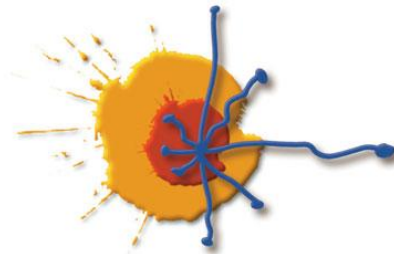


UNIVERSIDAD DE SALAMANCA



Centro de Investigación del Cáncer



Tesis Doctoral

***MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN
LA REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS Y LA
ADHESIÓN CELULAR POR LA RUTA C3G/p38
MAPK. IMPLICACIONES EN LA PATOGÉNESIS DE
LA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA.***

VERA SUSANA CARNEIRO MAIA

2012

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Centro de Investigación del Cáncer

*MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN
LA REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS Y LA
ADHESIÓN CELULAR POR LA RUTA C3G/p38
MAPK. IMPLICACIONES EN LA PATOGÉNESIS DE
LA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA.*

Este trabajo de tesis ha sido realizado por Vera Susana Carneiro Maia para optar al grado de Doctor, en el Centro de Investigaciones del Cáncer de la Universidad de Salamanca, bajo la dirección de la Dra. Carmen Guerrero Arroyo.

Vº Bº de la Directora de Tesis

Dra. Carmen Guerrero Arroyo

**Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación del Ministerio de
Ciencia e Innovación mediante el proyecto FIS-PI070078.**

Dra. CARMEN GUERRERO ARROYO, Profesor Contratado Doctor (Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, USAL) en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (CSIC-Universidad de Salamanca).

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado **“Mecanismos moleculares implicados en la regulación de la apoptosis y la adhesión celular por la ruta C3G/p38 MAPK. Implicaciones en la patogénesis de la leucemia mieloide crónica”**, que presenta Dña. Vera Susana Carneiro Maia, ha sido realizado bajo su dirección en el Centro de Investigación del Cáncer (CSIC-Universidad de Salamanca), y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente y optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que conste, y a los efectos oportunos, expide el presente certificado en Salamanca a 9 de Diciembre de 2011.

Fdo, Dra. Carmen Guerrero Arroyo

Fdo, Vera Susana Carneiro Maia



Agradecimientos

No quiero alargarme demasiado con los agradecimientos esencialmente porque es muy difícil hacerlo.

Lo primero, dar gracias a Carmen quien hizo posible la realización de esta tesis al escogerme para trabajar en su proyecto y al enseñarme mucho sobre la investigación científica durante estos 4 años. También quisiera agradecer a Almudena por su disponibilidad desde el inicio del proyecto.

A mi familia, principalmente a mi madre, a mi padre y a mi hermano que siempre han creído en mis capacidades y me han motivado a seguir adelante.

A mis amigos, principalmente a los que asistieron a los malos momentos y me ayudaron a pasarlos de un modo más leve, especialmente a Rosula. A la peña del laboratorio 6 que han hecho con que los ratos libres fuesen muy divertidos y un escape al estrés del trabajo. Al laboratorio 1 y laboratorio 17 que siempre me han ayudado en todo lo que necesité y me han tratado como un miembro más de su grupo.

A Quimera, un proyecto nacido de mucha ilusión y ganas de vivir momentos con mucho espíritu ultimate. Dar las gracias a los miembros constantes desde su fundación principalmente a Rosula, Janny y Mariana que han permitido que este equipo y grupo de amigos siga existiendo.

Por último y englobando a los que ya he mencionado, recordar a todos los que participaron en mi vida durante todo el tiempo en Salamanca.

Índice

Índice	i
Abreviaturas	I
INTRODUCCIÓN	1
<i>LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA</i>	3
<i>APOPTOSIS</i>	7
<i>RUTAS DE SUPERVIVENCIA CELULAR</i>	10
<i>ADHESIÓN CELULAR</i>	11
<i>Rap1, una GTPasa de la familia Ras con funciones en adhesión</i>	16
<i>C3G, un GEF de Rap</i>	19
<i>p38 MAPKs</i>	30
OBJETIVOS	37
MATERIALES Y MÉTODOS	41
<i>Líneas celulares y construcciones de expresión</i>	43
<i>Transfección de células K562</i>	44
<i>Infección de células K562 con partículas lentivirales shRNA</i>	45
<i>Inhibidores de las rutas de C3G y p38α MAPK</i>	45
<i>RT-PCR semicuantitativa</i>	46
<i>Anticuerpos</i>	46
<i>Ensayo quinasa in vitro de p38 MAPK</i>	48
<i>Análisis de microrrays de DNA</i>	48
<i>Análisis de los datos de hibridación de los microarrays</i>	49
<i>PCR cuantitativa a tiempo real</i>	49
<i>Ensayo de apoptosis</i>	52
<i>Ensayo de adhesión celular</i>	53
<i>Purificación de la proteína de fusión GST-RalGDS-RBD</i>	54
<i>Ensayo de la actividad de Rap1</i>	54
<i>Inmunoprecipitación</i>	55
<i>Pull-down</i>	56
<i>Inmunofluorescencia</i>	56
<i>Array de Dominios SH3</i>	57

<i>Análisis estadístico</i>	61
RESULTADOS	63
I. CARACTERIZACIÓN DE LA RUTA APOPTÓTICA C3G-p38 MAPK EN CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA	65
<i>La sobre-expresión de C3G induce apoptosis en la línea K562</i>	65
<i>El silenciamiento génico de C3G también incrementa la apoptosis basal</i> .	67
<i>C3G participa en la vía de apoptosis inducida por STI-571 en células K562 a través de la regulación de p38 MAPK</i>	69
<i>C3G antagoniza el efecto inhibitor de STI-571 sobre las rutas de supervivencia</i>	74
<i>C3G regula la transcripción de genes involucrados en apoptosis</i>	76
II. IDENTIFICACIÓN DEL INTERMEDIARIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE C3G Y BCR-ABL	83
<i>El dominio SH3 de Bcr-Abl interacciona con C3G y con las proteínas Abi1, Cbl y p130Cas</i>	83
<i>Los dominios SH3 y SH3-binding de Abi1, Cbl y p130Cas interaccionan con C3G y Bcr-Abl</i>	84
<i>El silenciamiento de las proteínas Abi1, Cbl y p130Cas altera la interacción entre C3G y Bcr-Abl</i>	87
<i>C3G, Cbl y p130Cas interaccionan directamente con el mismo grupo de proteínas, destacando las que participan en adhesión</i>	89
<i>Anexo I</i>	94
III. IMPLICACIÓN DE LA RUTA C3G-p38α MAPK EN LAS PROPIEDADES ADHESIVAS DE LAS CÉLULAS K562	97
<i>Las células K562 tienen preferencia por adherirse a fibronectina</i>	98
<i>El silenciamiento de C3G, Cbl, Abi1 y p38 MAPK inhibe la adhesión a fibronectina, mientras que el silenciamiento de p130Cas incrementa la adhesión</i>	99
<i>C3G y p38α forman complejos con proteínas que participan en la formación y regulación de adhesiones focales</i>	100
<i>La sobreexpresión de C3G tiene un efecto inhibitor sobre proteínas de las adhesiones focales</i>	102
<i>El silenciamiento génico de C3G tiene un efecto inhibitor sobre proteínas de las adhesiones focales</i>	103
<i>p38α MAPK regula la expresión y activación de proteínas de adhesión de forma antagónica a C3G</i>	105

<i>Las proteínas Cbl, Abi1 y p130Cas regulan la expresión y activación de proteínas de adhesión en células K562.....</i>	<i>107</i>
DISCUSIÓN	109
<i>Capítulo I.....</i>	<i>111</i>
<i>Capítulo II.....</i>	<i>115</i>
<i>Capítulo III.....</i>	<i>120</i>
CONCLUSIONES	121
BIBLIOGRAFIA	121

Abreviaturas

abl	proteína <i>abelson tyrosine kinase</i>
AMPC	adenosín-3',5'- monofosfato cíclico
ATP	adenosín-5'-trifosfato
bcr	proteína <i>breakpoint cluster region</i>
BID	protein <i>BH3-interacting domain death agonist</i>
BSA	albúmina bovina sérica
cDNA	DNA complementario
Cdk	quinasa dependiente de ciclina
CS	<i>Calf serum</i> , suero de ternera
DAPI	<i>4'6-diamidino-2-fenylindole</i> , 4'6-diamidino-2-fenilindol
DEPC	dietil pirocarbonato
DMEM	medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	dimetil sulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxinucleótidos
DTT	dithiothrietol
ECM	<i>Extracellular matrix</i> , matriz extracelular
EDTA	ácido etilen-diamino tetracético
EGF	factor de crecimiento epidérmico
EGTA	ácido etilen-glicol-bis-(β-amino etil eter) N,N tetracético
ERK	quinasa regulada por señales extracelulares
FADD	<i>Fas-associated death domain protein</i> , proteína de dominio de muerte asociado a Fas
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i> , quinasa de adhesión focal
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> , suero bovino fetal
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> , factor de crecimiento de fibroblastos
FGFR	<i>FGF receptor</i> , receptor de FGF
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> , isotiocianato de fluoresceína
GAP	proteínas activadoras de la actividad GTPasa
GAPDH	gliceraldehide-3-fosfato deshidrogenasa
GDP	guanosín-5'-difosfato
GTP	ácido guanosín-5'-trifosfato
GEF	proteínas intercambiadoras de nucleótidos de guanina
GH	hormona de crecimiento
GM-CSF	factor estimulante de colonias de granulocito y macrófagos
GST	Glutathione S-transferase, Glutación-S-Transferasa
HAT	hipoxantina, aminopterina y timidina
HCK	<i>Hematopoietic cell kinase</i> , quinasa de células hematopoyéticas
HGF	<i>High growth factor</i> , factor de crecimiento hepático
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i> , factor de crecimiento insulínico
IGFR	<i>IGF receptor</i> , receptor de IGF
IL	Interleucina
IP	inmunoprecipitación
IPTG	Isopropil-β-D-Tiogalactopiranósido
Jak	<i>Janus kinase</i> , quinasa janus

JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i> , quinasa N-terminal de c-Jun
Kb	kilobase
kDa	kilodalton
LB	medio "Luria bertani"
MAPK	quinasa de proteínas activadas por mitógenos
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
NGF	<i>neuronal growth factor</i> , factor de crecimiento neuronal
NF	κ B <i>Nuclear factor-κB</i> , factor nuclear κ B
p/v	relación peso/volumen
p-Akt	Akt fosforilado
PBS	tampón fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
p-ERK	ERK fosforilado
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i> , quinasa fosfatidilinositol-3
PMSF	fluoruro de fenil metil sulfonilo
p-MEK	MEK fosforilado
Rb	proteína de Retinoblastoma
RNA	ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
ROCK	<i>Rho-kinase</i> , Rho-quinasa
RT	transcripción reversa
RTK	<i>Tyrosine-kinase receptor</i> , receptor tirosina-quinasa
RT-PCR	transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (ensayo de)
SDS	lauril sulfato sódico
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS
SH2	<i>Src-homology domain 2</i> , dominio 2 de homología con Src
SH3	<i>Src-homology domain 3</i> , dominio 3 de homología con Src
shRNA	<i>interfering short-hairpin RNA</i> , horquilla de ARN interferente
Src	<i>Sarcoma tyrosine-kinase</i> , tirosín-quinasa sarcoma
STAT	<i>Signal transducers and activator of transcription</i> , transductor de señal y activador de transcripción.
TCR	<i>T-cell receptor</i> , receptor de células T
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β1</i> , factor de crecimiento transformante β 1
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-α</i> , factor de necrosis tumoral



INTRODUCCIÓN

LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

La leucemia mieloide crónica (LMC) es un desorden mieloproliferativo clonal que ha sido estudiado extensivamente como modelo de transformación neoplásica de células madre. Está asociada en más del 95% de los casos con el cromosoma *Philadelphia* (Ph) (Nowell y Hungerford 1960), resultante de la traslocación cromosómica t(9:22) (q34;q11) que da lugar a la fusión de secuencias 5' del gen bcr, situado en el cromosoma 22, con secuencias 3' del proto-oncogén abl, que se localiza en el cromosoma 9 (Figura 1). Esta proteína de fusión recibe el nombre de Bcr-Abl y codifica para una oncoproteína que tiene una actividad quinasa muy superior a la de la quinasa c-Abl (Rowley 1973). Dependiendo del punto de rotura en bcr se pueden generar proteínas de 190, 210 y más raramente 230 kDa, las cuales están representadas en la Figura 2. La proteína de 210 kDa se halla en el 95% de los pacientes de LMC y hasta un 20% de pacientes adultos con leucemia linfoblástica aguda (LLA) y la forma p190 se encuentra en aproximadamente 10% de los pacientes con LLA y en la mayoría de los pacientes pediátricos con LLA Ph⁺ (Mauro y Druker 2001; Williams *et al.*, 1994). La forma p230 de Bcr-Abl se asocia a un síndrome mieloproliferativo conocido como leucemia neutrofílica crónica (Quackenbush *et al.*, 2000).

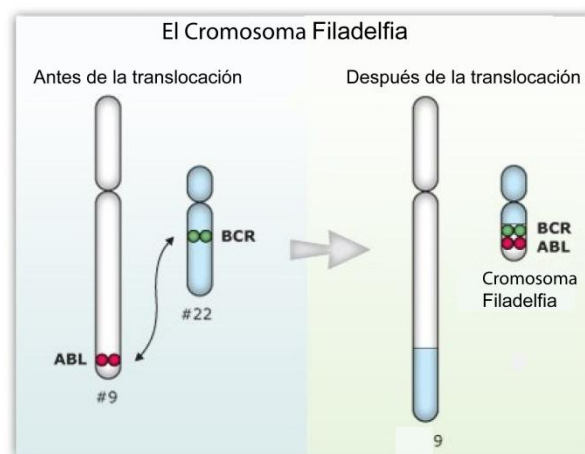


Figura 1. Representación de la translocación cromosómica t(9:22) (q34;q11) que da lugar al cromosoma Filadelfia portador de la proteína quimérica Bcr-Abl (adaptado de la página Web de la Sociedad Canadiense de LMC; www.cmlsociety.org).

Bcr-Abl p210 contiene en su estructura proteica tres dominios principales, el dominio tirosina-quinasa que es precedido por un dominio SH2 (Src-homology-2) y un

dominio SH3 (Src-homology-3) que están representados en la Figura 3 (Hantschel y Superti-Furga 2004). La expresión del gen de fusión se lleva a cabo por el promotor de bcr y su actividad tirosina quinasa está aumentada 5 veces o más, con respecto a la proteína c-abl (Konopka y Witte 1985). Ensayos utilizando mutantes de p210 Bcr-Abl *in vitro* y *in vivo* indican que la actividad tirosina quinasa es crucial para sus efectos oncogénicos (Wertheim *et al.*, 2002a).

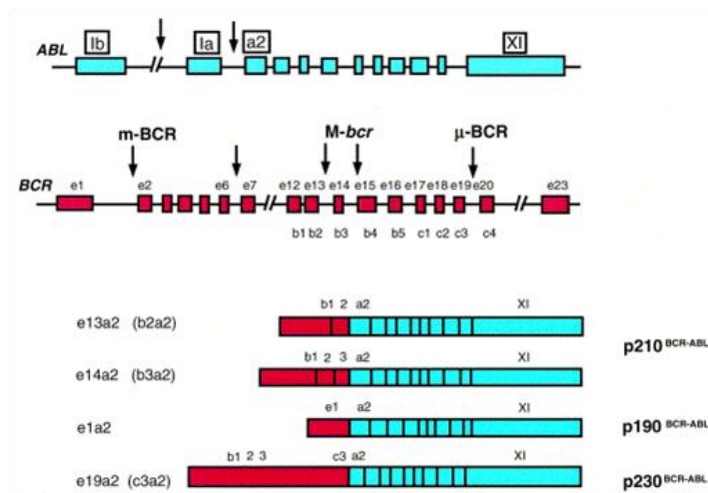


Figura 2. Representación de los diferentes puntos de rotura en bcr que dan origen a proteínas de diferentes tamaños, 210, 190 y 230 kDa. La isoforma p210 es la más frecuente en pacientes de LMC. (Figura tomada Mughal y Goldman 2001).

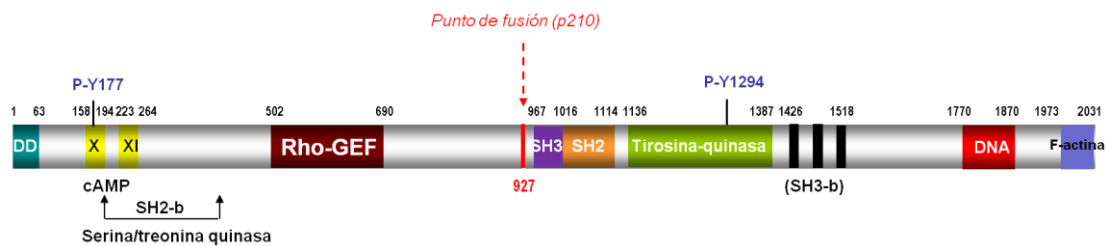


Figura 3. Representación de la estructura de los dominios de Bcr-Abl p210. En la región amino al punto de fusión se encuentran los dominios pertenecientes a bcr como la región rica en residuos fosforilados de serina y treonina (192-413), esencial para la transformación. La fosforilación en el residuo tirosina 177 provoca la unión al dominio SH2 de Grb2 activando a Ras. En la región carboxilo al punto de fusión se encuentra el dominio tirosina quinasa que contiene el residuo tirosina 1294 que cuando se autofosforila crea sitios de unión para proteínas con dominios SH2 como Grb2, Ras-GAP, PLC γ , p85PI3K, Shc y Syp. Este dominio es precedido por los dominios SH2 y SH3. El extremo carboxilo posee un dominio de unión al DNA y a F-actina. DD: dominio de dimerización.

La mayoría de los pacientes con LMC comienzan con una fase crónica caracterizada por un elevado porcentaje de neutrófilos maduros, si bien tiene lugar una expansión normal de todos los tipos de diferenciación mieloide. Con el progreso de la

enfermedad los pacientes entran en una fase acelerada que es seguida por una tercera y fatal fase, la crisis blástica durante la cual se detiene la diferenciación hematopoyética (Figura 4). En esta fase se produce una acumulación de blastos en la medula ósea que son expulsados a la circulación, proceso que está acompañado por la adquisición de mutaciones genéticas adicionales (Lugo *et al.*, 1990; Wertheim *et al.*, 2002b). Cuando la LMC se encuentra en fase avanzada presenta arresto de diferenciación y mutagénesis vía especies reactivas de oxígeno (ROS) resultando en inestabilidad genómica (que incluye defectos en la supervisión del genoma, deficiencias en la reparación del DNA y pérdida de la función de genes supresores de tumores). Las mutaciones más frecuentes involucran a p53, a p16^{INK4A} y Akt, también son frecuentes la duplicación de genes, translocaciones, rotura cromosomal y acortamiento de los telómeros (De Melo *et al.*, 2007; Jamieson *et al.*, 2004; Koptyra *et al.*, 2006).

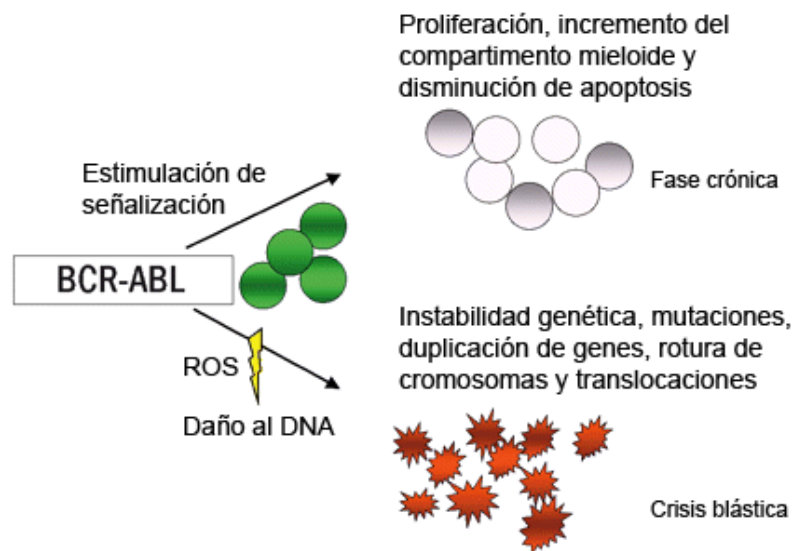


Figura 4. Papel de Bcr-Abl en LMC. En la fase crónica Bcr-Abl estimula la proliferación e inhibe la apoptosis. Durante la progresión a la crisis blástica Bcr-Abl promueve la inestabilidad genética, lo que induce la adquisición de nuevas mutaciones (Hehlmann y Saussele 2008).

A nivel celular, la enfermedad se caracteriza por un incremento de la proliferación y de la estimulación de vías de señalización, lo que resulta en una mayor resistencia a apoptosis, así como por alteraciones de las propiedades de adhesión (Gordon *et al.*, 1989; Koptyra *et al.*, 2006; Verfaillie *et al.*, 1992). Como resultado de la activación constitutiva de la proteína tirosina quinasa Bcr-Abl, varios sustratos son fosforilados, lo que resulta en la activación de múltiples vías de señalización (Figura 5), incluyendo entre otras las vías PI3K/Akt, JAK/STAT y Ras/MAPK/ERK quinasa. Esto

confiere a las células progenitoras mieloides, una capacidad de proliferación y de supervivencia independiente de factores de crecimiento (Deininger *et al.*, 2000; Jacquél *et al.*, 2003; Steelman *et al.*, 2004).

Por otra parte, en contraste con progenitores primitivos y progenitores comprometidos normales, los progenitores primitivos y comprometidos de la médula ósea de LMC no se adhieren a las capas normales del estroma ni a fibronectina y sus fragmentos proteolíticos, pero se adhieren al colágeno tipo IV y laminina, componentes de la membrana basal de la matriz extracelular (Gordon *et al.*, 1989; Verfaillie *et al.*, 1992).

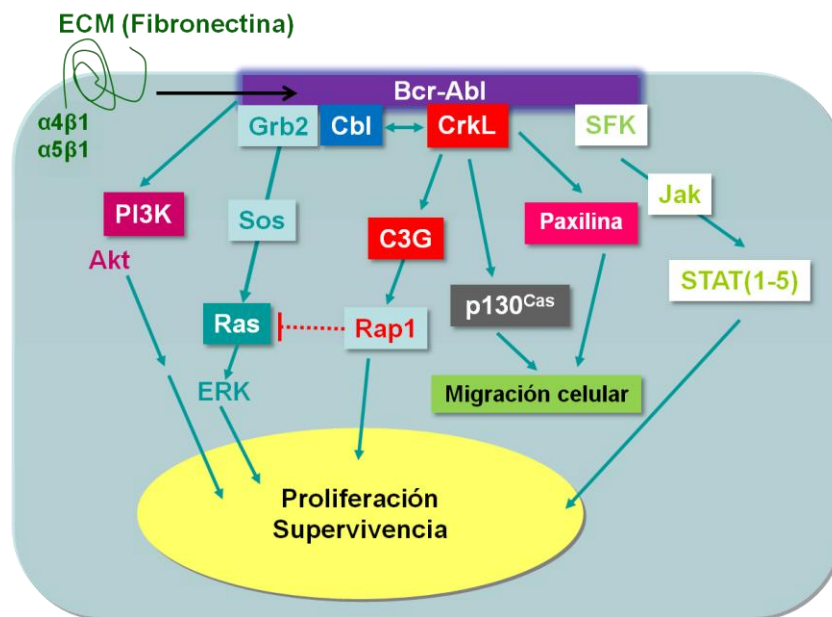


Figura 5. Representación de las vías de señalización activadas por la proteína de fusión p210 Bcr-Abl, incluyendo Ras/ERK, PI3K/Akt, JAK/STAT, que confieren a las células de LMC una mayor capacidad de proliferación y supervivencia. Las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$ conectan las células de LMC con la matriz extracelular (ECM).

La LMC fue la primera enfermedad hematológica para la cual se logró el desarrollo de una terapia efectiva basada en la inhibición de una molécula diana (Druker 2001; Druker *et al.*, 1996). STI-571 (*Imatinib mesylate*, *Gleevec* o *Glivec*), fue el primer inhibidor de la quinasa Abl desarrollado para uso clínico y de hecho, sigue siendo hoy en día la terapia de primera línea más común para el tratamiento de la enfermedad (Druker *et al.*, 2006). STI-571 inhibe la fosforilación y actividad de Bcr-Abl y, como consecuencia, produce la inhibición de las vías ERK1/2, JNK, y Akt, lo que conduce a la activación de los eventos que conllevan a la muerte celular mediada por la mitocondria (Jacquél *et al.*, 2003). El STI-571 inhibe Bcr-Abl de forma altamente eficaz

durante la fase crónica, y prolonga significativamente la supervivencia. La progresión a la crisis blástica se retarda en la mayoría de los pacientes y posiblemente se previene en algunos casos (Hehlmann y Saussele 2008). Para los pacientes que desarrollan resistencia al STI-571, la utilización de inhibidores de quinasa de segunda generación como *nilotinib* y *dasatinib* ofrece una nueva oportunidad del control de la enfermedad (Kantarjian *et al.*, 2006; Talpaz *et al.*, 2006). Sin embargo, ninguno de los tratamientos disponibles actualmente tiene un impacto significativo en la reversión de la evolución de la enfermedad, lo que hace imprescindible controlar la LMC mientras aún se encuentra en la fase crónica.

Por ello es vital la identificación de genes que puedan servir como marcadores de pronóstico de los pacientes con probabilidad incrementada de progresión de la enfermedad a crisis blástica.

La línea celular humana K562 procede de un paciente de LMC en crisis blástica y ha sido utilizada extensivamente como modelo de estudio de la diferenciación, apoptosis y adhesión celular en células de leucemia. Las células K562 se comportan como precursores hematopoyéticos pluripotentes expresando, en condiciones de ausencia de estímulos, marcadores de las líneas eritroides, granulocíticas, monocíticas y megacariocíticas (Yuksel *et al.*, 2002).

APOPTOSIS

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada, regulada genéticamente, que se caracteriza por la condensación de la cromatina y del citosol, fragmentación del DNA y la rotura final de la célula en “cuerpos apoptóticos” que son eliminados por fagocitosis sin que se produzca inflamación. Por el contrario, en la muerte por necrosis se produce un hinchamiento celular y posterior fragmentación, liberándose el contenido celular, lo que origina un proceso de inflamación (Kroemer *et al.*, 2005). La apoptosis tiene una importancia fundamental en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos, ya que elimina las células que están en exceso o que son potencialmente peligrosas, y juega un papel esencial en el desarrollo al eliminar células o tejidos transitorios (revisado por Kroemer *et al.*, 2005). Las células en apoptosis son eliminadas de forma controlada para minimizar el daño y la disrupción de las células vecinas. Los restos celulares son removidos por fagocitosis y una nueva célula toma el lugar de la célula

eliminada (revisado por Taylor *et al.*, 2008). En la mayoría de los casos, la ejecución de la apoptosis se debe a la activación de un conjunto de cisteína-proteasas denominadas caspasas que se activan en cascada (Figura 6). Se ha demostrado que durante la apoptosis la enzima nuclear de 113 kDa PARP, importante en la reparación del DNA, puede ser escindida en fragmentos de 89 y 24 kDa que contienen el sitio activo y el dominio de unión al DNA, respectivamente. Este corte resulta en la inactivación de PARP, mediante la destrucción de su capacidad de respuesta a la ruptura de las cadenas de DNA. El principal responsable del corte de PARP durante la muerte celular es la caspasa 3 que juega un papel central en la ejecución del programa de apoptosis (Boulares *et al.*, 1999).

Hasta la fecha, han sido establecidas tres rutas principales de apoptosis asociadas a la activación de caspasas en mamíferos: la vía extrínseca o de los receptores de muerte, la vía intrínseca o mitocondrial, y la vía de la Granzima B que involucra la liberación de la proteasa granzima por linfocitos T citotóxicos (CTL) o células NK (*natural killer*), (revisado por Taylor *et al.*, 2008). Brevemente, la ruta extrínseca implica la unión de ligandos de muerte extracelulares a receptores de muerte transmembranales que inducen el reclutamiento de proteínas adaptadoras, tales como FADD. FADD recluta y activa la procaspasa 8, que a su vez activa la procaspasa 3 y 7 (Figura 6), lo cual provoca la activación de caspasas adicionales, culminando en muerte celular (Hengartner 2000; Krammer 2000; Taylor *et al.*, 2008). En algunas situaciones, las señales de muerte extrínsecas pueden cruzarse con la vía intrínseca a través de la proteólisis, mediada por la caspasa 8, de las proteínas BID (revisado por Taylor *et al.*, 2008). La ruta intrínseca está regulada por proteínas de la familia de Bcl-2, que pueden actuar como sensores específicos de la vía, y su activación resulta en la inhibición de los miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 resultando en la liberación del citocromo c y de otras proteínas pro-apoptóticas como Smac/Diablo y AIF (Figura 6). El citocromo c permite la activación de la caspasa 9 que a su vez propaga el sistema de proteólisis activando caspasas adicionales (Gulbins *et al.*, 2003; Parone *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2008).

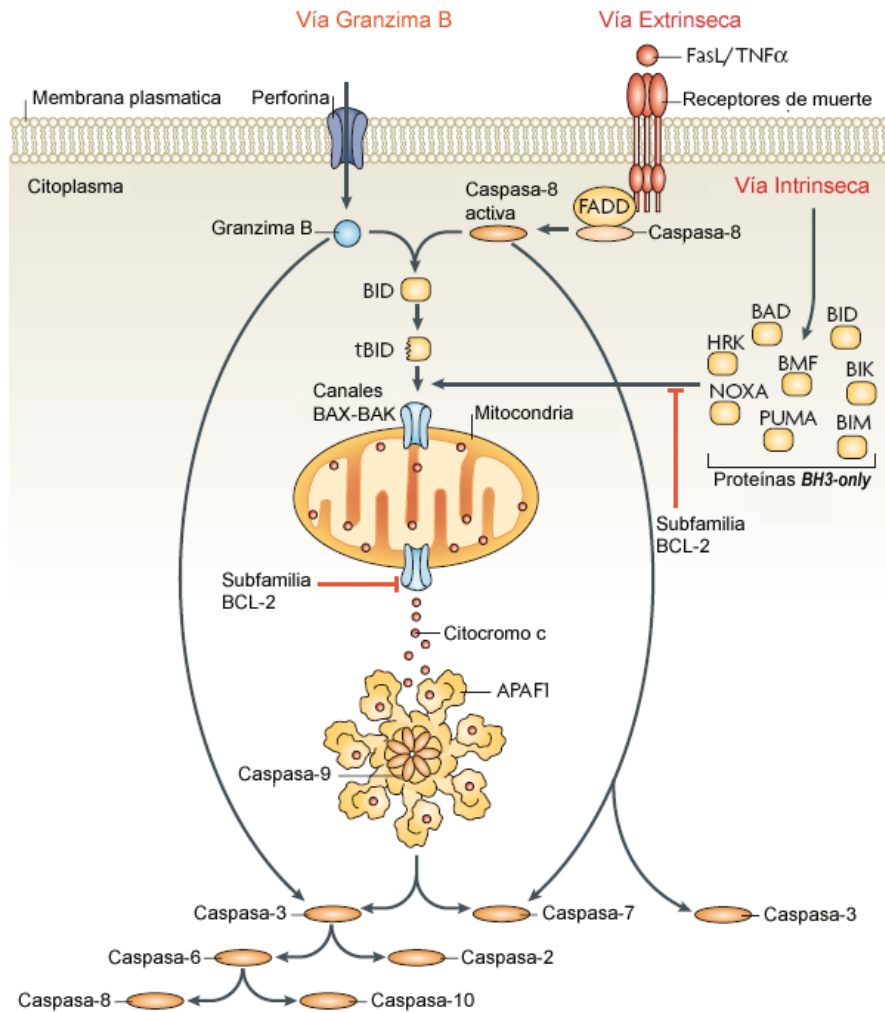


Figura 6. Las vías de activación de caspasas. En mamíferos están establecidas tres vías principales de apoptosis asociada a la activación de caspasas: vías extrínseca e intrínseca, y vía dependiente de la granzima B. Todas estas vías llevan a la activación de las principales caspasas efectoras, caspasa-3, caspasa-6 y caspasa-7 (Taylor *et al.*, 2008).

La apoptosis está regulada por varias familias de proteínas que activan o reprimen la apoptosis, entre ellas destacamos la familia de proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP), la familia de proteínas Bcl-2 y las p38 MAPKs, de las cuales hablaremos más adelante (Hengartner 2000; Porras *et al.*, 2004).

RUTAS DE SUPERVIVENCIA CELULAR

Las MAPKs ERK1 y ERK2

Las MAPKs ERK1 y ERK2 son serina-treonina quinasas de 44 y 42 kDa, respectivamente, ubicuamente expresadas en todos los organismos eucariotas (Zang *et al.*, 2009). Entre los estímulos que son capaces de activar a ERK1/2 se encuentran factores de crecimiento (EGF, PDGF, GM-CSF), citoquinas (IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-8, TNF α , TGF β), quimioquinas (CXCL12), la adhesión mediada por integrinas a sustratos de la ECM, y determinados agentes transformantes y carcinógenos. Las ERKs, cuando se encuentran en su forma activada, son capaces de fosforilar diversos sustratos citoplasmáticos, proteínas de membrana y de citoesqueleto, o migrar al núcleo para fosforilar y activar varios factores de transcripción entre los que se incluyen c-Fos, c-Myc y ELK (Cuschieri y Maier 2005; Roux y Blenis 2004; Wada y Penninger 2004).

No todos los tipos tumorales utilizan la ruta de las MAPKs para inducir su crecimiento, pero se sabe que una gran cantidad de líneas celulares y tumores humanos expresan de manera constitutiva las formas fosforiladas de ERK1 y ERK2. Se ha descrito que Bcr-Abl tiene capacidad de activar no solo a Ras sino a otras proteínas de la misma familia como Rap1. La activación de Rap en células de LMC resulta en la activación de B-Raf y ERK. La inhibición de la activación de Rap1 bloquea la señalización dependiente de ERK, demostrando que aparte de Ras/Raf-1, Bcr-Abl también puede activar ERK a través de la activación de Rap1/B-Raf (Stork y Dillon 2005).

La ruta de PI3K/Akt

La fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) es una enzima con actividad lípido-quinasa, que produce inosítoles fosforilados en posición 3', generándose fundamentalmente PI(3,4)P₂ y PI(3,4,5)P₃. La ruta de la PI3K/Akt puede modular diferentes funciones celulares bien, directamente por la PI3K y/o por la Akt. La Akt fosforila numerosos sustratos, regulando así múltiples procesos celulares como son la supervivencia celular, el crecimiento y el ciclo celular, la adhesión celular o el metabolismo glucídico (Cantley 2002). Entre todas estas funciones, es importante su

papel en la regulación de la supervivencia gracias a la fosforilación de GSK3, Mdm2, Bad, caspasa 9, factores de transcripción de la familia de Foxo e IK quinzasas (IKKs) que conducen a la activación de rutas de supervivencia y/o inactivación de proteínas pro-apoptóticas (Vanhaesebroeck y Alessi 2000).

ADHESIÓN CELULAR

Adhesión célula-matriz extracelular

La adhesión de la célula a la matriz extracelular (ECM) induce estructuras discretas en la superficie celular asociadas con la matriz que median las interacciones de la célula con su ambiente extracelular. Las adhesiones célula–matriz son esenciales para la migración celular, organización de tejidos y diferenciación, y como resultado juegan un papel central en el desarrollo embrionario, remodelación y homeostasis en los sistemas de tejidos y órganos. Las señales de adhesión a la matriz cooperan con otras vías para la regulación de procesos biológicos como la supervivencia y proliferación celular, reparación de heridas y tumorigénesis (Figura 7) (Berrier y Yamada 2007). Una de las estructuras de adhesión celular más comúnmente estudiadas son las adhesiones focales que están presentes en una serie de tipos celulares típicamente de origen mesenquimal (Romer *et al.*, 2006).

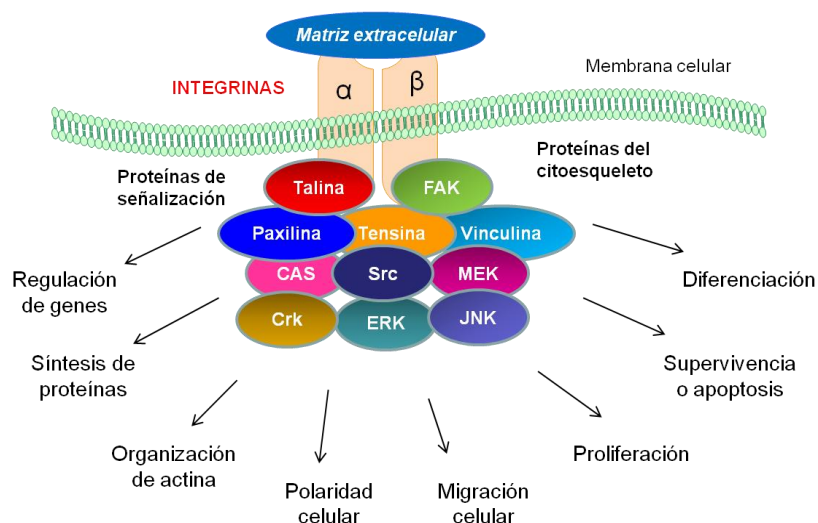


Figura 7. Vías de señalización reguladas por la adhesión célula-matriz. Las adhesiones contienen agrupamientos de integrinas que reclutan proteínas citoplasmáticas que cooperan en el control de diversos procesos celulares, funciones y fenotipos.

Adhesiones focales

Las adhesiones focales son estructuras celulares alargadas, organizadas y complejas que se localizan al final de las fibras de estrés y que median las interacciones con la ECM (Horwitz y Parsons 1999; Parsons *et al.*, 2010; Smilenov *et al.*, 1999). El evento de iniciación de estas estructuras se caracteriza por la adhesión de la célula a ligandos específicos de la ECM a través de receptores integrina transmembranales. Esta interfase adhesiva madura mediante el reclutamiento de integrinas adicionales y componentes del citoesqueleto. La propagación de señales involucra la interacción y agregación de más de 50 proteínas y sus cascadas efectoras (Romer *et al.*, 2006). Las estructuras adhesivas iniciales designadas complejos focales contienen las proteínas FAK (*focal adhesion kinase*) y paxilina que son inducidas por los miembros de la familia Rho, Rac y cdc42. La maduración de los complejos focales a adhesiones focales depende de las interacciones con el citoesqueleto de actina y de la tensión actomiosina modulada por Rho (Romer *et al.*, 2006).

Las integrinas se unen a ligandos específicos de la ECM tras la adhesión celular. La ECM está compuesta de proteínas colagenosas y no colágenosas como elastina, fibronectina, laminina o entactina (Kolacna *et al.*, 2007). Todas estas glicoproteínas son ligandos de las integrinas $\beta 1$ y cabe destacar que la fibronectina es uno de los ligandos de las integrinas $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$. Las integrinas promueven tanto la señalización *outside-in* tras la adhesión celular, transmitiendo señales hacia el interior celular, como la señalización *inside-out* que conduce a cambios en sus funciones, afinidad y avidéz (Kim *et al.*, 2003; Kinashi 2005; Schwartz y Assoian 2001; Zhu X. y Assoian 1995).

En la señalización *outside-in* mediada por las integrinas $\beta 1$ participan moléculas con las que integrina $\beta 1$ se asocia, bien directamente a través de su dominio citoplásmico, como talina, o bien indirectamente, como vinculina, paxilina y α -actinina, las cuales se asocian a su vez al citoesqueleto de actina (Hynes 2002). Además, la quinasa FAK, una molécula fundamental en la señalización *outside-in* generada tras la adhesión celular dependiente de integrinas, se asocia indirectamente con estas integrinas. La asociación entre este conjunto de proteínas y las subunidades $\beta 1$ en la membrana plasmática permite el ensamblaje de las integrinas con filamentos de actina (Cabodi *et al.*, 2004; Giancotti y Ruoslahti 1999; Saegusa *et al.*, 2009; Schwartz y Assoian 2001).

Proteínas de las adhesiones focales

Las adhesiones focales están constituidas por proteínas sin actividad enzimática, como vinculina, α -actinina y paxilina que funcionan como proteínas adaptadoras interaccionando con proteínas estructurales y tirosina-quinasa. Adicionalmente, contienen una gran diversidad de proteínas enzimáticamente activas. FAK y Src presentan mecanismos de regulación cruciales en la señalización de las adhesiones focales. Tras la adhesión celular mediada por integrinas, FAK es reclutado a las adhesiones focales gracias a su interacción con talina. Así, FAK y Src son activadas por autofosforilación en residuos de tirosina específicos dependiente de la localización de las adhesiones focales y de las asociaciones intermoleculares. La autoactivación de FAK recluta a Src a través de la unión a su dominio SH2, produciéndose un incremento de la actividad de Src sobre FAK (Mitra S. K. *et al.*, 2005; Provenzano *et al.*, 2009; Zhao y Guan 2009). A continuación, Src fosforila residuos específicos de FAK permitiendo a este último interaccionar con p130Cas a través de su dominio SH3 y/o con paxilina (Figura 8). Tras la interacción de FAK con paxilina, los residuos Y31 e Y118 de esta última son fosforilados por el complejo FAK-Src (Mitra S. K. *et al.*, 2005; Schlaepfer y Mitra 2004; Webb *et al.*, 2004). Paxilina integra diversas proteínas incluyendo tirosinas quinasa y reguladores de la familia Rho. La activación de paxilina por el complejo FAK-Src regula el reclutamiento de moléculas efectoras como Crk, importantes para la transducción de señales externas resultantes de alteraciones de la movilidad celular y para la modulación de la expresión de genes a través de las cascadas de MAPK (JNK, p38, ERK) (Turner 2000). FAK también puede impulsar la movilidad mediante la activación y formación de complejos de señalización regulados por p130Cas, Grb2, SOS, Crk, C3G y MAPK incluyendo JNK, ERK. (Figura 8) (Romer *et al.*, 2006). La activación de JNK mediada por la vía p130Cas/Crk/DOCK180/Rac induce la expresión de MMP (*matrix metalloproteinases*) y la invasión celular (McLean *et al.*, 2005).

Todos estos datos indican que paxilina, FAK y p130Cas desempeñan funciones esenciales en la formación y regulación de las adhesiones focales. Paxilina y sus modificaciones, como la fosforilación en tirosinas, parecen ser cruciales en la regulación de la formación de las adhesiones focales, así como en la transducción de señales mediadas por integrinas (Brown y Turner 2004). En humanos se han identificado 4 isoformas de paxilina resultantes de *splicing* alternativo, α , β , γ y δ que

parecen tener funciones fisiológicas distintas en los complejos de las adhesiones focales. La isoforma α se expresa tanto en tejidos normales como en células tumorales, mientras que las isoformas β y γ solo se expresan en células tumorales (Mazaki *et al.*, 1997; Mazaki *et al.*, 1998).

FAK es una tirosina-quinasa no receptor que actúa como regulador primario de la señalización de la adhesión focal regulando la proliferación, supervivencia y migración celular (Provenzano y Keely 2009). FAK tiene un papel crítico en la mediación del comportamiento celular dependiente de la ECM. La adhesión celular provoca la fosforilación de FAK, en asociación con la formación de contactos focales (Parsons 2003). FAK ha sido relacionado con el cáncer y la invasión tumoral (Avizienyte y Frame 2005; Hsia *et al.*, 2003; Luo y Guan 2009; Provenzano y Keely 2009).

La proteína adaptadora p130Cas es el principal sustrato de Src involucrado en la señalización de integrinas. La fosforilación en tirosinas de p130Cas en las adhesiones focales se ha asociado a la activación de la migración celular, invasión, proliferación y supervivencia. p130Cas es un componente de las adhesiones focales durante las etapas de ensamblaje y desensamblaje, aunque resida temporalmente en las adhesiones focales con una alta fracción móvil (Donato *et al.*, 2010).

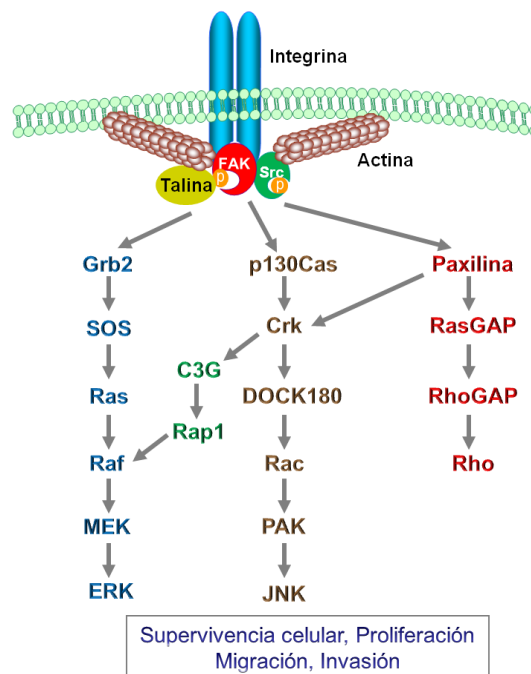


Figura 8. Vías de señalización resultantes de la adhesión celular mediada por integrinas. Tras la interacción con talina, FAK es fosforilado por Src, permitiendo la interacción de FAK con diferentes proteínas como paxilina, p130Cas, Grb2, SOS, Crk, C3G los cuales activan las rutas de ERK, JNK y Rho (adaptado de Guan 2010).

Adhesión celular y LMC

En células de LMC, la proteína oncogénica Bcr-Abl se une a paxilina, que probablemente usa como sustrato o sitio de acoplamiento para perturbar, o incluso inhibir, la adhesión normal (Turner 2000). Bcr-Abl fosforila un gran número de proteínas asociadas a actina y adhesiones focales como tensina, talina, FAK, vinculina y paxilina. Se ha descrito que paxilina además de ser fosforilada también es degradada en células que expresan Bcr-Abl. En células NIH3T3 transformadas con Bcr-Abl, se ha observado la acumulación de varias formas de paxilina de menor peso molecular (46 y 33 kDa) que también se encuentran fosforiladas en residuos de tirosina (Salgia *et al.*, 1997). Estas formas de menor peso molecular son posiblemente proteínas de señalización ya que se ha visto que la proteína adaptadora CrkL (Salgia *et al.*, 1995c) y la protooncoproteína Cbl (Salgia *et al.*, 1996a; Salgia *et al.*, 1995c) forman complejo con las mismas, en mayor medida que con la isoforma p68 (silvestre) de paxilina. De hecho, se ha observado un incremento de la fosforilación de residuos de tirosina de las formas p46 y p33 en células hematopoyéticas de LMC (Salgia *et al.*, 1995c).

La expresión de FAK parece ser importante para la regulación de la adhesión y proliferación de las células LMC. Se ha descrito que IFN- α es capaz de reparar el defecto de la vía de la integrina $\beta 1$ a través de la restauración del contenido celular de FAK en células de LMC (Chang *et al.*, 2003). Otros estudios demostraron que IFN- $\alpha 2b$ es capaz de inhibir la proliferación mediante la restauración de la función de $\alpha 5\beta 1$, incrementando la capacidad de unión de la integrina a fibronectina y regulando el aumento de la expresión génica de FAK en células de LMC (Niu *et al.*, 2006).

Las células de LMC expresan integrinas $\beta 1$ como $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha 4\beta 1$ (Lundell *et al.*, 1997; Schofield *et al.*, 1999). Se ha demostrado que las vías de señalización mediadas por integrinas utilizan proteínas quinasas y de adhesión focal similares a las vías mediadas por Bcr-Abl (Lewis y Schwartz 1998; Lewis *et al.*, 1996). Existen datos que indican que las proteínas involucradas en adhesión celular como FAK, p130Cas, paxilina, y también PI3K son activadas por integrinas $\beta 1$ y Bcr-Abl de forma independiente (King *et al.*, 1997; Salgia *et al.*, 1995a; Schlaepfer *et al.*, 1997).

Bcr-Abl desregula la función de la integrina $\beta 1$, lo que resulta en la disminución de adhesión y aumento de la movilidad de las células de LMC (Bhatia *et al.*, 1996; Salesse y Verfaillie 2002; Skorski *et al.*, 1998; Verfaillie *et al.*, 1992). Aunque Bcr-Abl no altera los niveles de integrina $\beta 1$ en la membrana (Bazzoni *et al.*, 1996; Verfaillie *et*

al., 1992; Wertheim *et al.*, 2002b) induce interacciones anormales entre la integrina $\beta 1$ y el citoesqueleto de actina (Bhatia *et al.*, 1996). A diferencia de c-Abl, que se encuentra fundamentalmente en el núcleo, Bcr-Abl está primariamente (al menos un 70% de la proteína) en el citoplasma estrechamente asociada con F-actina a través del dominio carboxilo-terminal de unión a actina (Figura 3) (McWhirter y Wang 1991; Van Etten *et al.*, 1994; Verfaillie *et al.*, 1992). La localización de Bcr-Abl en el citoesqueleto de actina ha sido señalada como la responsable de la adhesión anormal a fibronectina (Wertheim *et al.*, 2003). Se ha descrito que las células de LMC tienen disminuida la capacidad de adherirse a las capas del estroma (Gordon *et al.*, 1987), y a la fibronectina y sus fragmentos proteolizados, debido a alteraciones en la función de la integrina $\beta 1$. Por otra parte, la adhesión al colágeno tipo IV y a la laminina está aumentada en las células de LMC (Verfaillie *et al.*, 1992). Sin embargo, este tema es más complejo debido a que otros estudios muestran que la adhesión a fibronectina a tiempos cortos (30 minutos) se ve incrementada por Bcr-Abl, mientras que la adhesión a tiempos más largos se ve disminuida (Bazzoni *et al.*, 1996).

Rap1, una GTPasa de la familia Ras con funciones en adhesión

Rap1 es un miembro de la familia de GTPasas Ras. La subfamilia Rap está compuesta por las proteínas Rap1a, Rap1b, Rap2a y Rap2b. Rap1 fue inicialmente identificada en fibroblastos como un posible supresor oncogénico capaz de revertir la morfología de células transformadas por K-Ras (Bos 1997; Bos 1998; Raaijmakers y Bos 2009; Zwartkruis y Bos 1999).

Rap1 es regulada por un gran número de estímulos que incluyen factores de crecimiento y citoquinas, pero también por fuerza mecánica y estrés osmótico (Frische y Zwartkruis 2010). La regulación de Rap1 es llevada a cabo por proteínas GEF que estimulan la sustitución de GDP por GTP y su consiguiente activación. Los GEF de Rap se agrupan en varias familias, dependiendo de sus dominios funcionales, reflejo de sus diferentes señales activadoras: C3G, PDZ-GEF1/2 (o RA-GEF1/2), EPAC1/2 (o cAMP-GEFI/II), CalDAG-GEFI/III (o Ras-GRP2/3), MR-GEF (o Repac), Dock-4, AND-34 y PLC ϵ (revisado por Stork y Dillon 2005), algunas de las cuales están representadas en la Figura 9. La inactivación de las proteínas Rap es llevada a cabo por GAPs que tienen

como función interrumpir la señalización de Rap1, hidrolizando el GTP en GDP. Los principales RapGAP son Rap1GAP1 y SPA-1 (revisado por Kooistra *et al.*, 2007; Stork y Dillon 2005), representados en la Figura 9. Tras la activación, Rap1 sufre un cambio conformacional que expone el sitio de unión a efectores permitiendo su reclutamiento. Este reclutamiento desencadena la activación de una variedad de vías de señalización, entre las que destacan la señalización de integrinas y la activación de ERK (Stork 2003). Rap1-GTP se asocia con potenciales efectores, tales como RapL y RIAM (*Rap1-GTP-interacting adaptor molecule*) que median la adhesión mediada por integrinas en células hematopoyéticas. B-Raf y Raf-1 son reclutados por Rap1-GTP a través del dominio de unión a Ras (RBD). En células que expresan B-Raf, como en células hematopoyéticas, Rap1 activa la señalización de ERK dependiente de B-Raf. Sin embargo, en células que no expresan B-Raf, como células T, Rap1 se une a Raf-1 antagonizando la señalización de ERK dependiente de Ras (Kooistra *et al.*, 2007) (Figura 9).

Entre las funciones reguladas por Rap1 se incluyen la proliferación, diferenciación y adhesión celular. En estudios realizados con ratones deficientes para Rap1a se ha visto que esta GTPasa es importante para la viabilidad embrionaria (Li Y. *et al.*, 2007b). Rap1 tiene una función en la regulación de las señales dependientes de integrinas. Las acciones de Rap1 para promover la función de las integrinas están potenciadas por la consecuente activación de Rap1 por parte de las integrinas, sugiriendo un mecanismo de *feedback* positivo (Bos *et al.*, 2001; Li L. *et al.*, 2002).

Además de su papel regulador de la adhesión, Rap1 regula vías de señalización, implicadas en proliferación y diferenciación, a través de la activación de las cascadas MAPK. En células megacariocíticas Rap1 induce la activación sostenida de ERK a través de B-Raf, necesaria para la diferenciación megacariocítica mediada por trombopoyetina (García J. *et al.*, 2001). En determinados tumores Rap1, mediante la regulación sobre ERK1/2, parece controlar la proliferación celular, por ejemplo la depleción de RapGAP en células de melanoma incrementa la actividad de ERK1/2, lo que resulta en el crecimiento del tumor (Zheng *et al.*, 2009). Otros autores, describen que la inhibición de ERK por cAMP requiere Rap1 (Schmitt y Stork 2001).

