 |
| sèrum de conill anti-TCTP | TBS-Tween 0,1% + llet desnatada en pols 5% | 1/200 |
| sèrum de conill anti-NDPK | TBS-Tween 0,1% + llet desnatada en pols 5% | 1/100 |
| sèrum de conill anti-p-eIF2 α | TBS-Tween 0,1% + BSA 3% | 1/1000 |
| sèrum de conill anti-p-ERK1/2(Thr202/Tyr204) | TBS-Tween 0,1% + BSA 3% | 1/1000 |
| sèrum de ratolí anti-ERK1/2 | TBS-Tween 0,1% + llet desnatada en pols 5% | 1/1000 |
| sèrum de conill anti-p-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) | TBS-Tween 0,1% + BSA 3% | 1/1000 |
| sèrum de conill anti-p-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) | TBS-Tween 0,1% + BSA 3% | 1/1000 |
| sèrum de conill anti-c-Jun (60A8) | TBS-Tween 0,1% + BSA 3% | 1/1000 |
| sèrum de conill anti-p73 | TBS-Tween 0,1% + llet desnatada en pols 5% | 1/100 |
| sèrum de conill anti-FoxO1 | TBS-Tween 0,1% + BSA 3% | 1/1000 |
| sèrum de ratolí anti-p-p70S6K | TBS-Tween 0,1% + BSA 3% | 1/1000 |
| sèrum de conill anti-Src | TBS-Tween 0,1% + llet desnatada en pols 5% | 1/1000 |
| sèrum de conill anti-p-Src (Tyr527) | TBS-Tween 0,1% + llet desnatada en pols 5% | 1/1000 |
| sèrum de conill anti-p-mTOR (Ser2448) | TBS-Tween 0,1% + BSA 3% | 1/1000 |
| sèrum de conill anti-Akt | TBS-Tween 0,1% + BSA 3% | 1/1000 |
| sèrum de conill anti-p-Akt (Ser473) | TBS-Tween 0,1% + BSA 3% | 1/100 |
| sèrum de conill anti-p-Akt (Thr308) | TBS-Tween 0,1% + BSA 3% | 1/100 |
| sèrum de conill anti-nm23-H1 | TBS-Tween 0,1% + llet desnatada en pols 5% | 1/100 |
| sèrum de conill anti-4EBP1 | TBS-Tween 0,1% + BSA 3% | 1/1000 |
| sèrum de conill anti-p-4EBP1 (Thr37/46) | TBS-Tween 0,1% + BSA 3% | 1/1000 |

| | | |
|-------------------------------|---|----------|
| sèrum de cabra anti-profilina | TBS-Tween 0,1% + BSA 3% | 1/200 |
| sèrum de ratolí anti-tubulina | TBS-Tween 0,1% + BSA 3% | 1/200 |
| Ac anti-rabbit* | TBS-Tween 0,1% + llet desnatada en pols 5% | 1/20.000 |
| Ac anti-mouse* | TBS-Tween 0,1% + llet desnatada en pols 5% | 1/10.000 |

Taula 8: Anticossos Western. Anticossos primaris i secundaris utilitzats per als assajos de Western Blot, amb les solucions i dilucions corresponents

3.1.5. Tinció amb Comassie Blue

Aquesta tinció es basa en la unió inespecífica del colorant Comassie Brilliant Blue R. El seu límit de detecció és de 0,3-1 µg/banda de proteïna.

Solució de Comassie Blue: metanol 50 %
Comassie Brilliant Blue R 0,05%
àcid acètic 10%

Solució destenyidora: metanol 40%
àcid acètic 10%

Procediment:

- El gel es cobreix amb solució de Comassie durant 15-20 min.
- Es descarta la solució de Comassie i es destenyeix el gel amb solució destenyidora durant 1 h, fins que les bandes siguin visibles i el fons del gel quedi clar.

El gel es pot guardar en àcid acètic 7%, o es pot assecar entre dos papers de cel·lofana durant 60 min a 80°C.

3.2. Gels bidimensionals

3.2.1. Obtenció del lisat cel·lular

Per obtenir els lisats cel·lulars vam utilitzar el Sample Grinding Kit (Amersham Biosciences) i el 2-D Clean-up kit (GE Healthcare, Amersham, England) per netejar les mostres abans de l'anàlisi proteòmic, seguint les instruccions del fabricant.

3.2.2. Electroforesi bidimensional

L'electroforesi bidimensional es basa en separar les proteïnes d'una mostra complexa segons les seves dues propietats moleculars, una en cada dimensió. El procediment més utilitzat es basa en la separació en una primera dimensió mitjançant isoelectroenfoc (separació de pèptids o proteïnes en un gradient de pH, per tant separació per càrrega pI), i la segona dimensió segons el pes molecular mitjançant electroforesi en poliacrilamida.

| | |
|--------------------------------|--|
| Tampó desnaturalitzant: | Urea 7M Thiourea 2M CHAPS 4% (w/v) |
| Tampó de rehidratació: | Urea 7M Thiourea 2M CHAPS 4% (w/v) Tampó IPG pH3-11NL 0.5% (v/w) Blau de Bromofenol 0.002% (w/v) |
| Tampó SDS d'equilibri: | Tris-HCl 50 mM pH 8.8 Urea 6M Glicerol 30% (v/v) SDS 2% (w/v) Blau de Bromofenol 0.002% (w/v) DTT 1% (w/v)* Iodeacetamida 2.5% (w/v)* |

* afegir després de preparar

Procediment:

- Els pellets resultants es van ressuspèndre en tampó desnaturalitzant
- Es porta 225 µg de cada mostra fins a 450 µl amb tampó de rehidratació
- Es carreguen les mostres dins un gel Immobiline DryStrip de 24 cm (pH 3-11 no linial) mitjançant una rehidratació nativa durant un mínim de 12 hores.
- Després de la rehidratació, es transfereix el gel DryStrip a un sistema Ettan IPGPhor (GE Healthcare, Amersham, England) i es realitza un enfoc isoelèctric de 500 V durant 1 hora, 1.000 V durant 1 hora, i 8.000 V durant 10.5 hores, fins aconseguir 64.000 V/hora.

- Les tires s'equilibren en tampó d'equilibri, al qual s'afegeix el DTT durant 15 min a temperatura ambient, seguit d'una incubació amb iodeacetamida durant 15 min a temperatura ambient.
- Després de l'equilibració, es posen les tires en un gel SDS-PAGE 12.5% (w/v) i es separen les proteïnes en la segona dimensió utilitzant la unitat de separació Ettan DALT II (GE Healthcare, Amersham, England) a 0.2 W/gel durant 1 hora, 0.4 W/gel durant una hora i després 20 W/gel fins al final.
- Es tenyeix el gel utilitzant SYPRO Ruby Total Protein Gel Stain (Molecular Probes, Invitrogen, Paisley, Scotland), segons les instruccions del fabricant, i es visualitza amb un aparell Typhoon 9400 Variable Mode Imager (GE Healthcare, Amersham, England).

3.2.3. Spot Picking, Processament proteic i Espectrometria de Masses

Les taques proteiques escollides es tallen del gel, utilitzant un Investigator ProPic Automated 2D Spot Picker i es digereixen amb tripsina utilitzant la ProGest Automated Digestion Unit (ambdues de Perkin Elmer Life Sciences (UK) Ltd., Beaconsfield, England). Els pèptids resultants s'han analitzat mitjançant un espectròmetre de masses 4700 MALDI-TOF-TOF (Applied Biosystems, Foster City, CA) per obtenir el registre peptídic i la informació de la seva seqüència, la qual es va comparar amb diverses bases de dades utilitzant el programa informàtic Mascot (www.matrixscience.com) per a identificar la proteïna present en la taca.

4. Anàlisi i manipulació d'àcids nucleics

4.1. Extracció de RNA total

L'extrema fragilitat del RNA i la presència de RNAses endògenes i exògenes presents en l'ambient fa necessari prendre una sèrie de mesures abans i durant la seva manipulació amb la finalitat d'evitar la contaminació i degradació de la mostra. Per a treballar amb RNA és necessari utilitzar guants i material específic lliure de RNAses. El material de vidre ha d'estar perfectament net i autoclavat, així com les puntes i les

pipetes. Les solucions es preparen a partir d'aigua tractada amb un agent que inactiva les ribonucleases, el DEPC.

L'extracció de RNA total es va dur a terme mitjançant el NucleoSpin[®] RNA II Kit (Macherey-Nagel, BD Biosciences), i per als assaigs de PCR en temps real (Real Time PCR) es va realitzar una digestió addicional amb DNAsa (RQ1 Rnase-Free Dnase, Promega). Per a l'array de miRNA, el RNA total es va extreure amb TRIzol[®] LS Reagent (Invitrogen), seguint les instruccions del fabricant.

4.2. Obtenció de DNA plasmídic

4.2.1. Minipreparacions

Per a l'obtenció del DNA plasmídic es va utilitzar el kit NucleoSpin[®] (Macherey-Nagel), partint de 7 ml de cultiu bacterià.

4.2.2. Maxipreparacions

Per a l'obtenció del DNA plasmídic a gran escala es va utilitzar el kit NucleoBond[®] PC 500 (Macherey-Nagel), optimitzat amb el NucleoBond[®] Finalizer (Macherey-Nagel).

4.3. Subclonatge de fragments de DNA en plasmidis

4.3.1. Reaccions de modificació del DNA

En la realització dels subclonatges s'han emprat les següents reaccions de modificació del DNA: digestió amb enzims de restricció, fosforilació, desfosforilació i lligació. Els protocols utilitzats són els descrits als manuals *Molecular Cloning: A Laboratory manual* (Sambrook, 1989) i *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel i col., 1998), tenint en compte, a més a més, les recomanacions dels fabricants per a cadascun dels productes utilitzats.

4.3.2. Electroforesi en gel d'agarosa no desnaturalitzant

Un cop finalitzada la reacció de PCR el producte d'amplificació es detecta en un gel d'agarosa no desnaturalitzant que separa els fragments de DNA en funció de la seva grandària. El DNA es visualitza per tinció amb bromur d'etidi, un potent agent mitògen que s'intercala en els àcids nucleics.

Material:

- Tampó TAE 1x
- Tampó de càrrega 1x
- Agarosa
- Cubeta d'electroforesi
- Transil·luminador UV

Procediment:

- Preparar una solució d'agarosa al 0,8-1,2 % (en funció de la mida de la banda que desitgem veure) en tampó TAE 1x.
- Dissoldre al microones, refredar i afegir el bromur d'etidi a una concentració 0,5 µg/µl.
- Un cop gelificat, es carrega la mostra amb el tampó de càrrega
- El gel s'observa en un transiluminador de llum ultraviolada.

La radiació ultraviolada de 260 nm absorbida pels àcids nucleics es transmet al bromur d'etidi emetent com a resultat fluorescència a 590 nm que és proporcional a la quantitat d'àcid nucleic present.

4.3.3. Purificació de DNA a partir de gels d'agarosa

El mètode emprat està basat en la utilització d'una resina que uneix el DNA. S'ha purificat amb el kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) seguint les instruccions del fabricant.

4.3.4. Preparació i transformació de cèl·lules competents d'*E.coli*

El mètode utilitzat es basa en una modificació del descrit per Ausubel (1998) el qual permet obtenir una eficàcia de transformació al voltant de 10^5 - 10^6 cfu/ μ g de DNA mitjançant el procés de xoc tèrmic.

Solució TFB: K-MES 10 mM pH 6.20
 RbCl 100 mM MnCl₂·4H₂O 45 mM
 CaCl₂·2H₂O 10 mM
 Hexamine Cobalt (III) Chloride 3 mM
 1 M MES
 S'ajusta a pH 6,3 amb KOH i s'autoclava

Protocol de preparació de cèl·lules competents:

- Inocular un minicultiu de 5 ml de SOB a partir d'un glicerinat de la soca d'*E.coli* que ens interessi (en el nostre cas DH5 α o XLBlue) i incubar o/n a 30°C.
- Posar 200 ml de SOB en un erlenmeyer d'1 l, i afegir 12 ml de NaCl 5M. Inocular-hi el cultiu o/n de 5 ml.
- Incubar a 30 °C a 200 rpm fins que s'arribi a una D.O.₅₅₀=0,5 (3-4 h)
- Centrifugar el cultiu 15 min a 4°C a 1000 g.
- Ressuspendre suaument el sediment en 20 ml de tampó TFB fred, i incubar en gel 15 min.
- Preparar un bany de gel sec/ EtOH. Quan estigui viscos, posar-hi vials destapats en una barqueta flotant (assegurar-se que el EtOH no entra en els vials).
- Afegir 700 μ l de DMSO a la suspensió cel·lular, i incubar en gel 10 - 15 min.
- Aliquotar 1 ml de suspensió cel·lular en els vials i tapar-los durant encara estan al bany. Guardar a -70°C.

Transformació de cèl·lules competents:

- Descongela els vials amb les cèl·lules competents suaument, i quan encara està turbi aliquotar 100 μ l de cèl·lules en un eppendorf amb la quantitat de DNA adequada (25-50 ng de DNA plasmídic).
- Mesclar bé (sense vortejar) i incubar en gel durant 15 min.
- Incubar 90 sec. a 42°C (xoc tèrmic).

- Posar els tubs en gel durant 2 min.
- Afegir 800 µl de medi SOC, incubar en agitació 1 h a 37°C (opcional) i plaquejar en plaques de LB amb el corresponent antibiòtic.
- Incubar a 37°C o/n en posició invertida.

4.4. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

En aquest treball experimental es van seguir els protocols generals descrits a Ausubel (1998) per a la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis i col., 1986) adaptant-los a les nostres necessitats d'amplificació de fragments de DNA.

4.4.1. Condicions generals de PCR

Les condicions generals de PCR emprades en aquest treball es descriuen a continuació:

| | |
|--|----------------------------|
| DNA motllo | 20 ng |
| Tampó PCR 10X (amb MgCl ₂ 2 mM) | 2,5 µl |
| dNTPs 10 mM | 0,5 µl |
| Encebadors 10 µM | 0,5 µl de cada |
| DNA Taq polimerasa (Pfu 2,5U/µl) | 1 µl |
| H ₂ O | Fins a 25 µl (volum final) |

Es van mesclar tots els components indicats i es van mantenir a 4°C fins a programar el termociclador. Els cicles de PCR habituals van ser:

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| Desnaturalització inicial: 3' a 93°C | |
| Desnaturalització: 2' a 94°C | 30 cicles |
| Anellament: 40" a T_p °C | |
| Extensió: n" a 72°C | |
| Extensió final: 5' a 72°C | |

Taula 9: Esquema dels cicles de PCR. On T_p és la temperatura específica per a cada parell d'encebadors i n el temps d'extensió (es calcula que es necessita 1' per cada 1000 pb).

4.4.2. Clonatge de fragments de DNA amplificats per PCR

Els fragments de DNA resultants de la PCR es van purificar retallant el producte d'interès després de la seva resolució en gels d'agarosa. El producte de PCR s'ha purificat amb el kit GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) seguint les instruccions del fabricant.

4.4.3 RT-PCR

La reacció de RT-PCR permet analitzar l'expressió d'un determinat gen tot retrotranscrivint els seus transcrits (mRNA) a cDNA, per després utilitzar-lo com a motlle en una reacció de PCR convencional.

La síntesi de cDNA de primera cadena s'ha realitzat a partir de RNA total, utilitzant el kit SuperScriptTM III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR Reverse Transcriptase (Invitrogen). L'enzim retrotranscriptasa utilitzat en aquest kit prové del virus de la leucèmia murina de Moloney (M-MLV), però amb una menor activitat RNasa H (l'activitat RNasa H present en alguns enzims degrada específicament els híbrids RNA:DNA) i una major estabilitat tèrmica. Es parteix d'1 µg de RNA total i s'utilitzen hexanucleòtids a l'atzar com a encebadors (s'uneixen a diversos llocs del RNA i generen cDNA curts, per tant són ideals per evitar estructures secundàries en el motlle i a més a més transcriuen de forma més eficaç les regions 5' dels mRNA).

