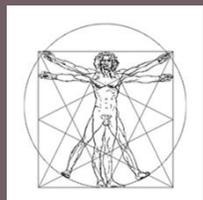
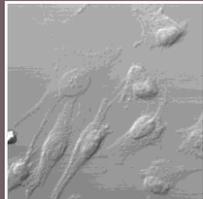
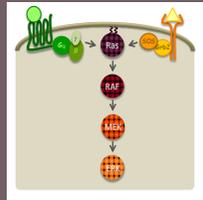
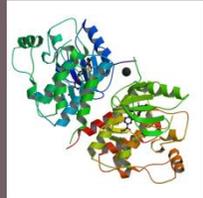
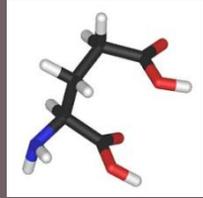
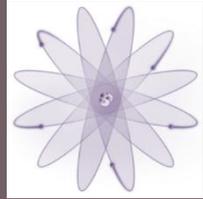
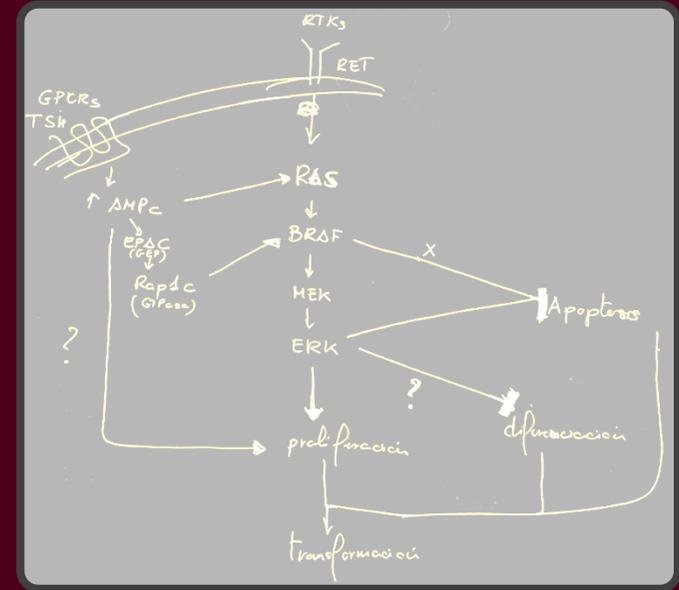


# NUEVOS MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA CARCINOGENESIS PRODUCIDA POR B-RAF

Irene Sánchez Hernández  
2010





Tesis Doctoral

**NUEVOS MECANISMOS MOLECULARES  
IMPLICADOS EN LA CARCINÓGENESIS  
PRODUCIDA POR B-RAF**

Irene Sánchez Hernández

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular*

Alcalá de Henares 2010

ISBN: 84-693-2324-3

**Antonio Chiloeches Gálvez**, Doctor en Biología y Profesor Titular de Universidad del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Alcalá,

INFORMA:

Que el trabajo presentado por **Dña. Irene Sánchez Hernández**, titulado **“Nuevos mecanismos moleculares implicados en la carcinogénesis producida por B-RAF”**, ha sido realizado bajo mi dirección en este Departamento y, a su juicio, cumple todos los requisitos necesarios para que la interesada opte al Grado de Doctor.

Alcalá de Henares, a 10 de Mayo de 2010

Dr. Antonio Chiloeches Gálvez



**Antonio Jiménez Ruíz**, Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Alcalá,

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral que lleva por título **“Nuevos mecanismos moleculares implicados en la carcinogénesis producida por B-RAF”** ha sido realizada por **Dña. Irene Sánchez Hernández** en este Departamento, bajo la dirección del **Dr. Antonio Chiloeches Gálvez** y, a su juicio, cumple todos los requisitos necesarios para que la interesada opte al Grado de Doctor.

Alcalá de Henares, a 10 de Mayo de 2010

Dr. Antonio Jiménez Ruíz



## Abstract

---

B-RAF protein is included in the Ras-RAF-MEK-ERK pathway that regulates several signalling processes. In particular, it has been implicated in cellular proliferation and apoptosis, two key steps in transformation. Due to point mutations in B-RAF, this protein is hyperactivated in approximately 10 % of human cancers. The most common mutation is <sup>V600E</sup>B-RAF, which account for 90% of the cases. This substitution transforms the wild type protein in a constitutively activated kinase. Previous studies have shown that most of the processes regulated by B-RAF occur through the activation of MEK-ERK pathway, but it also exist data suggesting that oncogenic B-RAF can produce its effects through other pathways. Therefore, it is important and necessary a better understanding of the biological processes regulated by <sup>V600E</sup>B-RAF in cancer.

In the present work, the role of <sup>V600E</sup>B-RAF in tumour cells proliferation and apoptosis, was studied, as well as other signalling pathways that may be related to <sup>V600E</sup>B-RAF in these processes. We used two recognized strategies in the study of RAF proteins functions with the aim to achieve these goals: treatment with the RAF inhibitor BAY 43-9006 and silencing of B-RAF and C-RAF expression by using small interference RNA. Moreover, the MEK specific inhibitor U0126 was used for determining the contribution of the MEK-ERK pathway in those processes. The model used includes four cell lines derived from different human tumours: two of them carrying the wild type B-RAF protein and the other two containing the oncogenic protein <sup>V600E</sup>B-RAF. Thus, we could compare the role of either wild-type B-RAF or the constitutively activated protein in such processes.

Our results demonstrate that <sup>V600E</sup>B-RAF is the main MEK-ERK activator when this mutant is present in the cells. Thus, <sup>V600E</sup>B-RAF-MEK-ERK pathway promotes proliferation of tumour cells and its inhibition diminishes cell proliferation. We also show that the inhibition of either B-RAF activity or its expression increases cellular apoptosis, so <sup>V600E</sup>B-RAF is a survival signal for the cells harbouring it and its silencing sensitize cells to death by treatment with the chemotherapeutic drug etoposide. Furthermore, this oncoprotein protects cells from apoptosis by regulation of expression levels of some proteins involved in the apoptotic machinery like BIM, Bcl-2, Bcl-XL, and the activation of caspase 3. Surprisingly, the MEK-ERK pathway does not act downstream <sup>V600E</sup>B-RAF in the prevention of apoptosis, since the inhibition of this pathway does not have any effect in the apoptotic levels.

In addition, our data establish that PI3K also participates in proliferation and survival in cells carrying the <sup>V600E</sup>B-RAF mutation. Firstly, inhibition of PI3K with LY294002 reduces proliferation, and this effect is bigger when cells are treated simultaneously with LY294002 and the inhibitors of the RAF-MEK-ERK pathway. Secondly, PI3K-AKT-mTOR pathway cooperates with <sup>V600E</sup>B-RAF in the survival of the studied tumour cell lines. The inhibition of the PI3K pathway alone does not exert any effect on apoptosis; however, together with <sup>V600E</sup>B-RAF inhibition, it has a bigger effect on the levels of apoptosis than the inhibition of B-RAF alone. Remarkably, the presence of <sup>V600E</sup>B-RAF downregulates the activation of the pathway since its silencing induces the phosphorylation of AKT and p70S6K proteins.

Finally, we demonstrate that <sup>V600E</sup>B-RAF regulates NF- $\kappa$ B-dependent transcription by two different mechanisms: one through the canonical pathway, inducing I $\kappa$ B $\alpha$  degradation and increasing the p65/RelA nuclear translocation, and the other one by increasing p65/RelA transactivation potential by a MSK1-dependent mechanism. <sup>V600E</sup>B-RAF depends on MEK-ERK pathway for activating NF- $\kappa$ B, so this transcription factor does not participate in the survival induced by oncogenic <sup>V600E</sup>B-RAF. However, the role of NF- $\kappa$ B is not yet elucidated.

All together, these data demonstrate that oncogenic <sup>V600E</sup>B-RAF plays a crucial role in carcinogenesis, regulating both tumour cell proliferation and survival, two key processes in tumoral progression. Therefore, B-RAF must be considered as a therapeutic target in cancer treatment, specially, in combination with drugs which act on other signalling pathways such as PI3K and NF- $\kappa$ B pathways.

## Prólogo

El objetivo fundamental de esta Tesis era estudiar el papel del oncogén <sup>V600E</sup>B-RAF en células tumorales tiroideas. Para ello, el modelo celular elegido incluía un amplio panel de líneas celulares, representativas de diversos estadios del cáncer de tiroides que carecen o poseen la forma oncogénica <sup>V600E</sup>B-RAF. Las células utilizadas fueron: células WRO derivadas de cáncer folicular de tiroides con B-RAF silvestre, células KAK-1 derivadas de adenoma folicular tiroideo con <sup>V600E</sup>B-RAF, células KAT-10 y NPA derivadas de cáncer papilar tiroideo con <sup>V600E</sup>B-RAF, y las células derivadas de tumores anaplásicos tiroideos KAT-18 (con B-RAF silvestre), KAT-4, KAT-4B, KAT-4C y ARO (con <sup>V600E</sup>B-RAF). Sin embargo, a finales del año 2008 el laboratorio del Dr. Haugen publicó un artículo en el que demostraba la identificación errónea de la mayor parte de las líneas celulares utilizadas en estudios del cáncer de tiroides durante los últimos 20 años (1). En ese trabajo se expone que muchas de ellas se corresponden a la misma línea celular y, además, que la mayor parte de ellas no tienen un origen tiroideo, sino que provienen de otros tipos de tumores como melanoma, mama o colon (1). Este artículo mereció un editorial en la propia revista (2), otra en Nature (3) y una revisión reciente sobre el tema (4). Este hecho ha puesto de manifiesto que gran parte de los datos publicados en el campo del cáncer de tiroides deben ser revisados, repetidos y contrastados de nuevo, ya que muchos de los resultados existentes podrían no ser extrapolables a este tipo de cáncer.

Nosotros también nos hemos visto afectados por los problemas de mala identificación de distintas líneas celulares tiroideas, lo que ha provocado que gran cantidad de datos que poseíamos sobre el papel de B-RAF en la carcinogénesis tiroidea deban ser repetidos. Así, somos conscientes de que parte de los resultados presentados en esta memoria pueden parecer preliminares, aunque debemos señalar que, en algunos no se ha podido profundizar por carecer de los controles adecuados, y otros ya están publicados en la literatura con la misma línea celular, pero con distinto nombre. Por lo tanto, a pesar de que poseemos más resultados, para evitar repeticiones con los datos publicados hemos decidido no incluirlos en esta memoria. Por todo esto, nosotros hemos modificado ligeramente los objetivos, hemos incluido los datos más novedosos y discutimos el papel de B-RAF en la transformación celular desde un punto de vista más general.

A pesar de estos problemas y de no haber podido realizar algunos de los objetivos planteados al comienzo de esta Tesis, nuestros resultados aportan nueva y valiosa información sobre el papel y los mecanismos que puede utilizar B-RAF oncogénico para inducir la transformación celular.



## Agradecimientos

---

Hoy yo no estaría aquí si Don Pascual Royo no me hubiera animado a entrar en su laboratorio. Me propuso ayudar a Gema MM en el final de su tesis, aunque realmente fue ella quién me ayudó a mí. De ahí me fui a Uppsala, al laboratorio de Staffan Eriksson, donde cambié de tercio; él, dándole importancia a lo yo que hacía, me hizo sentir ilusión. Volví con una enorme sensación de vértigo y Antonio Jiménez me buscó un hueco en el departamento; y, aunque entonces no alcanzaba a comprenderlos todos, Juan me dio consejos muy valiosos. Entonces conocí a Antonio. Aún recuerdo ese primer día; él me hablaba de las proteínas RAF casi como de sus hijas y yo no conseguía explicarle el ensayo de actividad quinasa que había estado haciendo durante un año (a día de hoy seguimos sin terminar de entendernos). Él no tenía ninguna referencia sobre mí y me dejó perfectamente claro que existía la posibilidad de que tuviera que marcharse, así que los dos apostamos a ciegas. Eso sí, aunque sea algo entre ellos, sin Pilar LR no hubiera podido quedarme. Así empecé mi tesis.

Al principio no sabía nada, menos mal que los que ya estaban en el laboratorio tuvieron paciencia conmigo. En los huecos de los cursos de doctorado Jesús me mostró por primera vez unas células al microscopio y me enseñó a trabajar con ellas. Fran, como rey del *western*, me enseñó muchos de los trucos que conozco a día de hoy y, como compañero, no se cansó de decirme cosas que solo a día de hoy entiendo. Laura me recordó que siempre hay que mirar las dos caras de la moneda mientras me enseñaba a transfectar en nuestro cuarto de cultivos. Qué pena que nos echasen. Con Vero y Eva, todos juntos sufrimos los olores, las palomas y las perlas de Chilo. Entonces llegó Miguel, mi compañero de proyectos difíciles (p-AKT, NIS, Q-PCR...). Yo sí le entendía, menos mal, porque compartimos mucho tiempo (paseos a la instalación en invierno, sudores en la cámara  $\gamma$  en verano, esperas a los huecos de Antonio, tres mudanzas...). Sin él me faltaría cerca de media tesis. Entre tanto, Antonio fue superando todos los trámites necesarios y obtuvo su plaza.

Después, las circunstancias me separaron de Vero y estuve sin compañeros durante un tiempo, pero nunca me sentí sola. María José, sin ningún rencor y con todo su cariño, me hizo más llevaderas las tardes-noches (aún tenemos pendientes las agujas) y los Colás me acogieron como una más. Juntos cambiamos de laboratorio cinco veces, se dice pronto. Entre mudanza y mudanza apareció Pablo. Yo llevaba mucho tiempo sola y me costó encajarlo (no me fiaba de él, me buscaba artículos...); pocos me han aguantado lo que él. La otra media tesis se la debo a su enorme capacidad tamponante, ¡está claro! Volvimos a arriba, donde me reencontré con Vero. Apareció

Lauralicia; y desapareció, aunque dejó huella. Creo que al final leeré yo antes, menos mal. Por último llegó un tesoro, Nadia, dispuesta a todo, incluso a hacerme las puntas.

En todo este periodo ha habido muchos experimentos, pero también ha habido lugar para otras cosas: viajes, cenas, carreras, celebraciones, crisis, risas, lágrimas,... y eso se lo debo a aquellos con los que he compartido este tiempo: los Chilo (incluidos Chilo y Vero), los Jiménez, los Colás, las Puyoles y los Gago. Sin esta parte sería un sin sentido. El final ha sido lo más difícil, creí que jamás llegaría, pero he tenido grandes apoyos que me han levantado tras cada tropiezo.