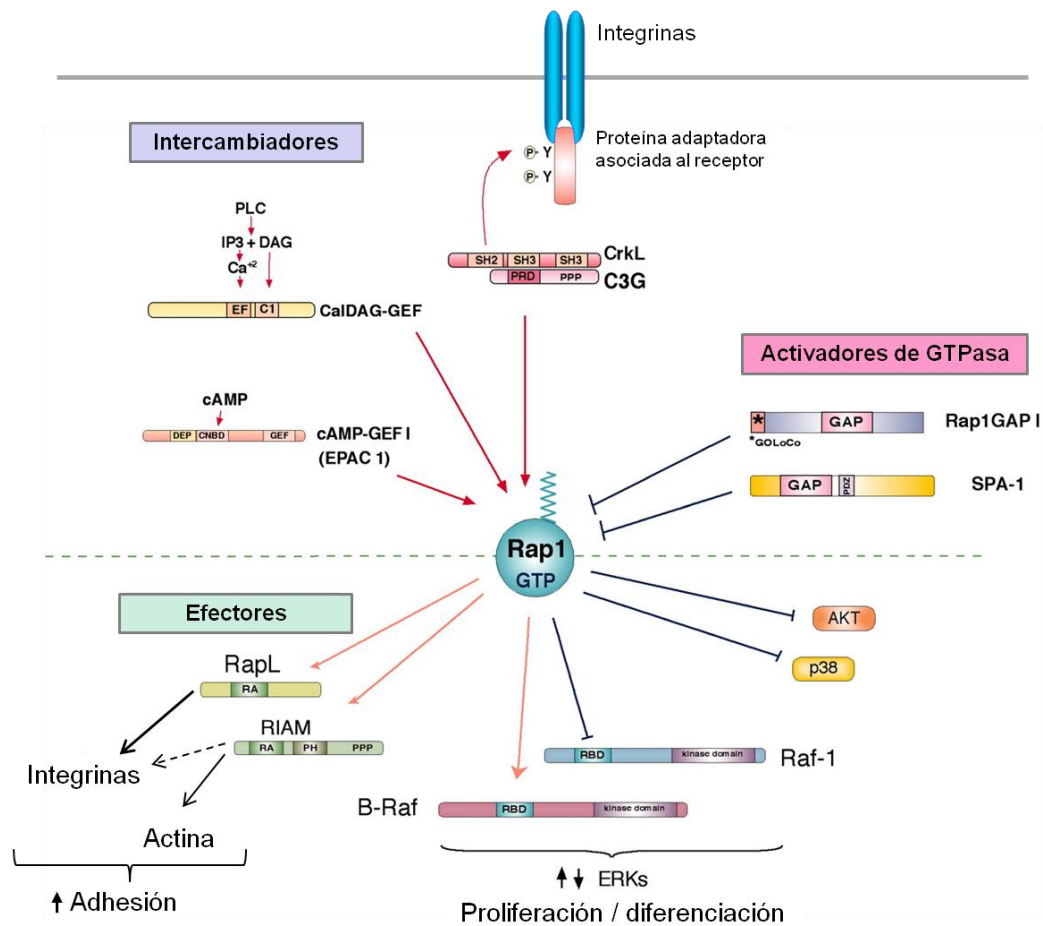


Figura 9. Regulación y activación de proteínas efectoras de Rap1. Rap1 es activado por GEFs específicos (C3G, CalDAG-GEFs y cAMP-GEFs) e inhibido por GTPasas específicas (Rap1GAP1 y SPA-1) para la regulación de su unión a potenciales proteínas efectoras (Kooistra *et al.*, 2007). Tomado de Stork y Dillon, 2005.

Rap1 también ha sido implicado en leucemias. En la línea celular hematopoyética TonB210, que expresa Bcr-Abl, Rap1 es activado por Bcr-Abl de manera dependiente de su actividad quinasa, lo que resulta en la activación de B-Raf y ERK. En células mieloides progenitoras SPA-1^{-/-} el nivel basal de la actividad de Rap1 está incrementado. Células pre-leucémicas muestran aumento de la activación basal de Rap1 y activación constitutiva de ERK. Esto sugiere que el incremento de la actividad de Rap1 contribuye directamente a la activación de ERK y a la expansión de las células progenitoras hematopoyéticas (Ishida *et al.*, 2003; Mizuchi *et al.*, 2005; Stork y Dillon 2005). El mecanismo por el cual Bcr-Abl activa a Rap1 es controversial. Se ha demostrado una unión directa de CrkL (la principal molécula adaptadora de C3G) a Bcr-Abl (Uemura *et al.*, 1997), sin embargo algunos estudios han puesto de manifiesto una disrupción del complejo CrkL/C3G en células que expresan Bcr-Abl (de Jong *et al.*, 1997b; revisado por Stork y Dillon 2005). Por otra parte, nuestro grupo demostró que en

células de LMC, K562 y en células hematopoyéticas de ratón BaF3, que expresan Bcr-Abl, la interacción C3G/CrkL incrementa con la inhibición de Bcr-Abl lo que resulta en el aumento de la activación de Rap1 (Gutierrez-Berzal *et al.*, 2006). Rap1 también es necesario para la adhesión inducida por las citoquinas G-CSF, IL-3 y EPO, y mediada por la integrina $\beta 1$, en la línea celular pro-mielocítica 32D (revisado por Stork y Dillon 2005). Finalmente, recientemente, en colaboración con el grupo de la Dra. Porras hemos demostrado que Rap1 regula positivamente a p38 α MAPK en MEFs (fibroblastos embrionarios de ratón) sometidos a estrés (Gutierrez-Uzquiza *et al.*, 2009).

C3G, un GEF de Rap

C3G (*Crk-SH3-domain-binding guanine nucleotide-releasing factor*) es una proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina o GEF de dos miembros de la familia de proteínas Ras: Rap1/2 y R-Ras (Gotoh *et al.*, 1995). Además, C3G puede activar otras proteínas de la superfamilia Ras, incluyendo TC21 y la proteína relacionada con Cdc42, TC10 (Ehrhardt *et al.*, 2002). Tiene como nombres alternativos RapGEF1, GRF2 y DKFZp781P1719. Aunque C3G se expresa ubicuamente, se han visto algunas diferencias en sus niveles de expresión específicas de tejido. En humanos, tejidos como placenta, corazón, músculo esquelético y cerebro fetal muestran un mayor grado de expresión de C3G en comparación con otros tejidos como hígado (Tanaka *et al.*, 1994). C3G es activado a través de su asociación con CrkL formando un complejo que se une a sitios de fosforilación de tirosina de receptores tirosina quinasa (Ichiba *et al.*, 1997).

La proteína C3G fue el primer GEF de Rap identificado (Gotoh *et al.*, 1995), originalmente aislado como una molécula de interacción con Crk (homólogo celular de la oncoproteína v-Crk) (Knudsen *et al.*, 1994; Matsuda *et al.*, 1992; Tanaka *et al.*, 1994). La secuencia nucleotídica de C3G presenta un marco de lectura abierto (ORF) de 3231 pares de bases que codifican una proteína de 1077 residuos. El gen humano comprende 24 exones, que abarcan 163 kilobases en el cromosoma 9q34.3 (Takai *et al.*, 1994). En humanos existen predominantemente 2 isoformas, que se forman por procesamiento alternativo y difieren en su región amino-terminal (revisado por Radha *et al.*, 2011). La Figura 10 representa la estructura proteica de C3G, la cual se organiza en diferentes dominios funcionales. C3G posee un dominio catalítico en el extremo

carboxilo responsable, junto con el dominio REM (*Ras-Exchange-Motif*), del intercambio de nucleótidos de guanina (Boguski y McCormick 1993; Rebhun *et al.*, 2000). En la región central C3G posee cuatro regiones ricas en prolina, que contienen la secuencia consenso PXXP, a través de las cuales interacciona con proteínas que contienen dominios SH3, por lo que esta región recibe el nombre de dominio SH3-binding (Knudsen *et al.*, 1994; Lim y Richards 1994). Las moléculas Crk (Knudsen *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 1994), Hck (Shivakrupa *et al.*, 2003) y c-Abl (Radha *et al.*, 2007) interaccionan directamente con el dominio SH3-binding de C3G. C3G posee una quinta región rica en prolina en posición amino del dominio SH3-b que interacciona con p130Cas (Kirsch *et al.*, 1998). El extremo más amino-terminal, concretamente los residuos 144 a 230 son responsables de la interacción con E-cadherina (Hogan *et al.*, 2004). Se ha detectado que esta región funciona como elemento regulador negativo de la actividad catalítica de C3G. El efecto negativo se elimina cuando C3G es fosforilado en la tirosina 504 y tras la unión de p130Cas a las prolina 267 y 270 (Ichiba *et al.*, 1999).

Recientemente, se ha descrito una isoforma de 87 kDa de C3G, denominada p87C3G (Gutierrez-Berzal *et al.*, 2006), que carece de los primeros 305 aminoácidos de la proteína. Esta región comprende el dominio de unión a E-cadherina, el sitio de unión a p130Cas y la primera región de poliprolinas (Figura 10). La expresión de esta isoforma está incrementada en líneas celulares que expresan Bcr-Abl y en pacientes de LMC al tiempo del diagnóstico y su expresión disminuye tras el tratamiento con *Imatinib* (Gutierrez-Berzal *et al.*, 2006).

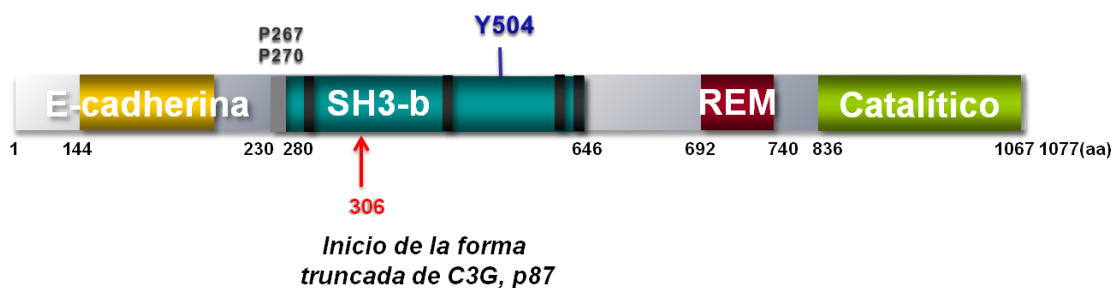


Figura 10. Representación de la organización de los dominios de C3G. El dominio catalítico, que se encuentra en la región C-terminal, es responsable, junto con el dominio REM de la función intercambiadora de nucleótidos de guanina. La región central está compuesta por el dominio SH3-binding que contiene 4 secuencias ricas en prolina que se une a los dominios SH3 de Crk, c-Abl y Hck, así como por otra zona rica en prolina adicional en posición amino del dominio SH3-b, que se une a p130Cas. La región N-terminal contiene el dominio de unión a E-cadherina. C3G se activa con la fosforilación de su residuo Y504. También se indica el residuo de inicio de la isoforma p87C3G.

Interacciones proteicas de C3G

Los dominios SH3 son dominios de interacción proteína-proteína que median la formación de complejos proteicos específicos y contribuyen a la transmisión de señales extracelulares, típicamente a través de la unión a secuencias ricas en prolinas (Birge *et al.*, 2009). Hasta la fecha se sabe que C3G interactúa directamente con las proteínas portadoras de dominios SH3, Crk, Abl, Hck y p130Cas. En particular, Crk y C3G están asociadas constitutivamente formando complejos Crk-C3G, necesarios para la posterior activación de Rap1 (He *et al.*, 2011; Nolz *et al.*, 2008). Existen otras proteínas, como Cbl y paxilina, que aunque no interactúan de forma directa forman parte de complejos proteicos donde también se localiza C3G, mientras que otras participan en los mismos procesos celulares que C3G, como Abi1/2 que está involucrada en adhesión (Li Y. *et al.*, 2007a).

Proteínas Crk

Las proteínas Crk son proteínas adaptadoras que poseen dominios SH2 y SH3 representados en la Figura 11, a través de los cuales interactúan con otras proteínas como p130Cas, paxilina, y Gab1, vía el dominio SH2, o Bcr-Abl, DOCK180, Abl (Salgia *et al.*, 1996b), Sos y C3G a través del SH3 (Alsayed *et al.*, 2000). Con Cbl interactúa con ambos dominios (Keane *et al.*, 1999). La familia de Crk incluye cuatro miembros afines en estructura y funcionalidad: v-Crk, CrkI, CrkII y CrkL. CrkL es uno de los principales sustratos de Bcr-Abl y se encuentra constitutivamente fosforilado en residuos de tirosina en pacientes con LMC, siendo la fosfoproteína más abundante en sangre periférica de los pacientes (de Jong *et al.*, 1997a; Senechal *et al.*, 1996). Se une a Bcr-Abl a través del dominio SH3 amino-terminal y se sabe que interactúa con varias proteínas que han sido implicadas en la señalización de integrinas, como Cbl, Cas, Hef-1 y paxilina (Uemura *et al.*, 1999).



Figura 11. Estructura de los dominios de CrkL que contiene dominios SH3 y un dominio SH2 que posee el motivo canónico del dominio SH3-b.

La formación del complejo Crk-C3G se regula por la fosforilación del residuo Y221 del dominio SH3 carboxilo de Crk, que induce la disociación de C3G. Esta fosforilación es llevada a cabo por quinasas como Abl al unirse al dominio SH2 de Crk (Feller *et al.*, 1994; Okada *et al.*, 1998). La unión de los complejos Crk-C3G a receptores activados y sus sustratos conduce a la redistribución de C3G en la célula, presumiblemente a zonas donde se encuentra su efector Rap1 (revisado por Feller 2001). La fosforilación de C3G en la tirosina 504 modifica la actividad de C3G, pero no su interacción con Crk (Ichiba *et al.*, 1999).

Los complejos C3G-Crk y C3G-CrkL están presentes en muchos tipos de células y se sabe que se forman en respuesta a la estimulación con insulina, a la activación de integrinas y en respuesta a otros estímulos como EGF, eritropoyetina, interleucina-3 y la adhesión de neuronas regulada por la tirosina quinasa Lyn (Buensuceso y O'Toole 2000; revisado por Feller 2001; He *et al.*, 2011; Nosaka *et al.*, 1999; Okada y Pessin 1997; Okada *et al.*, 1998). En células hematopoyéticas la sobre-expresión de CrkL incrementa la adhesión a las proteínas de la ECM a través de integrinas $\beta 1$ (Uemura *et al.*, 1999).

Familia p130Cas

En esta familia se incluyen p130Cas, la proteína homóloga Hef1/Cas-L y Efs/Sin (Feller 2001). Al igual que las proteínas de la familia Crk, las proteínas p130Cas son proteínas adaptadoras con múltiples secuencias y dominios que les permite interactuar con otras proteínas (Figura 12). Presentan en su región amino-terminal un dominio SH3 único al que se une directamente C3G, concretamente a una región comprendida entre los aminoácidos 247-280 de C3G, anterior al dominio SH3-binding (Kirsch *et al.*, 1998). También posee varias tirosinas fosforilables concentradas en una región, que se disponen siguiendo la secuencia YXXP, reconocible por dominios SH2. Además recluta proteínas tirosina-quinasa de las familias FAK y Src, tirosina-fosfatasa como PTP1B y forma complejo con Crk, estando implicados los complejos Crk-p130Cas en la regulación del citoesqueleto de actina (revisado por Birge *et al.*, 2009; Bouton *et al.*, 2001). El reclutamiento de C3G a la membrana plasmática permite su unión con p130Cas, incrementando en estas zonas la asociación de Rap1-GTP a las integrinas tipo $\beta 1$, lo que conduce a un aumento de la afinidad de éstas por la ECM (revisado por Birge *et al.*, 2009). Es probable que la activación de C3G coincida con su unión a p130Cas y

con la activación, inducida por Src, en respuesta a la adhesión celular a la ECM o la estimulación por citoquinas o por mecanotransducción (Ichiba *et al.*, 1999).



Figura 12. Estructura de p130Cas. Destaca un dominio SH3, dominios ricos en prolina P1 y P2 y un dominio de unión a dominios SH2 que tiene como secuencia consenso YxxP. Y: tirosinas, P: prolina.

Se ha descrito que en células de LMC, K562, p130Cas no está fosforilado en las tirosinas o unido a Crk, encontrándose Crk predominantemente asociado al protooncogén Cbl a través del dominio SH2 de Crk (Ribon *et al.*, 1996). De forma divergente, Salgia y colaboradores describen que en células hematopoyéticas que contienen Bcr-Abl y en pacientes de LMC, p130Cas se encuentra fosforilado en tirosinas y asociado a Bcr-Abl a través del dominio SH2 de CrkL. Tanto en células normales como en células que expresan Bcr-Abl, p130Cas se encuentra en las adhesiones focales asociada con FAK y paxilina (Salgia *et al.*, 1996b).

Cbl

Las proteínas Cbl controlan múltiples procesos celulares actuando como ligasas de ubiquitina y como moléculas adaptadoras multifuncionales. Están involucradas en el control de la proliferación y diferenciación celular, y morfología de la célula (revisado por Rao *et al.*, 2002). Las proteínas Cbl de 120 kDa se unen al dominio SH2 de Crk/CrkL a través de residuos de tirosina fosforilados, formando complejos que se pueden encontrar de forma constitutiva o inducible dependiendo del tipo celular. También contienen dominios ricos en prolina que se unen a dominios SH3 (Figura 13) (Feller 2001) y se ha descrito que puede interactuar con el dominio SH3 de Crk (Keane *et al.*, 1999).



Figura 13. Estructura de los dominios de Cbl. Contiene dominios ricos en prolina (SH3-b) y un dominio de tirosinas fosforilables (700-774) de unión al dominio SH2 de CrkL. Y: tirosinas, P: prolina.

Se ha encontrado una relación funcional entre Cbl y C3G en diferentes sistemas celulares. En células T Cbl^{-/-} la interacción entre CrkL y C3G, así como la activación de Rap1 están incrementadas, lo que conlleva a un aumento de adhesión (Uemura y Griffin 1999; Zhang *et al.*, 2003). En células T activadas, C3G interacciona con Cbl y este último con el dominio SH2 de Crk (Reedquist *et al.*, 1996). Por otra parte, Cbl se une al dominio SH2 de Bcr-Abl a la vez que puede unirse al dominio SH3 o SH2 de Grb2 (Bhat *et al.*, 1997; Fukazawa *et al.*, 1995; Meisner *et al.*, 1995; Park *et al.*, 1998). En células 32Dcl3 la interacción de Cbl con Bcr-Abl puede ser directa, a través de residuos de tirosina fosforilados que se unen al dominio SH2 de Bcr-Abl. Dicha unión puede ser también indirecta a través de CrkL que se une directamente al dominio rico en prolina de Bcr-Abl a través de su dominio SH3 (Bhat *et al.*, 1997). De hecho, Bcr-Abl puede inducir la fosforilación en tirosinas de Cbl y la formación de un complejo multiproteico que contiene Bcr-Abl, Cbl, CrkL y PI3K (revisado por Dikic *et al.*, 2003; Ribon *et al.*, 1996; Sattler *et al.*, 1996).

Abi1/2

Las proteínas Abi (*Abelson interacting protein*) de mamíferos están representadas por tres miembros, Abi1 (también conocido como e3b1), Abi2 y NESH (Biesova *et al.*, 1997; Dai y Pendergast 1995; Miyazaki *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 1995; Ziemnicka-Kotula *et al.*, 1998). Abi1 y Abi2 fueron inicialmente identificadas como moléculas de unión a c-Abl, v-Abl y Bcr-Abl (Dai y Pendergast 1995; Shi *et al.*, 1995). La región amino-terminal de Abi1 contiene un 23% de serina-treoninas, la región central está constituida por varias extensiones de poliprolina y la región carboxilo-terminal consiste en un dominio SH3 (Figura 14). La región de poliprolinas incluye varias copias del motivo consenso PXXP de los sitios de unión a SH3, sugiriendo que puede unirse, a través de dominios SH3, tanto a sí misma como a c-Abl o otras proteínas (Dai y Pendergast 1995).

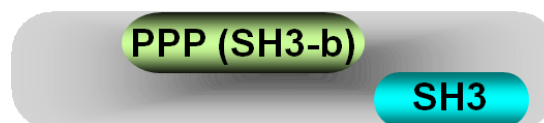


Figura 14. Estructura de los dominios de Abi1/2. Contiene una región central rica en prolina (SH3-b) y un dominio SH3 a través de los cuales se une a c-Abl. P: prolina.

Hasta la fecha se sabe que los dominio SH3 y las secuencias carboxilo-terminal ricas en prolinas de Abi1/2 son necesarias para la interacción específica con Abl (Dai y Pendergast 1995; Dai *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 1995). La unión de Abi1 al dominio SH3 de Abl bloquea la transformación oncogénica inducida por v-Abl, lo que indica un papel negativo en la función quinasa de Abl o en la selección de sus dianas. Por otra parte, la unión del dominio SH3 de Abi1 con las secuencias ricas en prolinas de Abl, activa la capacidad de transformación de Abl (Dai y Pendergast 1995; Shi *et al.*, 1995) Estos datos indican que Abi1/2 juega un papel dual como regulador y potencial efector de Abl.

Posteriormente se describió que Abi1/2 parece tener un papel en la señalización de la adhesión y proliferación celular. En líneas celulares hematopoyéticas, la expresión de Bcr-Abl induce la fosforilación en tirosinas de Abi1 y el transporte del complejo Abi1/WAVE2 a un sitio adyacente a la membrana donde se reúne con paxilina, vinculina y integrina β . Asimismo, la disrupción de la interacción entre Bcr-Abl y Abi a través de mutaciones en Bcr-Abl o Abi, provoca la inhibición de la reorganización del citoesqueleto de actina y la adhesión celular a fibronectina (Li Y. *et al.*, 2007a).

Paxilina

La paxilina es crucial en la regulación de la formación de las adhesiones focales y en la transducción de señales mediadas por integrinas. En su estructura proteica contiene una secuencia rica en prolinas que interacciona con el dominio SH3 de Src (Brown *et al.*, 1998; Ren R. *et al.*, 1993; Turner *et al.*, 1999). Cuando se encuentra fosforilada por FAK y Src recluta moléculas efectoras como Crk, la principal proteína de unión a C3G. Hasta la fecha se sabe que C3G es necesario para la formación y estabilización de focos de adhesión formados por integrina β 1 y paxilina (Voss *et al.*, 2003). Paxilina, de forma similar a C3G, interacciona con el oncogén Bcr-Abl, lo que perturba la adhesión y proliferación celular normal (Turner 2000). Además, paxilina es un sustrato del oncogén Bcr-Abl en líneas celulares mieloides (Salgia *et al.*, 1995c). De hecho, se ha descrito que el dominio SH2 de CrkL interacciona con paxilina, sugiriendo que CrkL puede unir físicamente Bcr-Abl a paxilina (Salgia *et al.*, 1995b).

Funciones de C3G

C3G juega un papel crucial en varios procesos celulares los cuales están resumidos en la Figura 15. C3G es un gen esencial en el desarrollo embrionario del ratón (Ohba *et al.*, 2001) y participa en la adhesión celular mediada por integrinas a través de su interacción con Crk y p130Cas (Arai *et al.*, 1999; Kirsch *et al.*, 1998; Li L. *et al.*, 2002). También, está implicado en el establecimiento de las uniones adherentes dependientes de E-cadherina, concretamente C3G interviene en las etapas iniciales de la formación de la unión célula-célula, gracias a su interacción directa con E-cadherina (Balzac *et al.*, 2005; Hogan *et al.*, 2004). C3G, al igual que su efector Rap1, es capaz de inhibir la actividad transformante de varios oncogenes como ras, sis, v-raf 1, dbl y R-ras, a través de un mecanismo independiente del dominio GEF pero dependiente del dominio SH3-b (Guerrero *et al.*, 2004; Guerrero *et al.*, 1998). Este efecto supresor de C3G involucra la activación de fosfatasa de la familia PP2A que inhiben ERK, lo que resulta en la inhibición de la expresión de ciclina A y, consecuentemente, en la pérdida de la capacidad que tienen las células tumorales de vivir con independencia de anclaje al sustrato (Guerrero *et al.*, 2004; Martin-Encabo *et al.*, 2007). En esta línea, ratones deficientes en C3G muestran un incremento de la proliferación del neuroepitelio cortical, lo que indica que el tamaño de la población de precursores neuronales corticales está controlado por la inhibición de la vía de Ras mediada por C3G (Voss *et al.*, 2006). C3G tiene además un papel en la fijación y migración de las células neuronales corticales a través de la activación de Rap1 (Voss *et al.*, 2008). Por otra parte, estudios en células cotransfectadas demostraron que C3G colabora con Hck en la inducción de apoptosis y que al igual que su actividad supresora de la transformación, este efecto es independiente del dominio catalítico (Shivakrupa *et al.*, 2003). C3G es esencial para la maduración vascular (Voss *et al.*, 2003) y regula la maduración y expansión de los timocitos, mediante la activación de Rap1 (Nolz *et al.*, 2008). También, participa en el transporte de glucosa en adipocitos y células musculares a través de la activación de TC10, que es translocado a balsas lipídicas en la membrana plasmática junto con CrkII y Cbl (Chiang *et al.*, 2001). A continuación se describe con mayor detalle las funciones de C3G en la adhesión y apoptosis celular.

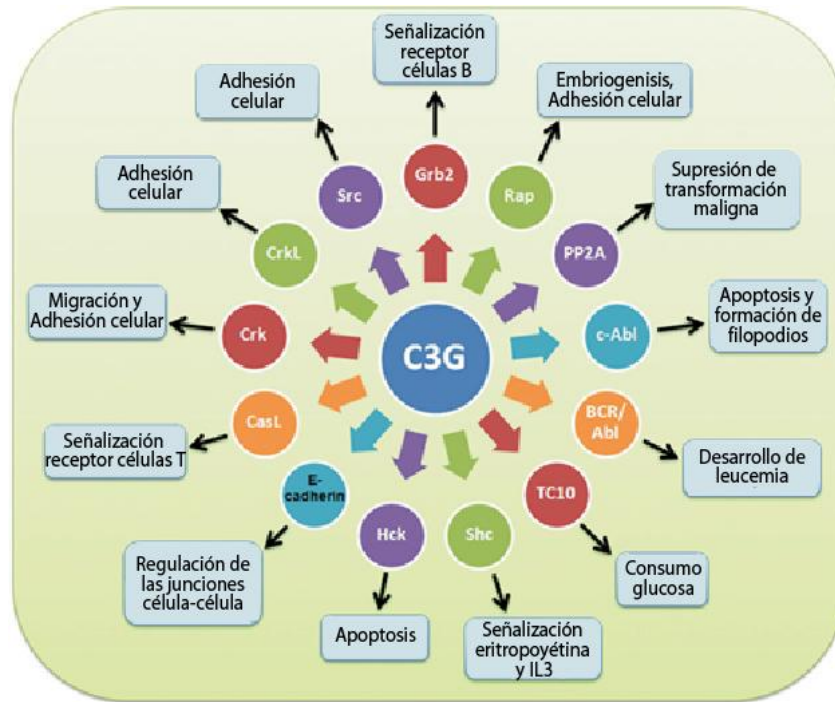


Figura 15. Proteínas que interaccionan con C3G y su implicación en las vías que llevan a funciones específicas. Estas proteínas interaccionan con el dominio rico en prolinas de C3G a través de dominios SH3 con la excepción de algunas como E-cadherina (Radha *et al.*, 2011).

C3G en adhesión y migración celular

A través de su efector Rap, C3G juega un papel muy importante en la señalización mediada por integrinas. MEFs *knock-out* para C3G, en los que se observa una deficiencia de la activación de Rap1, presentan una inhibición de la adhesión celular, desajustes en la expansión celular y aumento de la migración celular (Ohba *et al.*, 2001; Voss *et al.*, 2003). Se ha descrito que la fosforilación en tirosinas de C3G, como respuesta a la adhesión en células NIH3T3, aumenta su habilidad para asociarse con estructuras del citoesqueleto (de Jong *et al.*, 1998). Otros estudios han demostrado que la sobre-expresión de C3G resulta en la formación de filopodios en células epiteliales y en células transformadas con v-Abl, lo que indica que C3G está involucrado en vías de señalización que regulan la reorganización de actina (Lee H. *et al.*, 2008; Radha *et al.*, 2007).

En estudios anteriores se ha descrito la importancia de la interacción de C3G con Crk en la estimulación de adhesión. En células hematopoyéticas el complejo CrkL-C3G activa a las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$, posiblemente a través de la activación de Rap (Arai

et al., 1999; Buensuceso y O'Toole 2000). Por otra parte, la interacción entre C3G y CrkII parece controlar la migración celular (Valles *et al.*, 2004).

Estudios con los dominios SH2 y SH3 de p130Cas, identificaron la interacción directa de p130Cas con FAK y C3G respectivamente (Kirsch *et al.*, 1998). Otros estudios sugieren que la adhesión celular induce la activación de Rap1 a través de la regulación positiva de la vía de señalización p130Cas-Crk-C3G (Sakakibara *et al.*, 2002). Por otra parte, CrkL media la interacción entre Cbl y C3G incrementando la migración celular (Uemura y Griffin 1999).

C3G se localiza e interviene en las interacciones proteicas que se producen en las adhesiones focales (Feller 2001; Nievers *et al.*, 1997). Entre las proteínas que forman parte de los complejos proteicos de los focos de adhesión, se encuentran, además de C3G, paxilina, p130Cas, quinasas como FAK, Src, Abl, Syk/ZAP y Csk, proteínas de las rutas de Ras, PI3K, PKC, JNK y proteínas adaptadoras como Cbl, Crk, Nck, Grb-2 (Miranti y Brugge 2002). En fibroblastos, la quinasa Src es esencial para las adhesiones focales a través de la activación de C3G-Rap1 (Li L. *et al.*, 2002; revisado por Radha *et al.*, 2011).

C3G en apoptosis y supervivencia celular

Como ya se ha comentado, C3G colabora con la quinasa de células hematopoyéticas Hck en la inducción de apoptosis. Este efecto apoptótico es independiente de la fosforilación de la tirosina 504 y del dominio catalítico de C3G, pero requiere de la actividad catalítica de Hck. Esta vía apoptótica involucra las caspasas 1, 8 y 9 (Shivakrupa *et al.*, 2003). Por otra parte, C3G es un sustrato de c-Abl en la inducción de muerte celular por stress oxidativo. La apoptosis mediada por c-Abl requiere tanto de la actividad catalítica de C3G como de su fosforilación en la tirosina 504 (Mitra A. y Radha 2010). Sin embargo, en líneas celulares de neuroblastoma C3G induce supervivencia en respuesta a la retirada de suero (Radha *et al.*, 2008).

En colaboración con el grupo de la Dra. A. Porras hemos demostrado que C3G regula negativamente a p38 α MAPK, jugando un papel dual en la regulación de la muerte celular en MEFs, dependiendo del estímulo. Así, en células expuestas a la privación de suero, C3G induce supervivencia mediante la inhibición de la actividad pro-apoptótica de p38 α MAPK. Mientras que como respuesta al estrés oxidativo, C3G

se comporta como una proteína pro-apoptótica, a través de la regulación negativa sobre p38 α , la cual bajo estas condiciones funciona como anti-apoptótica (Gutierrez-Uzquiza *et al.*, 2009).

Cascadas de señalización reguladas por C3G

C3G actúa como GEF para Rap1 y R-Ras a través de su dominio catalítico (Gotoh *et al.*, 1997; Gotoh *et al.*, 1995), pero también ejerce funciones independientes de su actividad GEF, como su función supresora de la transformación inducida por varios oncogenes, la cual depende de su dominio rico en prolinas (Guerrero *et al.*, 2004; Guerrero *et al.*, 1998).

C3G ha sido implicado principalmente en dos rutas de transducción de señales, ERK1/2 y JNK, a través de su actividad sobre Rap1 y R-Ras respectivamente (Figura 16). Así, la activación de Rap1 por C3G induce la activación sostenida de ERK en células que expresan B-Raf, como neuronas y células hematopoyéticas (Eychene *et al.*, 1995; Kao *et al.*, 2001; Mizuchi *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2001; York *et al.*, 2000). C3G también activa a Ras en células hematopoyéticas estimuladas con eritropoyetina o interleucina-3 (Figura 16) (Nosaka *et al.*, 1999).

C3G, a través de R-Ras, activa la ruta de JNK en respuesta a citoquinas y señales de estrés y media la proliferación y la capacidad de crecer en ausencia de adhesión al sustrato (Tanaka *et al.*, 1997). Además, en respuesta a adhesión celular mediada por integrinas en fibroblastos, la asociación de p130Cas con C3G lleva a la localización de C3G cerca de Src y FAK en las adhesiones focales resultando en la activación de JNK (Figura 16) (Li L. *et al.*, 2002).

Además, se ha descubierto un posible papel de C3G en la activación de algunos miembros de la familia Rho, como Cdc42 y TC10 (Ehrhardt *et al.*, 2002). Finalmente, como ya se ha señalado, C3G participa en la ruta de señalización de p38 MAPK regulando apoptosis en distintos sistemas celulares (Gutierrez-Uzquiza *et al.*, 2009).

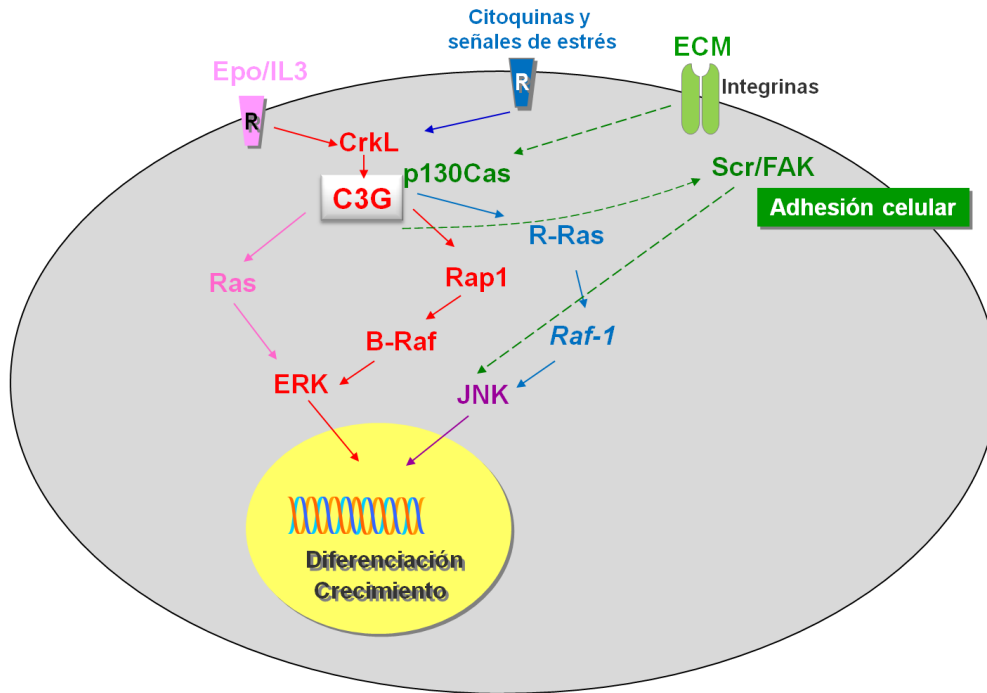


Figura 16. Representación de las vías de señalización reguladas por C3G en células hematopoyéticas. La activación de ERK está mediada por Ras/Raf y Rap1/B-Raf en células estimuladas con eritropoyetina (EPO) o interleucina-3 (IL3). La vía de JNK es activada por citoquinas y señales de estrés a través de R-Ras/Raf-1 y mediante adhesión celular que promueve la localización de C3G en las adhesiones focales.

p38 MAPKs

La subfamilia p38 MAPK pertenece a la familia de las MAPK y puede ser activada en respuesta a una gran variedad de estímulos de estrés (cambios en la osmolaridad, radiación UV, estrés oxidativo, etc) y citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α o IL1). No obstante, también pueden ser activadas por otros tipos de estímulos, incluidos numerosos factores de crecimiento. Regulan diversas funciones celulares como son la respuesta al estrés, apoptosis, proliferación, diferenciación, migración y otros procesos implicados en el desarrollo (revisado por Nebreda y Porras 2000; Ono y Han 2000). La familia de las p38 MAPKs está constituida por cuatro isoformas: p38 α , β , γ y δ , que comparten más de un 60% de homología (Goedert *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 1997; Li Z. *et al.*, 1996). La p38 α es la isoforma más ubicua y de mayor expresión y aunque la p38 β también se expresa en la mayoría de los tejidos, sus niveles suelen ser mucho menores que los de p38 α . Por el contrario, la p38 γ se expresa preferentemente en el musculo esquelético y la p38 δ en los pulmones, testículos, páncreas e intestino delgado (Cuenda y Rousseau 2007; Goedert *et al.*, 1997; revisado

por Nebreda y Porras 2000). Los niveles de activación de las cuatro isoformas varían en respuesta a diferentes estímulos, lo que sugiere que estas isoformas están específicamente reguladas a través de sus distintos activadores. Muchos de los datos disponibles sobre las p38 MAPK se han obtenido mediante el uso de inhibidores químicos de la p38 α y β , como el SB203580 y el SB202190. Estos inhibidores interaccionan con la tirosina 106 de la zona de unión al ATP, impidiendo su unión al ATP (Cuenda y Rousseau 2007).

Ratones deficientes en p38 α , mueren a mitad del desarrollo embrionario (Adams *et al.*, 2000; Mudgett *et al.*, 2000) mientras que los ratones deficientes en p38 β , p38 γ y p38 δ y doble para p38 γ /p38 δ (Beardmore *et al.*, 2005; Sabio *et al.*, 2005) son viables y fértiles (revisado por Aouadi *et al.*, 2006). Se ha descrito que p38 α se activa en procesos relacionados con la inflamación, como por ejemplo en la estimulación de macrófagos por endotoxinas bacterianas (lipopolisacárido o LPS) (Han *et al.*, 1994) y en la estimulación de células endoteliales con TNF- α (Modur *et al.*, 1996). p38 MAPK también puede ser activada por muchas otras señales como GM-CSF, FGF, eritropoyetina, IL-3, EGF, NGF o PDGF en distintos tipos celulares (revisado por Nebreda y Porras 2000; Ono y Han 2000). Así mismo, se activa por algunos agentes quimioterapéuticos como el cisplatino (Bragado *et al.*, 2007) y en respuesta a señales de estrés como la radiación UV o el estrés oxidativo (revisado por Ono y Han 2000). La activación de p38 no solo depende del estímulo, sino también del tipo celular. Las rutas de transducción de señales que regulan la(s) cascada(s) de las p38 MAPK son muy diversas, lo que explica en parte que p38 pueda ser activada por muchos estímulos. Las p38MAPK son activadas por MAPK quininas (MKK) que a su vez son activadas por MAPK quinasa quininas (MAP3K). Algunas GTPasas, como por ejemplo Rho, Rac y Cdc42 pueden regular la ruta de p38 (Figura 17) a través de la interacción con algunas MAP3K (MLK1, 2, 3) y/o con las PAK (*p21 Activated Kinases*) (Ono y Han 2000). En condiciones fisiológicas, la activación de las p38 MAPK suele ser transitoria y los niveles totales de proteína no cambian a lo largo del curso de la estimulación, por lo que la inactivación se produce por desfosforilación (revisado por Cuenda y Rousseau 2007; Ono y Han 2000; Zarubin y Han 2005). p38 α y β tienen como sustratos MAPKAP2 o MK-2 (*MAP Kinase-Activated Protein Kinase 2*) que fosforila a HSP27 (*Heat Shock Protein 27*) responsable de la reorganización de actina (Figura 17) necesaria para la migración celular, y MAPKAP3 o MK3 (Rouse *et al.*, 1994). Una vez activadas, estas quininas fosforilan otras proteínas o factores de transcripción amplificando y

diversificando la señal transmitida por p38 MAPK. Del mismo modo, p38 α y β también pueden fosforilar y activar directamente factores de transcripción como ATF-1/2, CHOP (*C/EBP Homologue Protein*), p53, MEF2C (*Myocyte Enhancer Factor 2C*) y MEF2A (*Myocyte Enhancer Factor 2A*), entre otros. Además, también han sido identificados como sustratos de p38 α y β algunas proteínas del citoesqueleto, componentes de la maquinaria transcripcional y enzimas metabólicas tales como la glucógeno sintasa o la fosfolipasa A2 (revisado por Zarubin y Han 2005).

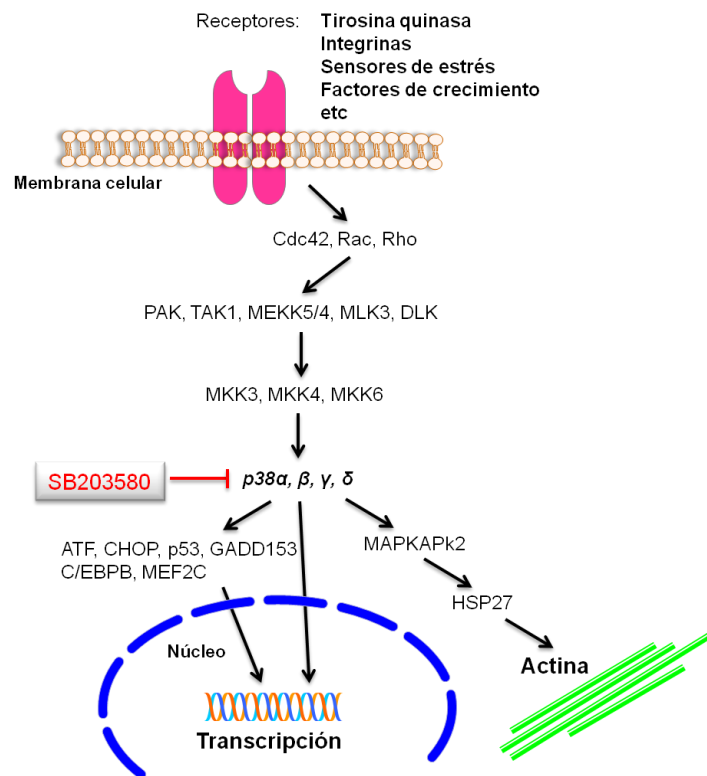


Figura 17. Vía de señalización de p38 MAPK. La vía de p38 MAPK está compuesta por la MAPK (p38), la MAPKK (MKK3, 4 y 6) y la MAPKKK (PAK, MLK3, etc.). Esta ruta se conecta a los receptores de membrana o sensores de estrés mediante proteínas adaptadoras y GTPasas como Rac. La activación de p38 resulta en la fosforilación de varios factores de transcripción y también de quinasas citosólicas como MAPKAPk2 que fosforila al factor de polimerización de actina HSP27.

Función de p38 MAPK en Apoptosis

Las p38 MAPK median diferentes procesos de apoptosis en distintos tipos celulares, como la apoptosis inducida por la retirada de NGF en las células PC12 (Mearow *et al.*, 2002), por el tratamiento con TNF- α en los adipocitos marrones (Valladares *et al.*, 2000) o por el receptor de células T en linfocitos (Hsu *et al.*, 1999). En este último caso, las p38 MAPKs median la inducción de la expresión del ligando de

Fas. También está descrito que p38 MAPK media la translocación de Bax a la mitocondria en la apoptosis inducida por óxido nítrico en neuronas y en la inducida por radiación UV en queratinocitos (Sumbayev y Yasinska 2005; Van Laethem *et al.*, 2004). Las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno también inducen apoptosis a través de la activación de ASK1 y de p38 MAPK (Sumbayev y Yasinska 2005). Respecto a la isoforma p38 α , datos previos del grupo de la Dra. A. Porras han demostrado la implicación de p38 α MAPK en apoptosis ya que, tanto cardiomiocitos como MEFs deficientes en p38 α son más resistentes a la apoptosis inducida por diferentes estímulos como la retirada de suero, la radiación UV, el ligando de Fas o un ionoforo de calcio, o incluso a la apoptosis en condiciones basales. Esto es debido a la menor expresión de proteínas pro-apoptóticas como Fas/CD95 y Bax, y a una mayor activación de las rutas de supervivencia mediadas por ERK y Akt (Porras *et al.*, 2004; Zuluaga *et al.*, 2007b). Por otra parte, p38 α es capaz de inducir apoptosis por un mecanismo dependiente de ROS en los primeros estadios de la transformación tumoral, mediada por el oncogén Ras (Dolado *et al.*, 2007). También se ha descrito la implicación de p38 α , en la inducción de apoptosis, en respuesta al tratamiento con cisplatino en la línea celular HCT116 de cáncer de colon (Bragado *et al.*, 2007). p38 α puede contribuir a la respuesta apoptótica mediante la fosforilación y/o translocación de las proteínas de la familia de Bcl-2, lo que induciría la liberación del citocromo c de la mitocondria (Ghatan *et al.*, 2000; Wang Q. y Wieder 2004), la activación de la caspasa 8 (Schrantz *et al.*, 2001), la regulación de la fragmentación de Bid y su consecuente activación y translocación a la mitocondria (Zhuang *et al.*, 2000), así como la regulación de los procesos de formación de burbujas y condensación nuclear (Deschesnes *et al.*, 2001). En contraste, las p38 MAPK pueden tener un papel anti-apoptótico en algunos tipos celulares, como por ejemplo en cardiomiocitos, fibroblastos que han sufrido daño en el DNA o macrófagos activados (Zechner *et al.*, 1998), entre otros. En algunos de estos casos, podría ser la isoforma β la responsable de este efecto de supervivencia, como parece ocurrir en cardiomiocitos, células Jurkat y células HeLa, donde se ha descrito que p38 α induce apoptosis mientras que p38 β favorece la supervivencia celular (Mackay y Mochly-Rosen 1999; Wang X. *et al.*, 1998).

Función de p38 MAPK en adhesión celular

Las p38 MAPK regulan la polimerización-despolimerización de la actina y la expresión de algunas moléculas de adhesión, como E-selectina (Laferriere *et al.*, 2002) y pueden regular negativamente la adhesión celular. Células embrionarias de ratón deficientes en p38 α muestran un incremento en la adhesión celular en gelatina, colágeno, fibrinógeno y fibronectina, juntamente con el aumento de la actividad de FAK y paxilina (Guo Y. L. y Yang 2006). En contraste, en células de melanoma humano, estimuladas con ácido araquidónico, la adhesión celular se ve incrementada a través de RhoA y ROCKII vía la asociación, dependiente de p38 MAPK, de HSP27 y p115RhoGEF (García M. C. *et al.*, 2009). Por otra parte, el grupo de la Dra. A. Porras ha descrito una regulación cruzada entre p38 MAPK y Rac1, donde p38 α en ausencia de suero incrementa la actividad de Rac1 mediante la formación del complejo caveolina1-Rac1, mientras que en presencia de suero p38 α disminuye la actividad de Rac-1. La formación de este complejo requiere la fijación celular posiblemente a través de un mecanismo dependiente de la activación de integrinas y/o cadherinas, ya que se produce en ausencia de factores de crecimiento (Zuluaga *et al.*, 2007b). En células PC12 estimuladas con NGF, p38 α fosforila la paxilina en el residuo Ser83 (Cuenda y Rousseau 2007). La integrina α 2 β 1 media la activación específica de la isoforma p38 α , donde Cdc42, MMK3 y MMK4 son posibles efectores (Ivaska *et al.*, 1999). Se ha descrito que p38 MAPK es activada por la integrina β 1 a través de p95Vav y Rac1 (Mainiero *et al.*, 2000). En células de linfoma Karpas 299, se ha demostrado que la inhibición de p38 MAPK, a través de su inhibidor SB203580, desfosforila la integrina β 1 resultando en la disminución de la adhesión celular a fibronectina y colágeno (Sato *et al.*, 2005).

p38 MAPK en LMC

El papel de las diferentes isoformas de p38 MAPK en la LMC no está claro. Se ha demostrado que la sobre-expresión de Bcr-Abl suprime la ruta de p38 MAPK, cuya función es necesaria para la transcripción de genes dependientes de IFN α (Uddin *et al.*, 1999). Estos datos concuerdan con estudios posteriores que describen un incremento de la activación de p38 MAPK mediada por Rac1 en células KT-1 y pacientes LMC tratados con IFN α (Mayer I. A. *et al.*, 2001; Plataniás 2003; Uddin *et al.*, 2000). Imatinib y otros inhibidores de Bcr-Abl como el ácido clorogénico inducen la apoptosis

a través de la fosforilación de p38 MAPK en células K562 y KT-1 (Bandyopadhyay *et al.*, 2004; Kohmura *et al.*, 2004; Parmar *et al.*, 2004). Además, p38 es esencial para la actividad terapéutica del agente antitumoral cisplatino en células que expresan Bcr-Abl (Galan-Moya *et al.*, 2008). Sin embargo otros estudios han demostrado una activación de p38 por la actividad quinasa de Bcr-Abl (Sanchez-Arevalo Lobo *et al.*, 2005). Asimismo, se ha observado que p38 MAPK activa el ciclo celular, a través de la regulación de ciclina D(2), ciclina E y p27, lo que resulta en un incremento de la proliferación y, por consiguiente, de la progresión de la LMC (Guo X. *et al.*, 2007).

Dado que tanto C3G como p38 MAPK participan en funciones comunes dentro de la célula, como apoptosis y adhesión celular, y en base a los indicios existentes en la literatura sobre su participación en la LMC, nuestra hipótesis es que ambas proteínas forman parte de rutas comunes de apoptosis y adhesión celular que están desreguladas en LMC y contribuyen a la progresión tumoral. Por tanto, en este trabajo de Tesis nos hemos propuesto los siguientes objetivos.



OBJETIVOS

- I. Caracterización de una ruta apoptótica común, C3G-p38 α MAPK, en la línea celular de LMC K562.
- II. Identificación del intermediario/s de la interacción entre C3G y Bcr-Abl en las células K562.
- III. Implicación de la ruta C3G-p38 α MAPK en las propiedades adhesivas de las células K562.



***MATERIALES Y
MÉTODOS***

Líneas celulares y construcciones de expresión

La línea celular humana K562, (ATCC, CCL 243), derivada de un paciente con leucemia mieloide crónica en crisis blástica, fue mantenida en cultivo en medio RPMI 1640 con 10% de suero fetal bovino (FBS).

Para el silenciamiento de la expresión de C3G (C3Gi) se utilizaron los oligonucleótidos hC3Gsi-F

5´-

GATCCCCCCACTATGATCCCGACTATTTCAAGAGAATAGTCGGGATCATA
GTGGTTTTTGGAAA-3´ y su reverso complementario hC3Gsi-R 5´-

AGCTTTTCCAAAACCACTATGATCCCGACTATTCTCTTGAAATAGTCGG
GATCATAGTGGGGG-3´, donde la secuencia diana de C3G está marcada en negro y subrayado, y corresponde a los nucleótidos 1152-1170 de la secuencia humana (número de acceso D21239).

Para el silenciamiento de p38 α MAPK (p38 α i) la secuencia diana fue: 5´-GCACATGCCTACTTTGCTC -3´, correspondiente a los nucleótidos 909-927, con el número de acceso NM_139012, siendo el resto de la secuencia del oligonucleótido de 64 pb igual a la de C3G. Ambos oligos se clonaron en el plásmido pSuper.gfp/neo (Oligoengine) (Figura M-1) utilizando el sitio de corte de la enzima de restricción *Hind*III y *Bgl*II. La posición del oligo directo *downstream* a la caja TATA del promotor H1 permitió la transcripción del doble siRNA deseado. Las construcciones resultantes fueron denominadas pSuper-C3Gi y pSuper-p38 α i.

El mutante Rap1 dominante negativo (Rap1S17N, con Ser17 sustituida por Asn) se clonó en el plásmido pCEP4 utilizando el sitio de corte de la enzima de restricción BamHI.

Para sobre-expresar C3G en células K562 se utilizó la construcción pLTR2C3G donde el cDNA completo de C3G de 3,2 kb está clonado en el sitio BamHI del vector pLTR2 (Guerrero *et al.*, 1998).

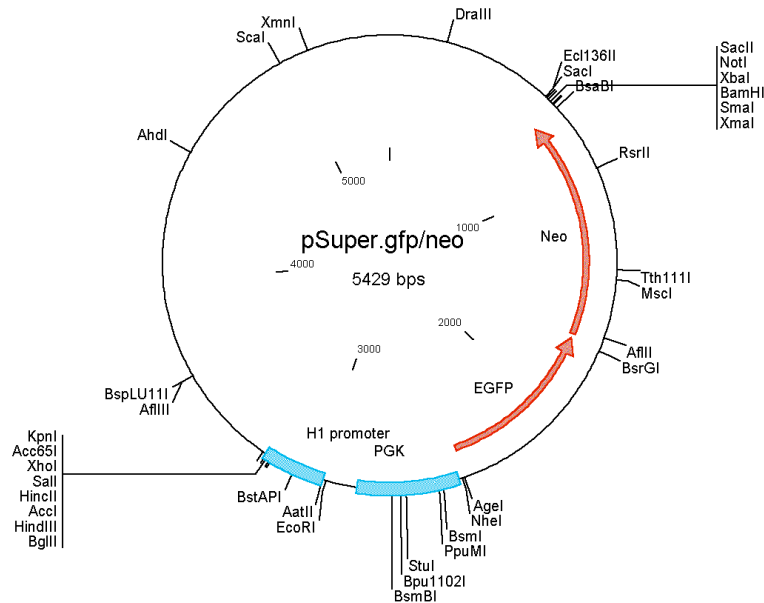


Figura M-1. Esquema representativo del vector pSuper.gfp/neo utilizado para silenciar los genes humano C3G y p38 α . Este vector contiene el promotor H1 RNA *polymerase* III que lleva a la producción endógena del shRNA.

Transfección de células K562

Para obtener las cepas estables de K562 con las modificaciones de expresión génica descritas anteriormente, se lavaron 5-10 x 10⁶ células en 0,7 ml de RPMI sin suero y se resuspendieron en el mismo medio, previamente a su transfección mediante electroporación a 260V y 950 μ Fa, con 25 μ g de plásmido (vacío o con la secuencia diana) resuspendido en agua estéril. Tras la electroporación se añadió 800 μ l de medio con suero y se dejó 5 minutos a temperatura ambiente. Pasadas 48 h de incubación en el medio RPMI con suero, las células transfectadas con las construcciones del plásmido pSuper fueron seleccionadas con 500 μ g/ml de geneticina, mientras que las células transfectadas con las construcciones del plásmido pCEP4 fueron seleccionadas con 100 μ g/ml de higromicina. Las células transfectadas con las construcciones del plásmido pLTR2 se seleccionaron en medio *Killer HAT* 1:20 (12,5 μ g/ml de *xanthine*, 1,25 μ g/ml de ácido micofenólico y 0,05 X de la solución salina HAT 100X que contiene *Hypoxanthine*, *Aminopterin* y *Thymidine* (Gibco-BRL Cat. No. 31062-011) en DMEM con 10% de suero fetal bovino. Las células fueron mantenidas en los medios descritos hasta la selección completa de los cultivos (*mass cultures*) con una frecuencia de cambio de medio de 3 días.

Infección de células K562 con partículas lentivirales shRNA

Células K562 (1×10^5 células/ml) fueron incubadas en medio con 10% de suero fetal bovino 24 horas antes de la infección con las partículas lentivirales, con el fin de obtener un 50% de confluencia el día de la infección. Primeramente, se resuspendieron las células en 1 ml de medio con suero que contenía 5 $\mu\text{g/ml}$ de *Polybrene*. A continuación, se añadieron 15 μl de partículas lentivirales shRNA (10 μM) y las células fueron incubadas a 37 °C y 5% de CO_2 durante toda la noche. Posteriormente el medio de cultivo fue sustituido por medio con suero sin polybrene y se incubó a 37 °C durante 24 horas más. La selección de los clones estables que expresaban el shRNA se inició diluyendo el cultivo celular 2 veces y incubando durante 48 horas. Posteriormente se añadió 2 $\mu\text{g/ml}$ de puromicina (*Purymicin dihydrochloride*, Sigma) para seleccionar los clones estables que expresaban el shRNA. Las células se mantuvieron en este medio de selección, que se cambió con una frecuencia de 4 días, hasta que las colonias resistentes fueron identificables. Se procedió a hacer diluciones del medio de cultivo para añadir 1 célula por cada pocillo (placa de 96 pocillos). Los clones con expresión estable del shRNA fueron analizados mediante *Western blot*. Las partículas lentivirales shRNA usadas para disminuir la expresión en K562 fueron p130cas shRNA (NM_014567) y su Control shRNA (Sigma), Cbl shRNA (sc-29242-V), C3G shRNA (sc-29863-V), Abi1 shRNA (sc-40306-V) y Control shRNA (sc-108080) de Santa Cruz Biotechnology.

