



MASTER
EN INVESTIGACION
BIOMÉDICA

iBGM
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
Y GENÉTICA MOLECULAR



Estudio en modelos animales de las quimerinas como supresores de tumores en el intestino

Candidato: Fco. Javier Fernández Gañán

Directora del proyecto: M^a José Caloca Roldán

CONVOCATORIA: JULIO 2012

La primera función descrita para las GTPasas Rho fue la regulación del citoesqueleto en respuesta a diversos estímulos extracelulares. Hoy en día se sabe que las GTPasas Rho participan en el control de numerosos procesos celulares desde el control de la polaridad celular, la morfología, la migración, la endocitosis, progresión del ciclo celular, crecimiento y la apoptosis.

El hecho de que las GTPasas Rho controlen tan amplia variedad de procesos biológicos implica que una desregulación de la actividad de estas proteínas genera una señalización deficiente que puede causar distintas patologías. Entre las principales enfermedades asociadas a esta desregulación de las proteínas Rho podemos encontrar enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica [4], síndromes asociados con el retraso mental, alteraciones cardiovasculares [5,6], inmunodeficiencias como el síndrome de deficiencia de Rac2 [7,8,9] o el síndrome de Wiskott-Aldrich [10], infecciones bacterianas [11,12] y el cáncer [13]. Las alteraciones causantes de estas enfermedades pueden aparecer a nivel de las Rho GTPasas, de sus proteínas reguladoras o de sus efectores.

Todas las GTPasas actúan como interruptores moleculares que les permite encender o apagar la transducción de señales [4]. El interruptor ocurre por medio del cambio unidireccional de la GTPasa de la forma activa (unida a GTP) a la forma inactiva (unida a GDP) [14,15]. Este cambio se efectúa por hidrólisis del GTP por medio de la actividad intrínseca de la misma GTPasa, logrando pasar el interruptor al estado apagado. Esta reacción es iniciada por proteínas específicas denominadas proteínas activadoras de GTPasa (GAP) [16].

La inactivación de la GTPasa puede ser revertida a su estado de encendido por efecto de otras proteínas llamadas factor intercambiador de nucleótido de guanina (GEF) que causan que se disocie el GDP de la GTPasa, conllevando a su asociación con un nuevo GTP. Ello cierra el ciclo al estado activado de la GTPasa, el cual es el único estado en el que la GTPasa puede transducir una señal a una reacción en cadena downstream (**Figura 2**).

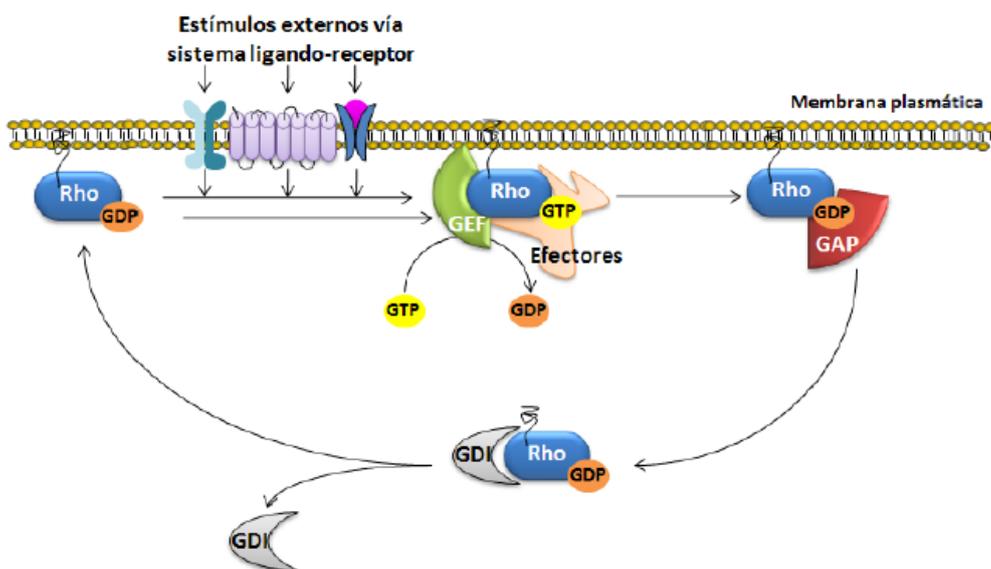


Figura 2: Regulación del ciclo GTPasa. La fase inactiva se produce cuando Rho está unida a GDP y se activa al fosforilarse con la ayuda de GEF. Mientras Rho se encuentre unido a GDI, seguirá inactivo. GAP ayuda a la capacidad de hidrólisis del GTP.

Los GDIs (GDP - dissociation Inhibitors), son también un grupo de reguladores negativos de las proteínas Rho GTPasas que actúan uniéndose a las GTPasas en su estado inactivo y bloqueando el acceso de los GEFs y la asociación de las GTPasas a las membranas [17].

ESTRUCTURA Y PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE LAS QUIMERINAS

Originariamente, las quimerinas se definieron como una quimera entre el dominio C1 de Protein Kinasa C (PKC) y el dominio GAP de BCR, una proteína involucrada en la translocación del cromosoma Philadelphia en la leucemia mieloide crónica [18].

En mamíferos, los genes CHN1 y CHN2 codifican para las cuatro isoformas más conocidas: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$. Las isoformas $\alpha 1$ y $\beta 1$ presentan un dominio C1 y un dominio de GAP, mientras que $\alpha 2$ y $\beta 2$ poseen un dominio adicional SH2 (**Figura 3**).

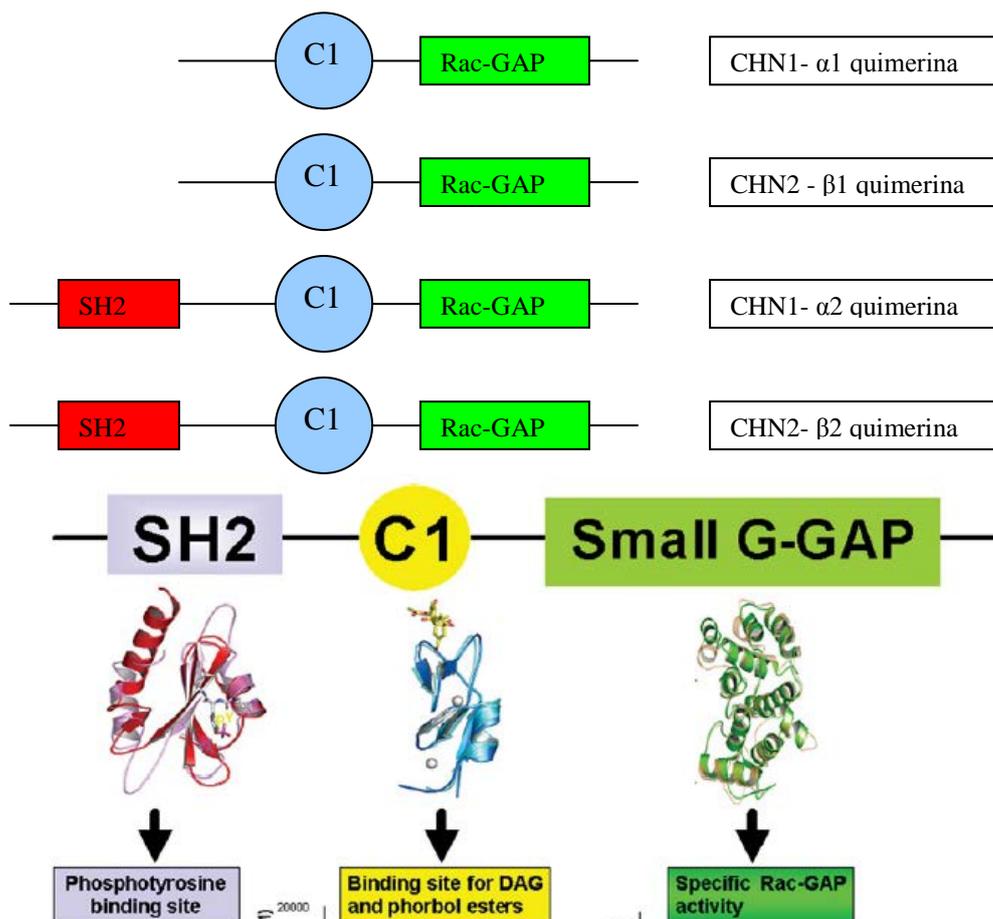


Figura 3: Isoformas de las quimerinas y estructura de la $\beta 2$ quimerina.

Se indica el sitio de unión a fosfotirosina (dominio SH2), el sitio de unión a DAG y ésteres de forbol y la zona de actividad específica de Rac-GAP.

El dominio C1, rico en cisteína, es una estructura de unos 50 aminoácidos, originariamente definidos como dominios de unión a lípidos en los isoenzimas de PKC. El dominio C1 se ha clasificado en dos grupos, los dominios típicos y los atípicos. Los dominios C1 típicos unen ésteres de forbol, como el PMA (acetato de forbol miristato), y DAG. El dominio C1 es muy importante en la regulación posicional de las quimerinas. Es esencial para su capacidad de unir ésteres de forbol y para translocar las quimerinas en membranas.

El dominio GAP se compone de unos 150 aminoácidos y es homólogo con el dominio GAP de BCR. La actividad GAP de las quimerinas es sensible a la presencia de lípidos, especialmente a la presencia de DAG y ésteres de forbol.

El dominio N-terminal SH2 (dominio de homología 2 de la proteína Src) es similar a los dominios SH2 de otras proteínas salvo que contiene un residuo de ácido glutámico al inicio del dominio. En comparación con otros dominios SH2, el dominio SH2 de las $\alpha 2$ y $\beta 2$ quimerinas, es una hélice α más corta.

QUIMERINAS Y CÁNCER: FUNCIÓN DE LAS QUIMERINAS COMO SUPRESORES DE TUMORES

Se ha descrito que las quimerinas pueden actuar como supresores tumorales en mama, adenocarcinomas de duodeno y gliomas malignos [19].

Los mecanismos moleculares de las $\beta 2$ -quimerinas en el cáncer están asociados a su capacidad de inhibir a Rac.

El papel de Rac y otras Rho GTPasas en la regulación de la morfología, movimiento celular, invasión, metástasis, proliferación y transformación maligna se ha descrito ampliamente [20, 21]. Todos estos eventos son cruciales para el desarrollo y progresión del cáncer [22] (**Figura 4**).

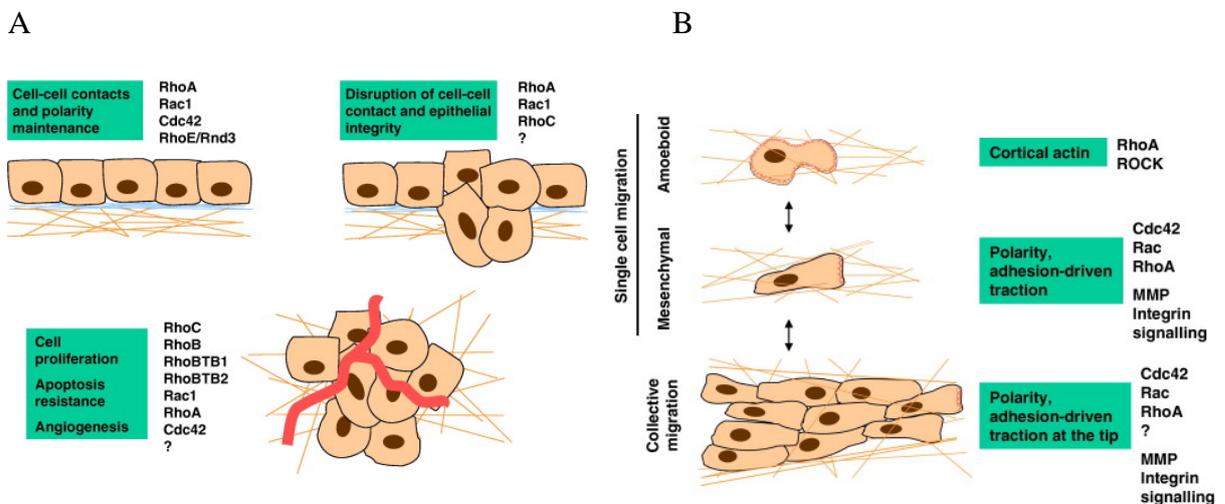


Figura 4: A) Fases en la progresión tumoral y GTPasas Rho implicadas. B) Diferentes mecanismos de invasión de células cancerígenas.