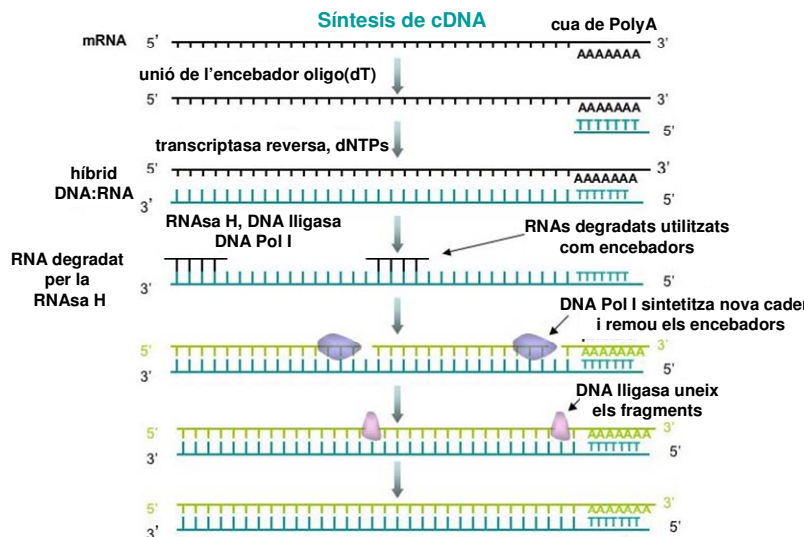


Fig. 52: Síntesi de cDNA. Esquema de la síntesi de cDNA a partir de RNA utilitzant Oligo dT

4.4.4. Reacció de PCR en Temps Real (Real-Time PCR)

En la PCR a temps real, el producte de PCR s'analitza en uns cicles en els que encara hi ha una relació lineal entre el producte de partida i la quantitat d'amplicó sintetitzat. La PCR a temps real permet la detecció del producte de PCR a mida que aquest s'acumula, i per tant, proporciona un mètode molt sensible per a la quantificació del nombre de còpies d'una mostra o la comparació dels nivells d'expressió entre mostres diferents.

Les reaccions de PCR en temps real venen caracteritzades pel cicle en què l'amplificació d'un determinat producte es detecta per primer cop. La PCR en temps real permet tant una quantificació absoluta del número de còpies de cada missatger com una quantificació relativa, basada en el paràmetre C_T (cicle llindar o *threshold cycle*), el qual es fixa com el cicle en què la fluorescència supera un llindar prèviament fixat (*threshold*). Per tant, s'ha d'utilitzar un control endogen com a element normalitzador. La relació entre el C_T de la diana i el del control endogen proporciona un valor de C_T normalitzat (C_{TN}) de la diana, que serveix per estandaritzar la quantitat del cDNA afegit a la reacció.

Els *primers* contra els exons E3-IDX, E4A-E4B, E3-E4A i GAPDH (control endogen) van ser dissenyats per TaqMan[®] Gene Expression Assays (Applied Biosystems). Aquest sistema es basa en la utilització d'una sonda consistent en un oligonucleòtid que porta unides dos tipus de molècules: un marcador fluorescent (o *reporter*) al seu extrem 5' i un reductor de l'emissió (o *quencher*) a l'extrem 3'. Mentre la sonda es troba intacta, la proximitat del *quencher* redueix enormement la fluorescència emesa pel *reporter* pel fenomen de FRET (*Fluorescence resonance energy transfer*). A mesura que la Taq DNA polimerasa allarga el *primer*, l'activitat 5' nucleasa d'aquesta degrada la sonda, que es troba unida entre els dos *primers*. D'aquesta manera els dos fluorocroms es separen, incrementant així el senyal del *reporter*. A cada cicle hi ha més molècules de *reporter* alliberades, produint-se un augment de la fluorescència proporcional a la quantitat d'amplicó generat.

Materials:

- Aparell ABI PRISM 7700 Sequence Detection System
- Sondes TaqMan[®] i primers
- TaqMan[®] Universal PCR Master Mix
- ABI PRISM Optical Adhesive Cover Starter Pack
- ABI PRISM 96-well Optical Reaction Plate with Barcode

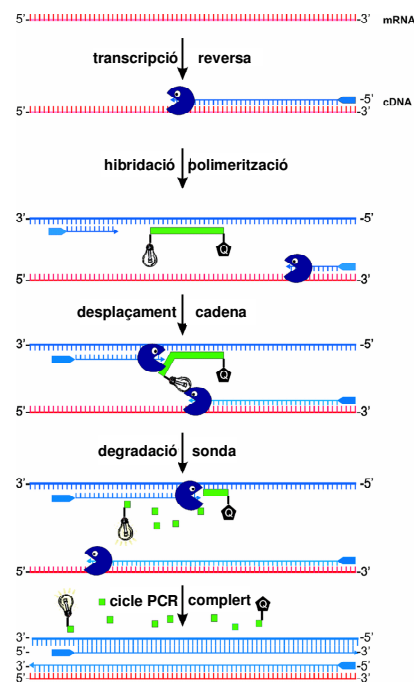


Fig. 53: Principi d'acció de les sondes TaqMan. La fluorescència s'incorpora a la reacció de PCR pel mètode de l'assaig 5' nucleasa que utilitza una sonda i uns primers específics per la seqüència que es vol detectar. La sonda i els primers s'uneixen al cDNA i comença la polimerització. Quan l'enzim arriba a la sonda, l'activitat 5' nucleasa de la polimerasa la desplaça i l'acaba trencant. Això fa que el fluorocrom que emet la fluorescència (R, *reporter*) se separi de l'altre fluorocrom (Q, *quencher*) i que s'emeti la fluorescència. A mesura que es van sintetitzant noves cadenes de DNA l'emissió de fluorescència augmenta i queda enregistrat en l'aparell, donant la mesura de fluorescència a cada cicle de la PCR.

Les condicions generals de Real-Time PCR emprades en aquest treball es descriuen a continuació:

| | |
|---------------------------------------|----------------------------|
| cDNA | 9 µl (30 ng del RNA total) |
| TaqMan® Universal PCR Master Mix | 10 µl |
| 20X TaqMan® Gene Expression Assay Mix | 1 µl |

Es van mesclar tots els components indicats i es van mantenir a 4°C fins a programar el termociclador. Els cicles de PCR habituals van ser:

| | |
|---------------------------------------|-----------|
| Desnaturalització inicial: 10' a 95°C | |
| Desnaturalització: 15" a 95°C | 30 cicles |
| Anellament/Extensió : 1' a 60°C | |

Taula 10: Esquema dels cicles de PCR en Temps Real.

* Vam calcular el llindar òptim en 0,4, i els càlculs s'han realitzat segons el $\Delta\Delta C_T$ method (User Bulletin #2 ABI Prism 7700 Sequence Detection System, December 11, 1997).

Tal com s'ha comentat prèviament aquest mètode es basa en el càlcul de la relació entre el C_T de la diana i el del control endogen, que serveix per a estandaritzar la quantitat de RNA o DNA afegit a la reacció. Tot i això, aquest valor és un valor sense cap tipus d'unitat que pot ser utilitzat per a la comparació relativa de la quantitat de la diana entre diferents mostres. Una forma d'aconseguir-ho és designar una de les mostres com a calibrador. El calibrador no és més que una mostra que serveix com a base per a comparar els resultats, és a dir, és el que proporciona el valor 1 d'expressió.

La quantitat de la diana, normalitzada al control endogen i relativa al calibrador, ve donada per:

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$

$$\text{on } \Delta C_T = C_T \text{ diana} - C_T \text{ control endogen}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ mostra} - \Delta C_T \text{ calibrador}$$

L'error estàndard (SE) de ΔC_T pot ser calculat com:

$$\sqrt{(SE_{\text{diana}})^2 + (SE_{\text{control}})^2}$$

Sempre i quan el nombre de rèpliques sigui el mateix pels dos elements. El càlcul de $\Delta\Delta CT$ no és més que una resta d'una constant arbitrària, per tant, el SE de $\Delta\Delta CT$ és la mateixa que la de $\Delta\Delta CT$ de la diana.

4.5. Microarrays de DNA

La tecnologia de microxips de DNA és una de les eines més poderoses que disposa actualment la genòmica per tal d'obtenir informació sobre les funcions dels diferents gens, conèixer en quins processos participen, de quina manera estan regulats, la interacció amb altres productes gènics, com varien els nivells d'expressió entre diferents tipus cel·lulars i estadis, i com varia l'expressió gènica sota diferents condicions ambientals, entre d'altres.

Els microarrays permeten la quantificació relativa de l'expressió gènica, amb l'avantatge d'analitzar centenars o milers de gens alhora. El concepte bàsic dels arrays és la immobilització de fragments coneguts de DNA (sondes) en suports sòlids, amb la posterior unió de les seqüències complementaries d'aquests àcids nucleics presents en la mostra biològica d'interès.

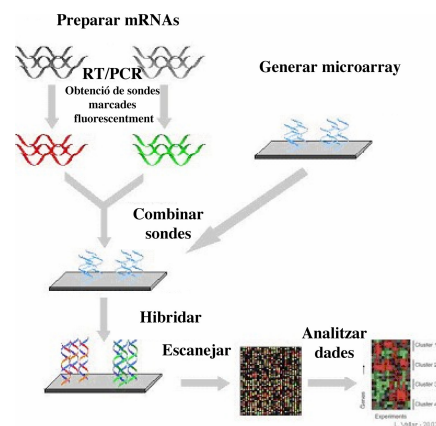


Fig. 54: Incubació d'arrays. Esquema del protocol d'incubació d'un array.

Existeixen dos tipus principals de microarrays que es diferencien en funció del mètode de fabricació i de la natura de l'àcid nucleic immobilitzat, els microarrays de DNA i els microarrays d'oligonucleòtids.

- Els **microarrays d'oligonucleòtids** es sintetitzen per fotolitografia, que consisteix en la síntesi *in situ* d'oligonucleòtids de 25 bases. En la síntesi es parteix d'una superfície de vidre coberta de quars amb un compost sensible a la llum que evita la unió del primer nucleòtid de la sonda. L'emascament litogràfic s'utilitza per a bloquejar o permetre la transmissió de la llum en localitzacions específiques del suport activant així el compost químic. A continuació la superfície s'incuba amb una solució que conté el nucleòtid d'interès que s'acoblarà només en aquelles regions on el vidre ha estat desprotegit per il·luminació. El nucleòtid presenta també un grup de protecció sensible a la llum, de manera que el cicle es va repetint. Així, es van sintetitzant les sondes mitjançant cicles de química combinatòria. Aquesta tecnologia requereix una infraestructura molt sofisticada i la seva utilització, pel moment, està limitada a unes poques empreses especialitzades entre les que destaca Affymetrix.
- Els **microarrays de DNA** es sintetitzen generalment per impressió del DNA en superfícies de vidre recobertes químicament per a permetre la unió del DNA. Aquesta unió pot ser iònica (amines o lisines) o covalent (epòxids o aldehids). El DNA utilitzat prové de productes de PCR, de 500 a 2500 bases, que són purificats per tal d'eliminar les sals, els *primers* i les proteïnes presents en la reacció de PCR. Cada punt de l'array, el que anomenarem sonda, es genera per la deposició de pocs nanolitres del producte purificat. En funció del mètode d'impressió utilitzat el diàmetre de la sonda varia entre 100 i 300 µm. En aquest tipus de microarrays es realitza una hibridació per competència entre la mostra d'interès i una de referència, marcades cadascuna amb un fluorocrom diferent (normalment Cy3 i Cy5).

Tanmateix, tot experiment de microarray consta de diversos passos comuns:

1. **Aïllament del RNA** de les mostres biològiques
2. **Generació de les dianes marcades.** Per a cada hibridació calen de 10 a 30 µg de diana marcada. En molts casos no es disposa de tanta quantitat de mostra, pel que és recomanable un primer pas d'amplificació del RNA (aRNA). A continuació s'efectua una retrotranscripció del aRNA amb l'objectiu d'obtenir les sondes de DNA marcades fluorescentment.
3. **Hibridació de les sondes marcades.** El protocol d'hibridació utilitzat varia en funció de la longitud de les sondes, del tipus d'array, de la química d'immobilització utilitzada i del tipus de diana marcada.
4. **Detecció del senyal i anàlisi de les dades.** Els senyals dels microarrays es detecten per escaneig, utilitzant un lector de fluorescència. Aquests escàners porten associat un *software* que permet la identificació de les sondes individuals i la mesura de la intensitat de cadascuna. Les dades obtingudes han de ser normalitzades amb la finalitat d'ajustar les diferències d'intensitat. A partir d'aquí ja es poden calcular els canvis d'expressió de cada gen. L'elevada quantitat de dades que es generen fa necessària la utilització de diversos programes informàtics per tal de facilitar aquest procés.
5. **Validació** de les dades de l'array mitjançant tècniques alternatives.

En aquesta tesi s'ha utilitzat un microarray d'Agilent (G4110B) que conté 22.000 gens humans.

En el nostre assaig, cèl·lules HeLa van ser transfectades amb pRK5, pRK5-p19 o pRK5-p19 W164A durant 24 h. La extracció de RNA es va realitzar tal com es descriu a l'apartat 3.1. Seguidament es va quantificar amb el NanoDrop[®] ND-1000 Spectrophotometer i es va enviar al servei de microarrays del Centre de Regulació Genòmica (CRG) de Barcelona. Allí es va procedir al seu anàlisi amb el Bioanalyzer 2100 (Agilent Tech., Santa Clara, CA, USA) per a comprovar-ne la qualitat.

Els RNAs dels diferents tractaments es van hibridar seguint la tècnica del *dye-swap* o intercanvi de fluorocrom, en la qual s'hibriden dos microarrays per comparar una mostra i un control o referència: si en una del les hibridacions marquem la mostra amb Cy3 i la referència amb Cy5, en l'altra ho farem a l'inversa. Això permet tenir dades replicades alhora que s'adreça el problema de l'esbiaix de fluorocroms, produït per les diferències en la incorporació dels mateixos i en les seves propietats.

Les mostres de cèl·lules HeLa transfectades amb el vector codificant per la proteïna p19 o p19mut es van comparar amb la mostra control, cèl·lules transfectades amb el vector buit (pRK5, un vector d'expressió en mamífers induïble per tet). Es van hibridar un total de 12 microarrays humans d'oligonucleòtids 1A v2 d'Agilent (G4110B) amb unes 22.000 sondes seguint les recomanacions del fabricant: 6 p19 *versus* control i 6 p19mut *versus* control.

Es van amplificar 500 ng de RNA total de cada mostra amb transcriptasa reversa Oligo-dT-T7, i es va marcar per transcripció *in vitro* amb T7 RNA polimerasa en presència de Cy5-CTP o Cy3-CTP utilitzant el *Low Input RNA labelling kit* (Agilent), i es va netejar mitjançant *RNAeasy columns* (Quiagen). Després de la fragmentació, es van co-hibridar 750 ng de cRNA marcat de cada una de les dues mostres en *In situ hybridation buffer* (Agilent) durant 18 h a 60°C, i es van rentar durant 10 min en 6X SSC + 0,005% Triton X-102 a temperatura ambient, i 5 min en 0,1X SSC + 0,005% Triton X-102 a 4°C, seguit d'un secar per centrifugació 5 min a 1.000 rpm.

Les imatges s'han generat en un escàner confocal de microarrays (Agilent) a una resolució de 10 µm, i s'han quantificat utilitzant el programa GenePix 6.0. Els espots amb intensitats de senyal dues vegades superior al soroll de fons, no saturats i no detectats pel GenePix van ser considerats fiables i amb un valor d'1 per a normalitzar-los, mentre que a la resta se'ls va donar el valor de 0,01. Les intensitats obtingudes es van sotstreure del nivell de fons local i els quocients log2 es van normalitzar en una corba dependent d'intensitat amb un paràmetre span 0,3. Els quocients normalitzats es van escalar entre els arrays per obtenir dades comparables.

Les dades no tractades es van processar mitjançant el programa MMARGE (Lozano *et al.*, no publicat), una pàgina web implementada de Limma, una llibreria d'anàlisi de microarrays desenvolupada dins el projecte Bioconductor en un ambient estadístic R (Gentleman *et al.* 2004). Per a comparar les mostres p19 *versus* p19mut, es va aplicar un test contrast utilitzant els quocients log₂ normalitzats de les hibridacions dels 6 microarrays de cada tipus com a replicats contra la mateixa referència control comuna, mitjançant BANAL, una web implementada de Limma (Lozano *et al.*, no publicat).

4.5.1 Microarray de miRNA

El processament dels microarrays de miRNA es van realitzar tal com es descriu anteriorment (Liu *et al.* 2004). Es van hibridar 5 µg de RNA total als xips de miRNA, els quals contenen sondes de 40-mer oligonucleòtids específiques de gens humans, unides a una matriu polimèrica per tecnologies de contacte i unions covalents. Els microarrays es van hibridar en 6X SSPE (0,9 M NaCl/60 mM NaH₂PO₄·H₂O/8 mM EDTA, pH 7.4)/30% formamida a 25°C durant 18 h, es van rentar en 0,75X TNT (Tris·HCl/NaCl/Tween 20) a 37°C durant 40 min, i es van processar utilitzant un mètode de detecció directe amb estreptavidina conjugada al fluorocrom Alexa Fluor 647 dels transcrits que contenen biotina. Els portaobjectes processats es van escanejar mitjançant un escàner de microarrays, amb un làser de 635 nm, un PMT fixat, i una resolució de 10 mm. Les dades es van confirmar més tard mitjançant anàlisis de Northern Blot.