Gracias por hacerme más fácil esta etapa:

A mis padres, mi hermano, y mis amigos, Noe, Mi, Celia, Carlos, Moreno, Iván, por apoyarme y esperarme.

A Don Pascual, Gema y Staffan por mostrarme la ciencia.

A Juan, Antonio Jiménez y Pilar LR por abrirme camino. A Juan, Guillermo, Angélica, María José y Miry por allanarlo. A Jesús, Fran y Laura por ayudarme en los primeros pasos.

A todos los Chilo, los Jiménez, los Colás, las Puyoles, los Gago, por acompañarme y ayudarme en esta etapa, en especial a Pablo, Miguel, JFAR, David, Eva, Javi, Mali, Ana, Juan, Claire, Vero, Eva Calviño y Nadia.

A David, Nuria, Iván, Eva y Vero, por sufrir conmigo, por alentarme en los momentos más difíciles, por guiarme en la oscuridad y hacerme creer que podía.

A mis mejores compañeros, Miguel y PABLo.

A Antonio, que forma parte de todos los grupos anteriores, por apoyarme, por esperarme, por mostrarme la ciencia, por abrirme camino, allanarlo y ayudarme en los primeros pasos, por acompañarme en este tiempo, por sufrir conmigo, por alumbrarme, por hacerme creer que podía y por compañero. Gracias por arriesgarte conmigo, por no echarme, por no marcharte, por comparar y no comparar, por ayudarme con mi circo (385), por financiar "mi árbol", por escribir una cuarta tesis. Afortunadamente he ganado tanto a nivel profesional y educativo como personal y humano. Aunque no eres perfecto eres el mejor.

A David, por su paciencia finita e infinita y aportarme el puntito de sensatez que me falta.

*A mis padres*

*“El camino más largo se inicia con un solo paso.”*

Lao Tse



# Índice

**Abstract, VII**

**Prólogo, IX**

**Agradecimientos, XI**

<b>Abreviaturas.....</b>	<b>1</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>3</b>
<b>I. APOPTOSIS</b>	<b>6</b>
1. VÍAS DE ACTIVACIÓN DE LA APOPTOSIS	7
2. ALTERACIÓN DE LA APOPTOSIS CELULAR	11
<b>II. RUTAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA PROLIFERACIÓN Y SUPERVIVENCIA CELULAR</b>	<b>12</b>
1. VÍA Ras-RAF-MEK-ERK	13
1.1. PROTEÍNAS RAF	15
Estructura de las proteínas RAF	
Regulación de las proteínas RAF	
Funciones de las proteínas RAF	
1.2. IMPLICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RAF EN CÁNCER	28
2. VÍA DE PI3K-AKT-mTOR	31
2.1. ACCIONES Y SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR LA VÍA DE PI3K-AKT-mTOR	31
PI3K	
AKT	
mTOR	
2.2. PAPEL DE LA VÍA PI3K-AKT-mTOR EN CÁNCER	38
3. VÍA DE NF- $\kappa$ B	40
3.1. REGULACIÓN Y SEÑALIZACIÓN POR LA VÍA DE NF- $\kappa$ B	41
3.2. PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE NF- $\kappa$ B EN CÁNCER	47
<b>Hipótesis y objetivos.....</b>	<b>49</b>
<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>53</b>
1. MATERIALES	55
1.1 Reactivos	
1.2. Plásmidos	
1.3. Compuestos inhibidores y activadores	
1.4. Anticuerpos	

2. CULTIVOS CELULARES	59
2.1. Líneas celulares	
2.2. Condiciones de cultivo	
3. TRANSFECCIONES TRANSITORIAS	60
3.1. Transfección de ARN pequeños de interferencia ( <i>siRNA</i> )	
3.2. Transfección de vectores de expresión	
4. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE PROTEÍNAS POR <i>WESTERN BLOT</i>	61
4.1. Obtención de extractos celulares totales	
4.2. Obtención de extractos de proteínas nucleares	
4.3. Determinación de la concentración de proteínas	
4.4. Electroforesis y electrotransferencia de proteínas a membrana	
4.5. Inmunodetección de las proteínas	
4.6. <i>Stripping</i> y rehibridación de las membranas con otro anticuerpo	
5. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN	64
5.1. Curvas de crecimiento. Tinción con azul de Tripan	
5.2. Ensayo de incorporación de [ <sup>3</sup> H]-timidina	
6. ANÁLISIS DE LA MUERTE CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO	65
6.1. Análisis del contenido celular de ADN por marcaje con IP	
6.2. Determinación del nivel de exposición de fosfatidil serina	
6.3. Determinación del potencial de membrana mitocondrial	
7. ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE NF-κB	67
7.1. Cuantificación de la actividad transcripcional de NF-κB por ensayo de luciferasa	
7.2. Cuantificación de la actividad transactivadora de p65/RelA mediante ensayo de luciferasa	
8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD QUINASA DE LAS PROTEÍNAS RAF	68
8.1. Expresión de las proteínas de fusión GST-MEK1 y GST-ERK2	
8.2. Inmunoprecipitación de proteínas	
8.3. Ensayo actividad quinasa	
9. ANÁLISIS DE LOS DATOS	70
<b>Resultados.....</b>	<b>71</b>
1. EFECTO DE LA VÍA RAF-MEK-ERK SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES	74
1.1. Estado de activación de la vía RAF-MEK-ERK en células KAT-18, WRO, ARO y NPA	74
1.2. Papel de la vía RAF-MEK-ERK sobre la proliferación de células KAT-18, WRO, ARO y NPA	76
1.3. Papel de las proteínas RAF en la proliferación de las células WRO y NPA	78

2. EFECTO DE B-RAF SOBRE LA APOPTOSIS EN CÉLULAS WRO Y NPA	82
2.1. Implicación de las proteínas RAF en la supervivencia de células WRO y NPA	82
2.2. Relación entre las proteínas RAF y proteínas de la maquinaria apoptótica celular	85
2.3. Papel de <sup>V600E</sup> B-RAF sobre la apoptosis producida por el agente proapoptótico etopósido	88
3. RELACIÓN ENTRE <sup>V600E</sup> B-RAF Y LA VÍA PI3K-AKT EN LA SUPERVIVENCIA DE CÉLULAS TUMORALES	90
3.1. Papel de PI3K en la proliferación de células tumorales con la mutación <sup>V600E</sup> B-RAF	90
3.2. Papel de la vía PI3K-AKT-mTOR en supervivencia inducida por <sup>V600E</sup> B-RAF	92
4. PAPEL DE <sup>V600E</sup> B-RAF SOBRE LA VÍA DE NF-κB	98
4.1. Efecto de <sup>V600E</sup> B-RAF sobre la actividad transcripcional de NF-κB	98
4.2. <sup>V600E</sup> B-RAF regula la degradación de IκBα y la translocación al núcleo de p65/RelA de manera dependiente de ERK	107
4.3. <sup>V600E</sup> B-RAF aumenta la actividad de transactivación de p65/RelA a través de la vía MEK-ERK-MSK1	109
<b>Discusión.....</b>	<b>113</b>
1. La proteína <sup>V600E</sup> B-RAF es responsable de la proliferación celular a través de la activación de la vía MEK-ERK en las células que la contienen	116
2. <sup>V600E</sup> B-RAF protege de la apoptosis regulando distintas proteínas de la maquinaria apoptótica, a través de un mecanismo independiente de la vía MEK-ERK	120
3. La vía PI3K-AKT-mTOR colabora en la protección de la apoptosis inducida por <sup>V600E</sup> B-RAF	124
4. <sup>V600E</sup> BRAF aumenta la actividad transcripcional de NF-κB	127
<b>Conclusiones.....</b>	<b>133</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>137</b>



## Abreviaturas

---

<b><sup>3</sup>H-timidina</b>	Timidina tritiada	<b>LY</b>	LY294002, inhibidor de PI3K
<b><math>\Delta\Psi_m</math></b>	Potencial de membrana mitocondrial	<b>Luc</b>	Actividad luciferasa
<b>AKT, AKT/PKB</b>	<i>Protein Kinase B</i>	<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
<b>ALX</b>	Inhibidor de AKT, <i>1L-6-Hydroxy methyl-chiro-inositol-2-[(R)-2-O-methyl-3-O-octadecylcarbonate</i>	<b>MAPKK</b>	<i>MAP Kinase Kinase</i>
<b>B-RAF wt</b>	B-RAF <i>wild type</i> , silvestre	<b>MAPKKK</b>	<i>MAP Kinase Kinase Kinase</i>
<b>BAX, BAK, BOK, BIM, BID, BAD, BMF, Bcl-2, Bcl-XL</b>	Proteínas de la familia Bcl2 de la maquinaria apoptótica celular	<b>MEFs</b>	Fibroblastos embrionarios de ratón
<b>BAY</b>	BAY 43-9006, inhibidor de RAF	<b>MEK</b>	<i>MAPK-ERK Kinase</i>
<b>CHX</b>	Cicloheximida	<b>MSK1</b>	<i>Mitogen and Stress- activated Kinase-1</i>
<b>cols.</b>	colaboradores	<b>mTOR</b>	<i>Mammalian Target Of Rapamycin</i>
<b>CRD</b>	<i>Cystein Rich Domain</i>	<b>mTORC</b>	<i>mTOR Complex</i>
<b>EMT</b>	Transición epitelio-mesenquima	<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	<i>Nuclear Factor-<math>\kappa</math>B</i>
<b>ERK</b>	<i>Extracelular signal-Regulated Kinase</i>	<b>p65/RelA</b>	Proteína miembro de la familia de NF- $\kappa$ B
<b>ESM</b>	Error estándar de la media	<b>p70S6K</b>	Proteína p70 kinasa de S6; también conocida como S6K1, <i>Ribosomal S6 Kinase 1</i>
<b>FS</b>	FosfatidilSerina	<b>PI3K</b>	<i>Phosphatidylinositol-3-Kinase</i>
<b>Geld, Geldan</b>	Geldanamicina, inhibidor de Hsp90	<b>PTC</b>	<i>Papillary Thyroid Carcinoma</i>
<b>GPCR</b>	<i>G-Protein Coupled Receptor</i>	<b>raf<sup>-/-</sup></b>	Ratones <i>knockout</i> para el gen de la isoforma de RAF correspondiente (A-RAF, B-RAF, C-RAF)
<b>GST</b>	Glutathionil-S-transferasa	<b>RAF<sup>-/-</sup></b>	Células en que no se expresa la isoforma de RAF correspondiente (A-RAF, B-RAF, C-RAF)
<b>IAPs</b>	<i>Inhibitor of Apoptosis Proteins</i>	<b>Rapam</b>	Rapamicina, inhibidor de mTOR
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	<i>Inhibitor of <math>\kappa</math>B</i>	<b>Ras</b>	Proteína G pequeña Ras
<b>IKK</b>	<i>I<math>\kappa</math>B Kinase</i>	<b>Ren</b>	Actividad renilla
<b>IP</b>	Ioduro de Propidio		
<b>kDa</b>	kiloDalton		

Abreviaturas

<b>RBD</b>	<i>Ras Binding Domain</i>	<b>TMRM</b>	Sonda TetraMetilRodaminMetiléster perclorato
<b>RKIP</b>	<i>RAF Kinase Inhibitor Protein</i>	<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor Necrosis Factor <math>\alpha</math></i>
<b>RTK</b>	<i>Receptor Tyrosine Kinase</i>	<b>U0</b>	U0126, inhibidor de MEK
<b>SC</b>	<i>Scrambled, secuencia de siRNA desordenada</i>	<b>VE, V600E</b>	Mutante <sup>V600E</sup> B-RAF
<b>siBRAF</b>	siRNA para B-RAF	<b>VEGFR</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
<b>siB/CRAF</b>	Mezcla de siBRAF y siCRAF	<b>Wort</b>	Wortmanina, inhibidor de PI3K
<b>siCRAF</b>	siRNA para C-RAF		
<b>siRNA</b>	<i>Small Interference RNA</i>		

## *Introducción*



El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por el crecimiento excesivo y descontrolado de células que invaden y dañan tejidos y órganos, provocando finalmente la muerte del individuo (5).

El desarrollo de un tumor se produce por alteraciones sucesivas de diversos procesos celulares tales como proliferación, supervivencia, diferenciación, migración, invasión y angiogénesis que conducen a la transformación progresiva de células normales en células derivadas malignas. Hanahan y Weinberg sugirieron que la mayoría, o posiblemente todos los tumores humanos de los más de cien tipos descritos, es una manifestación de seis alteraciones esenciales en la fisiología celular: autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a las señales inhibitorias del mismo, evasión de la muerte celular programada o apoptosis, adquisición de potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida e invasión de tejidos y metástasis (6). Cada una de estas seis alteraciones confiere algún tipo de ventaja a las células para el desarrollo de los tumores y, en conjunto, provocan el crecimiento maligno.

La evolución aberrante de dichos procesos celulares en carcinogénesis es debida a defectos en las vías de señalización que los regulan por modificaciones en el genoma de las células, mediante mutaciones puntuales, deleciones, translocaciones, amplificaciones y ganancia o pérdida de un cromosoma completo, que generalmente dan lugar a la activación de proteínas oncogénicas o a la inactivación de genes supresores de tumores.

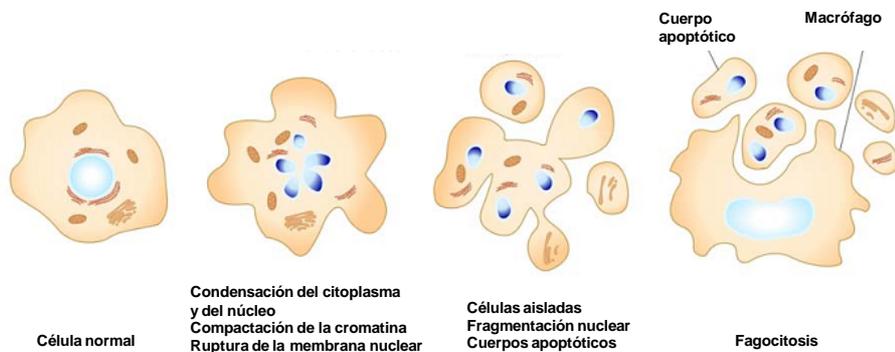
En el inicio de la tumorogénesis es esencial el aumento del número de células; la habilidad de las células de un tumor para crecer en número está determinada por un aumento de la tasa de proliferación de forma independiente de las señales de activación o inhibición del crecimiento y por la disminución de la tasa de muerte celular.