La primera asociación entre las quimerinas y el cáncer se describió en un estudio para identificar genes con expresión diferencial en tejido normal y astrocitomas de bajo grado en comparación con glioblastomas [23]. Este estudio reveló la disminución de la expresión de β 2-quimerina en glioblastomas, descubrimiento que respalda el papel de esta proteína como gen supresor de tumores e implican la desregulación de la actividad de Rac.

Se ha señalado el papel crucial de Rac como mediador de la respuesta a factores de crecimiento en cánceres de mama. EGF y HRG (Heregulina β) causan aumentos significativos en los niveles de Rac-GTP en las líneas de cáncer de mama MCF7 y T-47D, y promueven la migración de las células de cáncer de mama y la proliferación de una manera dependiente de Rac1. β 2-quimerina inhibe la migración y proliferación inducidas por HRG en células de cáncer de mama a través de la inactivación de Rac, señalando un papel de esta proteína β 2-quimerina en la interrupción de la respuesta dependiente de Rac mediada por factores de crecimiento [24].

La sobreexpresión de β 2-quimerina en células con cáncer de mama suprime el crecimiento dependiente de la activación de Rac, por lo que permite una reducción de la proliferación del tumor. Este efecto en proliferación está mediado por la inactivación de ERK [25]. Todo indica que las quimerinas actúan downstream del receptor del factor de crecimiento para inactivar Rac y modular la señalización del factor de crecimiento a través de ERK. Además, la modificación de las uniones adherentes produce cambios en las uniones célula a célula, tan importantes en la proliferación de las células cancerígenas a través de la modificación de la actividad de Rac de las células epiteliales. (Figura 5).

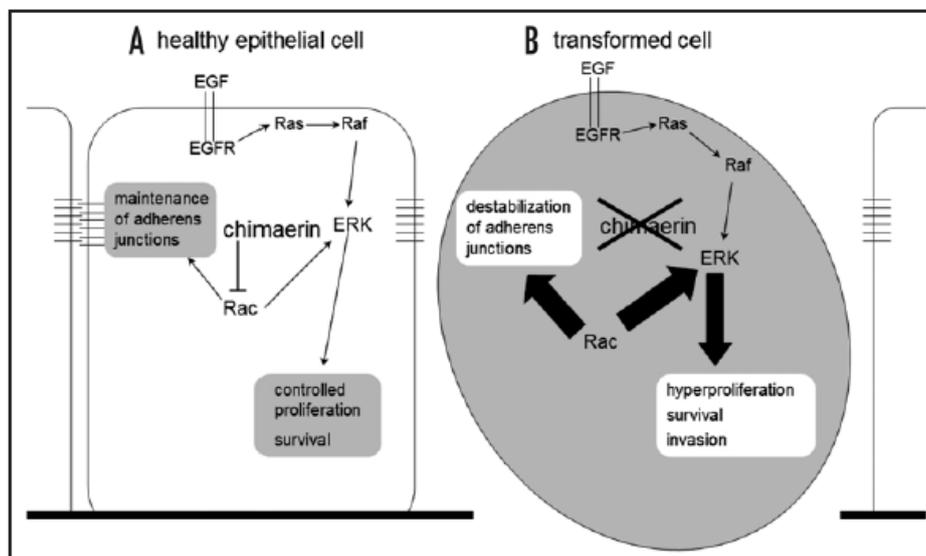


Figura 5: Modelo de señalización de las quimerinas en el tejido epitelial.

En el tejido epitelial sano (A), la señalización intracelular estrechamente regulada asegura la formación de contactos estables entre las células vecinas, regulados por la actividad de RAC, y una adecuada proliferación y supervivencia, regulada por el receptor de EGF / ERK y otras vías de señalización. En muchos tipos celulares, RAC se necesita para la activación completa de ERK. En la mosca, el tejido epitelial de retina está regulado por la quimerina de *Drosophila melanogaster* (RhoGAP5A). Cuando este equilibrio se ve perturbado por disminución de expresión de quimerina (B), el aumento de señalización de Rac conduce a la desestabilización de las uniones adherentes, mientras que un aumento del receptor de EGF / señalización ERK permite la hiperproliferación y supervivencia aberrante de la transformación maligna.

Aunque no existen datos de la asociación de la isoforma $\alpha 2$ -quimerina con el cáncer, el hecho de que tiene una ruta de señalización similar a la $\beta 2$ -quimerina [26], hace suponer que también es posible su implicación en la transformación maligna.

Además de modular la señalización mediada por el receptor de EGF, las quimerinas actúan en la señalización de los receptores de Ephrinas. Numerosos estudios demuestran las funciones esenciales de los receptores de Ephrinas (Eph) y sus ligandos en el control de posicionamiento celular y los patrones de tejidos durante el desarrollo normal y el oncogénico [27] **Figura 6.**

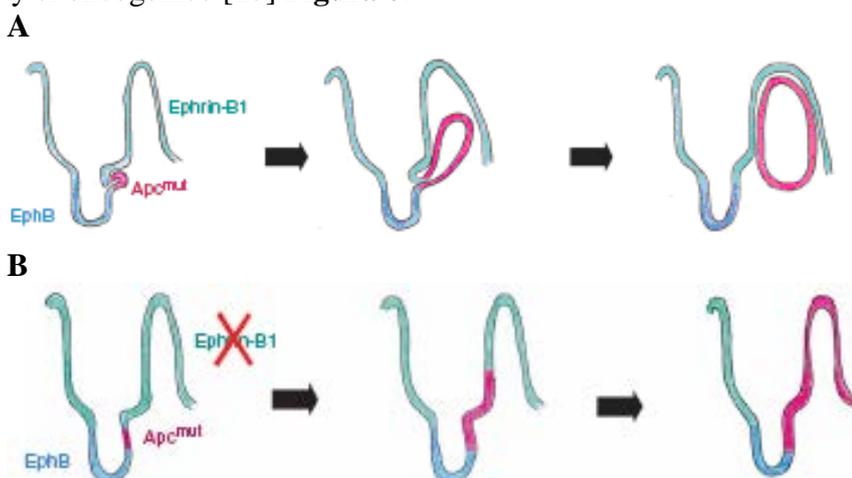


Figura 6: Representación esquemática de la morfogénesis de adenomas en intestino delgado de ratones *Apc^{Min/+}* mostrando la diseminación de células mutantes en la frontera celular en ausencia de los receptores de eprinas.

En la figura 6A se muestra el desarrollo del tejido tumoral normal en el intestino de los ratones *Apc^{Min/+}*. Se mantiene el tumor dentro de los límites celulares. En la figura 6B se muestra el diferente desarrollo tumoral en ausencia del receptor de eprinas. Se desempaqueta el tumor fuera de los límites celulares.

Estos estudios sugieren múltiples funciones, a veces contradictorias de señalización. Bajo diferentes condiciones, pueden promover tanto la difusión y la adhesión célula-célula como el colapso del citoesqueleto, dar una conformación redondeada de las células y también pueden promover la adhesión y la segregación de célula a célula [28, 29].

CÁNCER INTESTINAL Y EL GEN APC

El gen APC es conocido como supresor de tumores [30]. Se ha encontrado inactivado en más del 80% de los tumores colorectales.

El gen APC codifica una proteína de gran tamaño con numerosos dominios y sitios de interacción con otras proteínas. Se ha visto que esta proteína participa en diversos procesos celulares que influyen en la proliferación, diferenciación, adhesión, migración y segregación cromática. Los ratones knockout del gen APC, poseen una mutación sin sentido en el codón 850. Esta mutación trunca la región amino-terminal. Esta región es necesaria para la función dependiente de b-catenina.

Los animales heterocigotos *Apc^{Min/+}* desarrollan numerosos adenomas en el intestino por alteraciones entre las que se incluyen una señalización deficiente del receptor de EGF y del receptor de eprinas.

Varios estudios han demostrado la participación de las quimerinas en las rutas de señalización mediadas por ambos receptores. Por esta razón de han elegido los ratones $Apc^{Min/+}$ como modelo para estudiar el impacto de la eliminación de las isoformas $\beta 2$ -quimerina (gen $chn2$) y $\alpha 2$ -quimerina (gen $chn1$) en el desarrollo de cáncer gastrointestinal.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las proteínas de la superfamilia Ras GTPasa funcionan como interruptores moleculares para una gran variedad de rutas de transmisión de señales celulares.

A esta superfamilia pertenece la subfamilia Rho. Dentro de la subfamilia Rho se encuentra la familia de proteínas Ras.

Las quimerinas son proteínas GAPs (GTPase-activating proteins) que modulan la actividad de la familia de proteínas Rac.

La actividad de Rac GTPasa se modula a través del receptor EGF y los receptores de ephrinas.

Las quimerinas regulan los niveles de activación de Rac tras la activación de las rutas de señalización mediadas por el receptor EGF y los receptores de ephrinas.

Señalizaciones aberrantes derivada de ambos receptores son causantes de la progresión tumoral y metástasis.

En el presente trabajo se va a estudiar la proliferación del cáncer propiciado por la inactivación de las quimerinas aplicado en el intestino.

OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto es estudiar la implicación de las quimerinas en el cáncer de intestino de ratón.

Este objetivo general se va a dividir en dos objetivos específicos:

Objetivo 1.- Análisis de la expresión de las isoformas $\alpha 2$ y $\beta 2$ –quimerina en intestino.

Se pretende demostrar la presencia de las isoformas $\alpha 2$ y $\beta 2$ quimerina en el intestino de ratones $Apc^{Min/+}$ (control) frente a las líneas mixtas de $chn1^{-/-}$, $Apc^{Min/+}$ y $chn2^{-/-}$, $Apc^{Min/+}$.

La diferente creación de los knock-out va a condicionar los ensayos a realizar para la consecución del presente objetivo.

1. 1.- Análisis de la expresión de las $\alpha 2$ –quimerina en intestino de ratón.
 - 1.1.1.- Análisis mediante tinción de X-Gal
- 1.2. Análisis de la expresión de la $\beta 2$ –quimerina en intestino de ratón.
 - 1.2.1.- Análisis mediante western blot
 - 1.2.2.- Análisis mediante inmunohistoquímica

Objetivo 2.- Evaluación en modelos animales del papel de las quimerinas en la formación de tumores en intestino.