Les imatges es van analitzar utilitzant el programa GenePix Pro. Es va restar el soroll de fons de les mitjanes dels valors dels punts replicats de cada miRNA, aquests es van normalitzar i es va procedir a un anàlisi posterior. Finalment es van seleccionar els miRNA mesurats en almenys la més petita de les dues classes en un rang de dades. Els punts no rellevants els vam donar un valor de 4,5 abans dels anàlisis estadístics, valor que correspon a la mitjana de la intensitat mínima detectada en els experiments. La nomenclatura dels miRNAs està basada del Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>) i de la base de dades de miRNAs del Sanger Center (Griffiths-Jones 2004). Els miRNAs expressats diferencialment es van identificar utilitzant un test *t* amb un anàlisi de significància dels microarraus (SAM) (Tusher *et al.* 2001).

5. Microscopia

5.1. Fixació i muntatge de les cèl·lules

Hem preparat les mostres per a visualitzar les cèl·lules al microscopi fixant-les amb paraformaldehid 4% durant 30 min a temperatura ambient. Després es renten 2 cops amb PBS, i es guarden en PBS azida 0,01% a 4°C.

Per a muntar les preparacions, es renta cada lletia 2 cops amb PBS, es passa per aigua, etanol i es deixa assecat. Després muntem les lleties amb Immuno Floure Mounting Medium (ICN Biomedicals, Inc.).

5.2. Immunocitoquímica

- Es renten les lleties on hem crescut les cèl·lules 2 cops amb PBS (prèviament hem fixat les cèl·lules amb paraformaldehid 4%).
- S'afegeix 150 µl de NaBH₄ 1 mg/ml en PBS (ha de ser fresc), per permeabilitzar les cèl·lules. Es deixa 10 min a T ambient.
- Es renta 3 cops amb PBS.
- S'afegeix 300 µl de PBS/Tritó X 100 0,2%, 10 min a T ambient.
- Es renta 3 cops amb PBS.
- S'afegeix 200 µl de BSA 3%/PBS/Tritó X 100 0,2% durant 10 min a T ambient, per bloquejar.
- Es renta 3 cops amb PBS.
- S'incuba amb l'anticòs primari diluït en BSA 3%/PBS durant 45 min a T ambient.
- Es renta 3 cops amb PBS.
- S'incuba amb l'anticòs secundari (en cas que sigui una detecció indirecta) diluït en 3%BSA/PBS durant 30 min a T ambient.
- Es renta 3 cops amb PBS.

| ANTICOS | DILUCIÓ |
|---|---------|
| sèrum de ratolí anti-p73 | 1/500 |
| sèrum de conill anti-p19 sobreexpressada SP57 | 1/500 |
| sèrum de conill anti-p19 SP1 | 1/50 |
| sèrum de conill anti-p19 SP1 Non Immune Serum | 1/50 |
| sèrum de ratolí anti-PKC | 1/50 |
| sèrum de cabra Alexa Fluor [®] 488 F(ab') ₂ anti-conill | 1/5000 |
| sèrum de cabra Alexa Fluor [®] 555 F(ab') ₂ anti-ratolí | 1/5000 |

Taula 11: Anticossos utilitzats en els assajos d'immunocitoquímica.

5.3. Fluorescence resonance energy transfer (FRET)

La tècnica FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) es basa en un procés fotofísic que consisteix en la transferència d'energia entre estats singlet des d'un fluoròfor (donador d'energia) a un altre cromòfor (acceptor d'energia). L'energia és transmesa a través d'una interacció dipol-dipol entre ambdues molècules, sense que es produeixi l'emissió de cap fotó. Així doncs, l'excitació del donador pot produir emissió de llum per part de l'acceptor, amb pèrdua d'emissió del donador.

Aquesta tècnica s'utilitza per quantificar la distància entre dues molècules conjugades a fluorocroms diferents (Clegg, 1996), i requereix que:

- El donador sigui fluorescent el temps suficient.
- La transferència no impliqui l'actual reabsorció de llum per part de l'acceptor.
- L'espectre d'emissió del fluorocrom de la molècula donadora es superposi a l'espectre d'excitació de la molècula acceptora.
- La distància entre el donador i l'acceptor sigui de 1-10 nm.

La interacció entre les dues molècules es detecta excitant amb la longitud d'ona corresponent a l'espectre d'excitació del donador, i detectant l'emissió de llum a la longitud d'ona corresponent a l'espectre d'emissió de l'acceptor. Quan es dona FRET, l'emissió del donador disminueix i l'emissió de l'acceptor incrementa. Les mesures de

FRET requereixen certes correccions en base del *cross talk* (la detecció de fluorescència del donador mitjançant el filtre d'emissió de l'acceptor i a l'inversa) i les concentracions de donador i acceptor, així com el càlcul de la fluorescència *background* i l'autofluorescència. En certs casos també es requereix fer un “blanqueig” (*photobleaching*) de la mostra.

Les construccions plasmídiques que hem utilitzat en les transfeccions han estat:

Interacció p19/RACK1

- pEYFP-C1-p19
- pECFP-C1-RACK1
- pEYFP-C1-p19 / pECFP-C1-RACK1
- pEYFP-C1 / pECFP-C1-RACK1

Interacció p19/p73 α

- pEYFP-C1-p19
- pECFP-C1-p73 α
- pEYFP-C1-p19 / pECFP-C1-p73 α
- pEYFP-C1 / pECFP-C1-p73 α

Tots els càlculs s'han realitzat segons els procediments descrits per Gerald W. Gordon (Biophysical Journal, vol. 74, 1998).

5.4. Observació al microscopi

Un cop acabada la corresponent manipulació de les cèl·lules, es procedeix a la observació de les mostres al microscopi *Zeiss AxioPhot*. Les longituds d'ona d'emissió i d'excitació dels diferents fluorocroms utilitzats en aquest treball es descriuen a la següent taula:

| FLUOROCROM | EXCITACIÓ | EMISSIÓ |
|------------------------------|------------------|----------------|
| Alexa Fluor [®] 488 | 495 | 519 |
| Alexa Fluor [®] 555 | 555 | 568 |
| eGFP | 488 | 522/35 |
| eYFP | 513 | 527 |
| eCFP | 430 | 475 |

Taula 12: Fluorocroms utilitzats en els assaigs de FRET. Mesures en nanòmetres

En el cas de microscòpia confocal, les imatges s'han adquirit amb el Leica TCS SP *confocal laser scanning microscope* (Heidelberg, Alemanya), del servei de microscòpia de l'IBMB-CSIC de Barcelona, fixant la longitud d'ona d'emissió d'un làser d'argó a 488 nm. Durant l'escanejat, per visualitzar la fluorescència del fluorocrom Alexa Fluor[®] 488, es va utilitzar un filtre triple-dicroic (TD 488/543/633) i la finestra d'emissió es va fixar a 490-540 nm. Es van realitzar seccions òptiques seriadades i les imatges confocals es van combinar com projeccions x-y. Les imatges amb doble marcatge es van estudiar mitjançant excitació seqüencial de cada làser per evitar fluorescència creuada.

6. Anàlisi de Cicle Cel·lular i Apoptosi per Citometria de Flux

La citometria de flux consisteix en la mesura d'una sèrie de paràmetres de la cèl·lula en un sistema de flux. Les cèl·lules són obligades a passar alineades una a una davant d'un feix de làser mitjançant un flux continu. Cada cèl·lula, a la vegada que dispersa la llum, emet llum fluorescent com a conseqüència de l'excitació del làser a la que és sotmesa. Els paràmetres que s'han mesurat són:

Dispersió frontal de llum làser (FSC): és proporcional a la mida de la partícula analitzada. És recollida i amplificada per un fotodetector amb un filtre de densitat neutra.

Dispersió lateral de llum làser (SSC): és proporcional a la granulositat o complexitat de la partícula analitzada. És recollida i amplificada en direcció perpendicular al feix del làser mitjançant un fotomultiplicador amb els filtres 488DC + 488BP.

Fluorescència verda: és proporcional als antígens revelats amb un anticòs conjugat a Annexin-FITC (assaigs d'apoptosi) o a la fluorescència de la molècula GFP (assaigs de cicle cel·lular). És recollida i amplificada de forma logarítmica mitjançant un fotomultiplicador amb els filtres 550DC + 525BP.

Fluorescència vermella: és proporcional a la fluorescència de Iodur de Propidi (IP). És recollida i amplificada de forma logarítmica mitjançant un fotomultiplicador amb els filtres 645DC + 675BP.

Llum ultraviolada: és proporcional a la fluorescència blava donada per l'intercalador de la doble cadena de DNA Hoechst 33342 (450 nm).

Els experiments de citometria de fluxe es van realitzar en els serveis científic-tècnics de la UB.

6.1. Determinació de l'apoptosi

La membrana plasmàtica està formada per una bicapa lipídica de distribució asimètrica. En l'apoptosi primerenca es perd l'asimetria en la distribució dels fosfolípids de forma que la fosfatidilserina, que en condicions normals es troba exclusivament en la cara interna, passa a exposar-se a la cara exterior de la membrana. L'anexina V és una proteïna que s'uneix preferentment als fosfolípids carregats negativament, mitjançant una unió reversible i dependent de calci, per la qual cosa en una preparació de cèl·lules no permeabilitzades s'unirà a la fosfatidilserina de les cèl·lules apoptòtiques.

En processos d'apoptosi avançada i necrosi la membrana plasmàtica es deteriora i esdevé permeable a substàncies com el iodur de propidi (IP) que s'intercala en la doble cadena de DNA. La viabilitat cel·lular i el percentatge de cèl·lules apoptòtiques es determina per citometria de flux, mitjançant un doble marcatge amb anexina V conjugada amb FITC (fluorescència verda) i IP (fluorescència vermella). Així s'obté el percentatge de cèl·lules vives (anexina i IP negatives), cèl·lules apoptòtiques primerenques (positives pel marcatge d'anexina i negatives pel d'IP) i cèl·lules amb apoptosi avançada o necrosi (anexina i IP positives).

Procediment:

- Les cèl·lules HeLa es van transfectar amb els corresponents plàsmids, tal com es descriu a l'apartat 1.1.

- Les cèl·lules apoptòtiques foren detectades mitjançant el Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Sigma), seguint les instruccions del fabricant.
- Com a control positiu d'apoptosi, les cèl·lules es van tractar amb Etoposide 100 μM .

Els experiments de citometria van ser realitzats utilitzant un aparell Epics XL flow cytometer (Coulter Corporation, Miami, Florida, USA). L'excitació de la mostra es va dur a terme amb un làser d'argó estàndard de 15 mW a 488 nm.

6.2. Assaigs de cycle cel·lular

La citometria de flux permet determinar el cycle cel·lular mitjançant la determinació de la quantitat de DNA de les cèl·lules. La distribució típica del DNA d'una població cel·lular en creixement està formada per dos pics que corresponen a la fase G_1/G_0 i a la fase G_2/M i una vall corresponent a la fase S. En la fase G_2/M la cèl·lula té el doble de quantitat de DNA que en la fase G_1/G_0 . La fase S correspon a la síntesi de DNA.

La mesura de la quantitat de DNA es basa en la capacitat dels marcadors fluorescents per unir-s'hi específicament. Les cèl·lules tenyides amb el marcador emeten una fluorescència proporcional al contingut de DNA. L'histograma que s'obté mostra el nombre de cèl·lules respecte a la quantitat de fluorescència. A partir de l'histograma es poden utilitzar diversos mètodes informàtics per a calcular el percentatge de cèl·lules en cada fase.

Procediment

- Es van transfectar cèl·lules HeLa amb diferents plasmidis que contenen la seqüència de la molècula GFP, tal i com es descriu a l'apartat 1.1.
- Després les cèl·lules s'incuben amb 2 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33342 durant 2 h.
- Abans de l'anàlisi, es centrifuga les cèl·lules, es renten amb PBS 1x i es ressuspenen a una concentració de 1×10^6 cel/ml en medi DMEM suplementat amb 10% FBS, penicil·lina/estreptomicina i Hoechst 33342 2 $\mu\text{g/ml}$.

Les mostres foren analitzades en un MoFlo flow cytometer (DakoCytomation, Fort Collins, Colorado, USA).

7. Assaigs enzimàtics

7.1. Quantificació de l'activitat telomerasa

L'activitat telomerasa es va determinar mitjançant el TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) seguint les instruccions del fabricant. Aquest assaig combina el protocol d'amplificació de les seqüències repetitives telomèriques (*TRAP, Telomeric Repeat Amplification Protocol*) amb la detecció no-radioactiva dels productes generats per PCR (ELISA).

L'acrònim TRAP dona nom al mètode descrit per *Kim et al.* per a la determinació d'activitat telomerasa tant en teixits com en extractes cel·lulars. El TRAP es basa en l'amplificació, mitjançant una reacció en cadena de la polimerasa (PCR), dels productes resultants de l'activitat telomerasa. Bàsicament consta de dues etapes:

- La telomerasa afageix repeticions telomèriques a l'extrem 3' d'un oligonucleòtid sintètic (**TS**: AATCCGTCGAGCAGAGTT).
- Els productes resultants d'aquesta elongació són amplificats a través d'una PCR, utilitzant el mateix **TS** i un altre oligonucleòtid sintètic (**CX**: CCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA) com a iniciadors.

En el TRAP, primer es dona l'elongació de **TS** per part de la telomerasa present en l'extracte o teixit, que afageix repeticions telomèriques al seu extrem 3'. L'enzim afageix nucleòtids en sèries de 6, de manera que després de cada addició de 6 (una repetició telomèrica), té lloc l'etapa de translocació per tal de poder continuar afegint més repeticions telomèriques. El resultat de tot aquest procés és la generació, després de successives etapes d'addició-translocació, d'un oligonucleòtid de longitud **TS + 6n**. La suma de tots aquests processos que tenen lloc a nivell molecular

durant un assaig TRAP genera una barreja de cadenes nucleotídiques de diferents longituds: **TS**, **TS + 6**, **TS + 12**, **TS + 18**, ... La segona etapa del TRAP consisteix en l'amplificació d'aquestes cadenes mitjançant una reacció de PCR utilitzant la Taq polimerasa com a enzim i **TS** i **CX** com a iniciadors. Aquest últim, **CX**, és un 24-mer de seqüència pràcticament complementària a la telomèrica.

Al llarg dels anys, aquest experiment ha anat incorporant algunes modificacions per tal de millorar-ne els punts més dèbils, i actualment es realitzen el que s'anomenen assaigs TRAP modificats, com en el cas del kit que hem utilitzat. En aquest kit, **TS** es presenta biotinitat en el seu extrem 5'. Així, un cop acabada l'etapa d'amplificació, la barreja de productes obtinguda (**TS + 6n**) s'immobilitza en una placa d'ELISA on cada pou està folrat amb estreptavidina. Posteriorment, els productes resultants de l'elongació de la telomerasa són reconeguts per un anticòs que es troba conjugat a una peroxidasa, que a la vegada metabolitza un substrat generant un producte amb color. Finalment, un lector de plaques ELISA llegeix l'absorbància de la dissolució final, resultat del producte generat per la peroxidasa. El valor d'absorbància obtingut és proporcional a la quantitat de producte elongat per la telomerasa i posteriorment amplificat. En absència de telomerasa, el producte amplificat no és reconegut per l'anticòs, de manera que la reacció de la peroxidasa no té lloc, i no apareix coloració.

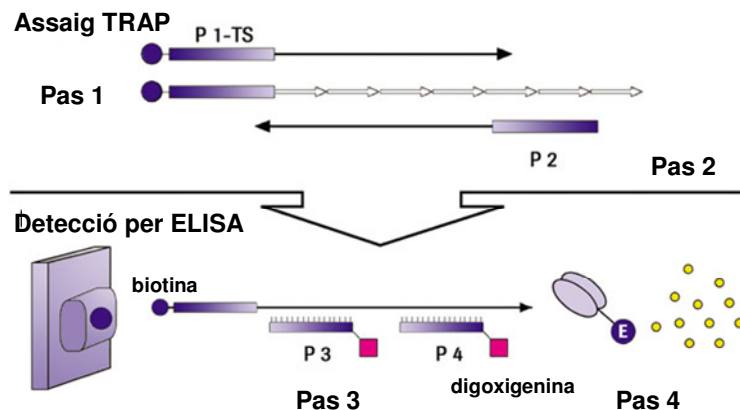


Fig. 55: Assaig TRAP. Aquest assaig combina el protocol d'amplificació de les seqüències repetitives telomèriques (*TRAP*, *Telomeric Repeat Amplification Protocol*) amb la detecció no-radioactiva dels productes generats per PCR (ELISA).

