

Caracterización de nuevos mecanismos de regulación de las β -quimerinas



Laura Adriana Gutiérrez Miranda

Máster en Investigación Biomédica IBGM-2012

Tutora: María José Caloca Roldán

Índice

1. Listado de Siglas utilizadas en el trabajo.....	3
2. Introducción.....	4-12
a. El diacilglicerol como mensajero secundario.	
b. Superfamilia Ras y Rho GTPasas.	
c. Las quimerinas.	
d. Estructura y mecanismo de acción de las quimerinas.	
e. Hipótesis e importancia del estudio.	
3. Materiales y métodos.....	13-16
a. Línea celular y cultivos celulares.	
b. Plásmidos y método de transfección.	
c. Estimulación y precipitación con GFP-Trap ^R .	
d. Ensayo de activación Rac1 “Pull Down”.	
e. Western Blot.	
f. Microscopía confocal.	
4. Resultados.....	17-27
a. El pervanadato y el EGF son estímulos capaces de fosforilar a las β -quimerinas.	
b. En nuestro sistema in vitro de células COS1, las β 2-quimerinas regulan negativamente la activación de Rac.	
c. El patrón de fosforilación es específico de β 2-quimerina y no aparece en los controles con GFP.	
d. La isoforma α , al igual que la isoforma β , presentan residuos de tirosinas que se fosforilan como respuesta a un estímulo.	
e. Los residuos de fosforilación de las β 2-quimerinas se localizan exclusivamente en la zona N-terminal.	
f. La translocación de las quimerinas es detectable tras la estimulación con EGF o PMA.	
5. Discusión y futuro enfoque.....	28-29
6. Conclusiones.....	30
7. Bibliografía.....	31

Siglas y acrónimos

- BCR = Breakpoint Cluster Region / Región de ruptura BCR.
- BSA = Bovine Serum Albumin / Albúmina de suero bovino.
- COS 1 = CV-1 (simian) in Origin carrying the SV40 genetic material / Células CV-1 en Origen con SV40.
- DAG = Diacylglycerol / Diacilglicerol.
- DAPI = 4',6-diamidino-2-phenylindole/ 4',6-diamidino-2-fenilindol.
- DEAE = Diethylaminoethyl / Dietilaminoetil.
- DGK = Diacylglycerol kinase / Diacilglicerol kinasa.
- DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium / Medio Eagle modificado por Dulbecco.
- DMSO = Dimethyl sulfoxide / Dimetil sulfóxido.
- DNA = Deoxyribonucleic acid / Ácido desoxirribonucleico.
- EDTA = Ethylenediaminetetraacetic acid / Ácido etilendiaminotetraacético.
- EGF = Epidermal Growth Factor / Factor de crecimiento epidérmico.
- EGFP = Enhanced Green Fluorescent Protein / Proteína fluorescente verde estimulada.
- EGFR = Epidermal Growth Factor Receptor / Receptor del factor de crecimiento epidérmico.
- FL = Full length / Proteína completa.
- GAP = GTPase Activating Protein / Proteína activadora de GTPasas.
- GEF = Guanine Nucleotide Exchange Factor / Factor de intercambio de nucleótidos de guanina.
- GFP = Green Fluorescent Protein / Proteína fluorescente verde.
- GST = Glutathione S transferase / Glutathion S transferasa.
- HRP = Horseradish Peroxidase / Peroxidasa de rábano.
- PAK = p21-Activated kinases / Kinasas activadas por p21.
- PBD = p21 Binding Protein / Dominio de unión a p21.
- PBS = Phosphate Buffer Saline / Tampón fosfato salino.
- PCK = Protein kinase C / Proteína kinasa C.
- PDGF = Platelet-Derived Growth Factor / Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
- PDGFR = Platelet-Derived Growth Factor Receptor / Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas.
- PKD = Protein Kinase D/ Proteína kinasa D.
- PMA = Phorbol 12-myristate 13-acetate / Acetato de forbol miristato.
- PV = Pervanadate / Pervanadato.
- SDS-PAGE = Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis / Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.
- SFK = Src family kinase / Kinasas de la familia Src.
- TBST =Tris-Buffered Saline Tween 20 / Tampón salino Tris con Tween 20.

Introducción

El diacilglicerol como segundo mensajero

El diacilglicerol (DAG) es uno de los segundos mensajeros más usados en la señalización celular de organismos superiores. Es de origen lipídico y se puede encontrar tanto en la membrana plasmática como en el interior celular asociado a las membranas de orgánulos subcelulares [Figura1].

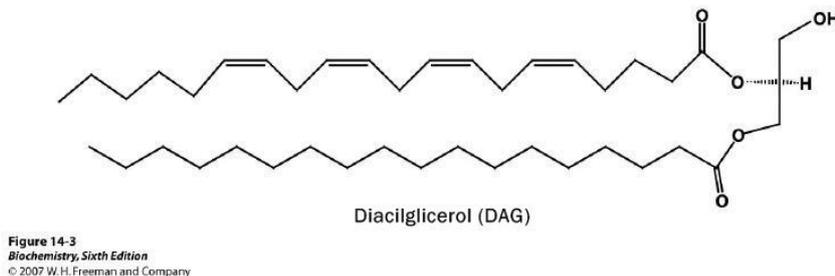


Figura 1. Estructura química del diacilglicerol (DAG). El diacilglicerol es un lípido que se encuentra asociado a las membranas celulares. *Biochemistry, Sixth Edition, 2007. W.H. Freeman and Company.*

Este segundo mensajero sólo se produce en respuesta a la activación de receptores de membrana asociados a fosfolipasas como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) y su repentino incremento se ha relacionado con los procesos de crecimiento y diferenciación celular ^[5,6]. Los ésteres de forbol, análogos funcionales de estos mensajeros, son usados como promotores de tumores en modelos animales ^[1,4].

El DAG actúa como un modulador de la proteína kinasa C (PKC) durante la transducción celular y tiene como dianas moleculares varias proteínas de la superfamilia de Ras GTPasas y RhoGTPasas ^[1,5]. Estas GTPasas son elementos importantes de las rutas que controlan la proliferación celular, la transformación celular y la metástasis.

La superfamilia Ras y Rho GTPasas

La superfamilia Ras de pequeñas GTPasas y proteínas G de pequeño tamaño está formada por cinco familias que agrupan proteínas que comparten propiedades bioquímicas y gran homología en su secuencia. Las familias se denominan por el nombre del miembro más representativo y entre ellas destacan Ras, Rho, Rab, Ran y Arf [Figura 2] ^[15].

Las Rho (Ras homologue) GTPasas, son unas GTPasas de pequeño tamaño homólogas a Ras que están muy conservadas en eucariotas, desde las levaduras hasta mamíferos ^[11,14]. La propiedad más importante de estas GTPasas es que están compuestas por sólo un monómero

y participan en la señalización celular a través de los receptores acoplados a proteínas G y los receptores tirosina kinasas. De esta familia destacan por su importancia las isoformas A, B y C de Rho, Rac1 y Rac2 y Cdc42 ^[11,14].

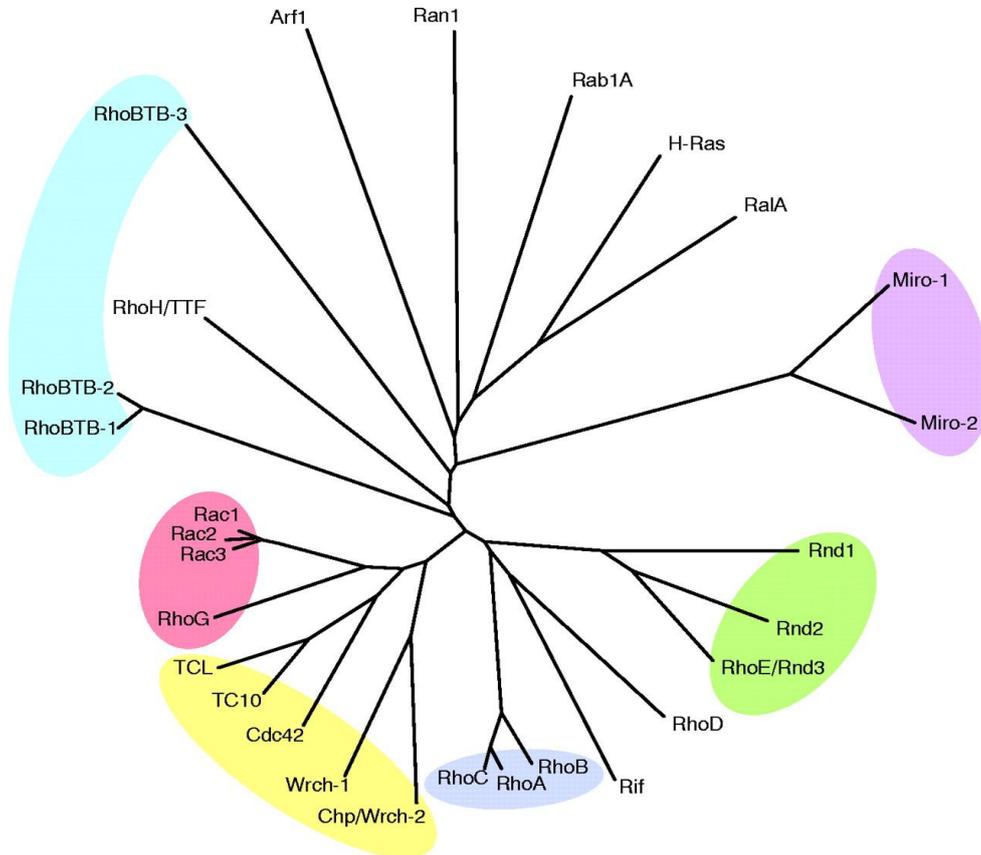


Figura 2. Representación esquemática del árbol filogenético de la familia de las Rho GTPasas y de otros representantes de la superfamilia de las Ras GTPasas. Según el análisis de la secuencia de aminoácidos, se pueden diferenciar 6 grandes subfamilias de las RhoGTPasas: las que se relacionan con RhoA (azul y en la zona inferior), Rac (rosa fucsia), Cdc42 (amarillo), las proteínas Rnd (verde), las proteínas RhoBTB (azul claro y en la zona superior/izquierda) y las proteínas Miro (violeta) ^[14].

Las RhoGTPasas tienen varias funciones entre las que destacan la organización del citoesqueleto de actina, la transformación, la expresión génica, la migración, el control del ciclo celular y la metástasis ^[9, 11, 15].

Las Rho GTPasas pueden controlar su paso de estado inactivo (unido a GDP) a activo (unido a GTP) a través de tres tipos de proteínas: los factores de intercambio de nucleótidos (GEF) que son intermediarios del paso de GDP a GTP activando las GTPasas, las proteínas activadoras de GTPasas (GAPs) que actúan de modo inverso e inactivan a las GTPasas facilitando la hidrólisis del GTP en GDP y los inhibidores de la disociación de los nucleótidos de guanina (GDIs), que se unen a la forma unida a GDP limitando el acceso de las GEFs y manteniendo a las GTPasas en

su estado inactivo [Figura 3] ^[9,11,12,15]. Este último tipo de moléculas no están presentes en todas las Rho GTPasas.