Nuestro trabajo se centra en el estudio del papel del oncogén <sup>V600E</sup>B-RAF en el proceso de carcinogénesis, concretamente, en la regulación de la proliferación y supervivencia celulares. Por ello, en esta introducción hacemos una breve descripción del proceso de apoptosis, de la vía de señalización Ras-RAF-MEK-ERK, donde se encuentra incluida B-RAF, así como de las vías de PI3K y NF-κB, también implicadas en carcinogénesis y que se encuentran relacionadas con ésta.

## I. APOPTOSIS

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada y, como tal, es un proceso fisiológico esencial para el correcto funcionamiento de los organismos multicelulares. Normalmente tiene lugar durante el desarrollo y envejecimiento, manteniendo la homeostasis en poblaciones celulares y tejidos. También puede actuar como un mecanismo de defensa en reacciones inmunes o frente a daño celular causado por enfermedad o agentes nocivos (7).

Durante este proceso se producen cambios morfológicos muy característicos en la célula apoptótica, como su separación de las células vecinas, contracción celular, condensación del núcleo y del citoplasma, condensación de la cromatina, fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN), degradación de la membrana nuclear y formación de cuerpos apoptóticos (8-10). Estos cuerpos apoptóticos son reconocidos y fagocitados por macrófagos y células adyacentes evitando una respuesta inflamatoria (11) (figura 1).



**Figura 1. Cambios morfológicos que experimenta una célula durante el proceso apoptótico.** En la figura se esquematiza la evolución morfológica de la célula indicando la secuencia de eventos moleculares producidos en la muerte celular por apoptosis.

Entre los eventos que caracterizan el proceso apoptótico a nivel bioquímico se encuentran (7):

- La activación de la cascada de caspasas. La mayoría de los efectos citológicos observados durante la apoptosis están causados por un grupo de cisteínas proteasas, llamadas también caspasas, que actúan sobre secuencias

específicas en las proteínas diana que contienen residuos de aspártico (cisteína-aspártico proteasas). Las caspasas son un grupo de proteínas expresadas en forma de proenzimas inactivas compuestas por tres dominios: el dominio N-terminal y los dominios p20 y p10; se activan por proteólisis de su dominio N-terminal, lo que permite que una procaspasa se active por acción de otra caspasa que ha sido previamente activada, iniciando una cascada de proteasas que arrastra irreversiblemente a la célula a morir por apoptosis.

- La exteriorización de fosfolípidos como la fosfatidilserina (FS) y de proteínas como la Anexina I y la Calreticulina en la cara externa de la membrana celular. Estos sirven como marcadores de la célula apoptótica actuando como ligandos de receptores de las células fagocíticas, lo que induce un rápido reconocimiento de la célula apoptótica por los macrófagos y desencadena una rápida fagocitosis que evita un proceso inflamatorio.
- La fragmentación del ADN en fragmentos mono y oligonucleosomales. Este proceso es llevado a cabo por endonucleasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ .

## 1. VÍAS DE ACTIVACIÓN DE LA APOPTOSIS

La activación del proceso apoptótico puede producirse por diferentes mecanismos en respuesta a diversos estímulos. El modelo mejor descrito de activación de la apoptosis se divide en dos vías iniciadoras, la vía extrínseca y la vía intrínseca, que activan a la vía ejecutora.

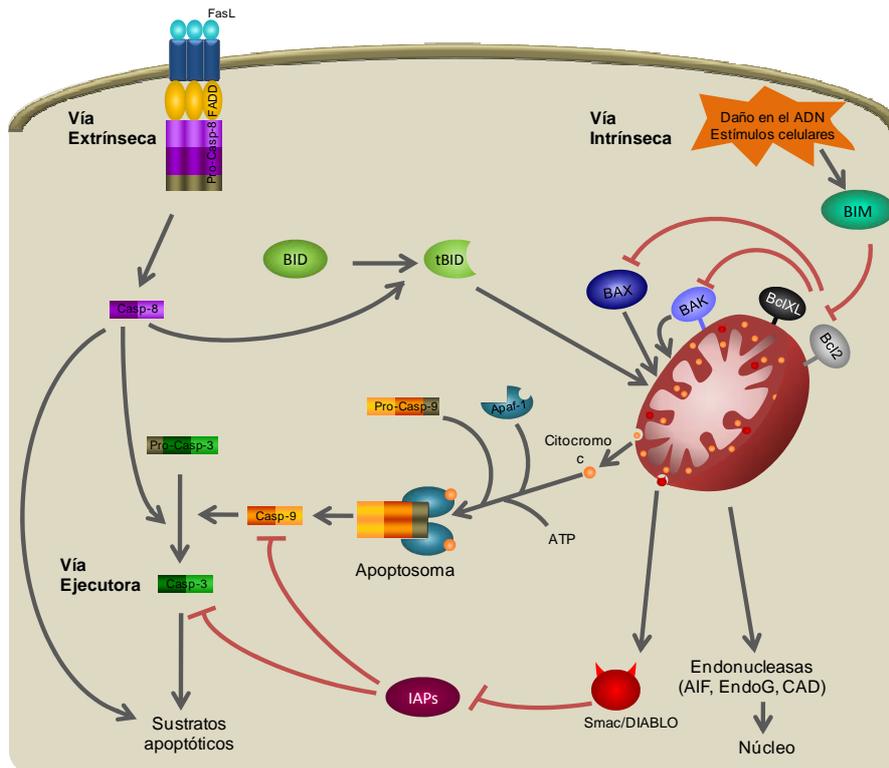
### Vía extrínseca

Esta vía también se denomina vía de los receptores de muerte porque se inicia por la activación de dichos receptores de membrana. Los receptores de muerte pertenecen a la superfamilia de receptores del TNF (*Tumor Necrosis Factor*) (12). Éstos comparten dominios extracelulares ricos en cisteínas y un dominio citoplasmático denominado dominio de muerte (DD, *Death Domain*) (13). Los receptores de muerte (R) mejor caracterizados y sus correspondientes ligandos (L) son: FasL/FasR,  $\text{TNF}\alpha/\text{TNFR}$ , Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 y Apo2L/DR5 (13). La secuencia de eventos que definen la fase extrínseca de la apoptosis está mejor caracterizada para FasL/FasR y  $\text{TNF}\alpha/\text{TNFR}$ .

Una vez que el ligando se une al receptor, el dominio de muerte recluta proteínas adaptadoras citoplasmáticas que contienen dominios efectores de muerte. Concretamente, la unión de FasL con FasR produce el reclutamiento de la proteína FADD (*Fas-Associated Death Domain protein*), mientras que la unión de TNF $\alpha$  con TNFR induce la unión de la proteína adaptadora TRADD (*TNF-Receptor-Associated Death Domain protein*) y el posterior reclutamiento de FADD y RIP (7). A continuación FADD se asocia con la procaspasa 8, formándose el complejo DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*) que induce la activación autocatalítica de la procaspasa 8 (14), que a su vez activa la caspasa 3 directamente. Una vez activa la caspasa 3, se ejecuta el proceso apoptótico (figura 2).

### Vía intrínseca

Esta vía también se denomina vía de la mitocondria, ya que la mitocondria juega un papel esencial en la activación de la apoptosis, y se activa en respuesta a señales intracelulares o lesiones celulares como daño en el ADN (15). Sea cual sea el estímulo, la activación de esta vía provoca cambios en la membrana mitocondrial interna tales como la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, pérdida del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) y la liberación de dos grupos de proteínas proapoptóticas desde el espacio intermembrana de la mitocondria hacia el citosol. El primer grupo está formado por el citocromo c, Smac/DIABLO (*Second mitochondrial-derived activator of caspase/Direct IAP-Associated Binding protein with Low PI*) y la serina proteasa HtrA2/Omi (16,17). Estas proteínas activan la vía mitocondrial dependiente de caspasas. El citocromo c se une a la proteína Apaf-1 (*Apoptosis protease activating factor 1*) formando el complejo proteico denominado apoptosoma, el cual media la activación de la cascada de caspasas, a través de la caspasa 9 (18). Por otra parte, Smac/DIABLO y HtrA2/Omi promueven la apoptosis por inhibición de la actividad de las proteínas antiapoptóticas IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Proteins*) (16,19) (figura 2). El segundo grupo de proteínas proapoptóticas liberadas desde la mitocondria está formado por AIF (*Apoptosis-Inducing Factor*), la Endonucleasa G y CAD (*Caspase Activated DNase*). Estas proteínas se liberan de la mitocondria de forma tardía, una vez que la célula ya está en proceso de muerte, y producen la fragmentación del ADN. AIF y la Endonucleasa G actúan de manera independiente de caspasas, desplazándose directamente desde la mitocondria al núcleo (7,20), mientras que CAD ha de ser activado por la caspasa 3 (21) (figura 2).



**Figura 2. Principales vías de activación del proceso apoptótico.** En la figura se representan la vía extrínseca, vía intrínseca y vía ejecutora de la apoptosis y las proteínas implicadas en las mismas.

Los eventos mitocondriales que desencadenan el proceso apoptótico están regulados por la familia de proteínas Bcl-2. Dentro esta familia existen miembros antiapoptóticos, que promueven la supervivencia, y miembros proapoptóticos, con función opuesta. Se han identificado al menos 25 miembros de la familia Bcl-2 y todos presentan como mínimo uno de los cuatro dominios BH (*Bcl-2 Homology*), lo que les permite interactuar entre ellos formando homo- o heterooligómeros, regulando así su función. Estas proteínas se han clasificado en 3 grupos basados en su función y homología en la secuencia de aminoácidos (22,23):

- Los miembros antiapoptóticos, que conservan los cuatro dominios de homología a Bcl-2 (BH1, BH2, BH3, BH4). Este grupo está formado por las proteínas Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, MCL1 y A1.

- Los miembros proapoptóticos multidominio, a los que solo les falta el dominio BH4, entre los que se encuentran BAX, BAK y BOK.
- Los miembros proapoptóticos llamados “solo BH3” (*BH3 only*) puesto que solo conservan el dominio BH3. Este grupo incluye las proteínas BID, BIM, BAD, BIK, BMF, Hrk/DP5, Noxa y Puma.

En condiciones normales, BAX y BAK existen como monómeros y cuando se activan forman homooligómeros; se postula que estos homooligómeros son los responsables de la formación del poro de la membrana mitocondrial por el que salen las proteínas mitocondriales, como el citocromo c, iniciando el proceso apoptótico (23,24) (figura 2).

Las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL se encuentran ancladas en membranas intracelulares como la de la mitocondria, del retículo endoplásmico o de la membrana nuclear, y actúan inhibiendo a BAX y BAK por heterodimerización con ellas (25) (figura 2). Además, existen estudios que indican que Bcl-2 y Bcl-XL inhiben la apoptosis por control de la activación de las caspasas (26).

Las proteínas “solo BH3” son activadas por señales citotóxicas e inician su función proapoptótica formando un dímero con las proteínas Bcl-XL y Bcl-2 que inhibe su función antiapoptótica y, por tanto, se inicia la apoptosis celular por activación de las proteínas BAX y BAK como ya se ha descrito (23,24,27). Sin la presencia de BAX o BAK, las proteínas “solo BH3” no son capaces de desencadenar la activación de la apoptosis (28).

Además de por interacción directa entre ellas, las proteínas Bcl-2 se regulan por cambios en los niveles de expresión, cambios conformacionales y fosforilación.

Las vías mitocondrial y extrínseca no son totalmente independientes, ya que existe una interacción entre ambas. Una vez que la caspasa 8 ha sido activada por la vía de los receptores de muerte, además de activar directamente la cascada de caspasas, proteoliza la proteína proapoptótica de la familia de Bcl-2 BID, que en condiciones normales se encuentra inactiva en el citosol. La proteólisis de BID libera su extremo carboxilo, generando un fragmento de BID truncado (tBID) que se transloca a la mitocondria (29,30). Allí inicia la permeabilización de la membrana mitocondrial al inducir cambios conformacionales y la oligomerización de BAX y BAK, produciéndose así la salida del citocromo c al citosol y la posterior activación de otras caspasas (31,32) (figura 2).

### Vía ejecutora

Las dos vías descritas anteriormente confluyen en la fase de ejecución, que se considera la vía final del proceso apoptótico (figura 2).

En esta fase las caspasas juegan un papel fundamental. Las caspasas implicadas en apoptosis se pueden dividir en dos grupos (33): caspasas iniciadoras (caspasa 2, 8, 9, 10) y caspasas ejecutoras (caspasa 3, 6, 7). La función de las caspasas iniciadoras es activar a las caspasas ejecutoras y éstas se encargan de inducir la degradación del material nuclear y las proteasas de proteínas nucleares y del citoesqueleto, probablemente responsables de la pérdida total de la forma celular (7). La caspasa 3 está considerada como la más importante de las proteínas ejecutoras. Ésta activa específicamente a la endonucleasa CAD, que se encarga de la degradación del ADN cromosómico y de la condensación de la cromatina (21). Además, la caspasa 3 activa es capaz de hidrolizar y, por lo tanto, inactivar a la proteína PARP (*Poly-ADP-Ribose Polimerase*), la cual normalmente está implicada en procesos de reparación del ADN y es muy importante para mantener la viabilidad celular (34).

Por otra parte, la activación de las caspasas también depende, además de su proteólisis, de inhibidores endógenos como IAPs, que regulan negativamente la activación de las caspasas 3, 7 y 9 (35-37).

## 2. ALTERACIÓN DE LA APOPTOSIS CELULAR

La desregulación de la apoptosis, tanto por exceso como por defecto, da lugar a diversas patologías. La activación excesiva de la apoptosis puede contribuir al desarrollo del SIDA, enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, la esclerosis múltiple o la enfermedad de Alzheimer, pancreatitis y daño isquémico entre otros. En cuanto a las enfermedades causadas por falta de apoptosis, se encuentran las infecciones virales, algunas enfermedades autoinmunes y el cáncer (7).