En el nostre assaig, cèl·lules HeLa van ser transfectades amb pRK5, pRK5-p19 o pRK5-p19 W164A durant 24 h. Després, les cèl·lules van ser tractades tal com indica el protocol, i la mostra resultant va ser mesurada en un lector de plaques a 450 nm. Cada assaig es va realitzar per triplicat, i es va utilitzar el test de t-student per fer l'anàlisi estadístic de les dades.

7.2. Quantificació de l'activitat PKC

L'activitat de les PKCs es va determinar utilitzant el MESACUP Protein Kinase Assay Kit (MBL, Medical & Biological Laboratories CO., LTD), el qual es basa en un mètode no radioisotòpic per mesurar l'activitat de proteïnes cinases depenents de AMPc (PKA) i de les proteïnes cinases C (PKC). El kit és un assaig d'ELISA que utilitza un pèptid sintètic i un anticòs que reconeix la forma fosforilada del pèptid. Així, si l'extracte proteic conté PKCs actives, aquestes fosforilaràn el pèptid i l'anticòs el podrà reconèixer.

En el nostre assaig, cèl·lules HeLa van ser transfectades amb pRK5, pRK5-p19 o pRK5-p19 W164A durant 24 h. Després, les cèl·lules van ser tractades tal com indica el protocol, i la mostra resultant va ser mesurada en un lector de plaques a 492 nm. Cada assaig es va realitzar per triplicat, i es va utilitzar el test de t-student per fer l'anàlisi estadístic de les dades.

BIBLIOGRAFIA

A

Abram, C.L. and Courtneidge, S.A. (2000). "Src family tyrosine kinases and growth factor signaling." Exp Cell Res **254**(1): 1-13.

Achsel, T. and Shimura, Y. (1996). "Factors involved in the activation of pre-mRNA splicing from downstream splicing enhancers." J Biochem **120**(1): 53-60.

Adams, B.D., Furneaux, H. and White, B.A. (2007). "The micro-ribonucleic acid (miRNA) miR-206 targets the human estrogen receptor-alpha (ERalpha) and represses ERalpha messenger RNA and protein expression in breast cancer cell lines." Mol Endocrinol **21**(5): 1132-47.

Aligianis, I.A., Johnson, C.A., Gissen, P., Chen, D., Hampshire, D., Hoffmann, K., Maina, E.N., Morgan, N.V., Tee, L., Morton, J., Ainsworth, J.R., Horn, D., Rosser, E., Cole, T.R., Stolte-Dijkstra, I., Fieggen, K., Clayton-Smith, J., Megarbane, A., Shield, J.P., Newbury-Ecob, R., Dobyns, W.B., Graham, J.M., Jr., Kjaer, K.W., Warburg, M., Bond, J., Trembath, R.C., Harris, L.W., Takai, Y., Mundlos, S., Tannahill, D., Woods, C.G. and Maher, E.R. (2005). "Mutations of the catalytic subunit of RAB3GAP cause Warburg Micro syndrome." Nat Genet **37**(3): 221-3.

Arden, K.C. (2004). "FoxO: linking new signaling pathways." Mol Cell **14**(4): 416-8.

Au, K.S., Rodriguez, J.A., Finch, J.L., Volcik, K.A., Roach, E.S., Delgado, M.R., Rodriguez, E., Jr. and Northrup, H. (1998). "Germ-line mutational analysis of the TSC2 gene in 90 tuberous-sclerosis patients." Am J Hum Genet **62**(2): 286-94.

B

Bar-Sagi, D. (2001). "A Ras by any other name." Mol Cell Biol **21**(5): 1441-3.

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

Barbier, J., Dutertre, M., Bittencourt, D., Sanchez, G., Gratadou, L., de la Grange, P. and Auboeuf, D. (2007). "Regulation of H-ras splice variant expression by cross talk between the p53 and nonsense-mediated mRNA decay pathways." Mol Cell Biol **27**(20): 7315-33.

Belham, C., Wu, S. and Avruch, J. (1999). "Intracellular signalling: PDK1--a kinase at the hub of things." Curr Biol **9**(3): R93-6.

Berget, S.M. (1995). "Exon recognition in vertebrate splicing." J Biol Chem **270**(6): 2411-4.

- Berget, S.M., Moore, C. and Sharp, P.A. (1977). "Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(8): 3171-5.
- Bhaskar, P.T. and Hay, N. (2007). "The two TORCs and Akt." Dev Cell **12**(4): 487-502.
- Black, D.L. (2003). "Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing." Annu Rev Biochem **72**: 291-336.
- Blackburn, E.H. (2000). "The end of the (DNA) line." Nat Struct Biol **7**(10): 847-50.
- Blackburn, E.H. (2001). "Switching and signaling at the telomere." Cell **106**(6): 661-73.
- Blasco, M.A. (2005). "Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond." Nat Rev Genet **6**(8): 611-22.
- Blencowe, B.J., Issner, R., Nickerson, J.A. and Sharp, P.A. (1998). "A coactivator of pre-mRNA splicing." Genes Dev **12**(7): 996-1009.
- Bommer, U.A., Borovjagin, A.V., Greagg, M.A., Jeffrey, I.W., Russell, P., Laing, K.G., Lee, M. and Clemens, M.J. (2002). "The mRNA of the translationally controlled tumor protein P23/TCTP is a highly structured RNA, which activates the dsRNA-dependent protein kinase PKR." Rna **8**(4): 478-96.
- Bommer, U.A. and Thiele, B.J. (2004). "The translationally controlled tumour protein (TCTP)." Int J Biochem Cell Biol **36**(3): 379-85.
- Bos, J.D. and Meinardi, M.M. (1989). "Two distinct squamous cell carcinomas in a psoriasis patient receiving low-dose cyclosporine maintenance treatment." J Am Acad Dermatol **21**(6): 1305-6.
- Brett, D., Pospisil, H., Valcarcel, J., Reich, J. and Bork, P. (2002). "Alternative splicing and genome complexity." Nat Genet **30**(1): 29-30.
- Broccoli, D., Chong, L., Oelmann, S., Fernald, A.A., Marziliano, N., van Steensel, B., Kipling, D., Le Beau, M.M. and de Lange, T. (1997). "Comparison of the human and mouse genes encoding the telomeric protein, TRF1: chromosomal localization, expression and conserved protein domains." Hum Mol Genet **6**(1): 69-76.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J. and Greenberg, M.E. (1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." Cell **96**(6): 857-68.
- Brunori, M., Luciano, P., Gilson, E. and Geli, V. (2005). "The telomerase cycle: normal and pathological aspects." J Mol Med **83**(4): 244-57.

Bumcrot, D., Manoharan, M., Koteliansky, V. and Sah, D.W. (2006). "RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs." Nat Chem Biol **2**(12): 711-9.

Burack, W.R. and Shaw, A.S. (2000). "Signal transduction: hanging on a scaffold." Curr Opin Cell Biol **12**(2): 211-6.

Burgering, B.M. and Kops, G.J. (2002). "Cell cycle and death control: long live Forkheads." Trends Biochem Sci **27**(7): 352-60.

C

Cai, D., McCarron, R.M., Yu, E.Z., Li, Y. and Hallenbeck, J. (2004). "Akt phosphorylation and kinase activity are down-regulated during hibernation in the 13-lined ground squirrel." Brain Res **1014**(1-2): 14-21.

Caloca, M.J., Zugaza, J.L. and Bustelo, X.R. (2003). "Exchange factors of the RasGRP family mediate Ras activation in the Golgi." J Biol Chem **278**(35): 33465-73.

Carmell, M.A., Xuan, Z., Zhang, M.Q. and Hannon, G.J. (2002). "The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis." Genes Dev **16**(21): 2733-42.

Castellano, E., De Las Rivas, J., Guerrero, C. and Santos, E. (2007). "Transcriptional networks of knockout cell lines identify functional specificities of H-Ras and N-Ras: significant involvement of N-Ras in biotic and defense responses." Oncogene **26**(6): 917-33.

Caudevilla, C., Serra, D., Miliar, A., Codony, C., Asins, G., Bach, M. and Hegardt, F.G. (1998). "Natural trans-splicing in carnitine octanoyltransferase pre-mRNAs in rat liver." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12185-90.

Cichowski, K., Santiago, S., Jardim, M., Johnson, B.W. and Jacks, T. (2003). "Dynamic regulation of the Ras pathway via proteolysis of the NF1 tumor suppressor." Genes Dev **17**(4): 449-54.

Clark, F. and Thanaraj, T.A. (2002). "Categorization and characterization of transcript-confirmed constitutively and alternatively spliced introns and exons from human." Hum Mol Genet **11**(4): 451-64.

Clarke, S. (1992). "Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues." Annu Rev Biochem **61**: 355-86.

Clayton, J.E., van den Heuvel, S.J. and Saito, R.M. (2008). "Transcriptional control of cell-cycle quiescence during *C. elegans* development." Dev Biol **313**(2): 603-13.

- Clyde-Smith, J., Silins, G., Gartside, M., Grimmond, S., Etheridge, M., Apolloni, A., Hayward, N. and Hancock, J.F. (2000). "Characterization of RasGRP2, a plasma membrane-targeted, dual specificity Ras/Rap exchange factor." J Biol Chem **275**(41): 32260-7.
- Codony, C., Guil, S., Caudevilla, C., Serra, D., Asins, G., Graessmann, A., Hegardt, F.G. and Bach-Elias, M. (2001). "Modulation in vitro of H-ras oncogene expression by trans-splicing." Oncogene **20**(28): 3683-94.
- Cohen, J.B., Broz, S.D. and Levinson, A.D. (1989). "Expression of the H-ras proto-oncogene is controlled by alternative splicing." Cell **58**(3): 461-72.
- Cohen, J.B. and Levinson, A.D. (1988). "A point mutation in the last intron responsible for increased expression and transforming activity of the c-Ha-ras oncogene." Nature **334**(6178): 119-24.
- Colicelli, J. (2004). "Human RAS superfamily proteins and related GTPases." Sci STKE **2004**(250): RE13.
- Collins, K. and Mitchell, J.R. (2002). "Telomerase in the human organism." Oncogene **21**(4): 564-79.
- Csukai, M., Chen, C.H., De Matteis, M.A. and Mochly-Rosen, D. (1997). "The coatamer protein beta'-COP, a selective binding protein (RACK) for protein kinase Cepsilon." J Biol Chem **272**(46): 29200-6.
- Chang, B.Y., Conroy, K.B., Machleder, E.M. and Cartwright, C.A. (1998). "RACK1, a receptor for activated C kinase and a homolog of the beta subunit of G proteins, inhibits activity of src tyrosine kinases and growth of NIH 3T3 cells." Mol Cell Biol **18**(6): 3245-56.
- Chang, B.Y., Chiang, M. and Cartwright, C.A. (2001). "The interaction of Src and RACK1 is enhanced by activation of protein kinase C and tyrosine phosphorylation of RACK1." J Biol Chem **276**(23): 20346-56.
- Chen, D.B. and Davis, J.S. (2003). "Epidermal growth factor induces c-fos and c-jun mRNA via Raf-1/MEK1/ERK-dependent and -independent pathways in bovine luteal cells." Mol Cell Endocrinol **200**(1-2): 141-54.
- Chow, L.T., Gelinas, R.E., Broker, T.R. and Roberts, R.J. (1977). "An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA." Cell **12**(1): 1-8.

D

- De Laurenzi, V., Raschella, G., Barcaroli, D., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Ranalli, M., Catani, M.V., Tanno, B., Costanzo, A., Levrero, M. and Melino, G. (2000). "Induction of neuronal differentiation by p73 in a neuroblastoma cell line." J Biol Chem **275**(20): 15226-31.
- De Ruiter, N.D., Burgering, B.M. and Bos, J.L. (2001). "Regulation of the Forkhead transcription factor AFX by Ral-dependent phosphorylation of threonines 447 and 451." Mol Cell Biol **21**(23): 8225-35.
- del Peso, L., Hernandez-Alcoceba, R., Embade, N., Carnero, A., Esteve, P., Paje, C. and Lacal, J.C. (1997). "Rho proteins induce metastatic properties in vivo." Oncogene **15**(25): 3047-57.
- Deng, Q., Li, Y., Tedesco, D., Liao, R., Fuhrmann, G. and Sun, P. (2005). "The ability of E1A to rescue ras-induced premature senescence and confer transformation relies on inactivation of both p300/CBP and Rb family proteins." Cancer Res **65**(18): 8298-307.
- Dereure, O. (2006). "[Mutations in H-Ras proto-oncogen in Costello syndrome]." Ann Dermatol Venereol **133**(8-9 Pt 1): 731.
- Derijard, B., Hibi, M., Wu, I.H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M. and Davis, R.J. (1994). "JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain." Cell **76**(6): 1025-37.
- Disatnik, M.H., Hernandez-Sotomayor, S.M., Jones, G., Carpenter, G. and Mochly-Rosen, D. (1994). "Phospholipase C-gamma 1 binding to intracellular receptors for activated protein kinase C." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(2): 559-63.
- Dorn, G.W., 2nd and Mochly-Rosen, D. (2002). "Intracellular transport mechanisms of signal transducers." Annu Rev Physiol **64**: 407-29.
- Downward, J. (2003). "Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy." Nat Rev Cancer **3**(1): 11-22.
- Dreyfuss, G., Kim, V.N. and Kataoka, N. (2002). "Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(3): 195-205.

E

- Ebinu, J.O., Bottorff, D.A., Chan, E.Y., Stang, S.L., Dunn, R.J. and Stone, J.C. (1998). "RasGRP, a Ras guanyl nucleotide-releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs." Science **280**(5366): 1082-6.

El-Naggar, A.K., Lai, S., Clayman, G.L., Mims, B., Lippman, S.M., Coombes, M., Luna, M.A. and Lozano, G. (2001). "p73 gene alterations and expression in primary oral and laryngeal squamous carcinomas." Carcinogenesis **22**(5): 729-35.

Esquela-Kerscher, A. and Slack, F.J. (2006). "Oncomirs - microRNAs with a role in cancer." Nat Rev Cancer **6**(4): 259-69.

Esteban, L.M., Vicario-Abejon, C., Fernandez-Salguero, P., Fernandez-Medarde, A., Swaminathan, N., Yienger, K., Lopez, E., Malumbres, M., McKay, R., Ward, J.M., Pellicer, A. and Santos, E. (2001). "Targeted genomic disruption of H-ras and N-ras, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development." Mol Cell Biol **21**(5): 1444-52.

F

Fang, J.Y. and Richardson, B.C. (2005). "The MAPK signalling pathways and colorectal cancer." Lancet Oncol **6**(5): 322-7.

Feig, L.A. (1999). "Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases." Nat Cell Biol **1**(2): E25-7.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Nature **391**(6669): 806-11.

Frantz, S.A., Thiara, A.S., Lodwick, D., Ng, L.L., Eperon, I.C. and Samani, N.J. (1999). "Exon repetition in mRNA." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(10): 5400-5.

Frischmeyer, P.A. and Dietz, H.C. (1999). "Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease." Hum Mol Genet **8**(10): 1893-900.

Fu, X.D. (1995). "The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors." Rna **1**(7): 663-80.

G

Gachet, Y., Tournier, S., Lee, M., Lazaris-Karatzas, A., Poulton, T. and Bommer, U.A. (1999). "The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle." J Cell Sci **112** (Pt 8): 1257-71.

Gallego, M.E., Gattoni, R., Stevenin, J., Marie, J. and Expert-Bezancon, A. (1997). "The SR splicing factors ASF/SF2 and SC35 have antagonistic effects on intronic enhancer-dependent splicing of the beta-tropomyosin alternative exon 6A." Embo J **16**(7): 1772-84.