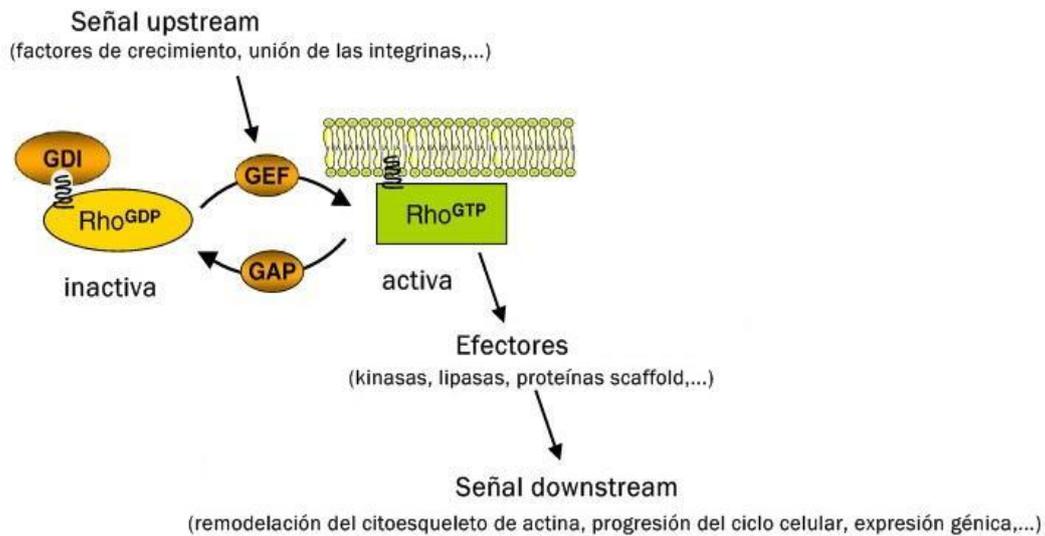


Figura 3. Representación gráfica del mecanismo de acción de las Rho-GTPasas y de su regulación mediante los GEFs, las GAPs y los GDIs. Las GEFs son las proteínas que activan a las GTPasas mediante el paso de GDP (inactivo) a GTP (activo). Las GAPs, por el contrario, son las proteínas que inactivan a las GTPasas produciendo la hidrólisis del GTP en GDP y las GDIs son aquellas proteínas inhibitoras que “secuestran” a las GTPasas en su estado inactivo evitando así su posible activación.

Rac, como la mayoría de las pequeñas GTPasas, actúa como interruptor molecular modulando el cambio cíclico entre la forma activa (GTP) a la forma inactiva (GDP) a través de GAPs y GEFs ^[9].

Las quimerinas

La primera quimerina se clonó a partir del cDNA de un cerebro humano en 1990 y fue nombrada entonces n-quimerina o quimerina neuronal para ser renombrada posteriormente como α 1-quimerina ^[15].

En la actualidad, se conocen 4 isoformas de esta familia: α 1-, α 2-, β 1-y β 2-quimerina que son el resultado del splicing de los genes CHN1 y CHN2 que codifican para las isoformas alfa y beta respectivamente ^[1, 2, 9, 15].

Cada una de las isoformas de las quimerinas se encuentra preferentemente en determinados tipos celulares. Las isoformas alfa se expresan en su gran mayoría en las células del cerebro. Se destaca la presencia de la isoforma α 1-quimerina en las neuronas corticales, en las células

del giro dentado, en las células piramidales del hipocampo y en las neuronas de Purkinje del cerebelo ^[8,12]. Como en el caso anterior, la isoforma $\alpha 2$ -quimerina también se expresa en el cerebro detectándose en las dendritas, en los axones y en la zona perinuclear de las neuronas ^[12].

Las isoformas beta por el contrario, no son tan uniformes en su localización; mientras que la isoforma $\beta 1$ -quimerina se ha descrito únicamente en testículo, la isoforma $\beta 2$ se encuentra principalmente en las células granulares del cerebelo aunque también se ha descrito en los linfocitos T ^[8,15].

Aunque todavía no se conocen con exactitud las funciones biológicas de las quimerinas, se cree que éstas guardan una intensa relación con su localización. De este modo, se ha observado que las isoformas alfa están relacionadas con los procesos neuronales como la neuritogénesis, el crecimiento y la dirección de los axones y la morfología dendrítica ^[4,8]. Las isoformas beta se relacionan con el control del ciclo celular, el reordenamiento del citoesqueleto, la migración, la adhesión y se ha demostrado que regulan la activación de Rac en respuesta a la estimulación celular con EGF (Epidermal Growth Factor) a través de su receptor EGFR ^[6].

Existen varios datos en la literatura que sugieren una posible función de las quimerinas como genes supresores de tumores ya que regulan negativamente la activación de Rac y presentan propiedades anti-proliferativas y anti-migratorias en células cancerosas ^[15]. Además, existen pruebas de que estas proteínas están reguladas negativamente en cierto tipo de cánceres como el glioma o el cáncer de mama ^[6, 9,15].

Estructura y mecanismo de acción de las quimerinas.

Las quimerinas recibieron su nombre por parecer una “quimera” entre el dominio GAP de BCR (Breakpoint Cluster Region), una proteína afectada por la translocación del cromosoma Philadelphia en la leucemia mieloide crónica y el dominio C1 de las isoenzimas de la proteína kinasa C (PKC) ^[1,10,15]. Ambos dominios estructurales son comunes a todas las quimerinas conocidas. [Figura 4].

El dominio C1, localizado en la región reguladora N-terminal, está constituido por unos 50 aminoácidos aproximadamente y se definieron en origen como módulos de unión a lípidos de las isoenzimas de PKC [Figura 5A] ^[1,6]. Existen dominios C1 denominados “típicos” y “atípicos”, basándose en su capacidad de unión a ésteres de forbol/DAG o no, respectivamente ^[3,15]. En el caso de los dominios atípicos se ha caracterizado una pérdida de elementos de la secuencia que impide, por un lado, un correcto plegamiento en forma de lámina β del sitio de unión al ligando, y por otro, la eliminación de residuos hidrofóbicos esenciales para la inserción en la membrana ^[3]. Aunque inicialmente se consideró que los dominios C1 eran exclusivos de las PKC, hoy en día se han encontrado dominios C1 típicos en gran variedad de moléculas como proteína kinasas D (PKDs), Ras GRPs y diacilglicerol kinasas (DGKs).

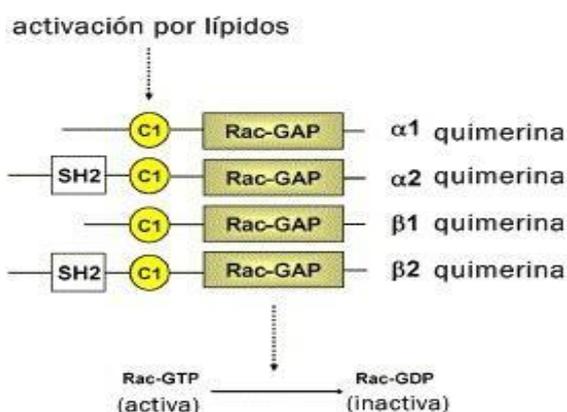


Figura 4. Comparación y localización de los dominios estructurales presentes en las isoformas de las quimerinas. El dominio C1 de unión a ésteres de forbol/DAG y el pequeño dominio Rac-GAP localizado en la parte C-terminal, son comunes a todas las isoformas. Sin embargo, el dominio SH2 que se localiza en la zona N-terminal, sólo está presente en las isoformas $\alpha 2$ y $\beta 2$ ^[10].

El dominio C1 de las quimerinas es típico y por lo tanto contiene todas las estructuras para unirse con gran afinidad a DAG y a los ésteres de forbol ^[2]. De hecho, presenta un 40% de homología en su estructura respecto al del PKC y es idéntico en un 94% en todas sus isoformas ya que el splicing del gen se produce upstream de la secuencia que codifica para este dominio ^[1,15]. A diferencia del dominio C1 de PKC, en las quimerinas sólo hay una única copia del mismo que es a su vez suficiente para unir los ésteres de forbol /DAG, activar las quimerinas y mediar en la translocación de éstas desde el citoplasma hacia las membranas ^[2, 4,13]. La observación de la translocación de la β -quimerina al aparato de Golgi posterior a su tratamiento con ésteres de forbol confirma la translocación subcelular de estos receptores ^[1, 2,13].

El dominio GAP en la región C-terminal está constituido por 150 aminoácidos altamente homólogos con la secuencia GAP de BCR [Figura 5B] ^[6,15]. Este dominio es el encargado de estimular la actividad GTPasa intrínseca de Rac facilitando su transición al estado inactivo ^[1, 2, 4,9]. El dominio GAP de las quimerinas α y β son idénticas al 77%.

El dominio SH2 (Src homology 2) sólo está presente en el extremo amino terminal de las isoformas $\alpha 2$ -quimerina y en $\beta 2$ -quimerina [Figura 5C]. Este dominio es un módulo de reconocimiento y unión específico de fosfotirosinas y es muy común en numerosas moléculas implicadas en la transducción de señales. La particularidad de éstos respecto al resto de dominios SH2 es que en las quimerinas, el dominio contiene un residuo de ácido glutámico al inicio del mismo, en vez de un residuo de triptófano ^[15]. Poco se conoce del papel de este dominio en las quimerinas pero sí se ha descrito la interacción de estos dominios en $\alpha 2$ -quimerinas con otras proteínas durante el proceso de neuritogénesis ^[15].

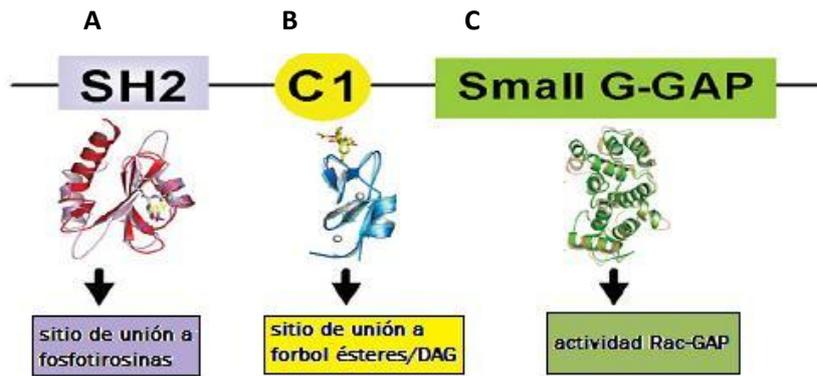


Figura 5. Representación gráfica de los diferentes dominios presentes en las quimerinas junto con sus funciones principales. A. El dominio SH2 se encarga de reconocer y unir específicamente proteínas con fosfotirosinas. B. El dominio C1 es imprescindible para unirse a los ésteres de forbol /DAG. C. El dominio GAP inactiva Rac acelerando el ratio de hidrólisis de GTP ^[15].