Inhibidores de las rutas de C3G y p38 α MAPK

Células K562 en fase exponencial de crecimiento ($1-5 \times 10^5$ células/ml) se trataron con 2 μM de STI-571 (inhibidor de la tirosina quinasa p210 Bcr-Abl) durante 30 minutos para los experimentos de señalización o 48 h en los experimentos de apoptosis.

El inhibidor de p38 α MAPK, SB203580 se utilizó a la concentración de 5 μM . En los experimentos de apoptosis se trataron las células con este inhibidor durante 48 h. En los experimentos de señalización las células K562 se trataron con SB203580 30 minutos antes de añadir STI-571 durante 30 minutos más.

RT-PCR semicuantitativa

Se procedió a la extracción de RNA de $5-10 \times 10^6$ células en crecimiento exponencial usando el *kit RNeasy total RNA* (Qiagen) siguiendo las especificaciones del fabricante. La cuantificación e integridad del RNA obtenido se determinó mediante un *lab-chip* (Agilent). Se utilizó 1,5 μg del RNA total de los clones de K562 para su retrotranscripción a cDNA según el protocolo de la casa comercial *kit SuperScript III Reverse Transcriptase* de Invitrogen. Se analizó 1 μl del cDNA para la expresión de C3G usando oligos específicos del inicio del exón 2 (n141-n160) sentido directo: 5'-ACTCTCAGCGTTCTCATCTC-5' y del final del exón 4 (n554-n573) sentido reverso: 5'-CTGTGCTGAATTCGAGGATC-3'. Las condiciones de la PCR fueron: 45°C, 45 s; 55°C, 45 s; y 72°C, 1 minuto durante 30 ciclos. Las bandas amplificadas fueron normalizadas mediante la cuantificación en gel de agarosa utilizando como control interno el gen GAPDH, amplificado utilizando los oligos: directo 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3' y reverso 5'-TCTTCTGGGTGGCAGTGATGTTA-3'.

Anticuerpos

El análisis de la expresión proteica de los diferentes clones de K562, tanto en ensayos de señalización como en ensayos de apoptosis y de activación, se realizó mediante la técnica de *Western-blot*. Para ello se utilizaron cantidades de extracto proteico comprendidas entre 40 y 60 μg , dependiendo del nivel de expresión de la proteína en estudio en nuestro modelo celular. Los extractos proteicos se obtuvieron añadiendo a las células, lavadas una vez con PBS frío, tampón de lisis 1X que contiene 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na_2EDTA , 1 mM EGTA, 1% Tritón, 2,5 mM *sodium pyrophosphate*, 1 mM *beta-glycerophosphate*, 1 mM Na_3VO_4 y 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *leupeptin* (#9803 de *Cell Signalling Technology*) suplementado con 25 μM de Fluoruro de sodio y 1 mM de PMSF. La mezcla se agitó mediante vortex durante 1 minuto y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos para separar los restos celulares del extracto proteico. A continuación, se cuantificó la cantidad de proteína por el método de *Bradford* (Bradford 1976). La detección de expresión proteica se realizó utilizando

anticuerpos específicos que se incubaron durante toda la noche a 4°C o 1 h a temperatura ambiente. En la tabla M-1 se indican los anticuerpos utilizados en esta tesis.

Tabla M-1: Descripción de los anticuerpos utilizados y su dilución dependiendo del tipo de estudio. Se indica el isotipo, casa comercial y referencia. Salvo indicado, la dilución se refiere a la utilización en *Western blot*. IF – Inmunofluorescencia.

<i>Anticuerpo</i>	<i>Isotipo</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Referencia</i>	<i>Dilución de trabajo</i>
C3G (C-19)	Conejo	Santa cruz Biotechnology	sc-869	1:1000; IF – 1:50
C3G (H300)	Conejo	Santa cruz Biotechnology	sc-15359	1:1000; IF – 1:50
C3G 1008-4	Conejo		Guerrero <i>et al.</i> , 1998	1:1000; IF – 1:50
Rap1/Krev (121)	Conejo	Santa cruz Biotechnology	sc-065	1:1000
Crk-L (c-20)	Conejo	Santa cruz Biotechnology	sc-319	1:1000
β-actin	Ratón	Sigma	SAB4200248	1:5000
ERK (K-23)	Conejo	Santa cruz Biotechnology	sc-94	1:1000
Akt1/2/3 (H-136)	Conejo	Santa cruz Biotechnology	sc-8312	1:1000
p38 (C-20)	Conejo	Santa cruz Biotechnology		1:1000
p38α (C-20)	Conejo	Santa cruz Biotechnology	sc-535	1:1000
Phospho-p38 (Thr180/Tyr182)	Conejo	Cell Signaling	9211S	1:1000
β-Tubulin	Ratón	Sigma-Aldrich	T5293	1:2000
Phospho-p44/42 MAPK(Thr202/Tyr204)	Conejo	Cell Signaling	9106L	1:1000
Phospho-Akt (Ser473)	Conejo	Cell Signaling	9271S	1:1000
Phospho-ATF-2 (Thr71)	Conejo	Cell Signaling	9221	1:1000
PARP-1	Ratón	BD Pharmingen	556362	1:1000
Cbl (c-15)	Conejo	Santa cruz Biotechnology	sc-170	1:1000
Abi-1 (H-80)	Conejo	Santa cruz Biotechnology	sc-30038	1:1000 IF – 1:50
Bcr (G6)	Ratón	Santa cruz Biotechnology	sc-104	1:1000
SSH3BP1 (AB11)	Ratón	Abcam	ab11222	1:1000
c-Abl (24-11)	Ratón	Santa cruz Biotechnology	sc-23	1:1000; IF – 1:50
p130cas	Ratón	Santa cruz Biotechnology	sc-20029	1:1000
Phospho-Tyr(py20)	Ratón	Santa cruz Biotechnology	sc-508	1:1000
Phospho-p130cas(Tyr249)	Conejo	Cell Signaling	4014S	1:1000 IF – 1:50
Paxillin	Ratón	BD Transduction Laboratories	612405	1:1000; IF – 1:50
Phospho-paxillin (Tyr118)	Conejo	Invitrogen	44-722G	1:1000; IF – 1:50
XPG (8H7)	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	sc-13563	1:1000
MAD1 (C-19)	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	sc-222	1:1000
Arginase II (H-64)	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	sc-20151	1:1000
RICK (H-300)	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	sc-22763	1:1000

<i>XPB/TFIIHp89 (S-19)</i>	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	Sc-293	1:1000
<i>SMAC (FL-239)</i>	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	sc-22766	1:1000
<i>NIP3 (Ana 40)</i>	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	sc-56167	1:1000
<i>GPR94 (H-212)</i>	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	sc-11402	1:1000
<i>FADD (H-181)</i>	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	sc-5559	1:1000
<i>PTEN (ab23694)</i>	Conejo	Abcam	ab23694-200	1:1000
<i>Bax (6A7)</i>	Ratón	Abcam	ab5714	1:1000
<i>JAK-2</i>	Conejo	Millipore	06-255	1:1000
<i>Bcl2 mAb</i>	Ratón	BD Pharmingen	551098	1:1000
<i>Rap1/Krev-1 (121)</i>	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	sc-065	1:1000

Ensayo quinasa *in vitro* de p38 MAPK

El ensayo quinasa *in vitro* de p38 MAPK se realizó usando el kit *p38 MAPK Kinase Assay* (Cell Signaling) según el protocolo de la casa comercial. Brevemente, la p38 MAPK fosforilada se inmunoprecipitó a partir de 200 µg de extracto total de proteína con el anticuerpo monoclonal fosfo-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) inmovilizado con bolas de Sefarosa *Gamma Bind G*. Tras 16h de incubación a 4 °C y después de 3 lavados con tampón quinasa (250 mM Tris (pH 7.5), 50 mM β-Glycerolphosphate y 100 mM MgCl₂) el pellet conteniendo el inmuprecipitado se resuspendió en un volumen final de 50 µl del mismo tampón suplementado con 200 µM de ATP y 2 µg del sustrato quinasa (proteína de fusión ATF-2 inactivo). Se incubó la reacción quinasa a 30 °C durante 30 minutos. Para detener la reacción se añadieron 25 µl de tampón de carga SDS 3X. Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE y reveladas con anticuerpos anti-fosfo-ATF-2.

Análisis de microrrays de DNA

El análisis de la expresión génica diferencial se realizó utilizando arrays de DNA humano, Genechips de Affymetrix HG-U133 plus2.

Se purificó el RNA de 5-10×10⁶ de células K562 en crecimiento exponencial transfectadas establemente con pSuper.neo/gfp-C3G (pSuper-C3Gi) o pSuper.gfp/neo (pSuper), usando el *kit RNeasy total RNA* (Qiagen) tal como se explica en el apartado RT-PCR semicuantitativa. El RNA fue usado para sintetizar sondas de RNA complementario (cRNA) a partir del cDNA, que se usaron en la hibridación de los

GeneChip según el protocolo descrito en el Manual Técnico de Análisis de Expresión de Affymetrix (<http://www.affymetrix.com>).

Análisis de los datos de hibridación de los microarrays

Los archivos de *Affymetrix CEL* fueron procesados en el ambiente estadístico R (www.r-project.org) usando las librerías de Bioconductor (www.bioconductor.org). Nuestro protocolo numérico es una variación del método RMA (Irrizarry *et al.*, 2003) que permite una estimación más consistente de las medidas de fluorescencia de la sonda. Con este método se procesaron cinco hibridaciones de microarray, tres clones de K562 transfectados con pSuper (controles) y dos clones de K562 transfectados con pSuper-C3Gi.

Posteriormente, se usó el algoritmo *SAM* (Tusher *et al.*, 2006) con implementación en R (*siggenes*) para identificar las diferencias significativas en expresión al comparar las muestras *knock-down* de C3G con sus respectivos controles. La significancia estadística de las anotaciones funcionales *GO* fue estimada por valores de *P-value* de confianza calculados con la prueba *Fisher's* para contrastar el número de genes asignados a las diversas categorías funcionales.

PCR cuantitativa a tiempo real

Esta técnica consiste en cuantificar en tiempo real el DNA amplificado a partir de cDNA mediante la utilización de un fluoróforo denominado *SYBR Green I*, que al unirse al surco menor de la doble hélice del DNA y excitarse a 494 nm emite una señal fluorescente a 521 nm. Esta señal es detectada por el termociclador *iCycler* (Bio-Rad), y es directamente proporcional a la cantidad de transcrito.

Utilizando el kit *iQTM SYBR[®] Green Supermix* (Cat No. 170-8882, BIO-RAD) se amplificó a tiempo real 20 ng del cDNA con los oligos directo e inverso (160 nM) del gen a estudiar (Tabla M-2). Además se utilizó el gen *housekeeping GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)* como referencia para calcular las alteraciones relativas de expresión de los genes de estudio. Previamente se había realizado una curva de calibración con los diferentes oligos utilizando 0,2 ng, 2 ng y 20

ng de cDNA de la muestra control con las mismas condiciones, para calcular la eficiencia de la PCR a tiempo real, utilizando la siguiente fórmula (Pfaffl *et al.*, 2001):

$$Eficiencia_{gen} = 10^{[-1/slope]}$$

Donde *slope* es la pendiente calculada por la gráfica C_T versus concentración de cDNA que se obtiene con el programa de análisis Bio-Rad iQ5. Tanto el ensayo para el cálculo de la eficiencia como para la cuantificación de la expresión del gen fueron realizados por duplicado.

Los oligos utilizados en la PCR cuantitativa se diseñaron a partir de la secuencia codificada del gen de estudio encontrada en la base de datos *Ensembl Genome Browser* (www.ensembl.org). Utilizando los *probe_set* de Affimetrix (<http://probeexplorer.cicancer.org/principal.php>) se comprobó que la secuencia era la usada en los *Genechips* y posteriormente se diseñaron los oligos directo e inverso en la zona mapeada.

Con la ayuda del programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) se escogió una pareja de oligos entre 18 y 27 nucleótidos por cada gen, teniendo en cuenta que tuvieran una temperatura de anillamiento entre 60 y 63 °C, una diferencia de T_m menor de 1°C, y que no tuvieran extremos complementarios. La eficiencia y especificidad de las parejas de oligos se verificó, mediante PCR semicuantitativa, comparando el cDNA y el DNA genómico de la muestra control. La especificidad de las parejas de oligos se confirmó con el resultado negativo de la reacción que contenía el DNA genómico de K562.

Tabla M-2. Oligos directo e inverso de los genes de estudio utilizados en la PCR cuantitativa diseñados a partir de su secuencia codificante.

<i>Gen Probe set ID</i>	<i>Oligo directo (5'-3')</i>	<i>Oligo reverso (5'-3')</i>
BBC3 211692_s_at	CCAGGAGAGGGACGGCTGATGGAC	TGAGATGGTGGTGGGCGGCAGA
ERRCC5 202414_at	GCGGTATTTTCGGCTGGAACAGAACG	TCAATTCGGAGCTGTGTCTGCTGGG
RIPK2 209545_s_at	AGACCACTCCATGCTCTTCA	GATCCACTGCTGGGCTATAC
BAX 211833_s_at	GGGCCGGGTTGTGCCCTTT	CCGGAGGAAGTCCAATGTCCAGCC
ERCC3 202176_at	CAGCCACTGACCTGGATGCCGA	CATGGTGCCAAAGCGCCGAGA

PARP2 204752_x_at	GCTGGGCAAGATGGCTCCAGT	CCTGTGTCACCTTGCTGGTCCTAATGGC
BRAC1 204531_s_at	CAGATCCCACCAGGAAGGAAGCTGTTG	GCTGTATGGTTTCAGCAACAGGGAGCA
BRAC2 214727_at	TCTTTGGCTGAGCTCGGTGGCTC	TCCTGGCCTCAAGCACTCCTCCC
TOP2A 237469_at	AGAATTGGAGGCTGTTGAAGCCAAGGA	CTCTTTGACCACGCGGAGAAGGC
BID 227143_s_at	AGACATGAAGCCACGGGTGCCAG	GCATGGATGAGCTGAGCGTATGGCT
RAD51C 209849_s_at	AAGTCACCCAGCCAGAAGGAATGCAC	TCGTGACCGTTTCCGGGTGCTC
DDB2 203409_at	CCAGGAGGAAGCCAGGACACGGA	GCCCTTTAACAAATCGCCACCTCTGCT
JAK2 1562031_at	CTGTGGCCTCAGATGTTTGGAGCTT	ACGCATAAATTCCGCTGGTGGACTT
MXD1 228846_at	ACCAGCAAACCTCAGCCCAAGGCA	TTGGCGAATCAGGGCTGCCGA
VEGFA 211527_x_at	ACAAGCCGAGGCGGTGAGCC	TGGTGGCGGCAGCGTGGT
HSP90B1 216449_x_at	ACCCACATCTGCTCCACGTGGT	GTCGTCTGTGATGAATACACGGCGC
PTEN 204053_x_at	CCTCCAATTCAGGACCCACACGACGG	ATCACCACACACAGGTAACGGCTGAGG
XRCC6 200792_at	GAGGCCTGCCGGGCTTACGG	GGCCACACTGCCGAAGGGCA

Las condiciones de PCR utilizadas se describen a continuación:

- 1) 15 minutos a 95 °C para activar la polimerasa de DNA *hot-StarTaq*TM.
- 2) 50 ciclos de:
 - a. 15 segundos a 94 °C (desnaturalización).
 - b. 30 segundos a 59 °C (anillamiento de los oligos). Temperatura de anillamiento 5 °C por debajo de la T_m de los oligos
 - c. 1 minuto a 72 °C (elongación de las cadenas y detección de la fluorescencia emitida).
- 3) 1 minuto a 95 °C.
- 4) 1 minuto a 65 °C.
- 5) 10 segundos a 65 °C. Este paso se repite durante 60 ciclos con aumento de 0,5 °C en cada ciclo.

El programa informático Bio-Rad iQ5 acoplado al termociclador calcula la C_T (*Threshold cycle*), es decir, el primer ciclo en el que se detecta un aumento de fluorescencia, valor que se utiliza para estimar las variaciones de expresión del RNA. Para cuantificar el aumento o disminución de la expresión del RNA de uno de los clones

respecto al control se tiene en cuenta el valor de la C_T de ambos y de un gen *housekeeping*, como el GAPDH, ya que se calcula la variación relativa con respecto a la expresión de este gen. Con la ayuda de las C_T se cuantifica la variación con la siguiente fórmula (Pfaffl *et al.*, 2001):

$$\text{Variación relativa} = \frac{(E_{gen})^{\Delta CT_{gen}(\text{Control}-\text{muestra})}}{(E_{gen Ref})^{\Delta CT_{gen Ref}(\text{Control}-\text{muestra})}}$$

Donde *gen Ref* es el gen de referencia, en nuestro caso GAPDH; *E* es la eficiencia calculada por la ecuación mencionada anteriormente; *Control* es la muestra control pSuper; *muestra* es el gen en estudio y ΔC_T es la variación entre la muestra y el control del primer ciclo en el que se detecta un aumento de fluorescencia. Como se utilizaron dos muestras de cada línea celular *knock-down*, se calculó el promedio de cada variación y del valor resultante se calculó el \log_2 (representado en las graficas del capítulo I de los resultados por LogRatio, Figuras I-15 y I-16).

Ensayo de apoptosis

Distintos clones de K562 en crecimiento exponencial ($1-5 \times 10^5$ células/ml) se trataron con 2 μM de STI-571 durante 48 horas. Posteriormente, las células se lavaron con PBS, se resuspendieron en 100 μl de *Binding buffer* 1X (0,1 M HEPES, pH 7.4; 1,4 M NaCl; 25 mM CaCl_2 ; BD Biosciences, Cat. No. 556454) y se marcaron doblemente con 5 μl de Anexina V conjugada con APC (Annexin V-APC; BD Biosciences, Cat. No. 550474) y 5 μl de 7-Amino-actinomycin D (7-AAD; BD Biosciences, Cat. No. 559925). Por último se incubaron las muestras con agitación fuerte, en ausencia de luz y a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las células fueron analizadas por citometría de flujo en un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson).

Este marcaje permite medir el porcentaje de células en apoptosis temprana (positivas solo para Anexin V-APC) o tardía (doblemente positivas para Anexin V-APC y 7-AAD).

Ensayo de adhesión celular

Se utilizó una placa de 96 pocillos pre-tratada con 50 $\mu\text{g/ml}$ de fibronectina (SIGMA) (9 pocillos por muestra) a 4 °C durante toda la noche. Tras lavar los pocillos, conteniendo fibronectina, tres veces con PBS se bloquearon con 1% de BSA durante 30 minutos a temperatura ambiente. Además, se añadió 1% BSA a 3 pocillos por muestra que se utilizaron como control negativo de la adhesión.

Las células de los clones de K562 y sus respectivos controles fueron cultivados en RPMI con 10% de suero hasta la confluencia. Las células fueron lavadas con PBS a temperatura ambiente y resuspendidas en RPMI sin suero (5×10^6 células/ml). Posteriormente, las células se marcaron con 5 μl de calceína AM 1 mM (Calcein, AM Fluorescent Dye, de BD Biosciences) por ml de muestra y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Las células así marcadas se lavaron con medio y se resuspendieron en igual volumen de medio sin suero. A cada pocillo se añadió 5×10^5 células y se dejó a 37 °C durante 90 min. Tras la incubación, los pocillos se lavaron tres veces con medio sin suero con agitación suave, para eliminar las células no adheridas, y la placa se secó sobre papel de filtro. Las células restantes se resuspendieron en PBS a la concentración inicial (5×10^6 células/ml) y se colocaron el mismo número de células (5×10^5 de células) a cada uno de los 9 pocillos sin fibronectina como control del número de células de partida. Se utilizó PBS como blanco. La Figura M-2, representa el esquema de la placa del ensayo de adhesión para cada línea celular.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Figura M-2. Esquema de la placa multipocillos utilizada para el ensayo de adhesión. Los cuadrados grises corresponden a pocillos revestidos con 1% de BSA, los azules son pocillos revestidos con fibronectina y los de color verde corresponden a pocillos que contienen el número total de células de partida. El pocillo rojo contiene PBS utilizado como blanco.

La fluorescencia se midió en el lector de placas (ULTRA Evolution; Serial number: 12903200010; Firmware: E 1.03 02/03 EVOLUTION; XFLUOR4 Version: V 4.50) a la emisión de 535 nm y excitación 485 nm. El porcentaje de adhesión se obtuvo

de la división entre la media de la fluorescencia de las células adheridas a fibronectina (valor corregido restando la fluorescencia del blanco) y la media del total de células (valor corregido restando la fluorescencia del blanco).

Purificación de la proteína de fusión GST-RalGDS-RBD

Se inoculó 25 ml de un cultivo saturado de la cepa de *E.coli* BL21 que expresa la proteína de fusión GST-RalGDS-RBD (Gutierrez-Berzal *et al.*, 2006) en 1 litro de medio LB con 100 µg/ml de ampicilina y se incubó a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm entre 0,5 y 0,7. Para iniciar la expresión de la proteína de fusión o del plásmido vacío se añadió al cultivo 0,5 mM de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) y se incubó durante 4 horas a 37 °C. El pellet de células se recogió por centrifugación a 8000 rpm durante 20 minutos (Avanti™ J-25 Centrifuge, Beckman) y se resuspendió en 10 ml de tampón de lisis PBST (2 mM EDTA, 0,1% β-Mercaptoethanol, 0,2 mM PMSF en PBS). Las células se lisaron por sonicación en hielo (5 minutos con pulsos de 20 segundos y amplitud de 30% en el sonicador SONICS, Vibracell™). El lisado se centrifugó a 15000 rpm durante 30 minutos a 4 °C para eliminar restos celulares y el sobrenadante se mantuvo a -80 °C. Se añadieron 200 µl de resina *Glutathione-Sepharose 4 Fast Flow* (Amersham Bioscience), previamente lavada con PBS + PMSF por 1 ml de sobrenadante. El glutatión presente en la resina se une específicamente a la proteína GST (glutatión-S-transferasa) de la molécula de fusión separándola del resto del lisado proteico. Tras la incubación a 4 °C durante 2 horas en rotación, se lavó la resina 4 veces con PBS conteniendo 1mM de PMSF a 4 °C. La verificación de la expresión y purificación se realizó mediante SDS-PAGE seguido de tinción de azul de *Coomassie*. La cuantificación de la proteína purificada se realizó por comparación con distintas cantidades de BSA (de 1 µg a 30 µg).

Ensayo de la actividad de Rap1

En células estimuladas existe un reclutamiento de GEFs que facilitan la liberación del GDP de Rap1. El GTP libre en el citosol reemplaza el GDP haciendo que Rap1 adopte una conformación activa y se una a efectores como RalGDS. De esta

manera, el dominio RBD de Ral-GDS, que comprende la región de unión a Rap1 activado, puede ser usado como ligando de afinidad para la precipitación de Rap1-GTP.

El ensayo Rap1 se realizó con lisados totales de células pre-confluentes de los clones de K562 resuspendidas en medio con suero y tratadas con 2 μ M de STI-571 y/o SB203580 usando la construcción pGST-RalGDS-RBD.

Se lisaron las células con el tampón de lisis MLB 1X (Mg²⁺ Lysis/Wash Buffer) conteniendo 125 mM HEPES, pH 7.5, 750 mM NaCl, 5% Igepal CA-630, 50 mM MgCl₂, 5 mM EDTA and 10% glycerol. Cat No. 20-168 de Upstate - Millipore) suplementado con 2% de glicerol, 1 mM Na₃VO₄, 25 mM NaF, 1mM PMSF, 10 μ g/ml aprotinina, 10 μ g/ml leupeptina. Entre 0,5-1 mg de lisado total fresco se incubó con 20 μ g de la proteína de fusión GST-RalGDS-RBD previamente unida a la resina de glutatión sefarosa. Tras 30 minutos de incubación a 4°C con rotación, los complejos resina-RalGDS-RBD-Rap1-GTP se separaron de la fracción líquida por breve centrifugación. Por último la resina se lavó tres veces con el tampón MLB 1X. La activación de Rap1 se analizó mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo específico de Rap1 (Tabla M-1). Para el revelado se utilizó tanto métodos quimioluminiscentes (ECL y ECL plus, GE-Healthcare), como fluorescentes (Odyssey), siguiendo las especificaciones de los fabricantes.

Inmunoprecipitación

Este ensayo tiene como finalidad la precipitación de una proteína concreta de un extracto proteico mediante el uso de anticuerpos específicos. Una vez realizada la separación se puede detectar su interacción con otras proteínas.

Se añadió entre 1-2 μ g de anticuerpo por 0,5 mg de extracto proteico y se incubó en rotación a 4 °C durante 16 horas, tras lo cual se añadió 20 μ l de inmunoglobulinas unidas a esferas de sefarosa (*GammaBindTM G Sepharose* de GE Healthcare) previamente lavadas con PBS + 1 mM de PMSF. Se prolongó la incubación 1 h en las mismas condiciones para la formación del complejo “proteína-anticuerpo primario-anticuerpo secundario-sefarosa” llevando a cabo su separación de la fracción líquida. Por último se lavaron las esferas de sefarosa que contienen los inmunocomplejos cuatro veces con tampón de lisis 1X. Los inmunoprecipitados fueron analizados mediante *Western blot*.

Pull-down

La técnica de *Pull-down* nos permite comprobar si determinadas proteínas forman complejo con una proteína específica X mediante la utilización de una construcción que expresa el dominio de unión de la proteína X a las diferentes proteínas. El ensayo fue realizado con lisados totales de células pre-confluentes de los clones de K562 a los que se añadió la construcción pGST-X. La construcción GST-X se expresó y se purificó mediante su unión a la resina glutatión sefarosa de manera similar a lo descrito para la proteína de fusión GST-RalGDS-RBD. La existencia de unión entre las diferentes proteínas fue analizada mediante *Western blot*, con anticuerpos específicos de las proteínas en estudio.

Inmunofluorescencia

Se utilizó esta técnica para la detección y colocalización de C3G con otras proteínas como paxilina, o con el citosqueleto en los clones de K562. Para ello, se utilizaron cubreobjetos incubados con 10 µg/ml de fibronectina durante un mínimo de 16 h. Tras aspirar el exceso de volumen de fibronectina se sembraron 1×10^5 células/ml, resuspendidas en medio sin suero sobre los cubreobjetos, para permitir la adhesión y tras 48 h se realizó la inmunofluorescencia propiamente dicha.

Las células se fijaron con 3,7% formaldehído (SIGMA) durante 15 minutos y se lavaron con PBS 3 veces durante 5 minutos. La permeabilización se realizó con 0,4% de Tween® en PBS durante 15 minutos. Tras una serie de lavados en PBS las células permeabilizadas, se bloquearon con 1% de BSA en PBS durante 30 minutos previamente a la incubación de los anticuerpos primarios específicos. Dependiendo del anticuerpo, las células juntamente con el anticuerpo, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C, y la dilución utilizada fue de 1:50 en 1% de BSA. Tras 3 lavados en PBS las células se incubaron en oscuridad con los anticuerpos secundarios específicos fluorescentes durante 1h a temperatura ambiente, lavándose posteriormente el exceso de anticuerpo. En el caso de la tinción del citosqueleto las células se incubaron durante 20 minutos con *Phalloidin* (Oregon Green® 514 phalloidin 300U, 07465 de Invitrogen) diluida 200 veces en PBS. Finalmente, se montaron los cubreobjetos sobre los portaobjetos con *Mowiol 4-40* (Calbiochem). Las

imágenes de fluorescencia fueron tomadas con el microscopio confocal Leica SP5 y analizadas con el programa informático LAS AF.

Array de Dominios SH3

Los dominios SH3 funcionan como parte de una molécula adaptadora, reclutando proteínas *downstream* en una vía de señalización. Los dominios SH3 median la formación de complejos específicos en varias vías de señalización clave.

Los array de dominios SH3 (Panomics) permiten identificar interacciones directas entre un ligando y dominios SH3 que permanecen plegados en sus conformaciones activas. Están diseñados como proteínas de fusión a GST, utilizando sitios de unión conservados de dominios SH3 de proteínas individuales que han sido purificados e inmovilizados en la membrana. Cada dominio SH3 se encuentra por duplicado en la membrada *array*. Se utilizaron 2 versiones de *Array* de Dominios SH3, el *Array* I (Panomics, Cat # MA3010) que incluye 38 dominios humanos diferentes (Figura M-3 y tabla M-3) y el *Array* II (Panomics, Cat # MA3011) que contiene 36 (Figura M-4 y tabla M-4).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
A	Amphiphysin		LOX		SPCH		Contactin		MLPK3		Yes1		AM2		SHHUA		Itk		CRK-D2		pos	
B	Dlg2		EMPS5		FGR		SLK		Nebulin		c-Src		FYB-D1		Hck		WIP2-D2		NOF2-D1		pos	
C	VAV-D1		NCK1-D3		Y124		PEXD		BTK		RasGAP		PSD95		Tim		HS1		Stam		pos	
D	BLK		Abl		PLC-γ		Riz		PI3-β		ITSN-D1		ITSN-D2		TRK		GST				pos	
E	pos		pos		pos		pos		pos		pos		pos		pos		pos		pos		pos	

Figura M-3. Diagrama esquemático del *Array I* de dominios SH3. Los dominios SH3 de las proteínas señaladas están por duplicado en el array. Como controles positivos de la hibridación se han inmovilizado ligandos de Histidina (pos).

Tabla M-3. Lista de las proteínas, cuyos dominios SH3 están inmovilizados en el Array I.

<i>Proteína</i>	<i>Nombre completo</i>
Amphiphysin	Amphiphysin
Dlg2	Discs large homolog 2
BLK	VAV proto-oncogene, SH3 domain #1
LCK	Beta-lymphocyte specific protein tyrosine kinase
VAV-D	Human T-lymphocyte specific protein tyrosine kinasep56
EMP55	55 kDa erythrocyte membrane protein
NCK1-D3	Cytoplasmic protein NCK1, SH3 domain #3
Abl	Abelson tyrosine kinase
SPCN	Spectrin alpha chain (non-erythrocytic)
FGR	Cellular Gardner-Rasheed feline sarcoma virusprotein
Y124	PAK-interacting exchange factor beta
PLCg	Phospholipase C gamma-1
Cortactin	Cortactin
SLK	Proto-oncogene tyrosine protein kinase
PEXD	Peroxisomal membrane protein PEX13
Riz	Retinoblastoma protein-interacting zinc-finger
MLPK3	Mixed-lineage kinase 3
Nebulin	Nebulin
BTK	Bruton Tyrosine Kinase
PI3b	Phosphoinositide-3-kinase regulatory beta subunit
Yes1	Yamaguchi sarcoma virus oncogene homolog 1
c-Src	Cellular Rous Sarcoma viral oncogene homolog
RasGAP	Ras GTPase-activating protein 1
ITSN-D1	Intersectin, SH3 Domain #1
Abl2	Abelson-related protein; Arg
FYB-D1	Fyn binding protein, SH3 domain #1
PSD95	Presynaptic density protein 95
ITSN-D2	Intersectin 1, SH3 Domain #2
SJHUA	Spectrin alpha chain, erythrocyte
Hck	Hemopoietic cell kinase
Tim	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 5
TXK	Tyrosine-protein kinase TXK
Itk	Interleukin-2-inducible T-cell kinase
VAV2-D2	Vav2 oncogene product, SH3 Domain #2
HS1	Hematopoietic specific protein 1
CRK-D2	Avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog, domain #2
NOF2-D1	Neurite outgrowth factor or neutrophil cytosol factor 2 domain #1
Stam	Signal transducing adaptor molecule

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
A	Abl2B		GRB2L-D1		ABL2		CCBA		CRKL-D1		CSKP		NCK1-D2		NE-DLG		NOF2-D1		OSF		pos	
B	PI3a		SP93		STAC		Tec		TRIP10		PIG2		ARH6		BCA1		BIN1		EFS		pos	
C	GRAP-D1		JIP1		M3KA		MY7A		NCK2-D2		NCK2-D3		RHG4		SH31		SNX9		UAS3		pos	
D	VAV2-D1		VAV3-D1		VAV3-D2		VINE-D1		VINE-D3		c-Src		GST								pos	
E	pos		pos		pos		pos		pos		pos		pos		pos		pos		pos		pos	

Figura M-4. Diagrama esquemático del *Array II* de dominios SH3. Los dominios SH3 de las proteínas señaladas están por duplicado en el array. Como controles positivos de la hibridación se han inmovilizado ligandos de Histidina (pos).

Tabla M-4. Lista de las proteínas, cuyos dominios SH3 están inmovilizados en el *Array II*.

<i>Proteína</i>	<i>Nombre completo</i>
Abl2B	Abl interactor protein 2
PI3a	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory alpha subunit
GRAP-D1	GRB2-related adaptor protein, SH3 Domain #1
VAV2-D1	Vav-2 protein, SH3 Domain #1
GRB2L-D1	Grb2-related adaptor protein 2, SH3 Domain #1
SP93	Channel associated protein of synapse-110
JIP1	C-jun-amino-terminal kinase interacting protein 1
VAV3-D1	Vav-3 protein, SH3 Domain #1
Abl2	Abelson-related protein; Arg
STAC	Stac protein
M3KA	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 10
VAV3-D2	Vav-3 protein, SH3 Domain #2
CCBA	Dihydropyridine-sensitive L-type, calcium channel beta-1 subunit
Tec	Tyrosine-protein kinase Tec
MY7A	Myosin VIIa
VINE-D1	Vinexin, SH3 Domain #1
CRKL-D1	CRK-like protein, SH3 Domain #1
TRIP10	Cdc42-interacting protein 4
NCK2-D2	Cytoplasmic protein NCK2, SH3 Domain #2
VINE-D3	Vinexin, SH3 Domain #3
CSKP	Peripheral plasma membrane protein CASK
PIG2	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma 2
NCK2-D3	Cytoplasmic protein NCK2, SH3 Domain #3
c-Src	Cellular Rous Sarcoma viral oncogene homolog
NCK1-D2	Cytoplasmic protein NCK1, SH3 Domain #2
ARH6	Rho guanine nucleotide exchange factor 6
RHG4	Rho-GTPase-activating protein 4
NE-DLG	Presynaptic protein SAP102
BCA1	CRK-associated substrate
SH31	SH3-containing GRB2-like protein 1
NOF2-D2	Neutrophil cytosol factor 2, SH3 Domain #2
BIN1	Myc box dependent interacting protein 1
SNX9	Sorting nexin 9

OSF	Osteoclast stimulating factor 1
EFS	Embryonal Fyn-associated substrate UBASH3A
UAS3	UBASH3A

Las secuencias que codifican para los dominios SH3-*binding* de las proteínas en estudio se clonaron en el vector de expresión pETEV15b o pET15b (Tabla M-5), modificados del vector pET-15b (Novagen), que permite obtener proteínas de fusión unidas a una cola de 8xHis en su extremo N-terminal (Figura M-5) y se transformaron en la cepa de *E.Coli* BL21. La expresión de la proteína de fusión SH3-*binding* unida a colas de histidinas se analizó mediante SDS-PAGE y *Western blot*. Se purificó el extracto proteico mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna quelante de níquel His-Trap (GE-Healthcare). Las proteínas se cuantificaron mediante el método de *Bradford*.

Tabla M-5. Lista de construcciones utilizadas para la realización de la hibridación de los *Arrays* de Dominios SH3.

<i>Inserto</i>	<i>Vector</i>
C3G-SH3b	pETEV15b ^a (vector que contiene un sitio de digestión TEV)
Cbl-SH3b	pET15b-NBKSXa ^a
p130CasP2 (SH3-b C-T)	pET15b-NBKSXa ^a

^a *construidos en el laboratorio del Dr. de Pereda por modificación del vector comercial pET-15b.*

Para la hibridación, se cubrió la membrana *array* con 5 ml de tampón de lavado 1X (Panomics). Tras 30 minutos de lavado se bloqueó la membrana añadiendo 5 ml de tampón de bloqueo 1X (Panomics) durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación. Se lavó la membrana añadiendo 6 ml de tampón de lavado 1X y se incubó con 20 µg/ml de proteína purificada diluida en tampón de bloqueo 1X durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación lenta. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos a temperatura ambiente con 6 ml de tampón de lavado. Para llevar a cabo la detección de hibridación de la proteína de fusión se incubó la membrana con 4 ml de anticuerpo anti-Histidina diluido en tampón de lavado 1X durante 1 hora. Una vez más, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con tampón de lavado a temperatura ambiente.

La detección se realizó mediante quimioluminiscencia utilizando el sistema ECL plus.

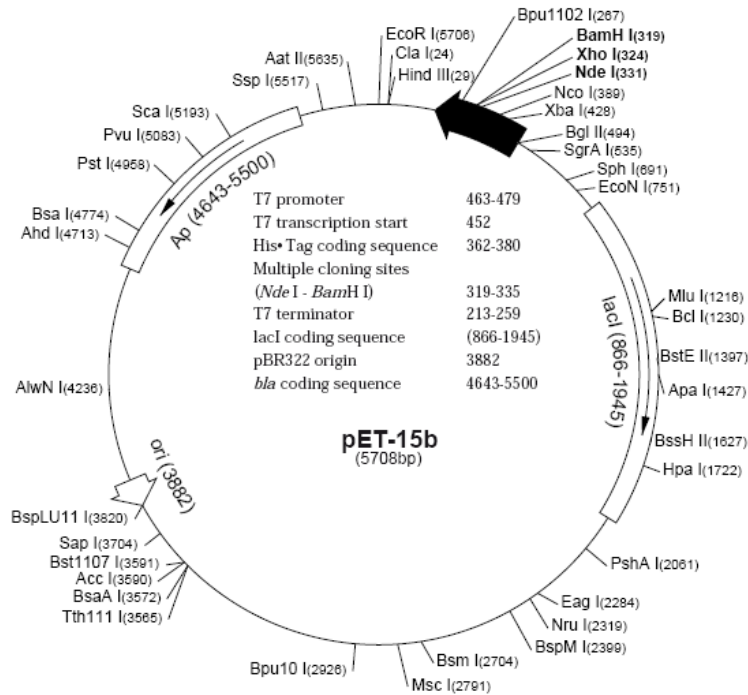


Figura M-5. Esquema del vector pET-15b que contiene una secuencia N-terminal *His Tag* seguida de un sitio trombina y tres sitios únicos de clonaje (en negrita). La secuencia está numerada en base a pBR322, lo que hace que la expresión de la región T7 sea reversa en el mapa circular.

Análisis estadístico

Los datos están representados como media \pm SEM. Para determinar la significancia estadística hemos utilizado la prueba t-Student no pareada por estar hechas todas las comparaciones entre dos grupos experimentales independientes. Los resultados se consideraron significativos cuando $p < 0,05$.



RESULTADOS

I. CARACTERIZACIÓN DE LA RUTA APOPTÓTICA C3G-p38 MAPK EN CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

Como se ha descrito en la introducción, la proteína C3G parece tener un papel en la leucemia mieloide crónica (LMC), ya que la isoforma truncada, p87C3G, se expresa abundantemente en células de LMC y además interacciona con Bcr-Abl. Por otra parte, se ha descrito que C3G tiene un papel en apoptosis en células hematopoyéticas a través de su interacción con la quinasa Hck (Shivakrupa *et al.*, 2003). A su vez, p38 MAPK parece tener una función en la apoptosis mediada por STI-571, la cual no está totalmente elucidada, y existen datos en la bibliografía que muestran una relación cruzada entre Rap1 y p38 MAPK (Stork y Dillon 2005). En base a todo ello uno de los objetivos de esta Tesis fue determinar si C3G y p38 MAPK podrían modular conjuntamente los efectos anti-proliferativos y pro-apoptóticos de STI-571 en células de LMC. Además, se pretendía identificar elementos que pudiesen participar en la posible vía reguladora de apoptosis C3G-p38 MAPK.

La sobre-expresión de C3G induce apoptosis en la línea K562

En células hematopoyéticas C3G tiene un papel pro-apoptótico (Shivakrupa *et al.*, 2003). Por otro lado, STI-571 inhibe la actividad tirosina quinasa de Bcr-Abl, lo que resulta en la desregulación de las vías de proliferación y supervivencia, y desencadena apoptosis en células que expresan Bcr-Abl (Jacquel *et al.*, 2003). Basándonos en lo anterior, nos propusimos determinar si C3G puede ser un mediador del efecto apoptótico de STI-571 en la línea celular de LMC, K562. Para este propósito, utilizamos clones estables de K562 que sobre-expresan C3G en el plásmido de expresión pLTR2 (Guerrero *et al.*, 2004; Guerrero *et al.*, 1998). La Figura I-1 muestra que la construcción pLTR2C3G incrementa los niveles de expresión de la isoforma p140 de C3G, tanto a nivel de mRNA (Figura I-1A) como de proteína (Figura I-1B)

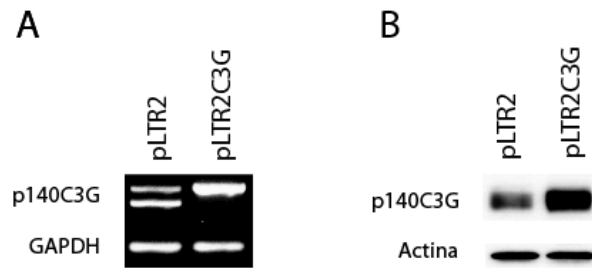


Figura I-1. Expresión de C3G en células K562 portadoras de la construcción pLTR2C3G. **(A)** Análisis mediante PCR semicuantitativa de la expresión del mRNA de C3G con la utilización de los oligos Ex2F-Ex4R y normalizado frente a GAPDH. **(B)** *Western blot* representativo de la expresión proteica de C3G detectada con el anticuerpo anti-C3G (C-19) y normalizada frente a β -actina.

Primeramente, se midieron los niveles basales de apoptosis de los clones control (pLTR2) y con C3G sobre-expresado (pLTR2C3G) mediante el doble marcaje con los marcadores específicos, anexina-V and 7-AAD. La Figura I-2 muestra que, la sobre-expresión de C3G duplica el nivel de apoptosis basal. Este resultado está de acuerdo con datos previos de otros autores (Shivakrupa *et al.*, 2003). Es importante destacar que el alto índice de apoptosis basal observado en el control pLTR2 puede ser debido a la toxicidad de la selección en el medio Killer Hat (Guerrero, observaciones no publicadas).

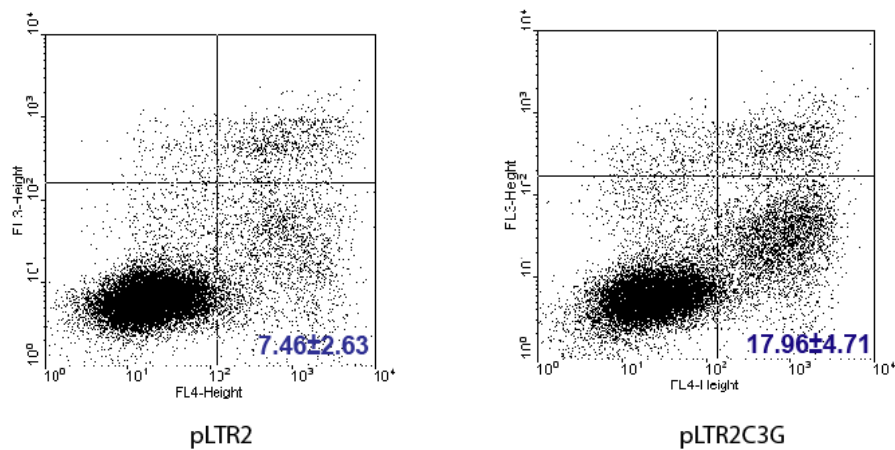


Figura I-2. Los niveles basales de apoptosis aumentan en células K562 que sobreexpresan C3G. Análisis por citometría de flujo de los marcadores anexina-V y 7-AAD en células K562 transfectadas permanentemente con los plásmidos indicados. Se muestra un experimento representativo donde se indica la media \pm SEM del porcentaje de las células positivas para anexina-V y negativas para 7-AAD (células con apoptosis temprana, cuadrante bajo/derecha) de 3 experimentos independientes.

El silenciamiento génico de C3G también incrementa la apoptosis basal

Para corroborar este resultado, hicimos clones estables de K562 donde la expresión de C3G fue silenciada mediante RNA de interferencia. Para ello se transfectaron establemente células de K562 con la construcción pSuper-C3Gi (ver Materiales y Métodos). Los niveles de expresión de ambas isoformas, p140C3G y p87C3G fueron modulados por dicha construcción tanto a nivel de mRNA (Figura I-3A) como de proteína. (Figura I-3B).

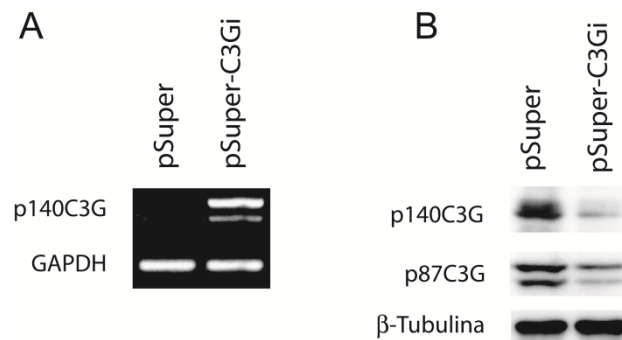


Figura I-3. Expresión de C3G en células K562 transfectadas permanentemente con pSuper-C3Gi. **(A)** Análisis mediante PCR semicuantitativa de la expresión del mRNA de C3G con la utilización de los oligos Ex2F-Ex4R y normalizado frente a GAPDH. **(B)** *Western blot* representativo de la expresión proteica de C3G detectada con el anticuerpo anti-C3G (C-19). La expresión de β -tubulina se utilizó como control de carga.

En contraste con lo que se esperaba, el silenciamiento de C3G también aumentó la apoptosis basal en células K562, incluso en mayor porcentaje que la sobre-expresión de C3G (Figura I-4), siendo este incremento de 4 veces con respecto al control.

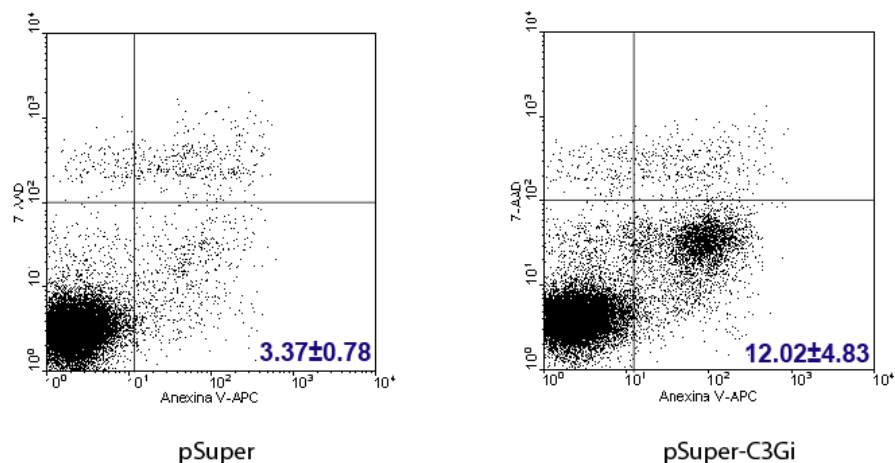


Figura I-4. El silenciamiento génico de C3G induce apoptosis en células K562. Análisis por citometria de flujo de los marcadores anexina V y 7-AAD en células K562 transfectadas permanentemente con los plásmidos indicados. Se muestra un experimento representativo donde se indica la media \pm SEM del porcentaje de las células positivas para anexina y negativas para 7-AAD (células con apoptosis temprana, cuadrante bajo/derecha) de 3 experimentos independientes.

Para corroborar estos resultados, se analizó la expresión del fragmento proteolizado de PARP-1, un indicador de apoptosis. La Figura I-5 muestra un aumento en la cantidad del fragmento proteolizado de 85 kDa, tanto en los clones con sobre-expresión de C3G como en los clones con expresión disminuida (*knock-down*) en comparación con sus respectivos controles.

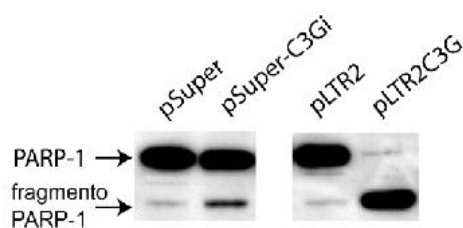


Figura I-5. Análisis de la expresión de PARP-1 en células K562 transfectadas permanentemente con las construcciones pLTR2C3G y pSuper-C3Gi. Las construcciones pSuper-C3Gi y pLTR2C3G inducen un aumento de la proteólisis de PARP-1 con respecto a los vectores vacíos.

C3G participa en la vía de apoptosis inducida por STI-571 en células K562 a través de la regulación de p38 MAPK

C3G regula la apoptosis inducida por STI-571

El STI-571 inhibe la actividad quinasa de Bcr-Abl, lo que resulta en apoptosis en células de LMC (Jacquel *et al.*, 2003). Quisimos comprobar el tiempo mínimo de incubación de las células K562 con STI-571 para que la actividad quinasa de Bcr-Abl se encontrara totalmente inhibida. Para ello se inmunoprecipitaron lisados de K562 con anticuerpo anti-pY y la proteína Bcr-Abl fosforilada se detectó mediante *Western blot* con anticuerpos anti-Bcr. Los resultados indican que en nuestro modelo celular la inhibición total de Bcr-Abl ocurre entre 30 min y 1h de incubación con 2 μ M de STI-571 (Figura I-6), en concordancia con la literatura (Parmar *et al.*, 2004). La inhibición de p38 MAPK mediante SB203580 potenció el efecto inhibitor del STI-571 sobre la fosforilación de Bcr-Abl.

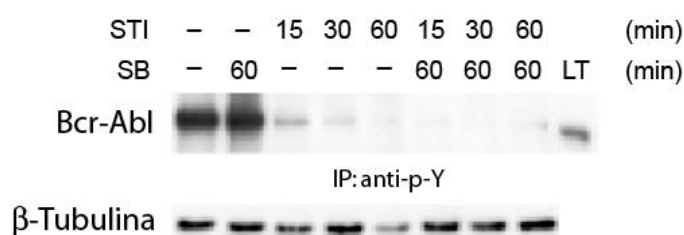


Figura I-6. STI-571 inhibe totalmente la actividad tirosina quinasa de Bcr-Abl entre 30 minutos y 1 h de incubación en células K562. Las células fueron mantenidas con o sin tratamiento con SB203580 (SB) durante 60 minutos y posteriormente se añadió 2 μ M de STI-571 (STI) a los tiempos indicados. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-fosfo-tirosina. *Western blot* representativo del análisis de la fosforilación de Bcr-Abl normalizado con β -tubulina. LT: lisado total.

A continuación, se estudió si la desregulación de C3G podría contribuir a la apoptosis mediada por STI-571. Para ello, se trataron los clones con sobre-expresión o expresión disminuída de C3G con STI-571 2 μ M durante 48 h y se midió el porcentaje de apoptosis. Los resultados indican que, al igual que en condiciones basales, tanto la sobre-expresión como el silenciamiento de C3G indujeron un aumento de la apoptosis mediada por STI-571 (Figura I-7). Estos resultados indican que C3G participa en la regulación de la apoptosis inducida por STI-571 en células de LMC.

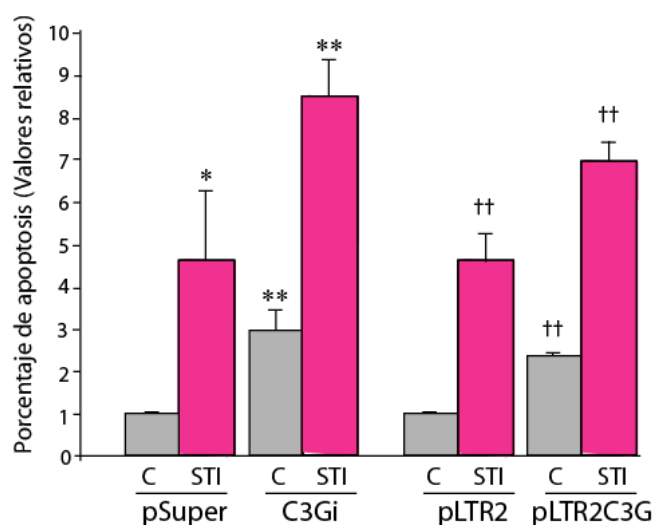


Figura I-7. Función de C3G en la apoptosis inducida por STI-571, representada como el porcentaje de células positivas para anexina V y negativas para 7-AAD respecto a los controles pSuper y pLTR2 (valor relativo a 1). Células transfectadas con pSuper, pSuper-C3Gi, pLTR2 o pLTR2C3G con o sin tratar con 2 μ M de STI-571 durante 48 h. El histograma representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs pSuper-C; † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ vs pLTR2-C. C: Células control no tratadas; STI: STI-571.

Está descrito, que la sobre-expresión de proteínas puede alterar la estequiometría de los complejos proteicos endógenos, particularmente los que involucran a los adaptadores de la familia Crk. Por ejemplo, la expresión ectópica de Bcr-Abl en células NIH3T3 altera la interacción entre C3G y CrkL (de Jong *et al.*, 1998). De hecho, Bcr-Abl induce anomalías en las funciones del citoesqueleto en células de LMC a través de la disrupción de las interacciones normales entre moléculas de adhesión. Dado que C3G y Bcr-Abl forman complejos en células de LMC a través de CrkL y otras moléculas (Salgia *et al.*, 1996a; Salgia *et al.*, 1996b; Salgia *et al.*, 1997) (ver capítulo II de Resultados), se pensó que la sobre-expresión de C3G podría alterar fisiológicamente las interacciones entre las proteínas del complejo, por lo que en futuros experimentos nos centramos en el efecto del clon de K562 con expresión de C3G silenciada.

C3G regula la activación de p38 α MAPK inducida por STI-571

Estudios anteriores han demostrado que p38 α MAPK tiene una función pro-apoptótica. Por otra parte, el papel de p38 MAPK en la apoptosis mediada por STI-571

no está claro. Algunos autores describen una ausencia de efecto del STI-571 en la fosforilación basal de p38, mientras otros relatan un papel de p38 MAPK en los efectos anti-proliferativos de STI-571 en células que expresan Bcr-Abl (Galan-Moya *et al.*, 2008; Jacquel *et al.*, 2003; Jacquel *et al.*, 2007). Para establecer nuevas aproximaciones en este campo, se estudió si p38 MAPK es activado por STI-571 y si es regulado por C3G en nuestro modelo de estudio. Para determinar el efecto de STI-571 en la fosforilación de p38, se usaron células silenciadas para p38 α MAPK (p38 α i). El silenciamiento de p38 α en células K562 es visible en la Figura I-8A. Como se observa en la Figura I-8B la fosforilación p38 MAPK inducida por STI-571 apenas fue detectada en células K562 control, lo que está de acuerdo con otros autores (Galan-Moya *et al.*, 2008; Jacquel *et al.*, 2003; Jacquel *et al.*, 2007). Sin embargo, la fosforilación de p38 MAPK fue evidente en los clones con silenciamiento génico de C3G tratados con STI-571. Esta fosforilación de p38 MAPK, inducida por el silenciamiento de C3G, se encuentra disminuida en clones doble *knock-down* para C3G y p38 α MAPK tratados con STI-571, indicando que p38 α es probablemente la isoforma regulada por C3G. Estos resultados sugieren la existencia de una relación funcional entre C3G y p38 α MAPK en la señalización mediada por STI-571 en K562, con C3G actuando como un regulador negativo de p38 α MAPK.