La supresión de la apoptosis durante la carcinogénesis juega un papel esencial en el desarrollo y progresión de muchos tipos de tumores (38). Las células tumorales adquieren resistencia a la apoptosis por múltiples mecanismos moleculares, entre los que se encuentra la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas, por ejemplo Bcl-2, la falta de expresión de proteínas proapoptóticas, mutaciones en el gen del supresor de tumores p53 o sobreactivación de la vía de supervivencia PI3K-AKT (7).

## II. RUTAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA PROLIFERACIÓN Y SUPERVIVENCIA CELULAR

Los procesos de proliferación, diferenciación, movilidad, supervivencia y muerte celular están controlados por diversas rutas de señalización. Bajo el término “transducción de señales” se agrupan los mecanismos por los cuales los estímulos extracelulares que llegan a la membrana plasmática se transforman dentro de la célula en respuestas celulares específicas, que le permiten a ésta la adaptación a los cambios en el medio externo, así como el mantenimiento de la homeostasis. La transducción de una señal desde la membrana plasmática y su propagación en el interior celular se realiza por la activación secuencial de distintas proteínas, que incluyen receptores para hormonas y factores de crecimiento de la membrana plasmática, así como proteínas GTPasas unidas a ella mediante modificaciones lipídicas, las cuales activan distintas proteínas quinasas y factores de transcripción organizados en lo que se conocen como cascadas de señalización. Entre éstas se encuentran las vías de señalización de las proteínas MAPKs, PI3K-AKT y NF- $\kappa$ B, objeto de nuestro estudio.

Las cascadas de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK, *Mitogen Activated Protein Kinases*) transducen las señales desde la membrana celular al núcleo, en respuesta a un amplio rango de estímulos. Hasta el momento se han descrito 6 familias de MAPKs en mamíferos, de las cuales las más estudiadas son las que incluyen las proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2, *Extracellular Signal-Regulated protein Kinases*), las proteínas quinasas del extremo N-terminal de c-Jun (JNKs, *c-Jun N-terminal Kinases*) y las p38 MAPKs (39-41). Además, existen otras familias de MAPKs, las ERK3/4, la ERK5 y la ERK7, cuyas funciones no se conocen en detalle. Las MAPKs intervienen en gran número de funciones celulares en respuesta a diferentes estímulos, están organizadas en módulos cuyos componentes comparten homología estructural, pero median respuestas celulares específicas que incluyen la expresión génica, proliferación, diferenciación, movilidad, metabolismo y supervivencia o muerte celular (39-41).

Las MAPKs son una familia de proteínas serina/treonina quinasas organizadas en una cascada de tres niveles. La cascada se inicia cuando se activa una proteína G monomérica de la superfamilia de Ras, la cual interacciona con una MAPK quinasa quinasa (MAPKKK, *MAPK Kinase Kinase*) que es activada por fosforilación. La MAPKKK fosforila y activa una MAPK quinasa (MAPKK, *MAPK Kinase*) de especificidad dual, que

a su vez activa a la MAPK por fosforilación doble en residuos de treonina y tirosina. A continuación, las MAPKs fosforilan a sus sustratos en residuos de serina o treonina. Las MAPKs tienen sustratos tanto a nivel citosólico como en el núcleo, donde fosforilan factores de transcripción y regulan la expresión de un gran número de genes (39-41).

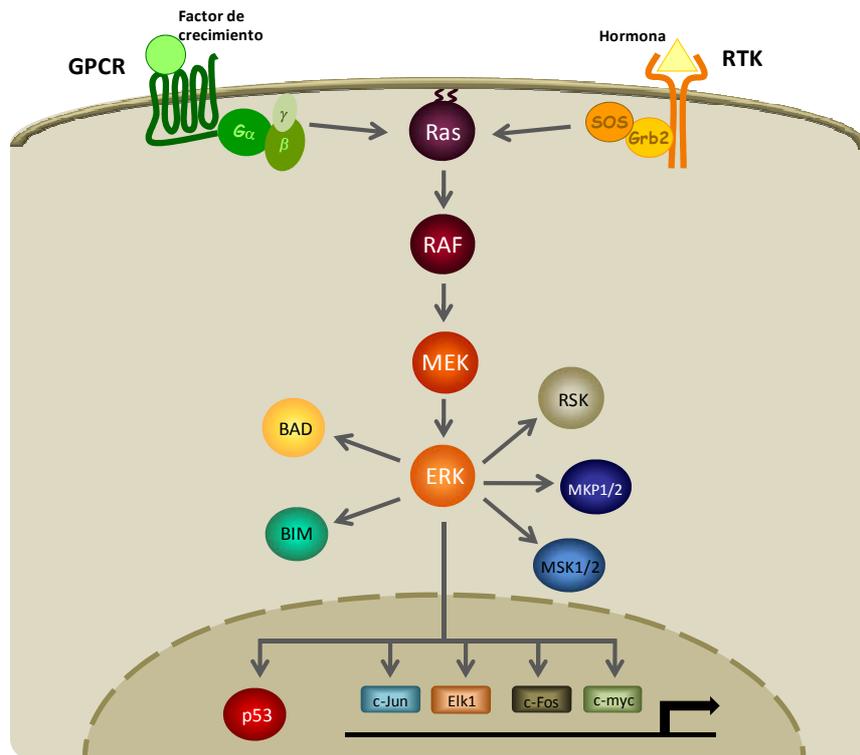
## 1. VÍA Ras-RAF-MEK-ERK

Las proteínas RAF, principal objeto de nuestro estudio, pertenecen a la vía de señalización Ras-RAF-MEK-ERK (figura 3). La activación de la vía se produce por la unión extracelular de factores de crecimiento, hormonas o citoquinas a sus correspondientes receptores de membrana, entre los que se encuentran receptores tirosina quinasa (RTK, *Receptor Tyrosine Kinase*) y receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G (GPCR, *G Protein Coupled Receptor*) (42). Éstos transmiten la señal al interior de la célula, activando la proteína Ras, que es una proteína G monomérica con actividad GTPasa que tiene la capacidad de unir e hidrolizar nucleótidos trifosfato de guanina (GTP). Las GTPasas existen en su conformación inactiva (unida a GDP) o activa (unida a GTP). El cambio del estado inactivo al activo se produce tras la recepción de una señal estimuladora, lo que provoca cambios estructurales que hacen accesible la región efectora de estas GTPasas a sus proteínas sustrato; de esta forma, una vez unida a GTP, Ras activa a su proteína quinasa efectora RAF (MAPKKK) (figura 3).

Las proteínas RAF son una familia de proteínas citosólicas compuesta por tres miembros: A-RAF, B-RAF y C-RAF. Éstas activan a una segunda quinasa llamada MEK (*MAPK-ERK Kinase*, MAPKK), que a su vez activa a una tercera proteína quinasa llamada ERK (*Extracelular signal-Regulated Kinase*, MAPK). Las proteínas MEK son los únicos efectores aceptados para las tres isoformas de RAF, así como las proteínas RAF son los activadores mejor caracterizados de MEK.

Las proteínas MEK son dos, MEK1 (44 kDa) y MEK2 (45 kDa), y pertenecen a la familia de MAPKK de actividad dual. Se activan por la fosforilación de los residuos S217 y S221 del segmento de activación de MEK1 (y los correspondientes para MEK2). Las MEKs tienen una secuencia rica en prolina que no poseen el resto de MAPKK y se piensa que es requerida para el reconocimiento y unión de RAF (43). Una vez que MEK se encuentra activa es capaz de activar a ERK mediante fosforilación de un residuo de treonina y otro de tirosina en el motivo TEY del lazo de activación (T202/Y204 en

ERK1). Las proteínas ERK, también conocidas como p44 y p42 por sus respectivos pesos moleculares (ERK1 44 kDa y ERK2 42 kDa), tienen actividad serina/treonina quinasa y una vez activas pueden fosforilar más de 100 posibles sustratos entre proteínas nucleares y citosólicas con diversas funciones. Algunos ejemplos de estos sustratos son las proteínas quinasas MSK1/2 (*Mitogen and Stress-activated Kinase*), RSK (también conocida como p90 RSK S6 quinasa), fosfatasa como MKP1/2, proteínas implicadas en apoptosis como BAD y BIM, la propia C-RAF y factores de transcripción como Elk-1, c-Fos, c-Jun, c-Myc y p53 (44) (figura 3). De esta forma ERK controla diversos procesos tales como proliferación, transformación, supervivencia y diferenciación celular (42,45).



**Figura 3. Vía de señalización Ras-RAF-MEK-ERK.** Tras la activación de los receptores de membrana por señales externas se produce la activación de Ras, que inicia la cascada de fosforilación de las MAPKs. Una vez que se activa ERK, ésta transmite la señal por regulación de proteínas citosólicas y nucleares.

Esta vía puede encontrarse desregulada en varios de sus niveles, lo que la ha vinculado ampliamente al proceso de carcinogénesis. Concretamente las proteínas Ras y RAF son protooncogenes, con una tasa de mutación de un 30 % en el caso de Ras y de un 10-20 % en el caso de B-RAF (46-49), y la actividad MAPK está aumentada en un aproximadamente 30 % de tumores.

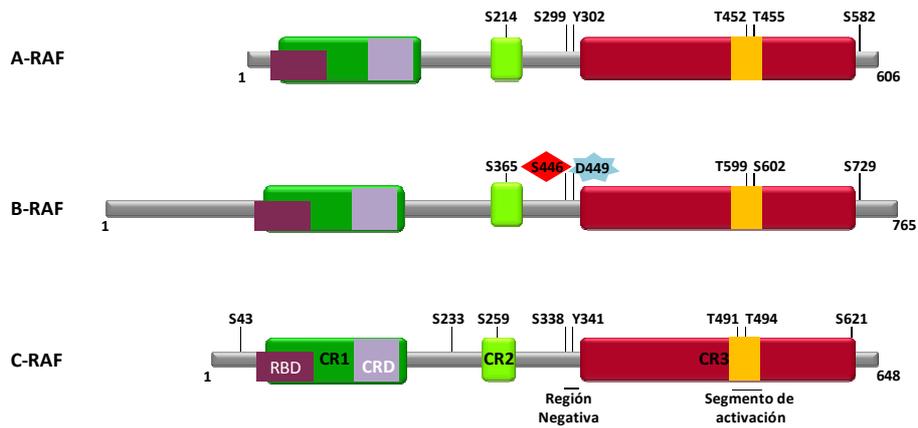
### 1.1. PROTEÍNAS RAF

Las proteínas RAF son una familia de proteínas citosólicas con actividad serina/treonina quinasa. Está compuesta por tres miembros: A-RAF, B-RAF y C-RAF. Mediante estudios evolutivos de los genes de estas tres proteínas se ha determinado que B-RAF debe ser la proteína más antigua de las tres y por tanto A-RAF y C-RAF derivan de ella (50). En cuanto a su expresión, C-RAF es una proteína bastante ubicua y se encuentra en la mayoría de tejidos y tipos celulares. En cambio, A-RAF y B-RAF se expresan principalmente en órganos urogenitales y tejido neuronal respectivamente y, aunque son detectables en otros tejidos, el nivel de expresión en ellos es mucho más bajo (43).

#### Estructura de las proteínas RAF

A-RAF es la más pequeña de las tres isoformas (aproximadamente 68 kDa) seguida de C-RAF (72-74 kDa). B-RAF es la más grande de las tres y sufre *splicing* alternativo, lo que da lugar a varias proteínas que oscilan entre 75 y 100 kDa (51,52).

Las tres isoformas presentan un alto grado de homología y comparten tres regiones altamente conservadas: las regiones CR1 y CR2, que forman parte de la subunidad reguladora en el extremo N-terminal, y la región CR3, que forma parte de la subunidad catalítica en el extremo C-terminal y es la que presenta mayor grado de homología en las tres isoformas. En la región CR1 se encuentran los dominios RBD (*Ras Binding Domain*) y CRD (*Cystein Rich Domain*), importantes para la activación mediada por Ras. En la región CR2, rica en residuos de serina y treonina, se encuentran algunos aminoácidos importantes para su regulación por fosforilación. En la región CR3 se encuentran el segmento de activación y el lazo catalítico, y junto al extremo N-terminal de CR3 está la Región Negativa (*N-region*) (figura 4).



**Figura 4. Estructura de proteínas RAF y sitios de fosforilación más importantes.** Las tres isoformas, A-RAF, B-RAF y CRAF comparten tres regiones conservadas: CR1 (verde oscuro), CR2 (verde claro) y CR3 (rojo). El dominio CR1 contiene el RBD y el CRD, y el CR3 contiene el segmento de activación. Sobre estos se indican los residuos más importantes en la regulación por fosforilación.

### Regulación de las proteínas RAF

A pesar del alto grado de homología entre las proteínas RAF, su regulación es diferente. La activación de RAF es un proceso muy complejo que comprende múltiples pasos, entre ellos el reclutamiento a la membrana por parte de Ras, dimerización u oligomerización, unión a otras proteínas y lípidos, fosforilación y cambios conformacionales (46).

#### Unión a Ras

La proteína Ras se encuentra anclada a la cara interna de la membrana celular a través de residuos de prenilo y farnesilo. La forma activa de la proteína Ras, Ras-GTP, se une al dominio N-terminal de RAF por interacción específica con los dominios RBD y CRD, lo que provoca la translocación de RAF a la membrana (53). Este parece ser un evento clave en el proceso de activación, aunque no es suficiente para activar RAF, ya que hacen falta otras modificaciones posteriores, las cuales estabilizan la forma activa de estas proteínas (54-56) (figura 5).

Todas las isoformas de Ras (H-Ras, N-Ras, K-Ras4A y K-Ras4B) activan a las proteínas RAF, pero la eficiencia con que se unen al RBD es diferente: K-Ras es la isoforma más efectiva, seguida de N-Ras y por último de H-Ras (57,58). La localización subcelular de

Ras también influye en la activación de RAF (59), ya que Ras se puede encontrar anclada a la membrana en microdominios diferentes dependiendo de los residuos prenilo y farnesilo por los que haya sido modificada (60-62).

La habilidad de Ras para unirse a RAF también depende de otras proteínas reguladoras como las proteínas adaptadoras 14-3-3 (63). Estas proteínas se unen a C-RAF en la S259 fosforilada, de tal forma que existe un impedimento estérico para la unión de Ras (64,65). Se ha descrito que Ras es capaz de romper la interacción entre las proteínas RAF y 14-3-3 *in vitro* (66,67), aunque *in vivo*, necesita la colaboración de la fosfatasa PP2A, que se encarga de desfosforilar la S259, permitiendo la unión de Ras a RAF (68-70) (figura 5).