La estructura tridimensional de las quimerinas resuelta a través de la cristalografía de rayos X, ha permitido conocer su disposición espacial y comprender el mecanismo de acción de las mismas. Según estos estudios se ha concluido que el dominio C1 forma varios enlaces tanto con el dominio GAP como con el dominio SH2. Por una parte, el sitio activo del dominio GAP está bloqueado por zonas del extremo amino terminal que impiden estéricamente cualquier unión de Rac al complejo ^[12,15]. Por otra parte, el dominio de unión a ésteres de forbol/DAG del dominio C1 está enterrado entre secuencias del extremo N-terminal, del dominio SH2 y del dominio GAP por lo que no es activo en esta conformación [Figura 6A]. De este modelo se ha deducido que es necesario un cambio conformacional que permita exhibir el dominio C1 y que favorezca la unión de éste a los ésteres de forbol/DAG previa a la translocación a membranas [Figura 6B] ^[6, 13,15].

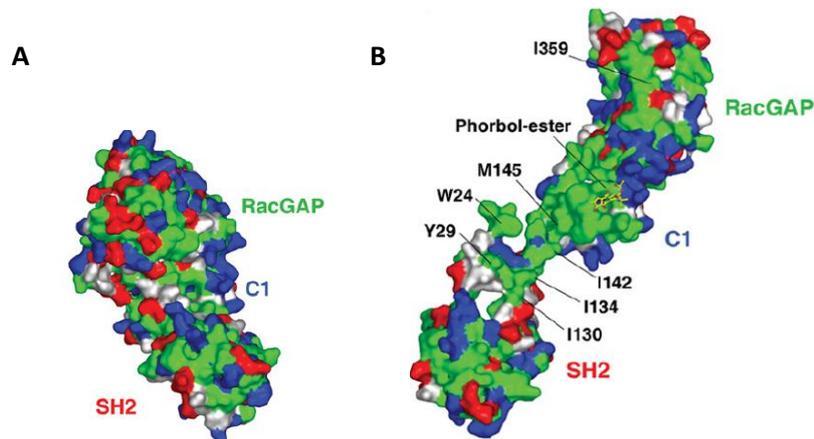


Figura 6. Representación tridimensional de la β 2-quimerina a partir de los datos obtenidos por cristalografía de rayos X. A. Conformación cerrada que presentan las quimerinas cuando están inactivas en la que el dominio C1 queda enterrado entre los otros dominios funcionales. B. Conformación de las quimerinas en estado activo en la que la estructura está mucho más abierta con el dominio C1 accesible a sus ligandos ^[15].

Los datos derivados de la estructura cristalina han permitido formular un modelo de activación de las quimerinas ^[3].

Según este modelo, en condiciones normales de reposo, las quimerinas en estado inactivo, se encuentran en el citoplasma de las células en su conformación más cerrada [Figura 7]. En presencia de algún estímulo como EGF, se genera DAG y se produce un cambio conformacional que tiene como resultado la generación de una estructura más abierta con un dominio C1 expuesto al medio. Como el sitio de unión al ligando es accesible, DAG se une y media en la inserción en la membrana translocando todo el complejo. Posteriormente y una vez la quimerina está insertada en la membrana, Rac se asocia y se activa el dominio Rac-GAP que hidrolizará el GTP y mediará en la conversión de Rac-GTP a Rac-GDP.

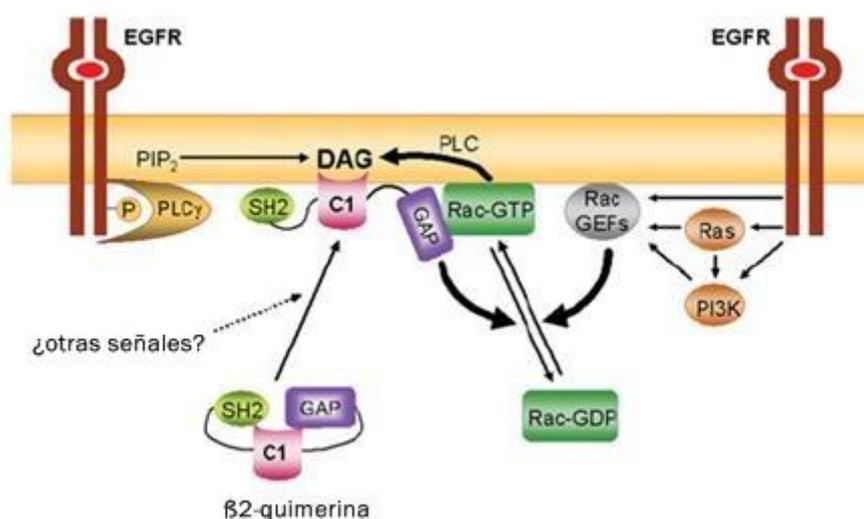


Figura 7. Representación esquemática del mecanismo de activación y de acción de las quimerinas. En estado de reposo, las quimerinas se encuentran en el citoplasma de las células y mantienen una conformación cerrada. En presencia de un estímulo, se produce un cambio conformacional y el dominio C1 puede unirse a forbol esteres/DAG. Esta unión es la responsable de la translocación de las quimerinas a la membrana donde Rac se podrá a su vez, unir al dominio GAP ^[15].

Hipótesis e importancia del estudio

El objetivo del presente estudio es clarificar los mecanismos de regulación implicados en la activación de las quimerinas. Para ello, el primer paso es analizar algunos de los aspectos de la regulación de las quimerinas que siguen siendo desconocidos, centrándonos en los dos procesos más probables: la fosforilación y la interacción proteína-proteína.

Estudios previos han descrito la fosforilación de α2-quimerinas en neuronas y de las β2-quimerinas en las células COS1 ^[9,12]. Sin embargo, no se conocen todos los residuos implicados en estos procesos ni su función biológica. Primeramente, analizaremos de forma global todos

los sitios de fosforilación de las quimerinas y en un futuro, analizaremos la relevancia de cada fosforilación y su implicación en la translocación de los receptores a la membrana y/o en la activación de las quimerinas.

Varios residuos ya han sido descritos como sitios de fosforilación y todos ellos regulan negativamente la activación de las quimerinas. La fosforilación en Ser¹⁶⁹ impide la traslocación de la β 2-quimerina a la membrana y las fosforilaciones en Tyr²¹ y Tyr¹⁵³ por las SFK (Src family kinase), regulan negativamente la activación de las β 2-quimerinas y su actividad Rac-GAP [6, 9,12].

Partiendo de la presencia de fosforilaciones con efecto negativo sobre la actividad de Rac; centramos nuestra hipótesis de trabajo en la presencia de otros residuos que, al fosforilarse, puedan actuar positivamente sobre la activación de Rac, algo que hasta el momento no ha sido descrito.

Para comprobar la hipótesis, intentaremos establecer unos objetivos específicos:

Objetivo 1: Establecimiento de las condiciones de estimulación necesarias para nuestro sistema. El experimento inicial servirá de comprobación para detectar qué tipo de estimulación es el más adecuado para nuestro modelo celular y para nuestras condiciones "in vitro". Una vez elegido el tipo de estímulo a usar, y comprobado que nuestro modelo celular se comporta del mismo modo que en condiciones normales, se analizará el efecto de nuestro estímulo sobre nuestros receptores de ésteres de forbol.

Objetivo 2: Evaluación de las fosforilaciones de las quimerinas y análisis de los posibles sitios de fosforilación existentes entre las diversas isoformas descritas. Se quiere comprobar la existencia de patrones de fosforilación similares entre ellas o si existen respuestas específicas de cada isoforma.

Objetivo 3: Identificación de los dominios de las quimerinas implicados para seguir acotando la zona de búsqueda de sitios de fosforilación de las quimerinas.

El organismo modelo elegido es la línea celular COS 1 ya que ha sido utilizada con anterioridad en todos los estudios hechos sobre las β -quimerinas. COS es un acrónimo de células derivadas de CV-1 en Origen y portadoras del material genético de SV40. Son células adherentes con una forma similar a la de los fibroblastos y provienen del riñón del mono verde africano. Es un sistema muy sencillo y fácil de transfectar por lo que supone una gran elección para este estudio. Otras líneas celulares como las células Jurkat, una línea celular inmortalizada de células T, fueron también consideradas para este proyecto y no se descarta su uso en un futuro ya que son de origen humano y los resultados obtenidos en ellas también serían de interés.

Este estudio es de gran importancia ya que permitirá conocer los mecanismos de regulación de estos receptores y a la larga, sus vías completas de señalización. Además, conocer la vía completa es el primer paso de la generación de una terapia clínica, ya que la inmensa mayoría

de los fármacos tienen su diana farmacológica en alguno de los efectores o en la regulación de efectores de una determinada ruta de señalización. Conocida la relación de las β -quimerinas con ciertos tipos de cánceres, se hace necesario conocer sus mecanismos de regulación para evitar los efectos adversos que deriven de su desregulación celular.

Materiales y métodos

- *Línea celular y cultivos celulares*

Se usó la línea celular COS 1 disponible en el laboratorio.

Las células se mantuvieron en medio DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium (Life technologies™) suplementado con un 10% de Suero Bovino, 1% de Glutamina, 1% Estreptomicina/Penicilina (todos los materiales de Invitrogen) y un 0,2% de ciprofloxacino (Sigma-Aldrich).

Se crecieron en una placa de Petri de 10 cm de diámetro y se mantuvieron en un incubador a 37°C con una atmósfera de 5% CO₂.

- *Plásmidos y método de transfección*

Se utilizaron vectores de expresión de las distintas isoformas de las quimerinas y de sus mutantes truncados disponibles en el laboratorio. Los plásmidos usados son pEGFP_N1, pEGFP-β2-FL, pEGFP-α2-FL, pEGFP-β1-FL, pEGFP-β2-N-terminal y pEGFP-β2-GAP.

Las células se transfectaron por el método DEAE-dextrano cuando presentaban una confluencia cercana al 50%. Previo al proceso de transfección y por cada placa de 10 cm de diámetro, se mezclaron 4 ml de medio DMEM sin suplementar con 160 µl de una solución de DEAE-dextrano filtrada compuesta por PBS con 10 mg/ml DEAE-dextrano (Sigma Aldrich) y 2,5 mM cloroquina (Sigma Aldrich). A estas soluciones se les añadió 2-5 µg de plásmido según el experimento.

Específicamente se añadieron 2 µg de pEGFP_N1 y 5µg de pEGFP-β2-FL, pEGFP-α2-FL, pEGFP-β1-FL, pEGFP-β2-N-terminal y pEGFP-β2-GAP.

Las placas se lavaron dos veces con 5 ml de medio DMEM sin suplementar y posteriormente se añadió la mezcla preparada con el ADN correspondiente. Se incubaron de 3 a 4 horas en las condiciones normales de mantenimiento. Posteriormente se les añadió 5 ml de PBS con 10% Dimetil Sulfóxido Hybrimax^R DMSO (Sigma Aldrich) y se las incubó a temperatura ambiente durante dos minutos. Para finalizar, se les añadió 10 ml de medio suplementado y se las dejó incubando 48 horas.

- *Estimulación y precipitación con GFP-Trap*

Para poder realizar la estimulación celular, las células COS1 se mantuvieron con medio DMEM al 0,5% suero bovino durante 24 horas. Se prepararon las soluciones con el estímulo para cada

caso, siendo 2µg de EGF y una solución de pervanadato formada por 250 µl de ortovanadato (Na_3VO_4) 100 mM, 301,3 µl agua miliQ y 5,7 µl H_2O_2 al 30% que se incorporaban al medio de las células.