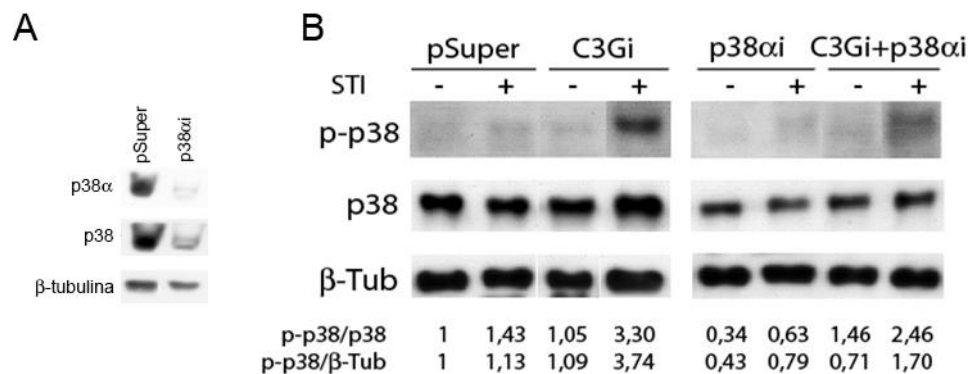


Figura I-8. El silenciamiento de C3G aumenta la activación de p38 MAPK inducida por STI-571. **(A)** Nivel de expresión de p38 α y p38 MAPK en células pSuper-p38 α i y células control pSuper. **(B)** Clones de K562 que expresan pSuper, pSuper-C3Gi, pSuper-p38 α i o ambas construcciones fueron tratados o no con STI-571 2 μ M durante 30 min. Se muestra un *Western blot* representativo de la fosforilación de p38 MAPK normalizado con p38 total y β -tubulina. Se muestran las proporciones relativas entre p-p38 y p38 total y p-p38 y β -tubulina.

Para profundizar en el efecto de C3G en la regulación de la vía de p38 MAPK inducida por STI-571, se realizó un ensayo quinasa *in vitro* de p38 MAPK en clones

con expresión silenciada para C3G o p38 α MAPK utilizando el sustrato de p38 MAPK, ATF-2. En la Figura I-9 se puede observar que, aunque STI-571 estimula de forma clara la fosforilación de ATF-2 en células control, la interferencia de la expresión de C3G indujo un aumento de los niveles basales de fosfo-ATF-2, que fue aún mayor en presencia de STI-571. El aumento de fosfo-ATF-2 es debido en su mayoría a la isoforma p38 α ya que el clon con expresión silenciada de p38 α presentó niveles basales de fosforilación de ATF-2. Estos resultados confirman que C3G está involucrado en la regulación de los efectos de STI-571 a través de la inhibición de p38 α MAPK.

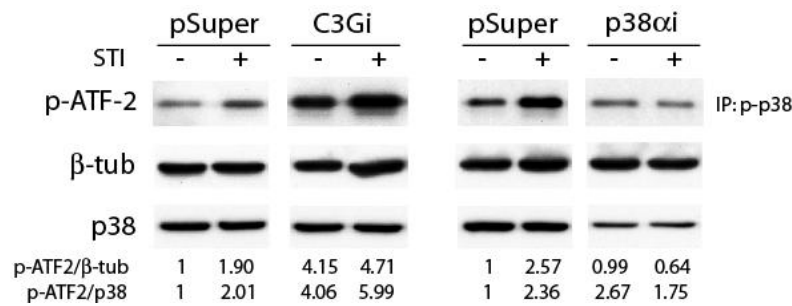


Figura I-9. Ensayo in vitro de p38 MAPK, utilizando la proteína ATF-2 purificada, llevado a cabo con lisados totales de los clones de K562 indicados. La fosforilación de ATF-2 se visualizó mediante *Western blot* con el anticuerpo anti-fosfo-ATF-2. Para determinar los niveles de p38 y β -tubulina en las muestras se utilizaron cantidades similares de proteína de cada clon (20 μ g). Se indican las proporciones relativas de p-ATF/ β -tubulina y p-ATF/p38.

El silenciamiento de C3G incrementa la apoptosis inducida por STI-571 a través de la activación de p38 α MAPK

A pesar de que la activación de p38 por STI-571 no fue significativa se observó una disminución (25-30%) en la apoptosis mediada por STI-571 cuando células control K562 transfectadas con pSuper fueron tratadas con el inhibidor SB203580 (3.60 ± 0.81 en pSuper STI+SB vs 4.61 ± 1.62 en pSuper STI) (Figura I-10). Valores semejantes se observaron cuando se disminuyó la expresión de p38 α mediante RNA de interferencia (3.72 ± 1.37 en p38 α i STI vs 3.60 ± 0.81 en pSuper STI+SB). Estos resultados indican que la isoforma p38 α participa, en parte, en el efecto apoptótico de STI-571. El efecto pro-apoptótico de p38 α fue más evidente en células que expresan pSuper-C3Gi donde el tratamiento con SB203580 condujo a una disminución del 25-30% en los niveles de apoptosis inducida por STI-571 (6.33 ± 0.23 en C3Gi STI+SB vs 8.47 ± 0.87 en C3Gi STI). Estos resultados sugieren, la participación de C3G y p38 α MAPK en una vía

común pro-apoptótica inducida por STI-571, donde C3G regula negativamente la actividad de p38 α MAPK y, por tanto, la apoptosis. Apoyando estos resultados, el silenciamiento de p38 α disminuyó la apoptosis inducida por STI-571 en células con expresión silenciada para C3G, efecto semejante al observado con el tratamiento con SB203580 (4.75 \pm 0.94 en C3Gi+p38 α i STI vs 8.47 \pm 0.87 en C3Gi STI). Estos resultados confirman la existencia de una relación funcional entre C3G y p38 α en la apoptosis inducida por STI-571 en células K562.

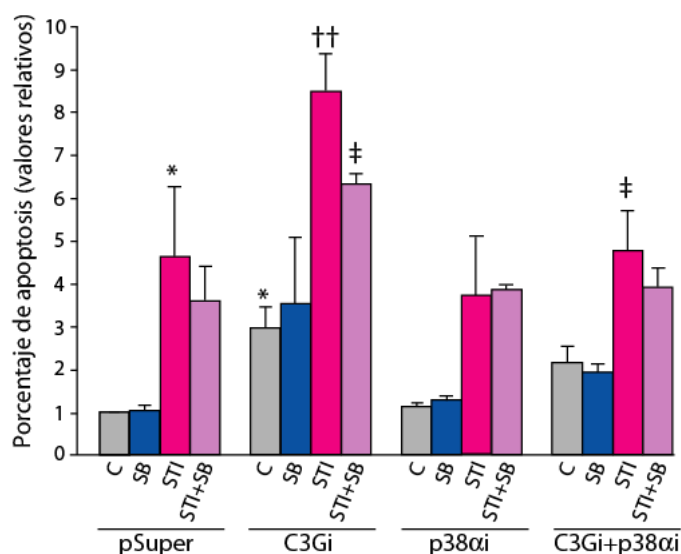


Figura I-10. Función de C3G y p38 α MAPK en la apoptosis inducida por STI-571, representada como el porcentaje de células positivas para anexina V y negativas para 7-AAD respecto al control pSuper (valor relativo a 1). Los valores presentados son la media \pm SEM de tres experimentos independientes. Todos los valores son relativos a las células K562 transfectadas con el vector vacío pSuper.neo+gfp (pSuper-C) no tratadas. *p<0.05 vs pSuper-C; ††p<0.01 vs C3Gi-C; ‡p<0.05 vs C3Gi-STI.

El efecto de C3G sobre p38 MAPK está mediado por Rap1

Stork y Dillon revisaron en 2005 el papel inhibitor de Rap1 en la vía de p38 MAPK en células hematopoyéticas (Stork y Dillon 2005). Por ejemplo, en timocitos p38 MAPK es activado por interleucina-1 (IL-1) de una manera dependiente de Ras, y Rap1 antagoniza este proceso (McDermott y O'Neill 2002; Remans *et al.*, 2004). Para correlacionar el efecto observado por el silenciamiento de C3G en la fosforilación de p38 MAPK con el efecto inhibitor de Rap1 sobre esta quinasa, se analizó la activación de Rap1 en células K562 que expresan pSuper-C3Gi. La Figura I-11A muestra una disminución dramática de los niveles de Rap1-GTP en el clon C3Gi, tanto en células no

tratadas como en las tratadas con STI-571. Estos datos indican que la activación de Rap1 depende casi completamente de C3G en estas células. Por otra parte, células K562 que expresan el mutante dominante negativo de Rap1 (Rap1S17N) presentaron un incremento en la activación de p38 en respuesta a STI-571 (Figura I-11), de manera similar al observado en células con pSuper-C3Gi. Estos resultados sugieren la participación de Rap1 en el efecto antagonista de C3G sobre p38 α MAPK.

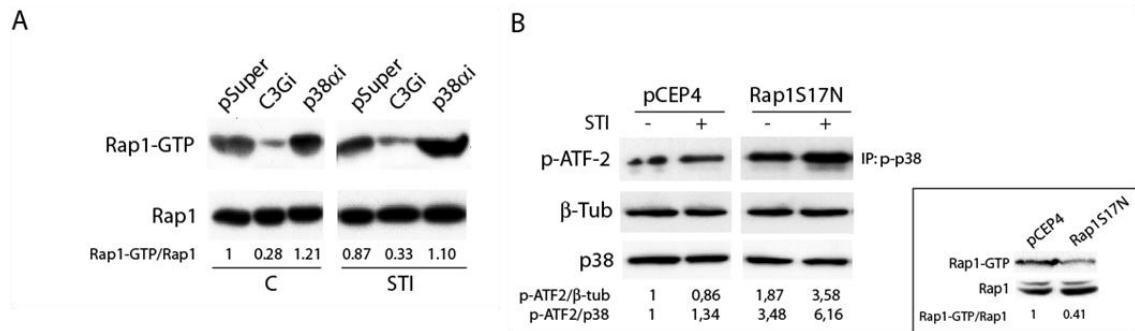


Figura I-11. C3G-Rap1 inhibe la activación de p38 MAPK inducida por STI-571 en células K562. (A) Los clones K562 indicados se trataron o no con 2 μ M de STI-571 durante 30 min y se determinó los niveles de Rap1-GTP mediante *pull-down* con GST-RalGDS (Panel superior). Niveles de Rap1 total en las mismas muestras (Panel inferior). Se muestran las proporciones relativas de Rap1-GTP/Rap1 total. (B) Ensayo *in vitro* de p38 MAPK, utilizando la proteína ATF-2 purificada, en lisados totales de clones K562 que expresan la construcción dominante negativa de Rap1 (Rap1S17N) o el vector vacío (pCEP4). Tras la reacción quinasa, las muestras se revelaron con el anticuerpo anti-p-ATF-2 (panel superior). Se utilizaron cantidades similares de proteína de cada clon (20 μ g) para determinar los niveles de p38 y β -tubulina en las muestras (paneles mediano e inferior). Se muestran las proporciones relativas de p-ATF2/ β -tubulina y p-ATF2/p38. Como control de transfección se realizó un ensayo de Rap1-GTP utilizando los lisados de células K562 transfectadas con Rap1S17N y pCEP4, normalizados contra Rap1 total (Caja).

C3G antagoniza el efecto inhibitor de STI-571 sobre las rutas de supervivencia

El efecto apoptótico de STI-571 es una consecuencia de la inhibición de diferentes vías de supervivencia, como las vías de ERK y PI3K-Akt, activadas por Bcr-Abl (Jacquel *et al.*, 2003). Para determinar si C3G y p38 MAPK también participan en el efecto inhibitor de STI-571 sobre estas vías se analizaron los niveles de fosfo-ERK1/2 y fosfo-Akt en los clones de K562 que expresan pSuper-C3Gi o pSuper-p38 α i tratados o no con STI-571 y en presencia o ausencia del inhibidor de p38 α MAPK, SB203580. La Figura I-12A muestra que en las células no tratadas, los niveles de fosforilación de ERK fueron ligeramente mayores en los clones C3Gi y p38 α i en

comparación con las células control transfectadas con pSuper. Por otra parte, como era de esperar, STI-571 inhibió fuertemente la fosforilación de ERK. Este efecto inhibitor de STI-571 sobre fosfo-ERK1/2 fue parcialmente revertido en el clon con silenciamiento de C3G (C3Gi) y en menor grado en el *knock-down* de p38 α MAPK (p38 α i), y casi completamente revertido con el tratamiento con SB203580. Estos resultados concuerdan con nuestras observaciones previas y de otros grupos, con respecto al efecto inhibitor, tanto de C3G (Guerrero *et al.*, 2004; Voss *et al.*, 2006) como de p38 MAPK sobre la activación de ERK (Grethe y Porn-Ares 2006; Liu y Hofmann 2004; Porras *et al.*, 2004). Los menores niveles de fosfo-ERK observados en el clon C3Gi tratado con STI+SB, en comparación con los clones pSuper y p38 α i, es probablemente debido al efecto positivo que el silenciamiento de C3G tiene sobre la fosforilación de p38 MAPK (que a su vez inhibe ERK). De acuerdo, con estudios anteriores (Guerrero *et al.*, 2004), el efecto del silenciamiento de C3G sobre fosfo-ERK es independiente de su actividad GEF sobre Rap1, ya que el mutante dominante negativo de Rap1 (Rap1S17N), inhibió la fosforilación de ERK (Figura I-12B), de acuerdo con la activación de la vía B-Raf-ERK mediada por Rap1 en estas células (Stork y Dillon 2005).

Por lo que se refiere a la fosforilación de Akt, de acuerdo con otros autores se detectaron niveles basales muy bajos de fosforilación de Akt en células K562, que no se alteraron en presencia de STI-571 (Jacquel *et al.*, 2003). No obstante, se detectó un aumento de los niveles de fosfo-Akt en células tratadas con SB203580, que fue aún más evidente en células donde la expresión de C3G o p38 α había sido silenciada (Figura I-12A). Estos resultados sugieren un papel regulador negativo de C3G y p38 α MAPK en la activación de Akt en células K562, observaciones que concuerdan con datos previos en otros tipos celulares (Voss *et al.*, 2006; Zuluaga *et al.*, 2007a).

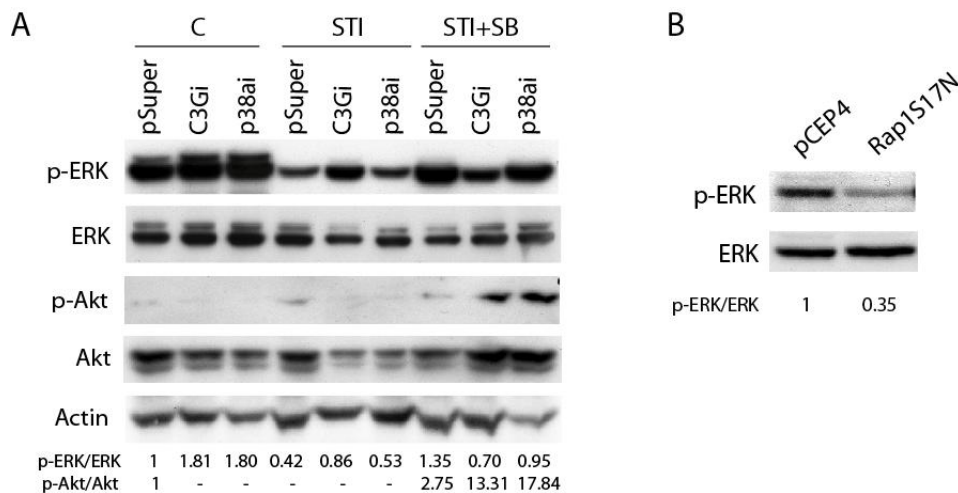


Figura I-12. Participación de C3G y p38 α MAPK en la inhibición de señales de supervivencia. **(A)** Clones de K562 expresando el shRNA para C3G, p38 α o el vector vacío se trataron con STI 2 μ M durante 30 minutos, solo o tras el pre-tratamiento con 5 μ M de SB203580 durante 1h, y se determinaron los niveles de p-ERK y p-Akt mediante *Western blot* con anticuerpos anti-fosfo específicos. El *blot* mostrado es representativo de cuatro experimentos independientes. Los valores obtenidos se normalizaron frente a ERK total, Akt total y actina. Se muestra la relación p-ERK/ERK y p-Akt/Akt. **(B)** Los niveles de p-ERK y ERK se determinaron en lisados celulares (30 μ g) de los clones K562 que expresan la construcción dominante negativa de Rap1 (Rap1S17N) o el vector vacío pCEP4. Se muestra la relación p-ERK/ERK.

C3G regula la transcripción de genes involucrados en apoptosis

Con el fin de profundizar en el papel regulador de C3G en células K562 de LMC se realizó un análisis del transcriptoma de las células K562 con expresión silenciada para C3G, utilizando *GeneChips* de Affymetrix HG-U133 plus2. Para ello, los *GeneChips* se hibridaron con cRNA de células K562 transfectadas permanentemente con las construcciones pSuper (3 chips) o pSuper-C3Gi (2 chips). Se utilizó el algoritmo SAM (Tusher *et al.*, 2001) para identificar los genes expresados diferencialmente en los clones que expresan pSuper-C3Gi con respecto al control (Figura I-13).

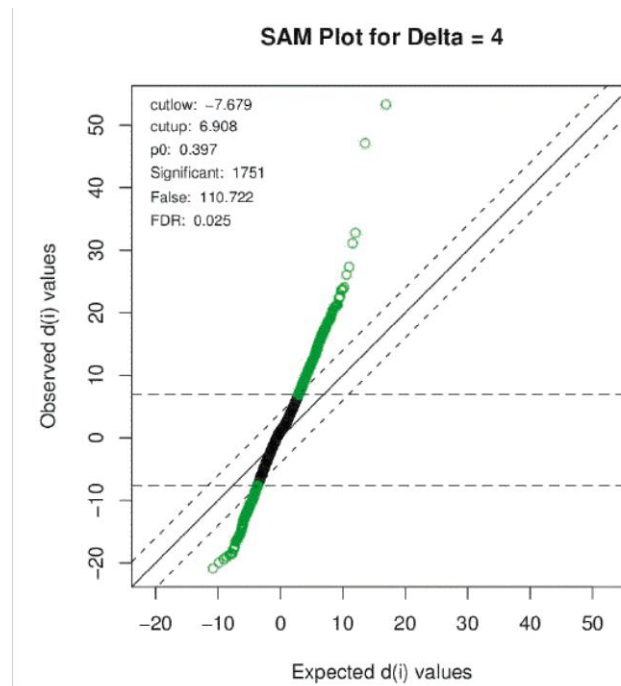


Figura I-13. Identificación estadística de los genes diferencialmente expresados en las líneas celulares silenciadas para C3G. Los puntos de color verde identifican los “conjuntos de sondas” que presentan alteraciones significativas en la expresión. Marcando un umbral (Delta) de 4, se obtuvo un valor astringente de falsos positivos (*false discovery rate* o FDR) de 0,025, lo cual identificó 1751 sondas génicas diferencialmente expresadas en la línea celular pSuper-C3Gi con respecto a las células control pSuper.

La caracterización funcional de los genes con expresión diferencial a través de FatiGO (Babelomics) (Al-Shahrour *et al.*, 2004), (www.fatigo.org) reveló que el 52,41% de los genes en el GO: “procesos biológicos de nivel 9” (el más específico) estaban involucrados en apoptosis (67 genes), con 45 genes regulados positivamente y 22 genes regulados negativamente en los clones con silenciamiento para C3G (Figura I-14 y Tabla I-1). Algunos de estos genes involucrados en apoptosis también están implicados en control del daño y reparación del DNA. Se ha descrito que Bcr-Abl induce mutaciones en genes responsables del control del genoma y de la reparación del DNA (revisado por Melo y Barnes 2007), por lo que decidimos incluir estos genes en nuestro análisis. El análisis de los chips reveló que 1,38% de los genes en el GO: “procesos biológicos del nivel 9” estaban involucrados en el control de daño y reparación del DNA (Figura I-14). La mayoría de estos genes presentaban una regulación positiva con la excepción de los genes DDB2, ERCC5 y PARP2 que estaban regulados negativamente en los clones silenciados para C3G (Tabla I-2).

Proceso Biológico. Nivel: 9

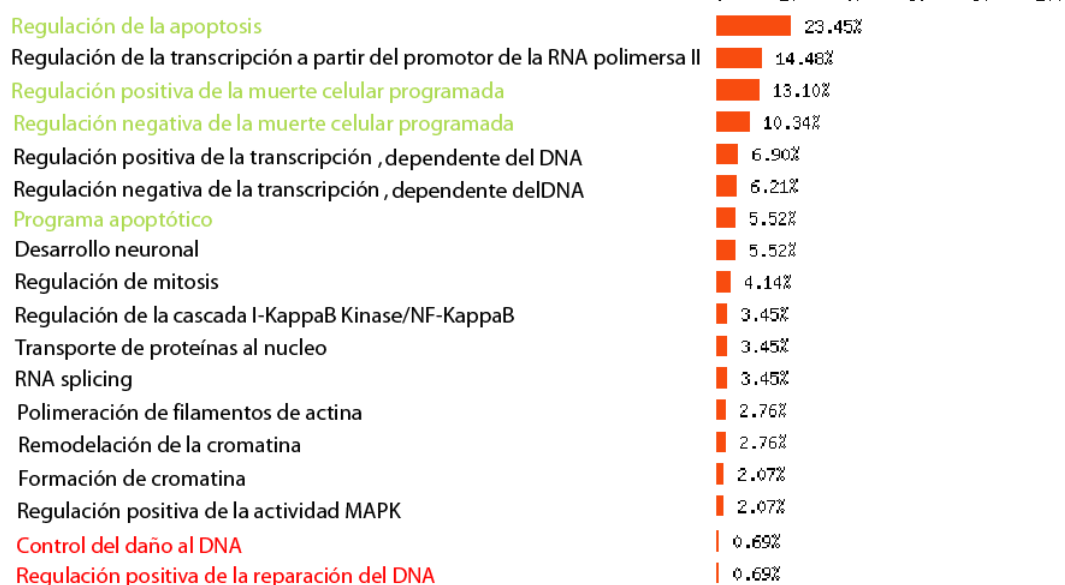


Figura I-14. Perfil de expresión asociado al silenciamiento génico de C3G en células K562. El perfil representado corresponde al análisis realizado en FatiGo (GO: procesos biológicos de nivel 9). Este análisis reveló que el 52,41% de los genes estaban involucrados en apoptosis (verde) y que 1,38% de los genes estaban involucrados en la reparación, recombinación y replicación del DNA (rojo).

Tabla I-1. Genes diferencialmente expresados relacionados con Apoptosis y Muerte programada identificados en células *knock-down* para C3G. La lista corresponde al análisis realizado en FatiGo, (GO: proceso biológico de nivel 9). ERCC5, MAP3K1 y PTTG1 pueden ejercer tanto funciones apoptóticas como anti-apoptóticas. * genes analizados por *Western blot*.

	<i>Regulados positivamente</i>		<i>Regulados negativamente</i>	
<i>Pro-apoptosis</i>	ADAMTSL4	MAP3K1	ATG5	
	ATF5	PARP10*	BAX*	
	BBC3	PDCD5	BRCA1	
	BCL6	PHF17	DIABLO*	
	BNIP3*	PTEN*	ERCC3*	
	BNIP3L	PTPRC	FADD*	
	CALR	PTTG1	FOXL2	
	CCAR1	RIPK2*	HIPK2	
	CEBPG	RTN4	PSEN2	
	DDIT3*	RYBP	RIPK1	
	DNASE2	SCARB1		
	DNM2	SCIN		
	ERCC5*	STX2*		
	LCK	TCF7		
	LITAF	TNFRSF10B		
	<i>Anti-apoptosis</i>	ARG2	PTTG1	AKT1S1
		BCL2*	SERPINB9	BFAR
		ERCC5*	SQSTM1	BID
		HSP90B1*	TNFAIP3	EP300
HSPA5		TPD52L1	FAIM	
IL1A		TRIB3	FASTKD2	
JAK2*			FASTKD5	

MAP3K1	HSPA1A
MITF	NME6
MXD1*	PHB
PIM1	PRKDC
PRKAA1	RPA2*

Tabla I-2. Genes diferencialmente expresados relacionados con control del daño y reparación del DNA identificados en células *knock-down* para C3G. La lista corresponde al análisis realizado en FatiGo, de los procesos biológicos del nivel 9. ^a genes analizados por PCR cuantitativa.

<i>Regulados positivamente</i>	<i>Regulados negativamente</i>		
DDB2 ^a	BRCA1 ^a	BRCA2 ^a	DCLRE1B
ERCC5 ^a	DDB1	ERCC3 ^a	GTF2H1
PARP2 ^a	PARP1	POLE2	PRKDC
	PRPF19	SMUG1	SUPT16H
	TDG	UNG	XRCC6 ^a
	ATR	BBC3 ^a	BRIP1
	PALB2	RPA2	PCNA
	POLE2	RPA1	

Algunos de los genes expresados diferencialmente involucrados en apoptosis y en reparación del DNA revelados por el análisis de los Genechips, fueron seleccionados para la corroboración de los resultados mediante análisis por PCR cuantitativa, utilizando el mRNA de los clones que expresan las construcciones pSuper y pSuper-C3Gi (Figura I-15). También se incluyó en el análisis el mRNA de los clones que expresan pSuper-p38 α i con el fin de estudiar la contribución de p38 α a la regulación de la expresión de genes implicados en control del daño y reparación del DNA dependiente de C3G (Figura I-16).

Los resultados de la PCR cuantitativa de la mayoría de los genes, como ERCC5, RIPK2, JAK2, MXD1, BBC3, PARP2, TOP2A, DDB2, VEGFA, PTEN y HSP90B1 validaron los resultados de los *GeneChips* (Figura I-15). Sin embargo los resultados de la PCR cuantitativa de unos pocos genes, como BAX, ERCC3, BRAC1, BRAC2, BID, RADIC5 y XRCC6 no concuerdan con los resultados de los *GeneChips*. La Figura I-16 representa en *LogRatio* los valores de la PCR cuantitativa de las células que expresan la construcción pSuper-C3Gi frente a células silenciadas para p38 α . Los resultados indican que todos los genes de control del daño y reparación del DNA analizados en células pSuper-p38 α i se ven afectados de la misma manera que en células C3Gi (Figura

I-16), lo que sugiere la participación de ambas proteínas en una ruta común de regulación del control del daño y reparación del DNA.

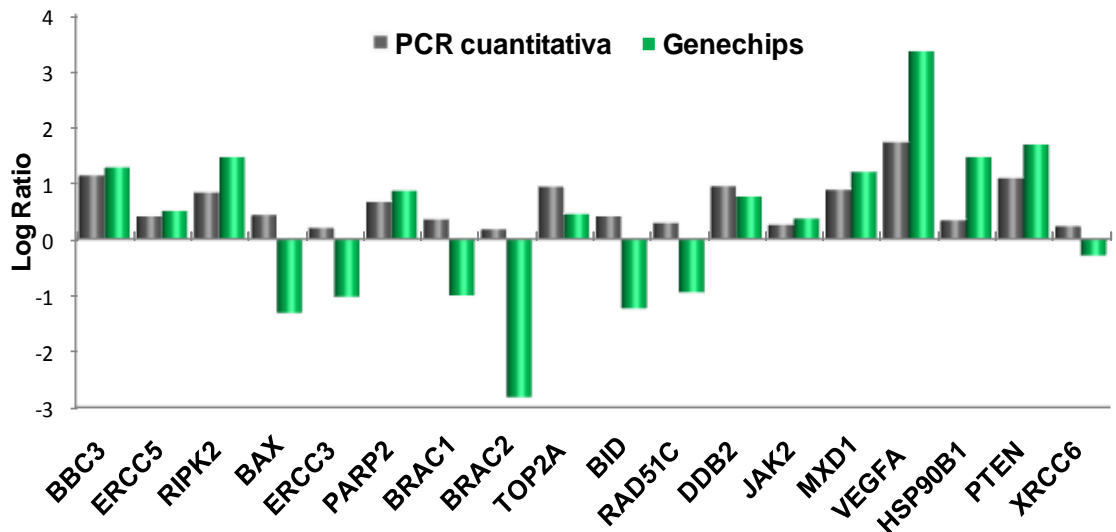


Figura I-15. Validación mediante PCR cuantitativa de los genes con expresión diferencial y análisis comparativo con los resultados de los *GeneChips*. Se utilizó mRNA de los clones K562 que expresan pSuper-C3Gi y mRNA de células pSuper como control. La gráfica representa los valores de la PCR cuantitativa frente a los valores de los *GeneChips* en Log Ratio.

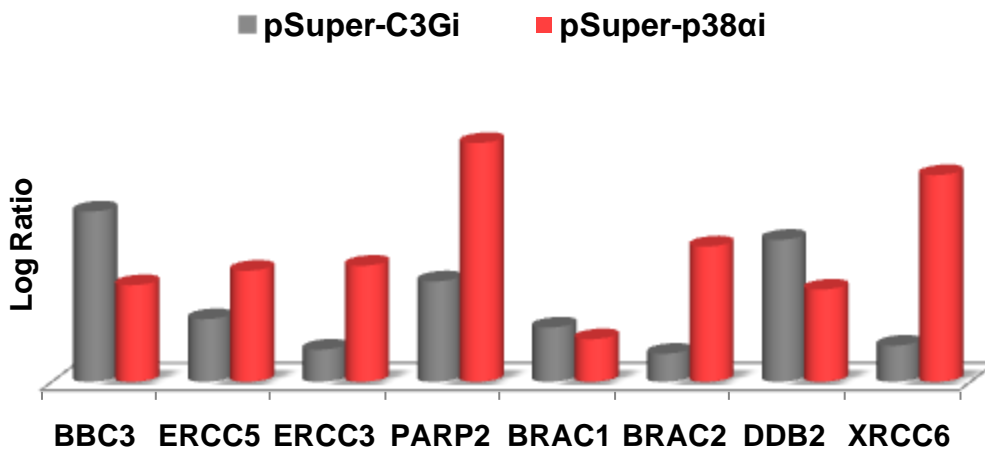


Figura I-16. Análisis comparativo, mediante PCR cuantitativa, de la expresión de genes de control de daño y reparación del DNA utilizando mRNA de los clones K562 que expresan pSuper-p38αi y pSuper-C3Gi y utilizando el mRNA de pSuper como control. La gráfica representa los valores en Log Ratio de C3Gi frente a p38αi.

Finalmente, para comprobar que la desregulación de esos genes a nivel de RNA se correspondía con una desregulación a nivel de proteína, se realizó una selección de

algunos de los genes con expresión diferencial para el análisis de su expresión proteica mediante *Western blot* utilizando anticuerpos específicos para las proteínas indicadas en la Tabla I-1 con asterisco. Para ello se utilizaron lisados totales de los clones de K562 que expresan pSuper y pSuper-C3Gi. También se incluyeron los lisados totales de los clones que expresan pSuper-p38 α i en el análisis (Figura I-17).

Los resultados de los *GeneChips* fueron validados por la mayoría de las proteínas analizadas por *Western blot*. Las excepciones fueron FADD, BAX y VEGF (Figura I-17D) que, presentaron una disminución (FADD y BAX) y un incremento (VEGF) de la expresión a nivel del RNA en clones pSuper-C3Gi en el análisis de los *GeneChips*, mientras que a nivel proteico la expresión resultó incrementada en FADD y BAX y sin alteración de la expresión en VEGF. En el caso de BAX, sin embargo, el resultado revelado por el análisis de la PCR cuantitativa está de acuerdo con el análisis de la expresión proteica. Los resultados de FADD y VEGF sugieren que estos genes sufren eventos adicionales de regulación al nivel pos-transcripcional, traducional y/o pos-traducional. Entre las proteínas que presentaron aumento de expresión a consecuencia del silenciamiento de C3G algunas son pro-apoptóticas (BNIP3, FADD, PTEN, BAX, RIPK2, ERCC5, DDTI, PARP10, STX2, ERCC3), lo cual está de acuerdo con el efecto del *knock-down* de C3G en el proceso de apoptosis. Por otra parte, el silenciamiento de C3G resulta en el incremento de la expresión de proteínas anti-apoptóticas, como BCL2, HSP90B1, ARG2, JAK2, y MXD1, así como en la disminución de las proteínas pro-apoptóticas ERCC3 y DIABLO (Figura I-17A). Algunas proteínas reguladas por C3G, o no se ven afectadas o están reguladas por el silenciamiento de p38 α de manera antagónica a lo que ocurre en células silenciadas para C3G (Figura I-17B). Por el contrario, otras proteínas, en su mayoría anti-apoptóticas, muestran el mismo comportamiento en su expresión en células *knock-down* para C3G y p38 α (Figura I-17B). También se validaron por *Western blot* genes involucrados en el desorden del tejido conectivo, como FN1 e ICAM2 (Figura I-17C), de acuerdo con el conocido papel de C3G en procesos de adhesión, así como genes que participan en la reparación, recombinación y replicación del DNA, como ERCC3 y ERCC5.

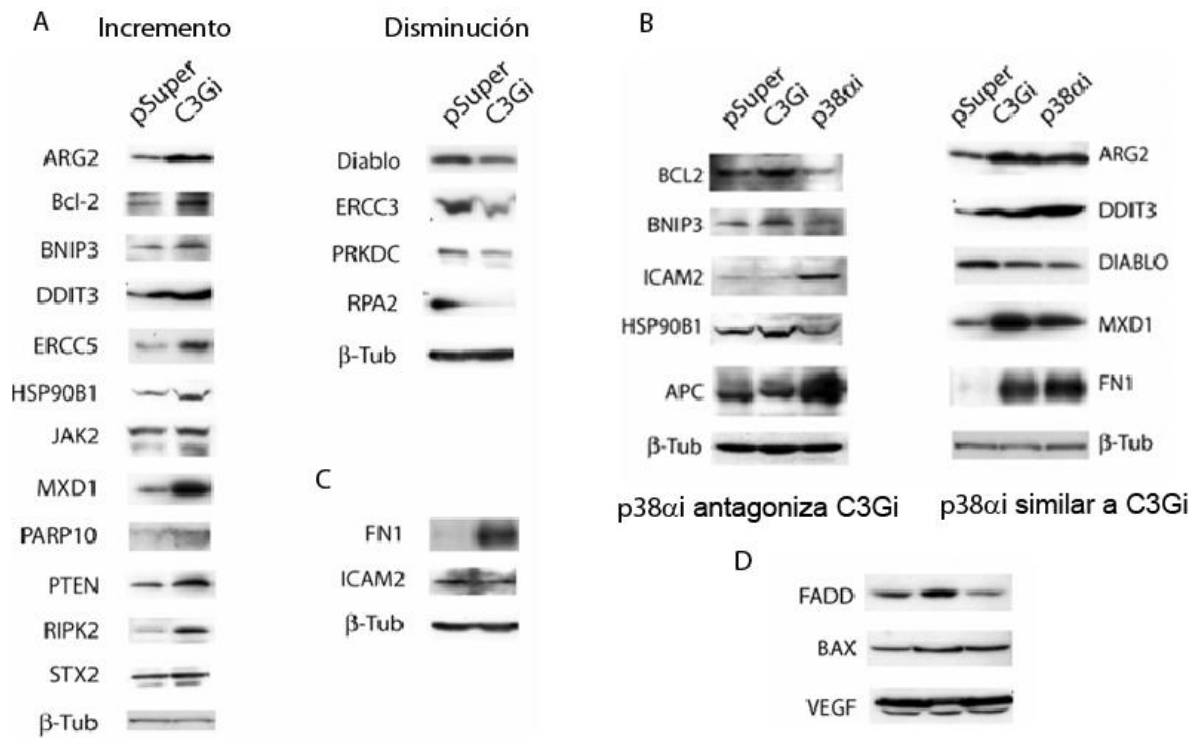


Figura I-17. Análisis de la expresión de las proteínas indicadas mediante *Western blot* utilizando lisados celulares (30 μ g) de los clones K562 que expresan pSuper, pSuper-C3Gi o pSuper-p38 α i. **(A)** *Western blots* representativos de las proteínas con expresión incrementada o disminuida en células pSuper-C3Gi y **(B)** proteínas cuya expresión es antagonista o similar en células con pSuper-C3Gi y pSuper-p38 α i comparadas con células control pSuper. **(C)** Proteínas implicadas en el desorden del tejido conectivo que presentan alternaciones en sus niveles de expresión en pSuper-C3Gi comparadas con pSuper. **(D)** Proteínas cuyo nivel de expresión proteica no coincide con el nivel de expresión de mRNA revelado en el análisis de los *Genechips*. La expresión de β -tubulina se utilizó como control de carga.

II. IDENTIFICACIÓN DEL INTERMEDIARIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE C3G Y BCR-ABL

El dominio SH3 de Bcr-Abl interacciona con C3G y con las proteínas Abi1, Cbl y p130Cas

Estudios previos de nuestro grupo y otros han demostrado la existencia de interacciones funcionales entre C3G, o su isoforma trunca, p87C3G, y la oncoproteína Bcr-Abl en células de LMC K562 (Gutierrez-Berzal *et al.*, 2006; Mitra A. y Radha 2010). Ensayos de inmuprecipitación en extractos proteicos de K562 con anticuerpos anti-C3G y anti-Abl revelaron que p87C3G co-precipita con Bcr-Abl y CrkL y que, recíprocamente, Bcr-Abl co-precipita con p87C3G (Gutierrez-Berzal *et al.*, 2006). Estos resultados fueron confirmados mediante ensayos de *pull-down*, corroborando que ambas proteínas interaccionan a través de los dominios SH3 de Abl y SH3-binding (SH3-b) de C3G. Experimentos de mutagénesis en los diferentes dominios de poliprolinas de C3G demostraron que el segundo tracto de poliprolinas del dominio SH3-b era el responsable de la unión de C3G a Bcr-Abl (Gutierrez-Berzal *et al.*, 2006).

Ensayos de doble híbrido mostraron que la interacción entre C3G y Bcr-Abl no es directa. Por consiguiente, quisimos determinar qué proteínas podrían actuar de mediadoras de dicha interacción. Nuestros potenciales candidatos eran CrkL, p130Cas, Cbl y Abi1/2 ya que: (i) todas son proteínas que interaccionan, o bien con C3G o bien con Bcr-Abl, (ii) tienen dominios SH3 y/o SH3-b, que pueden mediar la interacción y (iii) al igual que C3G y Bcr-Abl participan en procesos de adhesión celular.

Para caracterizar estas interacciones y determinar si estas proteínas podrían actuar de intermediarias de la interacción entre C3G y Bcr-Abl (la cual involucra al dominio SH3 de Abl), se realizaron ensayos de *pull-down* en lisados de K562 utilizando la construcción GST-SH3Abl. Los resultados, que se muestran en la Figura II-1, revelaron que el dominio SH3 de Abl interacciona con Cbl, Abi1, p130Cas y p140C3G, además de la ya descrita interacción con p87C3G.

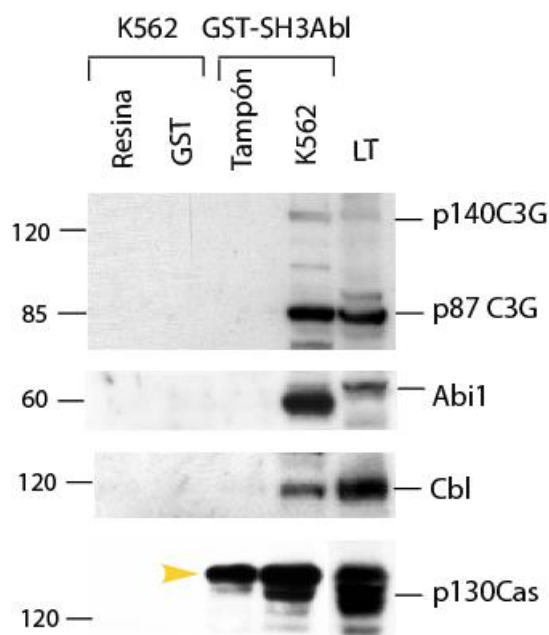


Figura II-1. El dominio SH3 de Abl interacciona con las proteínas Cbl, Abi1, p130Cas, p140C3G y p87C3G. Extractos celulares de K562 fueron sometidos a ensayos de *pull-down* utilizando la construcción GST-SH3Abl. La presencia de C3G, Abi1, Cbl y p130Cas en los complejos se visualizó por *Western blot* mediante anticuerpos específicos. Como controles negativos utilizamos resina con tampón de lisis (Resina), la construcción GST con lisado total de K562 (GST) y lisado total de K562 con tampón de lisis (Tampón). LT: lisado total. La flecha señala una banda inespecífica en el blot con anti-p130Cas.

Los dominios SH3 y SH3-binding de Abi1, Cbl y p130Cas interaccionan con C3G y Bcr-Abl

Con el fin de estudiar más a fondo estas interacciones, se clonaron los dominios SH3 y SH3-b de todas las proteínas candidatas como proteínas de fusión a GST y se estudió, mediante *pull-down* en lisados de K562, la interacción de dichos dominios con Bcr-Abl y C3G. La Figura II-2, muestra que todas las construcciones utilizadas (dominios SH3 y SH3-b de Abi1; SH3-b de Cbl; SH3, P1 y P2 de p130Cas) interaccionan en mayor o menor medida con C3G y con Bcr-Abl.

Así, ambos dominios SH3 y SH3-b de Abi1 se unen a Bcr-Abl, lo que está de acuerdo con la bibliografía (Shi *et al.*, 1995). Ambos dominios interaccionan también con p87C3G, pero no con p140C3G (Figura II-2A). A su vez Cbl interacciona tanto con Bcr-Abl como con p87C3G a través del dominio SH3-b (Figura II-2B). La unión de Cbl con Bcr-Abl ya había sido descrita por otros autores, además de la unión con CrkL y con Grb2 que se utilizó como control (Bhat *et al.*, 1997). Sin embargo, esta es la primera vez que se describe la interacción de ésta proteína con C3G. En cuanto a

p130Cas, la Figura II-2C revela que sus tres dominios SH3, P1 (domino SH3-b-1) y P2 (domino SH3-b-2) se unen a Bcr-Abl, aunque el dominio P1 muestra una mayor interacción. Adicionalmente, el dominio SH3 de p130Cas interacciona con la isoforma p140C3G, de acuerdo con lo descrito por otros autores (Kirsch *et al.*, 1998), mientras que los dominios ricos en prolinas P1 y P2 lo hacen con p87C3G.

Estos experimentos corroboran los resultados de los *pull-down* con el dominio SH3 de Bcr-Abl y sugieren que todas estas proteínas forman complejos entre sí. Por lo tanto, Cbl, Abi1 y p130Cas son claras candidatas para actuar como intermediarias de la interacción entre C3G y Bcr-Abl en células K562.

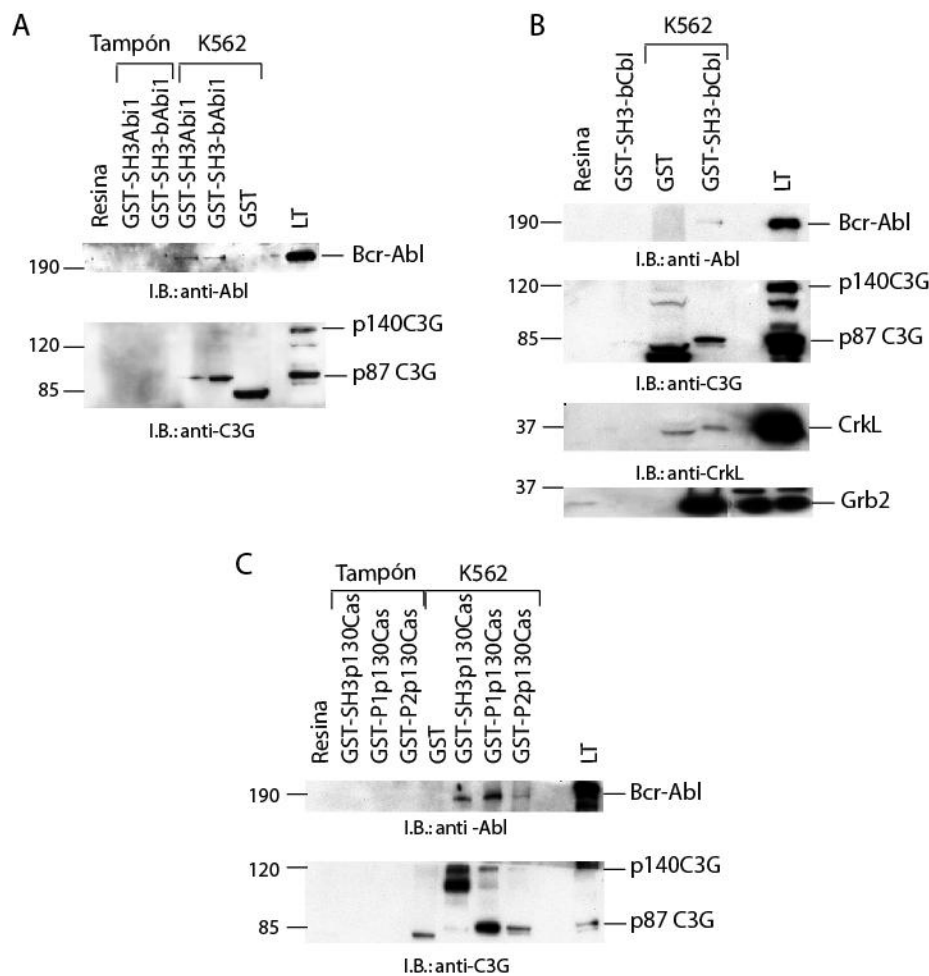


Figura II-2. Western blots representativos de los ensayos de *pull-down*, utilizando los dominios SH3 y SH3-b de Abi1 (**A**), SH3-b de Cbl (**B**) y SH3, P1 y P2 de p130Cas (**C**) unidos a GST y extractos proteicos de células K562. Los Westerns se revelaron con anticuerpos específicos de las proteínas indicadas. Se utilizaron como controles negativos resina con tampón de lisis (Resina), la construcción GST con lisado total de K562 (GST) y los diferentes dominios unidos a GST en tampón de lisis. LT: lisado total.

Ensayos de microscopía confocal de células K562 marcadas con anti-C3G y anticuerpos específicos de las proteínas en estudio y utilizando como anticuerpos secundarios anti-FITC y anti-Cy3 respectivamente, indican que C3G colocaliza con p130Cas fosforilado, Abi1, Cbl y Bcr-Abl (Figura II-3). Estos datos apoyan los resultados de los ensayos de *pull-down* e indican que C3G forma parte de complejos que contienen Cbl, p130Cas, Abi1 y Bcr-Abl.

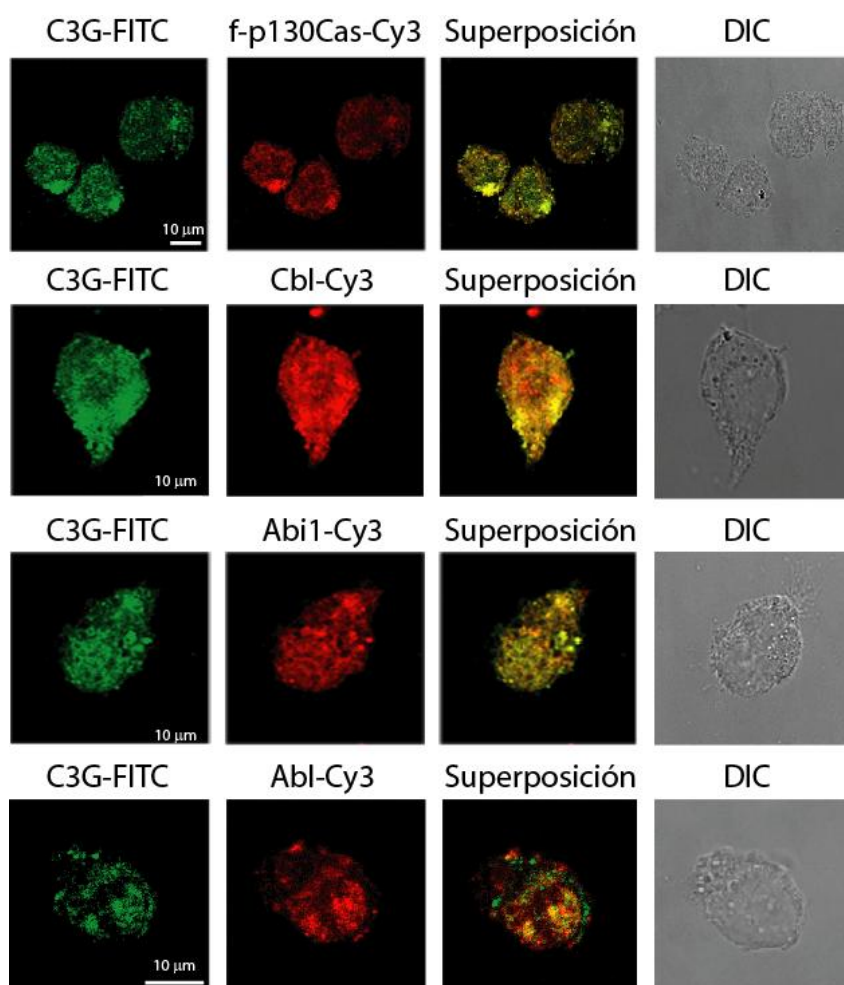


Figura II-3. En células K562 la proteína C3G colocaliza con p130Cas fosforilado, Cbl, Abi1 y Bcr-Abl. Ensayos de microscopía confocal utilizando células adheridas a portaobjetos cubiertos con 10 μg/ml de fibronectina durante 24 horas y marcadas con los anticuerpos indicados. DIC: Óptica de Contraste Interferencial.

El silenciamiento de las proteínas Abi1, Cbl y p130Cas altera la interacción entre C3G y Bcr-Abl

Con el fin de profundizar en el estudio de estas interacciones y determinar la contribución de cada una de las proteínas en la formación de los complejos C3G/Bcr-Abl, se procedió al silenciamiento génico de C3G y de las proteínas candidatas (Abi1, p130Cas y Cbl) mediante la utilización de lentivirus. Células K562 fueron infectadas con las partículas lentivirales en medio RPMI con 10% de suero conteniendo 5 $\mu\text{g/ml}$ de *Polybrene* y mantenidas a 37 °C en el mismo medio. Las células infectadas fueron tratadas con 2 $\mu\text{g/ml}$ de puomicina hasta su completa selección. Se analizaron mediante *Western blot* varios clones de cada transfección para seleccionar aquellos con expresión más disminuida de la proteína correspondiente (Figura II-4).

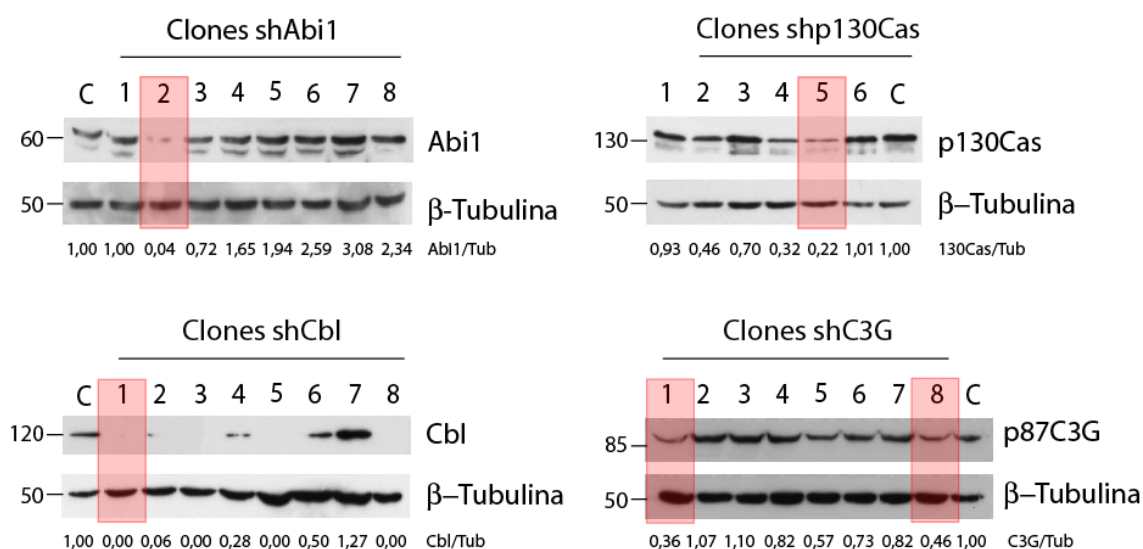


Figura II-4. Análisis de los clones permanentes de K562 con silenciamiento génico de Cbl, Abi1, p130Cas y C3G mediante lentivirus shRNA. Se muestran los valores de la relación entre la expresión de proteína y β -tubulina. Los clones seleccionados para los ensayos de *pull-down* fueron: el clon 2 de la línea shAbi1 (shAbi1-2); el clon 5 de la línea shp130Cas (shp130Cas-5); el clon 1 de la línea shCbl (shCbl-1) y los clones 1 y 8 de la línea shC3G (shC3G-1 y shC3G-8). C: lisado total de lentivirus shRNA Control.

La Figura II-5, muestra el análisis mediante *Western blot*, de la unión de las proteínas p87C3G y p140C3G al dominio SH3 de Abl en las diferentes líneas celulares *knock-down*. El silenciamiento de Abi1 disminuyó claramente la interacción entre p140C3G y Bcr-Abl, mientras que no afectó a la unión de esta última con p87C3G (Fig.II-5A). Por otra parte, el silenciamiento de p130Cas, provocó una disminución de

la asociación de ambas isoformas de C3G, p140 y p87 con el dominio SH3-Abl (Figura II-5B). El silenciamiento de Cbl no parece afectar de un modo claro a la interacción entre p140C3G y Bcr-Abl (Fig. II-5A y II-5D). Sin embargo hemos observado, en experimentos independientes, que la interacción entre p87C3G y Bcr-Abl puede disminuir (Fig. II-5C) o aumentar (Fig. II-5D) debido al silenciamiento de Cbl.

Además de la interacción entre C3G y SH3-Abl, hemos estudiado la unión de SH3-Abl con otras proteínas como CrkL y p130Cas, en las diferentes líneas celulares *knock-down*. La interacción de CrkL con SH3-Abl aumentó en células silenciadas para Abi1 mientras que no se vió afectada por el *knock-down* de Cbl (Fig. II-5A). Tanto la deficiencia de Abi1 como de Cbl en nuestro modelo celular, parece disminuir la interacción entre p130Cas y SH3-Abl. Estos resultados sugieren que todas estas proteínas interaccionan entre sí y que la disrupción de alguna de ellas afecta a la estequiometría de los complejos que forman.