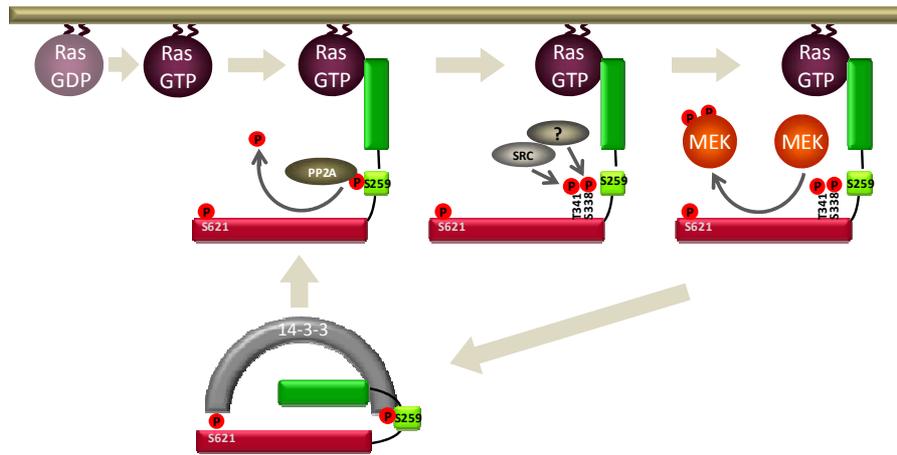
### Fosforilación

Una vez que RAF se encuentra en la membrana tienen lugar eventos de fosforilación y desfosforilación que dan lugar a una conformación de RAF activa.

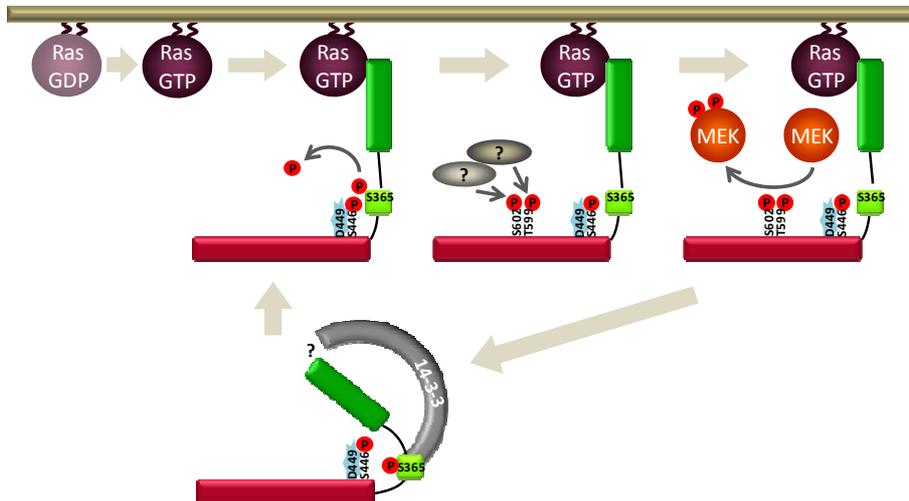
La regulación de las proteínas RAF por fosforilación es diferente según la isoforma de la que se trate. La regulación de A-RAF se supone muy similar a la de C-RAF por el alto grado de conservación de los residuos fosforilables más importantes; sin embargo, existen diferencias cruciales en la regulación de C-RAF y B-RAF. El modelo más aceptado de regulación por fosforilación para C-RAF y B-RAF destaca los siguientes residuos susceptibles de fosforilación:

- En primer lugar, un evento crucial en la activación de C-RAF es la fosforilación de la **S338** y la **Y341**, situadas en la Región Negativa, junto al extremo N-terminal de CR3 (71-74). La fosforilación de Y341 parece estar mediada por quinasas de la familia SRC en la membrana plasmática (72,73,75-78). En cambio, existe cierto desacuerdo sobre la quinasa responsable de la fosforilación de S338. En un principio se propuso que las proteínas PAKs eran las quinasas responsables de la fosforilación de la S338 de forma dependiente de Rac/Cdc42 y PI3K (71,79,80), pero parece que esto es cierto solo *in vitro*, ya que la fosforilación de S338 se da en la membrana de forma dependiente de Ras, mientras que la fosforilación por PAK se produce en el citosol de forma independiente de Ras (71,80,81). Además, la fosforilación de la S338 de C-RAF, inducida por activación de Ras tras tratamiento con factores de crecimiento, no se ve bloqueada por dominantes negativos de PAK y Cdc42 (81), ni por inhibición de PI3K (81) (figura 5A).

A) Modelo de activación de C-RAF.



B) Modelo de activación de B-RAF.



**Figura 5. Modelos de activación de C-RAF y B-RAF.** A) En células sin activar, C-RAF permanece en el citoplasma en una conformación cerrada por unión a 14-3-3. Tras la activación de Ras, se transloca a la membrana donde se producen modificaciones en los residuos fosforilables que dan lugar a la isoforma activa. B) Análogo a C-RAF, en células sin estimular, B-RAF se encuentra en el citoplasma en una conformación semicerrada por unión a 14-3-3. Tras la activación de Ras, se transloca a la membrana donde se producen fosforilaciones y desfosforilaciones que dan lugar a la proteína activa. Modificado de Mercer y Pritchard, 2003 (43).

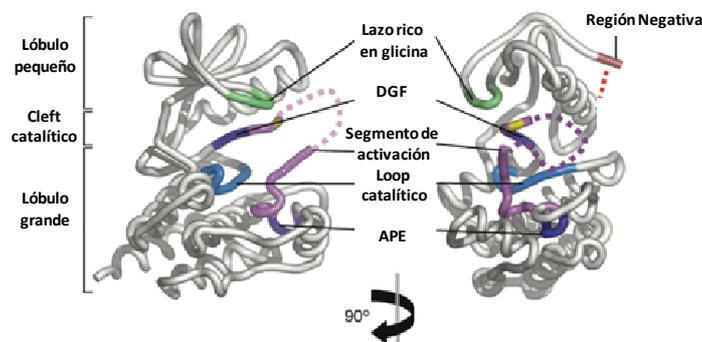
En el caso de B-RAF la fosforilación de la Región Negativa no es necesaria. En esta isoforma, la Y341 de C-RAF se corresponde con un ácido aspártico (**D449**), que mimetiza la carga negativa del fosfato; y la **S446** (equivalente a la S338), aunque sí está conservada, se encuentra fosforilada de forma constitutiva (74). Por ello, mientras que A-RAF y C-RAF para ser activadas requieren a SRC y la quinasa de S338, B-RAF tiene la región negativa cargada constitutivamente y solo necesita ser reclutada a la membrana por Ras (75), siendo más sencilla y rápida su activación. Debido a esto la actividad basal de B-RAF es muy elevada en comparación con la de C-RAF (74,75) (figura 5B).

- La fosforilación de los residuos **T599** y **S602** del segmento de activación de B-RAF es esencial para la activación de estas proteínas. Dicho proceso se da en respuesta a Ras oncogénico y su substitución por una valina da lugar a una quinasa inactiva (82). En C-RAF, los residuos correspondientes, **T491** y **S494**, están conservados, pero existen pocos datos que confirmen su importancia (83).
- En C-RAF, la fosforilación de la **S43** por PKA (*Protein Kinase A*) produce un impedimento estérico que evita la asociación de Ras con C-RAF (84,85).
- Por último, los residuos **S233**, **S259** y **S621** de C-RAF fosforilados forman sitios de unión para 14-3-3 (86,87). La unión de 14-3-3 a estos residuos da lugar a una conformación de C-RAF cerrada e inactiva y Ras no tiene acceso al RBD ni al CRD (46,63,86,88-90). Los tres residuos son fosforilados por PKA (46,91), pero la S259 también puede fosforilarse por AKT (92). Mientras que para la activación de C-RAF por Ras es necesaria la desfosforilación de la S259 por parte de Ras-GTP y PP2A (70), la S621 permanece fosforilada en la conformación activa (73) pero no se sabe aún si la fosforilación de este residuo está regulada o no (46). La unión de 14-3-3 a este residuo fosforilado es esencial para la activación de C-RAF, aunque no se conoce aún la función que tiene en el proceso de activación de C-RAF (65,69,86,87). Una posibilidad es que la proteína 14-3-3 participe en el proceso de dimerización u oligomerización de C-RAF (93). Por otra parte, se ha demostrado que C-RAF se autofosforila en la S621 para asegurarse la estabilidad mediante un correcto plegamiento y evitar la degradación por el proteasoma (94).

En el caso de B-RAF, los residuos S259 y S621 están conservados (**S365** y **S729**) y ambos forman un sitio de unión para 14-3-3. La S365 también parece regular negativamente a B-RAF (43). Sin embargo, en contraste con C-RAF, el

residuo S729 no está implicado en la inactivación de B-RAF ya que, debido al impedimento estérico que producen la S446 y el D449, B-RAF tiene una conformación más abierta en el citoplasma (43).

Por otra parte, la resolución del cristal del dominio quinasa de B-RAF por Wang y colaboradores (95) añadió nuevos datos sobre su estructura y la importancia de determinados residuos en la regulación de esta proteína. Es importante destacar que el cristal se obtuvo por interacción con una molécula del inhibidor de RAF BAY 43-9006, que induce una conformación inactiva de B-RAF, pero que no tiene porque ser exactamente igual a la conformación inactiva nativa de B-RAF (figura 6).



**Figura 6. Estructura del dominio quinasa de B-RAF.** Se indican el lóbulo pequeño, el lóbulo grande y el surco catalítico y en color: la Región N (marrón), el lazo rico en glicina (verde), el lazo catalítico (azul) y el segmento de activación (lila). Modificado de Garnett y Marais, 2004 (47).

En el cristal se observó que el dominio catalítico de B-RAF adopta la estructura típica de las quinasas, con un lóbulo pequeño separado de uno grande por una hendidura catalítica o bolsillo catalítico. Sin embargo, presenta una peculiaridad para las quinasas: existe una interacción hidrofóbica entre el lazo rico en glicina, responsable de la unión al ATP, (aminoácidos 459-471) y el segmento de activación (aminoácidos 578-623), de tal forma que B-RAF queda en una conformación inactiva. Como se comentó anteriormente, la fosforilación del segmento de activación en el residuo T599 es esencial para la activación de B-RAF ya que se encuentra en la superficie de

esta interacción hidrofóbica, de tal forma que cuando se fosforila se supone que se rompe esta interacción, permitiendo que el lazo catalítico adopte la conformación activa (95). Esto se comprobó porque cuando se sustituye este aminoácido por una isoleucina, B-RAF se activa fuertemente, probablemente porque la cadena lateral de la isoleucina rompe la interacción entre el lazo rico en glicina y el segmento de activación (95,96); sin embargo, si se sustituye por una alanina, de forma que se impide su fosforilación, B-RAF no puede activarse (82). Presumiblemente, la fosforilación de los residuos correspondientes en A-RAF y C-RAF regularán a estas quinasas de la misma forma. Esto explica por qué la fosforilación del segmento de activación es tan importante en la activación de las proteínas RAF. Además, como se puede ver en la estructura obtenida del cristal, la carga en la Región Negativa probablemente estabilice el lóbulo pequeño de estas proteínas.

#### Homodimerización y heterodimerización de las proteínas RAF

Además de tener funciones biológicas propias, los miembros de la familia RAF proporcionan una flexibilidad adicional para la activación de la vía MEK-ERK mediante la formación de homodímeros y heterodímeros. Así, en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento y a la activación de Ras, C-RAF y B-RAF forman heterodímeros, cuya actividad MEK quinasa es más alta que la de los respectivos monómeros u homodímeros (93,97,98). La importancia de la formación del heterodímero para la activación de C-RAF se ha descubierto recientemente por un estudio que muestra que la forma activa del dominio catalítico de C-RAF es una parte del dímero, y que las mutaciones de B-RAF que favorecen la formación del dímero aumentan la actividad catalítica de C-RAF (99,100).

#### Unión a otras proteínas

La regulación de las proteínas RAF también está mediada por interacciones proteína-proteína, entre las cuales cabe destacar las siguientes:

- La asociación con proteínas chaperonas como Hsp-90/p50(cdc37) (101,102) y Hsp/HSC-70 (103), que confieren estabilidad a los distintos miembros de la familia RAF.
- La unión de RAF a proteínas adaptadoras formando complejos multiproteicos, que regulan positiva o negativamente a las proteínas RAF, según la proteína adaptadora de la que se trate. Entre éstas se encuentran las proteínas 14-3-3, la proteína RKIP (*RAF Kinase Inhibitor Protein*) (104,105), la proteína KSR (106,107), y la proteína MP1 (108).

En concreto, RKIP es un miembro de un grupo de proteínas llamadas PEBP (*PhosphatidilEthanolamin Binding Protein*). Fue identificada por primera vez como una proteína que interacciona con C-RAF, regulando negativamente la activación de la vía MEK-ERK iniciada por esta quinasa (104). Posteriormente, también se ha demostrado que RKIP antagoniza con la función de B-RAF (105). Estudios funcionales en los que se utilizan mutantes con ganancia o pérdida de función demostraron que RKIP interrumpe la interacción entre C-RAF y B-RAF con MEK1/2, resultando en una disminución de la fosforilación de ésta última (105). Sin embargo, aunque los mecanismos implicados en esta regulación no se conocen en detalle, la utilización de *siRNA* para investigar el papel de la proteína RKIP endógena ha demostrado que ésta bloquea la activación de C-RAF al impedir su fosforilación en S338 y Y341, eventos necesarios para la activación de C-RAF, pero que no afecta directamente a la actividad de B-RAF (109). El papel de RKIP en la señalización por B-RAF podría ser indirecto, afectando a la función de C-RAF y la formación de dímeros C-RAF:B-RAF, aunque la eliminación de RKIP aumenta la actividad de MEK inducida por B-RAF en células MEFs C-RAF<sup>-/-</sup>, lo que sugiere que RKIP puede regular B-RAF de forma independiente de C-RAF (110).

Por otra parte, también se ha observado que RKIP se une e inhibe a GRK2 (*G-Protein Coupled Receptor Kinase 2*), potenciando la señalización por este tipo de receptores (111), e inhibe la activación de NF- $\kappa$ B (112,113).