Las placas se incubaron durante 5 minutos a 37°C después de lo cual se procedió a su lisis mediante la acción mecánica de un scraper y 1 ml del buffer de lisis compuesto por 20 mM Tris HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5mM MgCl, 0,5%NP-40 Igelpal, 1mM ortovanadato (Na_3VO_4), 10mM β-glicerolfosfato y Cømplete EDTA free (Roche Diagnostics GmbH).

Para la precipitación de las proteínas etiquetadas con Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP), se usó GFP Trap^R (Chromotek). Este sistema de precipitación consiste en pequeñas bolas de agarosa a las que se les ha añadido el dominio $V_{\text{H}}\text{H}$ (zona variable de la cadena pesada) del anticuerpo anti-GFP de alpaca. Se usan los dominios $V_{\text{H}}\text{H}$ porque son los fragmentos intactos más pequeños (con un peso molecular aproximado de ~ 13 kDa) capaces de unir el antígeno. Estas nanopartículas son muy estables, específicas y tienen gran afinidad por GFP y proteínas fusionadas a GFP.

El GFP Trap se equilibró primeramente con el buffer de lisis usado y luego se adicionaron 40 µl del mismo a cada tubo con 950 µl del lisado total de cada placa. Se dejaron en agitación y a 4°C de temperatura durante una hora y una vez pasado este tiempo, se realizaron unas centrifugaciones seriadas para precipitar todas las proteínas y bolas eliminando aquellas proteínas que se pudiesen haber unido de forma inespecífica [Figura 8]. Finalmente se adicionó SPLB 1X a cada tubo. Todas las muestras fueron hervidas durante 5 minutos y congeladas a -20°C hasta su uso.

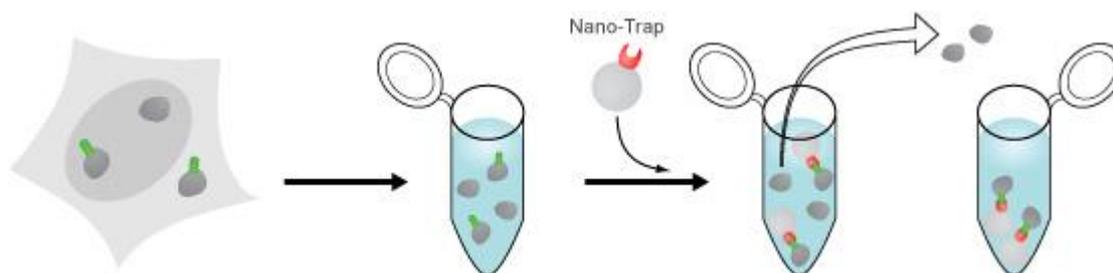


Figura 8. Representación del proceso de precipitación de proteínas por GFP-Trap. Las partículas de agarosa presentan un único dominio recombinante ($V_{\text{H}}\text{Hs}$) del anticuerpo α-GFP de alpaca. Las nanopartículas van a reconocer específicamente a GFP o proteínas etiquetadas con GFP y se van a unir con ellas. A través de un proceso de centrifugación, podemos separar el sobrenadante del pellet en el que se encuentran las nanopartículas unidas a la proteína de interés. Chromotek^R

- *Ensayo de activación de Rac1 "Pull Down"*

Para determinar los niveles de activación de Rac, las células COS1 fueron transfectadas y se estimularon como se ha indicado previamente. Posteriormente, se procedió a su lisis con GLPB buffer compuesto por 20 mM Tris HCl 7,2, 150 mM NaCl, 5mM MgCl₂, 0,5% NP40 Igelpal, 5mM

β -glicerolfosfato, 1mM DTT Protease Inhibitors y 10 μ g del dominio de unión (PBD) a Rac de PAK-GST por cada placa a lisar. Este dominio PBD se une específicamente a la forma activa de Rac (Rac-GTP).

Para la precipitación del complejo Rac-GTP-GST-PAK se usaron una bolas de Glutation-sefarosa transferasa (GSB). Estas nanopartículas unen específicamente las proteínas unidas a la etiqueta molecular GST. Esta etiqueta se ha añadido al dominio de unión (PDB) de Rac activado de la proteína PAK, por lo que en presencia de Rac-GTP (activo), se van a producir todas las uniones y el complejo proteico va a precipitar pudiéndose separar del resto por centrifugación. En la figura 9 se representan las interacciones que se establecen entre las proteínas para generar el complejo [Figura 9].

Las bolitas de GSB se lavaron y equilibraron en buffer de lisis (sin PAK) y posteriormente se añadieron 25 μ l de las mismas a cada tubo junto con los 900 μ l de lisado total para cada condición experimental. Como en protocolo de GFP-Trap, las muestras se incubaron a 4°C de temperatura y en agitación durante una hora y, una vez pasado este tiempo, se realizaron unas centrifugaciones seriadas para precipitar todas las proteínas y bolas eliminando aquellas proteínas del sobrenadante que se pudiesen haber unido de forma inespecífica. Finalmente se adicionó SPLB 1X a los tubos con el precipitado y SPLB 5X a los tubos con las muestras del lisado total. Todas las muestras se hirvieron durante 5 minutos y se guardaron a -20°C hasta su posterior uso.

La presencia de Rac fue detectada mediante el uso de un anticuerpo monoclonal α -Rac 1 tanto en el lisado total como en el volumen precipitado por las bolas Glutation-Sefarosa™ 4B (GE Healthcare Bio-Sciences AB).

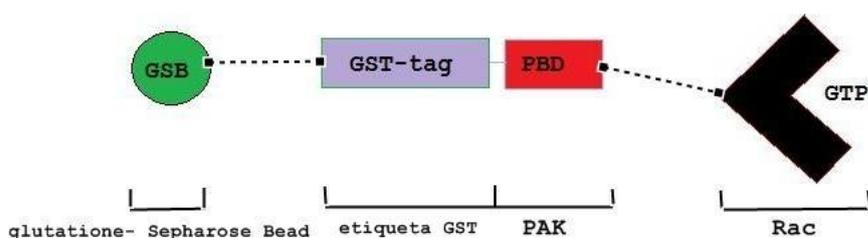


Figura 9. Representación esquemática de las interacciones en el ensayo de activación de Rac. Las bolas de glutatión sepharosa tienen gran avidez por aquellas proteínas marcadas con un GST tag. Al dominio de unión a Rac-GTP (PBD), se le ha añadido otro dominio GST con este marcaje molecular, por lo que en presencia de Rac-GTP se establecerán estos enlaces y precipitará todo el complejo pudiéndose purificar la muestra por centrifugación.

- *Análisis por densitometría*

Para el análisis de densitometría de los geles de western blot se usó el software Quantity One de BioRad y su aplicación para medir volúmenes.

Los valores obtenidos de este proceso fueron posteriormente analizados con Excel para realizar la representación gráfica.

- *Western Blot*

Los lisados totales y las proteínas precipitadas se separaron por electroforesis SDS-PAGE al 12% para el ensayo pulldown y al 10% para el resto de los casos. Posteriormente fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Whatman^R).

Las membranas fueron bloqueadas con una solución de BSA (Bovine Serum Albumin) al 3% en TBST (Tris-Buffered Saline con Tween 20) para aquellos ensayos que requerían inmunodetección por anticuerpos anti-fosfotirosina y el resto con leche desnatada en polvo al 5%.

Para cada caso, se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios y anticuerpos secundarios durante 1 hora a temperatura ambiente.

Los anticuerpos primarios usados fueron:- α -fosfotirosina (PY99) mouse anticlonal IgG_{2b} (Santa Cruz Biotecnología), α -rac (Rac1) mouse (BD Transduction Labs), α -GFP mouse (Covance) y α -GFP rabbit (e-Bioscience). Todos se usaron en concentración 1:1000 excepto α -GFP mouse que se usó en concentración 1:5000.

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron en cada caso: α -rabbit Horseradish Peroxidase Linked (HRP) o α -mouse HRP (GE Healthcare) en concentración 1:3000. Las membranas se revelaron usando el kit de detección Pierce[®] ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific).

- *Microscopía confocal*

Con el objetivo de analizar la translocación de las quimerinas desde el citosol a las membranas, varios grupos de células COS1, crecidas en el mismo medio y bajo las mismas condiciones anteriormente descritas, fueron cultivadas y transfectadas con diversas isoformas de β -quimerina y de mutantes truncados. Se colocaron varios cristales circulares (coverlips) de 12 mm de diámetro sobre las placas de cultivo con el fin de hacer crecer células sobre este soporte. Posteriormente, varios de estos cristales fueron aislados y se incorporaron a otras placas en las que se añadieron los estímulos EGF y PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) respectivamente. Después de 5 minutos de incubación a 37°C, las células fueron fijadas con formaldehído al 4% en PBS. Finalmente los cristales fueron lavados con PBS y se procedió a la tinción de los núcleos con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 100 ng/ml. Una vez teñidos, los cristales fueron adheridos al portaobjetos usando medio de montaje (Mowiol).

Las imágenes se obtuvieron con el microscopio confocal Leica TCS SP5 en el Servicio de microscopía del IBGM.

Resultados

Objetivo 1: Establecer las condiciones de estimulación adecuadas para el ensayo de fosforilación de las β -quimerinas.

El pervanadato y el EGF son estímulos capaces de fosforilar a las β -quimerinas.

El experimento inicial pretendía encontrar aquel estímulo capaz de activar a las quimerinas y producir su fosforilación de manera detectable. Para ello, inicialmente se transfectaron células COS1 con un plásmido codificante para una proteína de fusión de GFP- β 2-quimerina y se estimularon con pervanadato o con EGF.

El pervanadato es un inhibidor irreversible de fosfotirosina fosfatasas y por tanto, evita que se eliminen los grupos fosfato y mantiene los residuos en su estado fosforilado. Como consecuencia, se obtiene una gran señal cuando se revelan las películas con anti-fosfotirosina ya que se mantienen todas las fosforilaciones que se hayan producido. En el western blot se observa una clara fosforilación de la isoforma β 2-quimerina lo que nos sirve de indicación y nos permite afirmar la existencia de residuos de tirosina en esta isoforma que sí pueden sufrir procesos de fosforilación [Figura 10A].

El estímulo con EGF por el contrario, es mucho más específico y fisiológico. En la bibliografía quedaba descrito que las quimerinas, como otras Rho GTPasas, eran activadas por el receptor de EGF, por lo que la elección de EGF como estímulo es más acertada ^[1,9]. En el western blot se obtiene un bandeo específico que podemos relacionar con las fosforilaciones ocurridas exclusivamente en respuesta al estímulo aplicado [Figura 10B]. Como en el caso anterior, la detección de la proteína GFP nos sirve por una parte, de control para verificar que la transfección se ha realizado con éxito y para localizar específicamente la banda que se corresponde con nuestra proteína de interés, la GFP- β 2-quimerina.

A la vista de los resultados obtenidos y teniendo en cuenta que la estimulación con EGF es la fisiológica y detectable con nuestros métodos, se decide usar EGF en futuros experimentos como estímulo de la β 2-quimerina.