- Garzon, R., Pichiorri, F., Palumbo, T., Visentini, M., Aqeilan, R., Cimmino, A., Wang, H., Sun, H., Volinia, S., Alder, H., Calin, G.A., Liu, C.G., Andreeff, M. and Croce, C.M. (2007). "MicroRNA gene expression during retinoic acid-induced differentiation of human acute promyelocytic leukemia." Oncogene **26**(28): 4148-57.
- Gawler, D.J., Zhang, L.J., Reedijk, M., Tung, P.S. and Moran, M.F. (1995). "CaLB: a 43 amino acid calcium-dependent membrane/phospholipid binding domain in p120 Ras GTPase-activating protein." Oncogene **10**(5): 817-25.
- Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., Hornik, K., Hothorn, T., Huber, W., Iacus, S., Irizarry, R., Leisch, F., Li, C., Maechler, M., Rossini, A.J., Sawitzki, G., Smith, C., Smyth, G., Tierney, L., Yang, J.Y. and Zhang, J. (2004). "Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics." Genome Biol **5**(10): R80.
- Gilbert, W. (1978). "Why genes in pieces?" Nature **271**(5645): 501.
- Gimferrer, I., Farnos, M., Calvo, M., Mittelbrunn, M., Enrich, C., Sanchez-Madrid, F., Vives, J. and Lozano, F. (2003). "The accessory molecules CD5 and CD6 associate on the membrane of lymphoid T cells." J Biol Chem **278**(10): 8564-71.
- Gingras, A.C., Kennedy, S.G., O'Leary, M.A., Sonenberg, N. and Hay, N. (1998). "4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway." Genes Dev **12**(4): 502-13.
- Giraldez, A.J., Cinalli, R.M., Glasner, M.E., Enright, A.J., Thomson, J.M., Baskerville, S., Hammond, S.M., Bartel, D.P. and Schier, A.F. (2005). "MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish." Science **308**(5723): 833-8.
- Gomez, M.R. (1991). "Phenotypes of the tuberous sclerosis complex with a revision of diagnostic criteria." Ann N Y Acad Sci **615**: 1-7.
- Graveley, B.R. (2000). "Sorting out the complexity of SR protein functions." Rna **6**(9): 1197-211.
- Gray, J.V., Petsko, G.A., Johnston, G.C., Ringe, D., Singer, R.A. and Werner-Washburne, M. (2004). "'Sleeping beauty': quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*." Microbiol Mol Biol Rev **68**(2): 187-206.
- Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Cooch, N. and Shiekhattar, R. (2005). "Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing." Cell **123**(4): 631-40.
- Griffiths-Jones, S. (2004). "The microRNA Registry." Nucleic Acids Res **32**(Database issue): D109-11.

Gripp, K.W., Lin, A.E., Stabley, D.L., Nicholson, L., Scott, C.I., Jr., Doyle, D., Aoki, Y., Matsubara, Y., Zackai, E.H., Lapunzina, P., Gonzalez-Meneses, A., Holbrook, J., Agresta, C.A., Gonzalez, I.L. and Sol-Church, K. (2006). "HRAS mutation analysis in Costello syndrome: genotype and phenotype correlation." Am J Med Genet A **140**(1): 1-7.

Guil, S., de La Iglesia, N., Fernandez-Larrea, J., Cifuentes, D., Ferrer, J.C., Guinovart, J.J. and Bach-Elias, M. (2003a). "Alternative splicing of the human proto-oncogene c-H-ras renders a new Ras family protein that trafficks to cytoplasm and nucleus." Cancer Res **63**(17): 5178-87.

Guil, S., Gattoni, R., Carrascal, M., Abian, J., Stevenin, J. and Bach-Elias, M. (2003b). "Roles of hnRNP A1, SR proteins, and p68 helicase in c-H-ras alternative splicing regulation." Mol Cell Biol **23**(8): 2927-41.

H

Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.

Hancock, J.F. and Parton, R.G. (2005). "Ras plasma membrane signalling platforms." Biochem J **389**(Pt 1): 1-11.

Hancock, J.F., Paterson, H. and Marshall, C.J. (1990). "A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane." Cell **63**(1): 133-9.

Hanke, J., Brett, D., Zastrow, I., Aydin, A., Delbruck, S., Lehmann, G., Luft, F., Reich, J. and Bork, P. (1999). "Alternative splicing of human genes: more the rule than the exception?" Trends Genet **15**(10): 389-90.

Hartwell, L.H. and Weinert, T.A. (1989). "Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events." Science **246**(4930): 629-34.

Harvey, J.J. (1964). "An Unidentified Virus Which Causes the Rapid Production of Tumours in Mice." Nature **204**: 1104-5.

He, L., Simmen, F.A., Mehendale, H.M., Ronis, M.J. and Badger, T.M. (2006). "Chronic ethanol intake impairs insulin signaling in rats by disrupting Akt association with the cell membrane. Role of TRB3 in inhibition of Akt/protein kinase B activation." J Biol Chem **281**(16): 11126-34.

Hentze, M.W. and Kulozik, A.E. (1999). "A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay." Cell **96**(3): 307-10.

Hertel, K.J. and Maniatis, T. (1998). "The function of multisite splicing enhancers." Mol Cell **1**(3): 449-55.

Hofmann, Y. and Wirth, B. (2002). "hnRNP-G promotes exon 7 inclusion of survival motor neuron (SMN) via direct interaction with Htra2-beta1." Hum Mol Genet **11**(17): 2037-49.

Hsu, Y.C., Chern, J.J., Cai, Y., Liu, M. and Choi, K.W. (2007). "Drosophila TCTP is essential for growth and proliferation through regulation of dRheb GTPase." Nature **445**(7129): 785-8.

I

"Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16." (1993). Cell **75**(7): 1305-15.

Inoki, K., Li, Y., Xu, T. and Guan, K.L. (2003a). "Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling." Genes Dev **17**(15): 1829-34.

Inoki, K., Zhu, T. and Guan, K.L. (2003b). "TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival." Cell **115**(5): 577-90.

Inoue, T., Stuart, J., Leno, R. and Maki, C.G. (2002). "Nuclear import and export signals in control of the p53-related protein p73." J Biol Chem **277**(17): 15053-60.

Ip, Y.T. and Davis, R.J. (1998). "Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development." Curr Opin Cell Biol **10**(2): 205-19.

Irwin, M., Marin, M.C., Phillips, A.C., Seelan, R.S., Smith, D.I., Liu, W., Flores, E.R., Tsai, K.Y., Jacks, T., Vousden, K.H. and Kaelin, W.G., Jr. (2000). "Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis." Nature **407**(6804): 645-8.

Izquierdo, M. (2005). "Short interfering RNAs as a tool for cancer gene therapy." Cancer Gene Ther **12**(3): 217-27.

J

Jaumot, M. and Hancock, J.F. (2001). "Protein phosphatases 1 and 2A promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3 interactions." Oncogene **20**(30): 3949-58.

Jeong, M.H., Bae, J., Kim, W.H., Yoo, S.M., Kim, J.W., Song, P.I. and Choi, K.H. (2006). "p19ras interacts with and activates p73 by involving the MDM2 protein." J Biol Chem **281**(13): 8707-15.

Jia, F., Zhang, Y.Z. and Liu, C.M. (2006). "A retrovirus-based system to stably silence hepatitis B virus genes by RNA interference." Biotechnol Lett **28**(20): 1679-85.

- Jiang, M. and Milner, J. (2002). "Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference." Oncogene **21**(39): 6041-8.
- Johannessen, C.M., Reczek, E.E., James, M.F., Brems, H., Legius, E. and Cichowski, K. (2005). "The NF1 tumor suppressor critically regulates TSC2 and mTOR." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(24): 8573-8.
- Johnson, L., Greenbaum, D., Cichowski, K., Mercer, K., Murphy, E., Schmitt, E., Bronson, R.T., Umanoff, H., Edelmann, W., Kucherlapati, R. and Jacks, T. (1997). "K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras." Genes Dev **11**(19): 2468-81.
- Johnson, S.M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K.L., Brown, D. and Slack, F.J. (2005). "RAS is regulated by the let-7 microRNA family." Cell **120**(5): 635-47.

K

- Kaghad, M., Bonnet, H., Yang, A., Creancier, L., Biscan, J.C., Valent, A., Minty, A., Chalon, P., Lelias, J.M., Dumont, X., Ferrara, P., McKeon, F. and Caput, D. (1997). "Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers." Cell **90**(4): 809-19.
- Kamath, R.S., Fraser, A.G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M., Welchman, D.P., Zipperlen, P. and Ahringer, J. (2003). "Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi." Nature **421**(6920): 231-7.
- Karube, Y., Tanaka, H., Osada, H., Tomida, S., Tatematsu, Y., Yanagisawa, K., Yatabe, Y., Takamizawa, J., Miyoshi, S., Mitsudomi, T. and Takahashi, T. (2005). "Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients." Cancer Sci **96**(2): 111-5.
- Kazlauskas, A., Ellis, C., Pawson, T. and Cooper, J.A. (1990). "Binding of GAP to activated PDGF receptors." Science **247**(4950): 1578-81.
- Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L. and Shay, J.W. (1994). "Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer." Science **266**(5193): 2011-5.
- Kindig, D.A. and Kirsten, W.H. (1967). "Virus-like particles in established murine cell lines: electron-microscopic observations." Science **155**(769): 1543-5.

- Knudson, A.G., Jr. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(4): 820-3.
- Kobayashi, T., Minowa, O., Sugitani, Y., Takai, S., Mitani, H., Kobayashi, E., Noda, T. and Hino, O. (2001). "A germ-line Tsc1 mutation causes tumor development and embryonic lethality that are similar, but not identical to, those caused by Tsc2 mutation in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(15): 8762-7.
- Koehler, J.A. and Moran, M.F. (2001). "RACK1, a protein kinase C scaffolding protein, interacts with the PH domain of p120GAP." Biochem Biophys Res Commun **283**(4): 888-95.
- Koera, K., Nakamura, K., Nakao, K., Miyoshi, J., Toyoshima, K., Hatta, T., Otani, H., Aiba, A. and Katsuki, M. (1997). "K-ras is essential for the development of the mouse embryo." Oncogene **15**(10): 1151-9.
- Kops, G.J., Dansen, T.B., Polderman, P.E., Saarloos, I., Wirtz, K.W., Coffey, P.J., Huang, T.T., Bos, J.L., Medema, R.H. and Burgering, B.M. (2002a). "Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress." Nature **419**(6904): 316-21.
- Kops, G.J., Medema, R.H., Glassford, J., Essers, M.A., Dijkers, P.F., Coffey, P.J., Lam, E.W. and Burgering, B.M. (2002b). "Control of cell cycle exit and entry by protein kinase B-regulated forkhead transcription factors." Mol Cell Biol **22**(7): 2025-36.
- Korchak, H.M. and Kilpatrick, L.E. (2001). "Roles for beta II-protein kinase C and RACK1 in positive and negative signaling for superoxide anion generation in differentiated HL60 cells." J Biol Chem **276**(12): 8910-7.
- Krecic, A.M. and Swanson, M.S. (1999). "hnRNP complexes: composition, structure, and function." Curr Opin Cell Biol **11**(3): 363-71.
- Kusov, Y., Kanda, T., Palmenberg, A., Sgro, J.Y. and Gauss-Muller, V. (2006). "Silencing of hepatitis A virus infection by small interfering RNAs." J Virol **80**(11): 5599-610.

L

- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S. and Kim, V.N. (2003). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." Nature **425**(6956): 415-9.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S. and Kim, V.N. (2002). "MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization." Embo J **21**(17): 4663-70.

- Lewis, B.P., Green, R.E. and Brenner, S.E. (2003). "Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(1): 189-92.
- Li, L.C., Okino, S.T., Zhao, H., Pookot, D., Place, R.F., Urakami, S., Enokida, H. and Dahiya, R. (2006a). "Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(46): 17337-42.
- Li, S., Ferguson, M.J., Hawkins, C.J., Smith, C. and Elwood, N.J. (2006b). "Human telomerase reverse transcriptase protects hematopoietic progenitor TF-1 cells from death and quiescence induced by cytokine withdrawal." Leukemia **20**(7): 1270-8.
- Liang, G., Wolfgang, C.D., Chen, B.P., Chen, T.H. and Hai, T. (1996). "ATF3 gene. Genomic organization, promoter, and regulation." J Biol Chem **271**(3): 1695-701.
- Liu, C.G., Calin, G.A., Meloon, B., Gamliel, N., Sevignani, C., Ferracin, M., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Zupo, S., Dono, M., Alder, H., Bullrich, F., Negrini, M. and Croce, C.M. (2004). "An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(26): 9740-4.
- Liu, P., Ying, Y. and Anderson, R.G. (1997). "Platelet-derived growth factor activates mitogen-activated protein kinase in isolated caveolae." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(25): 13666-70.
- Liu, Z.R. (2002). "p68 RNA helicase is an essential human splicing factor that acts at the U1 snRNA-5' splice site duplex." Mol Cell Biol **22**(15): 5443-50.
- Lockyer, P.J., Kupzig, S. and Cullen, P.J. (2001). "CAPRI regulates Ca(2+)-dependent inactivation of the Ras-MAPK pathway." Curr Biol **11**(12): 981-6.
- Loeb, L.A. (2001). "A mutator phenotype in cancer." Cancer Res **61**(8): 3230-9.
- Loeb, L.A., Springgate, C.F. and Battula, N. (1974). "Errors in DNA replication as a basis of malignant changes." Cancer Res **34**(9): 2311-21.
- Lopez-Bergami, P., Habelhah, H., Bhoumik, A., Zhang, W., Wang, L.H. and Ronai, Z. (2005). "RACK1 mediates activation of JNK by protein kinase C [corrected]." Mol Cell **19**(3): 309-20.
- Lowy, D.R. and Willumsen, B.M. (1993). "Function and regulation of ras." Annu Rev Biochem **62**: 851-91.
- Lundblad, V. (2000). "DNA ends: maintenance of chromosome termini versus repair of double strand breaks." Mutat Res **451**(1-2): 227-40.

M

- Maehama, T. and Dixon, J.E. (1998). "The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate." J Biol Chem **273**(22): 13375-8.
- Malumbres, M. and Pellicer, A. (1998). "RAS pathways to cell cycle control and cell transformation." Front Biosci **3**: d887-912.
- Mamidipudi, V., Zhang, J., Lee, K.C. and Cartwright, C.A. (2004). "RACK1 regulates G1/S progression by suppressing Src kinase activity." Mol Cell Biol **24**(15): 6788-98.
- Manning, B.D. and Cantley, L.C. (2003). "United at last: the tuberous sclerosis complex gene products connect the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway to mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling." Biochem Soc Trans **31**(Pt 3): 573-8.
- Maquat, L.E. (2002). "NASy effects on fibrillin pre-mRNA splicing: another case of ESE does it, but proposals for translation-dependent splice site choice live on." Genes Dev **16**(14): 1743-53.
- Marabese, M., Vikhanskaya, F. and Broggin, M. (2007). "p73: a chiaroscuro gene in cancer." Eur J Cancer **43**(9): 1361-72.
- Marte, B.M., Rodriguez-Vician, P., Wennstrom, S., Warne, P.H. and Downward, J. (1997). "R-Ras can activate the phosphoinositide 3-kinase but not the MAP kinase arm of the Ras effector pathways." Curr Biol **7**(1): 63-70.
- Mathas, S., Hinz, M., Anagnostopoulos, I., Krappmann, D., Lietz, A., Jundt, F., Bommert, K., Mehta-Grigoriou, F., Stein, H., Dorken, B. and Scheidereit, C. (2002). "Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappa B." Embo J **21**(15): 4104-13.
- Matlin, A.J., Clark, F. and Smith, C.W. (2005). "Understanding alternative splicing: towards a cellular code." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(5): 386-98.
- McCahill, A., Warwicker, J., Bolger, G.B., Houslay, M.D. and Yarwood, S.J. (2002). "The RACK1 scaffold protein: a dynamic cog in cell response mechanisms." Mol Pharmacol **62**(6): 1261-73.
- McGrath, J.P., Capon, D.J., Smith, D.H., Chen, E.Y., Seeburg, P.H., Goeddel, D.V. and Levinson, A.D. (1983). "Structure and organization of the human Ki-ras proto-oncogene and a related processed pseudogene." Nature **304**(5926): 501-6.