2.1.- Papel de la isoforma $\alpha 2$ –quimerina en la formación de tumores en ratones $Apc^{Min/+}$

2.1.- Papel de la isoforma $\beta 2$ –quimerina en la formación de tumores en ratones $Apc^{Min/+}$

La aparición de mayor número de tumores en los ratones knock-out demostraría la implicación de las quimerinas en la supresión tumoral.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES

El laboratorio dispone de unas líneas mixtas de ratón que se han generado mediante cruces con los ratones $Apc^{Min/+}$ y ratones knock-out de dos isoformas de las quimerinas, $\alpha 2$ y $\beta 2$ -quimerina. Los ratones $Apc^{Min/+}$ tienen una mutación en el gen APC y son modelo de cáncer colorectal que desarrolla numerosos adenomas en intestino delgado e intestino grueso. Los ratones knock-out de las quimerinas, $\alpha 2$ y $\beta 2$ -quimerina fueron creadas previamente por la compañía Lexicon Genetics como se ilustra en la **figura 7**.

El knockout de $\alpha 2$ -quimerina se ha creado insertando un cassette que incluye β -galactosidasa en el gen *chn1* lo que permite la detección de la proteína mediante tinción con X-Gal.

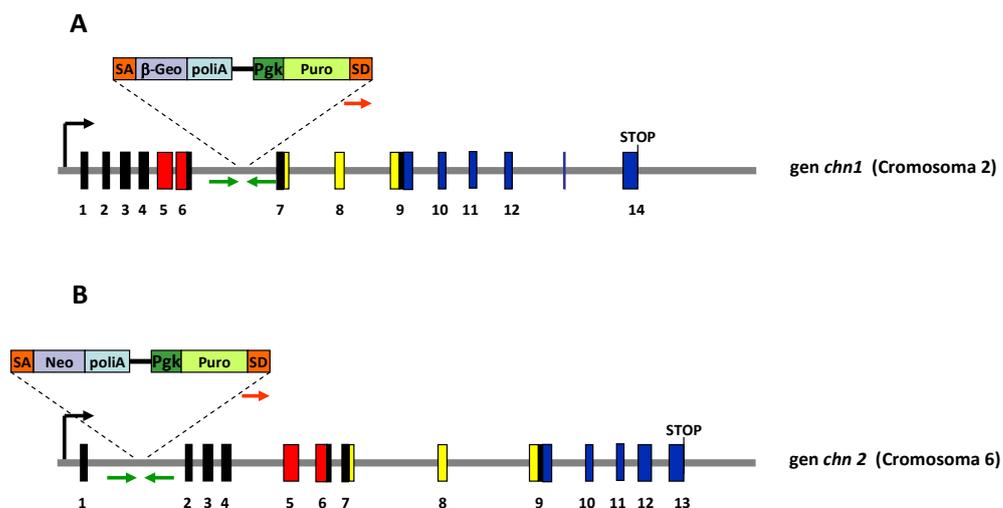


Figura 7: Representación esquemática de la inserción del vector gen-trap para la focalización de los genes *chn1* (A) y *chn2* (B). Creado por Lexicon Genetics.

Las líneas utilizadas en este estudio han sido:

- Línea **Apc^{Min/+}** : línea heterocigota para la mutación del gel APC que utilizaremos de control
- Línea **chn1^{-/-}, Apc^{Min/+}**: línea KO para α 2-quimerina y heterocigota para la mutación del gel APC
- Línea **chn2^{-/-}, Apc^{Min/+}**: línea KO para β 2-quimerina y heterocigota para la mutación del gel APC

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA.

La concentración de proteína de la muestra se determina por el método de Bradford usando el reactivo Bio-Rad Protein Assay (BIO-RAD). Para ello se realiza una curva patrón usando como estándares cantidades crecientes de albúmina bovina sérica (BSA). La absorbancia de la muestra patrón y de las muestras problema (GST-RBD) se determinará a 595nm.

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS DE INTESTINO DE RATÓN

El primer paso consiste en la extracción del intestino delgado, ciego y colon del ratón.

La distinción entre duodeno, yeyuno e ileon se realiza promediando en tres partes el intestino desde la finalización del estómago hasta el ciego, que se ve como una protuberancia antes del colon. En la práctica se separa haciendo una forma en U en tres partes iguales cada lado. La preparación de las muestras requiere que se mantengan en todo momento húmedas con PBS 1X. Se deben limpiar bien los restos fecales para que no interfieran en el ensayo. La extracción de proteínas se realiza en el siguiente tampón de lisis: TRIS HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, EDTA 2mM, DTT 2 mM, NaDOC 0,2 %, Complete (inhibidor de proteasas), en una proporción 1:10 (tejido:buffer de lisis). El tejido se homogeneiza con un politrón, se centrifuga durante 10 minutos a 13200 rpm y se extrae el sobrenadante, que se congela hasta su utilización.

WESTERN BLOT

Utilizamos esta técnica para detectar la presencia de las proteínas de estudio en nuestras muestras. En nuestro caso la expresión de β 2-quimerina en los ratones control.

Se utilizarán geles de poliacrilamida al 10%, donde se separarán las muestras de los lisados obtenidos como se indicó en el apartado anterior. Antes de cargarlas en el gel, las muestras congeladas se deben diluir 1:1 con SPLB (sample buffer) y se hierven durante 5 minutos. En el gel cargamos 30 μ g de cada muestra, según la cantidad de proteína calculada mediante el método Bradford.

El anticuerpo primario que se utiliza es anti β 2-quimerina (chn2). La dilución es 1/500. El anticuerpo es de SIGMA.

Se incuba toda la noche a 4° C en agitación.

El anticuerpo primario está preparado sobre rata, por lo que el anticuerpo secundario es un anti rat de SIGMA.

La dilución del anticuerpo secundario es 1/50.000.

El revelado se realiza con un kit comercial: Pierce ECL western blotting detection reagent. Se compone de dos líquidos: Luminol enhancer solution (1ml) y Peroxide solution (1ml). Thermo scientific.

Se contrasta con anti tubulina sobre la membrana del experimento.

Se lava la membrana en TTBS 1x y se deja 45 minutos en azida sódica 0,05%.

Se prepara el anticuerpo primario frente a tubulina (ONCOGENE) hecho en mouse, en TTBS 1x y leche. Se prepara en una proporción 1/1000. Se lava y se añade el anticuerpo secundario anti mouse (GE Healthcare) en una proporción 1/3000 en TTBS 1x y leche.

Se lava y se revela por quimioluminiscencia con el Kit Pierce ECL 1 minuto y se expone en película radiográfica.

INMUNOHISTOQUÍMICA

La inmunohistoquímica se utiliza para detectar la β 2-quimerina en los ratones control frente a los knockout de CHN2. Se utilizarán muestras incluidas en parafina. Para poner a punto las condiciones de tinción se utilizaron muestras de cerebro porque esta descrita la expresión de β 2-quimerina en cerebelo. Posteriormente se aplicaron las mismas condiciones de tinción a las muestras de intestino. Las condiciones son las siguientes:

Lo primero que se debe hacer es desparafinar las muestras. Se deben sumergir las muestras en las distintas soluciones:

Tiempo (minutos)	
5	Xileno
5	Xileno
4	Alcohol 100%
4	Alcohol 96%
5	Alcohol 96% + H ₂ O ₂ 0,3%
4	Alcohol 70%
4	Agua Milli Q

Se probó el desenmascaramiento del antígeno con tampón citrato en microondas pero no dio buenos resultados por lo que se prescindió de este paso.

Se bloquea con NGS 2% y PBS 0,2 M Tween 20 0,1%. Se utiliza el rotulador blocker y se añade 75 μ l/porta de la solución de bloqueo.

Se lavan las muestras y se incuban el anticuerpo anti β 2-quimerina (CHN2), de Sigma Aldrich, creado en Rabbit, en una proporción 1/50 con PBS 0,2 M Tween 20 0,1%. Se añaden 50 μ l/porta.

Se deja over nigh (O.N.) a 4°C. Se mantienen con humedad para que no sequen durante la noche.

Se lava el primario y se añade el anticuerpo secundario. El anticuerpo secundario es anti- Rabbit biotinilado, la dilución es 1/400 en PBS 1x. Se deja dos horas incubando temperatura ambiente.

Se lava con PBS y se añade Vectastain de Vector laboratories, ABC kit, para amplificar el anticuerpo y tener mejor señal. Se deja treinta minutos.

Se añade DAB, se tiene un KIT de Vector laboratories, con tres compuestos: buffer pH 7,5 substrate reagent, DAB y peróxido de hidrógeno, se espera hasta que haga reacción, unos 10 minutos.

Se lava con agua destilada.

Se deshidrata y se hace el montaje de las muestras con medio de montaje (Entellán).

Se realizan fotos de las muestras en el microscopio Nikon Eclipse 90i.

TINCIÓN DE X-GAL

La tinción de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) se utiliza para detectar la presencia de α 2-quimerina en los ratones knockout de CHN1 debido a la forma de creación de estos ejemplares.

En este caso se ha insertado el gen LacZ del operon Lac junto al represor del gen chn1. La enzima β -galactosidasa se va a expresar en los tejidos en los que se expresaría la quimerina α 2 y se detecta mediante esta tinción que resulta en un color azulado en la región donde se localiza la proteína de estudio.

Se prepara el ejemplar y se le sacrifica. Se extraen los órganos (intestino delgado y colon) y se fijan en formaldehído al 2% con 2mM MgCl₂.

Se mantienen en sacarosa al 20% con 2mM MgCl₂, durante toda la noche a 4°C. Se incluyen en OCT y enfrían en nieve carbónica. Se mantienen a -70°C hasta la preparación de las muestras para el corte de criosecciones. El corte se realiza a 10 μ m. Después se dejan calentar las muestras a temperatura ambiente durante una hora

Se lavan las muestras en PBS+ 2mM MgCl₂ a 4°C. La solución de lavado es: 100mM PBS, 2mM MgCl₂, 0,01% desoxicolato sódico y 0,02% NP-40.

Se tiñen las muestras con la solución de tinción: 5mM de ferrocianuro potásico, 5mM de ferricianuro potásico, 0,01% NP-40, 2mM MgCl₂, 1mg/ml X-gal. Con preparar 40 ml de solución ya es suficiente para la cubeta utilizada en el laboratorio.

Se mantienen toda la noche a 30°C en oscuridad.

Se contratiñen con eosina alcohólica durante 2 segundos, se deshidratan y se montan. Se deben ver en el microscopio en las primeras 24 horas porque la tinción de X-gal se va degradando y se pierde la señal.

Se realizan fotos de las muestras en el microscopio Nikon Eclipse 90i.

PREPARACION DEL INTESTINO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE TUMORES

La disección de los ejemplares se realiza para extraer los intestinos (intestino delgado y colon) que se utilizarán en los diferentes ensayos.

Uno de los experimentos que se realizan es demostrar que las quimerinas son eficaces represores de tumores.

La disección se realiza en ejemplares con aproximadamente cuatro meses de edad. Se le extrae el intestino delgado que se separa posteriormente en tres secciones: proximal (duodeno), media (yeyuno) y distal (íleon). Además se extrae el colon y el ciego para su posterior análisis. Se lavan los distintos fragmentos para eliminar el contenido fecal. Posteriormente se abren y se adhieren a un papel de filtro o papel Whatmam.

Se fijan posteriormente en formaldehído toda la noche a temperatura ambiente y al día siguiente se lavan en PBS. Acto seguido se tiñen en azul de metileno al 0,5-1% en agua durante dos minutos y se destiñe el exceso en PBS.

Una vez se tienen contrastados, se analizan los adenomas utilizando una lupa binocular Leica, midiendo el tamaño de cada pólipo con el programa LAS EZ.