Estas funciones hacen que también se le haya asignado un papel en cáncer a RKIP. Se ha demostrado que los niveles de expresión de RKIP son inferiores en células de carcinoma de próstata, mama, colorrectal, tiroides y melanoma (114-116) y que su reexpresión en células tumorales y tumores xenotransplantados disminuye la migración y la capacidad metastásica de estas células (116). Estas diferencias en la expresión de RKIP se correlacionan con cambios en la actividad de C-RAF y ERK1/2, demostrando el papel modulador que tiene esta proteína sobre esta vía (116).

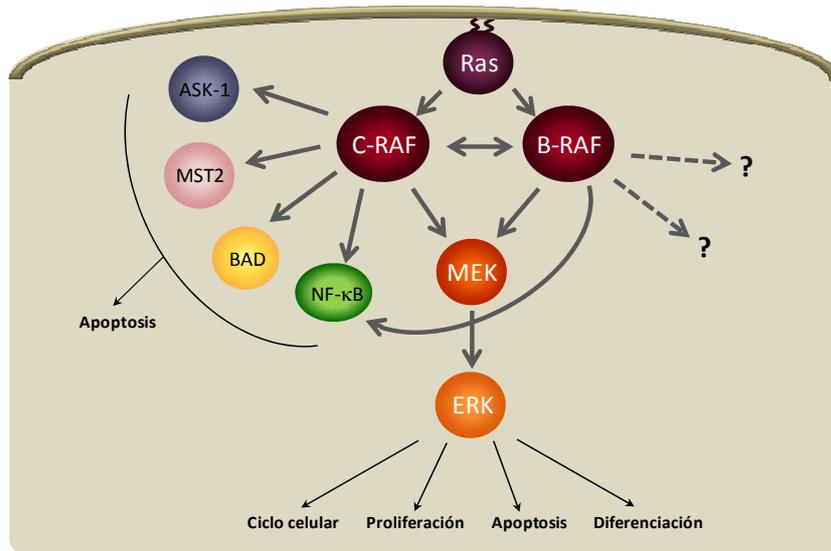
### **Funciones de las proteínas RAF**

Aunque la mayor parte de las funciones fisiológicas asignadas a las proteínas RAF en proliferación, supervivencia y diferenciación, se relacionaron con su capacidad de activar la vía MEK-ERK, el descubrimiento de formas mutadas oncogénicas de B-RAF en distintos tipos de tumores humanos y diferentes estudios en ratones *knock out*

para cada una de estas isoformas están ayudando a comprender mejor las funciones específicas de cada una de las distintas proteínas RAF en estos procesos.

Todas las isoformas de RAF son capaces de activar a MEK *in vitro* (75), pero B-RAF la activa de forma más eficiente que A-RAF y C-RAF (75,117). Una versión inducible de B-RAF estimula más, y más rápido la actividad de ERK que versiones semejantes de A-RAF y C-RAF (118). Además, estudios con fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) han demostrado que células MEFs derivadas de ratones mutantes *b-raf*<sup>-/-</sup> muestran un defecto en la estimulación de ERK por distintos agonistas (119), mientras que ni las células MEFs C-RAF<sup>-/-</sup> ni las MEFs A-RAF<sup>-/-</sup> presentan defectos en la activación de ERK por distintos factores de crecimiento (120,121). En cuanto a A-RAF, estudios realizados en MEFs y células primarias embrionarias deficientes en esta proteína demostraron que ninguno de los procesos de proliferación, diferenciación, apoptosis, activación de ERK y transformación por Ras oncogénico estaba desregulado. Esto implica que A-RAF no tiene un papel importante en la activación de MEK-ERK, ya sea porque su función es completamente compensada por las otras isoformas de RAF, o porque su papel es altamente específico de algún tejido (121). Todos estos estudios demuestran que B-RAF es el principal activador de la vía MEK-ERK, y que tanto C-RAF como A-RAF tienen funciones diferentes e independientes de esta vía.

Por otra parte, en la última década se han identificado algunas funciones de RAF independientes de su actividad quinasa y de la vía MEK-ERK. Aunque algunos de los efectores descritos son compartidos por las proteínas RAF, la mayoría se han descrito para C-RAF. Entre ellos hay proteínas implicadas en el proceso de apoptosis como BAD, ASK-1 y MST-2, proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular como retinoblastoma (Rb) y Cdc25, proteínas implicadas en la organización del citoesqueleto como Vimentina, Roka y keratina 8, y proteínas implicadas en la supervivencia celular como BAG1 y NF- $\kappa$ B (122). En el caso de NF- $\kappa$ B, B-RAF también parece ser capaz de activar este factor de transcripción, ya que mutantes activos de B-RAF son capaces de activar NF- $\kappa$ B (96,123) (figura 7).



**Figura 7. Efectores de B-RAF y C-RAF.** Se esquematizan los distintos efectores de B-RAF y C-RAF y las respuestas celulares mediadas por éstas.

#### Papel de B-RAF y C-RAF en proliferación

Las proteínas B-RAF y C-RAF están implicadas en el proceso de proliferación como mediadoras de la activación de la vía MEK-ERK en respuesta a la activación de Ras por factores de crecimiento o por mutaciones oncogénicas de la misma. En este sentido, se ha demostrado que los ratones transgénicos en los que se expresan formas activas de B-RAF o C-RAF manifiestan trastornos hiperproliferativos (47,124-126). Sin embargo, células MEFs C-RAF<sup>-/-</sup> immortalizadas no presentan defectos en la activación de ERK ni en proliferación (120) y la ausencia de C-RAF en estas células no es suficiente para prevenir la transformación inducida por Ha-Ras oncogénico (121). Este papel en proliferación está ligado a la progresión del ciclo celular de G1 a S a través de la expresión de genes tempranos como *c-fos*, la inducción de ciclina D y la consecuente fosforilación de Rb (127,128).

#### Papel de B-RAF y C-RAF en supervivencia celular

Además de su papel en la proliferación celular, a B-RAF y C-RAF se les ha asignado una función antiapoptótica. Se ha demostrado que los ratones a los que se les elimina el gen *b-raf* mueren durante el desarrollo embrionario debido a una ruptura vascular

causada por un aumento de la apoptosis de las células endoteliales y defectos en la hematopoyesis (129). Por otra parte, los ratones *c-raf*<sup>-/-</sup> también mueren durante la embriogénesis, en este caso por un aumento generalizado de la apoptosis celular en todos los tejidos y anomalías en vasculogénesis y hematopoyesis (120). Además, fibroblastos embrionarios de estos ratones son más sensibles a morir por apoptosis cuando se incuban en presencia de un agente proapoptótico (120).

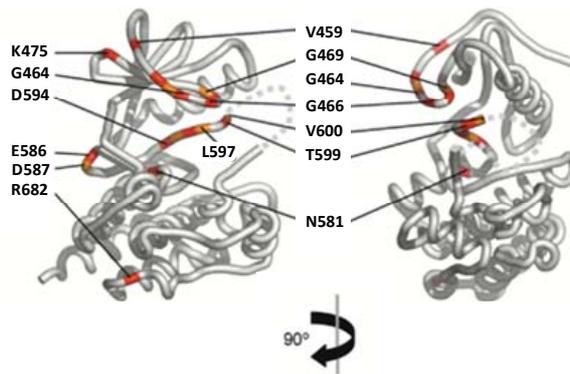
En cuanto a la función antiapoptótica de C-RAF, se ha observado que esta isoforma juega un papel fundamental en la protección frente a la apoptosis a través de un mecanismo independiente de su actividad MEK quinasa, actuando como una proteína adaptadora (120). Esto se demostró mediante la generación de ratones *knock in* que contienen una mutación en el gen *c-raf* que codifica para una proteína C-RAF que carece de actividad quinasa y es incapaz de activar MEK (120). Estos ratones, al contrario de los *c-raf*<sup>-/-</sup>, se desarrollan normalmente, son fértiles y alcanzan la vida media esperada. Sin embargo, las vías de señalización implicadas en los efectos antiapoptóticos de C-RAF no están totalmente definidas. Hay numerosas propuestas sobre cómo C-RAF participa en la prevención de muerte celular por apoptosis, por ejemplo, por regulación de la activación del factor de transcripción NF-κB (112,130,131), por interconexión entre la vía de C-RAF-MEK-ERK y la vía PI3K-AKT, ya que C-RAF activa PI3K en células mieloides y requiere de AKT para prevenir apoptosis a través de la inhibición de BAD (132,133), o también por un mecanismo independiente de su actividad quinasa, a través de la interacción física y funcional de C-RAF con la quinasa proapoptótica ASK1 (*Apoptosis Signal-regulating Kinase 1*) (134) y MST2 (135).

Aunque la función antiapoptótica de B-RAF no ha sido tan estudiada, parece que ésta debe ser diferente de la de C-RAF, ya que los efectores que median la función antiapoptótica de C-RAF no son activados por B-RAF, pues esta proteína está activa en células C-RAF<sup>-/-</sup> y no compensa la falta de C-RAF; y viceversa, en células B-RAF<sup>-/-</sup>, C-RAF no puede compensar la falta de B-RAF para prevenir la apoptosis que se produce en ausencia de esta proteína. Además, se ha descrito que el mecanismo por el que B-RAF previene la apoptosis celular en fibroblastos es a través de la activación de la vía MEK-ERK, impidiendo la activación de caspasas y la liberación del citocromo c de la mitocondria (136). Este efecto podría ser mediado por las IAPs, ya que en células de ratones *b-raf*<sup>-/-</sup> hay una disminución en la expresión de estas proteínas (137).

Papel de B-RAF en transformación

Las proteínas RAF solo se consideraban importantes en carcinogénesis por su posición debajo de Ras, sin embargo, esta idea cambió al descubrirse que existen mutaciones oncogénicas de B-RAF en el 10-20 % de cánceres humanos (47-49). Sin embargo las mutaciones de C-RAF en cáncer son raras y solo aparecen con una frecuencia de 1 % (138), y no se han encontrado mutaciones en A-RAF (139). Concretamente se ha encontrado B-RAF mutado en el 30-60 % de melanomas, 30-50 % de tumores tiroideos, 5-20 % de cánceres colorectales, 30-40 % de cánceres de ovario y en menor porcentaje (1-3 %) en otros tipos de cáncer (48,49).

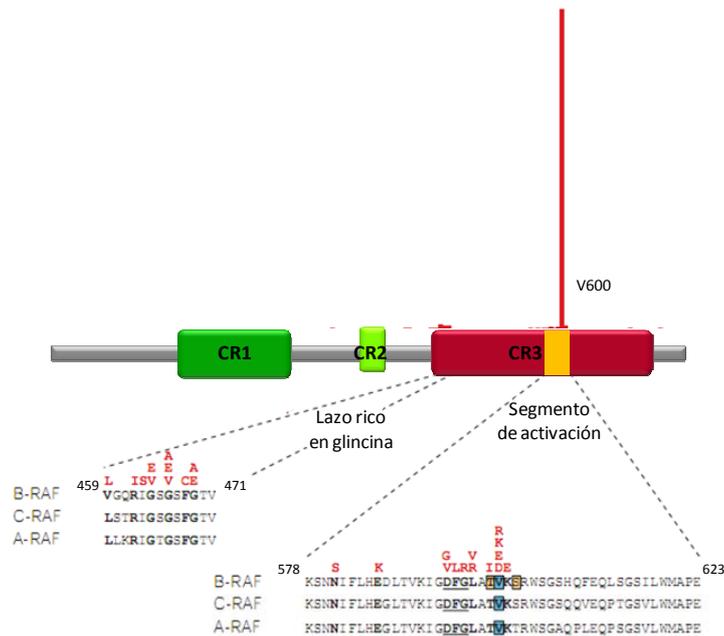
En total se han descrito unas 100 mutaciones para B-RAF (99). La mayoría de ellas son mutaciones activadoras y se encuentran situadas alrededor del lazo rico en glicina y del segmento de activación (95) (figura 8). Esto es debido a que, como se ha comentado anteriormente, la estructura de B-RAF ha puesto de manifiesto una interacción intramolecular entre el lazo rico en glicina y el segmento de activación que mantiene B-RAF inactivo, de forma que fosforilaciones o sustituciones de aminoácidos dentro de este segmento rompen dicha interacción intramolecular y producen la activación de B-RAF (95).



**Figura 8. Residuos mutados en el dominio catalítico de B-RAF.** Estructura del dominio quinasa de B-RAF con las mutaciones más importantes encontradas en cáncer. Dichos residuos están coloreados alternativamente en rojo y naranja para mayor claridad. Modificado de Garnett y Marais, 2004 (47).

De todas las mutaciones encontradas existe una predominante: el cambio del nucleótido 1799 de timidina a adenosina, convirtiendo la valina 600 del segmento de activación en un glutamato (V600E) (49). Esta mutación representa aproximadamente el 90 % de las mutaciones encontradas para B-RAF en melanoma y cáncer de tiroides,

lo que convierte a  $V600E$ -RAF en el mutante más importante de todos los encontrados (49) (figura 9).



**Figura 9. Mutaciones del dominio catalítico de B-RAF asociadas a cáncer y su incidencia.** Las posiciones de las mutaciones que tienen lugar en cáncer humano están indicadas sobre la estructura. La longitud de las barras rojas indican la frecuencia relativa con que se producen dichas mutaciones. Los aminoácidos por los que se sustituyen se indican en rojo sobre la secuencia. Modificado de Wellbrock y otros, 2004 (46).

$V600E$ -RAF es uno de los mutantes con mayor actividad; su actividad quinasa *in vitro* es 500 veces mayor que la de B-RAF silvestre (95). Es capaz de estimular constitutivamente la actividad de ERK, inducir proliferación y transformación en células NIH3T3 y melanocitos murinos, y permite a estas células crecer como tumores en ratones inmunodeprimidos (46,49,95,96,123,140). Además, la inhibición de  $V600E$ -RAF en células de melanoma disminuye la proliferación de estas células, aumenta la apoptosis basal e impide la formación de tumores xenotransplantados (141), por lo tanto, todos estos datos demuestran que  $V600E$ -RAF es un oncogén. Sin embargo,  $V600E$ -RAF no es el único mutante de B-RAF con capacidad transformante. Muchos de los otros mutantes encontrados también son capaces de transformar células, como L597V, G466A, G469A y G464V, entre otros. El caso más sorprendente es el de los mutantes que tienen menor actividad quinasa que B-RAF silvestre, como D594V, y

aún así son capaces de activar MEK-ERK por un mecanismo dependiente de C-RAF (95). Una posible explicación es que estos mutantes adoptan la conformación activa, pero no son capaces de fosforilar MEK porque las mutaciones que tienen producen un impedimento estérico. Sin embargo, éstos son capaces de formar heterodímeros con C-RAF, activando a esta última, de forma que C-RAF se encarga de transmitir la señal a MEK-ERK (95,98).