- Medema, R.H., Kops, G.J., Bos, J.L. and Burgering, B.M. (2000). "AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1." Nature **404**(6779): 782-7.
- Mellor, H. and Parker, P.J. (1998). "The extended protein kinase C superfamily." Biochem J **332** (Pt 2): 281-92.
- Mills, A.A., Zheng, B., Wang, X.J., Vogel, H., Roop, D.R. and Bradley, A. (1999). "p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis." Nature **398**(6729): 708-13.
- Mineo, C., James, G.L., Smart, E.J. and Anderson, R.G. (1996). "Localization of epidermal growth factor-stimulated Ras/Raf-1 interaction to caveolae membrane." J Biol Chem **271**(20): 11930-5.
- Mitin, N., Rossman, K.L. and Der, C.J. (2005). "Signaling interplay in Ras superfamily function." Curr Biol **15**(14): R563-74.
- Modrek, B. and Lee, C. (2002). "A genomic view of alternative splicing." Nat Genet **30**(1): 13-9.
- Montaner, S. (2007). "Akt/TSC/mTOR activation by the KSHV G protein-coupled receptor: emerging insights into the molecular oncogenesis and treatment of Kaposi's sarcoma." Cell Cycle **6**(4): 438-43.
- Moodie, S.A., Willumsen, B.M., Weber, M.J. and Wolfman, A. (1993). "Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase." Science **260**(5114): 1658-61.
- Morin, G.B. (1996). "Telomere integrity and cancer." J Natl Cancer Inst **88**(16): 1095-6.
- Mourton, T., Hellberg, C.B., Burden-Gulley, S.M., Hinman, J., Rhee, A. and Brady-Kalnay, S.M. (2001). "The PTPmu protein-tyrosine phosphatase binds and recruits the scaffolding protein RACK1 to cell-cell contacts." J Biol Chem **276**(18): 14896-901.

N

- Negrini, M. and Calin, G.A. (2008). "Breast cancer metastasis: a microRNA story." Breast Cancer Res **10**(2): 203.
- Nojima, H., Tokunaga, C., Eguchi, S., Oshiro, N., Hidayat, S., Yoshino, K., Hara, K., Tanaka, N., Avruch, J. and Yonezawa, K. (2003). "The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif." J Biol Chem **278**(18): 15461-4.

Nurse, P. (1990). "Universal control mechanism regulating onset of M-phase." Nature **344**(6266): 503-8.

Nurse, P. (2000). "A long twentieth century of the cell cycle and beyond." Cell **100**(1): 71-8.

O

Ohki, R., Nemoto, J., Murasawa, H., Oda, E., Inazawa, J., Tanaka, N. and Taniguchi, T. (2000). "Reprimo, a new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G2 phase." J Biol Chem **275**(30): 22627-30.

Okamura, K., Ishizuka, A., Siomi, H. and Siomi, M.C. (2004). "Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways." Genes Dev **18**(14): 1655-66.

Oliva, J.L., Zarich, N., Martinez, N., Jorge, R., Castrillo, A., Azanedo, M., Garcia-Vargas, S., Gutierrez-Eisman, S., Juarranz, A., Bosca, L., Gutkind, J.S. and Rojas, J.M. (2004). "The P34G mutation reduces the transforming activity of K-Ras and N-Ras in NIH 3T3 cells but not of H-Ras." J Biol Chem **279**(32): 33480-91.

P

Padgett, R.A., Konarska, M.M., Grabowski, P.J., Hardy, S.F. and Sharp, P.A. (1984). "Lariat RNA's as intermediates and products in the splicing of messenger RNA precursors." Science **225**(4665): 898-903.

Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degan, B., Muller, P., Spring, J., Srinivasan, A., Fishman, M., Finnerty, J., Corbo, J., Levine, M., Leahy, P., Davidson, E. and Ruvkun, G. (2000). "Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA." Nature **408**(6808): 86-9.

Passegue, E. and Wagers, A.J. (2006). "Regulating quiescence: new insights into hematopoietic stem cell biology." Dev Cell **10**(4): 415-7.

Pawson, T. and Scott, J.D. (1997). "Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins." Science **278**(5346): 2075-80.

Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K. and Cobb, M.H. (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." Endocr Rev **22**(2): 153-83.

- Pells, S., Divjak, M., Romanowski, P., Impey, H., Hawkins, N.J., Clarke, A.R., Hooper, M.L. and Williamson, D.J. (1997). "Developmentally-regulated expression of murine K-ras isoforms." Oncogene **15**(15): 1781-6.
- Perucho, M. (1996). "Cancer of the microsatellite mutator phenotype." Biol Chem **377**(11): 675-84.
- Potenza, N., Vecchione, C., Notte, A., De Rienzo, A., Rosica, A., Bauer, L., Affuso, A., De Felice, M., Russo, T., Poulet, R., Cifelli, G., De Vita, G., Lembo, G. and Di Lauro, R. (2005). "Replacement of K-Ras with H-Ras supports normal embryonic development despite inducing cardiovascular pathology in adult mice." EMBO Rep **6**(5): 432-7.
- Prior, I.A., Harding, A., Yan, J., Sluimer, J., Parton, R.G. and Hancock, J.F. (2001). "GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity." Nat Cell Biol **3**(4): 368-75.
- Putral, L.N., Gu, W. and McMillan, N.A. (2006). "RNA interference for the treatment of cancer." Drug News Perspect **19**(6): 317-24.

R

- Rahman-Roblick, R., Roblick, U.J., Hellman, U., Conrotto, P., Liu, T., Becker, S., Hirschberg, D., Jornvall, H., Auer, G. and Wiman, K.G. (2007). "p53 targets identified by protein expression profiling." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(13): 5401-6.
- Rajalingam, K., Schreck, R., Rapp, U.R. and Albert, S. (2007). "Ras oncogenes and their downstream targets." Biochim Biophys Acta **1773**(8): 1177-95.
- Rangatia, J., Vangala, R.K., Singh, S.M., Peer Zada, A.A., Elsasser, A., Kohlmann, A., Haferlach, T., Tenen, D.G., Hiddemann, W. and Behre, G. (2003). "Elevated c-Jun expression in acute myeloid leukemias inhibits C/EBPalpha DNA binding via leucine zipper domain interaction." Oncogene **22**(30): 4760-4.
- Raoul, C., Barker, S.D. and Aebischer, P. (2006). "Viral-based modelling and correction of neurodegenerative diseases by RNA interference." Gene Ther **13**(6): 487-95.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R. and Ruvkun, G. (2000). "The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*." Nature **403**(6772): 901-6.
- Reszka, A.A., Hayashi, Y. and Horwitz, A.F. (1992). "Identification of amino acid sequences in the integrin beta 1 cytoplasmic domain implicated in cytoskeletal association." J Cell Biol **117**(6): 1321-30.

- Reuther, G.W. and Der, C.J. (2000). "The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree." Curr Opin Cell Biol **12**(2): 157-65.
- Riley, D., Carragher, N.O., Frame, M.C. and Wyke, J.A. (2001). "The mechanism of cell cycle regulation by v-Src." Oncogene **20**(42): 5941-50.
- Ring, H.Z. and Lis, J.T. (1994). "The SR protein B52/SRp55 is essential for Drosophila development." Mol Cell Biol **14**(11): 7499-506.
- Robberson, B.L., Cote, G.J. and Berget, S.M. (1990). "Exon definition may facilitate splice site selection in RNAs with multiple exons." Mol Cell Biol **10**(1): 84-94.
- Rodriguez-Viciana, P., Oses-Prieto, J., Burlingame, A., Fried, M. and McCormick, F. (2006). "A phosphatase holoenzyme comprised of Shoc2/Sur8 and the catalytic subunit of PP1 functions as an M-Ras effector to modulate Raf activity." Mol Cell **22**(2): 217-30.
- Rodriguez-Viciana, P., Warne, P.H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M.J., Waterfield, M.D. and Downward, J. (1994). "Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras." Nature **370**(6490): 527-32.
- Rodriguez, M.M., Ron, D., Touhara, K., Chen, C.H. and Mochly-Rosen, D. (1999). "RACK1, a protein kinase C anchoring protein, coordinates the binding of activated protein kinase C and select pleckstrin homology domains in vitro." Biochemistry **38**(42): 13787-94.
- Ron, D., Chen, C.H., Caldwell, J., Jamieson, L., Orr, E. and Mochly-Rosen, D. (1994). "Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(3): 839-43.
- Ron, D., Jiang, Z., Yao, L., Vagts, A., Diamond, I. and Gordon, A. (1999). "Coordinated movement of RACK1 with activated betaIIIPKC." J Biol Chem **274**(38): 27039-46.
- Ron, D., Luo, J. and Mochly-Rosen, D. (1995). "C2 region-derived peptides inhibit translocation and function of beta protein kinase C in vivo." J Biol Chem **270**(41): 24180-7.
- Ruskin, B. and Green, M.R. (1985). "An RNA processing activity that debranches RNA lariats." Science **229**(4709): 135-40.
- Ruskin, B., Krainer, A.R., Maniatis, T. and Green, M.R. (1984). "Excision of an intact intron as a novel lariat structure during pre-mRNA splicing in vitro." Cell **38**(1): 317-31.

S

- Sah, D.W. (2006). "Therapeutic potential of RNA interference for neurological disorders." Life Sci **79**(19): 1773-80.
- Saito, K., Ishizuka, A., Siomi, H. and Siomi, M.C. (2005). "Processing of pre-microRNAs by the Dicer-1-Loquacious complex in *Drosophila* cells." PLoS Biol **3**(7): e235.
- Sanchez-Molina, S., Oliva, J.L., Garcia-Vargas, S., Valls, E., Rojas, J.M. and Martinez-Balbas, M.A. (2006). "The histone acetyltransferases CBP/p300 are degraded in NIH 3T3 cells by activation of Ras signalling pathway." Biochem J **398**(2): 215-24.
- Sasaki, Y., Ishida, S., Morimoto, I., Yamashita, T., Kojima, T., Kihara, C., Tanaka, T., Imai, K., Nakamura, Y. and Tokino, T. (2002). "The p53 family member genes are involved in the Notch signal pathway." J Biol Chem **277**(1): 719-24.
- Saumet, A. and Lecellier, C.H. (2006). "Anti-viral RNA silencing: do we look like plants?" Retrovirology **3**: 3.
- Schechtman, D. and Mochly-Rosen, D. (2001). "Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction." Oncogene **20**(44): 6339-47.
- Schonwasser, D.C., Marais, R.M., Marshall, C.J. and Parker, P.J. (1998). "Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isoforms." Mol Cell Biol **18**(2): 790-8.
- Sharp, P.A. (1994). "Split genes and RNA splicing." Cell **77**(6): 805-15.
- Shaw, R.J. and Cantley, L.C. (2006). "Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth." Nature **441**(7092): 424-30.
- Sinibaldi, D., Wharton, W., Turkson, J., Bowman, T., Pledger, W.J. and Jove, R. (2000). "Induction of p21WAF1/CIP1 and cyclin D1 expression by the Src oncoprotein in mouse fibroblasts: role of activated STAT3 signaling." Oncogene **19**(48): 5419-27.
- Sklan, E.H., Podoly, E. and Soreq, H. (2006). "RACK1 has the nerve to act: structure meets function in the nervous system." Prog Neurobiol **78**(2): 117-34.
- Smith, C.W. and Valcarcel, J. (2000). "Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control." Trends Biochem Sci **25**(8): 381-8.

- Song, K.S., Li, S., Okamoto, T., Quilliam, L.A., Sargiacomo, M. and Lisanti, M.P. (1996). "Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains." J Biol Chem **271**(16): 9690-7.
- Spandidos, D.A. (1984). "Transfer of human globin genes to human erythroleukemia cells." Mol Biol Med **2**(3): 167-75.
- Spandidos, D.A. and Agnantis, N.J. (1984a). "Human malignant tumours of the breast, as compared to their respective normal tissue, have elevated expression of the Harvey ras oncogene." Anticancer Res **4**(4-5): 269-72.
- Spandidos, D.A. and Kerr, I.B. (1984b). "Elevated expression of the human ras oncogene family in premalignant and malignant tumours of the colorectum." Br J Cancer **49**(6): 681-8.
- Spandidos, D.A. and Wilkie, N.M. (1984c). "Malignant transformation of early passage rodent cells by a single mutated human oncogene." Nature **310**(5977): 469-75.
- Staley, J.P. and Guthrie, C. (1998). "Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things." Cell **92**(3): 315-26.
- Sun, Q., Mayeda, A., Hampson, R.K., Krainer, A.R. and Rottman, F.M. (1993). "General splicing factor SF2/ASF promotes alternative splicing by binding to an exonic splicing enhancer." Genes Dev **7**(12B): 2598-608.

T

- Tacke, R. and Manley, J.L. (1999). "Determinants of SR protein specificity." Curr Opin Cell Biol **11**(3): 358-62.
- Takahara, T., Kanazu, S.I., Yanagisawa, S. and Akanuma, H. (2000). "Heterogeneous Sp1 mRNAs in human HepG2 cells include a product of homotypic trans-splicing." J Biol Chem **275**(48): 38067-72.
- Takahashi, K., Mitsui, K. and Yamanaka, S. (2003). "Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells." Nature **423**(6939): 541-5.
- Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., Yatabe, Y., Nagino, M., Nimura, Y., Mitsudomi, T. and Takahashi, T. (2004). "Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival." Cancer Res **64**(11): 3753-6.

- Tan, S.L. and Katze, M.G. (1999). "The emerging role of the interferon-induced PKR protein kinase as an apoptotic effector: a new face of death?" J Interferon Cytokine Res **19**(6): 543-54.
- Tanno, T., Fujiwara, A., Sakaguchi, K., Tanaka, K., Takenaka, S. and Tsuyama, S. (2007). "Slit3 regulates cell motility through Rac/Cdc42 activation in lipopolysaccharide-stimulated macrophages." FEBS Lett **581**(5): 1022-6.
- Tapon, N., Ito, N., Dickson, B.J., Treisman, J.E. and Hariharan, I.K. (2001). "The Drosophila tuberous sclerosis complex gene homologs restrict cell growth and cell proliferation." Cell **105**(3): 345-55.
- Tarn, W.Y. and Steitz, J.A. (1996). "A novel spliceosome containing U11, U12, and U5 snRNPs excises a minor class (AT-AC) intron in vitro." Cell **84**(5): 801-11.
- Taub, J., Lau, J.F., Ma, C., Hahn, J.H., Hoque, R., Rothblatt, J. and Chalfie, M. (2003). "A cytosolic catalase is needed to extend adult lifespan in *C. elegans* daf-C and clk-1 mutants." Nature **421**(6924): 764.
- Tavazoie, S.F., Alarcon, C., Oskarsson, T., Padua, D., Wang, Q., Bos, P.D., Gerald, W.L. and Massague, J. (2008). "Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis." Nature **451**(7175): 147-52.
- Taylor, W.R. and Stark, G.R. (2001). "Regulation of the G2/M transition by p53." Oncogene **20**(15): 1803-15.
- Tee, Y.T., Chen, G.D., Lin, L.Y., Ko, J.L. and Wang, P.H. (2006). "Nm23-H1: a metastasis-associated gene." Taiwan J Obstet Gynecol **45**(2): 107-13.
- Tessier, L.H., Keller, M., Chan, R.L., Fournier, R., Weil, J.H. and Imbault, P. (1991). "Short leader sequences may be transferred from small RNAs to pre-mature mRNAs by trans-splicing in *Euglena*." Embo J **10**(9): 2621-5.
- Thiele, H., Berger, M., Skalweit, A. and Thiele, B.J. (2000). "Expression of the gene and processed pseudogenes encoding the human and rabbit translationally controlled tumour protein (TCTP)." Eur J Biochem **267**(17): 5473-81.
- Toh, W.H., Kyo, S. and Sabapathy, K. (2005). "Relief of p53-mediated telomerase suppression by p73." J Biol Chem **280**(17): 17329-38.
- Tran, H., Brunet, A., Grenier, J.M., Datta, S.R., Fornace, A.J., Jr., DiStefano, P.S., Chiang, L.W. and Greenberg, M.E. (2002). "DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein." Science **296**(5567): 530-4.