PREPARACION DEL INTESTINO COMO “SWISS ROLL” PARA ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO

Para realizar los estudio histopatológicos e inmunohistoquímicos, los intestinos, obtenidos y procesados como se indicó en el apartado anterior, se enrollan (“swiss roll”) y se incluyen en parafina. De esta manera se puede visualizar secciones enteras de intestino. Posteriormente, se realizan los cortes en el microtomo de entre 6 y 10 y se teñirán con hematoxilina eosina. Los tumores y sus características histológicas se examinarán en el microscopio Nikon Eclipse 90i y el programa de adquisición es NIS elements B.R. 3.1 imaging software.

PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS TUMORALES

La proliferación de las células tumorales se va a estudiar a través de un ensayo de Invitrogen: Click-it EdU Imagin Kits. La detección se basa en la reacción covalente entre un ácido, en nuestro caso Alexa Fluor y una base, en nuestro caso EdU (5-etinil-2´deoxyuridina). Este componente, EdU, proporciona una nucleósido análogo a la timidina, que se incorpora en el DNA durante la síntesis activa de DNA.

El ensayo consiste en añadir EdU a los ratones antes de sacrificarlos, para que así se incorpore en componente en el DNA y posteriormente se pueda detectar con Alexa Fluor.

Las muestras de intestino se han mantenido en parafina antes de realizar la detección con Alexa Fluor. Después de desparafinar las muestras se lavan con PBS 1x. Se añade BSA 3% en PBS durante cinco minutos. Se lava con Triton-X 0,5% en PBS durante veinte minutos. Se añade el cocktail de reacción que contiene: Click-it reaction buffer, sulfato de cobre, Alexa fluor y aditivo a la reacción buffer. Se incuba durante treinta minutos, RT en oscuridad. Se lava con BSA 3% en PBS. Para teñir el DNA se incuba Hoechst 33342 1/2000 en PBS durante treinta minutos, RT en oscuridad. Se lava con PBS y se monta con Vectashield, mounting medium for fluorescente, de Vector laboratorios.

3.- RESULTADOS

Los resultados del presente proyecto se van a agrupar en dos objetivos:

Objetivo 1.- Análisis de la expresión de las isoformas $\alpha 2$ y $\beta 2$ –quimerina en intestino.

No se ha descrito en la literatura la presencia de las isoformas $\alpha 2$ y $\beta 2$ -quimerina en intestino. Se va poner como primer objetivo del proyecto la puesta a punto de las técnicas de detección de ambas quimerinas.

1.1.- Análisis de la expresión de las $\alpha 2$ –quimerina en intestino de ratón.

En el mercado no se encuentran anticuerpos específicos para la isoforma $\alpha 2$ -quimerina con resultados contrastados.

La expresión de isoforma $\alpha 2$ -quimerina se va a detectar de manera indirecta a través de la tinción de X-gal.

La creación específica del knock-out de la isoforma $\alpha 2$ mediante la inserción de un cassette que incluye β -galactosidasa en el gen *chn1* nos va a permitir detectar la presencia del gen *chn1* comprobando la presencia de β -galactosidasa a través de la tinción de X-gal en los ratones knock-out.

1.1.1.- Análisis mediante tinción de X-Gal

Mediante la tinción con X-gal se ha podido observar la presencia de β -galactosidasa en el intestino de los ratones knockout del gen *chn1*. La β -galactosidasa, que se encuentra en el gen *chn1* para inactivar la $\alpha 2$ -quimerina, ha reaccionado con el X-gal y se puede observar de color azulado. De esta forma podemos conocer la localización de la $\alpha 2$ -quimerina en el intestino. (**Figura 8**).

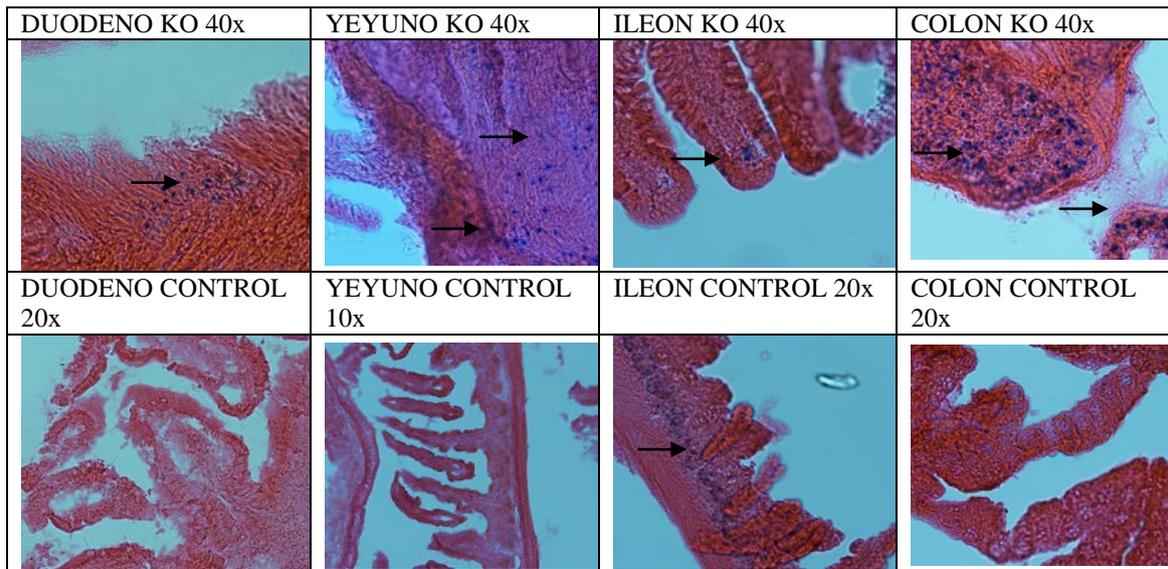


Figura 8: Cortes histológicos con la tinción de X-gal contrateñida con eosina en diferentes zonas del intestino.

Se estudia en ratones knockout y control de *chn1*. El color azulado en los knock-out demuestra la presencia de $\alpha 2$ -quimerina.

La β -galactosidasa que ha sido detectada mediante X-gal en los diferentes cortes histológicos, nos demuestra que se encuentra en los ratones knock-out y no en los ratones control. Se observa que en ileon del ratón control hay reacción inespecífica de β -galactosidasa.

Esta detección nos permite demostrar que hay presencia de α 2-quimerina en el intestino de los ratones.

Tanto en el intestino delgado como en el intestino grueso, la α 2-quimerina se localiza en zonas cercanas a la luz del tubo intestinal, por lo que tiene la posibilidad de interaccionar en la proliferación tumoral.

2.2. Análisis de la expresión de las β 2 –quimerina en intestino de ratón.

La β 2-quimerina se va a poder detectar mediante anticuerpos comerciales ya contratados. De esta forma, es una detección directa de β 2-quimerina en el intestino de los ratones control.

2.2.1.- Análisis mediante western blot

La detección de la expresión de la β 2-quimerina se realiza a través del ensayo western-blot. Con este ensayo se detecta la proteína mediante anticuerpos específicos.

La banda de la β 2-quimerina se encuentra alrededor de los 40 Kda. Se ha podido reconocer mediante la banda de marcadores tipo (**Figura 9**).

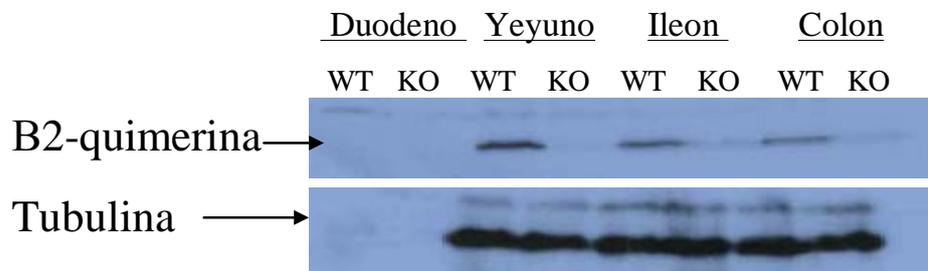


Figura 9: Ensayo western blot para detectar la presencia de β 2-quimerina.

La β 2-quimerina se encuentra en los ratones wild type, encontrándose ausente en los ratones knockout de β 2-quimerina. En el duodeno se observa menos señal al haber menos cantidad de proteína.

La tubulina se encuentra en todos los ratones wild type y en los ratones knockout de β 2-quimerina, como era de esperar. Se ve menos muestra en el duodeno.

Como resultado, se puede observar que la banda de la β 2-quimerina del gen *chn2* se encuentra marcada en los ratones control pero no en los knockout. En el duodeno se encuentra la banda menos marcada debido a la diferente cantidad de proteína encontrada en este tejido. No se ha podido realizar el ensayo de western blot con las cantidades medidas en el ensayo Bradford por esa razón se ve menos marcada la proteína en el duodeno. En el resto de tejido se pueden observar mejor las diferencias. A través de la detección de la tubulina con anticuerpos específicos, se puede comprobar que la muestra de duodeno puede estar dañada ya que tampoco se puede detectar la presencia de esta proteína.

2.2.2.- Análisis mediante inmunohistoquímica

El ensayo de inmunohistoquímica nos sirve para detectar la presencia de la β 2-quimerina en los ratones control frente a los knockout de *chn2*. Los ratones sobre los que se ha realizado la inmunohistoquímica son: control de *chn2* y knock-out de *chn2*. (Figura 10).

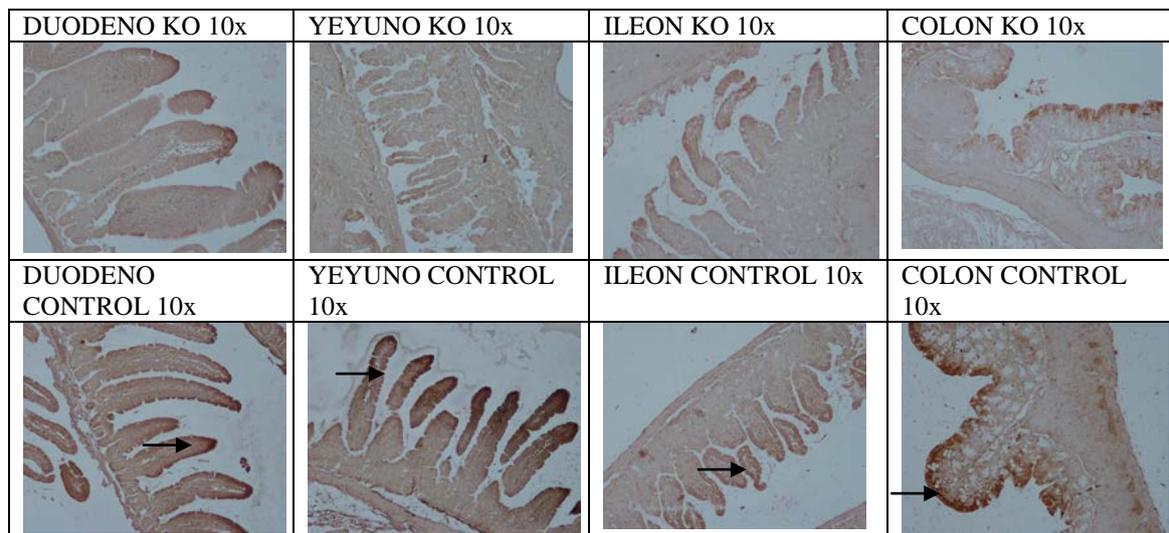


Figura 10: Inmunohistoquímica de β 2-quimerina en cortes de intestino.