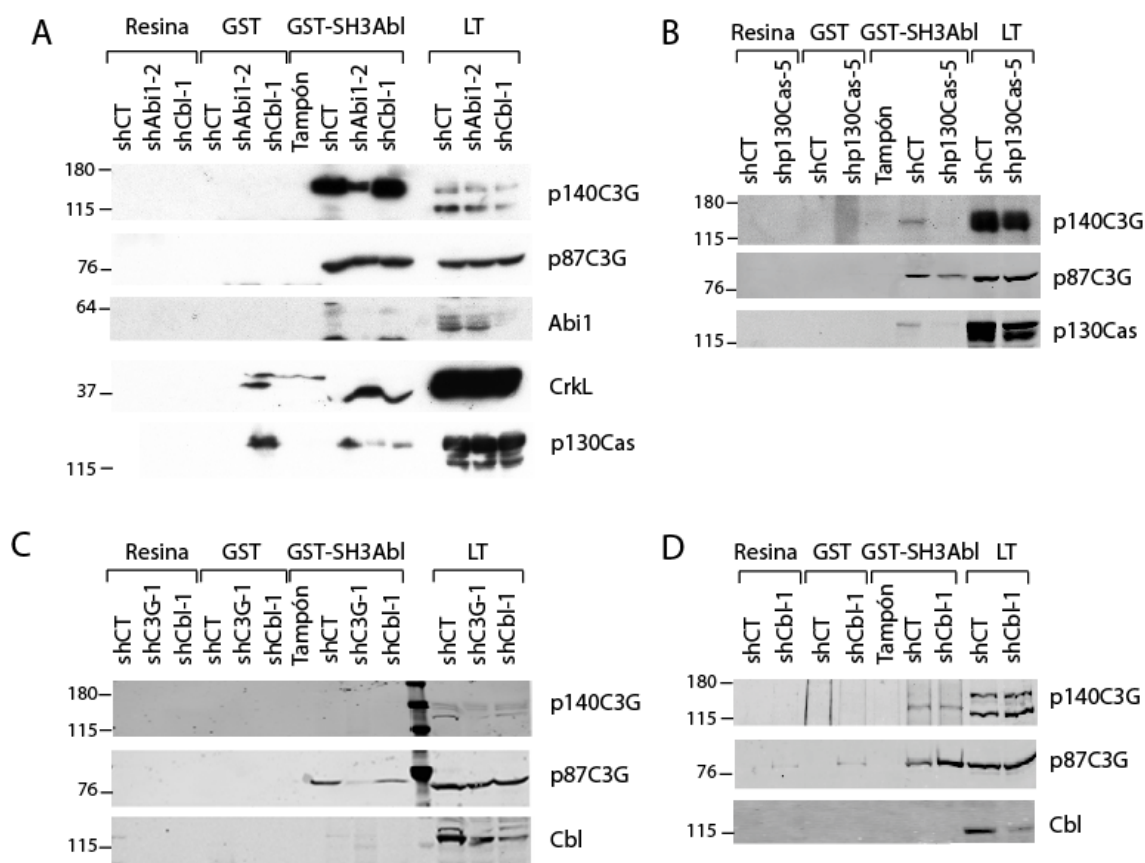


Figura II-5. Análisis del efecto del silenciamiento de las proteínas Abi1, p130Cas y Cbl en la interacción de Bcr-Abl con C3G, CrkL o p130Cas. La construcción conteniendo el dominio SH3 de Abl unida a GST se utilizó en ensayos de *pull-down* con lisados totales (LT) de los clones shAbi1-2 (**A**), shp130Cas-5 (**B**), shCbl-1 (**A**, **C-D**) y shC3G-1 (**C**). Como controles se utilizaron las muestras conteniendo la resina glutatión sefarosa (Resina) o la proteína GST (GST) incubadas con 2 mg de extracto proteico y la

construcción GST-SH3Abl con tampón de lisis. Se cargaron 40 µg de lisado total para tener como referencia el tamaño de las proteínas (LT).

C3G, Cbl y p130Cas interaccionan directamente con el mismo grupo de proteínas, destacando las que participan en adhesión

Para estudiar si alguna de las interacciones entre los dominios SH3 y SH3-b de las proteínas en estudio era directa utilizamos *arrays* conteniendo diferentes dominios SH3, *SH3 Domain Array* de Panomics: *Array I* (que contiene 38 dominios SH3) y *Array II* (conteniendo 36 dominios SH3) (ver esquema representativo de los *arrays* en las Figuras 20 y 21 de Materiales y Métodos, así como la lista de proteínas inmovilizadas). La imagen de la hibridación de los dominios SH3-b de C3G, Cbl y p130Cas con los *arrays* se puede ver en el Anexo I al final de este capítulo. Para una mejor representación y análisis de los datos se cuantificó la intensidad de hibridación mediante el software *Odyssey*. Las gráficas muestran una medida relativa de la media de la intensidad de hibridación entre los duplicados de cada dominio (Figuras II-6, 7 y 8).

Los resultados de la hibridación del dominio SH3-b de C3G con el *array I* indican que éste se asocia directamente con los dominios SH3 de las proteínas Cortactina, Y124, LCK, HCK, SLK, YES1, VAV-D2, SPCN, PEXD, Stam, BTK, c-SRC, y ABL2 (ARG), y con menos afinidad a Abl, VAV-D1, NOF2-D1 y PLCγ (Figura II-6). El *array II* confirma la unión con el dominio SH3 de c-Src y de Abl2 y revela la unión con las proteínas OSF, CrkL-D1, NCK1-D2, Tec, VINE-D3, PI3α y PIG2 a través de sus dominios SH3 (Figura II-6). Al contrario de lo esperado, no se verificó unión directa entre los dominios de C3G y SH3 de Abl2 (ABL2B).

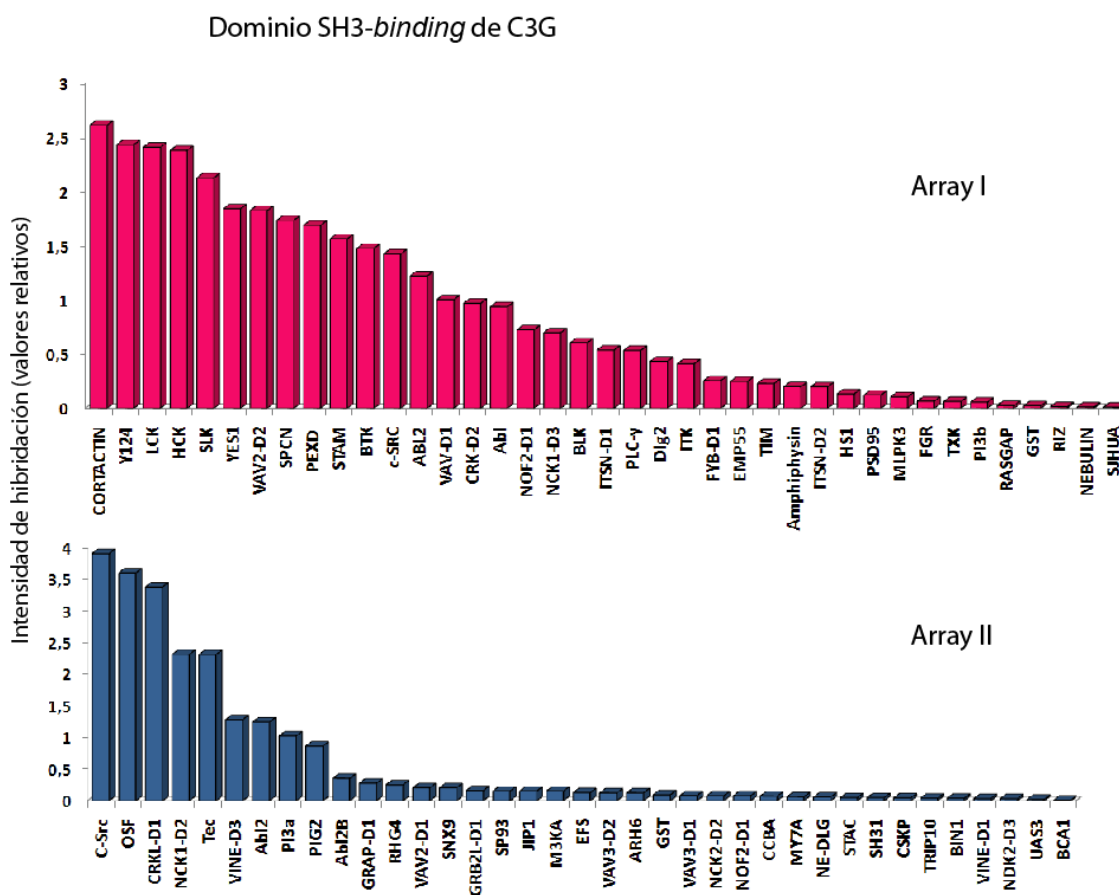


Figura II-6. Gráficas que representan la intensidad relativa de la unión entre el dominio SH3-b de C3G y los diferentes dominios SH3 presentes en los *arrays* I y II. El dominio SH3-b de C3G unido a una cola de histinas (20 μ g) se hibridó con los *arrays* (I y II). Las barras representan la media de la intensidad de los puntos detectados por el anticuerpo anti-His frente a los puntos de ligandos de histidina (Controles de hibridación y detección). Los controles negativos no están representados.

En cuanto al dominio SH3 de Cbl, se observó su interacción con los dominios SH3 de las proteínas ITK, ITSN-D1, Dlg2 y TXK coincidiendo con C3G en la unión con YES1, LCK, PEXD, Cortactina, SLK, BTK, STAM, HCK, ABL2, Y124, c-SRC, SPCN, VAV2-D2, NOF2-D1 (Figura II-7) en la hibridación del *array I*. La hibridación con el *array II* reveló su unión a las proteínas OSF, Tec, C-Src, NCK1-D2, PIG2, VINE-D3, PI3 α , Abl2 y CrkL-D1, de manera similar al dominio SH3-b de C3G. Por el contrario, a diferencia de C3G, el dominio SH3-b de Cbl también se une a las proteínas SNX9, Abl2B (Abi2), VAV3-D2, M3KA y SH3-1 (dominio SH3 de Grb2) estando este último de acuerdo con la bibliografía (Meisner *et al.*, 1995). De acuerdo con lo anteriormente descrito se observó, aunque débil, una interacción directa entre el dominio SH3-b de Cbl y el dominio SH3 de CrkL (Keane *et al.*, 1999).

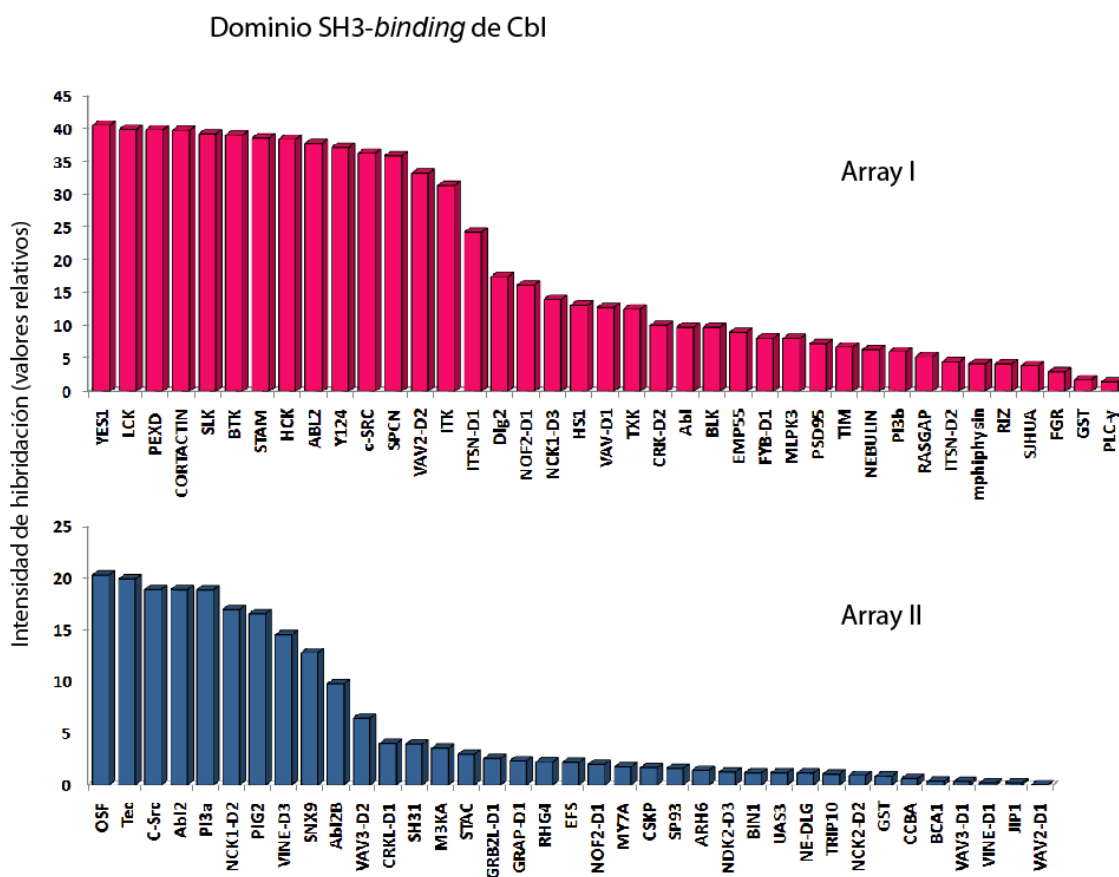


Figura II-7. Gráficas que representan la intensidad relativa de la unión entre el dominio SH3-b de Cbl y los diferentes dominios SH3 presentes en los *arrays* I y II. El dominio SH3-b de Cbl unido a una cola de histinas (20 μ g) se hibridó con los *arrays* (I y II). Las barras representan la media de la intensidad de los puntos detectados por el anticuerpo anti-His frente a los puntos de ligandos de histidina. (Controles de hibridación y detección). Los controles negativos no están representados.

El dominio P2 (domino SH3-b o rico en prolina-2) de p130Cas, presenta una hibridación menos específica probablemente debido al pequeño tamaño del dominio. Respecto al *array* I, este dominio comparte con C3G y Cbl su asociación con BTK, PEXD, Cortactina, ABL2, Y124, SLK, LCK, YES1, HCK, c-SRC, STAM, VAV2-D2 y BLK (Figura II-8). Al igual que Cbl, se asocia a ITSN-D1 e ITK y presenta una interacción exclusiva con PSD95, ITSN-D1, RASGAP, NCK1-D3, MLPK3, PI3- β y *Amphiphysin* y comparte únicamente con C3G su asociación con Abl.

En cuanto a los dominios SH3 del *array* II, al igual que C3G y Cbl, p130Cas se une a las proteínas OSF, NCK1-D2, Abl2, PIG2, Tec, PI3 α , C-Src, VINE-D3 y CrkL-D1 (Figura II-8) y coincide solo con Cbl en la unión con VAV3-D2, SNX9, M3KA, SH3-1 (dominio SH3 de Grb2) y ABL2B (Abl2). Además hemos observado la interacción de p130Cas-P2 con el dominio SH3 de las proteínas NOF2-D1, NE-DLG y

GRB2L-D1 y, con menor afinidad, BIN1 y EFS. La interacción entre el dominio P2 de p130Cas y el dominio SH3 de CrkL está en desacuerdo con lo descrito por Salgia y colaboradores, según los cuales CrkL se une a p130Cas a través de su dominio SH2 en células que contienen Bcr-Abl y en pacientes de LMC (Ribon y Saltiel 1996; Salgia *et al.*, 1996b).

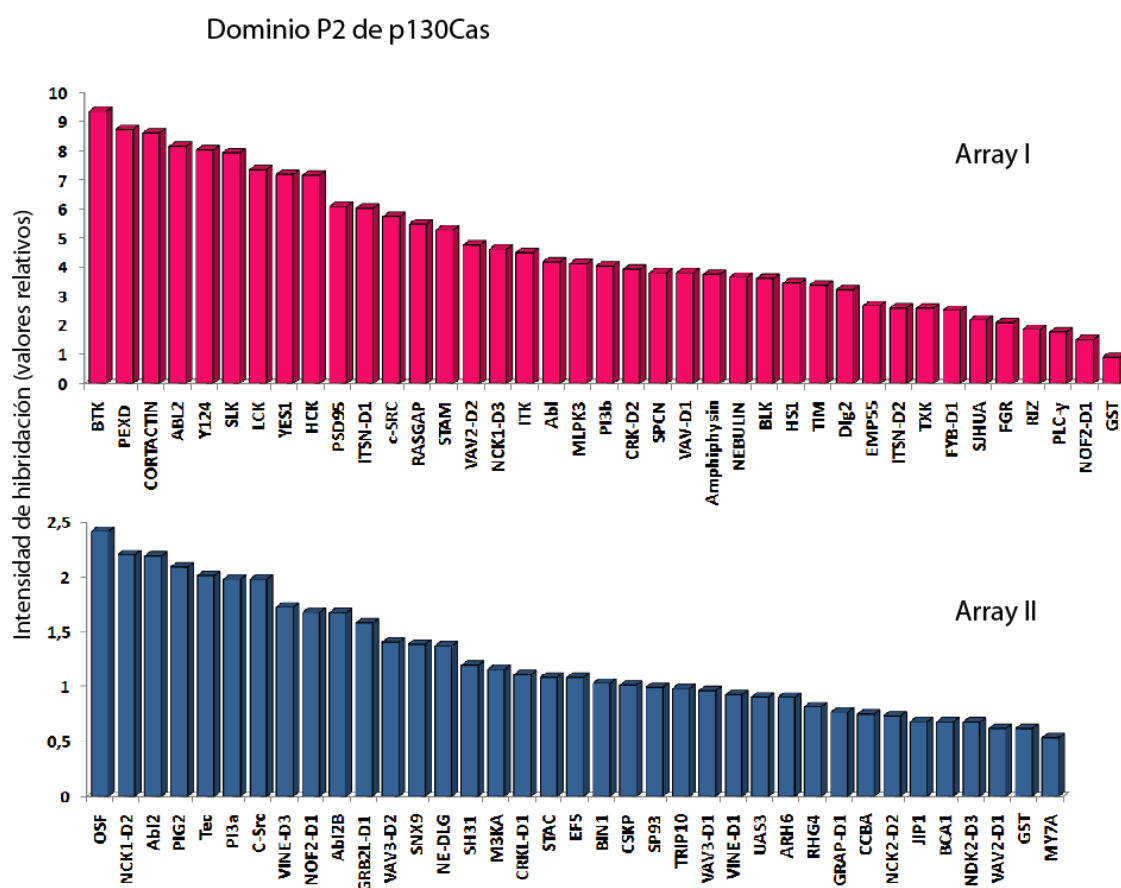


Figura II-8. Gráficas que representan la intensidad relativa de la unión entre el dominio P2 de p130Cas y los diferentes dominios SH3 presentes en los *arrays* I y II. El dominio P2 de p130Cas unido a una cola de histinas (20 µg) se hibridó con los *arrays* (I y II). Las barras representan la media de la intensidad de los puntos detectados por el anticuerpo anti-His frente a los puntos de ligandos de histidina. (Controles de hibridación y detección). Los controles negativos no están representados.

La gran cantidad de proteínas comunes que interaccionan con C3G, p130Cas y Cbl sugiere que estas tres proteínas están involucradas en la regulación de los mismos procesos y vías de señalización celulares. De hecho, las tres participan en adhesión celular, proceso en el cual están implicadas proteínas de adhesión focal como Cortactina y Vinexina (VINE), proteínas tirosina quinasa implicadas en la regulación de las adhesiones focales como Abi2 y c-Src y proteínas adaptadoras como CrkL, las cuales,

como hemos mostramos aquí, se unen directamente a los dominios SH3-b de C3G, p130Cas y Cbl.

Anexo I

Dominio SH3-binding de C3G

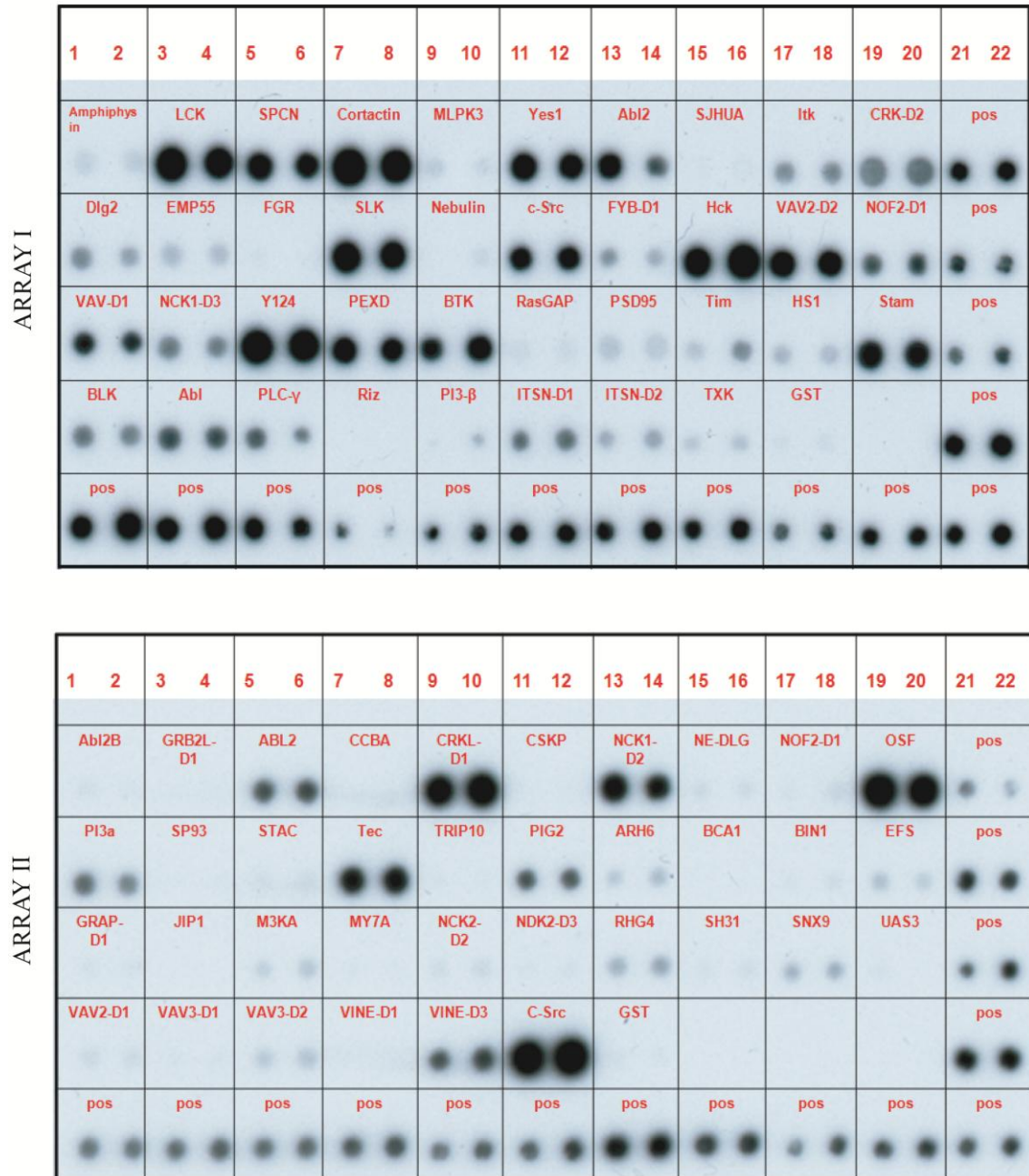


Figura II-A-1. Western blot de los arrays I y II, hibridados con el dominio SH3-b de C3G y revelados con el anticuerpo anti-His. Cada pareja de puntos representa un dominio inmovilizado por duplicado. Los puntos se interpretaron como positivos o negativos teniendo como referencia la intensidad de los puntos de ligandos de histidina (pos) que son los controles de hibridación y detección. GST es el control negativo.

Dominio SH3-binding de C3G

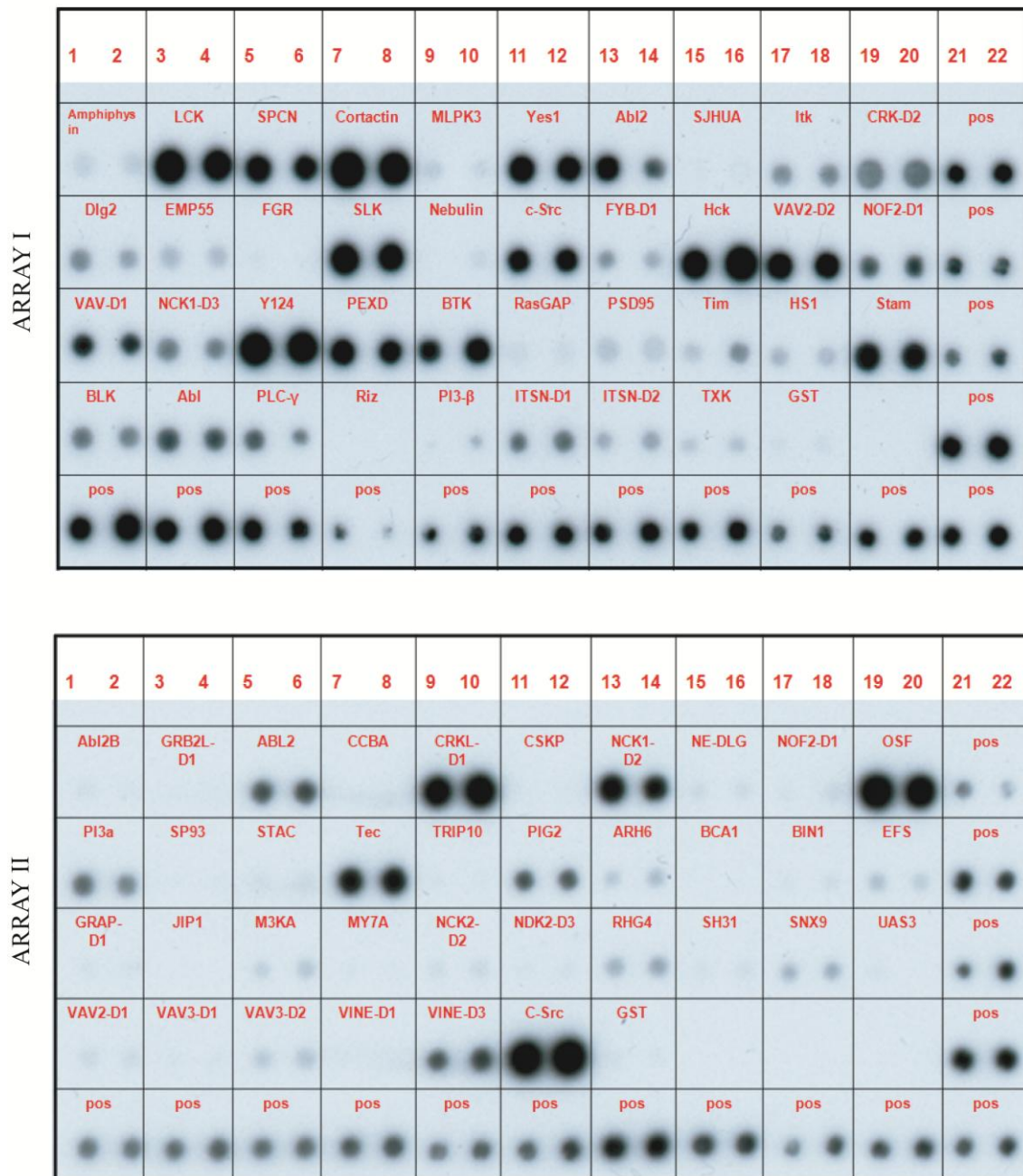


Figura II-A-2. Western blot de los arrays I y II, hibridados con el dominio SH3-b de Cbl y revelados con el anticuerpo anti-His. Cada pareja de puntos representa un dominio inmovilizado por duplicado. Los puntos se interpretaron como positivos o negativos teniendo como referencia la intensidad de los puntos de ligandos de histidina (pos) que son los controles de hibridación y detección. GST es el control negativo.

Dominio SH3-binding-2 de p130Cas

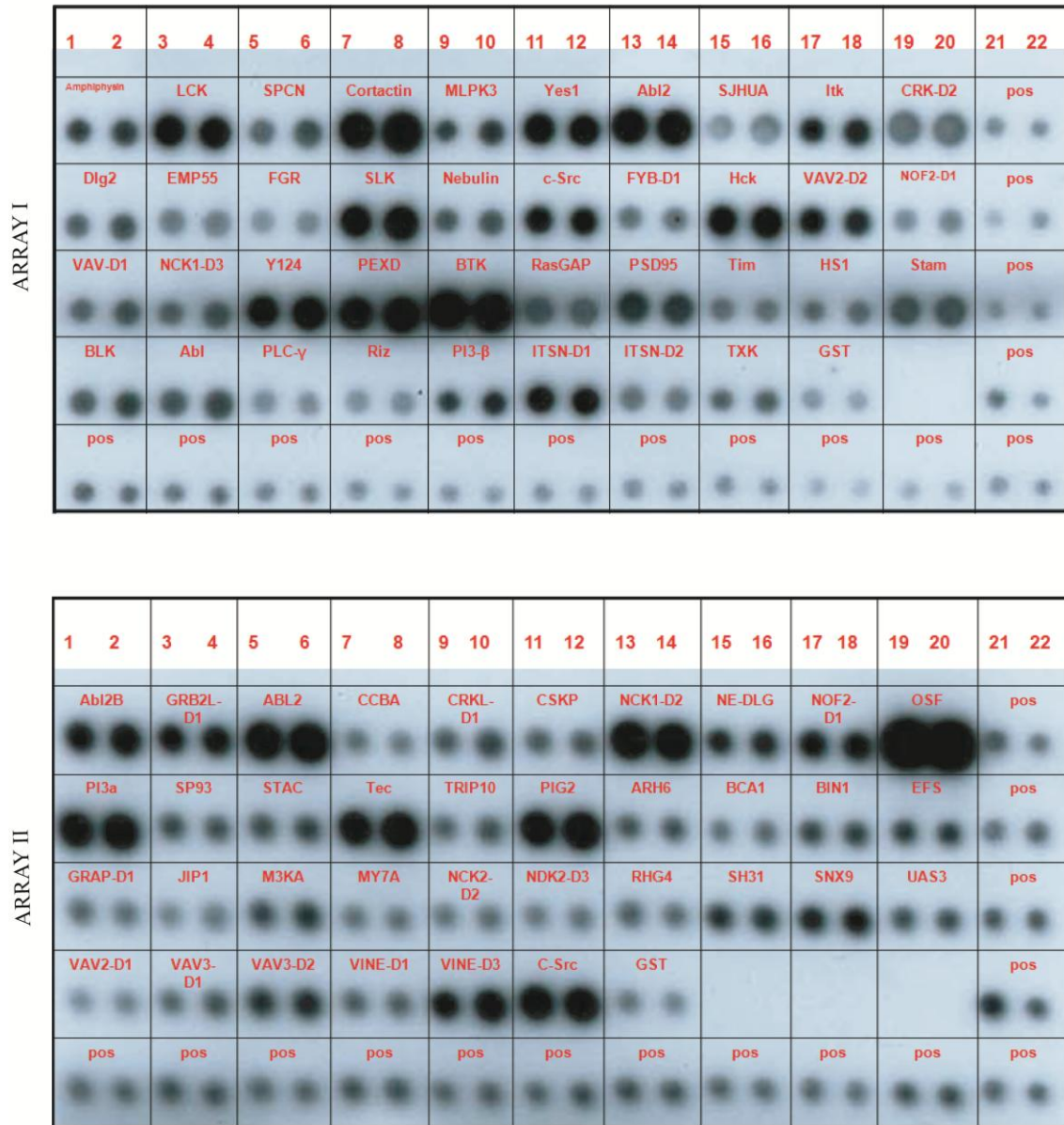


Figura II-A-3. Western blot de los arrays I y II, hibridados con el dominio SH3-b de p130Cas y revelados con el anticuerpo anti-His. Cada pareja de puntos representa un dominio inmovilizado por duplicado. Los puntos se interpretaron como positivos o negativos teniendo como referencia la intensidad de los puntos de ligandos de histidina (pos) que son los controles de hibridación y detección. GST es el control negativo.

III. IMPLICACIÓN DE LA RUTA C3G-p38 α MAPK EN LAS PROPIEDADES ADHESIVAS DE LAS CÉLULAS K562

Bcr-Abl induce anomalías en la función del citoesqueleto y altera las interacciones normales entre las proteínas de las adhesiones focales y sus dianas, alterando la adhesión normal de la célula (Deininger *et al.*, 2000). Se sabe que Bcr-Abl está implicado en la regulación de la adhesión a laminina, fibronectina y colágeno de las células leucémicas a través de la formación de complejos con las integrinas $\beta 1$ (Skorski *et al.*, 1998).

C3G se une a proteínas adaptadoras como Crk y forma complejos con p130Cas y otras proteínas de las adhesiones focales (Birge *et al.*, 2009). Además, el análisis de microarrays de expresión con células K562 en las que hemos disminuido la expresión de C3G, revelaron cambios en los patrones de expresión de varios genes relacionados con adhesión. Por otra parte, los *arrays* de dominios SH3 indican que el dominio SH3-b de C3G se une a proteínas implicadas en adhesión, como cortactina y vinexina, entre otras.

Del mismo modo, las p38 MAPK también juegan un papel importante en la regulación de los procesos de adhesión y migración, muy relacionados con la patogénesis de la leucemia mieloide crónica. El laboratorio de la Dr. A. Porras y otros han observado en diferentes tipos celulares que las células que carecen de p38 α MAPK muestran un incremento en la adhesión a varias proteínas de la matriz extracelular (Guo Y. L. y Yang 2006; Zuluaga *et al.*, 2007b), lo que se correlaciona con un incremento en la fosforilación de las proteínas de adhesión focal FAK y paxilina (Guo Y. L. y Yang 2006).

Dada la importancia que juegan los procesos de adhesión celular al estroma en la patogénesis de la leucemia mieloide crónica y basándonos en que tanto C3G como p38 MAPK son proteínas reguladoras de adhesión celular y además interactúan funcionalmente en apoptosis, nos hemos propuesto investigar si C3G y p38 MAPK (concretamente la isoforma p38 α) forman parte también de una ruta común C3G-p38 α MAPK implicada en la regulación de la adhesión de células de LMC.

Las células K562 tienen preferencia por adherirse a fibronectina

En primer lugar, se analizó las propiedades adhesivas de las células K562 a diferentes sustratos como fibronectina, laminina y colágeno IV mediante ensayos de adhesión con calceína AM. Para ello, células K562 transfectadas con los lentivirus shCTRL o shC3G-1 se incubaron en medio sin suero y se marcaron con calceína AM durante 30 minutos. A continuación, se mantuvieron durante 90 minutos en contacto con la superficie revestida con 50 $\mu\text{g/ml}$ del sustrato y se determinó el valor de la adhesión celular mediante fluorescencia. Los resultados mostraron que en nuestras condiciones experimentales la fibronectina era mucho mejor sustrato que el colágeno IV o la laminina (Figura III-1), en discordancia con lo descrito (Salgia *et al.*, 1997). Por tanto, en los experimentos subsiguientes se utilizó fibronectina como sustrato de adhesión.

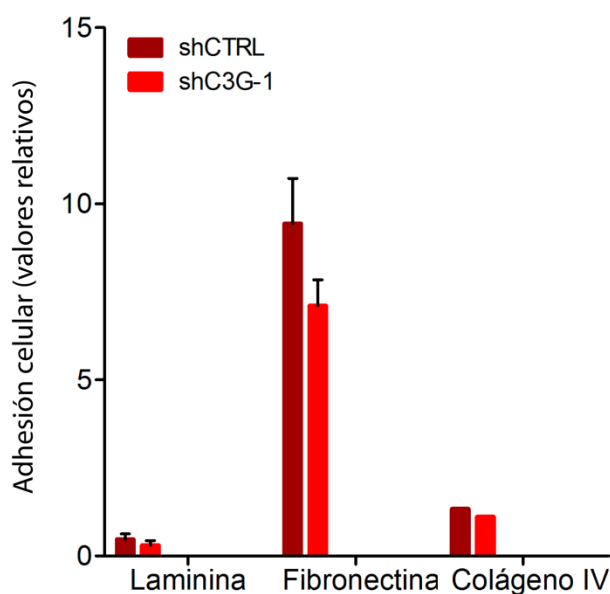


Figura III-1. Cuantificación relativa de la adhesión de las células K562 transfectadas con shCTRL o shC3G-1 a fibronectina, laminina y colágeno IV. shCTRL: shRNA Control.

El silenciamiento de C3G, Cbl, Abi1 y p38 MAPK inhibe la adhesión a fibronectina, mientras que el silenciamiento de p130Cas incrementa la adhesión

Se estudió la capacidad de adhesión a fibronectina de los clones que expresan pSuper-C3Gi, pSuper-p38 α i, pSuper-C3Gi/p38 α i y pSuper, y también de los clones lentivirales shC3G-1 y shC3G-8, shCbl-1, shAbi1-2, shp130Cas-5 y el shRNA Control, con el fin de determinar si el silenciamiento de las diferentes proteínas promueve cambios en la adhesión de las células K562 a la matriz extracelular, en nuestro caso, fibronectina. Los resultados indican que las células deficientes en C3G tienen una menor capacidad de adhesión a fibronectina (Figura III-2A), resultado que también se observa en la Figura III-1. Lo mismo ocurre al silenciar Cbl y Abi1. Por el contrario, el clon p130Cas *knock-down* presentó un incremento de su capacidad de adhesión a fibronectina (Figura III-2A). En cuanto a p38 α MAPK, en contra de lo esperado, su silenciamiento también resultó en una disminución de la adhesión en un porcentaje similar al observado en el clon shC3G. Además, el clon doble *knockdown* para C3G y p38 α mostró una inhibición de la adhesión similar a los dos clones *knockdown* simples, indicando que ambas proteínas C3G y p38 α MAPK participarían en una ruta común reguladora de la adhesión en K562.

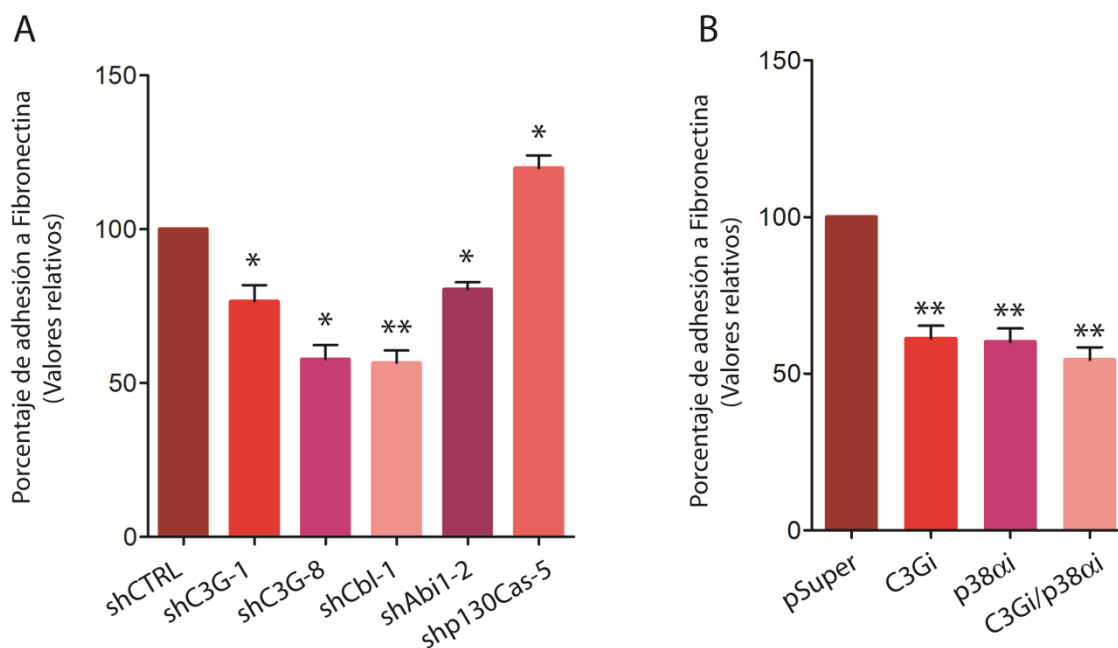


Figura III-2. Representación gráfica del porcentaje de adhesión a fibronectina de los clones K562 indicados. **(A)** Porcentaje de adhesión de células silenciadas para C3G (shC3G-1 y shC3G-8), Cbl (shCbl-1), Abi1 (Abi1-2) y p130Cas (shp130Cas-5). **(B)** Porcentaje de adhesión de células que expresan permanentemente el RNA de interferencia para C3G y/o p38 α . Los valores presentados son la media \pm SEM de tres o más experimentos independientes. Todos los valores son relativos a las células K562 transfectadas con el shRNA Control o el vector pSuper, (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

C3G y p38 α forman complejos con proteínas que participan en la formación y regulación de adhesiones focales

Como se ha descrito en la introducción, la adhesión de las células a la matriz extracelular está mediada por integrinas y regulada por las adhesiones focales. Las adhesiones focales están compuestas por proteínas quinasa, como FAK, y por proteínas, como paxilina, que funcionan como plataforma de unión a otras proteínas. La paxilina interacciona con proteínas activadas como Src, p38 MAPK, c-Abl y FAK (Deakin y Turner 2008), y cuando es fosforilada por Src y FAK regula el reclutamiento de proteínas efectoras como Crk (Turner 2000). Además, la paxilina interacciona con la integrina β y con el oncogén Bcr-Abl, estando esta última interacción mediada por CrkL (Salgia *et al.*, 1995b). Se ha descrito que p130Cas interacciona con paxilina, CrkL y C3G y es fosforilada por FAK tras la estimulación de integrinas (Payne *et al.*, 2006; Polte y Hanks 1997). CrkL, además de con paxilina y C3G (Tanaka *et al.*, 1994) también se asocia con Cbl, interacción que disminuye células que expresan Bcr-Abl

(Uemura *et al.*, 1997). A su vez, C3G también interacciona con Bcr-Abl (Gutierrez-Berzal *et al.*, 2006) y p130Cas (Kirsch *et al.*, 1998), datos corroborados por los datos presentados en el Capítulo II de Resultados de Tesis.

Con el fin de caracterizar las interacciones existentes entre algunas de las proteínas de las adhesiones focales y las proteínas C3G y p38 α MAPK, en células de leucemia mieloide crónica K562, éstas fueron crecidas en presencia de 10 μ g/ml de fibronectina y se obtuvieron lisados de las mismas, los cuales fueron sometidos a ensayos de inmunoprecipitación.

Los resultados indican que CrkL interacciona con C3G y Bcr-Abl (Figura III-3A y B), en concordancia con los resultados del capítulo II, y con la bibliografía (Kiyokawa *et al.*, 1997; Salgia *et al.*, 1996a). Además, CrkL también interacciona con la isoforma p33 de paxilina fosforilada, de acuerdo con lo descrito por Salgia *et al.*, 1997, así como con FAK y p38 α MAPK (Figura III-3A y C).

C3G inmunoprecipitó con fosfo-paxilina de 68 kDa, CrkL y p38 α (Figura III-3A). A su vez paxilina, en su forma fosforilada, co-precipitó con la isoforma p87 de C3G y p38 α (Figura III-3A). Finalmente, observamos interacción entre p130Cas y Bcr-Abl (Figura III-3B) y entre FAK y C3G, p38 α y CrkL (Figura III-3C).

La interacción entre C3G y paxilina, aunque débilmente detectada probablemente debido al dinamismo de estas interacciones, fue corroborada mediante microscopia confocal de células K562 adheridas a 10 μ g/ml de fibronectina y marcadas con anti-C3G y anti-paxilina, donde se observa colocalización de las dos proteínas (Figura III-3D).

Como ha sido mencionado anteriormente, las proteínas paxilina y FAK son esenciales para la formación de las adhesiones focales, activando proteínas que regulan el reclutamiento de proteínas efectoras necesarias para el ensamblaje y el desensamblaje de las adhesiones focales. Asimismo, nuestros resultados indicando que C3G y p38 α MAPK interaccionan con FAK, paxilina y fosfo-paxilina así como con p130Cas, sugieren que ambas proteínas forman parte de los complejos de adhesión focal, lo que está de acuerdo con su papel en adhesión celular.

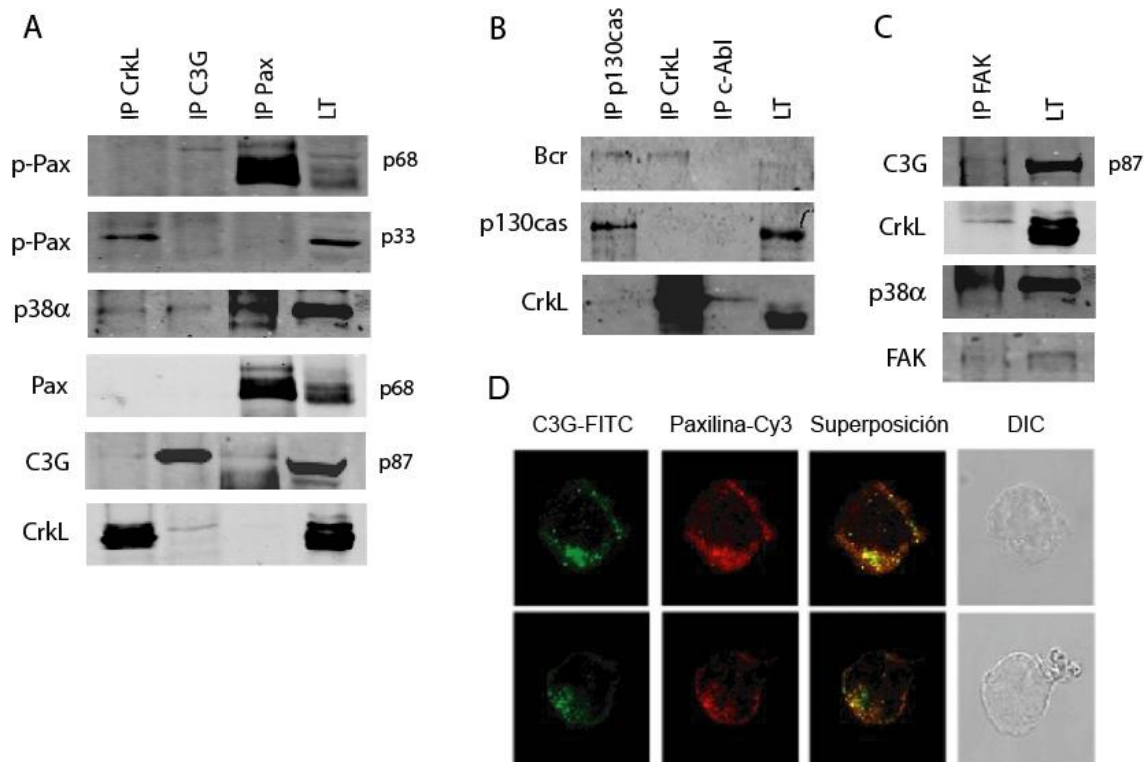


Figura III-3. C3G y p38 α MAPK interaccionan con proteínas de las adhesiones focales. **A, B, C)** *Western blots* representativos de ensayos de inmunoprecipitación con los anticuerpos indicados realizados con extractos proteicos de células K562 mantenidas con 10 μ g/ml fibronectina durante 24h. **D)** Microscopia confocal de células K562 adheridas durante 24 horas a portaobjetos con 10 μ g/ml de fibronectina, marcadas con los anticuerpos indicados.

La sobreexpresión de C3G tiene un efecto inhibitor sobre proteínas de las adhesiones focales

Con el fin de profundizar en el papel que juega C3G en la regulación de las interacciones entre las proteínas implicadas en las adhesiones focales, se estudió si la sobre-expresión de C3G afectaba a la expresión y fosforilación de algunas de estas proteínas. Para ello se llevaron a cabo ensayos de *Western blot* con extractos proteicos de células K562, establemente transfectadas con pLTR2C3G, cuyos resultados se representan en la Figura III-4. La sobre-expresión de C3G resultó en una disminución de los niveles de expresión de las proteínas FAK, paxilina, p130Cas e integrina α 5, si bien se observó un incremento en los niveles de paxilina fosforilada, principalmente las isoformas p33 y p46 (Figura III-4A-B). Esta disminución en los niveles de expresión se acentuó en presencia de fibronectina, principalmente en el caso de paxilina (Figura III-

4B). Por el contrario, se observó un aumento de los niveles de expresión de Cbl en células con C3G sobre-expresado.

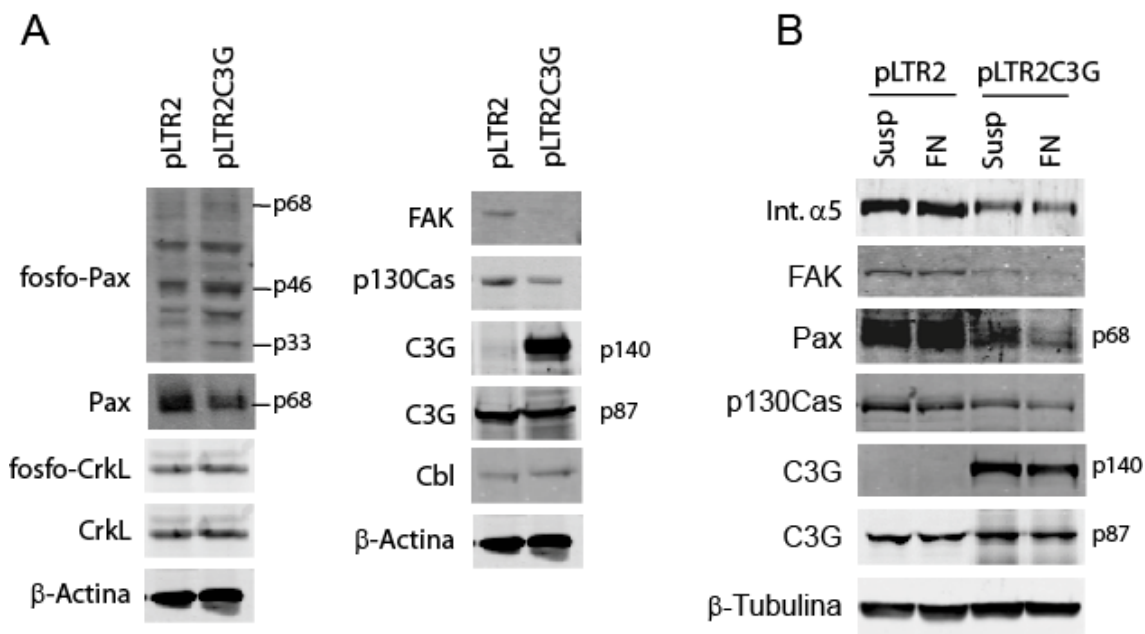


Figura III-4. Análisis mediante *Western blot* de la expresión de las proteínas paxilina (Pax), Cbl, CrkL, FAK, p130Cas e integrina $\alpha 5$ (Int. $\alpha 5$) y de la fosforilación de paxilina y CrkL en células K562 que sobre-expresan C3G o el vector vacío pLTR2. **(A)** Células crecidas en medio sin sustrato, durante 24h. **(B)** Células crecidas en 10 $\mu\text{g/ml}$ fibronectina (FN) durante 24h o en suspensión (Susp). Para la realización de los *Western blots* se utilizó 50 μg de extracto proteico. β -actina y β -tubulina se utilizaron como controles de carga.

El silenciamiento génico de C3G tiene un efecto inhibitor sobre proteínas de las adhesiones focales

Para confirmar estas observaciones, determinamos si los niveles de expresión de las proteínas en estudio se veían afectados por el silenciamiento de C3G. La Figura III-5A muestra que, al igual que lo observado con la sobre-expresión de C3G, tanto la expresión y fosforilación de paxilina como la expresión de FAK también disminuyen en células C3G *knock-down*. La disminución de la expresión de paxilina se confirmó mediante inmunofluorescencia con microscopia confocal (Figura III-5B) de células control (shCTRL) y silenciadas para C3G (shC3G) adheridas a fibronectina y marcadas con anti-paxilina. Adicionalmente, también se observó una disminución en los niveles de expresión de CrkL y Cbl. Los niveles de expresión de p130Cas no se vieron

afectados, aunque su fosforilación presentó una ligera disminución en células C3G *knock-down* (Figura III-5A), principalmente en células en suspensión. La fibronectina promovió el aumento del nivel de expresión y de la fosforilación de las isoformas de paxilina. Sin embargo, mientras que las isoformas p68 y p46 de paxilina incrementaron su fosforilación en presencia de FN, independientemente del nivel de expresión de C3G, fosfo-p33 únicamente aumentó en células control. La presencia de FN también llevó al incremento de la fosforilación de CrkL en células C3G *knock-down* y a la expresión de Cbl en células control.

Quisimos analizar el efecto del silenciamiento de C3G en la interacción de las proteínas involucradas en adhesión celular. La Figura III-5C muestra los resultados de ensayos de inmunoprecipitación, utilizando extractos proteicos de las células C3G *knock-down* y control mantenidas durante 24h con 10 $\mu\text{g/ml}$ de fibronectina. Los resultados indican que la deficiencia de C3G inhibió la asociación de CrkL a Bcr-Abl, visible en las inmunoprecipitaciones tanto de CrkL como de c-Abl, y potenció la interacción de CrkL con paxilina, visible en la inmunoprecipitación de paxilina. La asociación entre p130Cas y Bcr-Abl apenas se vió afectada (Figura III-5C).

Todos estos datos sugieren que C3G podría tener un papel en la regulación de la expresión de proteínas involucradas en la adhesión celular, así como en su activación y en los niveles de asociación de las mismas. Una vez más, de manera similar a lo que ocurre en apoptosis, tanto la sobre-expresión como el silenciamiento de C3G producen un efecto similar que resulta en la inhibición de proteínas implicadas en las vías de señalización que regulan la adhesión celular.