- Treins, C., Giorgetti-Peraldi, S., Murdaca, J., Semenza, G.L. and Van Obberghen, E. (2002). "Insulin stimulates hypoxia-inducible factor 1 through a phosphatidylinositol 3-kinase/target of rapamycin-dependent signaling pathway." J Biol Chem **277**(31): 27975-81.
- Tusher, V.G., Tibshirani, R. and Chu, G. (2001). "Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(9): 5116-21.
- Tuynder, M., Susini, L., Prieur, S., Besse, S., Fiucci, G., Amson, R. and Telerman, A. (2002). "Biological models and genes of tumor reversion: cellular reprogramming through tpt1/TCTP and SIAH-1." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(23): 14976-81.
- U**
- Ueda, Y., Hijikata, M., Takagi, S., Chiba, T. and Shimotohno, K. (1999). "New p73 variants with altered C-terminal structures have varied transcriptional activities." Oncogene **18**(35): 4993-8.
- V**
- Valentine, C.R. (1998). "The association of nonsense codons with exon skipping." Mutat Res **411**(2): 87-117.
- van den Heuvel, S. (2005). "The C. elegans cell cycle: overview of molecules and mechanisms." Methods Mol Biol **296**: 51-67.
- van den Heuvel, S. and Harlow, E. (1993). "Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control." Science **262**(5142): 2050-4.
- van der Geer, P., Henkemeyer, M., Jacks, T. and Pawson, T. (1997). "Aberrant Ras regulation and reduced p190 tyrosine phosphorylation in cells lacking p120-Gap." Mol Cell Biol **17**(4): 1840-7.
- van Slegtenhorst, M., de Hoogt, R., Hermans, C., Nellist, M., Janssen, B., Verhoef, S., Lindhout, D., van den Ouweland, A., Halley, D., Young, J., Burley, M., Jeremiah, S., Woodward, K., Nahmias, J., Fox, M., Ekong, R., Osborne, J., Wolfe, J., Povey, S., Snell, R.G., Cheadle, J.P., Jones, A.C., Tachataki, M., Ravine, D., Sampson, J.R., Reeve, M.P., Richardson, P., Wilmer, F., Munro, C., Hawkins, T.L., Sepp, T., Ali, J.B., Ward, S., Green, A.J., Yates, J.R., Kwiatkowska, J., Henske, E.P., Short, M.P., Haines, J.H., Jozwiak, S. and Kwiatkowski, D.J. (1997). "Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34." Science **277**(5327): 805-8.

- van Steensel, B., Smogorzewska, A. and de Lange, T. (1998). "TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions." Cell **92**(3): 401-13.
- Vantaggiato, C., Formentini, I., Bondanza, A., Bonini, C., Naldini, L. and Brambilla, R. (2006). "ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases affect Ras-dependent cell signaling differentially." J Biol **5**(5): 14.
- Varani, L., Hasegawa, M., Spillantini, M.G., Smith, M.J., Murrell, J.R., Ghetti, B., Klug, A., Goedert, M. and Varani, G. (1999). "Structure of tau exon 10 splicing regulatory element RNA and destabilization by mutations of frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(14): 8229-34.
- Villanueva, J., Yung, Y., Walker, J.L. and Assoian, R.K. (2007). "ERK activity and G1 phase progression: identifying dispensable versus essential activities and primary versus secondary targets." Mol Biol Cell **18**(4): 1457-63.
- Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (2004). "Cancer genes and the pathways they control." Nat Med **10**(8): 789-99.
- Vojtek, A.B. and Der, C.J. (1998). "Increasing complexity of the Ras signaling pathway." J Biol Chem **273**(32): 19925-8.
- Vojtek, A.B., Hollenberg, S.M. and Cooper, J.A. (1993). "Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf." Cell **74**(1): 205-14.
- Voorhoeve, P.M. and Agami, R. (2007). "Classifying microRNAs in cancer: the good, the bad and the ugly." Biochim Biophys Acta **1775**(2): 274-82.
- Voorhoeve, P.M., le Sage, C., Schrier, M., Gillis, A.J., Stoop, H., Nagel, R., Liu, Y.P., van Duijse, J., Drost, J., Griekspoor, A., Zlotorynski, E., Yabuta, N., De Vita, G., Nojima, H., Looijenga, L.H. and Agami, R. (2006). "A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors." Cell **124**(6): 1169-81.

W

- Wang, J., Chang, Y.F., Hamilton, J.I. and Wilkinson, M.F. (2002). "Nonsense-associated altered splicing: a frame-dependent response distinct from nonsense-mediated decay." Mol Cell **10**(4): 951-7.
- Wang, J., Xiao, S.H. and Manley, J.L. (1998). "Genetic analysis of the SR protein ASF/SF2: interchangeability of RS domains and negative control of splicing." Genes Dev **12**(14): 2222-33.

Wang, Y., You, M. and Wang, Y. (2001). "Alternative splicing of the K-ras gene in mouse tissues and cell lines." *Exp Lung Res* **27**(3): 255-67.

Wennerberg, K., Rossman, K.L. and Der, C.J. (2005). "The Ras superfamily at a glance." *J Cell Sci* **118**(Pt 5): 843-6.

Wurzer, G., Mosgoeller, W., Chabicovsky, M., Cerni, C. and Wesierska-Gadek, J. (2001). "Nuclear Ras: unexpected subcellular distribution of oncogenic forms." *J Cell Biochem Suppl* **Suppl 36**: 1-11.

X

Xu, X., Yang, D., Ding, J.H., Wang, W., Chu, P.H., Dalton, N.D., Wang, H.Y., Bermingham, J.R., Jr., Ye, Z., Liu, F., Rosenfeld, M.G., Manley, J.L., Ross, J., Jr., Chen, J., Xiao, R.P., Cheng, H. and Fu, X.D. (2005). "ASF/SF2-regulated CaMKII δ alternative splicing temporally reprograms excitation-contraction coupling in cardiac muscle." *Cell* **120**(1): 59-72.

Y

Yang, A., Schweitzer, R., Sun, D., Kaghad, M., Walker, N., Bronson, R.T., Tabin, C., Sharpe, A., Caput, D., Crum, C. and McKeon, F. (1999). "p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development." *Nature* **398**(6729): 714-8.

Yang, A., Walker, N., Bronson, R., Kaghad, M., Oosterwegel, M., Bonnin, J., Vagner, C., Bonnet, H., Dikkes, P., Sharpe, A., McKeon, F. and Caput, D. (2000). "p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours." *Nature* **404**(6773): 99-103.

Yang, J.Y., Michod, D., Walicki, J., Murphy, B.M., Kasibhatla, S., Martin, S.J. and Widmann, C. (2004). "Partial cleavage of RasGAP by caspases is required for cell survival in mild stress conditions." *Mol Cell Biol* **24**(23): 10425-36.

Yarm, F.R. (2002). "Plk phosphorylation regulates the microtubule-stabilizing protein TCTP." *Mol Cell Biol* **22**(17): 6209-21.

Yarwood, S.J., Steele, M.R., Scotland, G., Houslay, M.D. and Bolger, G.B. (1999). "The RACK1 signaling scaffold protein selectively interacts with the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D5 isoform." *J Biol Chem* **274**(21): 14909-17.

Z

- Zender, L., Hutker, S., Liedtke, C., Tillmann, H.L., Zender, S., Mundt, B., Waltemathe, M., Gosling, T., Flemming, P., Malek, N.P., Trautwein, C., Manns, M.P., Kuhnel, F. and Kubicka, S. (2003). "Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(13): 7797-802.
- Zhang, D., Li, F., Weidner, D., Mnjoyan, Z.H. and Fujise, K. (2002). "Physical and functional interaction between myeloid cell leukemia 1 protein (MCL1) and Fortilin. The potential role of MCL1 as a fortilin chaperone." J Biol Chem **277**(40): 37430-8.
- Zhong, Z., Shiue, L., Kaplan, S. and de Lange, T. (1992). "A mammalian factor that binds telomeric TTAGGG repeats in vitro." Mol Cell Biol **12**(11): 4834-43.
- Zhu, X., Kumar, R., Mandal, M., Sharma, N., Sharma, H.W., Dhingra, U., Sokoloski, J.A., Hsiao, R. and Narayanan, R. (1996). "Cell cycle-dependent modulation of telomerase activity in tumor cells." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(12): 6091-5.
- Zimmermann, S. and Martens, U.M. (2007). "Telomeres and telomerase as targets for cancer therapy." Cell Mol Life Sci **64**(7-8): 906-21.

ANNEXES

ANNEX 1

Taula 13: Possibles gens diana dels miRNAs regulats per la sobreexpressió de p19.

| gen diana per al miRNA | Número | funció |
|---------------------------------------|-----------------|--|
| hsa-miR-330 | | |
| CDC42 | ENSG00000070831 | Cell division control protein 42 homolog |
| CDK11 | ENSG00000155111 | Cyclin-dependent kinase (CDC2-like) 11 |
| DICER1 | ENSG00000100697 | Endoribonuclease Dicer Helicase with RNase motif. |
| E2F1 | ENSG00000101412 | Transcription factor E2F1 |
| GAS7 | ENSG00000007237 | Growth-arrest-specific protein 7 |
| MAP2K1 | ENSG00000169032 | MAPK/ERK kinase 1 |
| PIK3R1 | ENSG00000145675 | PI3-kinase p85-alpha subunit. |
| PRKCA/PKCα | ENSG00000154229 | Protein kinase C, alpha type |
| PRKCB1/PKCβ 1 | ENSG00000166501 | Protein kinase C, beta type |
| PRKCE/PKCϵ | ENSG00000171132 | Protein kinase C, epsilon type |
| SFRS1 | ENSG00000136450 | Splicing factor, arginine/serine-rich 1, SR protein, (pre-mRNA splicing factor SF2) (Alternative splicing factor ASF-1) |
| SFRS10 | ENSG00000136527 | splicing factor, arginine/serine-rich 10, SR protein, TRA2 |
| SFRS2 | ENSG00000161547 | Splicing factor, arginine/serine-rich 2, SR protein SC35 |
| SFRS7 | ENSG00000115875 | splicing factor, arginine/serine-rich 7, SR protein 9G8 |
| SFRS8 | ENSG00000061936 | splicing factor, arginine/serine-rich 8, SR protein (suppressor-ofwhite apricot homolog, Drosophila, SWAP) |
| SFRS9 | ENSG00000111786 | Splicing factor, arginine/serine-rich 9, SR protein SRp30, (PremRNA splicing factor SRp30C |
| SLITRK4 | ENSG00000179542 | slit and trk like 4 protein; slit and trk like gene 4 |
| SNRPD3 | ENSG00000100028 | Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3 (UsnRNP core protein D3) Splicing factor |
| hsa-miR-342 | | |
| BCL2L1 | ENSG00000171552 | apoptosis regulator Bcl-X (Bcl-2-like 1 protein); apoptosis inhibitor. |
| BCL2L2 | ENSG00000129473 | apoptosis regulator Bcl-W (Bcl-2-like 2 protein); apoptosis inhibitor. |
| CSK | ENSG00000103653 | c-src tyrosine kinase |
| FOSB | ENSG00000125740 | Protein fosB,G0/G1 switch regulatory protein 3 |
| IBRDC2 | ENSG00000137393 | p53-inducible RING finger protein. |
| MAP3K7IP2 | ENSG00000055208 | mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 2 |
| RAP2B | ENSG00000181467 | Ras-related protein Rap-2b |
| RASA1 | ENSG00000145715 | Ras GTPase-activating protein 1,Ras p21 protein activator. |
| RASSF1 | ENSG00000068028 | Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 1. RASSF1A functions as a negative regulator of cell proliferation through inhibition of G1/S-phase progression. |
| SF4 | ENSG00000105705 | splicing factor 4 |
| SLA | ENSG00000155926 | Src-like-adaptor protein 1 |
| hsa-miR-206 | | |
| ARHGAP21 | ENSG00000107863 | Rho GTPase activating protein p21; |
| CDK6 | ENSG00000105810 | cyclin dependent kinase 6 |
| CDK9 | ENSG00000136807 | cyclin-dependent kinase 9 |
| DDX5 | ENSG00000108654 | p68 RNA helicase |
| FOSB | ENSG00000125740 | Protein fosB (G0/G1 switch regulatory protein 3) |
| JUND | ENSG00000130522 | Jun D proto-oncogene,Transcription factor jun-D. |
| MAP3K3 | ENSG00000198909 | mitogen activated kinase 3 |
| MET | ENSG00000105976 | met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor) |
| MTSS1 | ENSG00000170873 | metastasis suppressor 1. |
| RASA1 | ENSG00000145715 | Ras GTPase-activating protein 1,Ras p21 protein activator. |
| SFRS1 | ENSG00000136450 | Splicing factor, arginine/serine-rich 1, SR protein, (pre-mRNA splicing factor SF2) (Alternative splicing factor ASF-1) |
| SFRS10 | ENSG00000136527 | Arginine/serine-rich splicing factor 10, SR protein HTRA2- beta |
| SFRS3 | ENSG00000112081 | Splicing factor, arginine/serine-rich 3, SR protein SRP20 |
| SFRS7 | ENSG00000115875 | splicing factor, arginine/serine-rich 7, SR protein 9G8 |

| | | |
|--------------------|-----------------|---|
| SFRS9 | ENSG00000111786 | splicing factor, arginine/serine-rich 9, SR protein SRp30 |
| hsa-miR-138 | | |
| AIFM2 | ENSG00000042286 | apoptosis-inducing p53-responsive gene |
| CCND3 | ENSG00000112576 | G1/S-specific cyclin D3. |
| CCNE1 | ENSG00000105173 | G1/S-specific cyclin E1. |
| DDX3X | ENSG00000124487 | DEAD-box protein 3 (Helicase-like protein 2) |
| MAP2K7 | ENSG00000076984 | mitogen-activated protein kinase kinase 7, JNK kinase 2, c-Jun kinase 2) (JNK kinase 2) |
| MAPK4 | ENSG00000141639 | Mitogen-activated protein kinase 4, ERK-4, MAP kinase isoform p63 |
| MYBBP1A | ENSG00000132382 | MYB binding protein 1a; p53-activated protein-2 |
| TP53BP2 | ENSG00000143514 | Apoptosis stimulating of p53 protein, p53-binding protein 2. |
| TP53INP1 | ENSG00000164938 | tumor protein p53 inducible nuclear protein 1 |
| TP53INP2 | ENSG00000078804 | protein p53 inducible nuclear protein 2 |
| TP73L/p63 | ENSG00000073282 | tumor protein p73-like; tumor protein63 kDa with strong homology to p53. |
| hsa-miR-99b | | |
| MYCBP2 | ENSF00000004253 | MYC binding protein 2 |
| RalGPS1A | ENSG00000136828 | Similar to Ral guanine nucleotide exchange factor |

Taula 14: Possibles gens diana dels miRNAs regulats per la sobreexpressió de p19mut.

| gen diana per al miRNA | Número | funció |
|------------------------|-----------------|--|
| mmu-miR-294 | | |
| MLL T6 | ENSG00000108292 | myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 6 |
| PAK7 | ENSG00000101349 | p21(CDKN1A)-activated kinase 7 |
| mmu-miR-377 | | |
| ARHGAP21 | ENSG00000107863 | Rho GTPase activating protein 21 |
| BCL2L1 | ENSG00000171552 | BCL2-like 1 |
| H3F3A | ENST00000366815 | H3 histone, family 3A |
| HRAS | ENSG00000174775 | v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog |
| MADD | ENSG00000110514 | MAP-kinase activating death domain |
| MAP4K5 | ENSG00000012983 | Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5 |
| MARK3 | ENSG00000075413 | MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3 |
| PPARA | ENSG00000186951 | peroxisome proliferator-activated receptor alpha |
| PRKCA | ENSG00000154229 | Protein kinase C alpha type |
| RAB1A | ENSG00000138069 | Ras-related protein Rab-1A |
| RABGAP1 | ENSG00000011454 | RAB GTPase activating protein 1 |
| RAP2A | ENSG00000125249 | member of RAS oncogene family |
| RHOBTB2 | ENSG00000008853 | Rho-related BTB domain-containing protein 2 (Deleted in breast cancer 2 gene protein) |
| SFRS1 | ENSG00000136450 | splicing factor, arginine/serine-rich 1 (splicing factor 2, alternate splicing factor) |
| TP73L | ENSG00000073282 | tumor protein p73-like |
| hsa-miR-373* | | |
| ARHGEF10 | ENSG00000104728 | Rho guanine nucleotide exchange factor 10 |
| ARHGEF18 | ENSG00000104880 | rho/rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 18 |
| ARHGEF5 | ENSG00000050327 | Rho guanine nucleotide exchange factor 5 |
| ARID4B | ENSG00000054267 | Histone deacetylase complex subunit SAP180 |
| BCL2L11 | ENSG00000153094 | BCL2-like 11 (apoptosis facilitator) |
| BMF | ENSG00000104081 | Bcl2 modifying factor |
| CCND2 | ENSG00000118971 | cyclin D2 |
| CDK11 | ENSG00000155111 | Cell division cycle 2-like protein kinase 6 |
| DDX3X | ENSG00000215301 | DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked |
| DHX40 | ENSG00000108406 | Probable ATP-dependent RNA helicase |