La β 2-quimerina se encuentra marcada de color más oscuro en los ratones control, encontrándose ausente en los ratones knockout de β 2-quimerina.

La detección de β 2-quimerina se ha podido realizar en los ratones control, se puede observar de color más marcado, con una tonalidad más oscura. En duodeno yeyuno y colon se puede observar mayor expresión de proteína. La localización de la β 2-quimerina se observa en los extremos de las vellosidades intestinales. Con este resultado se puede estudiar la posibilidad de acción de las quimerinas como supresores tumorales.

Con estos ensayos se ha demostrado la presencia de las isoformas α 2 y β 2-quimerina en intestino. De esta forma, ya se puede estudiar la acción supresora de tumores de las quimerinas en modelos de ratón.

Objetivo 2.-Evaluación en modelos animales del papel de las quimerinas en la formación de tumores en intestino.

Estando ya demostrada la presencia de las isoformas $\alpha 2$ y $\beta 2$ -quimerina en intestino se va a evaluar su posible función supresora de tumores.

2.1.- Papel de la isoforma $\alpha 2$ –quimerina en la formación de tumores en ratones $Apc^{Min/+}$

Para investigar el papel desempeñado por la $\alpha 2$ -quimerina se va a realizar el estudio de formaciones tumorales en el intestino las siguientes líneas de ratones:

- Línea $Apc^{Min/+}$: línea heterocigota para la mutación del gen APC que utilizaremos de control
- Línea $chn1^{-/-}, Apc^{Min/+}$: línea knock-out para $\alpha 2$ -quimerina y heterocigota para la mutación del gen APC

Durante la realización del presente trabajo se han sacrificado siete ejemplares del genotipo control y siete ejemplares del genotipo knock-out.

Se ha realizado la suma de los pólipos contabilizados en los diferentes intervalos de cada ratón sacrificado de este genotipo. Los resultados se muestran calculando el promedio de las sumas de los pólipos contabilizados (**Figura 11**).

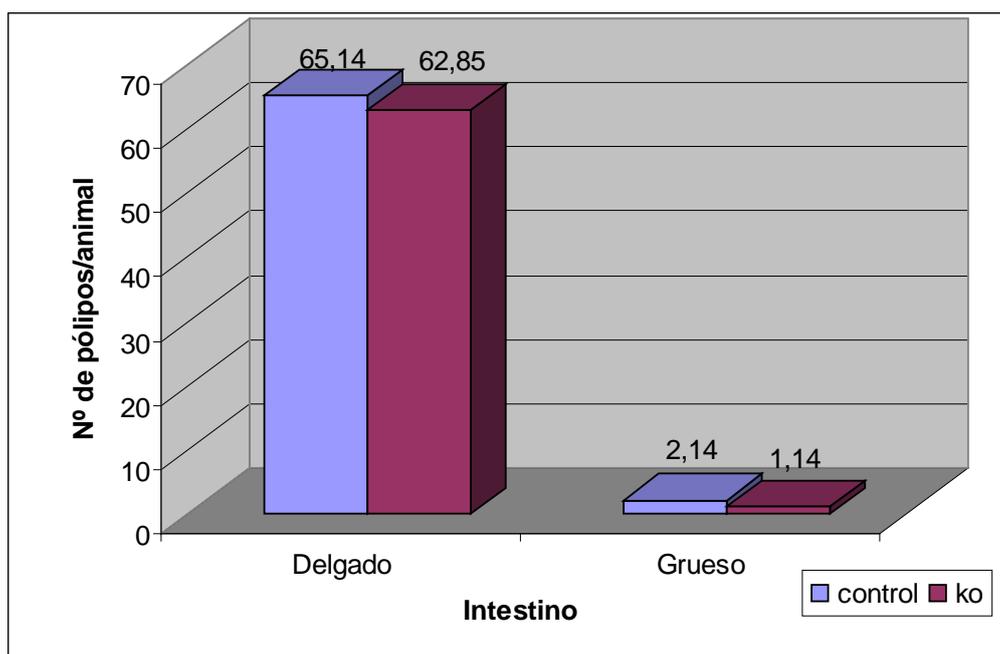


Figura 11: Promedio de los pólipos totales en el genotipo $chn1$

En esta gráfica se observa una pequeña diferencia en el número total de pólipos desarrollados a favor de los ratones control. Con estos resultados no se puede corroborar nuestra hipótesis de partida, ya que se deberían observar mayor número de pólipos en los ratones knock-out.

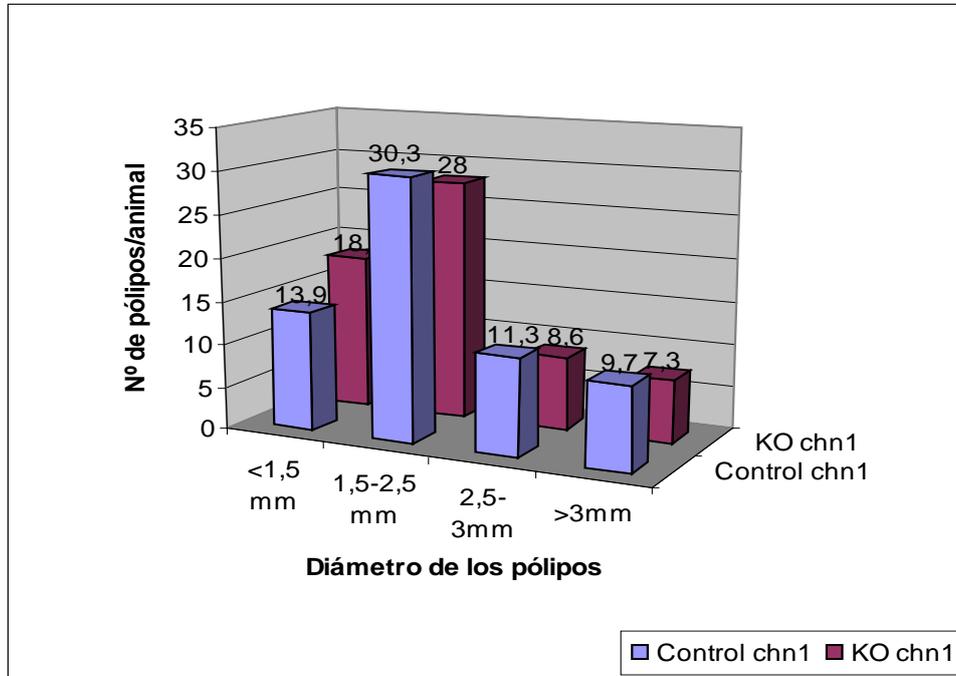
Aunque no existen diferencias en el número total de pólipos se va a estudiar si hay diferencias en el tamaño de los pólipos.

Para comprobar estas posibles diferencias se han agrupado los tumores en función de tamaño en las siguientes categorías:

Intervalos:	<1,5mm	>=1,5-2,49	>=2,5-2,99	>=3
-------------	--------	------------	------------	-----

Se ha calculado el promedio de los pólipos contabilizados clasificados por intervalos de tamaño en el intestino delgado y en el intestino grueso (colon y recto) (Figura 12).

A



B

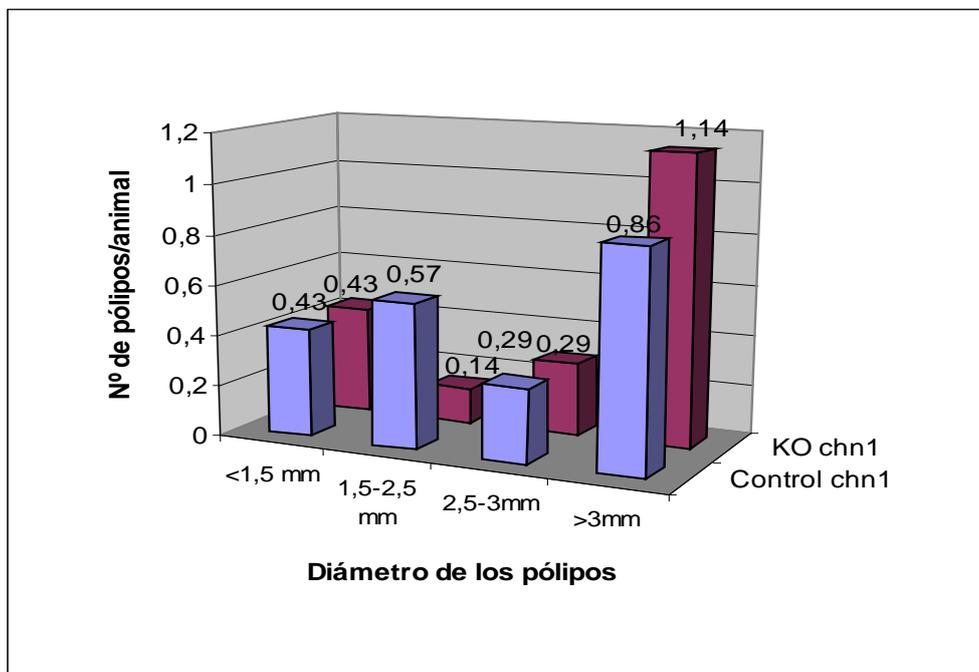


Figura 12: Promedio del número de pólipos separados por tamaños en intestino delgado (A) y en intestino grueso (colon y recto) del genotipo chn1 (B)

Con estos resultados obtenidos en el intestino delgado y en el intestino grueso podemos observar que no se confirma la hipótesis de partida en todos los intervalos.

Hay intervalos como en el de pólipos menores de 1,5 mm en el intestino delgado o en el de pólipos mayores de 3 mm en el intestino grueso que sí confirman la hipótesis de partida, pero no en el resto.

La isoforma $\alpha 2$ -quimerina, con el número de ejemplares sacrificados hasta el momento, no confirma en todos los intervalos de tamaños de pólipos la hipótesis de partida, que debería incrementar el número de pólipos en los ratones knock-out.

2.2.- Papel de la isoforma $\beta 2$ –quimerina en la formación de tumores en ratones $Apc^{Min/+}$

La evaluación del papel desempeñado por la $\beta 2$ -quimerina se ve en los datos de formación de tumores en los diferentes ejemplares.

Durante el transcurso del proyecto se han podido sacrificar tres ejemplares del genotipo control y tres ejemplares del genotipo knockout.

- Línea $Apc^{Min/+}$: línea heterocigota para la mutación del gel APC que utilizaremos de control
- Línea $chn2^{-/-}$, $Apc^{Min/+}$: línea KO para $\beta 2$ -quimerina y heterocigota para la mutación del gel APC

La imagen macroscópica del intestino en dos ejemplares de la línea $chn2$ nos muestra la proliferación de los tumores (**Figura 13**).