Por último, también existen otras mutaciones activadoras que implican a residuos situados en otras partes de la proteína y no forman parte de la interacción entre el lazo rico en glicina y el segmento de activación. Posiblemente sean residuos implicados en las interacciones intramoleculares entre el extremo N-terminal y el dominio catalítico que mantienen a B-RAF en una conformación inactiva, o interacciones con otras proteínas, como proteínas inhibitorias (46) (figura 8).

En cuanto a A-RAF y C-RAF, apenas se han descrito mutaciones en tumores humanos, aunque la mayoría de las 45 mutaciones encontradas en B-RAF se dan sobre aminoácidos conservados en A-RAF y C-RAF. Sin embargo, al introducir las mutaciones más frecuentes de B-RAF en C-RAF su actividad apenas aumenta (142). Esto puede tener su explicación en la constante carga negativa de la Región Negativa de B-RAF que le confiere una elevada actividad basal respecto a las otras isoformas; de manera que simples mutaciones puntuales estimulan enormemente la actividad de esta isoforma. De esta forma, las células que contienen la proteína B-RAF oncogénica están desreguladas y adquieren capacidad para progresar hacia un estado maligno, mientras que A-RAF y C-RAF requieren más eventos para activarse y una mutación puntual no es suficiente. Así, aunque dichas mutaciones tuvieran lugar, éstas no supondrían una ventaja adaptativa para las células, que condujera a su transformación.

## 1.2. IMPLICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RAF EN CÁNCER

La habilidad tumorigénica de B-RAF se ha demostrado tanto en estudios con células *in vitro*, como en tumores humanos. La expresión de <sup>V600E</sup>B-RAF en melanocitos y células tiroideas de rata aumenta la proliferación e invasividad de estas células (46,143-145) y la eliminación de su expresión en líneas celulares derivadas de melanoma y tumores papilares tiroideos (PTCs) humanos inhibe la proliferación, previene la transformación e inhibe el crecimiento de tumores xenotransplantados en ratones (141,146). La presencia de la mutación <sup>V600E</sup>B-RAF también confiere a las células que la poseen resistencia a morir por apoptosis. Así, células de melanoma con

<sup>V600E</sup>B-RAF sufren arresto del ciclo en G1 y apoptosis al silenciar la expresión de B-RAF o inhibir la vía MEK-ERK (141), además de sensibilizar estas células a sufrir anoikis (147). En células de cáncer colorrectal se observan efectos similares cuando se someten a la retirada de suero combinado con la inhibición de MEK (148,149). Sin embargo, en líneas celulares de cáncer tiroides, la inhibición de la vía ERK1/2 no siempre produce apoptosis (150,151). Por otra parte, <sup>V600E</sup>B-RAF ejerce protección contra la apoptosis inducida por cisplatino, actinomicina-D o daunorubicina en células de melanoma (152).

Además de inducir proliferación y supervivencia, <sup>V600E</sup>B-RAF también desempeña un papel importante en la invasión tumoral y en las interacciones con el estroma, en la promoción de la angiogénesis y en la creación de un microambiente inmunológico privilegiado. <sup>V600E</sup>B-RAF aumenta la expresión de varias proteínas que regulan la migración celular, tales como Rdn3, PlexinB1 o Minerva/FAM129B, favoreciendo el anclaje y la metástasis de células de melanoma (153-156). Además, <sup>V600E</sup>B-RAF modifica el ambiente tumoral induciendo la expresión de los factores angiogénicos HIF-1 y VEGF (157,158), así como la sobreexpresión de IL-8 e IL-10 en numerosas líneas celulares tumorales (159). En cuanto al cáncer de tiroides, varios estudios han mostrado que <sup>V600E</sup>B-RAF aumenta la expresión del receptor para el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR), de algunas metaloproteasas como MMP3 o del receptor tirosina quinasa c-Met (146), todas ellas moléculas relacionadas con la invasión y metástasis de cánceres humanos. Por otra parte, recientemente, se ha encontrado que la fosforilación de LKB1 por la vía <sup>V600E</sup>B-RAF-ERK tiene efectos importantes en la generación de los tumores, mediante la señalización por mTOR y la continuación de la síntesis de proteínas en condiciones de estrés metabólico, como las encontradas por el desarrollo de tumores (160). Estos efectos son revertidos por silenciamiento del gen de B-RAF y por la inhibición química de MEK y, por lo tanto, éstos son mediados por la vía MEK-ERK (156,161).

Sin embargo, a pesar de que se ha demostrado que la expresión de <sup>V600E</sup>B-RAF aumenta la proliferación y la transformación celular, también se ha observado que tanto la presencia de esta mutación como niveles altos de activación de la vía MEK-ERK fomentan la senescencia, en lugar de la proliferación (162,163). En consonancia con estos datos, <sup>V600E</sup>B-RAF se encuentra con frecuencia en hiperplasia benigna melanocítica (nevus), lesiones cuyas células tienen detenido el crecimiento y se encuentran en un estado similar al de senescencia (164-166). Esta senescencia inducida por <sup>V600E</sup>B-RAF puede ser contrarrestada por cooperación con otros mecanismos, entre los que encontramos la pérdida de supresores de tumores, en

particular, p16INK4a, p53 y PTEN (164-166), y la sobreexpresión de protooncogenes como el c-myc (167) o, en células de carcinoma colorrectal, Rac1b (168). Además, AKT3, que se encuentra activada en muchos melanomas, también puede cooperar con <sup>V600E</sup>B-RAF fosforilándola y disminuyendo su actividad a un nivel que promueve la proliferación en lugar de la senescencia (169). Por último, la dimerización con C-RAF también podría ser un mecanismo adicional para modular la activación de ERK inducida por <sup>V600E</sup>B-RAF y mantenerla a un nivel tolerable, de forma que no se produzcan ni senescencia ni apoptosis. En apoyo de esta idea, la proporción C-RAF:B-RAF está reducida en las células de melanoma humano (170). Por lo tanto, la heterodimerización de mutantes de B-RAF asociados a tumores con C-RAF endógeno es una espada de doble filo, y el resultado depende de la naturaleza de la mutación en B-RAF.

El papel oncogénico de la mutación <sup>V600E</sup>B-RAF también se ha confirmado *in vivo* utilizando cepas de ratones *knock in* que expresan <sup>V600E</sup>B-RAF de forma condicional. Así, los datos de Dhomen y colaboradores (cols.), demuestran que, en ratones en los que la expresión de <sup>V600E</sup>B-RAF se restringe a melanocitos, el 70 % de ellos desarrollan melanoma de forma espontánea, con características de invasividad (171). Sin embargo, otros autores han demostrado que es necesaria la presencia de otra mutación para que <sup>V600E</sup>B-RAF ejerza su función oncogénica, por ejemplo, la expresión de esta forma mutante de B-RAF induce adenomas benignos de pulmón y solo la eliminación conjunta de p53 o p16INK4a/p19ARF promueve la progresión del tumor a adenocarcinoma (172). También se ha demostrado que <sup>V600E</sup>B-RAF sólo induce nevus benigno en ratones a menos que se silencie la expresión de PTEN o p16INK4a, en cuyo caso los melanocitos se convierten en células tumorales con características invasoras y se produce metástasis en ganglios linfáticos y pulmón (166), demostrando que existe una cooperación entre la activación de la vía de ERK y la de AKT, mediante la ausencia de PTEN, y la supresión genómica de p16INK4a, como mecanismo para evitar la posible senescencia y apoptosis inducida por <sup>V600E</sup>B-RAF (173). Además, los ratones transgénicos que expresan la forma oncogénica <sup>V600E</sup>B-RAF en la glándula tiroidea desarrollan PTC y muestran invasión de estas células en los vasos sanguíneos y tejidos adyacentes (174). De igual forma, en PTCs humanos que poseen esta mutación existe una estrecha relación entre B-RAF mutado y la progresión a estados avanzados del tumor, invasión extratiroidea y metástasis en nódulos linfáticos (146). En este sentido, también se ha visto que la eliminación de la expresión de <sup>V600E</sup>B-RAF o su inhibición química, conduce al estancamiento o la regresión de tumores derivados de pacientes y tumores xenotransplantados de líneas de celulares tumorales que expresan <sup>V600E</sup>B-RAF (175,176).

## 2. VÍA PI3K-AKT-mTOR

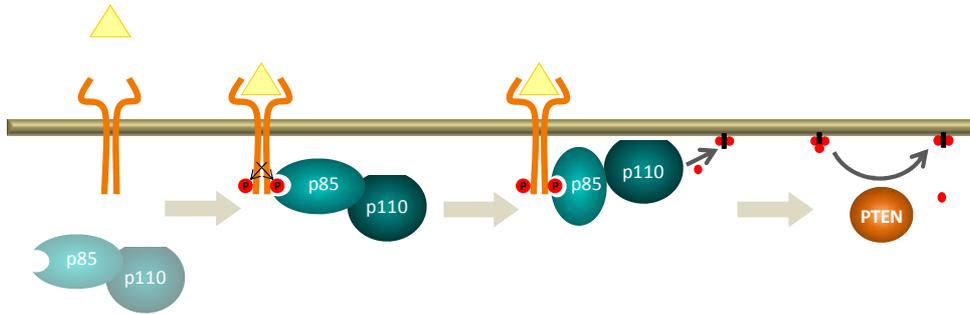
### 2.1. ACCIONES Y SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR LA VÍA DE PI3K-AKT-mTOR

#### PI3K

Las proteínas PI3K (*Phosphatidylinositol-3-Kinase*) forman una familia de enzimas capaces de fosforilar el grupo 3-OH del anillo de inositol del fosfoinositol (PI) y generar fosfatidilinositoles (PtdIns) PI(3)P, PI(3,4)P2 y PI(3,4,5)P3, a los que deben su nombre (177). La familia de PI3K está dividida en 3 clases diferentes: la clase I (subdividida a su vez en IA y IB), la clase II y la clase III. La clasificación está basada en su estructura primaria, su regulación y su diferente especificidad *in vitro* por los lípidos sustrato (178). De todas, solo la clase IA ha sido vinculada a la carcinogénesis (179).

Las proteínas PI3K son heterodímeros formados por una subunidad reguladora y otra catalítica. La clase IA presenta cinco isoformas de la subunidad reguladora: p85 $\alpha$ , p55 $\alpha$ , p50 $\alpha$ , p85 $\beta$  y p85 $\gamma$ . La subunidad mejor estudiada es p85 $\alpha$ . Ésta contiene dos dominios SH2 a través de los cuales se une a residuos de fosfotirosina de receptores tirosina quinasa. Además, posee un dominio situado entre los dominios SH2 al que se une constitutivamente la subunidad catalítica p110. Por último, tiene un dominio SH3 y un dominio BCR que sirven para regular negativamente a la subunidad p110. La subunidad catalítica p110 también tiene diferentes isoformas: p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  y p100 $\gamma$ . Las tres tienen la misma estructura básica, que incluye varios dominios responsables de la interacción con p85 y Ras, un dominio C2, importante en el anclaje a la membrana, y el dominio catalítico quinasa (180).

El complejo p85:p110, en ausencia de señales, se encuentra inactivo en el citoplasma. Su activación comienza por la unión del ligando apropiado a un RTK, que da lugar a la transfosforilación de su dominio citoplásmico. Seguidamente, el dímero p85:p110 se une al receptor a través del dominio SH2 de p85. Una vez que el complejo se une a los residuos de fosfotirosina, p85 sufre cambios conformacionales que implican a los dominios SH3 y BCR de forma que dejan de regular negativamente a p110 (181). Así, p110 activa se sitúa junto a sus sustratos lipídicos en la membrana celular (figura 10). En algún caso la interacción de p85 con el RTK es indirecta y se da a través de fosfoproteínas intermedias como IRS1/2 (*Insulin Receptor Substrates 1 y 2*). Los receptores RTKs también pueden activar a PI3K de forma indirecta, a través de Ras, la cual se une directamente a la subunidad catalítica p110, activándola, sin necesidad de la participación de la subunidad reguladora (182,183) (figura 10).



**Figura 10. Mecanismo de activación de PI3K.** Tras la activación del RTK por unión de su sustrato, se produce la transfosforilación en residuos de tirosina de los dominios citosólicos del mismo, la subunidad p85 de PI3K se une a dichos residuos de forma que se produce un cambio conformacional que activa la subunidad p110. La subunidad catalítica p110 transfiere un grupo fosfato a los PIP2 situados en la membrana. La fosfatasa PTEN revierte este proceso.

El principal sustrato *in vivo* de PI3K IA es PIP2 (PtdIns(4,5)P2), que es fosforilado y convertido en PIP3 (PtdIns (3,4,5)P3). Estos PIP3 actúan como segundos mensajeros y activan vías por debajo de ésta, como AKT y otras proteínas. En células de mamífero sin estimular los niveles de PIP3 son casi indetectables, debido a la fina regulación de PI3K y la acción de múltiples fosfatasas como PTEN, SHIP1 y SHIP2 (180). Estas fosfatasas se encargan de quitar los grupos fosfato de los PIP3 y así regulan negativamente los efectos de PI3K e impiden la activación de AKT.