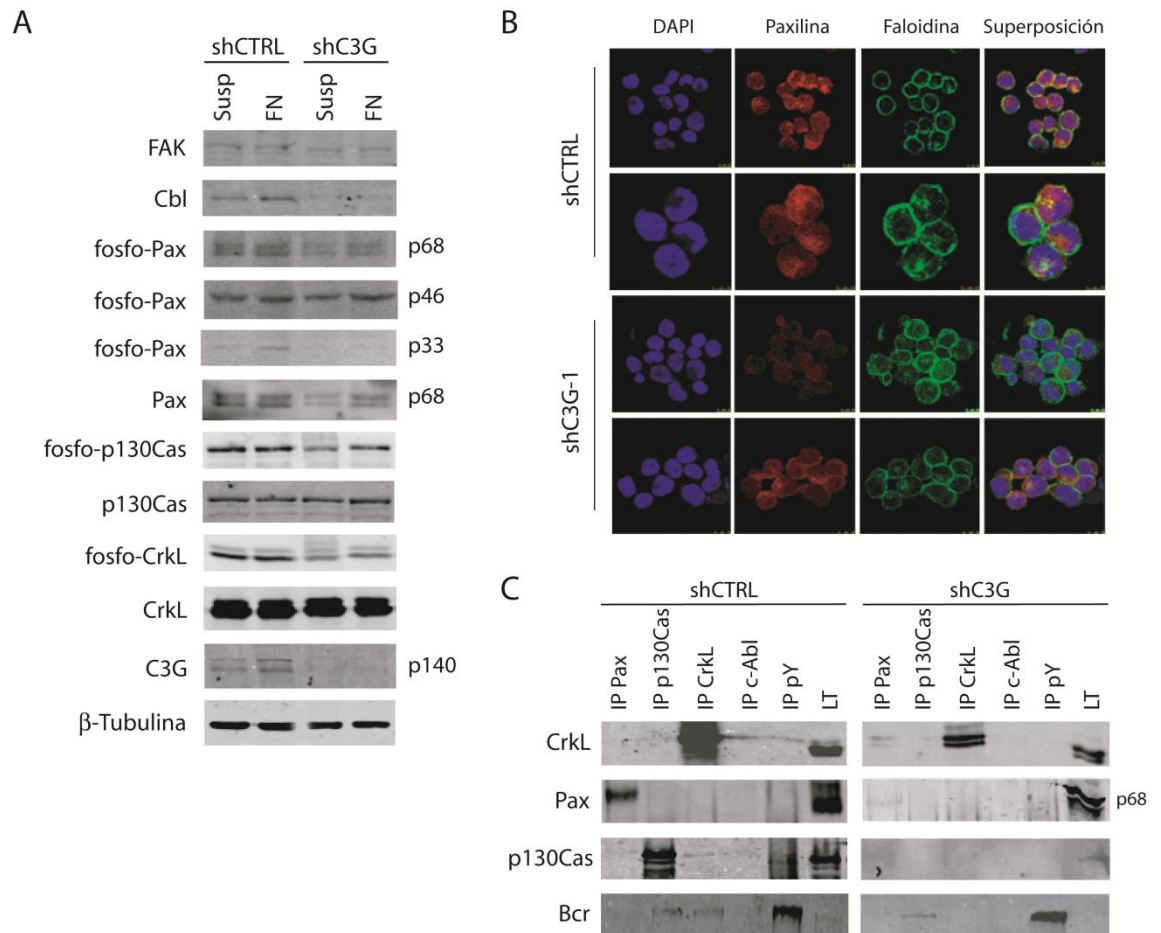


Figura III-5. Expresión e interacciones entre proteínas de las adhesiones focales en células K562 que expresan C3G *knock-down* y shRNA Control. Las células indicadas fueron mantenidas con 10 μ g/ml de fibronectina durante 24h o en suspensión. **(A)** Análisis de la expresión de las proteínas indicadas mediante *Western blot* utilizando 50 μ g de extracto proteico. **(B)** Microscopía confocal de células K562 control o C3G *knock-down* adheridas a portaobjetos cubiertos con 10 μ g/ml de fibronectina y marcadas con los anticuerpo paxilina y faloidina. **(C)** Análisis de la interacción de proteínas mediante ensayos de inmunoprecipitación utilizando los anticuerpos indicados.

p38 α MAPK regula la expresión y activación de proteínas de adhesión de forma antagónica a C3G

De manera similar, quisimos analizar si p38 α MAPK juega un papel regulador en la expresión y activación de proteínas de las adhesiones focales. Para ello, se analizó los niveles de expresión de proteína en las células p38 α knock-down crecidas en suspensión o en presencia de 10 μ g/ml de fibronectina durante 24 horas. Los resultados, representados en la Figura III-6 por medio de *Western blot* (A) y gráfica (B), revelan que la deficiencia de p38 α MAPK aumentó los niveles de expresión de integrina α 5, CrkL, p130Cas y paxilina. La proteína FAK no presentó cambios de expresión proteica.

Además, la disminución de la expresión de p38 α MAPK indujo un incremento en la fosforilación de todas las isoformas de paxilina y de p130Cas, efecto que fue mas visible en presencia de fibronectina. Por otra parte, la presencia de fibronectina provocó un incremento del nivel de expresión en la integrina $\alpha 5$, CrkL, p130Cas y paxilina. Estos resultados apoyan un efecto inhibitor de p38 α en la expresión y activación de proteínas de adhesión, en concordancia con lo descrito por otros autores (Guo Y. L. y Yang 2006). Contrariamente a lo esperado, las células con deficiencia en p38 α MAPK presentaron un rescate de los niveles de expresión de la proteína silenciada en presencia de fibronectina. Estos datos sugieren que p38 α tiene un papel opuesto al de C3G, funcionando como inhibidor de la regulación de la señalización en el proceso de adhesión celular.

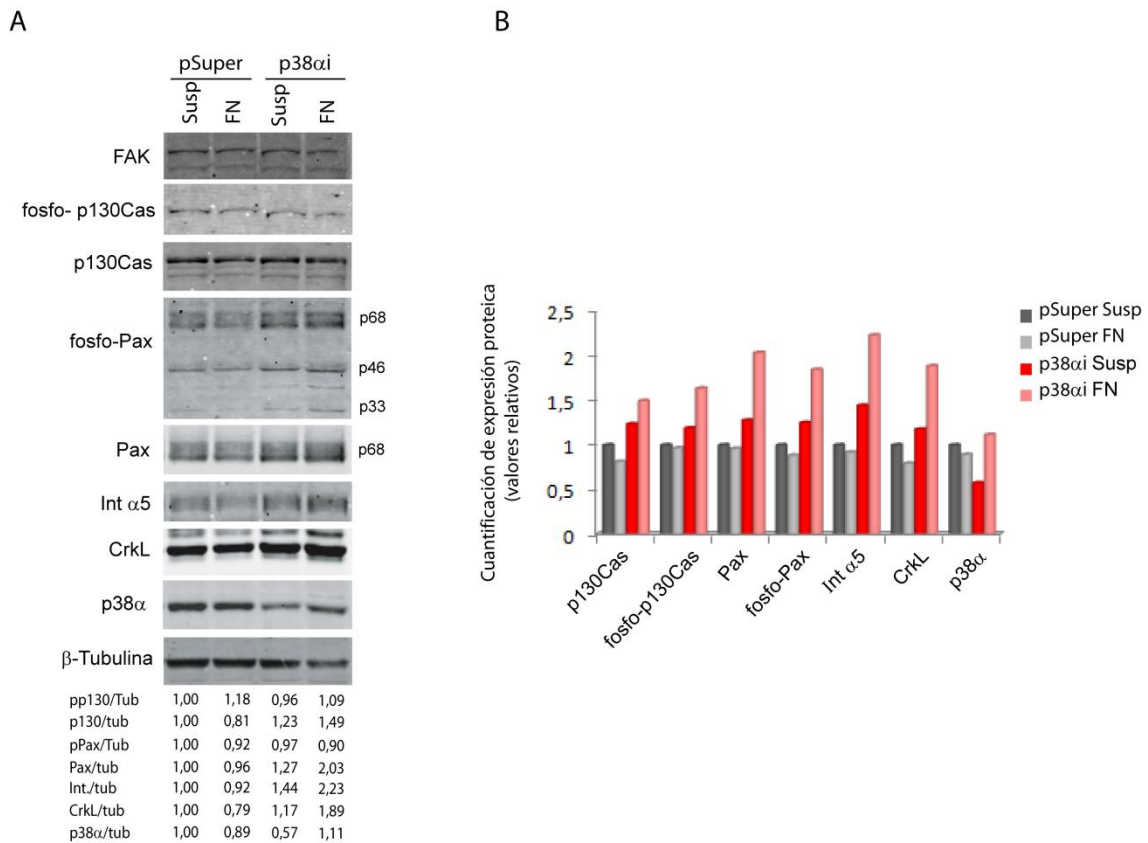


Figura III-6. Western blot representativo del análisis de los (A) niveles de expresión y fosforilación de proteínas de adhesión como p130Cas, FAK, paxilina (Pax), CrkL, p38 α y integrina $\alpha 5$ (Int $\alpha 5$) en los clones K562 que expresan el vector interferente pSuper para p38 α MAPK. (B) Representación gráfica de la cuantificación de las bandas del Western blot para cada proteína. Para el análisis se utilizó 50 μ g de extracto proteico de los clones indicados. Se indican las relaciones entre los niveles de expresión de las distintas proteínas.

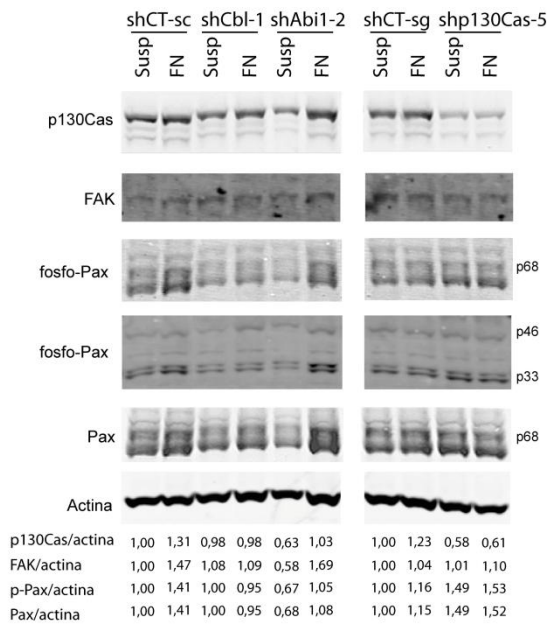
Las proteínas Cbl, Abi1 y p130Cas regulan la expresión y activación de proteínas de adhesión en células K562

Finalmente, hemos analizado la influencia del silenciamiento de otras proteínas de adhesión en estudio, como Cbl, Abi1 y p130Cas, en los niveles expresión y fosforilación de FAK y paxilina. Para ello, utilizamos clones deficientes en Cbl, Abi1 y p130Cas junto con células que expresan los vectores vacíos (shRNA Control de Sigma y de Santa cruz) como control. Los resultados mostrados en la Figura III-7 muestran que el mayor efecto se observó en las células silenciadas para Abi1, donde se produjo una disminución de los niveles de expresión de FAK, p130Cas, paxilina y así como en los niveles de fosforilación de esta última. Sin embargo estos niveles se recuperaron a niveles normales presencia de fibronectina, comparados con el respectivo control en suspensión, con la excepción de la expresión de FAK que casi se triplicó (Figura III-7A y B).

El silenciamiento de Cbl solo indujo el incremento en los niveles de expresión de paxilina, sin cambios en FAK, p130Cas y en la fosforilación de paxilina. Al contrario de Abi1, la presencia de FN en las células *knock-down* para Cbl no indujo alteraciones en los niveles de expresión de estas proteínas (Figura III-7A y B).

A su vez, el *knock-down* de p130Cas reveló un incremento en los niveles de expresión y fosforilación de paxilina, sin cambios en la expresión de FAK. Al igual que el *knock-down* para Cbl, el silenciamiento de p130Cas parece no afectar a la expresión y fosforilación de las proteínas analizadas en células estimuladas con fibronectina (Figura III-7A y B).

A



B

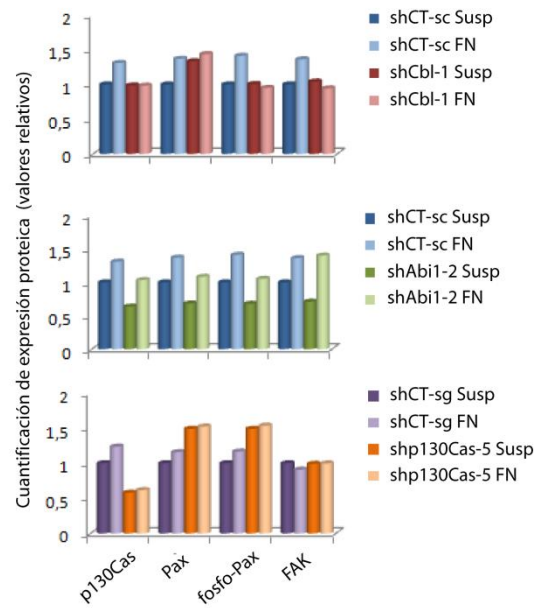


Figura III-7. Experimento representativo del análisis de los niveles de expresión de p130Cas, FAK y paxilina así como de los niveles de fosforilación de paxilina (Pax) en los diferentes clones K562 silenciados indicados. (A) *Western blot* que se llevó a cabo utilizando 50 μ g de extracto proteico por muestra. (B) Valores relativos de los niveles de expresión de las distintas proteínas analizadas. shCT-sc: shRNA Control Santa cruz, shCT-sg: shRNA Control Sigma.

En resumen, nuestros datos indican que C3G tiene un papel regulador de la expresión y activación de proteínas de las adhesiones focales y que por tanto, es un regulador de adhesión en LMC. Por otra parte, p38 α MAPK antagoniza la función de C3G inhibiendo la expresión y actividad de las mismas proteínas de adhesión, si bien favorece la adhesión a fibronectina de las células K562, en ausencia de suero.



DISCUSIÓN

En este trabajo de Tesis hemos abordado el estudio de una posible relación funcional entre C3G y p38 MAPK en la señalización intracelular que regula la apoptosis y la adhesión celular en células de leucemia mieloide crónica. Utilizando como modelo la línea celular de leucemia mieloide crónica K562, que expresa la tirosina quinasa p210 Bcr-Abl, hemos demostrado que la muerte celular por apoptosis de estas células tumorales involucra la actividad de p38 MAPK regulada por C3G a través de Rap1. Por otra parte, C3G y Bcr-Abl participan en adhesión celular e interaccionan entre sí formando complejos en células de LMC. Además, hemos demostrado que las proteínas Abi1, Cbl y p130Cas son intermediarios de la interacción entre C3G y Bcr-Abl y que participan en la regulación de las adhesiones focales en células de leucemia mieloide crónica.

Capítulo I

Estudios realizados anteriormente por nuestro grupo y otros indican que tanto C3G como p38 MAPK son proteínas implicadas en el proceso de apoptosis (Shivakrupa *et al.*, 2003) (Nebreda y Porras 2000). Además existen datos en la literatura que indican que Rap1 regula a p38 MAPK en varios sistemas (Stork y Dillon 2005). Todo ello nos indujo a pensar que C3G y p38 MAPK podrían estar implicadas en una ruta común reguladora de la apoptosis. Dado que STI-571 es un inductor de apoptosis en células de LMC, nos planteamos estudiar la contribución de C3G y p38 MAPK en la regulación de la apoptosis inducida por STI-571. Los resultados de este trabajo demuestran por primera vez la existencia de una relación funcional entre C3G y p38 MAPK en el efecto apoptótico y anti-proliferativo de STI-571 en K562.

C3G regula la apoptosis basal de las células K562 y de hecho tanto la sobre-expresión como el silenciamiento de C3G inducen apoptosis en K562. La apoptosis observada por la sobre-expresión de C3G concuerda con el papel pro-apoptótico de C3G descrito en células hematopoyéticas (Shivakrupa *et al.*, 2003). Sin embargo, el incremento de la apoptosis fue aún mayor cuando suprimimos la expresión de C3G mediante RNA de interferencia.

Nuestros experimentos indican que C3G tiene una función inhibidora de la fosforilación de p38 MAPK, ya que la fosforilación de p38 MAPK inducida por STI-

571, que es apenas detectable según nuestros datos y la bibliografía (Jacquel *et al.*, 2003; Jacquel *et al.*, 2007), incrementó con el silenciamiento de C3G. Reforzando estos datos, la activación de p38 MAPK, medida como fosforilación de su sustrato ATF-2, también se incrementó en células silenciadas para C3G. La isoforma de p38 que colabora con STI-571 en la inducción de apoptosis en LMC debe ser predominantemente la p38 α , ya que tanto el inhibidor de p38 α/β MAPK, SB203580 como el silenciamiento de esta isoforma inhibieron parcialmente la apoptosis inducida por STI-571 (Figura I-10), de acuerdo con otros autores (Yu *et al.*, 2002).

Por otra parte, la expresión del mutante dominante negativo de Rap1 (Rap1S17N) también incrementó la fosforilación y la actividad de p38 MAPK, sugiriendo que la función inhibidora de C3G sobre p38 MAPK está mediada por la actividad GEF de C3G sobre Rap1. Estos datos apoyan la existencia de una función anti-apoptótica de la vía C3G-Rap1 en LMC.

Hemos observado una cooperación entre C3G y STI-571 en la inhibición de las rutas de supervivencia, ERK y Akt en células de LMC, K562. STI-571 inhibió la fosforilación de ERK, conforme a los datos en la literatura (Kohmura *et al.*, 2004; Mizuchi *et al.*, 2005; Steelman *et al.*, 2004), efecto que fue parcialmente revertido en los clones silenciados para C3G y en menor medida en el clon silenciado para p38 α MAPK, dado el conocido efecto inhibidor de p38 MAPK sobre ERK (Liu y Hofmann 2004; Porras *et al.*, 2004). El efecto de STI-571 en la fosforilación de ERK fue casi totalmente revertido en células *knock-down* para C3G tratadas conjuntamente con SB203580. De acuerdo, con estudios anteriores (Guerrero *et al.*, 2004), el efecto del silenciamiento de C3G sobre fosfo-ERK fue independiente de su actividad GEF sobre Rap1, ya que el mutante dominante negativo de Rap1 (Rap1S17N) exhibió un comportamiento contrario al silenciamiento de C3G, es decir inhibió la fosforilación de ERK, acorde con la activación de la vía B-Raf-ERK mediada por Rap1 en estas células (Stork y Dillon 2005).

C3G y p38 α MAPK tienen un papel regulador negativo en la activación de Akt en células K562, observaciones que coinciden con datos previos en otros tipos celulares (Voss *et al.*, 2006; Zuluaga *et al.*, 2007a). El tratamiento con STI-571 no tuvo efecto en la fosforilación de Akt en células K562, que se mantuvo en niveles muy bajos de acuerdo con lo descrito por otros autores (Jacquel *et al.*, 2003). Sin embargo combinando STI-571 con SB203580 se detectó un incremento de los niveles de fosforilación de Akt, que fue aún más evidente en células donde la expresión de C3G o

p38 α había sido silenciada (Figura I-12). Este efecto del silenciamiento de C3G sobre la fosforilación de ERK y Akt concuerda con la función anti-proliferativa de C3G anteriormente reportada (Guerrero *et al.*, 2004; Guerrero *et al.*, 1998; Martin-Encabo *et al.*, 2007; Voss *et al.*, 2006). En consecuencia, contemplamos que la apoptosis inducida por la sobre-expresión de C3G sea debida a la acción inhibitoria sobre ERK y Akt, aunque no pueden excluirse otros mecanismos, incluyendo la participación de Hck. Cabe destacar que la activación de Rap1 mediada por C3G juega un papel en la inducción de la proliferación y supervivencia celular en células hematopoyéticas, estimuladas con IL-3 o expresando Bcr-Abl, a través de la activación de las vías B-Raf-ERKs y PI3K-Akt (Jin *et al.*, 2006; Mizuchi *et al.*, 2005; Stork y Dillon 2005). Además, hay que tener en cuenta la presencia de p87C3G, isoforma de C3G abundantemente expresada en células LMC, que es fosforilada por Bcr-Abl, lo que sugiere su participación en la leucemogénesis promovida por Bcr-Abl (Gutierrez-Berzal *et al.*, 2006). Por consiguiente, C3G parece tener una doble función reguladora en células de LMC mediante la modulación de ambas vías, apoptótica y de supervivencia. Así, la vía de C3G-Rap1 puede contribuir al fenotipo maligno inducido por Bcr-Abl, tanto por la inhibición de vías pro-apoptóticas, como p38 MAPK, como por la estimulación de vías de supervivencia como las cascadas ERKs y Akt. Por el contrario, C3G puede inhibir las vías de ERK y Akt a través de mecanismos independientes de Rap1 que pueden involucrar la activación de fosfatasas (Martin-Encabo *et al.*, 2007). Apoyando este doble papel de C3G, numerosas evidencias han confirmado que tanto el exceso como el defecto de la activación de Rap1, particularmente en células hematopoyéticas, puede contribuir a la malignidad a través de distintos efectos biológicos, dependiendo del contexto celular (revisado por Hattori y Minato 2003; Stork 2003; Stork y Dillon 2005). Por ejemplo, ratones deficientes en SPA-1 desarrollan desórdenes mieloproliferativos similares a la LMC humana (Ishida *et al.*, 2003).

El hecho de que el silenciamiento de C3G pueda revertir el efecto inhibitorio de STI-571 sobre la activación de ERK, junto con su efecto sinérgico sobre la fosforilación de p38 MAPK y la apoptosis inducida por STI-571, sugieren que la activación de C3G no solo depende de Bcr-Abl si no que deben de existir otras vías alternativas. Esto es importante, ya que hasta la fecha no se han descrito rutas independientes de Bcr-Abl en células de LMC. Por tanto estos resultados pueden inspirar nuevas aproximaciones terapéuticas para el tratamiento de la LMC. La función reguladora de C3G en apoptosis está apoyada por el análisis de los datos de los

GeneChips de Affymetrix, que revela un gran número de genes involucrados en apoptosis que están diferencialmente expresados en los clones *knock-down* para C3G. La expresión de algunos de esos genes está igualmente regulada por p38 α MAPK, reforzando aún más la idea de una asociación funcional entre estas dos proteínas en la regulación de la apoptosis en LMC.

En resumen, los resultados presentados son compatibles con un papel dual de C3G en apoptosis, donde la función anti-apoptótica de C3G promueve la activación de Rap1 resultando en la inhibición de p38 α través de un mecanismo desconocido, mientras que la función anti-proliferativa/pro-apoptótica de C3G involucra una inhibición de las vías de señalización ERKs y Akt independientemente de Rap1 (Figura D-1). Así, este modelo puede explicar como tanto la sobreexpresión de C3G como su *knock-down* pueden inducir apoptosis. La sobreexpresión de C3G inhibe las rutas de supervivencia de ERK y Akt, lo que induce apoptosis. Por otra parte, el silenciamiento de C3G induce la activación de p38 MAPK y contribuye a la inhibición de la ruta Rap1-B-Raf-ERK, siendo ambos eventos favorecedores de la apoptosis.

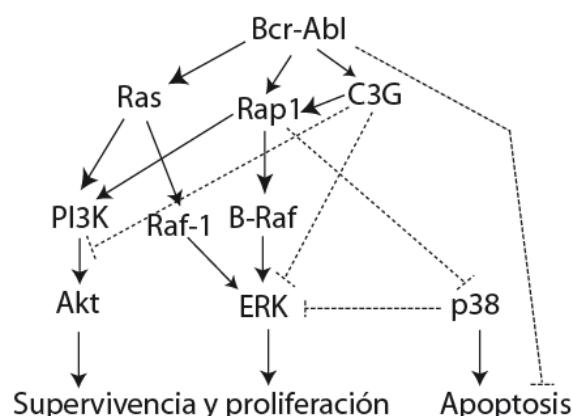


Figura D-1. Modelo de la participación de C3G en las vías de Bcr-Abl en células K562. Rap1 es mediador del efecto de C3G sobre p38, sin embargo C3G también inhibe las vías de proliferación y de supervivencia independientemente de Rap1. Las vías de activación están representadas por las líneas sólidas y las vías de inhibición con líneas discontinuas.

En conclusión, aunque C3G parece tener un papel complejo en LMC, la desregulación de su expresión incrementa la apoptosis mediada por STI-571 en células LMC. Por consiguiente, podemos proponer a C3G como una diana terapéutica alternativa para nuevas terapias anti-tumorales en LMC.

Capítulo II

Bcr-Abl está implicado en la regulación de la adhesión a laminina, fibronectina y colágeno de las células leucémicas a través de la formación de complejos con las integrinas $\beta 1$, siendo el dominio SH3 el responsable de estos efectos (Skorski *et al.*, 1998).

Estudios previos de nuestro grupo y otros han descrito la existencia de una interacción entre C3G y Bcr-Abl en células de LMC K562, a través de los dominios SH3 de Abl y SH3-b (región rica en prolinas) de C3G (Gutierrez-Berzal *et al.*, 2006; Mitra A. y Radha 2010; Radha *et al.*, 2007). Sin embargo, ensayos de doble híbrido con los dominios aislados sugieren que esta interacción no es directa por lo que debe existir un intermediario(s) molecular(es) de esta interacción (Gutierrez Berzal y Guerrero, observaciones no publicadas). Se han identificado varias proteínas que interaccionan con el dominio SH3 de Abl, como 3BP-1 (Cicchetti *et al.*, 1992), Abi-1 (Shi *et al.*, 1995), Abi-2 (Dai y Pendergast 1995), AAP1 (Zhu J. y Shore 1996), RIN1 (Afar *et al.*, 1997), y PAG (Wen y Van Etten 1997). Sin embargo, solo tres de ellas (RIN1, PAG y Abi1/2) se unen también a Bcr-Abl y de hecho actúan como potenciales efectores en la señalización desde el dominio SH3 de Bcr-Abl. De todas ellas, solo Abi1/2 contiene, tanto un dominio SH3 como un dominio SH3-b, y por tanto puede interaccionar potencialmente a la vez con Bcr-Abl y C3G (Skorski *et al.*, 1998). En este trabajo hemos descrito por primera vez que, no solo Abi1/2, si no también las proteínas Cbl y p130Cas son mediadores de la interacción entre las proteínas C3G y Bcr-Abl. Escogimos estudiar las proteínas Abi1, Cbl y p130Cas ya que, al igual que C3G y Bcr-Abl son proteínas que participan en procesos de adhesión y porque además poseen dominios SH3 y/o SH3-b que podrían mediar la interacción entre C3G y Bcr-Abl.

Nuestros estudios de *pull-down* con dominios SH3 y SH3-b aislados indican que en células K562, Bcr-Abl interacciona mediante el dominio SH3, además de con p140C3G, p87C3G y con Abi1/2 en concordancia con lo descrito (Gutierrez-Berzal *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 1995), con Cbl y con p130Cas. A su vez, la proteína Abi1 interacciona con Bcr-Abl a través de ambos dominios SH3 y SH3-b, de acuerdo con lo descrito en la bibliografía (Dai y Pendergast 1995; Shi *et al.*, 1995), y con p87C3G. Estos datos indican que Abi1 puede unirse tanto a Bcr-Abl como a p87C3G, mediante sus dominio SH3-b y SH3, respectivamente, y que por tanto puede actuar como

mediador directo entre C3G y Bcr-Abl (Figura D-2). Alternativamente, está descrito que Abi1 puede unirse directamente al dominio SH3-b de Bcr-Abl, a través de su dominio SH3 (Dai y Pendergast 1995). Según nuestros resultados en los cuales el dominio SH3-b de Abi1 también interacciona con p87C3G, Abi1 podría también interactuar indirectamente con p87C3G a través de otra(s) molécula(s) que contenga(n) en su estructura dominios SH3 y SH3-b. La proteína WAVE-2, que contiene un dominio SH3, podría ser un posible mediador del complejo Bcr-Abl-Abi1-C3G, ya que esta proteína interacciona directamente con Abi1 formando un complejo que regula la polimerización de actina (Innocenti *et al.*, 2004). Además, WAVE-2 se asocia a Abl regulando la activación de Rap1 mediada por integrinas a través del reclutamiento del complejo CrkL/C3G (Nolz *et al.*, 2008). Finalmente, esta hipótesis está apoyada por el hecho de que C3G interacciona con actina en el citoesqueleto subcortical (Martin-Encabo *et al.*, 2007).

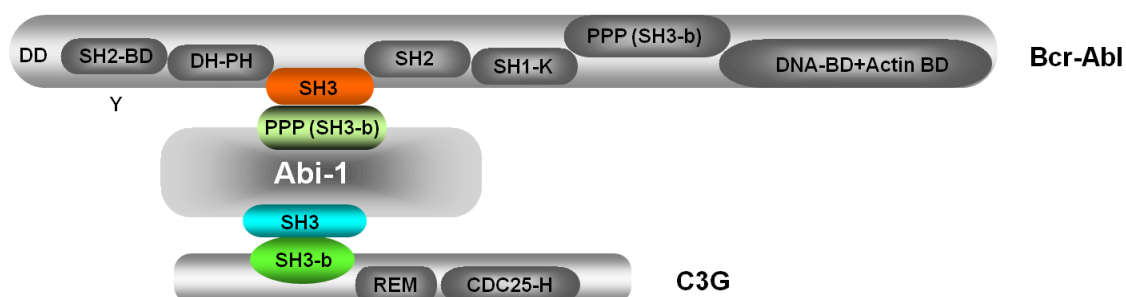


Figura D-2. Representación del modelo de interacción entre el dominio SH3 de Bcr-Abl y el dominio SH3-b de C3G a través de su unión directa a los dominios SH3-b y SH3 de Abi1, respectivamente. DD: dominio de dimerización; SH2-BD: dominio de unión a SH2; SH1-K: dominio quinasa; DNA-BD+Actin-BD: dominios de interacción con DNA y actina.

Cbl participa en la vía de señalización Crk-C3G-Rap1 en células hematopoyéticas (Uemura y Griffin 1999; Zhang *et al.*, 2003). Diversos autores han descrito una asociación directa entre un dominio rico en tirosinas de Cbl y el dominio SH2 de Bcr-Abl, CrkL o Grb2 (Bhat *et al.*, 1997; Fukazawa *et al.*, 1995; Meisner *et al.*, 1995; Park *et al.*, 1998), sin embargo no observaron asociación entre el dominio SH3-b de Cbl y el dominio SH3 de Bcr-Abl (Bhat *et al.*, 1997). A diferencia de estos resultados, nuestros datos demuestran por primera vez, que Cbl interacciona tanto con Bcr-Abl como con C3G a través de su dominio SH3-b. Por otra parte, existen datos que describen una asociación directa entre el dominio SH3 de CrkL o Grb2 y el dominio

SH3-b de C3G (Reedquist *et al.*, 1996; Smit *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1994). Estos datos apoyan una interacción directa entre el dominio SH3 de Bcr-Abl y el dominio SH3-b de Cbl, y una asociación indirecta entre Cbl y C3G posiblemente a través de CrkL o de Grb2. Por tanto, Cbl también podría actuar como mediador de la interacción entre C3G y Bcr-Abl según el modelo de la Figura D-3.

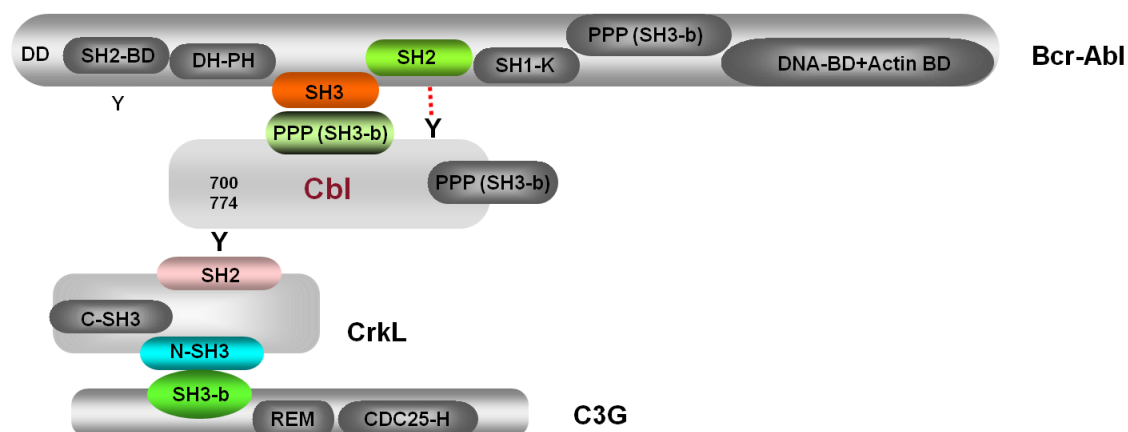


Figura D-3. Representación de la interacción entre Bcr-Abl y C3G a través de la unión directa del dominio SH3-b de Cbl al dominio SH3 de Bcr-Abl y de su interacción indirecta a C3G mediante el dominio SH2 y SH3 de CrkL que se une a las tirosinas 700 y 774 fosforiladas de Cbl y al dominio SH3-b de C3G, respectivamente.

Kirsch y colaboradores en 1998 describieron la interacción directa entre el dominio SH3 de p130Cas y un dominio rico en prolinas de p140C3G, lo que está de acuerdo con nuestros datos (Kirsch *et al.*, 1998). A su vez, los tres dominios SH3, P1 y P2 de p130Cas interaccionan con Bcr-Abl, con diferentes afinidades. Estos datos juntamente con la ya descrita interacción directa entre p140C3G y el dominio SH3 de p130Cas podrían explicar la interacción entre Bcr-Abl y p140C3G, siendo por tanto p130Cas otro claro candidato a mediar la interacción entre C3G y Bcr-Abl (Figura D-4). Además, nuestros resultados describen por primera vez, la asociación de los dominios P1 y P2 de p130Cas a p87C3G, lo que implica la participación de otra(s) molécula(s) que posea(n) un dominio SH3 que permita la unión al dominio SH3-b de C3G. Es posible que la interacción de p87C3G con Bcr-Abl produzca asociaciones aberrantes con las moléculas de las adhesiones focales y que por tanto contribuya a las alteraciones en adhesión inducidas por Bcr-Abl en las células de LMC, previamente reportadas (Salgia *et al.*, 1997). Ensayos de inmunofluorescencia muestran la colocalización de

C3G con todas estas proteínas, lo que apoya las interacciones ya descritas de C3G con Bcr-Abl (Gutierrez-Berzal *et al.*, 2006; Mitra A. y Radha) y con p130Cas (Kirsch *et al.*, 1998), y las interacciones novedosas de C3G con Abi1 y con Cbl en células de LMC (Figura II-3).

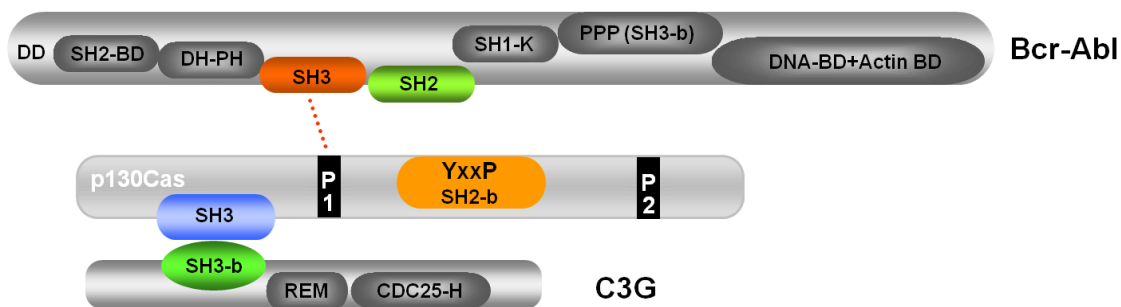


Figura D-4. Representación de la interacción indirecta entre el dominio SH3 de Bcr-Abl y el dominio SH3-b de C3G a través de la unión directa de éstos dominios a los dominios P1 y SH3 de p130Cas, respectivamente.

El silenciamiento de las proteínas Abi1, Cbl y p130Cas en células K562 distorsiona la interacción entre C3G y Bcr-Abl lo que apoya, una vez más, que estas proteínas son intermediarios de la interacción entre Bcr-Abl y C3G. Así, el silenciamiento de Abi1 resultó en una clara disminución de los niveles de p140C3G asociada a Bcr-Abl, a pesar de que no se observó interacción entre el dominio SH3 de Abi1 y p140C3G. Sin embargo, no se observaron cambios en los niveles de p87C3G asociado a Bcr-Abl. Estos resultados podrían ser explicados por la mayor expresión de p87C3G en comparación con p140C3G, que es apenas detectable en la mayoría de los experimentos. Otra explicación es que Abi1 sea necesario en la interacción entre p140C3G y Bcr-Abl mientras que no sea muy relevante en la interacción entre p87C3G y Bcr-Abl. En cuanto a Cbl, su papel en la interacción entre Bcr-Abl y C3G no está claro ya que su silenciamiento en células K562 resultó tanto en la disminución como en el incremento de la interacción entre estas proteínas. Como hemos mencionado anteriormente, nuestros datos indican que Cbl participa en la interacción entre Bcr-Abl y C3G probablemente a través de una cuarta proteína que podría ser CrkL o Grb2. Un posible papel dual y dinámico de Cbl en esta interacción, implicando la participación de otras proteínas, podría explicar la contradicción de estos resultados. El *knock-down* de p130Cas disminuye la cantidad de las dos isoformas de C3G que se asocian al dominio SH3 de Bcr-Abl. Estos datos conjuntamente con los resultados que demuestran que los

dominios SH3, P1 y P2 de p130Cas interaccionan con tanto con C3G como con Bcr-Abl sugieren que p130Cas es una proteína necesaria en la interacción entre Bcr-Abl y C3G.

Por lo tanto podemos concluir que las proteínas Abi1 y p130Cas son claros intermediarios de la interacción entre C3G y Bcr-Abl mientras que el papel de Cbl como mediador en esta interacción es más ambiguo.

Ensayos de hibridación de los dominios SH3-b de C3G, Cbl y p130Cas con dominios SH3 inmovilizados demuestran que estas proteínas interaccionan directamente con el mismo grupo de proteínas, destacando las que participan en adhesión. El dominio SH3-b de C3G se asoció mayoritariamente a moléculas involucradas en adhesión celular, como cortactina, Y124, YES1, VAV2, SPCN, c-Src, ABL2, OSF, CrkL, Nck1, Tec y vinexina (Figura II-6). La cortactina, vinexina, c-Src, YES y CrkL forman parte de los complejos proteicos encontrados en los focos de adhesión (Kioka *et al.*, 1999; Li L. *et al.*, 2002; Miranti y Brugge 2002; Ren G. *et al.*, 2009). Adicionalmente, C3G interacciona con Y124 (Beta-Pix) que participa en el reclutamiento de paxilina a las adhesiones focales mediante la activación de Rac1 y Cdc42 (Lamorte *et al.*, 2003). ABL2 (ARG) activa a RhoGAP que a su vez inactiva a RhoA, siendo crucial para el ensamblaje y maduración de las adhesiones (Shimizu *et al.*, 2008). La interacción de C3G con estas proteínas sugiere su participación en la dinámica de las adhesiones focales. La proteína adaptadora NCK1 forma parte del complejo de proteínas adaptadoras GADS/Slp-76/Nck1 que participa en la regulación del citoesqueleto de actina por Bcr-Abl (Preisinger y Kolch). La interacción de C3G con esta proteína sugiere su participación en el mismo complejo regulando el citoesqueleto de actina mediante la actividad de Bcr-Abl. La proteína OSF, sustrato de Src, se localiza en las adhesiones focales e interacciona con Cbl apoyando la hipótesis de que Cbl es intermediario de la interacción entre Bcr-Abl y C3G, posiblemente a través de su asociación con OSF (Szymkiewicz *et al.*, 2004). Cbl así como C3G, también interaccionan directamente con c-Src de acuerdo con la bibliografía (Odai *et al.*, 1995), indicando que esta proteína podría ser también la cuarta proteína mencionada. Por otra parte, C3G interacciona con los dominios SH3 de proteínas pro-apoptóticas como BTK, SLK y BLK (Lee S. *et al.*, 2002; Sabourin y Rudnicki 1999; Uckun 1998). Al contrario de lo esperado, no se detectó unión directa entre los dominios SH3-b de C3G y SH3 de Abi2 (ABL2B), sugiriendo la existencia de una molécula intermediaria en la interacción entre estas dos proteínas, hipótesis que está avalada por nuestros resultados indicando que el dominio SH3-b de Abi1 interacciona con C3G. No se observó interacción entre

C3G y p130Cas en este experimento debido a que el fragmento que contiene el dominio SH3-b de C3G utilizado no incluye los aminoácidos esenciales para esta unión (Kirsch *et al.*, 1998). El dominio SH3-b de C3G y de Cbl también interaccionaron directamente con el dominio SH3 de CrkL en concordancia con la bibliografía (Alsayed *et al.*, 2000; Keane *et al.*, 1999), apoyando la hipótesis de que Cbl media la interacción C3G/Bcr-Abl mediante su interacción con CrkL. La interacción entre p130Cas y el dominio SH3 de CrkL sugiere una asociación alternativa entre estas dos proteínas a la previamente descrita que involucra el dominio SH2 de CrkL y un dominio rico en tirosinas fosforilables de p130Cas (Salgia *et al.*, 1996b). El dominio rico en prolinas P2 de p130Cas y el dominio SH3-b de Cbl, aunque con poca afinidad, interaccionan directamente con el dominio SH3 de Abl, apoyando nuestros datos que indican a estas proteínas como mediadores de la interacción entre Bcr-Abl y C3G. Estos datos son innovadores ya que nunca se había descrito una interacción directa entre los dominios SH3-b de estas proteínas con el dominio SH3 de Abl. Lo único descrito hasta la fecha es la interacción de Cbl con Bcr-Abl mediante el dominio SH2 de Abl y tirosinas fosforiladas de Cbl (Bhat *et al.*, 1997). También observamos una cierta interacción directa entre el dominio SH3-b de C3G y Abl, lo que está en contradicción con los ensayos de doble híbrido mencionados. Una posible explicación es que estas interacciones se favorezcan *in vitro* donde hay un exceso de proteína.

Los dominios SH3-b de Cbl y el dominio rico en prolinas P2 de p130Cas comparten un vasto número de interacciones con C3G. Las proteínas en común son en su mayoría proteínas implicadas en adhesión como cortactina, Y124, YES1, c-Src, VAV2, ODF, VINE y ABL2 (ARG). Adicionalmente, Cbl interacciona con el dominio SH3 de Abi2 (ABL2B) de acuerdo con la bibliografía (Tanos y Pendergast 2007), sugiriendo, una vez más, que podrían participar en el mismo complejo donde se encuentran Bcr-Abl y C3G.

Capítulo III

En esta tercera parte hemos tratado de determinar la contribución de C3G a la regulación de la adhesión de las células de LMC, K562. Los resultados mostraron que en nuestras condiciones experimentales las células de LMC se unen en mayor medida a la fibronectina que al colágeno IV o a la laminina, en discordancia con lo descrito por

Verfaillie y colaboradores en 1992, que describe una menor adherencia de células de pacientes de LMC a fibronectina (Verfaillie *et al.*, 1992). Esta divergencia de resultados puede ser explicada por el uso de un modelo de estudio diferente al nuestro, ya que esos autores utilizaron muestras de médula ósea de 22 pacientes de LMC.

Nuestros datos indican que la proteína C3G participa positivamente en la regulación de la adhesión en células de LMC, ya que el silenciamiento de la misma provocó una disminución de adhesión a fibronectina en células K562. Estos resultados concuerdan con el papel en adhesión de C3G descrito (Ohba *et al.*, 2001; Voss *et al.*, 2003). Del mismo modo, nuestros resultados indican que Abi1 y Cbl son reguladores positivos de la adhesión a fibronectina, lo que nuevamente está de acuerdo con la bibliografía (Li Y. *et al.*, 2007a; Uemura y Griffin 1999; Zhang *et al.*, 2003). Sato y colaboradores en 2005 describen que la inhibición de p38 MAPK con SB203500 en células de linfoma Karpas 299 resulta en la disminución de la adhesión a fibronectina, lo que está de acuerdo con los datos de las células *knockdown* para p38 α que indican una función reguladora positiva de la adhesión por p38 α (Sato *et al.*, 2005). Sin embargo, Guo y colaboradores en 2006 describen un incremento de la adhesión a fibronectina de células madre embrionarias de ratón deficientes en p38 α (Guo Y. L. y Yang 2006). Estos resultados podrían sugerir que el papel de p38 α MAPK en adhesión está alterado en células tumorales, como las células de linfoma o nuestras células de LMC. Los resultados con el doble *knock-down* C3G/p38 α sugieren que las dos proteínas participan en la misma vía de señalización de adhesión ya que los niveles de adhesión a fibronectina son semejantes a los de los *knock-down* simples. En contraste, la proteína p130Cas parece tener un papel regulador negativo en la adhesión, ya que su silenciamiento produjo un aumento de la adhesión a fibronectina de células K562, lo que está de acuerdo con su papel en migración (Cary *et al.*, 1998).

En base a estos resultados, hemos analizado las interacciones de C3G y p38 α con algunas de las proteínas de adhesión focal. En células control K562 en presencia de fibronectina, C3G interacciona con CrkL, de acuerdo con lo descrito (Buensuceso y O'Toole 2000; Gutierrez-Berzal *et al.*,). Además, C3G interacciona con la isoforma p68 de paxilina fosforilada, corroborado por la colocalización de paxilina con C3G en experimentos de microscopia confocal. Estos resultados concuerdan con las aproximaciones de Voss y colaboradores en 2003, según las cuales C3G es necesario para la activación y formación de los focos de adhesión que poseen paxilina (Voss *et*

al., 2003). Además C3G co-inmunoprecipita con FAK, lo que está de acuerdo con otros trabajos que describen la formación de complejos en los focos de adhesión que contienen, no solo C3G y FAK si no también paxilina y CrkL, estando esta última unida tanto a C3G como a FAK y Bcr-Abl en células K562 (Miranti y Brugge 2002). CrkL, en contraste con C3G, se une solo a la isoforma p33 de paxilina fosforilada en concordancia con lo descrito (Salgia *et al.*, 1997). Por otra parte, nuestros datos indican que p38 α también participa en la formación de los focos de adhesión ya que además de la disminución de la adhesión provocada por su silenciamiento, interacciona con las proteínas de las adhesiones focales CrkL, paxilina y FAK, además de con C3G. La proteína p130Cas, que también forma parte de los complejos de los focos de adhesión, se encuentra asociada a Bcr-Abl de acuerdo con la bibliografía (Mayer B. J. *et al.*, 1995); el aumento de adhesión inducido por el *knock-down* de p130Cas, sugiere que en células de LMC, Bcr-Abl podría regular negativamente la adhesión a través de p130Cas, cuya fosforilación ha sido asociada a la inducción de la migración celular, encontrándose en las adhesiones focales a lo largo de las etapas de ensamblaje y desensamblaje (Cary *et al.*, 1998; Donato *et al.*, 2010). Estos datos indican que C3G y p38 α forman complejos con proteínas que participan en la formación y regulación de las adhesiones focales.

Todos los datos presentados indicarían que C3G tiene un papel regulador positivo en adhesión, sin embargo, tanto la sobre-expresión como el silenciamiento de C3G tienen un efecto inhibitor sobre la expresión de algunas de las proteínas que forman parte de las adhesiones focales. Ambos clones presentaron una disminución de la expresión de paxilina, sin embargo, al contrario del *knock-down* que manifestó una disminución de la fosforilación de las isoformas p68, p46 y p33 de paxilina, la sobre-expresión de C3G presentó un incremento de la fosforilación de las mismas, principalmente de las isoformas p46 y p33, lo que concuerda con la mayor adhesión y expansión de estas células (datos no mostrados). La expresión de Cbl también parece estar regulada positivamente por la expresión de C3G, disminuyendo con su silenciamiento y aumentando con su sobre-expresión. Por el contrario, la sobre-expresión de C3G produjo una pequeña disminución de la expresión de p130Cas, mientras que el silenciamiento, aunque no alteró la expresión, disminuyó la fosforilación de p130Cas. Estos datos concuerdan una vez más, con el efecto inhibitor de p130Cas en adhesión a fibronectina, descrito anteriormente, y con su papel inductor en migración (Cary *et al.*, 1998). La señalización celular inducida por fibronectina en

las células K562 está regulada de forma distinta en los dos clones. En presencia de fibronectina, la sobre-expresión de C3G disminuyó aún más la expresión de FAK, paxilina y p130Cas mientras que el silenciamiento de C3G provocó el incremento de la expresión proteica de paxilina y de sus formas fosforiladas así como la fosforilación de p130Cas y CrkL. Además, el silenciamiento de C3G tiene efecto en la interacción de algunas de las proteínas en estudio. Así, la interacción entre CrkL y Bcr-Abl se redujo, mientras que la asociación de CrkL con paxilina fue incrementada (Figura III-5C). Esto indica que C3G participa en la regulación de la propagación de señales resultantes de la adhesión a fibronectina. Todos estos datos sugieren un papel regulador de C3G, tanto en la expresión de proteínas involucradas en la adhesión celular, así como en su activación y en los niveles de asociación de las mismas (Figura D-5). De manera equivalente a lo observado en la regulación de la apoptosis, estos resultados apoyan un papel dual de C3G en la regulación de la adhesión, ya que tanto la sobreexpresión como el silenciamiento de C3G producen un efecto similar que resulta en la inhibición de proteínas implicadas en las vías de señalización que regulan la adhesión celular.

Por otra parte, nuestros resultados indican que p38 α MAPK regula la expresión y activación de proteínas de adhesión de forma antagónica a C3G. El *knock-down* de p38 α presentó aumento generalizado de la expresión y fosforilación de las proteínas de adhesión, integrina $\alpha 5$, CrkL, paxilina, p130Cas y de la fosforilación de p130Cas y las isoformas p68, p46 y p33 de paxilina (Figura III-6). En cambio la proteína FAK no sufrió cambios en su expresión. Todas las proteínas con la excepción de FAK, sufrieron un incremento adicional de su expresión y fosforilación en presencia de fibronectina, incluyendo la misma p38 α . Estos datos sugieren que p38 α MAPK tiene un papel regulador negativo de la expresión de las proteínas de adhesión celular (Figura D-5), de acuerdo con Guo y colaboradores que describen un papel inhibidor para p38 α MAPK en adhesión (Guo Y. L. y Yang 2006). El efecto negativo de p38 α MAPK en adhesión está en sintonía con su papel en migración (Cuenda y Rousseau 2007). Estos datos contradicen la disminución de la adhesión manifestada por el *knock-down* de p38 α representada en la Figura III-2. El hecho de que el ensayo de adhesión haya sido realizado en ausencia de suero podría explicar las contradicciones presentadas por el *knock-down* para p38 α . Posiblemente, la ausencia de suero provocó la activación, tanto de p38 α como de otras isoformas de p38 MAPK (principalmente la β) y como consecuencia, la disminución de la adhesión de las células K562, teniendo en cuenta su

papel inhibitor en la adhesión (Guo Y. L. y Yang 2006; Nebreda y Porras 2000; Zuluaga *et al.*, 2007b). Estos resultados, donde el *knock-down* de p38 α tiene un papel antagónico al *knock-down* de C3G, están en sintonía con los datos de sus funciones en apoptosis. Además los resultados de la adhesión con el doble *knock-down* de C3G/p38 α apoyan que, al igual que en apoptosis, ambas proteínas participan en una ruta común de regulación de la adhesión. El silenciamiento de Cbl no afectó a la expresión y activación de las proteínas de adhesión con la excepción de paxilina que incrementó su nivel de expresión. A su vez, el *knock-down* de Abi1 presentó una disminución generalizada del nivel de expresión de las proteínas de adhesión y de la fosforilación de paxilina en un 30% en condiciones de suspensión. En cuanto al *knock-down* de p130Cas, éste presentó disminución de la expresión y fosforilación de paxilina, mientras que no afectó a la expresión de FAK (Figura III-7). En células silenciadas para Abi1, la fibronectina no indujo cambios significativos en la expresión y fosforilación de las proteínas de adhesión con respecto al control. La excepción fue FAK cuya expresión aumentó, lo que sugiere un papel regulador de Abi1 en la expresión de FAK. Las células *knock-down* para Cbl y p130Cas estimuladas con fibronectina mostraron una disminución en la expresión y activación de proteínas de adhesión con respecto a las células control. Estos datos indican que estas tres proteínas, Abi1, Cbl y p130Cas participan en la regulación de la expresión de proteínas implicadas en la vía de señalización mediada por la fibronectina. Estos datos están apoyados por los resultados del ensayo de adhesión, que muestran que el silenciamiento de Abi1, Cbl y p130Cas altera la propiedades adhesivas de estas células.

En resumen, nuestros datos indican que C3G regula positivamente la expresión de paxilina, FAK, p130Cas, integrina $\alpha 5$ y Cbl mientras que p38 α MAPK regularía negativamente la expresión de paxilina, CrkL, p130Cas e integrina $\alpha 5$. Por otra parte, Cbl y p130Cas regulan principalmente la expresión y fosforilación de paxilina, mientras que Abi no solo regula la expresión y fosforilación de paxilina como también de FAK y p130Cas (Figura D-5).

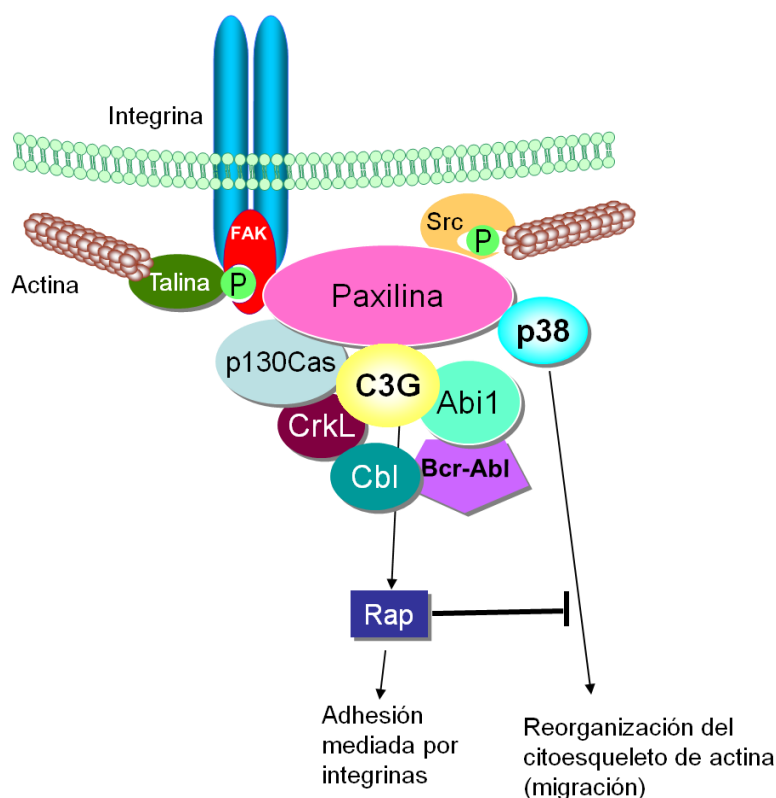


Figura D-5. Representación del papel de C3G en la regulación de la adhesión en LMC a través de la interacción con proteínas de las adhesiones focales. C3G regula positivamente la expresión de proteínas de adhesión focal promoviendo la adhesión mediada por integrinas. p38 MAPK regula negativamente las proteínas de adhesión focal de acuerdo con su papel en la migración celular (Cuenda y Rousseau 2007).