Sorprendentemente, se ha detectado un patrón de bandas que acompañan a las β 2-quimerinas en ambos experimentos y que no aparece descrito en estudios anteriores. En los casos en los que las células han sido tratadas con PV o EGF, se observa la banda correspondiente a nuestra proteína de interés GFP- β 2-quimerina (con un peso molecular total de unos 75KDa) y se observan otras dos bandas de un peso molecular inferior pertenecientes a dos proteínas que co-precipitan con nuestra proteína y que también presentan residuos de tirosina fosforilados.

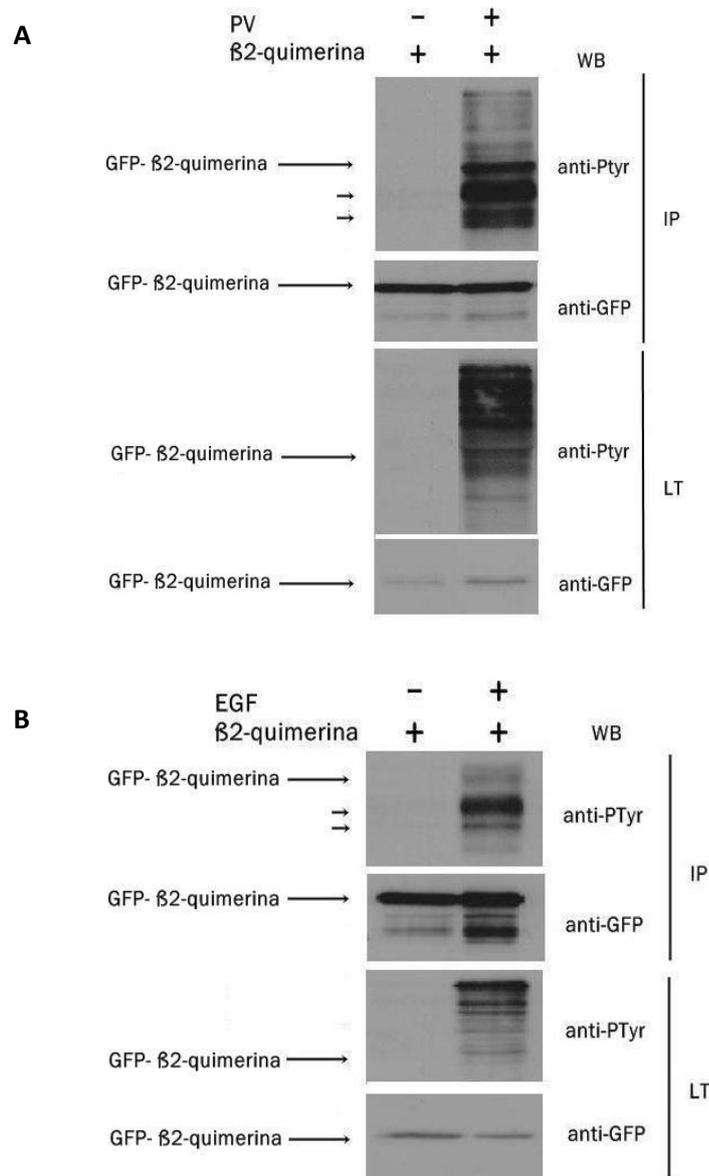


Figura 10. La $\beta 2$ -quimerina se fosforila en tirosina tras la estimulación celular. A. Western blot en el que se muestran las fosforilaciones en tirosinas de la isoforma $\beta 2$ -quimerina en respuesta a la estimulación por pervanadato. Células COS1 fueron transfectadas con el plásmido que codifica para la $\beta 2$ -quimerina y fueron tratadas con pervanadato. Se analizaron las fosforilaciones en tirosina del inmunoprecipitado y del lisado total y se rebloteó con anti-GFP como control de la correcta transfección. Con una flecha se marca la banda correspondiente a GFP- $\beta 2$ -quimerina y con una flecha de menor tamaño se marcan dos bandas pertenecientes a dos proteínas que co-precipitan con nuestra proteína de interés. B. Western blot en el que se muestran las fosforilaciones en tirosinas de la isoforma $\beta 2$ -quimerina en respuesta a la estimulación por EGF. Células COS1 fueron transfectadas con el plásmido que codifica para la isoforma y se estimularon con EGF. Se analizaron los residuos de fosfotirosinas en el inmunoprecipitado y en el lisado total en ausencia y en presencia del estímulo. Como en el caso anterior, una flecha señala nuestra proteína de interés GFP- $\beta 2$ -quimerina y dos pequeñas flechas señalan las proteínas fosforiladas en tirosinas que co-precipitan con $\beta 2$ -quimerina.

En nuestro sistema in vitro de células COS1, las β 2-quimerinas regulan negativamente la activación de Rac.

Para comprobar que, en nuestro sistema las β -quimerinas se expresaban y funcionaban regulando negativamente a Rac como en su ambiente original, se realizó un ensayo Pull down para la detección de Rac activado (Rac-GTP) como se ha descrito previamente. Primero, se realizó la precipitación de Rac en lisados de células COS1 que habían sido transfectadas con plásmidos codificantes para GFP- β 2-quimerina o para GFP como control. Posteriormente se separaron las muestras por western blot y se detectó la presencia de Rac con un anticuerpo monoclonal α -Rac.

Se observó entonces que en los precipitados obtenidos de las muestras transfectadas únicamente con GFP, no había gran variación de sus niveles de Rac activado con la excepción de un ligero aumento cuando se aplicaba un estímulo externo.[Figura 11A].

Sin embargo, se observó una disminución en la cantidad de Rac-GTP mucho más acusada en los inmunoprecipitados de las muestras transfectadas con β 2-quimerinas y estimuladas. Este resultado era el esperado ya que explica el mecanismo de acción de las quimerinas. En estado de reposo (-) las β 2-quimerinas se encuentran en estado inactivo en el citosol. Sin embargo, en presencia de un estímulo (+EGF), la conformación de las β -quimerinas cambia y se activa, dejando libre su dominio C1 y translocando a la membrana donde su dominio GAP se asocia con Rac. En esta situación el dominio GAP de las β -quimerinas va a catalizar el paso de Rac-GTP activo a Rac-GDP inactivo. Como en el sistema de precipitación usado (ensayo de pull down) se precipita específicamente Rac-GTP, la acción de el domino GAP explica la menor detección de Rac activo en el medio.

Las variaciones se analizaron sobre las fracciones de los precipitados porque en ellas sólo había Rac activado y en el lisado total se detectan los niveles totales de Rac (Rac-GTP y Rac-GDP).

Como no había muestras ni duplicados suficientes para realizar un estudio estadístico que nos permitiese analizar nuestros datos, se decidió realizar una densitometría de las bandas [Figura 11B]. Para ello, se midió el volumen de cada banda con el software Quantity One de Biorad y se calcularon los valores netos restando a todos ellos el background de fondo. Posteriormente se compararon los valores obtenidos en el inmunoprecipitado con respecto al lisado total para cada condición y se asignó arbitrariamente el valor de 1 al cociente entre inmunoprecipitado y el lisado total para GFP (-). A partir de este valor, se establecieron los valores relativos del resto de condiciones.

Se concluye que en el sistema con GFP (-/+EGF) y en β 2-quimerina (-), la densidad de la banda obtenida es muy similar en todos los casos. Sin embargo, en el caso de β 2-quimerina (+EGF) hay una disminución de hasta el 80% de la banda respecto a GFP(-), GFP(+) y β 2-quimerina (-). Es esta diferencia la que podemos asumir que se debe al poder regulador de las quimerinas sobre Rac.

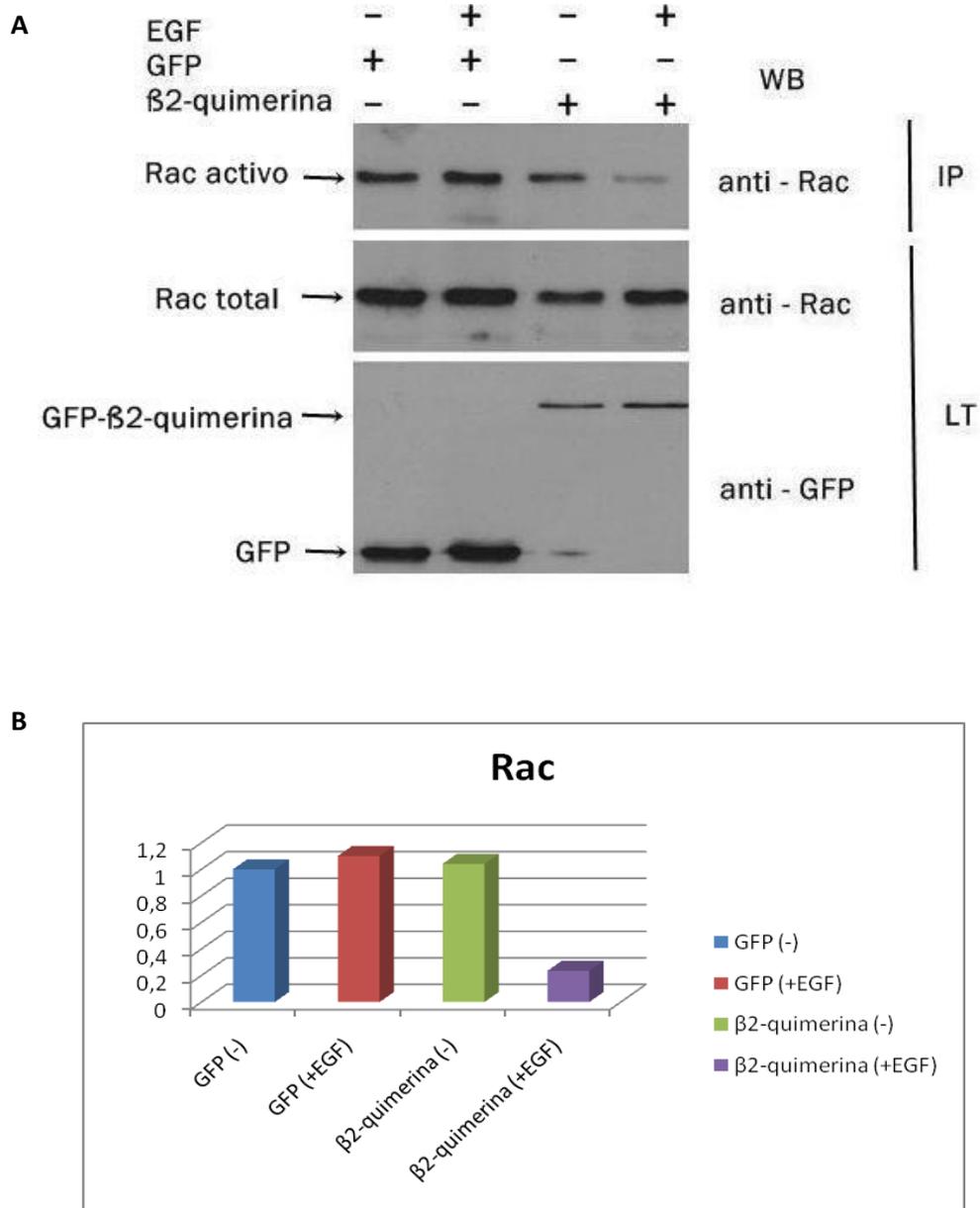


Figura 11. Ensayo de activación "pull down" para determinar los niveles de Rac-GTP. A. Western Blot del pulldown realizado sobre células COS1 transfectadas con GFP- β 2-quimerina o GFP para determinar el efecto regulador de la β 2-quimerina sobre Rac cuando ésta está en reposo y cuando está en estado activo. Se muestra la cantidad de Rac activo en el inmunoprecipitado y la cantidad total de Rac en el lisado en ausencia/presencia de estimulación (-/+EGF) para las dos condiciones. El marcaje de GFP sirve como control de la transfección. B. Representación gráfica de la modificación relativa de Rac-GTP para las diferentes condiciones analizadas. GFP (en color azul), GFP (+EGF) (en color rojo) y β 2-quimerinas en reposo (color verde), mantienen unos niveles muy similares en la cantidad de Rac-GTP. Sin embargo, cuando β 2-quimerina está activada (+EGF) (en color morado), se produce una disminución del 80% de la cantidad de Rac-GTP activo en el medio.