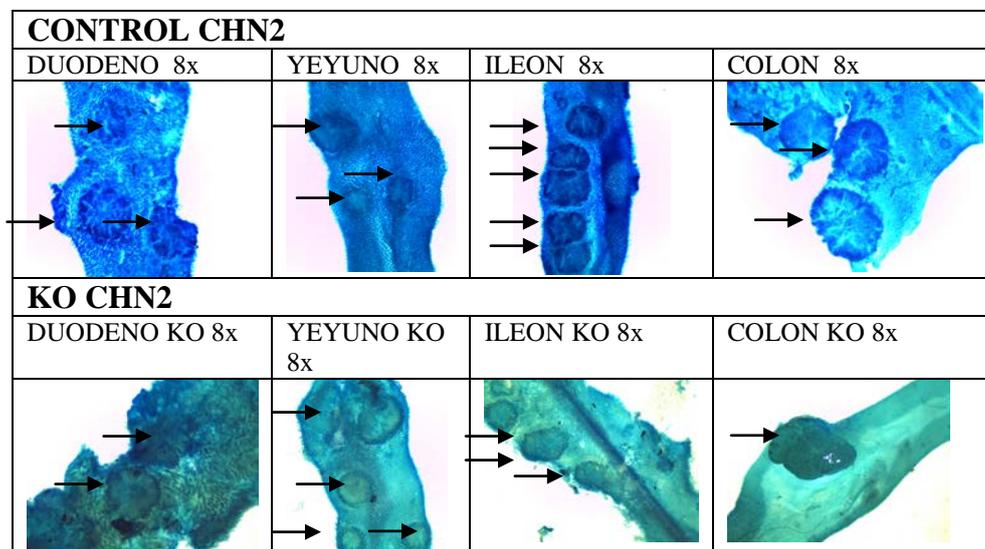


Figura 13: Proliferación tumoral en ratones control y ratones knockout de $chn2$.

En estas imágenes se observa el tamaño de los pólipos que se han ido midiendo a lo largo del proyecto.

Se ha realizado la suma de los pólipos contabilizados en los diferentes intervalos de cada ratón sacrificado de este genotipo. Los resultados se muestran calculando el promedio de las sumas de los pólipos contabilizados (**Figura 14**).

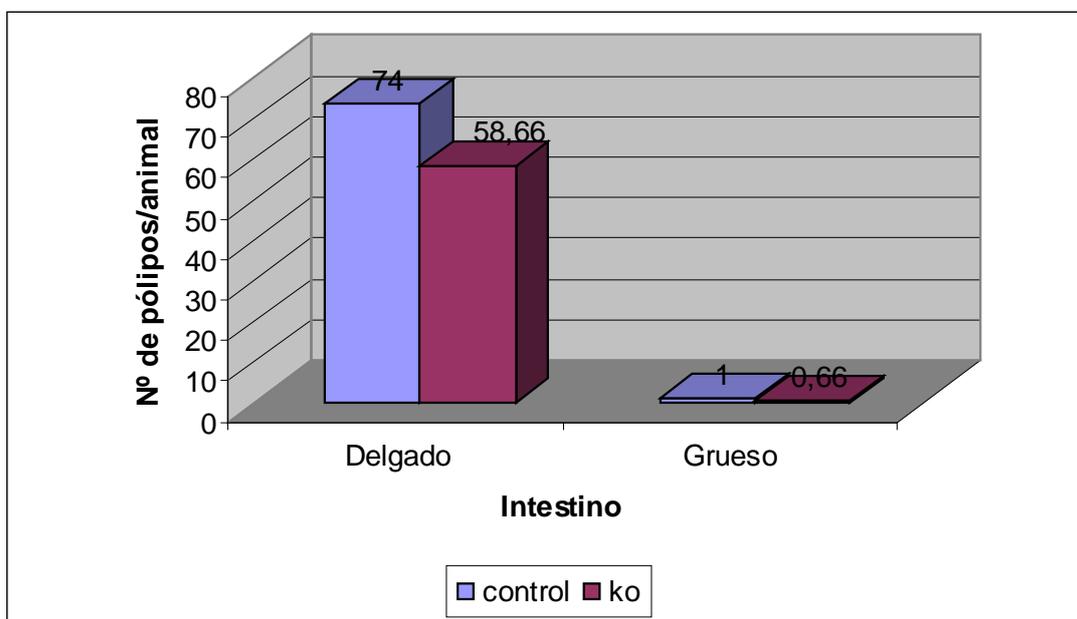


Figura 14: Promedio de los pólipos totales en el genotipo *chn2*

En esta gráfica se observan también diferencias en el número total de pólipos desarrollados a favor de los ratones control. Con estos resultados no se puede afirmar que nuestra hipótesis de partida se cumple, ya que se deberían observar mayor número de pólipos en los ratones knock-out.

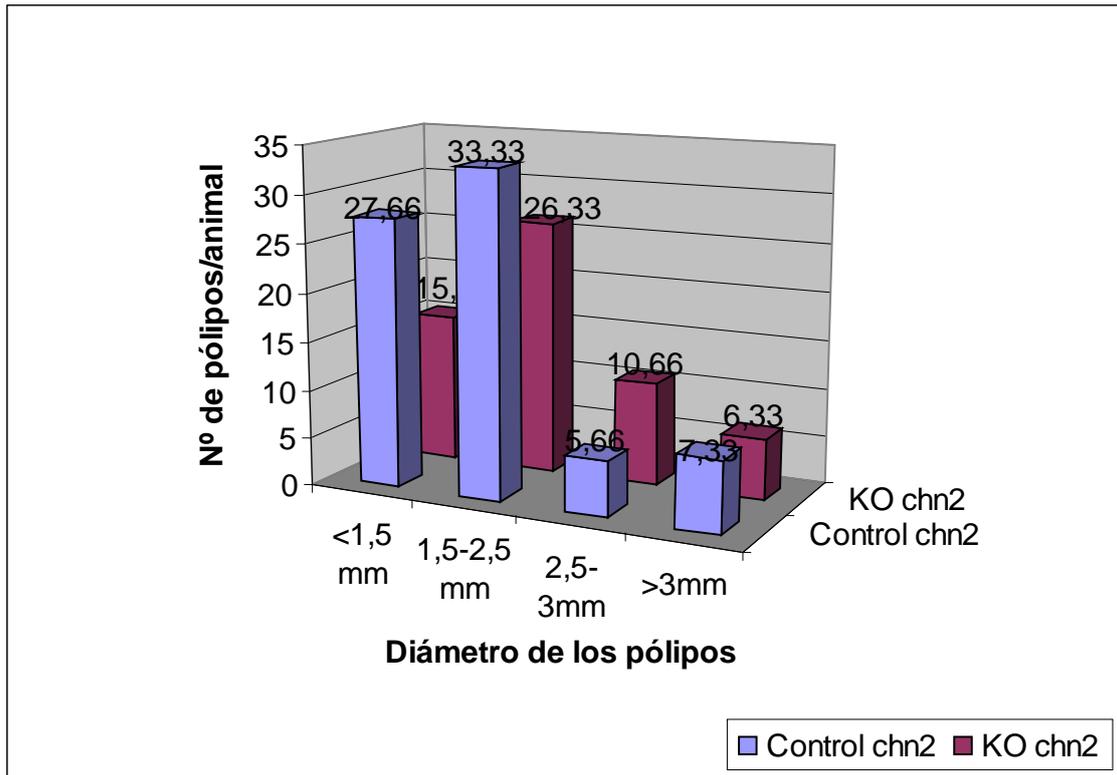
Aunque no existen diferencias en el número total de pólipos se va a estudiar si hay diferencias en el tamaño de los pólipos.

Para comprobar estas posibles diferencias se han agrupado los tumores en función de tamaño en las siguientes categorías:

Intervalos:	<1,5mm	>=1,5-2,49	>=2,5-2,99	>=3
-------------	--------	------------	------------	-----

Se ha calculado la media aritmética de los pólipos contabilizados clasificados por intervalos de tamaño en el intestino delgado y en el intestino grueso (colon y recto) (**Figura 15**).

A



B

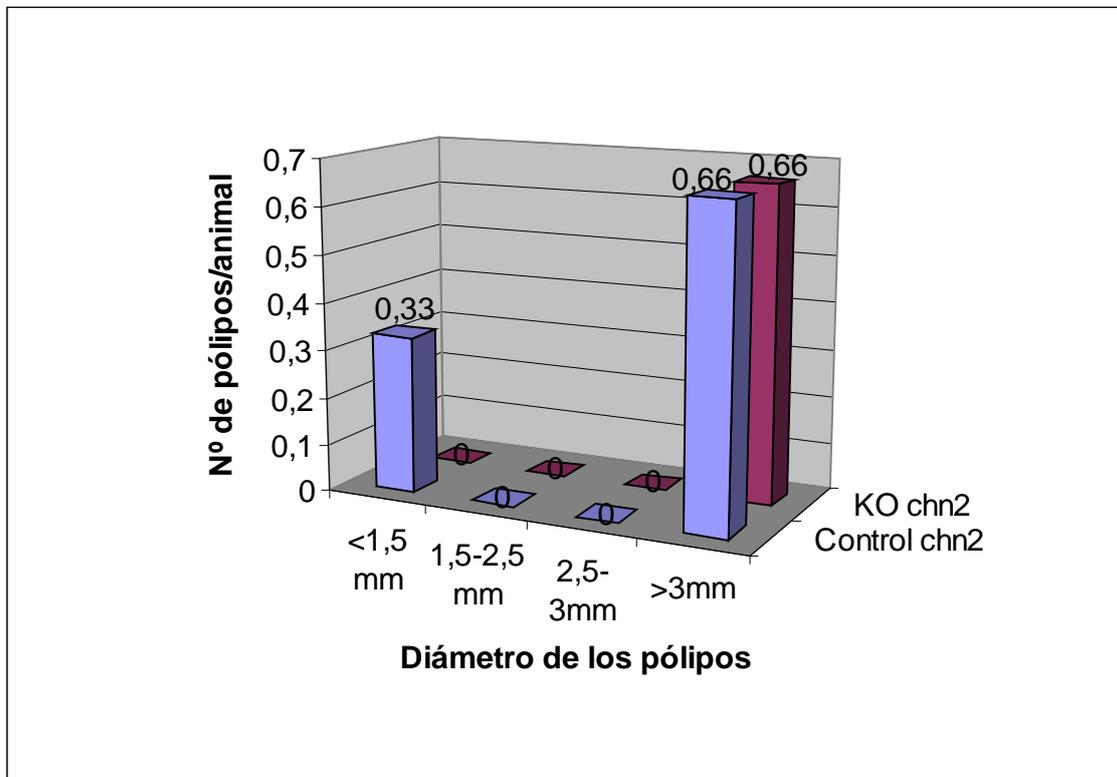


Figura 15: Promedio del número de pólipos separados por tamaños en intestino delgado (A) y en intestino grueso (colon y recto) del genotipo chn2 (B)

Con estos resultados obtenidos en el intestino delgado y en el intestino grueso podemos observar que no se confirma la hipótesis de partida en todos los intervalos.

Hay un intervalo, en el de pólipos entre 2,5 y 3 mm en el intestino delgado que sí confirma la hipótesis de partida, pero no en el resto.

La isoforma β 2-quimerina, con el número de ejemplares sacrificados hasta el momento, no confirma en todos los intervalos de tamaños de pólipos la hipótesis de partida, que debería incrementar el número de pólipos en los ratones knock-out.

Por último se ha querido comprobar si existen diferencias en los diferentes tramos de intestino.

Se muestran datos según el intestino proximal (duodeno), medio (yeyuno) y distal (ileon), y en colon en ratones control y knock-out de *chn1* (Figura 16).