Como conclusión general, nuestros resultados indican que C3G es un regulador de apoptosis y de adhesión celular en células de leucemia mieloide crónica. Los niveles de C3G necesitan estar muy controlados ya que tanto la sobre-expresión como la disminución de su expresión alteran el balance de supervivencia/muerte celular, así como la expresión de proteínas clave en la adhesión. p38 α MAPK participa juntamente, y de modo antagónico, con C3G en la regulación de ambos procesos, apoptosis y adhesión celular formando complejos con proteínas de las adhesiones focales, incluyendo C3G. Además, aportamos datos que sugieren que Cbl, Abi1 y p130Cas son intermediarios de la interacción entre C3G y Bcr-Abl y que participan en la regulación de la adhesión en células de LMC.



CONCLUSIONES

C3G regula la apoptosis, tanto basal como inducida por STI-571 en células de LMC K562, a través de la inhibición de p38 α MAPK por un mecanismo dependiente de Rap1.

C3G participa en el efecto inhibitor de STI-571 sobre las rutas de supervivencia, ERK y Akt en células K562. Esta función antiproliferativa es independientemente de Rap1.

Las proteínas Abi1, Cbl y p130Cas son intermediarios de la interacción entre C3G y Bcr-Abl. Todas estas proteínas forman parte de los mismos complejos en los que participan C3G y Bcr-Abl junto con proteínas de las adhesiones focales como Crk, paxilina y FAK, entre otras.

C3G, Abi1, Cbl y p130Cas regulan positivamente la expresión y activación de paxilina y FAK, mientras que p38 α MAPK las regula negativamente.

p38 α MAPK forma complejos con el mismo grupo de proteínas de adhesión focal que interaccionan con C3G, indicando una relación funcional entre las dos proteínas en adhesión celular, pero al igual que en la regulación de la apoptosis, p38 α MAPK actúa de forma antagónica a C3G en la regulación de la adhesión en células de LMC.

CONCLUSIÓN FINAL:

C3G regula la apoptosis y la adhesión celular en células de leucemia mieloide crónica a través de mecanismos en los que participa p38 α MAPK. Los niveles de C3G necesitan estar controlados ya que tanto la sobreexpresión como la disminución de su expresión alteran el balance de supervivencia/muerte celular, así como la expresión de proteínas clave en la adhesión. La existencia de isoformas de C3G, como la abundantemente expresada p87C3G, que interaccionan con el dominio SH3 - regulador de la adhesión- de Bcr-Abl, sugiere la participación de C3G en la perturbación de las propiedades adhesivas de las células de LMC inducidas por Bcr-Abl.



BIBLIOGRAFIA

Adams, R.H., Porras, A., Alonso, G., Jones, M., Vintersten, K., Panelli, S., Valladares, A., Perez, L., Klein, R. y Nebreda, A.R. 2000. Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. *Mol Cell* 6: 109-116.

Afar, D.E., Han, L., McLaughlin, J., Wong, S., Dhaka, A., Parmar, K., Rosenberg, N., Witte, O.N. y Colicelli, J. 1997. Regulation of the oncogenic activity of BCR-ABL by a tightly bound substrate protein RIN1. *Immunity* 6: 773-782.

Al-Shahrour, F., Diaz-Uriarte, R. y Dopazo, J. 2004. FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics* 20: 578-580.

Alsayed, Y., Uddin, S., Ahmad, S., Majchrzak, B., Druker, B.J., Fish, E.N. y Plataniias, L.C. 2000. IFN-gamma activates the C3G/Rap1 signaling pathway. *J Immunol* 164: 1800-1806.

Aouadi, M., Binetruy, B., Caron, L., Le Marchand-Brustel, Y. y Bost, F. 2006. Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice. *Biochimie* 88: 1091-1098.

Arai, A., Nosaka, Y., Kohsaka, H., Miyasaka, N. y Miura, O. 1999. CrkL activates integrin-mediated hematopoietic cell adhesion through the guanine nucleotide exchange factor C3G. *Blood* 93: 3713-3722.

Avizienyte, E. y Frame, M.C. 2005. Src and FAK signalling controls adhesion fate and the epithelial-to-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol* 17: 542-547.

Balzac, F., Avolio, M., Degani, S., Kaverina, I., Torti, M., Silengo, L., Small, J.V. y Retta, S.F. 2005. E-cadherin endocytosis regulates the activity of Rap1: a traffic light GTPase at the crossroads between cadherin and integrin function. *J Cell Sci* 118: 4765-4783.

Bandyopadhyay, G., Biswas, T., Roy, K.C., Mandal, S., Mandal, C., Pal, B.C., Bhattacharya, S., Rakshit, S., Bhattacharya, D.K., Chaudhuri, U., Konar, A. y Bandyopadhyay, S. 2004. Chlorogenic acid inhibits Bcr-Abl tyrosine kinase and triggers p38 mitogen-activated protein kinase-dependent apoptosis in chronic myelogenous leukemic cells. *Blood* 104: 2514-2522.

Bazzoni, G., Carlesso, N., Griffin, J.D. y Hemler, M.E. 1996. Bcr/Abl expression stimulates integrin

function in hematopoietic cell lines. *J Clin Invest* 98: 521-528.

Beardmore, V.A., Hinton, H.J., Eftychi, C., Apostolaki, M., Armaka, M., Darragh, J., McIlrath, J., Carr, J.M., Armit, L.J., Clacher, C., Malone, L., Kollias, G. y Arthur, J.S. 2005. Generation and characterization of p38beta (MAPK11) gene-targeted mice. *Mol Cell Biol* 25: 10454-10464.

Berrier, A.L. y Yamada, K.M. 2007. Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol* 213: 565-573.

Bhat, A., Kolibaba, K., Oda, T., Ohno-Jones, S., Heaney, C. y Druker, B.J. 1997. Interactions of CBL with BCR-ABL and CRKL in BCR-ABL-transformed myeloid cells. *J Biol Chem* 272: 16170-16175.

Bhatia, R., McCarthy, J.B. y Verfaillie, C.M. 1996. Interferon-alpha restores normal beta 1 integrin-mediated inhibition of hematopoietic progenitor proliferation by the marrow microenvironment in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 87: 3883-3891.

Biesova, Z., Piccoli, C. y Wong, W.T. 1997. Isolation and characterization of e3B1, an eps8 binding protein that regulates cell growth. *Oncogene* 14: 233-241.

Birge, R.B., Kalodimos, C., Inagaki, F. y Tanaka, S. 2009. Crk and

CrkL adaptor proteins: networks for physiological and pathological signaling. *Cell Commun Signal* 7: 13.

Boguski, M.S. y McCormick, F. 1993. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366: 643-654.

Bos, J.L. 1997. Ras-like GTPases. *Biochim Biophys Acta* 1333: M19-31.

1998. All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral. *EMBO J* 17: 6776-6782.

Bos, J.L., de Rooij, J. y Reedquist, K.A. 2001. Rap1 signalling: adhering to new models. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 369-377.

Boulares, A.H., Yakovlev, A.G., Ivanova, V., Stoica, B.A., Wang, G., Iyer, S. y Smulson, M. 1999. Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *J Biol Chem* 274: 22932-22940.

Bouton, A.H., Riggins, R.B. y Bruce-Staskal, P.J. 2001. Functions of the adapter protein Cas: signal convergence and the determination of cellular responses. *Oncogene* 20: 6448-6458.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of

protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

Bragado, P., Armesilla, A., Silva, A. y Porras, A. 2007. Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38alpha MAPK activation through ROS generation. *Apoptosis* 12: 1733-1742.

Brown, M.C. y Turner, C.E. 2004. Paxillin: adapting to change. *Physiol Rev* 84: 1315-1339.

Brown, M.C., Curtis, M.S. y Turner, C.E. 1998. Paxillin LD motifs may define a new family of protein recognition domains. *Nat Struct Biol* 5: 677-678.

Buensuceso, C.S. y O'Toole, T.E. 2000. The association of CRKII with C3G can be regulated by integrins and defines a novel means to regulate the mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 275: 13118-13125.

Cabodi, S., Moro, L., Bergatto, E., Boeri Erba, E., Di Stefano, P., Turco, E., Tarone, G. y Defilippi, P. 2004. Integrin regulation of epidermal growth factor (EGF) receptor and of EGF-dependent responses. *Biochem Soc Trans* 32: 438-442.

Cantley, L.C. 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296: 1655-1657.

Cary, L.A., Han, D.C., Polte, T.R., Hanks, S.K. y Guan, J.L. 1998. Identification of p130Cas as a mediator of focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J Cell Biol* 140: 211-221.

Cicchetti, P., Mayer, B.J., Thiel, G. y Baltimore, D. 1992. Identification of a protein that binds to the SH3 region of Abl and is similar to Bcr and GAP-rho. *Science* 257: 803-806.

Cuenda, A. y Rousseau, S. 2007. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1773: 1358-1375.

Cuschieri, J. y Maier, R.V. 2005. Mitogen-activated protein kinase (MAPK). *Crit Care Med* 33: S417-419.

Chang, X., Liu, X.L., Du, Q.F., Li, R., Feng, R., Chen, Q., Liu, Q.F. y Zhou, S.Y. 2003. [Study of adhesion-related molecule beta1-integrin and focal adhesion kinase in chronic myeloid leukemia]. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 23: 1047-1049.

Chiang, S.H., Baumann, C.A., Kanzaki, M., Thurmond, D.C., Watson, R.T., Neudauer, C.L., Macara, I.G., Pessin, J.E. y Saltiel, A.R. 2001. Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature* 410: 944-948.

Dai, Z. y Pendergast, A.M. 1995. Abi-2, a novel SH3-containing

protein interacts with the c-Abl tyrosine kinase and modulates c-Abl transforming activity. *Genes Dev* 9: 2569-2582.

Dai, Z., Kerzic, P., Schroeder, W.G. y McNiece, I.K. 2001. Deletion of the Src homology 3 domain and C-terminal proline-rich sequences in Bcr-Abl prevents Abl interactor 2 degradation and spontaneous cell migration and impairs leukemogenesis. *J Biol Chem* 276: 28954-28960.

de Jong, R., ten Hoeve, J., Heisterkamp, N. y Groffen, J. 1997a. Tyrosine 207 in CRKL is the BCR/ABL phosphorylation site. *Oncogene* 14: 507-513.

de Jong, R., van Wijk, A., Heisterkamp, N. y Groffen, J. 1998. C3G is tyrosine-phosphorylated after integrin-mediated cell adhesion in normal but not in Bcr/Abl expressing cells. *Oncogene* 17: 2805-2810.

de Jong, R., van Wijk, A., Haataja, L., Heisterkamp, N. y Groffen, J. 1997b. BCR/ABL-induced leukemogenesis causes phosphorylation of Hef1 and its association with Crkl. *J Biol Chem* 272: 32649-32655.

De Melo, V.A., Milojkovic, D., Khorashad, J.S., Marin, D., Goldman, J.M., Apperley, J.F. y Reid, A.G. 2007. Philadelphia-negative clonal hematopoiesis is a significant feature of

dasatinib therapy for chronic myeloid leukemia. *Blood* 110: 3086-3087.

Deakin, N.O. y Turner, C.E. 2008. Paxillin comes of age. *J Cell Sci* 121: 2435-2444.

Deininger, M.W., Goldman, J.M. y Melo, J.V. 2000. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 96: 3343-3356.

Deschesnes, R.G., Huot, J., Valerie, K. y Landry, J. 2001. Involvement of p38 in apoptosis-associated membrane blebbing and nuclear condensation. *Mol Biol Cell* 12: 1569-1582.

Dikic, I., Szymkiewicz, I. y Soubeyran, P. 2003. Cbl signaling networks in the regulation of cell function. *Cell Mol Life Sci* 60: 1805-1827.

Dolado, I., Swat, A., Ajenjo, N., De Vita, G., Cuadrado, A. y Nebreda, A.R. 2007. p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Cell* 11: 191-205.

Donato, D.M., Ryzhova, L.M., Meenderink, L.M., Kaverina, I. y Hanks, S.K. 2010. Dynamics and mechanism of p130Cas localization to focal adhesions. *J Biol Chem* 285: 20769-20779.

Druker, B.J. 2001. ST1571: a paradigm for clinical trials of

molecularly targeted agents. *Biomed Pharmacother* 55: 529-530.

Druker, B.J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G.M., Fanning, S., Zimmermann, J. y Lydon, N.B. 1996. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 2: 561-566.

Druker, B.J., Guilhot, F., O'Brien, S.G., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gattermann, N., Deininger, M.W., Silver, R.T., Goldman, J.M., Stone, R.M., Cervantes, F., Hochhaus, A., Powell, B.L., Gabrilove, J.L., Rousselot, P., Reiffers, J., Cornelissen, J.J., Hughes, T., Agis, H., Fischer, T., Verhoef, G., Shepherd, J., Saglio, G., Gratwohl, A., Nielsen, J.L., Radich, J.P., Simonsson, B., Taylor, K., Baccarani, M., So, C., Letvak, L. y Larson, R.A. 2006. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 355: 2408-2417.

Ehrhardt, A., Ehrhardt, G.R., Guo, X. y Schrader, J.W. 2002. Ras and relatives--job sharing and networking keep an old family together. *Exp Hematol* 30: 1089-1106.

Eychene, A., Dusanter-Fourt, I., Barnier, J.V., Papin, C., Charon, M., Gisselbrecht, S. y Calothy, G. 1995. Expression and activation of B-Raf

kinase isoforms in human and murine leukemia cell lines. *Oncogene* 10: 1159-1165.

Feller, S.M. 2001. Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles. *Oncogene* 20: 6348-6371.

Feller, S.M., Ren, R., Hanafusa, H. y Baltimore, D. 1994. SH2 and SH3 domains as molecular adhesives: the interactions of Crk and Abl. *Trends Biochem Sci* 19: 453-458.

Frische, E.W. y Zwartkruis, F.J. 2010. Rap1, a mercenary among the Ras-like GTPases. *Dev Biol* 340: 1-9.

Fukazawa, T., Reedquist, K.A., Trub, T., Soltoff, S., Panchamoorthy, G., Druker, B., Cantley, L., Shoelson, S.E. y Band, H. 1995. The SH3 domain-binding T cell tyrosyl phosphoprotein p120. Demonstration of its identity with the c-cbl protooncogene product and in vivo complexes with Fyn, Grb2, and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 270: 19141-19150.

Galan-Moya, E.M., Hernandez-Losa, J., Aceves Luquero, C.I., de la Cruz-Morcillo, M.A., Ramirez-Castillejo, C., Callejas-Valera, J.L., Arriaga, A., Aranburu, A.F., Ramon y Cajal, S., Silvio Gutkind, J. y Sanchez-Prieto, R. 2008. c-Abl activates p38 MAPK independently of its tyrosine kinase activity: Implications in

cisplatin-based therapy. *Int J Cancer* 122: 289-297.

Garcia, J., de Gunzburg, J., Eychene, A., Gisselbrecht, S. y Porteu, F. 2001. Thrombopoietin-mediated sustained activation of extracellular signal-regulated kinase in UT7-Mpl cells requires both Ras-Raf-1- and Rap1-B-Raf-dependent pathways. *Mol Cell Biol* 21: 2659-2670.

Garcia, M.C., Ray, D.M., Lackford, B., Rubino, M., Olden, K. y Roberts, J.D. 2009. Arachidonic acid stimulates cell adhesion through a novel p38 MAPK-RhoA signaling pathway that involves heat shock protein 27. *J Biol Chem* 284: 20936-20945.

Ghatan, S., Larner, S., Kinoshita, Y., Hetman, M., Patel, L., Xia, Z., Youle, R.J. y Morrison, R.S. 2000. p38 MAP kinase mediates bax translocation in nitric oxide-induced apoptosis in neurons. *J Cell Biol* 150: 335-347.

Giancotti, F.G. y Ruoslahti, E. 1999. Integrin signaling. *Science* 285: 1028-1032.

Goedert, M., Cuenda, A., Craxton, M., Jakes, R. y Cohen, P. 1997. Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity

with that of other SAP kinases. *EMBO J* 16: 3563-3571.

Gordon, M.Y., Dowding, C.R., Riley, G.P., Goldman, J.M. y Greaves, M.F. 1987. Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature* 328: 342-344.

1989. Adhesive defects in chronic myeloid leukemia. *Curr Top Microbiol Immunol* 149: 151-155.

Gotoh, T., Niino, Y., Tokuda, M., Hatase, O., Nakamura, S., Matsuda, M. y Hattori, S. 1997. Activation of R-Ras by Ras-guanine nucleotide-releasing factor. *J Biol Chem* 272: 18602-18607.

Gotoh, T., Hattori, S., Nakamura, S., Kitayama, H., Noda, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Matsui, H., Hatase, O., Takahashi, H. y et al. 1995. Identification of Rap1 as a target for the Crk SH3 domain-binding guanine nucleotide-releasing factor C3G. *Mol Cell Biol* 15: 6746-6753.

Grethe, S. y Porn-Ares, M.I. 2006. p38 MAPK regulates phosphorylation of Bad via PP2A-dependent suppression of the MEK1/2-ERK1/2 survival pathway in TNF-alpha induced endothelial apoptosis. *Cell Signal* 18: 531-540.

Guan, J.L. 2010. Integrin signaling through FAK in the regulation of mammary stem cells and breast cancer. *IUBMB Life* 62: 268-276.

Guerrero, C., Martin-Encabo, S., Fernandez-Medarde, A. y Santos, E. 2004. C3G-mediated suppression of oncogene-induced focus formation in fibroblasts involves inhibition of ERK activation, cyclin A expression and alterations of anchorage-independent growth. *Oncogene* 23: 4885-4893.

Guerrero, C., Fernandez-Medarde, A., Rojas, J.M., Font de Mora, J., Esteban, L.M. y Santos, E. 1998. Transformation suppressor activity of C3G is independent of its CDC25-homology domain. *Oncogene* 16: 613-624.

Gulbins, E., Dreschers, S. y Bock, J. 2003. Role of mitochondria in apoptosis. *Exp Physiol* 88: 85-90.

Guo, X., Pan, L., Hou, L.F., Wang, Y.J., Guo, H.M., Yang, L., Wang, Z.W., Sun, Y. y Li, D.L. 2007. [Regulative effects of ERK and p38 signal transduction pathway on cell cycle in chronic myeloid leukemia]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 15: 242-247.

Guo, Y.L. y Yang, B. 2006. Altered cell adhesion and cell viability in a p38alpha mitogen-activated protein

kinase-deficient mouse embryonic stem cell line. *Stem Cells Dev* 15: 655-664.

Gutierrez-Berzal, J., Castellano, E., Martin-Encabo, S., Gutierrez-Cianca, N., Hernandez, J.M., Santos, E. y Guerrero, C. 2006. Characterization of p87C3G, a novel, truncated C3G isoform that is overexpressed in chronic myeloid leukemia and interacts with Bcr-Abl. *Exp Cell Res* 312: 938-948.

Gutierrez-Uzquiza, A., Arechederra, M., Molina, I., Banos, R., Maia, V., Benito, M., Guerrero, C. y Porras, A. 2009. C3G down-regulates p38 MAPK activity in response to stress by Rap-1 independent mechanisms: involvement in cell death. *Cell Signal* 22: 533-542.

Han, J., Lee, J.D., Bibbs, L. y Ulevitch, R.J. 1994. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265: 808-811.

Hantschel, O. y Superti-Furga, G. 2004. Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 33-44.

Hattori, M. y Minato, N. 2003. Rap1 GTPase: functions, regulation, and malignancy. *J Biochem* 134: 479-484.

He, Y., Kapoor, A., Cook, S., Liu, S., Xiang, Y., Rao, C.V., Kenis, P.J. y Wang, F. 2011. The non-receptor

tyrosine kinase Lyn controls neutrophil adhesion by recruiting the CrkL-C3G complex and activating Rap1 at the leading edge. *J Cell Sci* 124: 2153-2164.

Hehlmann, R. y Saussele, S. 2008. Treatment of chronic myeloid leukemia in blast crisis. *Haematologica* 93: 1765-1769.

Hengartner, M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776.

Hogan, C., Serpente, N., Cogram, P., Hosking, C.R., Bialucha, C.U., Feller, S.M., Braga, V.M., Birchmeier, W. y Fujita, Y. 2004. Rap1 regulates the formation of E-cadherin-based cell-cell contacts. *Mol Cell Biol* 24: 6690-6700.

Horwitz, A.R. y Parsons, J.T. 1999. Cell migration--movin' on. *Science* 286: 1102-1103.

Hsia, D.A., Mitra, S.K., Hauck, C.R., Strelow, D.N., Nelson, J.A., Ilic, D., Huang, S., Li, E., Nemerow, G.R., Leng, J., Spencer, K.S., Cheresch, D.A. y Schlaepfer, D.D. 2003. Differential regulation of cell motility and invasion by FAK. *J Cell Biol* 160: 753-767.

Hsu, S.C., Gavrilin, M.A., Tsai, M.H., Han, J. y Lai, M.Z. 1999. p38 mitogen-activated protein kinase is involved in Fas ligand expression. *J Biol Chem* 274: 25769-25776.

Hynes, R.O. 2002. A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat Med* 8: 918-921.

Ichiba, T., Kuraishi, Y., Sakai, O., Nagata, S., Groffen, J., Kurata, T., Hattori, S. y Matsuda, M. 1997. Enhancement of guanine-nucleotide exchange activity of C3G for Rap1 by the expression of Crk, CrkL, and Grb2. *J Biol Chem* 272: 22215-22220.

Ichiba, T., Hashimoto, Y., Nakaya, M., Kuraishi, Y., Tanaka, S., Kurata, T., Mochizuki, N. y Matsuda, M. 1999. Activation of C3G guanine nucleotide exchange factor for Rap1 by phosphorylation of tyrosine 504. *J Biol Chem* 274: 14376-14381.

Innocenti, M., Zucconi, A., Disanza, A., Frittoli, E., Areces, L.B., Steffen, A., Stradal, T.E., Di Fiore, P.P., Carrier, M.F. y Scita, G. 2004. Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex. *Nat Cell Biol* 6: 319-327.

Ishida, D., Kometani, K., Yang, H., Kakugawa, K., Masuda, K., Iwai, K., Suzuki, M., Itohara, S., Nakahata, T., Hiai, H., Kawamoto, H., Hattori, M. y Minato, N. 2003. Myeloproliferative stem cell disorders by deregulated Rap1 activation in SPA-1-deficient mice. *Cancer Cell* 4: 55-65.

Ivaska, J., Reunanen, H., Westermarck, J., Koivisto, L., Kahari,

V.M. y Heino, J. 1999. Integrin alpha2beta1 mediates isoform-specific activation of p38 and upregulation of collagen gene transcription by a mechanism involving the alpha2 cytoplasmic tail. *J Cell Biol* 147: 401-416.

Jacquel, A., Herrant, M., Legros, L., Belhacene, N., Luciano, F., Pages, G., Hofman, P. y Auberger, P. 2003. Imatinib induces mitochondria-dependent apoptosis of the Bcr-Abl-positive K562 cell line and its differentiation toward the erythroid lineage. *FASEB J* 17: 2160-2162.

Jacquel, A., Colosetti, P., Grosso, S., Belhacene, N., Puissant, A., Marchetti, S., Breittmayer, J.P. y Auberger, P. 2007. Apoptosis and erythroid differentiation triggered by Bcr-Abl inhibitors in CML cell lines are fully distinguishable processes that exhibit different sensitivity to caspase inhibition. *Oncogene* 26: 2445-2458.

Jamieson, C.H., Ailles, L.E., Dylla, S.J., Muijtjens, M., Jones, C., Zehnder, J.L., Gotlib, J., Li, K., Manz, M.G., Keating, A., Sawyers, C.L. y Weissman, I.L. 2004. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med* 351: 657-667.

Jiang, Y., Chen, C., Li, Z., Guo, W., Gegner, J.A., Lin, S. y Han, J.

1996. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem* 271: 17920-17926.

Jiang, Y., Gram, H., Zhao, M., New, L., Gu, J., Feng, L., Di Padova, F., Ulevitch, R.J. y Han, J. 1997. Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. *J Biol Chem* 272: 30122-30128.

Jin, A., Kurosu, T., Tsuji, K., Mizuchi, D., Arai, A., Fujita, H., Hattori, M., Minato, N. y Miura, O. 2006. BCR/ABL and IL-3 activate Rap1 to stimulate the B-Raf/MEK/Erk and Akt signaling pathways and to regulate proliferation, apoptosis, and adhesion. *Oncogene* 25: 4332-4340.

Kantarjian, H.M., Talpaz, M., Giles, F., O'Brien, S. y Cortes, J. 2006. New insights into the pathophysiology of chronic myeloid leukemia and imatinib resistance. *Ann Intern Med* 145: 913-923.

Kao, S., Jaiswal, R.K., Kolch, W. y Landreth, G.E. 2001. Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. *J Biol Chem* 276: 18169-18177.

- Keane, M.M., Ettenberg, S.A., Nau, M.M., Banerjee, P., Cuello, M., Penninger, J. y Lipkowitz, S. 1999. cbl-3: a new mammalian cbl family protein. *Oncogene* 18: 3365-3375.
- Kim, S.J., Kim, E.J., Kim, Y.H., Hahn, S.B. y Lee, J.W. 2003. The modulation of integrin expression by the extracellular matrix in articular chondrocytes. *Yonsei Med J* 44: 493-501.
- Kinashi, T. 2005. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 5: 546-559.
- King, W.G., Mattaliano, M.D., Chan, T.O., Tschlis, P.N. y Brugge, J.S. 1997. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation. *Mol Cell Biol* 17: 4406-4418.
- Kioka, N., Sakata, S., Kawauchi, T., Amachi, T., Akiyama, S.K., Okazaki, K., Yaen, C., Yamada, K.M. y Aota, S. 1999. Vinexin: a novel vinculin-binding protein with multiple SH3 domains enhances actin cytoskeletal organization. *J Cell Biol* 144: 59-69.
- Kirsch, K.H., Georgescu, M.M. y Hanafusa, H. 1998. Direct binding of p130(Cas) to the guanine nucleotide exchange factor C3G. *J Biol Chem* 273: 25673-25679.
- Kiyokawa, E., Mochizuki, N., Kurata, T. y Matsuda, M. 1997. Role of Crk oncogene product in physiologic signaling. *Crit Rev Oncog* 8: 329-342.
- Knudsen, B.S., Feller, S.M. y Hanafusa, H. 1994. Four proline-rich sequences of the guanine-nucleotide exchange factor C3G bind with unique specificity to the first Src homology 3 domain of Crk. *J Biol Chem* 269: 32781-32787.
- Kohmura, K., Miyakawa, Y., Kawai, Y., Ikeda, Y. y Kizaki, M. 2004. Different roles of p38 MAPK and ERK in STI571-induced multi-lineage differentiation of K562 cells. *J Cell Physiol* 198: 370-376.
- Kolacna, L., Bakesova, J., Varga, F., Kostakova, E., Planka, L., Necas, A., Lukas, D., Amler, E. y Pelouch, V. 2007. Biochemical and biophysical aspects of collagen nanostructure in the extracellular matrix. *Physiol Res* 56 Suppl 1: S51-60.
- Konopka, J.B. y Witte, O.N. 1985. Detection of c-abl tyrosine kinase activity in vitro permits direct comparison of normal and altered abl gene products. *Mol Cell Biol* 5: 3116-3123.
- Kooistra, M.R., Dube, N. y Bos, J.L. 2007. Rap1: a key regulator in cell-

cell junction formation. *J Cell Sci* 120: 17-22.

Koptyra, M., Falinski, R., Nowicki, M.O., Stoklosa, T., Majsterek, I., Nieborowska-Skorska, M., Blasiak, J. y Skorski, T. 2006. BCR/ABL kinase induces self-mutagenesis via reactive oxygen species to encode imatinib resistance. *Blood* 108: 319-327.

Krammer, P.H. 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407: 789-795.

Kroemer, G., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Peter, M.E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M.V., Malorni, W., Knight, R.A., Piacentini, M., Nagata, S. y Melino, G. 2005. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2: 1463-1467.

Laferriere, J., Houle, F. y Huot, J. 2002. Regulation of the metastatic process by E-selectin and stress-activated protein kinase-2/p38. *Ann N Y Acad Sci* 973: 562-572.

Lamorte, L., Rodrigues, S., Sangwan, V., Turner, C.E. y Park, M. 2003. Crk associates with a multimolecular Paxillin/GIT2/beta-PIX complex and promotes Rac-dependent relocalization of Paxillin to focal contacts. *Mol Biol Cell* 14: 2818-2831.

Lee, H., Gaughan, J.P. y Tsygankov, A.Y. 2008. c-Cbl facilitates cytoskeletal effects in v-Abl transformed fibroblast through Rac1- and Rap1-mediated signaling. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 1930-1943.

Lee, S., Ha, S., Chung, M., Kim, Y. y Choi, Y. 2002. Mouse DAM1 regulates pro-apoptotic activity of BLK in mammary epithelial cells. *Cancer Lett* 188: 121-126.

Lewis, J.M. y Schwartz, M.A. 1998. Integrins regulate the association and phosphorylation of paxillin by c-Abl. *J Biol Chem* 273: 14225-14230.

Lewis, J.M., Baskaran, R., Taagepera, S., Schwartz, M.A. y Wang, J.Y. 1996. Integrin regulation of c-Abl tyrosine kinase activity and cytoplasmic-nuclear transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 15174-15179.

Li, L., Okura, M. y Imamoto, A. 2002. Focal adhesions require catalytic activity of Src family kinases to mediate integrin-matrix adhesion. *Mol Cell Biol* 22: 1203-1217.

Li, Y., Clough, N., Sun, X., Yu, W., Abbott, B.L., Hogan, C.J. y Dai, Z. 2007a. Bcr-Abl induces abnormal cytoskeleton remodeling, beta1 integrin clustering and increased cell adhesion to fibronectin through the Abl interactor 1 pathway. *J Cell Sci* 120: 1436-1446.

- Li, Y., Yan, J., De, P., Chang, H.C., Yamauchi, A., Christopherson, K.W., 2nd, Paranaivitana, N.C., Peng, X., Kim, C., Munugalavadla, V., Kapur, R., Chen, H., Shou, W., Stone, J.C., Kaplan, M.H., Dinauer, M.C., Durden, D.L. y Quilliam, L.A. 2007b. Rap1a null mice have altered myeloid cell functions suggesting distinct roles for the closely related Rap1a and 1b proteins. *J Immunol* 179: 8322-8331.
- Li, Z., Jiang, Y., Ulevitch, R.J. y Han, J. 1996. The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 228: 334-340.
- Lim, W.A. y Richards, F.M. 1994. Critical residues in an SH3 domain from Sem-5 suggest a mechanism for proline-rich peptide recognition. *Nat Struct Biol* 1: 221-225.
- Liu, Q. y Hofmann, P.A. 2004. Protein phosphatase 2A-mediated cross-talk between p38 MAPK and ERK in apoptosis of cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H2204-2212.
- Lugo, T.G., Pendergast, A.M., Muller, A.J. y Witte, O.N. 1990. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* 247: 1079-1082.
- Lundell, B.I., McCarthy, J.B., Kovach, N.L. y Verfaillie, C.M. 1997. Activation of beta1 integrins on CML progenitors reveals cooperation between beta1 integrins and CD44 in the regulation of adhesion and proliferation. *Leukemia* 11: 822-829.
- Luo, M. y Guan, J.L. 2009. Focal adhesion kinase: a prominent determinant in breast cancer initiation, progression and metastasis. *Cancer Lett* 289: 127-139.
- Mackay, K. y Mochly-Rosen, D. 1999. An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase protects neonatal cardiac myocytes from ischemia. *J Biol Chem* 274: 6272-6279.
- Mainiero, F., Soriani, A., Strippoli, R., Jacobelli, J., Gismondi, A., Piccoli, M., Frati, L. y Santoni, A. 2000. RAC1/p38 MAPK signaling pathway controls beta1 integrin-induced interleukin-8 production in human natural killer cells. *Immunity* 12: 7-16.
- Martin-Encabo, S., Santos, E. y Guerrero, C. 2007. C3G mediated suppression of malignant transformation involves activation of PP2A phosphatases at the subcortical actin cytoskeleton. *Exp Cell Res* 313: 3881-3891.
- Matsuda, M., Reichman, C.T. y Hanafusa, H. 1992. Biological and biochemical activity of v-Crk chimeras

containing the SH2/SH3 regions of phosphatidylinositol-specific phospholipase C-gamma and Src. *J Virol* 66: 115-121.

Mauro, M.J. y Druker, B.J. 2001. STI571: targeting BCR-ABL as therapy for CML. *Oncologist* 6: 233-238.

Mayer, B.J., Hirai, H. y Sakai, R. 1995. Evidence that SH2 domains promote processive phosphorylation by protein-tyrosine kinases. *Curr Biol* 5: 296-305.

Mayer, I.A., Verma, A., Grumbach, I.M., Uddin, S., Lekmine, F., Ravandi, F., Majchrzak, B., Fujita, S., Fish, E.N. y Plataniias, L.C. 2001. The p38 MAPK pathway mediates the growth inhibitory effects of interferon-alpha in BCR-ABL-expressing cells. *J Biol Chem* 276: 28570-28577.

Mazaki, Y., Hashimoto, S. y Sabe, H. 1997. Monocyte cells and cancer cells express novel paxillin isoforms with different binding properties to focal adhesion proteins. *J Biol Chem* 272: 7437-7444.

Mazaki, Y., Uchida, H., Hino, O., Hashimoto, S. y Sabe, H. 1998. Paxillin isoforms in mouse. Lack of the gamma isoform and developmentally specific beta isoform expression. *J Biol Chem* 273: 22435-22441.

McDermott, E.P. y O'Neill, L.A. 2002. Ras participates in the activation of p38 MAPK by interleukin-1 by associating with IRAK, IRAK2, TRAF6, and TAK-1. *J Biol Chem* 277: 7808-7815.

McLean, G.W., Carragher, N.O., Avizienyte, E., Evans, J., Brunton, V.G. y Frame, M.C. 2005. The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. *Nat Rev Cancer* 5: 505-515.

McWhirter, J.R. y Wang, J.Y. 1991. Activation of tyrosinase kinase and microfilament-binding functions of c-abl by bcr sequences in bcr/abl fusion proteins. *Mol Cell Biol* 11: 1553-1565.

Mearow, K.M., Dodge, M.E., Rahimtula, M. y Yegappan, C. 2002. Stress-mediated signaling in PC12 cells - the role of the small heat shock protein, Hsp27, and Akt in protecting cells from heat stress and nerve growth factor withdrawal. *J Neurochem* 83: 452-462.

Meisner, H., Conway, B.R., Hartley, D. y Czech, M.P. 1995. Interactions of Cbl with Grb2 and phosphatidylinositol 3'-kinase in activated Jurkat cells. *Mol Cell Biol* 15: 3571-3578.

Melo, J.V. y Barnes, D.J. 2007. Chronic myeloid leukaemia as a model

of disease evolution in human cancer. *Nat Rev Cancer* 7: 441-453.

Miranti, C.K. y Brugge, J.S. 2002. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol* 4: E83-90.

Mitra, A. y Radha, V. 2010. F-actin-binding domain of c-Abl regulates localized phosphorylation of C3G: role of C3G in c-Abl-mediated cell death. *Oncogene* 29: 4528-4542.

Mitra, S.K., Hanson, D.A. y Schlaepfer, D.D. 2005. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 56-68.

Miyazaki, K., Matsuda, S., Ichigotani, Y., Takenouchi, Y., Hayashi, K., Fukuda, Y., Nimura, Y. y Hamaguchi, M. 2000. Isolation and characterization of a novel human gene (NESH) which encodes a putative signaling molecule similar to e3B1 protein. *Biochim Biophys Acta* 1493: 237-241.

Mizuchi, D., Kurosu, T., Kida, A., Jin, Z.H., Jin, A., Arai, A. y Miura, O. 2005. BCR/ABL activates Rap1 and B-Raf to stimulate the MEK/Erk signaling pathway in hematopoietic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 326: 645-651.

Modur, V., Zimmerman, G.A., Prescott, S.M. y McIntyre, T.M. 1996.

Endothelial cell inflammatory responses to tumor necrosis factor alpha. Ceramide-dependent and -independent mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* 271: 13094-13102.

Mudgett, J.S., Ding, J., Guh-Siesel, L., Chartrain, N.A., Yang, L., Gopal, S. y Shen, M.M. 2000. Essential role for p38alpha mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10454-10459.

Mughal, T.I. y Goldman, J.M. 2001. Chronic myeloid leukaemia. STI 571 magnifies the therapeutic dilemma. *Eur J Cancer* 37: 561-568.

Nebreda, A.R. y Porras, A. 2000. p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci* 25: 257-260.

Nievers, M.G., Birge, R.B., Greulich, H., Verkleij, A.J., Hanafusa, H. y van Bergen en Henegouwen, P.M. 1997. v-Crk-induced cell transformation: changes in focal adhesion composition and signaling. *J Cell Sci* 110 (Pt 3): 389-399.

Niu, Z.Y., Pan, L., Zhang, X.J. y Liu, Y.J. 2006. [Regulatory effect of integrin alpha5 and beta1 on proliferation inhibition of K562 cells induced by interferon alpha-2b]. *Ai Zheng* 25: 297-302.

- Nolz, J.C., Nacusi, L.P., Segovis, C.M., Medeiros, R.B., Mitchell, J.S., Shimizu, Y. y Billadeau, D.D. 2008. The WAVE2 complex regulates T cell receptor signaling to integrins via Abl- and CrkL-C3G-mediated activation of Rap1. *J Cell Biol* 182: 1231-1244.
- Nosaka, Y., Arai, A., Miyasaka, N. y Miura, O. 1999. CrkL mediates Ras-dependent activation of the Raf/ERK pathway through the guanine nucleotide exchange factor C3G in hematopoietic cells stimulated with erythropoietin or interleukin-3. *J Biol Chem* 274: 30154-30162.
- Nowell, P.C. y Hungerford, D.A. 1960. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst* 25: 85-109.
- Odai, H., Sasaki, K., Hanazono, Y., Ueno, H., Tanaka, T., Miyagawa, K., Mitani, K., Yazaki, Y. y Hirai, H. 1995. c-Cbl is inducibly tyrosine-phosphorylated by epidermal growth factor stimulation in fibroblasts, and constitutively tyrosine-phosphorylated and associated with v-Src in v-src-transformed fibroblasts. *Jpn J Cancer Res* 86: 1119-1126.
- Ohba, Y., Ikuta, K., Ogura, A., Matsuda, J., Mochizuki, N., Nagashima, K., Kurokawa, K., Mayer, B.J., Maki, K., Miyazaki, J. y Matsuda, M. 2001. Requirement for C3G-dependent Rap1 activation for cell adhesion and embryogenesis. *EMBO J* 20: 3333-3341.
- Okada, S. y Pessin, J.E. 1997. Insulin and epidermal growth factor stimulate a conformational change in Rap1 and dissociation of the CrkII-C3G complex. *J Biol Chem* 272: 28179-28182.
- Okada, S., Matsuda, M., Anafi, M., Pawson, T. y Pessin, J.E. 1998. Insulin regulates the dynamic balance between Ras and Rap1 signaling by coordinating the assembly states of the Grb2-SOS and CrkII-C3G complexes. *EMBO J* 17: 2554-2565.
- Ono, K. y Han, J. 2000. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* 12: 1-13.
- Park, R.K., Kyono, W.T., Liu, Y. y Durden, D.L. 1998. CBL-GRB2 interaction in myeloid immunoreceptor tyrosine activation motif signaling. *J Immunol* 160: 5018-5027.
- Parmar, S., Katsoulidis, E., Verma, A., Li, Y., Sassano, A., Lal, L., Majchrzak, B., Ravandi, F., Tallman, M.S., Fish, E.N. y Plataniias, L.C. 2004. Role of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the generation of the effects of imatinib mesylate (STI571) in BCR-ABL-

expressing cells. *J Biol Chem* 279: 25345-25352.

Parone, P.A., James, D. y Martinou, J.C. 2002. Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochimie* 84: 105-111.

Parsons, J.T. 2003. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci* 116: 1409-1416.

Parsons, J.T., Horwitz, A.R. y Schwartz, M.A. 2010. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 633-643.

Payne, S.L., Hendrix, M.J. y Kirschmann, D.A. 2006. Lysyl oxidase regulates actin filament formation through the p130(Cas)/Crk/DOCK180 signaling complex. *J Cell Biochem* 98: 827-837.

Platanias, L.C. 2003. The p38 mitogen-activated protein kinase pathway and its role in interferon signaling. *Pharmacol Ther* 98: 129-142.

Polte, T.R. y Hanks, S.K. 1997. Complexes of focal adhesion kinase (FAK) and Crk-associated substrate (p130(Cas)) are elevated in cytoskeleton-associated fractions following adhesion and Src transformation. Requirements for Src kinase activity and FAK proline-rich motifs. *J Biol Chem* 272: 5501-5509.

Porras, A., Zuluaga, S., Black, E., Valladares, A., Alvarez, A.M., Ambrosino, C., Benito, M. y Nebreda, A.R. 2004. p38 alpha mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli. *Mol Biol Cell* 15: 922-933.

Preisinger, C. y Kolch, W. 2010. The Bcr-Abl kinase regulates the actin cytoskeleton via a GADS/Slp-76/Nck1 adaptor protein pathway. *Cell Signal* 22: 848-856.

Provenzano, P.P. y Keely, P.J. 2009. The role of focal adhesion kinase in tumor initiation and progression. *Cell Adh Migr* 3: 347-350.

Provenzano, P.P., Inman, D.R., Eliceiri, K.W. y Keely, P.J. 2009. Matrix density-induced mechanoregulation of breast cell phenotype, signaling and gene expression through a FAK-ERK linkage. *Oncogene* 28: 4326-4343.

Quackenbush, R.C., Reuther, G.W., Miller, J.P., Courtney, K.D., Pear, W.S. y Pendergast, A.M. 2000. Analysis of the biologic properties of p230 Bcr-Abl reveals unique and overlapping properties with the oncogenic p185 and p210 Bcr-Abl tyrosine kinases. *Blood* 95: 2913-2921.

Raaijmakers, J.H. y Bos, J.L. 2009. Specificity in Ras and Rap

signaling. *J Biol Chem* 284: 10995-10999.

Radha, V., Mitra, A., Dayma, K. y Sasikumar, K. 2011. Signalling to actin: role of C3G, a multitasking guanine-nucleotide-exchange factor. *Biosci Rep* 31: 231-244.

Radha, V., Rajanna, A., Mitra, A., Rangaraj, N. y Swarup, G. 2007. C3G is required for c-Abl-induced filopodia and its overexpression promotes filopodia formation. *Exp Cell Res* 313: 2476-2492.

Radha, V., Rajanna, A., Gupta, R.K., Dayma, K. y Raman, T. 2008. The guanine nucleotide exchange factor, C3G regulates differentiation and survival of human neuroblastoma cells. *J Neurochem* 107: 1424-1435.

Rao, N., Dodge, I. y Band, H. 2002. The Cbl family of ubiquitin ligases: critical negative regulators of tyrosine kinase signaling in the immune system. *J Leukoc Biol* 71: 753-763.

Rebhun, J.F., Castro, A.F. y Quilliam, L.A. 2000. Identification of guanine nucleotide exchange factors (GEFs) for the Rap1 GTPase. Regulation of MR-GEF by M-Ras-GTP interaction. *J Biol Chem* 275: 34901-34908.

Reedquist, K.A., Fukazawa, T., Panchamoorthy, G., Langdon, W.Y., Shoelson, S.E., Druker, B.J. y Band, H.

1996. Stimulation through the T cell receptor induces Cbl association with Crk proteins and the guanine nucleotide exchange protein C3G. *J Biol Chem* 271: 8435-8442.

Remans, P.H., Gringhuis, S.I., van Laar, J.M., Sanders, M.E., Papendrecht-van der Voort, E.A., Zwartkuis, F.J., Levarht, E.W., Rosas, M., Coffey, P.J., Breedveld, F.C., Bos, J.L., Tak, P.P., Verweij, C.L. y Reedquist, K.A. 2004. Rap1 signaling is required for suppression of Ras-generated reactive oxygen species and protection against oxidative stress in T lymphocytes. *J Immunol* 173: 920-931.

Ren, G., Crampton, M.S. y Yap, A.S. 2009. Cortactin: Coordinating adhesion and the actin cytoskeleton at cellular protrusions. *Cell Motil Cytoskeleton* 66: 865-873.

Ren, R., Mayer, B.J., Cicchetti, P. y Baltimore, D. 1993. Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* 259: 1157-1161.

Ribon, V. y Saltiel, A.R. 1996. Nerve growth factor stimulates the tyrosine phosphorylation of endogenous Crk-II and augments its association with p130Cas in PC-12 cells. *J Biol Chem* 271: 7375-7380.

Ribon, V., Hubbell, S., Herrera, R. y Saltiel, A.R. 1996. The product of the cbl oncogene forms stable

complexes in vivo with endogenous Crk in a tyrosine phosphorylation-dependent manner. *Mol Cell Biol* 16: 45-52.

Romer, L.H., Birukov, K.G. y Garcia, J.G. 2006. Focal adhesions: paradigm for a signaling nexus. *Circ Res* 98: 606-616.

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

Roux, P.P. y Blenis, J. 2004. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 320-344.

Rowley, J.D. 1973. Letter: Deletions of chromosome 7 in haematological disorders. *Lancet* 2: 1385-1386.

Sabio, G., Arthur, J.S., Kuma, Y., Peggie, M., Carr, J., Murray-Tait, V., Centeno, F., Goedert, M., Morrice, N.A. y Cuenda, A. 2005. p38gamma regulates the localisation of SAP97 in the cytoskeleton by modulating its interaction with GKAP. *EMBO J* 24: 1134-1145.

Sabourin, L.A. y Rudnicki, M.A. 1999. Induction of apoptosis by SLK, a

Ste20-related kinase. *Oncogene* 18: 7566-7575.

Saegusa, J., Yamaji, S., Ieguchi, K., Wu, C.Y., Lam, K.S., Liu, F.T., Takada, Y.K. y Takada, Y. 2009. The direct binding of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) to integrin alphavbeta3 is involved in IGF-1 signaling. *J Biol Chem* 284: 24106-24114.

Sakakibara, A., Ohba, Y., Kurokawa, K., Matsuda, M. y Hattori, S. 2002. Novel function of Chat in controlling cell adhesion via Cas-Crk-C3G-pathway-mediated Rap1 activation. *J Cell Sci* 115: 4915-4924.

Salesse, S. y Verfaillie, C.M. 2002. Mechanisms underlying abnormal trafficking and expansion of malignant progenitors in CML: BCR/ABL-induced defects in integrin function in CML. *Oncogene* 21: 8605-8611.

Salgia, R., Sattler, M., Pisick, E., Li, J.L. y Griffin, J.D. 1996a. p210BCR/ABL induces formation of complexes containing focal adhesion proteins and the protooncogene product p120c-Cbl. *Exp Hematol* 24: 310-313.

Salgia, R., Brunkhorst, B., Pisick, E., Li, J.L., Lo, S.H., Chen, L.B. y Griffin, J.D. 1995a. Increased tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins in myeloid cell lines expressing p210BCR/ABL. *Oncogene* 11: 1149-1155.

- Salgia, R., Pisick, E., Sattler, M., Li, J.L., Uemura, N., Wong, W.K., Burky, S.A., Hirai, H., Chen, L.B. y Griffin, J.D. 1996b. p130CAS forms a signaling complex with the adapter protein CRKL in hematopoietic cells transformed by the BCR/ABL oncogene. *J Biol Chem* 271: 25198-25203.
- Salgia, R., Li, J.L., Ewaniuk, D.S., Pear, W., Pisick, E., Burky, S.A., Ernst, T., Sattler, M., Chen, L.B. y Griffin, J.D. 1997. BCR/ABL induces multiple abnormalities of cytoskeletal function. *J Clin Invest* 100: 46-57.
- Salgia, R., Uemura, N., Okuda, K., Li, J.L., Pisick, E., Sattler, M., de Jong, R., Druker, B., Heisterkamp, N., Chen, L.B. y et al. 1995b. CRKL links p210BCR/ABL with paxillin in chronic myelogenous leukemia cells. *J Biol Chem* 270: 29145-29150.
- Salgia, R., Li, J.L., Lo, S.H., Brunkhorst, B., Kansas, G.S., Sobhany, E.S., Sun, Y., Pisick, E., Hallek, M., Ernst, T. y et al. 1995c. Molecular cloning of human paxillin, a focal adhesion protein phosphorylated by P210BCR/ABL. *J Biol Chem* 270: 5039-5047.
- Sanchez-Arevalo Lobo, V.J., Aceves Luquero, C.I., Alvarez-Vallina, L., Tipping, A.J., Viniestra, J.G., Hernandez Losa, J., Parada Cobo, C., Galan Moya, E.M., Gayoso Cruz, J., Melo, J.V., Ramon y Cajal, S. y Sanchez-Prieto, R. 2005. Modulation of the p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) pathway through Bcr/Abl: implications in the cellular response to Ara-C. *Biochem J* 387: 231-238.
- Sato, T., Yamochi, T., Aytac, U., Ohnuma, K., McKee, K.S., Morimoto, C. y Dang, N.H. 2005. CD26 regulates p38 mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of integrin beta1, adhesion to extracellular matrix, and tumorigenicity of T-anaplastic large cell lymphoma Karpas 299. *Cancer Res* 65: 6950-6956.
- Sattler, M., Salgia, R., Okuda, K., Uemura, N., Durstin, M.A., Pisick, E., Xu, G., Li, J.L., Prasad, K.V. y Griffin, J.D. 1996. The proto-oncogene product p120CBL and the adaptor proteins CRKL and c-CRK link c-ABL, p190BCR/ABL and p210BCR/ABL to the phosphatidylinositol-3' kinase pathway. *Oncogene* 12: 839-846.
- Schlaepfer, D.D. y Mitra, S.K. 2004. Multiple connections link FAK to cell motility and invasion. *Curr Opin Genet Dev* 14: 92-101.
- Schlaepfer, D.D., Broome, M.A. y Hunter, T. 1997. Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion kinase-c-Src complex:

involvement of the Grb2, p130cas, and Nck adaptor proteins. *Mol Cell Biol* 17: 1702-1713.

Schmitt, J.M. y Stork, P.J. 2001. Cyclic AMP-mediated inhibition of cell growth requires the small G protein Rap1. *Mol Cell Biol* 21: 3671-3683.

Schofield, K.P., Duerig, J., Rushton, G. y Chang, J. 1999. alpha4beta1 integrin-mediated adhesion of CD34+ cells from patients with chronic myeloid leukaemia: influence of IL-3. *Br J Haematol* 106: 524-527.

Schranz, N., Bourgeade, M.F., Mouhamad, S., Leca, G., Sharma, S. y Vazquez, A. 2001. p38-mediated regulation of an Fas-associated death domain protein-independent pathway leading to caspase-8 activation during TGFbeta-induced apoptosis in human Burkitt lymphoma B cells BL41. *Mol Biol Cell* 12: 3139-3151.

Schwartz, M.A. y Assoian, R.K. 2001. Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *J Cell Sci* 114: 2553-2560.

Senechal, K., Halpern, J. y Sawyers, C.L. 1996. The CRKL adaptor protein transforms fibroblasts and functions in transformation by the BCR-ABL oncogene. *J Biol Chem* 271: 23255-23261.

Shi, Y., Alin, K. y Goff, S.P. 1995. Abl-interactor-1, a novel SH3 protein binding to the carboxy-terminal portion of the Abl protein, suppresses v-abl transforming activity. *Genes Dev* 9: 2583-2597.

Shimizu, A., Mammoto, A., Italiano, J.E., Jr., Pravda, E., Dudley, A.C., Ingber, D.E. y Klagsbrun, M. 2008. ABL2/ARG tyrosine kinase mediates SEMA3F-induced RhoA inactivation and cytoskeleton collapse in human glioma cells. *J Biol Chem* 283: 27230-27238.

Shivakrupa, R., Radha, V., Sudhakar, C. y Swarup, G. 2003. Physical and functional interaction between Hck tyrosine kinase and guanine nucleotide exchange factor C3G results in apoptosis, which is independent of C3G catalytic domain. *J Biol Chem* 278: 52188-52194.

Skorski, T., Nieborowska-Skorska, M., Wlodarski, P., Wasik, M., Trotta, R., Kanakaraj, P., Salomoni, P., Antonyak, M., Martinez, R., Majewski, M., Wong, A., Perussia, B. y Calabretta, B. 1998. The SH3 domain contributes to BCR/ABL-dependent leukemogenesis in vivo: role in adhesion, invasion, and homing. *Blood* 91: 406-418.

Smilenov, L.B., Mikhailov, A., Pelham, R.J., Marcantonio, E.E. y Gundersen, G.G. 1999. Focal adhesion

motility revealed in stationary fibroblasts. *Science* 286: 1172-1174.

Smit, L., van der Horst, G. y Borst, J. 1996. Sos, Vav, and C3G participate in B cell receptor-induced signaling pathways and differentially associate with Shc-Grb2, Crk, and Crk-L adaptors. *J Biol Chem* 271: 8564-8569.

Steelman, L.S., Pohnert, S.C., Shelton, J.G., Franklin, R.A., Bertrand, F.E. y McCubrey, J.A. 2004. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* 18: 189-218.

Stork, P.J. 2003. Does Rap1 deserve a bad Rap? *Trends Biochem Sci* 28: 267-275.

Stork, P.J. y Dillon, T.J. 2005. Multiple roles of Rap1 in hematopoietic cells: complementary versus antagonistic functions. *Blood* 106: 2952-2961.

Sumbayev, V.V. y Yasinska, I.M. 2005. Regulation of MAP kinase-dependent apoptotic pathway: implication of reactive oxygen and nitrogen species. *Arch Biochem Biophys* 436: 406-412.

Szymkiewicz, I., Destaing, O., Jurdic, P. y Dikic, I. 2004. SH3P2 in complex with Cbl and Src. *FEBS Lett* 565: 33-38.

Takai, S., Tanaka, M., Sugimura, H., Yamada, K., Naito, Y., Kino, I. y Matsuda, M. 1994. Mapping of the human C3G gene coding a guanine nucleotide releasing protein for Ras family to 9q34.3 by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 94: 549-550.

Talpaz, M., Shah, N.P., Kantarjian, H., Donato, N., Nicoll, J., Paquette, R., Cortes, J., O'Brien, S., Nicaise, C., Bleickardt, E., Blackwood-Chirchir, M.A., Iyer, V., Chen, T.T., Huang, F., Decillis, A.P. y Sawyers, C.L. 2006. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 354: 2531-2541.

Tanaka, S., Ouchi, T. y Hanafusa, H. 1997. Downstream of Crk adaptor signaling pathway: activation of Jun kinase by v-Crk through the guanine nucleotide exchange protein C3G. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 2356-2361.

Tanaka, S., Morishita, T., Hashimoto, Y., Hattori, S., Nakamura, S., Shibuya, M., Matuoka, K., Takenawa, T., Kurata, T., Nagashima, K. y et al. 1994. C3G, a guanine nucleotide-releasing protein expressed ubiquitously, binds to the Src homology 3 domains of CRK and GRB2/ASH

proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 3443-3447.