El patrón de fosforilación es específico de β 2-quimerina y no aparece en los controles con GFP.

Con el fin de analizar más profundamente el patrón de bandas triple obtenido en los ensayos de fosforilación, se diseñó un experimento que permitiese comprobar si este bandedo era producto de la inespecificidad del proceso de inmunoprecipitación o de si realmente, la proteína GFP- β 2-quimerina era capaz de interactuar y precipitar junto con otras proteínas. Para ello, un grupo de células COS1 fueron transfectadas con un plásmido que codificaba para GFP- β 2-quimerina y con otro grupo control de células COS1 fueron transfectadas con un plásmido que codificaba para GFP.

A ambos grupos se las estimuló con EGF en las condiciones descritas anteriormente y se las analizó la fosforilación en los residuos de tirosina en el inmunoprecipitado y en el lisado total para la condición de reposo y la estimulada.

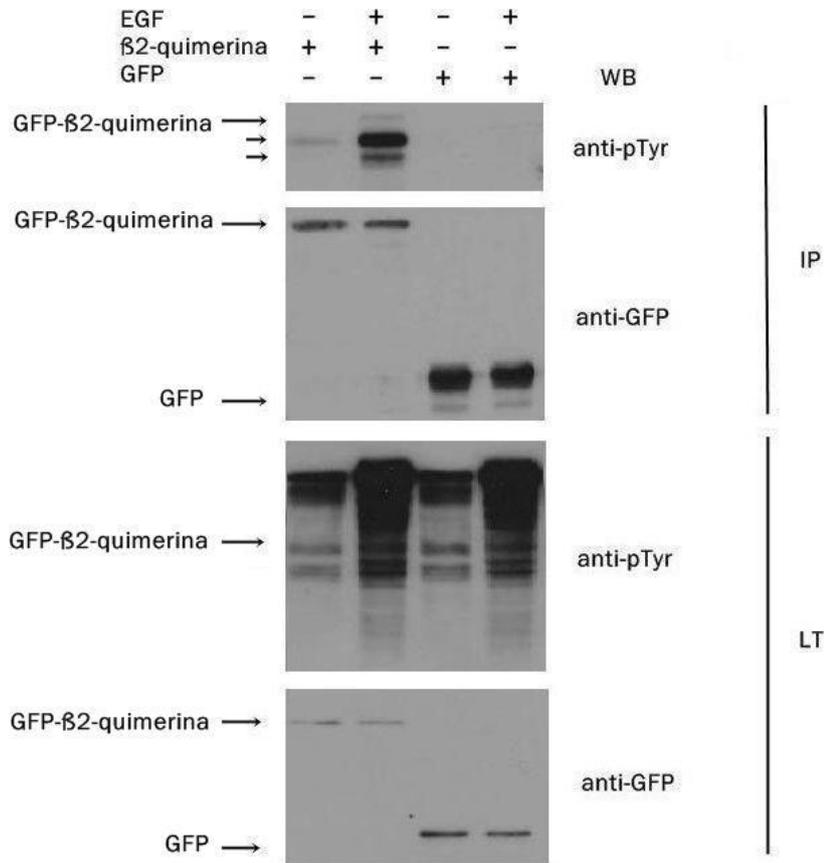


Figura 12. Western blot para la comparación de los patrones de fosforilación de β 2-quimerinas y GFP. Varios grupos de células COS1 fueron transfectadas con plásmidos que codificaban para GFP- β 2-quimerina o GFP. Posteriormente fueron estimulados con EGF y se analizó la presencia de residuos de tirosina fosforilados tanto en el inmunoprecipitado (IP) como en el lisado total (LT). La detección de GFP sirve de control de la transfección. Una flecha marca la localización de nuestra proteína de interés GFP- β 2-quimerina y dos pequeñas flechas señalan las dos bandas de las proteínas que co-precipitan con ella.

Se comprobó que el patrón de bandas sólo era observable en aquellos grupos que habían sido transfectados con el plásmido que codificaba para la isoforma de la quimerina y no en aquellos transfectados con el plásmido que codificaba para GFP [Figura 12].

Como el proceso de inmunoprecipitación con GFP_Trap es común para todas las condiciones analizadas; cualquier proteína que precipitase debido a uniones inespecíficas o errores durante el proceso, debería ser detectada igualmente en el grupo control. En nuestro caso, en el grupo control transfectado con un plásmido para GFP, no se detecta fosforilación ni en estado de reposo y ni después de haber sido estimulado con EGF. La fosforilación sólo se detecta en el grupo transfectado con la isoforma y posteriormente estimulado con EGF.

Se deduce pues, que la estimulación por EGF causa fosforilación de los residuos de tirosinas en nuestra proteína de interés y en otras proteínas, dos de las cuales puedan unirse físicamente a nuestra isoforma precipitando junto a ella.

Objetivo 2: Evaluación de la especificidad de las fosforilaciones de las isoformas de las quimerinas.

La isoforma α , al igual que la isoforma β , presentan residuos de tirosinas que se fosforilan como respuesta a un estímulo.

El siguiente paso fue comprobar si la fosforilación ocurría de manera general en las quimerinas o si era específica de isoformas concretas. Con este fin, intentamos analizar las diferencias en la fosforilación de las isoformas α 2-quimerina y β 2-quimerina. Para ello, se transfectaron células COS1 con plásmidos codificantes para las dos isoformas y se estimularon con EGF o con PV. En este caso, y a pesar de que ya habíamos elegido el EGF como el estímulo a usar en el futuro, se decidió usar también pervanadato ya que no se había descrito ningún patrón de fosforilación de las isoformas α en este modelo celular y como había observado antes, el pervanadato actuaba como un estímulo muy potente. Se realizó un western blot para separar las proteínas del inmunoprecipitado y del lisado total y se analizaron las fosforilaciones en los residuos de tirosina a través de un anticuerpo α -fosfotirosina.

El primer resultado destacable de este experimento es la detección de fosforilación de residuos de tirosina en las isoformas alfa, ya que no se había descrito anteriormente en esta línea celular y es observable después de la estimulación con PV como con EGF [Figura 13]. Como en casos anteriores, la fosforilación detectada posterior a la estimulación con PV es muy fuerte. El segundo resultado interesante que se obtiene de este experimento es la detección una vez más del mismo patrón de bandeo con dos proteínas que co-precipitan. En este caso, el patrón de bandas observado en los ensayos previos con la isoforma beta, es también detectado en los grupos experimentales que expresan la isoforma alfa.

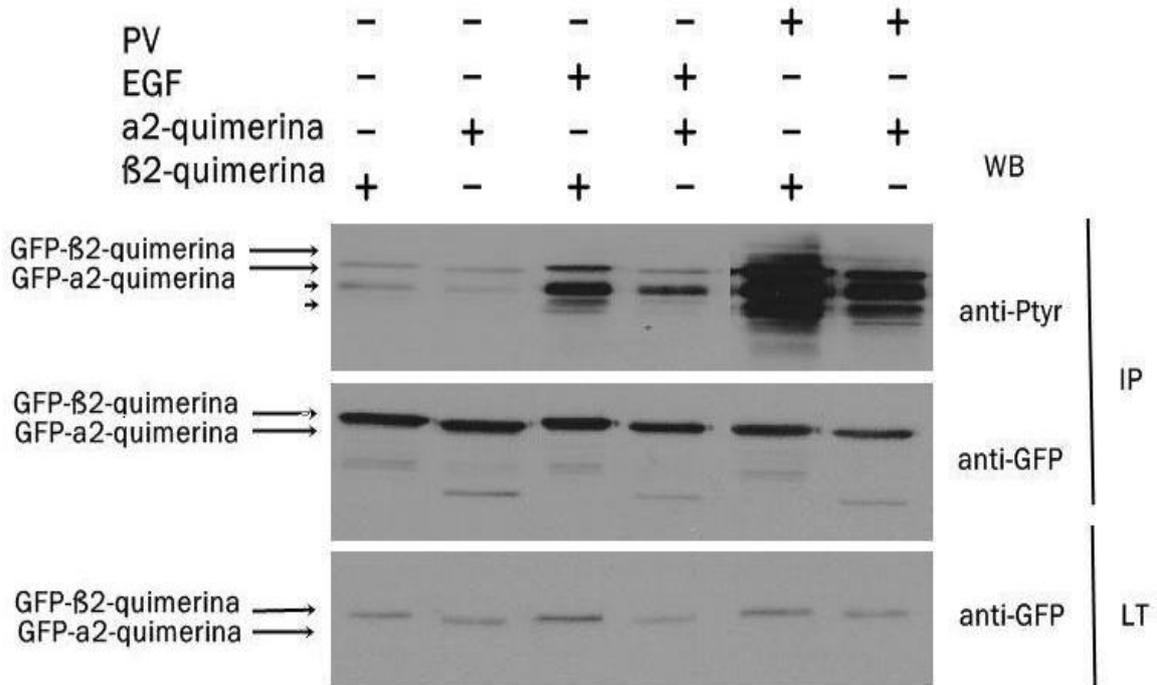


Figura 13. Western Blot para la detección de fosforilación en tirosina de las isoformas α 2-quimerina y β 2-quimerina tras la estimulación con pervanadato (PV) o factor de crecimiento epidérmico (EGF). Las células COS1 fueron transfectadas con plásmidos que codificaban para una de las isoformas y posteriormente se las expuso a alguno de los dos estímulos para observar su efecto sobre cada una de las isoformas. Se muestra el western blot del inmunoprecipitado por el método GFP-Trap (IP) y del lisado total (LT) para analizar las fosforilaciones producidas en respuesta al estímulo (anti-fosfotirosina). El marcaje anti-GFP sirve de control para demostrar que las muestras de partida estaban bien transfectadas y que la inmunoprecipitación fue correcta.

A la vista de los datos obtenidos, se concluye que tanto las isoformas alfa como las isoformas beta pueden fosforilarse, aunque hay que destacar que la señal de fosforilación en la isoforma β 2-quimerina es mucho mayor que en la isoforma α 2-quimerina. Además, ambas isoformas son capaces de unirse y precipitar dos proteínas fosforiladas en residuos de tirosinas. Como las isoformas α 2-quimerina y β 2-quimerina presentan los mismos dominios, se necesita realizar más experimentos que nos permitan conocer la localización de estas fosforilaciones.

Como la isoforma β 2-quimerina es sin duda la que presenta un patrón de fosforilación más visible, se decide seguir buscando los sitios de fosforilación en esta isoforma.