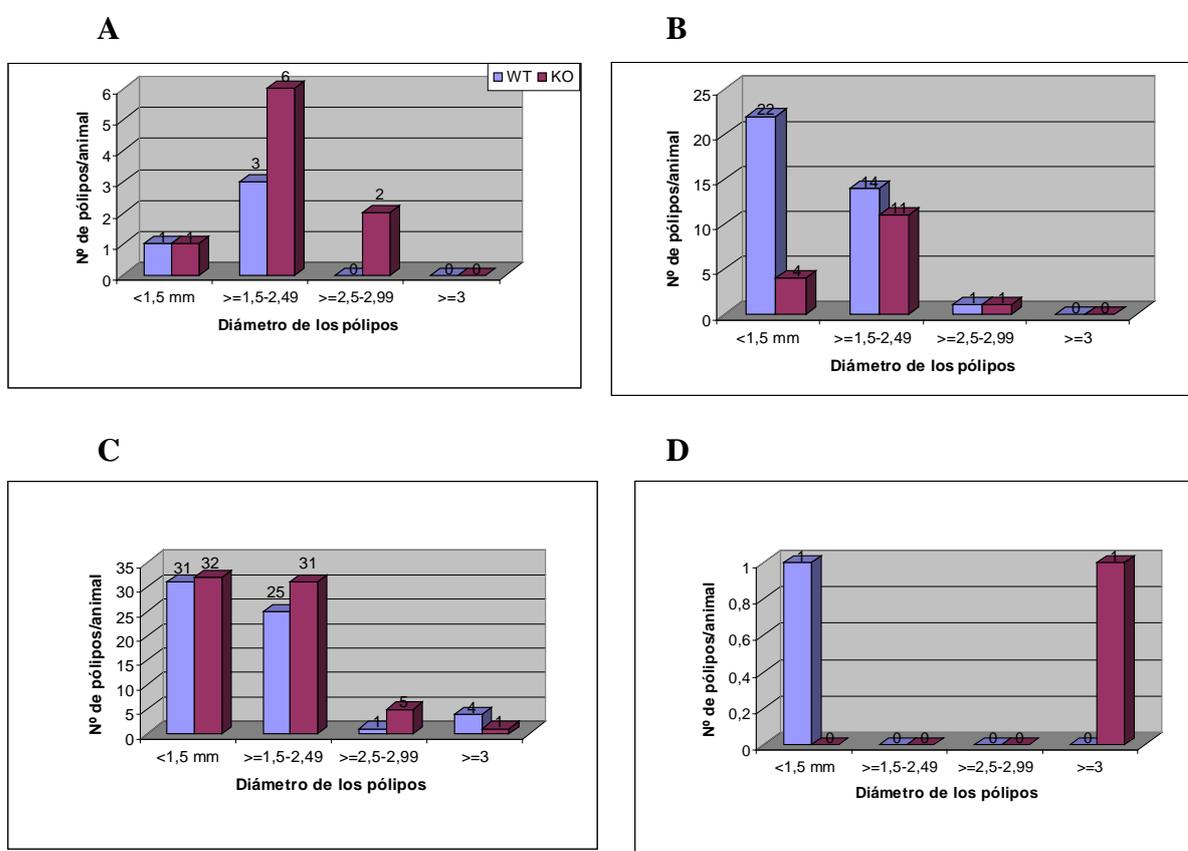


Figura 16: Promedio del número de pólipos separados por tamaños en intestino proximal (A), medio (B) y distal (C) y en intestino grueso (colon y recto) (D) del genotipo *chn2*.

En este caso sí se ven diferencias en alguna de las zonas estudiadas. En el intestino proximal, en todos los intervalos se ve un mayor número de pólipos en los ratones knock-out. En el intestino distal también se encuentran diferencias, hay mayor número de pólipos en todos los intervalos salvo en el de mayor de 3 mm.

Según estos datos, se puede constatar una pequeña disminución en el adenocarcinoma de duodeno e ileon debido a la β 2-quimerina.

El número de animales analizados todavía es insuficiente para sacar unas conclusiones definitivas. Se va a continuar el estudio hasta tener al menos de 20 a 30 ejemplares de cada genotipo.

Análisis histopatológico de los tumores:

Otro aspecto que hay que analizar son las diferencias morfológicas en la distribución y compartimentalización de los tumores. Es necesario evaluar los cortes histológicos y por eso se ha puesto a punto la técnica swiss-roll.

Mediante esta técnica se puede observar la distribución y estructura de las formaciones tumorales (**Figura 17**).

La localización de los tumores y su distribución en compartimentos es importante en la posterior difusión tumoral.

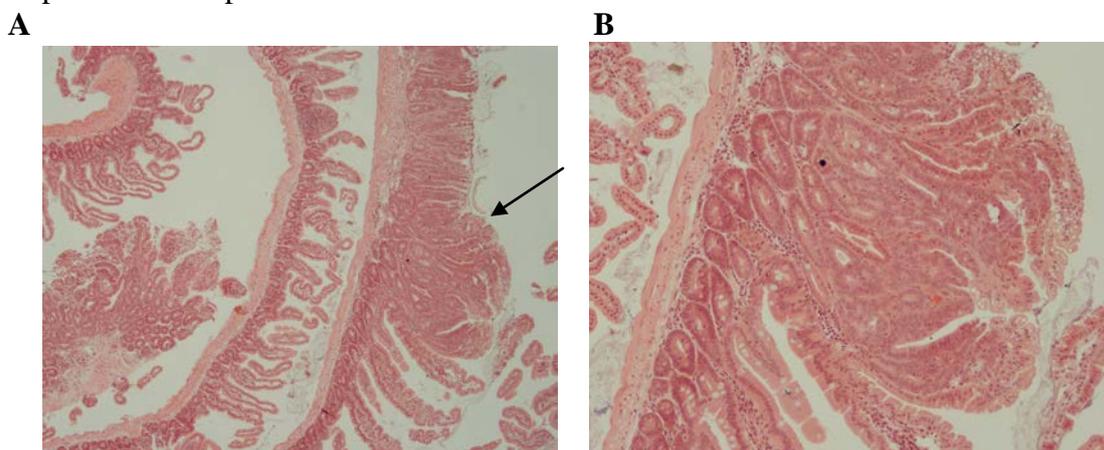


Figura 17: Localización de tumor en yeyuno de knock-out. (A) Microscopio de campo claro 4x. (B) Microscopio de campo claro 10x.

En esta figura se observa un pólipo y las estructuras adyacentes, la técnica nos resulta de utilidad para estudiar la morfología y compartimentalización de los tumores.

Las secciones se analizan, primero en binocular, y posteriormente en microscopio de campo claro para observar mejor las células adyacentes al tumor (**Figura 18**).

La distribución se puede observar en ratones control y ratones knockout.

Por el momento no se ha analizado la distribución tumoral y las células adyacentes, se ha dejado la técnica a punto para que se realice en el momento que se observen mayores diferencias a favor de la hipótesis de partida.

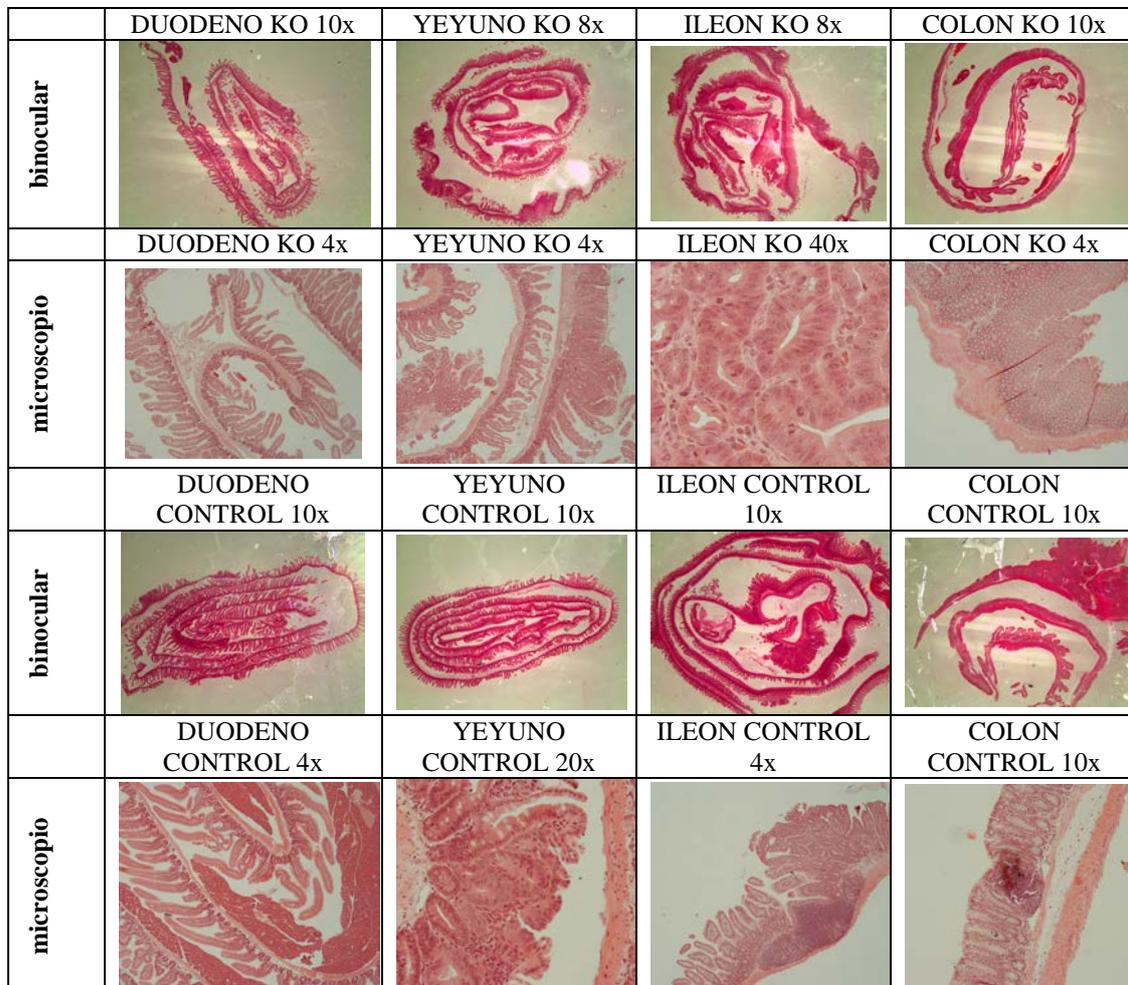


Figura 18: Swiss Roll. Se pueden observar los swiss-roll en binocular y en microscopio de campo claro.

Los tumores se localizan a lo largo de todo el intestino, aunque las mayores diferencias se han observado en duodeno e ileon. Se necesita tener mayor número de ejemplares para poder sacar unas conclusiones más precisas.

PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES:

Con la detección de EdU no se ha podido observar la proliferación celular tumoral ya que la tinción con Alexa Fluor no ha dado resultados positivos. Se muestran los resultados en el espectro de excitación/emisión máxima: 350/461 nm con la tinción de Hoechst 33342 (**Figura 19**).

El ejemplar utilizado en este experimento es un kock-out del gen *chn2*.

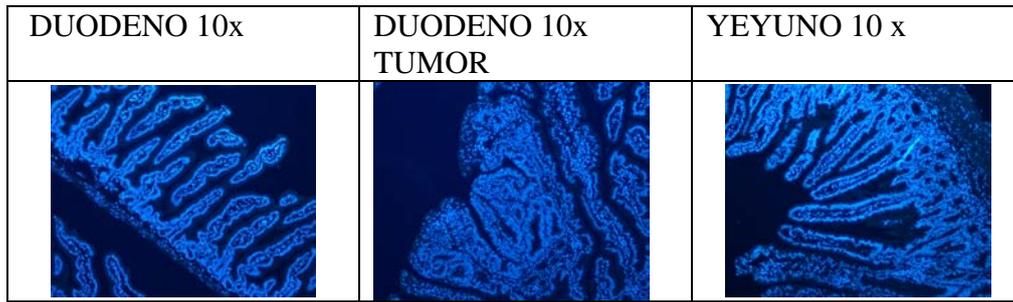


Figura 19: Ensayo EdU. Tinción con Hoechst. Se muestran los núcleos celulares y mitocondrias a través de microscopio de fluorescencia..