Tanos, B.E. y Pendergast, A.M. 2007. Abi-1 forms an epidermal growth factor-inducible complex with Cbl: role in receptor endocytosis. *Cell Signal* 19: 1602-1609.

Taylor, R.C., Cullen, S.P. y Martin, S.J. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 231-241.

Turner, C.E. 2000. Paxillin interactions. *J Cell Sci* 113 Pt 23: 4139-4140.

Turner, C.E., Brown, M.C., Perrotta, J.A., Riedy, M.C., Nikolopoulos, S.N., McDonald, A.R., Bagrodia, S., Thomas, S. y Leventhal, P.S. 1999. Paxillin LD4 motif binds PAK and PIX through a novel 95-kD ankyrin repeat, ARF-GAP protein: A role in cytoskeletal remodeling. *J Cell Biol* 145: 851-863.

Tusher, V.G., Tibshirani, R. y Chu, G. 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5116-5121.

Uckun, F.M. 1998. Bruton's tyrosine kinase (BTK) as a dual-function regulator of apoptosis. *Biochem Pharmacol* 56: 683-691.

Uddin, S., Majchrzak, B., Woodson, J., Arunkumar, P., Alsayed,

Y., Pine, R., Young, P.R., Fish, E.N. y Plataniias, L.C. 1999. Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase by type I interferons. *J Biol Chem* 274: 30127-30131.

Uddin, S., Lekmine, F., Sharma, N., Majchrzak, B., Mayer, I., Young, P.R., Bokoch, G.M., Fish, E.N. y Plataniias, L.C. 2000. The Rac1/p38 mitogen-activated protein kinase pathway is required for interferon alpha-dependent transcriptional activation but not serine phosphorylation of Stat proteins. *J Biol Chem* 275: 27634-27640.

Uemura, N. y Griffin, J.D. 1999. The adapter protein Crkl links Cbl to C3G after integrin ligation and enhances cell migration. *J Biol Chem* 274: 37525-37532.

Uemura, N., Salgia, R., Ewaniuk, D.S., Little, M.T. y Griffin, J.D. 1999. Involvement of the adapter protein CRKL in integrin-mediated adhesion. *Oncogene* 18: 3343-3353.

Uemura, N., Salgia, R., Li, J.L., Pisick, E., Sattler, M. y Griffin, J.D. 1997. The BCR/ABL oncogene alters interaction of the adapter proteins CRKL and CRK with cellular proteins. *Leukemia* 11: 376-385.

Valladares, A., Alvarez, A.M., Ventura, J.J., Roncero, C., Benito, M. y Porras, A. 2000. p38 mitogen-activated

protein kinase mediates tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in rat fetal brown adipocytes. *Endocrinology* 141: 4383-4395.

Valles, A.M., Beuvin, M. y Boyer, B. 2004. Activation of Rac1 by paxillin-Crk-DOCK180 signaling complex is antagonized by Rap1 in migrating NBT-II cells. *J Biol Chem* 279: 44490-44496.

Van Etten, R.A., Jackson, P.K., Baltimore, D., Sanders, M.C., Matsudaira, P.T. y Janmey, P.A. 1994. The COOH terminus of the c-Abl tyrosine kinase contains distinct F- and G-actin binding domains with bundling activity. *J Cell Biol* 124: 325-340.

Van Laethem, A., Van Kelst, S., Lippens, S., Declercq, W., Vandenabeele, P., Janssens, S., Vandenheede, J.R., Garmyn, M. y Agostinis, P. 2004. Activation of p38 MAPK is required for Bax translocation to mitochondria, cytochrome c release and apoptosis induced by UVB irradiation in human keratinocytes. *FASEB J* 18: 1946-1948.

Vanhaesebroeck, B. y Alessi, D.R. 2000. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 346 Pt 3: 561-576.

Verfaillie, C.M., McCarthy, J.B. y McGlave, P.B. 1992. Mechanisms underlying abnormal trafficking of

malignant progenitors in chronic myelogenous leukemia. Decreased adhesion to stroma and fibronectin but increased adhesion to the basement membrane components laminin and collagen type IV. *J Clin Invest* 90: 1232-1241.

Voss, A.K., Gruss, P. y Thomas, T. 2003. The guanine nucleotide exchange factor C3G is necessary for the formation of focal adhesions and vascular maturation. *Development* 130: 355-367.

Voss, A.K., Krebs, D.L. y Thomas, T. 2006. C3G regulates the size of the cerebral cortex neural precursor population. *EMBO J* 25: 3652-3663.

Voss, A.K., Britto, J.M., Dixon, M.P., Sheikh, B.N., Collin, C., Tan, S.S. y Thomas, T. 2008. C3G regulates cortical neuron migration, preplate splitting and radial glial cell attachment. *Development* 135: 2139-2149.

Wada, T. y Penninger, J.M. 2004. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 23: 2838-2849.

Wang, Q. y Wieder, R. 2004. All-trans retinoic acid potentiates Taxotere-induced cell death mediated by Jun N-terminal kinase in breast cancer cells. *Oncogene* 23: 426-433.

- Wang, X., Martindale, J.L., Liu, Y. y Holbrook, N.J. 1998. The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochem J* 333 (Pt 2): 291-300.
- Webb, D.J., Donais, K., Whitmore, L.A., Thomas, S.M., Turner, C.E., Parsons, J.T. y Horwitz, A.F. 2004. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol* 6: 154-161.
- Wen, S.T. y Van Etten, R.A. 1997. The PAG gene product, a stress-induced protein with antioxidant properties, is an Abl SH3-binding protein and a physiological inhibitor of c-Abl tyrosine kinase activity. *Genes Dev* 11: 2456-2467.
- Wertheim, J.A., Miller, J.P., Xu, L., He, Y. y Pear, W.S. 2002a. The biology of chronic myelogenous leukemia: mouse models and cell adhesion. *Oncogene* 21: 8612-8628.
- Wertheim, J.A., Forsythe, K., Druker, B.J., Hammer, D., Boettiger, D. y Pear, W.S. 2002b. BCR-ABL-induced adhesion defects are tyrosine kinase-independent. *Blood* 99: 4122-4130.
- Wertheim, J.A., Perera, S.A., Hammer, D.A., Ren, R., Boettiger, D. y Pear, W.S. 2003. Localization of BCR-ABL to F-actin regulates cell adhesion but does not attenuate CML development. *Blood* 102: 2220-2228.
- Williams, B.G., Yin, J.L. y Ma, D.D. 1994. A Ph⁺ acute myeloid leukaemia expressing both CML-type and ALL-type BCR/ABL mRNA transcripts. *Leuk Lymphoma* 14: 341-346.
- Wu, C., Lai, C.F. y Mobley, W.C. 2001. Nerve growth factor activates persistent Rap1 signaling in endosomes. *J Neurosci* 21: 5406-5416.
- York, R.D., Molliver, D.C., Grewal, S.S., Stenberg, P.E., McCleskey, E.W. y Stork, P.J. 2000. Role of phosphoinositide 3-kinase and endocytosis in nerve growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase activation via Ras and Rap1. *Mol Cell Biol* 20: 8069-8083.
- Yu, C., Krystal, G., Varticovski, L., McKinstry, R., Rahmani, M., Dent, P. y Grant, S. 2002. Pharmacologic mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase/mitogen-activated protein kinase inhibitors interact synergistically with STI571 to induce apoptosis in Bcr/Abl-expressing human leukemia cells. *Cancer Res* 62: 188-199.
- Yuksel, S., Saydam, G., Uslu, R., Sanli, U.A., Terzioglu, E., Buyukececi, F. y Omay, S.B. 2002. Arsenic trioxide and

methylprednisolone use different signal transduction pathways in leukemic differentiation. *Leuk Res* 26: 391-398.

Zang, C., Liu, H., Bertz, J., Possinger, K., Koeffler, H.P., Elstner, E. y Eucker, J. 2009. Induction of endoplasmic reticulum stress response by TZD18, a novel dual ligand for peroxisome proliferator-activated receptor alpha/gamma, in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 8: 2296-2307.

Zarubin, T. y Han, J. 2005. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 15: 11-18.

Zechner, U., Scheel, S., Hemberger, M., Hopp, M., Haaf, T., Fundele, R., Wanker, E.E., Lehrach, H., Wedemeyer, N. y Himmelbauer, H. 1998. Characterization of the mouse Src homology 3 domain gene Sh3d2c on Chr 7 demonstrates coexpression with huntingtin in the brain and identifies the processed pseudogene Sh3d2c-ps1 on Chr 2. *Genomics* 54: 505-510.

Zhang, W., Shao, Y., Fang, D., Huang, J., Jeon, M.S. y Liu, Y.C. 2003. Negative regulation of T cell antigen receptor-mediated Crk-L-C3G signaling and cell adhesion by Cbl-b. *J Biol Chem* 278: 23978-23983.

Zhao, J. y Guan, J.L. 2009. Signal transduction by focal adhesion

kinase in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 28: 35-49.

Zheng, H., Gao, L., Feng, Y., Yuan, L., Zhao, H. y Cornelius, L.A. 2009. Down-regulation of Rap1GAP via promoter hypermethylation promotes melanoma cell proliferation, survival, and migration. *Cancer Res* 69: 449-457.

Zhu, J. y Shore, S.K. 1996. c-ABL tyrosine kinase activity is regulated by association with a novel SH3-domain-binding protein. *Mol Cell Biol* 16: 7054-7062.

Zhu, X. y Assoian, R.K. 1995. Integrin-dependent activation of MAP kinase: a link to shape-dependent cell proliferation. *Mol Biol Cell* 6: 273-282.

Zhuang, S., Demirs, J.T. y Kochevar, I.E. 2000. p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 275: 25939-25948.

Ziennicka-Kotula, D., Xu, J., Gu, H., Potempska, A., Kim, K.S., Jenkins, E.C., Trenkner, E. y Kotula, L. 1998. Identification of a candidate human spectrin Src homology 3 domain-binding protein suggests a general mechanism of association of tyrosine kinases with the spectrin-based

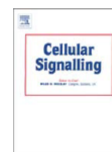
membrane skeleton. *J Biol Chem* 273: 13681-13692.

Zuluaga, S., Alvarez-Barrientos, A., Gutierrez-Uzquiza, A., Benito, M., Nebreda, A.R. y Porras, A. 2007a. Negative regulation of Akt activity by p38alpha MAP kinase in cardiomyocytes involves membrane localization of PP2A through interaction with caveolin-1. *Cell Signal* 19: 62-74.

Zuluaga, S., Gutierrez-Uzquiza, A., Bragado, P., Alvarez-Barrientos, A., Benito, M., Nebreda, A.R. y Porras, A. 2007b. p38alpha MAPK can positively or negatively regulate Rac-1 activity depending on the presence of serum. *FEBS Lett* 581: 3819-3825.

Zwartkruis, F.J. y Bos, J.L. 1999. Ras and Rap1: two highly related small GTPases with distinct function. *Exp Cell Res* 253: 157-165.

Anexo



C3G silencing enhances STI-571-induced apoptosis in CML cells through p38 MAPK activation, but it antagonizes STI-571 inhibitory effect on survival

Vera Maia ^a, María Sanz ^a, Javier Gutierrez-Berzal ^a, Alberto de Luis ^a, Alvaro Gutierrez-Uzquiza ^b, Almudena Porras ^{b,*}, Carmen Guerrero ^{a,*}

^a Centro de Investigación del Cáncer, IBMCC, Universidad de Salamanca-CSIC, 37007 Salamanca, Spain

^b Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, UCM, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 January 2009

Received in revised form 12 March 2009

Accepted 15 March 2009

Available online 24 March 2009

Keywords:

C3G

p38 MAPK

Apoptosis

STI-571

CML

ABSTRACT

In this work we report evidences of a functional relationship between C3G and p38 MAPK in the apoptotic effect of STI-571 on the chronic myeloid leukemia (CML) cell line K562. This has been demonstrated by knocking down C3G and p38 α using the interfering RNA approach, as well as through targeting p38 by its inhibitor SB203580. The results indicate that p38 is a mediator of the STI-571-induced apoptosis, while C3G plays a negative role on STI-571-mediated p38 activation through a Rap1-dependent mechanism. According to this, gene expression analysis in C3G silenced cells revealed an upregulation of a large number of genes involved in apoptosis. Some of these genes are also down-regulated (at the protein level) upon p38 α knock-down, which further suggests a functional association between these two proteins. On the other hand, C3G knock-down reverses the STI-571-inhibitory effect on ERKs and Akt pathways in a Rap1-independent fashion. Moreover, C3G overexpression also increased both, basal and STI-571-induced apoptosis, in agreement with previous reports. Therefore, our results strongly suggest a dual regulatory role for C3G in CML cells, modulating both apoptosis and survival via Rap-dependent and independent mechanisms.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

C3G is an essential gene for mouse embryogenesis with GEF (guanine nucleotide exchange factor) activity towards Rap and R-Ras proteins [1–3]. We have previously demonstrated that C3G displays antiproliferative properties, as it suppresses malignant transformation induced by several oncogenes, including Hras^{lys12}, by a mechanism involving PP2A-mediated ERKs downregulation [4–6]. In agreement with this function, C3G has been shown to play a role in apoptosis in hematopoietic cells [7]. On the other hand, we have recently described a novel C3G isoform, named p87C3G, that is abundantly expressed in CML cells. p87C3G interacts with Bcr–Abl and is phosphorylated by a Bcr–Abl-dependent mechanism, suggesting its participation in the pathogenesis of the CML [8].

The family of p38 MAPKs (p38 α , p38 β , p38 δ and p38 γ) are mainly activated by cellular stress and inflammatory cytokines, although they also regulate stress unrelated functions such as proliferation, differentiation and development [9–11]. Studies with p38 α knockout cellular models have revealed that p38 α negatively regulates cell proliferation, while it promotes cell death depending on the cell type and/or the stimuli [11, 12].

STI-571 (imatinib mesylate, Gleevec, Glivec, CGP 57148) is a specific inhibitor of the Abl family of protein–tyrosine kinases, including the Bcr–Abl fusion protein. Inhibition of Bcr–Abl kinase activity results in the blockage of proliferation and survival signaling cascades including phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), JAK/STAT and the Ras/MEK/ERKs pathways [13]. Consequently, the cell cycle progression is impaired and cells undergo apoptosis by activation of caspases 8, 9 and 3 [14]. However, the role of p38 MAPK in STI-571-mediated apoptosis is a highly controversial issue. Some reports have shown no effect for STI-571 on basal p38 phosphorylation [14–16], while others have described a role for the p38 MAPK pathway in the antiproliferative effects of STI-571 in Bcr–Abl-expressing cells [17, 18]. A functional relationship between C3G and p38 MAPK has not been described so far, although there are some data in the literature showing a crosstalk between Rap1 and p38 [19]. The present study aimed to investigate whether C3G and p38 coordinately modulate STI-571 antiproliferative and pro-apoptotic effects in CML and to identify elements that could participate in a putative C3G–p38 apoptosis regulatory pathway.

2. Materials and methods

2.1. Cell lines and expression constructs

K562 (ATCC, CCL 243), a human cell line derived from a patient with chronic myelogenous leukemia in terminal blast crisis, was maintained in RPMI 1640 containing 10% fetal bovine serum (FBS). C3G

* Corresponding authors. Guerrero is to be contacted at Tel.: +34 923294801; fax: +34 923294795, Porras, Tel.: +34 913941627.

E-mail addresses: maporras@farm.ucm.es (A. Porras), cguerrero@usal.es (C. Guerrero).

overexpression construct, pLTR2C3G, has been described previously [4]. Constructs containing shRNAs to target either human C3G or p38 α genes were generated using pSuper.neo+gfp vector (Oligoengine, Seattle, WA). The C3G sequence targeted was: 5'-CCACTATGATCCGACTAT-3' (C3Gi), nucleotides 1152–1170, acc. num. D21239. The p38 α sequence targeted was 5'-GCACATGCCTACTTTGCTC-3' (p38 α i), nucleotides 909–927, acc. num. NM_139012. Resulting constructs were named pSuper-C3Gi and pSuper-p38 α i. Rap1 with Ser 17 mutated to Asn (dominant negative) was cloned into pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA) as a 1.2 kb BamHI fragment.

2.2. Agonists and inhibitors

Exponentially growing cells ($\sim 1\text{--}5 \times 10^5$ cells/ml) were stimulated with 2 μM STI-571 for 30 min (signaling experiments) or 48 h (apoptosis experiments). The p38 α inhibitor SB203580 was used at 5 μM ; for signaling experiments cells were pretreated for 1 h before STI-571.

2.3. Transfection in K562

K562 cells ($5\text{--}10 \times 10^6/0.7$ ml of serum-free RPMI) were transfected by electroporation at 260 V, 950 μF with 25 μg of plasmid DNA. After 48 h incubation in complete RPMI media, selection was added: geneticin (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for pSuper constructs, or Killer HAT medium for constructs in plasmid pLTR2 [20].

2.4. Semiquantitative RT-PCR

cDNA from K562 clones was analyzed for C3G expression using specific primers Ex-2F: 5'-ACTCTCAGCGTTCTCATCTC-3' and Ex-4R: 5'-CTGTGCTGAATTCGAGGATC-3' (n141–n160 and n554–n573 respectively). The amplified bands were normalized against the internal control gene GAPDH using oligos GAPDH-F: 5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3' (forward) and GAPDH-R: 5'-TCT TCT GGG TGG CAG TGA TG-3' (reverse) in the same PCR reaction. The conditions for the PCR were: 94 $^{\circ}\text{C}$, 45 s; 55 $^{\circ}\text{C}$, 45 s; and 72 $^{\circ}\text{C}$, 1 min for 30 cycles.

2.5. Antibodies

Antibodies against: C3G (C-19), Rap1 (121), Actin (C-11), ERK1 (k-23), Akt1/2/3 (H-136) and p38 (C-20) were from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA); anti- β -Tubulin was from Sigma; anti-phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204), anti-phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182), anti-phospho-Akt (Ser473) and anti-phospho-ATF-2 (Thr71) were from Cell Signaling (Danvers, MA); anti-PARP-1 (556362) was from BD Pharmingen (San Diego, CA).

Antibodies used for microarray validation. Antibodies against: XPG (8H7), MAD1 (C-19), Arginase II (H-64), RICK (H-300), XPB/TFIIH p89 (S-19), SMAC (FL-239), NIP3 (Ana 40), GPR94 (H-212) and FADD (H-181) were from Santa Cruz Biotechnologies; against: PTEN (ab23694) and Bax (6A7) from Abcam (Cambridge, UK); anti-JAK2 (06-255) was from Millipore (Billerica, MA) and anti-Bcl2 mAb (551098) from BD Pharmingen.

2.6. P38 in vitro kinase assay

p38 MAPK in vitro kinase assay was performed using p38 MAPK Kinase Assay Kit from Cell Signaling following manufacturer's protocol. Briefly, phosphorylated p38 MAPK was immunoprecipitated from total protein extracts with immobilized anti-phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) monoclonal antibodies and suspended in a final volume of 50 μl of kinase buffer supplemented with 200 μM ATP. Kinase reaction was performed at 30 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min using inactive ATF-2 (2 μg per reaction) as substrate. Reaction was stopped by adding 25 μl 3X SDS sample buffer. Samples were resolved by SDS-PAGE and developed with antibodies anti-phospho-ATF-2.

2.7. Rap1 assay

The assay was performed with total cell lysates from confluent K562 clones using pGST-RalGDS-RBD construct as described previously [8].

2.8. DNA microarray analysis

RNA was purified from 5 to 10 million exponentially growing cells using RNeasy total RNA kit (Qiagen, Hilden, Germany). RNA was used to synthesize complementary RNA (cRNA) probes for hybridization to Affymetrix HG-U133 plus2 GeneChip according to protocols described in the Gene Expression Analysis Technical Manual (<http://www.affymetrix.com>).

2.9. Microarray hybridization data analysis

Affymetrix CEL files were processed in the R statistical environment (www.r-project.org) loaded with Bioconductor libraries (www.bioconductor.org). Our numeric protocol is a variation from RMA method [21] designed to preserve the magnitude and accuracy of the probe fluorescence measures. Five microarray hybridizations (three different clones for the control pSuper.neo/gfp K562 transfected cells and two different clones of pSuper-C3Gi K562 transfectants) were processed with this method. Afterwards, we use the SAM algorithm [22] implementation in R (siggenes) to identify the significant differential expression when comparing the knock-down C3G samples to their respective controls. The statistical significance of functional GO annotations was estimated by means of *P*-values of confidence calculated by running Fisher's exact tests to contrast the number of genes assigned to the various functional categories.

2.10. Flow cytometry

Apoptosis was measured by flow cytometry analysis of cells double stained with APC-conjugated Annexin V (Annexin V-APC) and 7-Amino-actinomycin D (7-AAD) according to conventional methods. Results were analyzed using WinMDI 2.8 software (Purdue University).

2.11. Statistical analysis

Data are represented as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using an unpaired Student's *t*-test. Results were considered significant when *P* < 0.05 (*).

3. Results

3.1. C3G regulates apoptosis in K562

C3G was suggested to play a role in apoptosis in hematopoietic cells [7]. On the other hand, STI-571 inhibits Bcr–Abl tyrosine kinase activity leading to apoptosis of the Bcr–Abl expressing cells [14]. In order to investigate the potential role of C3G facilitating the STI-571 pro-apoptotic effect in the CML cell model K562, we generated stable K562 clones with either C3G overexpression [4,5], or C3G knock-down (KD) expression upon C3G silencing with an interfering shRNA. Fig. 1A shows that both constructs modulate C3G expression as expected, both at RNA (a) and protein (b,c) levels, and that the shRNA downregulates both p140 (wild type) and p87C3G isoforms [8]. Using these clones, we first measured basal apoptosis by determining the percentage of annexin-V-positive and 7-AAD-negative cells. Fig. 1B shows that C3G overexpression increased basal apoptosis by ~ 2.5 fold, as previously reported [7]. Surprisingly, and in contrast to what we expected, C3G knock-down also increased basal apoptosis in K562 cells up to almost 4 fold, which represents a higher increase than that induced by C3G overexpression. Supporting these findings, the level of the cleaved (~ 85 kDa) PARP-1

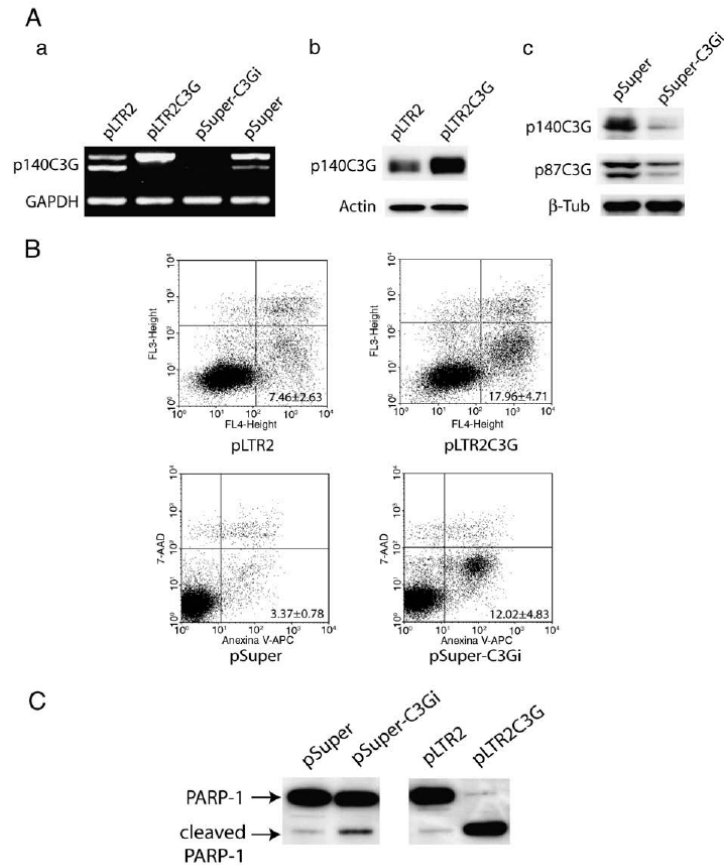


Fig. 1. Alterations in C3G expression induce apoptosis in K562 cells. (A) C3G expression upon permanent transfection of pLTR2C3G or pSuper-C3Gi in K562 cells. a: Representative semiquantitative analysis of C3G mRNA expression by RT-PCR using primers Ex2F-Ex4R and normalized against GAPDH. b, c: Representative Western blots showing C3G protein expression detected with anti-C3G (C-19) and normalized with anti-actin or anti-β-tubulin antibodies. pSuper: pSuper.neo+gfp. (B) Flow cytometry analysis of annexin-V/7-AAD-labelled K562 cells permanently transfected with the indicated plasmids. Representative experiment showing the mean ± SEM of the percentage of Annexin-V-positive/7-AAD-negative cells (early apoptotic cells, lower, right quadrant) from 3 independent experiments. (C) Analysis of cleaved PARP-1 expression in cell lysates of K562 clones expressing pSuper-C3Gi, pLTR2C3G or empty vectors.

fragment was increased in the clones with either C3G overexpression or knock-down expression, as compared to their controls (Fig. 1C). Next, we examined whether C3G deregulation could contribute to the STI-571-mediated apoptosis using the above clones treated with STI-571 2 μM for 48 h. Both, C3G overexpression and knock-down increased STI-571-induced apoptosis (Fig. 2), suggesting that C3G is involved in the STI-571 apoptotic effect.

As mentioned, a truncated C3G isoform, p87C3G, is abundantly expressed in K562 cells [8]. This highly expressed form might interfere with an additional C3G overexpression from our pLTR2C3G construct. For that reason, we have focused our investigations on the effect of the C3G knock-down.

3.2. C3G regulates STI-571-induced p38 activation

As indicated, the p38MAPK role in the STI-571-mediated apoptosis is not clear. To address this issue, we examined whether p38 MAPK was activated by STI-571 in our model and whether this was regulated by C3G. In our hands, STI-571 induced hardly detectable levels of p38 MAPK phosphorylation in control cells, in agreement with other

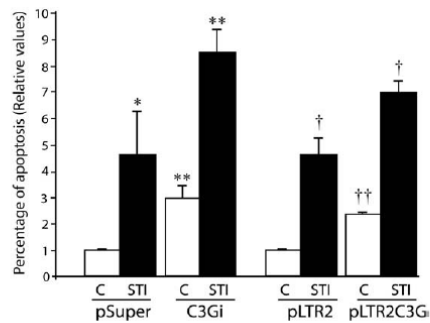


Fig. 2. Role played by C3G in STI-571-induced apoptosis, represented as the percentage of Annexin-V-positive/7-AAD-negative cells relative to controls pSuper and pLTR2 (given a relative value of 1). Cells transfected with pSuper, pSuper-C3Gi, pLTR2 or pLTR2C3G were maintained, either untreated or treated with 2 μM STI-571 for 48 h. The histogram represents the mean ± SEM of three independent experiments. *p<0.05, **p<0.01 vs pSuper; -C; †p<0.05, ††p<0.01 vs pLTR2-C. C: control-untreated cells; STI: STI-571.

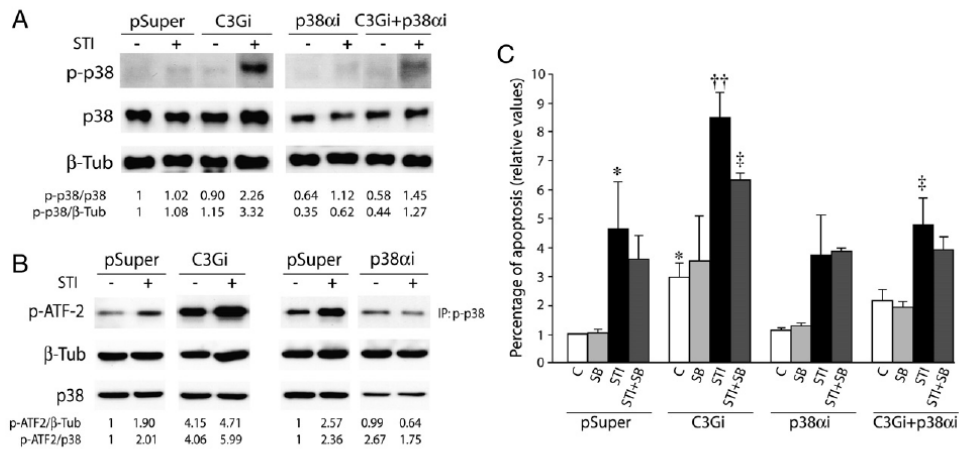


Fig. 3. C3G silencing enhances STI-induced p38 MAPK activation. K562 clones expressing pSuper, pSuper-C3Gi, pSuper-p38 α or both constructs were maintained untreated or treated with STI 571 2 μ M for 48 h. (A) Representative Western blot analysis of p38 MAPK phosphorylation normalized with total p38 and β -tubulin. Relative p-p38/p38 and p-p38/ β -tubulin ratios are shown. (B) p38 MAPK *in vitro* assay using purified ATF-2 protein performed with cell lysates from the indicated K562 clones. Phosphorylated-ATF-2 was visualized by Western blot with anti-phospho-ATF-2 antibodies. Similar amount of protein of each clone (20 μ g) was used to determine the levels of p38 and β -tubulin in the samples. Relative p-ATF2/ β -tubulin and p-ATF2/p38 ratios are shown. (C) Percentage of Annexin-V positive/7-AAD negative cells in K562 clones permanently expressing the indicated constructs. The values are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. All values are relative to non-treated K562 cells transfected with pSuper.neo+gfp empty vector (pSuper-C). * p <0.05 vs pSuper-C; $\dagger p$ <0.01 vs C3Gi-C; $\dagger\dagger p$ <0.05 vs C3Gi-STI.

previous reports [14–16]. However, upon C3G knock-down STI-571 was able to induce a clear increase in p38 MAPK phosphorylation (Fig. 3A). This was supported by the decrease in p38 phosphorylation in a double C3G and p38 α knock-down clone. These results suggest a functional relationship between p38 α and C3G in the STI-571-mediated effects in K562, with C3G acting as a negative regulator of p38 α . To confirm that STI-571 activates the p38 MAPK pathway and that C3G regulates this effect, we performed a p38 *in vitro* kinase assay using ATF-2 as substrate. Fig. 3B shows that, although STI-571 clearly stimulated ATF-2 phosphorylation in control -C3G-expressing-cells, C3G interference *per se* induced a much higher increase in phospho-ATF-2 level, which was further augmented by STI-571. The increase in phospho-ATF-2 was mainly due to activation of the p38 α isoform as it was abolished by p38 α knock-down. This result confirms the involvement of C3G in the regulation of p38 α by STI-571.

3.3. p38 MAPK participates in STI-571 induced apoptosis while C3G inhibits this process

According to the modest effect of STI-571 in p38 activation, we observed a slight, non-significant decrease in STI-571-induced apoptosis in K562 cells (carrying vector alone) upon treatment with the p38 α / β inhibitor SB203580 (3.60 ± 0.81 in pSuper STI+SB vs 4.61 ± 1.62 in pSuper STI) (Fig. 3C). Similar results were obtained upon p38 α silencing by interfering RNA (3.72 ± 1.37 in p38 α STI vs 3.60 ± 0.81 in pSuper STI+SB). These results suggest that p38 α isoform could participate in the STI-571 apoptotic effect. This potential pro-apoptotic role of p38 α was more evident in pSuper-C3Gi expressing cells, where SB203580 treatment led to a significant 25–30% decrease in STI-571-induced apoptosis (6.33 ± 0.23 in C3Gi STI+SB vs 8.47 ± 0.87 in C3Gi STI). This indicates that C3G and p38 α would be acting in a common, STI-571-induced, pro-apoptotic pathway, where C3G would be down-regulating p38 α MAPK activity and as a consequence STI-571-stimulated apoptosis. Accordingly, p38 α knock-down decreases STI-571-induced apoptosis in the C3Gi-expressing cells, similarly to the SB treatment (4.75 ± 0.94 in C3Gi+p38 α STI vs 8.47 ± 0.87 in C3Gi STI). These results confirm the cross-talk between C3G and p38 α in STI-571-induced apoptosis in K562 cells.

3.4. The effect of C3G on p38 is mediated by Rap1

To correlate the observed C3G effect on p38 phosphorylation and activity with the known inhibitory effect of Rap1 on p38 pathway [19], we checked the activation of Rap1 in K562 cells expressing pSuper-C3Gi. As expected, a dramatic decrease in Rap1-GTP levels was observed in the clone with interfered C3G expression in both untreated and STI-571-treated cells (Fig. 4A). This indicates that Rap1 activation depends mainly on C3G in these cells. Moreover, K562 cells expressing a dominant negative (DN) Rap1 mutant (Rap1S17N, framed Fig. 4B) showed an increased p38 activation in response to STI-571 (Fig. 4B), similar to that observed in cells with pSuper-C3Gi (Fig. 3B). This suggests that Rap1 mediates the antagonistic effect of C3G on p38.

3.5. C3G antagonizes STI-571-mediated inhibition of survival signals

The apoptotic effect of STI-571 has been shown to be the result of the inhibition of Bcr–Abl activation of several survival pathways, including ERKs and PI3K–Akt pathways [14]. To determine whether C3G and p38 participate in the STI-571 effect on these pathways, we checked phospho-ERK1/2 and phospho-Akt levels in K562 clones expressing pSuper-C3Gi or pSuper-p38 α upon treatment with STI-571. Fig. 5A shows that p-ERK control levels are slightly higher in C3Gi and p38 α expressing clones. Moreover, the STI-571 inhibitory effect on p-ERK was partially reverted by C3G knock-down, to a less extent by p38 α and almost completely reverted by pretreatment with SB203580 in the pSuper and p38 α clones (less in the C3Gi clone most likely due to the positive effect of C3G knock-down on p38 activity). These results are in agreement with previous data showing an inhibitory effect of C3G on ERKs [5,23], as well as with the known inhibitory effect of p38 on ERKs activation [12,24]. According to previous reports [5], the effect of C3Gi on p-ERK is independent of its GEF activity on Rap1, as a dominant negative Rap1 mutant (S17N), rather than activating, down-regulates p-ERKs (Fig. 5B), in concordance with the Rap1-mediated activation of the B-Raf-ERK pathway in these cells [19].

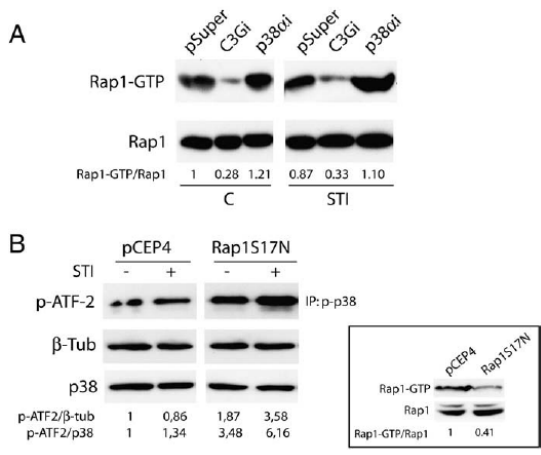


Fig. 4. C3G-Rap1 inhibits STI-571-mediated p38 activation in K562 cells. (A) K562 clones expressing pSuper, pSuper-C3G or pSuper-p38 α were maintained untreated or treated with STI-571 2 μ M for 30 min and the levels of Rap1-GTP determined by pull-down with GST-RalGDS (upper panel). Lower panel: Total Rap1 levels in the same cells. Relative Rap1-GTP/Total Rap1 ratios are shown. (B) p38 MAPK *in vitro* assay, using purified ATF-2 protein was performed on cell lysates from clones expressing a dominant negative (DN) Rap1 construct (Rap1S17N) or empty vector (pCEP4). After kinase reaction, samples were revealed with anti-p-ATF-2 antibodies (upper panel). Similar amount of protein of each clone (20 μ g) was used to determine de levels of p38 and β -tubulin in the samples (middle and lower panels). Relative p-ATF2/ β -tubulin and p-ATF2/p38 ratios are shown. Rap1-GTP assay in lysates of Rap1S17N and pCEP4 transfected cells, normalized against total Rap1, was performed as a transfection control (boxed figure).

Concerning Akt phosphorylation and in agreement with other authors, we detected a very low p-Akt basal level, which remained unchanged in the presence of STI-571 [14]. However, STI-571-induced a detectable increase in phospho-Akt levels in cells treated with SB203580, which was more evident in cells where C3G or p38 α had been knock-down (Fig. 5A). These results are indicative of a negative role of C3G and p38 α in the regulation of Akt activation in K562 cells, in concordance with previous data in other cell types [23,25].

3.6. C3G regulates the transcription of genes involved in apoptosis

To better understand the regulatory role of C3G in apoptosis, we analyzed the transcriptome of K562 cells with down-regulated C3G

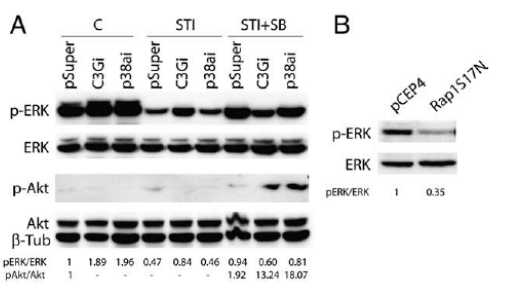


Fig. 5. C3G and p38 α participate in the inhibition of survival signals. (A) K562 clones expressing shRNA for C3G and p38 α or empty vector were treated 30 min with STI 2 μ M alone or after pretreatment with 5 μ M SB203580 for 1 h and the levels of p-ERK and p-Akt determined by immunoblotting with anti-phospho specific antibodies. The blot is representative of four independent experiments. Results were normalized by immunoblotting with total ERK, Akt and β -tubulin. pERK/ERK and pAkt/Akt ratios are shown. (B) p-ERK and ERK levels were determined in cell lysates (30 μ g) of K562 clones expressing DN Rap1 construct (Rap1S17N) or empty vector pCEP4.

Table 1
Genes involved in apoptosis and programmed Cell Death that are regulated by C3G knock-down. The list corresponds to FatiGo analysis, GO: biological process. Level: 8. The asterisks indicate the genes whose expression has been validated by immunoblotting (Fig. 6). Number of upregulated genes: 45 (20.87%); number of downregulated genes: 22 (10.20%); Unadjusted *p* value: 0.01781; Adjusted *p* value FDR: 0.88920. ERCC5, MAP3K1 and PTTG1 can display both apoptotic and antiapoptotic functions.

	Upregulated	Downregulated	
Pro-apoptosis	ADAMTSL4	MAP3K1	
	ATF5	PARP10	
	BBC3	PDCD5	
	BCL6	PHF17	
	BNIP3*	PTEN*	
	BNIP3L	PTPRC	
	CALR	PTTG1	
	CCAR1	RIPK2*	
	CEBPG	RTN4	
	DDIT3	RYBP	
	DNASE2	SCARB1	
	DNM2	SCN	
	ERCC5*	STX2	
	LCK	TCF7	
	LITAF	TNFRSF10B	
	ARG2*	PTTG1	
	BCL2*	SERPINB9	
	ERCC5*	SQSTM1	
	HSP90B1*	TNFAIP3	
	HSPA5	TPD52L1	
IL1A	TRIB3		
JAK2*			
MAP3K1			
MITF			
MXD1*			
PIM1			
PRKAA1			
		ATG5	
		BAX*	
		BRCA1	
		DIABLO*	
		ERCC3*	
		FADD*	
		FOXL2	
		HIPK2	
		PSEN2	
		RIPK1	
Anti-apoptosis			AKT1S1
			BFAR
			BID
			EP300
			FAIM
			FASTKD2
			FASTKD5
			HSPA1A
			NME6
			PHB
			PRKDC
			RPA2

expression using Affymetrix GeneChips HG-U133 plus2 that were hybridized with cRNA from K562 cell cultures permanently transfected with pSuper (3 chips) or pSuper-C3G (2 chips) constructs. SAM algorithm [22] identified numerous genes whose expression changed in the lines with diminished C3G expression as compared with controls (Supplementary Fig. 1). Functional characterization of the differentially expressed genes using FatiGO (Babelomics) [26], (www.fatigo.org) showed that 31.08% of the genes in the GO: biological

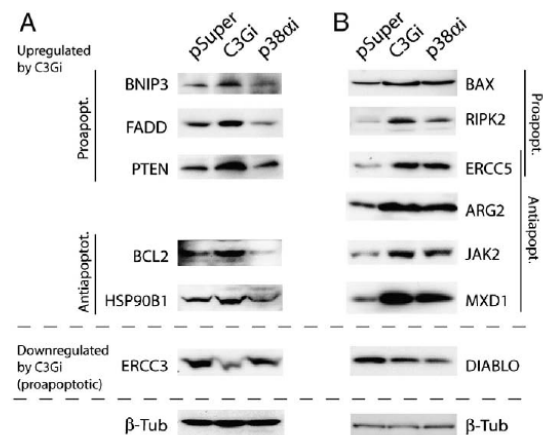


Fig. 6. Analysis of the expression of the indicated proteins by immunoblotting using cell lysates (30 μ g) from K562 clones expressing pSuper, pSuper-C3G or pSuper-p38 α . Representative Western blots showing proteins whose expression is antagonistic (A) or similar (B) in C3G and p38 α cells as compared to pSuper-control cells. β -tubulin expression was used as loading control. BNIP3: NIP3, RIPK2: RICK, HSP90B1: GPR94, ERCC3: XPB, ARG2: arginase II; ERCC5: XPG, MXD1: MAD1, Diab1: SMAC.

process level: 8 are involved in apoptosis (67 genes), with 45 genes upregulated and 22 genes downregulated in the C3G knock-down clones (Table 1). Among the C3Gi-upregulated genes most (>60%) were pro-apoptotic in agreement with the described C3G knock-down effect on apoptosis. To validate the data from the microarrays, we performed Western blot analysis with specific antibodies against some of the proteins in Table 1 (*), using total cell lysates from K562 clones expressing pSuper and pSuper-C3Gi (Fig. 6). We also included in this analysis lysates from pSuper-p38 α -expressing clones. Most of the proteins analyzed by Western blot validated the Genechips results. The exceptions were FADD and BAX, with decreased RNA levels and increased protein levels in the C3Gi clones, suggesting a posttranscriptional, translational and/or posttranslational regulation of these genes. The presence of FADD suggests that C3G may regulate both, the extrinsic and intrinsic pathways. The upregulation of anti-apoptotic proteins, such as BCL2, HSP90B1, ARG2, JAK2 and MXD1 or the downregulation of pro-apoptotic proteins, such as ERCC3 and DIABLO might reflect a compensatory mechanism to avoid massive apoptosis in the C3Gi cells. Some of the proteins regulated by C3G KD are, either not affected or regulated by p38 α KD in an antagonistic way as in C3Gi cells (Fig. 6A). This observation correlates with the opposite roles of these two proteins in apoptosis, as well as with the negative regulation of p38 by C3G. In contrast, other proteins showed the same expression behavior in the C3Gi and in the p38 α i cells (Fig. 6B). Most of these proteins are antiapoptotic, therefore their upregulation in p38 α i cells is in agreement with the apoptotic role of p38 α . However, their overexpression in C3Gi could be a result of compensatory mechanisms.

4. Discussion

In this paper, we demonstrate for the first time the existence of a functional relationship between C3G and p38 MAPK in the STI-571 apoptotic effect on the CML cell line K562, expressing the chimeric p210 Bcr–Abl protein. STI-571 directly inhibits Bcr–Abl kinase activity which results in apoptosis by a mitochondrion-dependent mechanism that requires the activation of caspases 9 and 3 [14]. It is supposed that these apoptotic events are the result of the abrogation of all proliferative and survival pathways triggered by the fusion protein, but little is known about the upstream players involved in this effect.

There are evidences implicating C3G and p38 MAPK in apoptosis. However, a direct cooperation between these two proteins in apoptosis and its role in CML has not been described so far. C3G, independently of its GEF activity, collaborates with the kinase Hck in the induction of apoptosis in primary hematopoietic cells [7]. In addition, few reports point out to a role of p38 in the antileukemic effect of STI-571 [17,18] or interferon-alpha [27] in Bcr–Abl-expressing cells.

Our results indicate that in K562 cells, p38 (mainly the p38 α isoform) activation by STI-571 is enhanced by C3G–Rap1 inhibition, which results in apoptosis. SB203580 or a p38 α interfering RNA partially inhibits STI-571 induced apoptosis, in agreement with other authors [28]. According to other reports, STI-571-induced p38 phosphorylation and activity was hardly detectable [14,15], but it was highly increased upon C3G interference, which is indicative of an inhibitory role of C3G on p38 phosphorylation. Moreover, expression of a Rap1 dominant negative mutant also increased p38 phosphorylation and activity, suggesting that the C3G-inhibitory effect on p38 is mediated by its GEF activity on Rap1. Importantly, and as expected from the mentioned results, C3G knock-down also resulted in an increase in STI-571-mediated apoptosis, further supporting an anti-apoptotic role for the C3G–Rap1 pathway acting through p38. On the other hand, we also present data showing an apoptotic role for C3G, when overexpressed, in agreement with other authors [7].

According to data from the literature, we have also detected a decrease in ERKs phosphorylation in response to STI-571 in K562 cells [13,18,29], that was partially reverted in C3Gi clones. This C3Gi effect, in

combination with the enhancement of Akt phosphorylation, supports the previously reported antiproliferative role of C3G [4–6,23]. Thus, we speculate that the apoptosis induced by C3G overexpression is likely due to its inhibitory action on ERK and Akt, although other mechanisms, including the participation of Hck cannot be excluded. It has also to be mentioned that C3G-mediated Rap1 activation plays a role in the induction of cell proliferation and survival in hematopoietic cells stimulated with IL-3 or expressing Bcr–Abl, through the activation of the B-Raf-ERKs and PI3K-Akt pathways, [19,29,30]. In addition, p87C3G, a C3G isoform abundantly expressed in CML cells, is phosphorylated by Bcr–Abl, which suggests its participation in Bcr–Abl-promoted leukemogenesis [8]. Therefore, C3G seems to play a dual regulatory role in CML cells through the modulation of both apoptotic and survival pathways. Thus, the C3G–Rap1 pathway may contribute to Bcr–Abl-induced malignant phenotype through both, inhibition of pro-apoptotic pathways, such as p38 MAPK, and stimulation of survival pathways such as ERKs and Akt cascades. In contrast, C3G, through Rap1-independent mechanisms, that may involve phosphatases activation [6], can inhibit ERKs and Akt pathways. Supporting this dual role of C3G, a number of evidences have confirmed that, either a defective or an excess of Rap1 activation can contribute to malignancy via distinct biological effects, depending on the cell context, particularly in hematopoietic cells [19,31]. For example, SPA-1 deficient mice developed myeloid disorders that resembled human CML [32].

The fact that C3G knock-down can revert the inhibitory effect of STI-571 on ERKs activation, together with its synergistic effect on STI-571-induced p38 phosphorylation and apoptosis suggests that C3G activation is not only dependent on Bcr–Abl, but also on other alternative inputs. This is remarkable, since no Bcr–Abl independent signaling pathways have been described so far in CML cells and may inspire new therapeutical approaches for CML treatment.

The regulatory role of C3G in apoptosis is supported by our data from Affymetrix GeneChips analysis, showing a high number of genes involved in apoptosis that are differentially expressed in the C3G knock-down clones. The expression of some of these genes is also regulated by p38 α , further suggesting the existence of a functional association between these two proteins in the regulation of apoptosis in CML. Future work will be aimed to elucidate the precise participation of these proteins in the C3G–p38-mediated apoptosis.

Our results are compatible with a model where the antiapoptotic role of C3G engages Rap1 activation, which results in p38 inhibition, while the antiproliferative/pro-apoptotic role of C3G involves a Rap1 independent inhibition of ERKs and Akt (Fig. 7). Hence, this model can explain how both, C3G overexpression or knock-down may induce apoptosis. C3G overexpression may inhibit ERKs and Akt activation, leading to apoptosis. On the other hand, C3G knock-down induces p38 activation and contributes to the inhibition of the Rap1–B-Raf-ERK pathway, both promoting apoptosis. Further research is necessary to

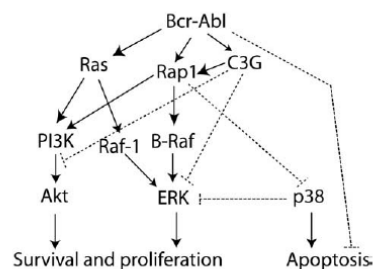


Fig. 7. Model of C3G participation in Bcr–Abl pathways. Rap1 is a mediator of the C3G effect on p38 but C3G also inhibits survival and proliferation pathways independently of Rap1 in CML cells. Activatory pathways are represented with solid lines, inhibitory pathways with dotted lines.

clarify the mechanism implicated in p38 inhibition by C3G-Rap1, although it is probably not dependent on MKK3/6 regulation, since MKK3/6 phosphorylation is not altered by STI-571 [18].

In conclusion, although C3G seems to play a complex role in CML, the main overall effect of C3G down-regulation is the enhancement of STI-571-mediated apoptosis in CML cells. Therefore, we can propose C3G as an important novel alternative target for new antitumoral therapies, along or in combination with other treatments such as STI-571.

Acknowledgements

This work was supported by grants FIS-PI041324 and FIS-PI070078 (AP: FIS-PI041131 and FIS-PI070071) from ISCIII, Ministry of Health, Spain; GR93 from Junta de Castilla y León, Spain, as well as institutional support from Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RD07/0020/0000) from ISCIII, Ministry of Health, Spain. V.M is a predoctoral student supported by grant FIS-PI070078. A.G.-U. is a predoctoral student supported by Comunidad Autónoma de Madrid, Spain.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.cellsig.2009.03.015.

References

- [1] T. Gotoh, S. Hattori, S. Nakamura, H. Kitayama, M. Noda, Y. Takai, K. Kaibuchi, H. Matsui, O. Hatase, H. Takahashi, et al., *Mol. Cell. Biol.* 15 (1995) 6746.
- [2] T. Gotoh, Y. Niino, M. Tokuda, O. Hatase, S. Nakamura, M. Matsuda, S. Hattori, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 18602.
- [3] Y. Ohba, K. Ikuta, A. Ogura, J. Matsuda, N. Mochizuki, K. Nagashima, K. Kurokawa, B.J. Mayer, K. Maki, J. Miyazaki, M. Matsuda, *EMBO J.* 20 (2001) 3333.
- [4] C. Guerrero, A. Fernandez-Medarde, J.M. Rojas, J. Font de Mora, L.M. Esteban, E. Santos, *Oncogene* 16 (1998) 613.
- [5] C. Guerrero, S. Martín-Encabo, A. Fernandez-Medarde, E. Santos, *Oncogene* 23 (2004) 4885.
- [6] S. Martín-Encabo, E. Santos, C. Guerrero, *Exp. Cell Res.* 313 (2007) 3881.
- [7] R. Shivakrupa, V. Radha, C. Sudhakar, G. Swarup, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 52188.
- [8] J. Gutierrez-Berzal, E. Castellano, S. Martín-Encabo, N. Gutierrez-Cianca, J.M. Hernandez, E. Santos, C. Guerrero, *Exp. Cell Res.* 312 (2006) 938.
- [9] A.R. Nebreda, A. Porras, *Trends Biochem. Sci.* 25 (2000) 257.
- [10] A. Cuenda, S. Rousseau, *Biochim. Biophys. Acta* 1773 (2007) 1358.
- [11] L. Hui, L. Bakiri, E. Stepniak, E.F. Wagner, *Cell Cycle* 6 (2007) 2429.
- [12] A. Porras, S. Zuluaga, E. Black, A. Valladares, A.M. Alvarez, C. Ambrosino, M. Benito, A.R. Nebreda, *Mol. Biol. Cell* 15 (2004) 922.
- [13] L.S. Steelman, S.C. Pohnert, J.G. Shelton, R.A. Franklin, F.E. Bertrand, J.A. McCubrey, *Leukemia* 18 (2004) 189.
- [14] A. Jacquél, M. Herrant, L. Legros, N. Belhacene, F. Luciano, G. Pages, P. Hofman, P. Auberger, *FASEB J.* 17 (2003) 2160.
- [15] A. Jacquél, P. Colosetti, S. Grosso, N. Belhacene, A. Puissant, S. Marchetti, J.P. Breittmayer, P. Auberger, *Oncogene* 26 (2007) 2445.
- [16] E.M. Galan-Moya, J. Hernandez-Losa, C.I. Aceves Luquero, M.A. de la Cruz-Morcillo, C. Ramirez-Castillejo, J.L. Callejas-Valera, A. Arriaga, A.F. Aramburo, S. Ramón y Cajal, J. Silvio Gutkind, R. Sánchez-Prieto, *Int. J. Cancer* 122 (2008) 289.
- [17] S. Parmar, E. Katsoulidis, A. Verma, Y. Li, A. Sassano, L. Lal, B. Majchrzak, F. Ravandi, M.S. Tallman, E.N. Fish, L.C. Platanias, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 25345.
- [18] K. Kohmura, Y. Miyakawa, Y. Kawai, Y. Ikeda, M. Kizaki, *J. Cell. Physiol.* 198 (2004) 370.
- [19] P.J. Stork, T.J. Dillon, *Blood* 106 (2005) 2952.
- [20] P.P. Di Fiore, J.H. Pierce, M.H. Kraus, O. Segatto, C.R. King, S.A. Aaronson, *Science* 237 (1987) 178.
- [21] R.A. Irizarry, B. Hobbs, F. Collin, Y.D. Beazer-Barclay, K.J. Antonellis, U. Scherf, T.P. Speed, *Biostatistics* 4 (2003) 249.
- [22] V.G. Tusher, R. Tibshirani, G. Chu, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98 (2001) 5116.
- [23] A.K. Voss, D.L. Krebs, T. Thomas, *EMBO J.* 25 (2006) 3652.
- [24] Q. Liu, P.A. Hofmann, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286 (2004) H2204.
- [25] S. Zuluaga, A. Alvarez-Barrientos, A. Gutierrez-Uzquiza, M. Benito, A.R. Nebreda, A. Porras, *Cell. Signal.* 19 (2007) 62.
- [26] F. Al-Shahrour, R. Diaz-Uriarte, J. Dopazo, *Bioinformatics* 20 (2004) 578.
- [27] S. Parmar, L.C. Platanias, *Curr. Opin. Oncol.* 15 (2003) 431.
- [28] C. Yu, G. Krystal, L. Varticovski, R. McKinstry, M. Rahmani, P. Dent, S. Grant, *Cancer Res.* 62 (2002) 188.
- [29] D. Mizuchi, T. Kurosu, A. Kida, Z.H. Jin, A. Jjin, A. Arai, O. Miura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326 (2005) 645.
- [30] A. Jin, T. Kurosu, K. Tsuji, D. Mizuchi, A. Arai, H. Fujita, M. Hattori, N. Minato, O. Miura, *Oncogene* 25 (2006) 4332.
- [31] M. Hattori, N. Minato, *J. Biochem.* 134 (2003) 479.
- [32] D. Ishida, K. Kometani, H. Yang, K. Kakugawa, K. Masuda, K. Iwai, M. Suzuki, S. Itohara, T. Nakahata, H. Hiai, H. Kawamoto, M. Hattori, N. Minato, *Cancer Cell* 4 (2003) 55.