Objetivo 3: Identificación de los dominios implicados en los procesos de fosforilación.

Los residuos de fosforilación de las β 2-quimerinas se localizan exclusivamente en la zona N-terminal.

Para seguir ahondando en la búsqueda de los sitios de fosforilación de estos receptores, se realizó otro experimento de transfección en células COS1 en la que se introdujeron plásmidos que codificaban para determinados dominios de la isoforma. Se probaron la isoforma GFP- β 2-quimerina-FL (full length), GFP- β 2-quimerina N-terminal, GFP- β 2-GAP y GFP- β 1-quimerina-FL (full length) [Figura 14]. Los lisados y precipitados obtenidos de cada grupo experimental, se separaron por western blot y se analizó la presencia de residuos de tirosina fosforilados en cada caso en presencia y en ausencia de un estímulo fisiológico como EGF.

El diseño del experimento permite comparar los dominios comunes de las isoformas con el patrón de fosforilación obtenido, identificando así los dominios susceptibles de fosforilación.



Figura 14. Representación esquemática de las isoformas (etiquetadas con GFP) analizadas en el experimento.A. β 2-quimerina (full length) B. β 2 quimerina N-terminal C. β 2 quimerina GAP D. β 1 quimerina (full length).Como cada isoforma carece de uno de los dominios a estudiar, se pueden establecer relaciones entre las bandas obtenidas y descartar alguno de los dominios en futuros experimentos. El dominio SH2 sólo está presente en los casos A y C. La isoforma β 2-N terminal carece del dominio GAP y la β 2-GAP carece a su vez de los dominios SH2 y C1.

Sorprendentemente, sólo se detectan residuos fosforilados en la β 2-quimerina (full length) y en el dominio N-terminal de esa misma isoforma [Figura 15]. Comparando sus estructuras se observa que las dos tienen en común el dominio C1 y el dominio SH2. Sin embargo, se descarta el dominio C1 ya que de producirse allí alguna fosforilación, ésta hubiese sido detectada también en la isoforma β 1 ya que como se ha descrito anteriormente, los dominios C1 de las isoformas son homólogos en un 94%.

Se concluye pues que el dominio SH2 es el único de las β 2-quimerinas que se fosforila en respuesta a un estímulo. Además este resultado es coherente con el patrón de tres bandas observado durante todos los experimentos ya que el dominio SH2 reconoce y une

específicamente proteínas con residuos de tirosina fosforilados. Por lo que la fosforilación de residuos de tirosinas en otras proteínas haría que fuesen detectadas y unidas por el dominio SH2 de las β 2-quimerinas cuando estas están a su vez activadas.

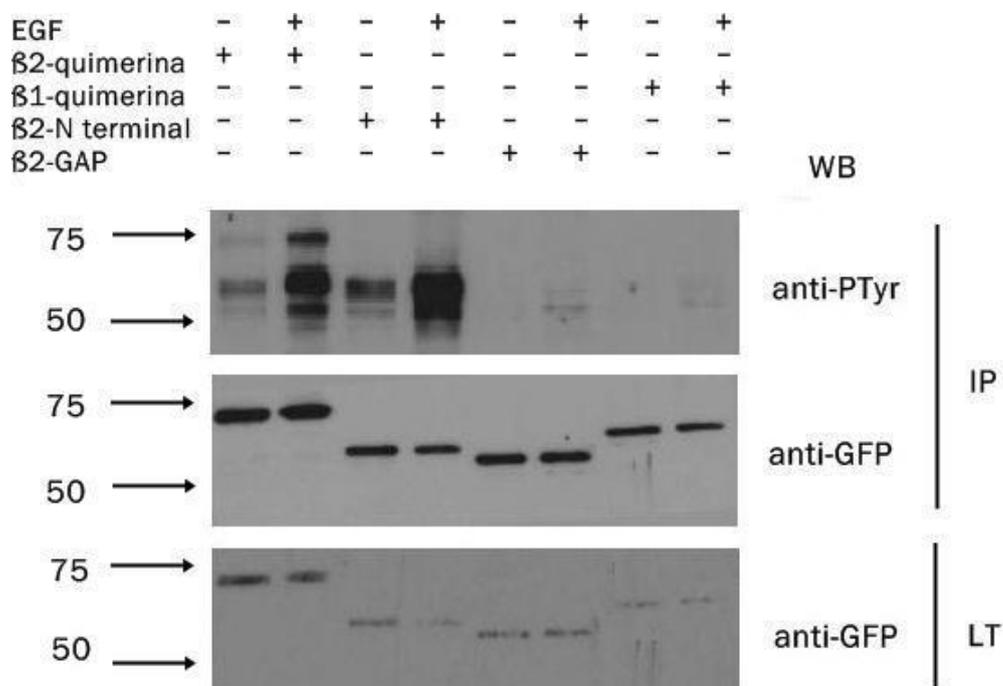


Figura 15. Western blot para el análisis de la fosforilación de las isoformas de β -quimerina. Se analiza la fosforilación en tirosinas (anti-pTyr) en ausencia y presencia de estímulo (-/+EGF) en las isoformas completas β 1 y β 2 y en los dominio N-terminal y GAP de la isoforma β 2-quimerina.

La translocación de las quimerinas es detectable tras la estimulación con EGF o PMA.

Para evaluar la relación entre la fosforilación y la localización subcelular de las quimerinas, se repitieron las condiciones de estimulación anteriores. Las células COS1 se transfectaron con los plásmidos codificantes para las 4 construcciones [Figura 16] y se estimularon con EGF o PMA. Tanto la estimulación de las células con EGF y con PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) pretende provocar la translocación de las isoformas a la membrana y la observación de un cambio en su localización subcelular.

EGF se eligió porque es el estímulo fisiológico y la translocación ha sido asociada a su aplicación en diversos estudios. Sin embargo, como el cambio conformacional generado por la estimulación de EGF y la translocación pueden ser muy rápidas y no perceptibles a la hora de fotografiar las células; se decidió incluir un grupo de células COS1 a las que se las estimularía con PMA. En este caso, el PMA, al ser un análogo de DAG, va a permitir que siempre haya ésteres de forbol a los que el dominio C1 pueda unirse y de este modo, podremos mantener la translocación de manera más estable.

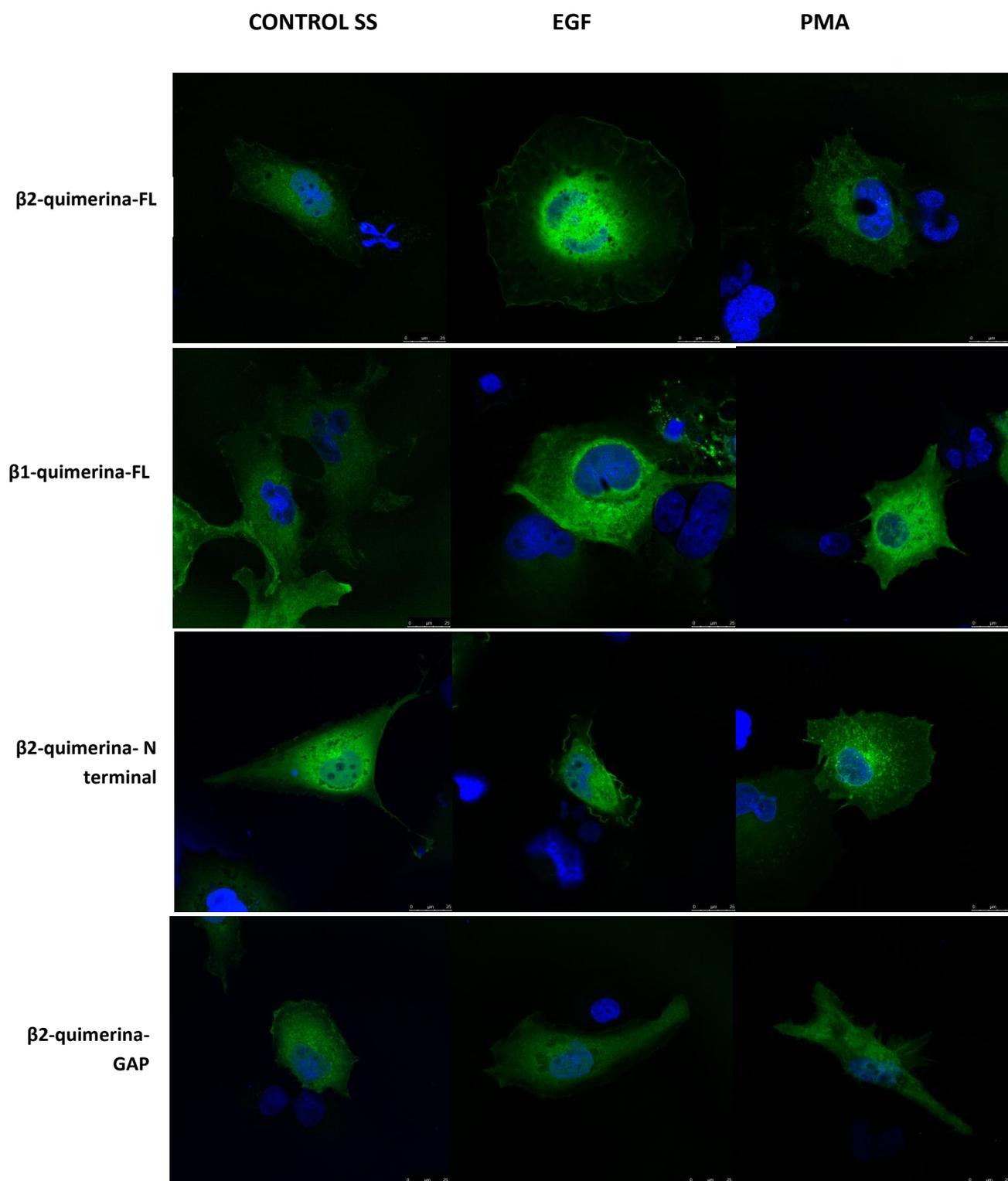


Figura 16. Imágenes de la translocación de las quimerinas obtenidas con el microscopio confocal Leica TCS SP5. Las células fueron transfectadas con cada una de las isoformas de las quimerinas unidas a GFP (en verde) y se tiñeron los núcleos con DAPI (en azul). Las isoformas analizadas en orden descendente son β 2-quimerina (full length), β 1 quimerina (full length), β 2-quimerina-N-terminal y β 2 quimerina GAP. Todas las fotografías fueron tomadas con el objetivo 60X.

Como en casos anteriores, se ha detectado la translocación a membrana de las quimerinas y los resultados obtenidos concuerdan con el modelo de activación propuesto hasta el momento. La β 2-quimerina, en estado de reposo, se encuentra inactiva en el citoplasma de la célula y su dominio C1 no está expuesto, por lo que no puede unirse a los ésteres de forbol [Figura 16A]. En presencia de EGF, se genera DAG y se produce un cambio conformacional de la isoforma en el que el dominio C1 queda expuesto pudiendo interactuar con los ésteres de forbol. Se observa en este caso la translocación a membrana diferenciándose la condición de reposo, en la que la fluorescencia se detectaba de forma homogénea en el citosol de la célula y la situación de estimulación con EGF/PMA en la que la fluorescencia se localiza más concentrada en la zona perinuclear y en la membrana plasmática que es donde se concentra el DAG generado. Como se esperaba, el tratamiento con EGF y con PMA produce los mismos efectos sobre la isoforma. Todos estos datos son coherentes con los descritos anteriormente en los que esta isoforma se asociaba a Golgi después de ser estimulada.