| | | |
|---------------------|--------------------|---|
| FAIM | ENSG00000158234 | Fas apoptotic inhibitory molecule 1 |
| H3F3A | ENST00000366815 | H3 histone, family 3A |
| MAP3K11 | ENSG00000173327 | mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11 |
| MAPK13 | ENSG00000156711 | mitogen-activated protein kinase 13 |
| MAPK9 | ENSG00000050748 | mitogen-activated protein kinase 9 |
| MARK1 | ENSG00000116141 | MAP/microtubule affinity-regulating kinase 1 |
| MARK4 | ENSG00000007047 | MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4 |
| MYST3 | ENSG00000083168 | MYST histone acetyltransferase (monocytic leukemia) 3 |
| PIK3CA | ENSG00000121879 | PI3-kinase p110 subunit alpha |
| PRKCB1 | ENSG00000166501 | protein kinase C, beta 1 |
| RAB11A | ENSG00000103769 | RAB11A, member RAS oncogene family |
| RAB22A | ENSG00000124209 | RAB22A, member RAS oncogene family |
| RAB6A | OTTHUMG000001 | RAB6A, member RAS oncogene family |
| RAB7 | ENSG00000117280 | RAB7A, member RAS oncogene family |
| RABGAP1 | ENSG00000011454 | RAB GTPase activating protein 1 |
| RASSF2 | ENSG00000101265 | Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 2 |
| RBBP7 | ENSG00000102054 | retinoblastoma binding protein 7 |
| RGL1 | ENSG00000143344 | ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1 |
| SLITRK3 | ENSG00000121871 | SLIT and NTRK-like family, member 3 |
| TP53INP1 | ENSG00000164938 | tumor protein p53 inducible nuclear protein 1 |
| TXNIP | ENSG00000117289 | thioredoxin interacting protein |
| mmu-miR-302 | | |
| BCL2L11 | ENSG00000153094 | BCL2-like 11 (apoptosis facilitator) |
| E2F2 | ENSG00000007968 | E2F transcription factor 2 |
| MAP3K14 | ENSG00000006062 | mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14 |
| MAPK2 | ENSG00000169967 | Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2 |
| MARK4 | ENSG00000007047 | MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4 |
| PIK3CA | ENSG00000121879 | PI3-kinase p110 subunit alpha |
| PRKCB1 | ENSG00000166501 | protein kinase C, beta 1 |
| RAB11A | ENSG00000103769 | RAB11A, member RAS oncogene family |
| RAB14 | ENSG00000119396 | member RAS oncogene family |
| RAB22A | ENSG00000124209 | RAB22A, member RAS oncogene family |
| RAB6A | OTTHUMG00000134308 | RAB6A, member RAS oncogene family |
| RABGAP1 | ENSG00000011454 | RAB GTPase activating protein 1 |
| RALGDS | ENSG00000160271 | ral guanine nucleotide dissociation stimulator |
| RAPH1 | ENSG00000173166 | Ras-associated and pleckstrin homology domains-containing protein 1 |
| RASSF2 | ENSG00000101265 | Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 2 |
| SLITRK3 | ENSG00000121871 | SLIT and NTRK-like family, member 3 |
| SUV39H1 | ENSG00000101945 | suppressor of variegation 3-9 homolog 1 (Drosophila) |
| TP53INP1 | ENSG00000164938 | tumor protein p53 inducible nuclear protein 1 |
| TXNIP | ENSG00000117289 | thioredoxin interacting protein |
| mmu-miR-196b | | |
| DICER1 | ENSG00000100697 | Dicer1, Dcr-1 homolog (Drosophila) |
| GAS7 | ENSG00000007237 | growth arrest-specific 7 |
| MAP4K3 | ENSG00000011566 | mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 3 |
| NRAS | ENSG00000213281 | neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog |
| RAB2L | ENSG00000206282 | Ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 2 |
| RAB39B | ENSG00000155961 | member RAS oncogene family |
| RASSF3 | ENSG00000153179 | Ras association domain-containing protein 3 |
| hsa-miR-185 | | |
| ARHGEF1 | ENSG00000076928 | Rho guanine nucleotide exchange factor 1 |
| ARHGEF4 | ENSG00000136002 | Rho guanine nucleotide exchange factor 4 |
| ARHGEF6 | ENSG00000129675 | Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6 |
| BAK1 | OTTHUMG00000014530 | BCL2-antagonist/killer 1 |
| BMF | ENSG00000104081 | Bcl2 modifying factor |
| CASP14 | ENSG00000105141 | Caspase-14 precursor |
| CDC42 | ENSG00000070831 | cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa) |
| CTSK | ENSG00000143387 | cathepsin K |
| DDX6 | ENSG00000110367 | Probable ATP-dependent RNA helicase |

| | | |
|---------------------|--------------------|--|
| EPHB2 | ENSG00000133216 | EPH receptor B2 |
| HDAC4 | ENSG00000068024 | histone deacetylase 4 |
| HDAC5 | ENSG00000108840 | Histone deacetylase 5 (HD5) |
| JUND | ENSG00000130522 | Transcription factor jun-D |
| MADD | ENSG00000110514 | MAP-kinase activating death domain |
| PPARA | ENSG00000186951 | peroxisome proliferator-activated receptor alpha |
| RAB14 | ENSG00000119396 | RAB14, member RAS oncogene family |
| RAB15 | ENSG00000139998 | member RAS oncogene family |
| RAB35 | ENSG00000111737 | Ras-related protein Rab-35 (Rab-1C) |
| RAB37 | ENSG00000172794 | member RAS oncogene family |
| RAB7 | ENSG00000117280 | member RAS oncogene family-like 1 |
| RHOA | ENSG00000067560 | ras homolog gene family, member A |
| RHOG | ENSG00000177105 | ras homolog gene family, member G (rho G) |
| RHOQ | ENSG00000119729 | ras homolog gene family, member Q |
| RHOT1 | ENSG00000126858 | ras homolog gene family, member T1 |
| RSU1 | ENSG00000148484 | Ras suppressor protein 1 |
| SF1 | ENSG00000168066 | splicing factor 1 |
| SFRS3 | ENSG00000112081 | splicing factor, arginine/serine-rich 3 |
| TBRG4 | ENSG00000136270 | transforming growth factor beta regulator 4 |
| hsa-miR-361 | | |
| BCLAF1 | ENSG00000029363 | Bcl-2-associated transcription factor 1 |
| ERG | ENSG00000157554 | v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog (avian) |
| SP1 | ENSG00000185591 | Sp1 transcription factor |
| YWHAB | ENSG00000166913 | tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide |
| hsa-miR-213 | | |
| SFRS1 | ENSG00000136450 | splicing factor, arginine/serine-rich 1 (splicing factor 2, alternate splicing factor) |
| TFAP2B | ENSG00000008196 | transcription factor AP-2 beta (activating enhancer binding protein 2 beta) |
| hsa-miR-219 | | |
| FOXJ3 | ENSG00000198815 | forkhead box J3 |
| mmu-miR-449 | | |
| NOTCH1 | ENSG00000148400 | Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila) |
| DDX17 | ENSG00000100201 | DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17 |
| ARHGAP26 | ENSG00000145819 | Rho GTPase activating protein 26 |
| E2F3 | ENSG00000112242 | E2F transcription factor 3 |
| CCNE2 | ENSG00000175305 | cyclin E2 |
| RAB43 | OTTHUMG00000137364 | RAB43, member RAS oncogene family |
| RRAS | ENSG00000126458 | related RAS viral (r-ras) oncogene homolog |
| FOXP1 | ENSG00000114861 | forkhead box P1 |
| mmu-miR-383 | | |
| RAPH1 | ENSG00000173166 | Ras association (RalGDS/AF-6) and pleckstrin homology domains 1 |
| mmu-miR-331 | | |
| KSR1 | ENSG00000141068 | kinase suppressor of ras 1 |
| MAP2K7 | ENSG00000076984 | mitogen-activated protein kinase kinase 7 |
| hsa-miR-122a | | |
| MAP3K12 | ENSG00000139625 | mitogen-activated protein kinase kinase kinase 12 |
| CCNG1 | ENSG00000113328 | cyclin G1, |
| MAP3K2 | ENSG00000169967 | mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2 |
| DICER1 | ENSG00000100697 | Dicer1, Dcr-1 homolog (Drosophila) |
| hsa-miR-342- | | |
| FOSB | ENSG00000125740 | FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B |
| CDK6 | ENSG00000105810 | cyclin-dependent kinase 6 |
| FOKK2 | ENSG00000141568 | forkhead box K2 |
| E2F3 | ENSG00000112242 | E2F transcription factor 3 |
| SRF | ENSG00000112658 | serum response factor (c-fos serum response element-binding transcription factor) |
| MAP3K1 | ENSG00000095015 | mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 |

| | | |
|--------------------|-----------------|---|
| MDM1 | ENSG00000111554 | Mdm4, transformed 3T3 cell double minute 1, p53 binding protein (mouse) |
| MYCBP | ENSG00000131233 | c-myc binding protein |
| FOXP1 | ENSG00000114861 | forkhead box P1 |
| mmu-miR-145 | | |
| MAP3K7IP3 | ENSG00000157625 | mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 3 |
| RAB15 | ENSG00000139998 | RAB15, member RAS oncogene family |
| RAP2B | ENSG00000181467 | RAP2B, member of RAS oncogene family |
| MDM1 | ENSG00000111554 | Mdm4, transformed 3T3 cell double minute 1, p53 binding protein (mouse) |
| mmu-miR-147 | | |
| RAB6B | ENSG00000154917 | RAB6B, member RAS oncogene family |
| MAP3K7IP3 | ENSG00000157625 | mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 3 |
| hsa-miR-32 | | |
| RAB14 | ENSG00000119396 | RAB14, member RAS oncogene family |
| DDX3Y | ENSG00000067048 | DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked |
| BCL2L11 | ENSG00000153094 | BCL2-like 11 (apoptosis facilitator) |
| MAP2K4 | ENSG00000065559 | mitogen-activated protein kinase kinase 4 |
| MAP3K1 | ENSG00000095015 | mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 |
| hsa-miR-136 | | |
| PTEN | ENSG00000171862 | phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1) |
| KRAS | ENSG00000133703 | v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog |
| MAP2K4 | ENSG00000065559 | mitogen-activated protein kinase kinase 4 |
| RABGAP1L | ENSG00000152061 | RAB GTPase activating protein 1-like |
| CDC42SE2 | ENSG00000158985 | CDC42 small effector 2 |
| MDM1 | ENSG00000111554 | Mdm4, transformed 3T3 cell double minute 1, p53 binding protein (mouse) |
| MAP3K7 | ENSG00000135341 | mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 |
| MAP4K3 | ENSG00000011566 | mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 3 |
| PRKCQ | ENSG00000065675 | protein kinase C, theta |
| RAB1A | ENSG00000138069 | RAB1A, member RAS oncogene family |
| CAPRIN1 | ENSG00000135387 | cell cycle associated protein 1 |
| CDK6 | ENSG00000105810 | cyclin-dependent kinase 6 |
| PARP16 | ENSG00000138617 | poly (ADP-ribose) polymerase family, member 16 |
| MAP3K7IP3 | ENSG00000157625 | mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 3 |
| hsa-miR-138 | | |
| FOXP4 | ENSG00000137166 | forkhead box P4 |
| MYB | ENSG00000118513 | v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian) |
| MAPKAPK3 | ENSG00000114738 | mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3 |
| FOXP1 | ENSG00000114861 | forkhead box P1 |
| hsa-miR-30c | | |
| PRKACB | ENSG00000142875 | protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, beta |
| MAP3K7IP3 | ENSG00000157625 | mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 3 |
| RASSF2 | ENSG00000101265 | Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 2 |
| RAB15 | ENSG00000139998 | RAB15, member RAS oncogene family |

ANNEX 2

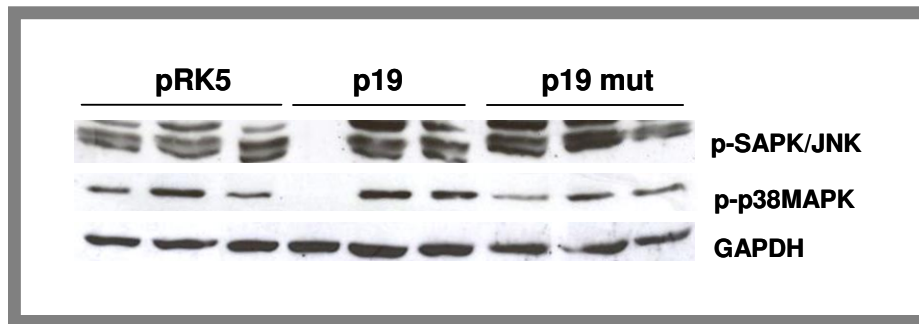


Fig. 56: p19 H-Ras no activa SAPK/JNK ni p38MAPK. Western Blot detecant les proteïnes fosforilades SAPK/JNK i p39MAPK en extractes cel·lulars totals de cèl·lules HeLa transfectades transitòriament amb els vectors pRK5, pRK5-p19 i pRK5-p19mut. Els extractes proteics es van obtenir en tres experiments independents. La GAPDH s'utilitzà com a control intern de quantificació de proteïna carregada al gel.

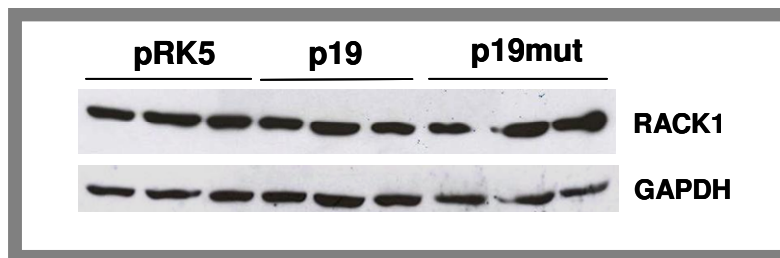


Fig. 57: La sobreexpressió de p19 H-Ras no varia els nivells de RACK1. Western Blot detecant la proteïna fosforilades SAPK/JNK i p39MAPK en extractes cel·lulars totals de cèl·lules HeLa transfectades transitòriament amb els vectors pRK5, pRK5-p19 i pRK5-p19mut. Els extractes proteics es van obtenir en tres experiments independents. La GAPDH s'utilitzà com a control intern de quantificació de proteïna carregada al gel.

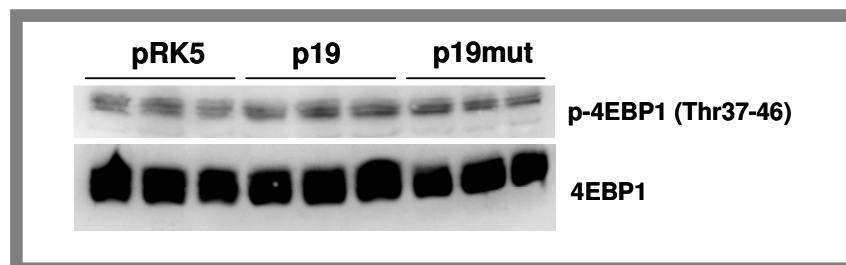


Fig. 58: Els nivells de 4EBP1 així com de la forma activa (p-E4BP1 Thr37/45) es mantenen constants amb la sobreexpressió de p19 H-Ras. Western Blot detecant la proteïna 4EBP1 i la la forma activa (p-E4BP1 Thr37/45), en extractes cel·lulars totals de cèl·lules HeLa transfectades transitòriament amb els vectors pRK5, pRK5-p19 i pRK5-p19mut. Els extractes proteics es van obtenir en tres experiments independents. Mitjanes dels valors de quantificació respecte la proteïna total mitjançant el programa Multi Gauge V3.0. pRK5=8,18; p19=8,84; p19mut= 8,14

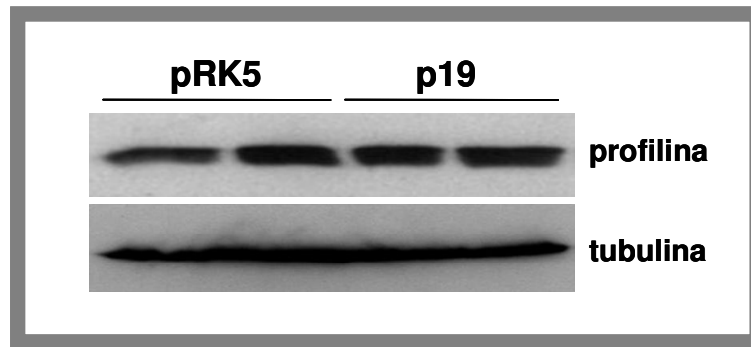


Fig. 59: Nivells de profilina al sobreexpressar p19 H-Ras. Western Blot on es detecta els nivells de profilina en extractes cel·lulars totals de cèl·lules HeLa sobreexpressant p19. Els extractes proteïcs es van obtenir en dos experiments independents. La tubulina s'utilitzà com a control intern de quantificació de proteïna carregada al gel.