Con este ensayo se ha intentado comprobar la proliferación tumoral, cuando se tenga a punto la técnica se comprobará en las zonas con mayores diferencias significativas.

4.- DISCUSIÓN

Las quimerinas pueden ser supresores de tumores, pero todavía tenemos datos preliminares de los experimentos debido al pequeño número de ejemplares estudiados. No obstante, tenemos algunos datos obtenidos a partir de las investigaciones en el presente trabajo que son concluyentes.

En un primer paso se ha evaluado la expresión de la $\alpha 2$ –quimerina. Para detectar esta proteína no se ha podido utilizar un anticuerpo específico puesto que los que hay comerciales no están contrastados. Se ha realizado la detección de esta isoforma de manera indirecta. La detección ha resultado positiva en todas las muestra tanto de intestino delgado como de intestino grueso. De esta forma se puede concluir que $\alpha 2$ –quimerina se expresa en el intestino de los ratones. También se ha comprobado la expresión de $\beta 2$ –quimerina a través de western blot y por inmunohistoquímica utilizando a los ratones knock-out como control. La distribución de la proteína, en un principio, se observa en las zonas exteriores de las microvellosidades.

La evaluación en modelos animales del papel de las quimerinas en la formación de tumores se ha realizado mediante el estudio de aparición de tumores en los ratones control frente a ratones knock-out. Es de suponer que, si las quimerinas son supresores tumorales, los ratones knockout van a desarrollar mayor número de tumores en el intestino que los ratones control.

Se ha evaluado el papel de la $\alpha 2$ -quimerina y con los resultados obtenidos en el intestino delgado y en el intestino grueso hemos podido observar que no se confirma la hipótesis de partida agrupando los pólipos según tamaños en diferentes intervalos. Hay intervalos como en el de pólipos menores de 1,5 mm en el intestino delgado o en el de pólipos mayores de 3 mm en el intestino grueso que sí confirman la hipótesis de partida, pero no el resto.

La isoforma $\alpha 2$ -quimerina, con el número de ejemplares sacrificados hasta el momento, no confirma en todos los intervalos de tamaños de pólipos la hipótesis de partida, que debería incrementar el número de pólipos en los ratones knock-out

También se ha evaluado el papel de la $\beta 2$ -quimerina, con los resultados obtenidos en el intestino delgado y en el intestino grueso podemos observar que no se confirma la hipótesis de partida agrupando los pólipos según tamaños en diferentes intervalos. Hay un intervalo, en el de pólipos entre 2,5 y 3 mm en el intestino delgado que sí confirma la hipótesis de partida, pero no el resto.

Por último se ha querido comprobar si existen diferencias en los diferentes tramos de intestino. En este caso sí se ven diferencias en alguna de las zonas estudiadas. En el intestino proximal, en todos los intervalos se ve un mayor número de pólipos en los ratones knock-out. En el intestino distal también se encuentran diferencias, hay mayor número de pólipos en todos los intervalos salvo en el de mayor de 3 mm. Según estos datos, se puede constatar un pequeño aumento en el adenocarcinoma de duodeno e ileon debido a la ausencia de $\beta 2$ -quimerina.

La localización de los tumores y su distribución en compartimentos es importante en la posterior difusión tumoral. Mediante el uso de las técnicas inmunohistoquímicas puestas a punto en este proyecto se podrá observar la distribución y estructura de las formaciones tumorales.

El número de animales analizados todavía es insuficiente para sacar unas conclusiones definitivas, de momento se puede continuar con el estudio puesto que sí encontramos datos que confirman la hipótesis inicial. Cuando se tenga un mayor número de ejemplares sacrificados se podrán tener datos más precisos.

5.- CONCLUSIONES

“La cura del cáncer siempre ha sido uno de los objetivos de la ciencia. Los esfuerzos dedicados a esta labor siempre serán de una gran ayuda a contribuir a la erradicación de esa enfermedad”.

Con estas frases comenzábamos la redacción de este proyecto. Hemos estudiado la relación de las quimerinas con el desarrollo del cáncer.

Las conclusiones preliminares que podemos obtener con los datos obtenidos en la realización del presente proyecto son:

1.- La isoformas $\alpha 2$ y $\beta 2$ quimerina se expresan en el intestino de ratón.

2.- El aumento de proliferación tumoral debido a la ausencia de la $\alpha 2$ -quimerina se constata en el tamaño de los pólipos menores de 1,5 mm en el intestino delgado y en el de pólipos mayores de 3 mm en el intestino grueso, de manera preliminar, pero no en el resto. El aumento de proliferación tumoral debido a la ausencia de la $\alpha 2$ -quimerina se constata en el tamaño de pólipos entre 2,5 y 3 mm en el intestino delgado, pero no en el resto.

3.- El aumento de proliferación tumoral en los diferentes tramos de intestino de ratones con genotipo $\alpha 2$ KO se ha podido comprobar en la gran mayoría. En el

intestino proximal (duodeno), en todos los intervalos se ve un mayor número de pólipos en los ratones knock-out. En el intestino distal (íleon) también se encuentran diferencias, hay mayor número de pólipos en todos los tamaños de intervalos salvo en el de mayor de 3 mm. En los otros de momento no se encuentran diferencias significativas. Según estos datos, se puede constatar un pequeño aumento en el adenocarcinoma de duodeno e íleon debido a la ausencia de β 2-quimerina.

En el laboratorio se va a continuar con el estudio de la proliferación tumoral para así demostrar estadísticamente la actividad de las quimerinas como supresores de tumores.

6.- BIBLIOGRAFÍA

1. Wennerberg, K., Rossman, K. L. and Der, C. J. (2005). "The Ras superfamily at a glance". *J. Cell Sci.* 118, 843–846
2. Boureux A, Vignal E, Faure S, Fort P. (2007). "Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes". *Mol Biol Evol* 24 (1): 203–16.
3. Aspenstrom, P., Fransson, A. & Saras, J. (2004). "Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system". *Biochem J* 377, 327-37.
4. Hadano, S. et al. (2001). "A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2". *Nat Genet* 29, 166-73.
5. Rolfe, B.E., Worth, N.F., World, C.J., Campbell, J.H. & Campbell, G.R. (2005). "Rho and vascular disease". *Atherosclerosis* 183, 1-16.
6. Johns, D.G., Dorrance, A.M., Leite, R., Weber, D.S. & Webb, R.C. (2000). "Novel signaling pathways contributing to vascular changes in hypertension". *J Biomed Sci* 7, 431-43.
7. Gu, Y. et al. (2003). "Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases". *Science* 302, 445-9.
8. Williams, D.A. et al. (2000). "Dominant negative mutation of the hematopoietic-specific Rho GTPase, Rac2, is associated with a human phagocyte immunodeficiency". *Blood* 96, 1646- 54.
9. Ambruso, D.R. et al. (2000). "Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4654-9.
10. Lemahieu, V., Gastier, J.M. & Francke, U. (1999). "Novel mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome protein gene and their effects on transcriptional, translational, and clinical phenotypes". *Hum Mutat* 14, 54-66.
11. Ellis, S. & Mellor, H. (2000). "Regulation of endocytic traffic by rho family GTPases". *Trends Cell Biol* 10, 85-8.
12. Lerm, M., Schmidt, G. & Aktories, K. (2000). "Bacterial protein toxins targeting rho GTPases". *FEMS Microbiol Lett* 188, 1-6.
13. Ellenbroek S, Collard J. (2007). "RhoGTPases: functions and association with cancer". *Clin Exp Metastasis* 24 (8): 657–72.

14. Vetter, I.R. & Wittinghofer, A. (2001). "The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions". *Science* 294, 1299-304.
15. Schmidt, A. & Hall, A. (2002). "Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* 16, 1587-609.
16. Moon, S.Y. & Zheng, Y. (2003). "Rho GTPase-activating proteins in cell regulation". *Trends Cell Biol* 13, 13-22.
17. DerMardirossian, C. & Bokoch, G.M. (2005) "GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation". *Trends Cell Biol* 15, 356-63.
18. Yang, Ch, Kazanietz, M. (2007). "REVIEW ARTICLE: Chimaerins: GAPs that bridge diacylglycerol signalling and the small G-protein Rac". *Biochem J.* 403, 1-12.
19. Bruinsma, S.P., Baranski, T.J. (2007). "β2-Chimaerin in cancer signaling. Connecting cell adhesion and MAP kinase activation". *Cell cycle* 6:20, 2440-2444.
20. Ridley, A.J. (2004). "Rho proteins and cancer". *Breast Cancer Res Treat* 84, 13-9.
21. Yang C, Liu Y, Coluccio Leskow F, Weaver VM, Kazanietz MG. (2005). "Rac-GAP-dependent inhibition of breast cancer cell proliferation by β2-chimaerin". *J Biol Chem.*
22. Vega F. M, Ridley A.J. (2008). "Rho GTPases in cancer cell biology". *Febs letter.* Volume 582, Issue 14, Pages 2093–2101.
23. Fritz, G. & Kaina, B. (2006). "Rho GTPases: promising cellular targets for novel anticancer drugs". *Curr Cancer Drug Targets* 6, 1-14.
24. Yang, C., Liu, Y., Lemmon, M.A. & Kazanietz, M.G.(2006). " Essential role for Rac in heregulin beta1 mitogenic signaling: a mechanism that involves epidermal growth factor receptor and is independent of ErbB4". *Mol Cell Biol* 26, 831-42.
25. Bruinsma S.P. and Baranski T. J. (2007). "Extra View β2-Chimaerin in Cancer Signaling Connecting Cell Adhesion and MAP Kinase Activation ". *Cell Cycle* 6:20, 2440-2444.
26. Colon-Gonzalez, F., Leskow, F.C. & Kazanietz, M.G. (2008). "Identification of an autoinhibitory mechanism that restricts C1 domain-mediated activation of the Rac-GAP α2-chimaerin". *J Biol Chem* **283**, 35247-57.
27. Carne Cortina, Sergio Palomo-Ponce, Mar Iglesias, Juan Luis Fernández-Masip, Ana Vivancos, Gavin Whissell, Mireia Huma`, Nerea Peiro, Lourdes Gallego, Suzanne Jonkheer, Alice Davy, Josep Lloreta, Elena Sancho & Eduard Batlle. (2007). "EphB–ephrin-B interactions suppress colorectal cancer progression by compartmentalizing tumor cells". *Nature genetics.*
28. Takeuchi S, Yamaki N, Iwasato T, Negishi M, Katoh H. (2009). " Beta2-chimaerin binds to EphA receptors and regulates cell migration". *FEBS Lett.* 17;583(8): 1237-42.
29. Nievergall, E. Lackmann, M., Janes P.T. (2012). "Eph-dependent cell-cell adhesion and segregation in development and cancer". *Cellular and Molecular Life Sciences* June 2012, Volume 69, Issue 11, pp 1813-1842.
30. Kawasaki , Y. Tsuji, S,Muroya, K, Furukawa, S, Shibata, S.,OkunoM, Ohwada, S, & Akiyama, T. (2009). "The adenomatous polyposis coli-associated exchange factors Asef and Asef2 are required for adenoma formation in Apc^{Min/-} mice". *Embo Reports.*