Los resultados obtenidos para la isoforma β 2-N-terminal [Figura 16B] y β 1-quimerina [Figura 16C] son muy similares a los anteriores. En ellos se observa un movimiento de las isoformas desde el citosol en el estado de reposo hasta la zona perinuclear y membrana plasmática en presencia de los estímulos EGF/DAG. Estos resultados son coherentes con el mecanismo de activación de las quimerinas y con la presencia del dominio C1 de unión a ésteres de forbol en ambas isoformas.

En el caso de la isoforma β 2-GAP sin embargo, no se observa ninguna traslocación a la membrana y la fluorescencia emitida siempre es detectada en el citoplasma de las células incluso después de ser estimuladas [Figura 16D]. Este resultado es lógico y concuerda con lo esperado ya que esta isoforma carece del dominio C1 y por lo tanto no contiene ningún dominio de unión a los ésteres de forbol que medie en la traslocación. Se comprueba una vez más, que es el dominio C1 el único cuya presencia es necesaria para la translocación de las quimerinas.

Discusión y futuros enfoques

Los experimentos realizados y sus resultados confirman varios de los datos descritos anteriormente:

Conocíamos previamente que las β 2-quimerinas se fosforilaban en residuos de tirosina y serina cuando son estimuladas con EGF o con PV ^[6, 9,12] y hemos comprobado que la estimulación fisiológica con EGF es la más útil para la experimentación ya que de la estimulación con PV es muy complicado poder extrapolar algún resultado.

Uno de los grandes resultados obtenidos en este estudio, es la detección de la fosforilación en las isoformas alfa en nuestro modelo celular ya que se pensaba que la fosforilación podría ser exclusiva de ciertas isoformas. Hemos detectando un patrón de fosforilación en la isoforma α 2-quimerina que no ha sido descrito hasta el momento en células COS1 y que se asemeja al patrón obtenido anteriormente en la isoforma β 2-quimerina.

Como en estudios previos ^[4], y a través del estudio de la fluorescencia de nuestras células en las imágenes de microscopio confocal, hemos podido comprobar la translocación de los receptores a membrana cuando éstos han sido expuestos previamente a estímulos como EGF y PMA. Estos resultados confirman una vez más, la necesidad de la presencia de un dominio C1 en la isoforma para que la translocación pueda llevarse a cabo.

Estos resultados son coherentes con el hecho de que el DAG pueda estar presente tanto en la membrana plasmática celular como en las membranas de orgánulos celulares como el aparato de Golgi. Sin embargo, teniendo en cuenta que Rac sólo se ha descrito en la membrana plasmática, el papel biológico de las quimerinas en el aparato de Golgi sigue siendo un dilema. Esta línea de investigación es muy interesante y está actualmente en curso por parte de otros miembros del laboratorio.

Otro de los resultados obtenidos, y que habrá que tener en cuenta en el futuro, es la detección inesperada de dos proteínas de pesos moleculares de entorno 50 KDa que presentan residuos fosforilados de tirosinas y que se unen específicamente al dominio SH2 de las quimerinas. La detección de estas proteínas ha sido un gran hallazgo ya que permite aceptar la hipótesis por la cual las quimerinas pueden regularse por interacciones proteína-proteína. De este modo, se puede añadir la interacción de proteínas como un mecanismo de activación y regulación de las quimerinas a los mecanismos de fosforilación ya descritos.

En cuanto a los futuros enfoques de la investigación, hay mucho que seguir estudiando. Una vez acabado el curso, se han observado los dos mecanismos de regulación que se consideraban en la hipótesis pero no hemos podido estudiar el efecto regulador de cada fosforilación ni la detección de fosforilaciones con efecto activador.

Sin embargo, en un futuro cercano, queremos aislar y analizar por técnicas proteómicas la isoforma β 2-quimerina para detectar todos los residuos que pudiesen sufrir procesos de

fosforilación. En el estudio realizado, sólo nos hemos centrado en los residuos de tirosinas pero una vez obtenida la secuencia completa de la isoforma, se tendrían en cuenta otros residuos como las serinas y treoninas. Con este fin, se aislaría la isoforma en un gel de acrilamida que se teñiría con plata. La banda de interés se cortaría y se la aplicaría un tratamiento con tripsina para la fragmentación de la isoforma en pequeños péptidos. Una vez obtenidos los fragmentos, se analizarían mediante espectrometría de masas para obtener información sobre su estructura.

Una vez obtenidos los residuos que podrían ser sitios de fosforilación en la proteína, se generaría una colección de mutantes mediante mutagénesis dirigida a cada uno de ellos. Para ello, se generarían mutantes en los que el sitio de fosforilación se ha eliminado modificando el residuo de serina, treonina o tirosina a fenilalanina o se generarían mutantes que mimetizarían la fosforilación mutando la serina, treonina o tirosina a aspártico.

Una vez obtenidos los mutantes, se analizaría el efecto de la mutación en cada caso con respecto a la activación de las quimerinas y la regulación de Rac a través de un ensayo de activación de Rac de tipo "Pull down" como el realizado en este experimento.

Como se piensa que la fosforilación de las quimerinas las activa y facilita su translocación a las membranas; la eliminación del sitio de fosforilación debería ir acompañado de un cambio en la regulación de la actividad Rac-GAP. Por ello, sería necesario realizar ensayos de Pull down en todos los mutantes generados para comprobar el estado de Rac. Paralelamente a estos ensayos de activación, se necesitaría comprobar el efecto de las mutaciones sobre la translocación de las quimerinas a la membrana con ensayos de fluorescencia similares a los descritos en este proyecto.

Otro enfoque que se plantea de esta investigación es el estudio de las proteínas que co-precipitan con las quimerinas. No se ha descrito nada sobre ellas y nosotros sólo hemos podido determinar que son sus residuos de tirosina los que, una vez fosforilados, se unen al dominio SH2 de las isoformas β 2-quimerina y α 2-quimerina.

Para seguir investigando estas proteínas, se necesitarían aislar en un gel de acrilamida como en el caso anterior y secuenciar. Una vez conocida sus secuencias, se podría conocer si son proteínas descritas en otras vías de señalización y en el caso de no haber sido descritas, analizar cómo y en qué orden se unirían a las quimerinas. Sería interesante investigar si la unión de estas proteínas generarían el cambio conformacional del estado inactivo a activo o si su unión sólo se produce posteriormente a la apertura de la estructura. Todos los datos obtenidos de estas futuras investigaciones permitirían aclarar los mecanismos de activación de estos receptores que podrían ser importantes en su aplicación terapéutica.

Conclusiones

1. La isoforma β 2-quimerina presenta varios residuos de tirosina que se fosforilan en respuesta al estímulo EGF.
2. El dominio SH2 de las quimerinas es la única zona en la que se acumulan aquellos residuos de tirosina capaces de fosforilarse.
3. El dominio SH2 cuando está fosforilado, es capaz de unir otras proteínas fosforiladas en tirosinas.

Bibliografía

1. Caloca M.J., Wang, H., and Kazanietz, M.G., Characterization of the Rac-GAP(Rac-GTPase-activating protein) activity of β 2-chimaerin, a “non-protein kinase C” phorbol ester receptor, *Biochemical Journal* Vol 375 313-321
2. Caloca, M.J., Wang, H., Delemos, A., Wang, S., and Kazanietz, M.G., (2001) Phorbol Esters and Related Analogs Regulate the Subcellular Localization of β 2-Chimaerin, a Non-protein Kinase C Phorbol Ester Receptor, *The Journal of Biological Chemistry* Vol 276 18303-18312
3. Colón-González, F., and Kazanietz, M.G., (2006) C1 domains exposed: From diacylglycerol binding to protein-protein interactions, *Biochimica et Biophysica Acta* 1761 827-837
4. Colón-González,F., Coluccio Leskow,F., and Kazanietz, M.G., (2008) Identification of an Autoinhibitory Mechanism That Restricts C1 Domain-mediated Activation of the Rac-GAP β 2-Chimaerin, *The Journal of Biological Chemistry* Vol 283 No50 35247-35257
5. Goto, K., Hozumi,Y., Nakano,T., Saino-Saito,S., Martelli, A.M., (2008) Lipid Messenger, Diacylglycerol, and its regulator, Diacylglycerol Kinase, in Cells, Organs and Animals: History and perspective, *Tohoku Journal of Experimental Medicine* Vol 214 (3) 199-212
6. Griner, E.M., Caino, M.C., Sosa, M.S., Colón-González, F., Chalmers,M.J., Mischak,H., and Kazanietz, M.G., (2010) A Novel Cross-talk in Diacylglycerol Signalling. The Rac-GAP β 2-chimaerin is negatively regulated by protein kinase C δ -mediated phosphorylation, *The Journal of Biological Chemistry* Vol 285 No 22 16931-16941
7. Grise, F., Bidaud,A., and Moreau,V., (2009) Rho GTPases in hepatocellular carcinoma, *Biochimica et Biophysica Acta. Cancer Reviews* Vol 1795 137-151
8. Hall, C., Michael,G.J., Cann, N., Ferrari, G., Teo, M., Jacobs, T., Monfries, C., and Lim, L., (2001) α 2-Chimaerin, a Cdc42/Rac1 Regulator, Is Selectively Expressed in the Rat Embryonic Nervous System and Is Involved in Neuritogenesis in N1E-115 Neuroblastoma Cells, *The Journal of Neuroscience* Vol 21 5191- 5202
9. Kai, M., Yasuda, S., Imai, S., Kanoh, H., and Sakane, F., (2007) Tyrosine phosphorylation of β 2-chimaerin by Src-family kinase negatively regulates its Rac-specific GAP activity, *Biochimica et Biophysica Acta* 1773 1407-1415
10. Kazanietz, M.G., (2005) Targeting protein kinase C and “non-kinase” phorbol ester receptors: Emerging concepts and therapeutic implications, *Biochimica et Biophysica Acta. Proteins&Proteomics*. Vol 1754 296-304
11. Narumiya, S., (1996) The small GTPase Rho: Cellular Functions and Signal Transduction, *The Journal of Biochemistry* Vol 120 215-228
12. Siliceo, M., and Mérida,I.,(2009) T Cell Receptor-dependent Tyrosine Phosphorylation of β 2-Chimaerin Modulates Its Rac-GAP Function in T Cells, *The Journal of Biological Chemistry* Vol 284, No 17 11354-11363
13. Wang, H., Kazanietz,M.G., (2010) p23/Tmp21 Differentially Targets the Rac-GAP β 2-chimaerin and protein kinase C via Their C1 domains, *Molecular Biology of the Cell* Vol 21 1398-1408
14. Wennerberg, K., and Der,C.J., (2004), Rho-family GTPases: it’s not only Rac and Rho(and I like it), *Journal of Cell Science* Vol 117 1301-1312
15. Yang, C., and Kazanietz, M.G., (2007) Chimaerins: GAPs that bridge diacylglycerol signalling and the small G-protein Rac, *Biochemical Journal* Vol 403