## AKT

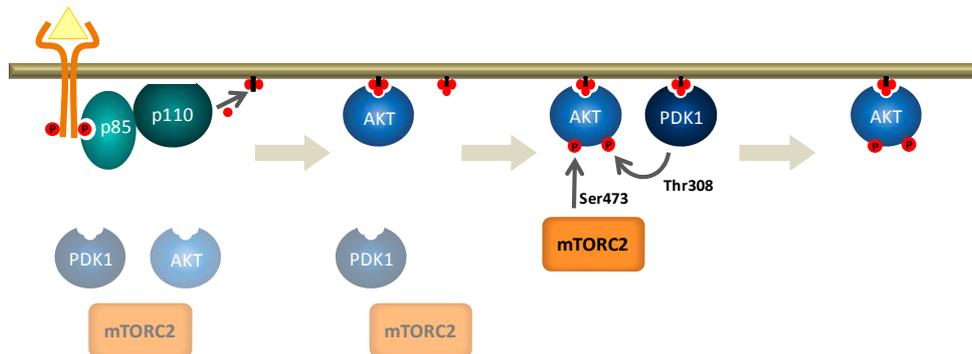
De todas las proteínas activadas por PI3K, la mejor caracterizada y más directamente implicada en cáncer es AKT. AKT es una familia de proteínas formada por 3 miembros: AKT1, AKT2 y AKT3, también conocidos como PKB $\alpha$ , PKB $\beta$  y PKB $\gamma$  (*Protein Kinase B  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$* ) o RAC-PK $\alpha$ , RAC-PK $\beta$  y RAC-PK $\gamma$  (*Related to A and C Kinases  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$* ). Existen algunas características específicas de cada isoforma, por ejemplo AKT1 está principalmente implicada en supervivencia, AKT2 en el transporte de glucosa y el papel de AKT3 es menos claro, pero parece que regula el crecimiento celular en cerebro.

La secuencia de las proteínas AKT tiene tres dominios principales (184):

- Un dominio PH (*Pleckstrin Homology*) en el extremo amino, que media las interacciones lípido-proteína y proteína-proteína.
- Un dominio catalítico central, con actividad serina/treonina quinasa.
- Un dominio regulador en el extremo carboxilo, que incluye un dominio hidrofóbico y rico en prolina.

La estructura primaria de AKT está evolutivamente conservada, con excepción del final del extremo carboxilo, que no existe en todas las especies e isoformas (185).

La regulación de la actividad de AKT comienza por translocación desde el citoplasma a la membrana plasmática. Los fosfoinosítidos generados por PI3K se sitúan en la cara interna de la membrana plasmática y AKT se une de forma directa a éstos a través de su dominio PH, situándose en la membrana (186-188). Este evento es crítico para la activación de AKT, ya que la relocalización en la membrana le confiere proximidad a las proteínas quinasas encargadas de fosforilarla y activarla, además de producir un cambio conformacional en AKT que facilita su fosforilación (185) (figura 11).



**Figura 11. Mecanismo de activación de AKT.** Una vez que PI3K genera PIP3, AKT se une a ellos a través de su dominio PH. A continuación es fosforilada en los residuos S473 y T308 por mTORC2 y PDK1 respectivamente, de forma que queda completamente activa.

AKT posee cuatro residuos susceptibles de fosforilación importantes para su activación *in vivo*: S124, T308, T450 y S473. Los residuos S124 y T450 están basalmente fosforilados, mientras que la fosforilación de los residuos T308 y S473 es inducida por estímulos extracelulares. Estudios de mutagénesis han revelado que se requiere la fosforilación de estos últimos para la activación completa de AKT (189). La T308 es fosforilada por la proteína serina/treonina quinasa PDK1 (*3-Phosphoinositide-Dependent Kinase-1*), que también contiene un dominio PH por el que se sitúa en la membrana (190). Este residuo se encuentra en el dominio quinasa y cuando no está fosforilado regula negativamente la actividad quinasa de AKT. Su fosforilación parece ser suficiente para la activación de AKT (191), sin embargo la activación máxima se alcanza tras la fosforilación de la Ser473 por PDK2 (192). La identidad de PDK2 no está clara, aunque la exploración del genoma humano ha revelado que no existen homólogos de PDK1, lo que indica que PDK2 pertenece a otra clase de quinasas. Existen numerosos candidatos que puedan mediar esta fosforilación *in vitro*, pero pocos son convincentes *in vivo*. Recientemente se ha propuesto que el complejo mTORC2 media la fosforilación de la S473 *in vivo* (193) (figura 11).

Entre los mecanismos de inactivación de AKT descritos hasta ahora se incluye la interacción directa entre AKT con CTMP (*Carboxi-Terminal Modulator Protein*) (194), que previene su fosforilación. También se ha propuesto su interacción con la chaperona Hsp90, que protege a AKT de la desfosforilación por PP2A (195). Recientemente se ha identificado la fosfatasa PHLPP que contiene un dominio PH y que desfosforila específicamente la S473 de AKT (196).

### **Efectos biológicos de la activación de PI3K-AKT**

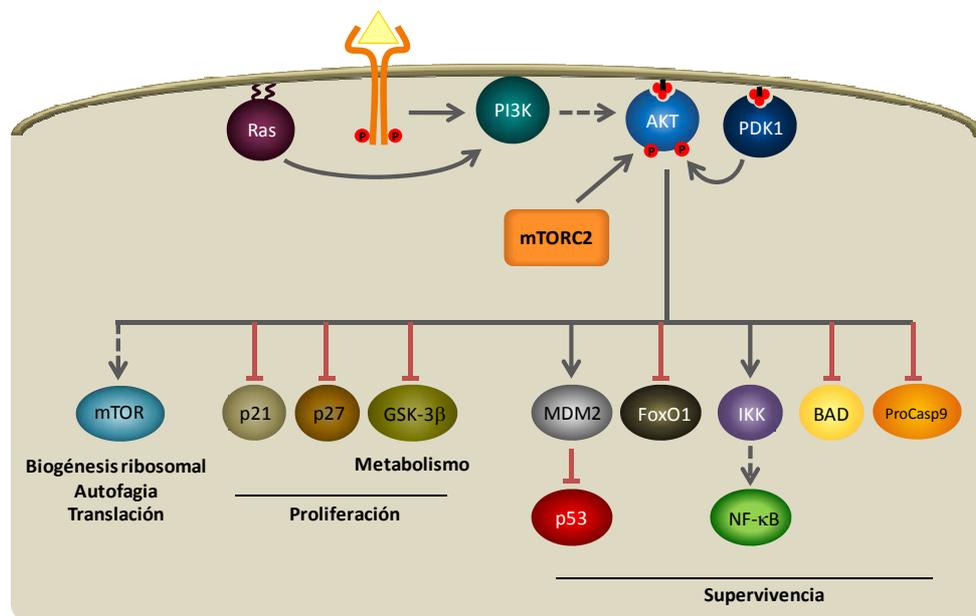
Una vez activo, AKT fosforila numerosos sustratos implicados en diversos procesos biológicos. De todos ellos, los más relevantes en carcinogénesis son la supervivencia, la proliferación y el crecimiento celulares (figura 12).

#### Supervivencia celular

El mecanismo por el que AKT protege a las células de la apoptosis es multifactorial, ya que AKT fosforila de forma directa a diversos componentes de la maquinaria de la muerte celular, pero también es capaz de regular de forma indirecta la actividad de distintos factores de transcripción de la maquinaria apoptótica.

Entre las proteínas fosforiladas directamente por AKT está la proteína proapoptótica BAD de la familia de proteínas Bcl-2, que promueve la muerte celular por formación

de un dímero con la proteína antiapoptótica Bcl-XL, de forma que esta última no puede ejercer su función. AKT fosforila a BAD inhibiendo su interacción con Bcl-XL (197,198). AKT también fosforila la procaspasa 9 inhibiendo la actividad catalítica de esta proteína proapoptótica (199). En cuanto a los factores de transcripción, AKT fosforila FoxO1, miembro de la familia de factores de transcripción FOXO, creando un sitio de unión para las proteínas adaptadoras 14-3-3, que lo secuestra en el citoplasma impidiendo su translocación al núcleo y, por tanto, evitando la activación de sus genes diana, entre los que se encuentran las proteínas proapoptóticas BIM y ligando FAS (200). Además, AKT regula a NF- $\kappa$ B (201,202), que induce supervivencia celular en respuesta a numerosos estímulos apoptóticos. Concretamente, AKT es capaz de fosforilar a IKK, de forma que se degrada el inhibidor I $\kappa$ B, activándose NF- $\kappa$ B(201,203). Por último, AKT disminuye la actividad proapoptótica de p53 por fosforilación de su inhibidor MDM2, de forma que éste se transloca al núcleo y se une a p53 dando lugar a su degradación (204) (figura 12).



**Figura 12. Efectores de AKT.** Una vez que AKT es activada interviene en diversos procesos celulares por fosforilación de numerosas proteínas, activándolas o inhibiéndolas.

### Proliferación celular y crecimiento celular

La mayoría de estudios sobre las funciones de AKT se han centrado en su papel en supervivencia celular, mientras que la regulación de la proliferación celular está mayoritariamente asociada a la vía Ras-MAPK. Sin embargo, AKT también interviene en el proceso de proliferación por regulación de la maquinaria del ciclo celular. En ese sentido se ha descrito que el bloqueo de la actividad de PI3K o AKT, farmacológicamente o mediante dominantes negativos, da lugar a la parada del ciclo celular en ciertos modelos (180). Concretamente, AKT inhibe la proteína GSK-3 $\beta$  (*Glycogen Synthase Kinase 3*) mediante fosforilación de la misma (205). GSK-3 $\beta$  controla gran número de eventos críticos del ciclo celular a través de la fosforilación inhibitoria de reguladores de éste, como c-Myc, ciclina D1 y ciclina E. Además, AKT directamente, o a través de los factores de transcripción de la familia FOXO, también fosforila inhibidores del ciclo celular como p21WAF1/CIP1 y p27KIP1, modificando su transcripción, estabilidad y su localización subcelular(206,207,207,208) (figura 12).

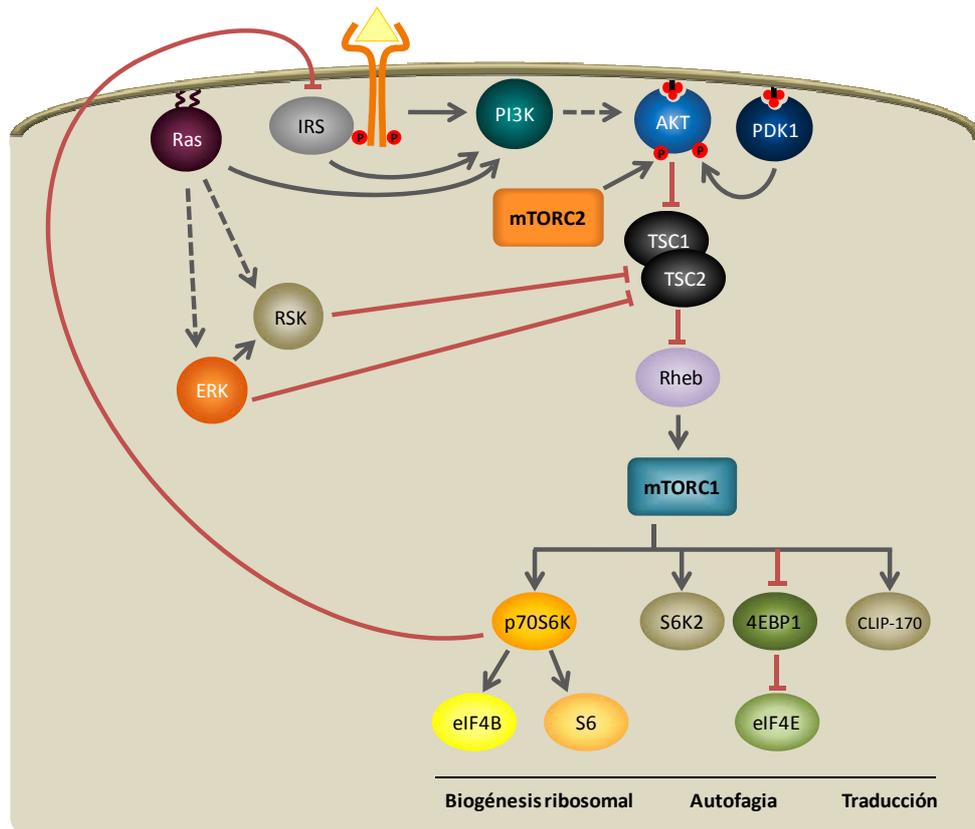
Por otra parte, AKT regula el crecimiento celular por inhibición de la actividad de TSC2 (*Tuberous Sclerosis 2*, también conocida como *Tuberin*). La proteína TSC2 inhibe la vía Rheb (*Ras Homologue Enriched in Brain*)-mTOR (209), responsable de la activación del crecimiento celular en respuesta a la disponibilidad de nutrientes, por tanto, la inhibición de TSC2 por AKT activa la vía Rheb-mTOR (figuras 12 y 13).

### **mTOR**

La proteína mTOR (*Mammalian Target Of Rapamycin*) se descubrió hace casi 20 años al estudiar el mecanismo de acción de rapamicina. Se trata de una proteína con actividad serina/treonina quinasa que integra las señales de factores de crecimiento, mitógenos e insulina, y actúa como un sensor de los niveles de nutrientes, energía y oxígeno celulares. mTOR es la subunidad catalítica de dos complejos moleculares diferentes de las células, mTORC1 y mTORC2 (*mTOR Complex 1* y *mTOR Complex 2*), cada uno con sus propios sustratos y por tanto con diferentes funciones.

El complejo mTORC1 está formado por mTOR, la proteína reguladora LST8 y la proteína RAPTOR (*Regulatory Associated Protein of mTOR*). mTORC1 regula el crecimiento celular en respuesta a factores de crecimiento y nutrientes, modulando la transcripción, la síntesis de proteínas, el inicio de la translación, la captación de nutrientes y la autofagia. El complejo mTORC1 está regulado negativamente por el complejo TSC1/2 (también conocidas como *Hamartin* y *Tuberin* respectivamente), que

inhibe el activador de mTORC1 Rheb. TSC1/2 puede ser inhibido mediante fosforilación directa de AKT, ERK y RSK *in vivo* (179). Los dos sustratos de mTORC1 mejor conocidos son las proteínas reguladoras de la traducción p70S6K (también conocida como S6K1, *Ribosomal S6 Kinase 1*) y 4EBP1 (*Eukaryotic Initiator Factor 4E (eIF4E) Binding Protein 1*). Además de su papel en la activación de la síntesis de proteínas, p70S6K inhibe la vía PI3K-AKT por inhibición de la expresión de IRS1/2. De la misma forma, la inhibición de mTORC1 activa la señalización de PI3K-AKT (210) (figura 13).



**Figura 13. Vía de señalización PI3K-AKT-mTOR.** Entre todas las proteínas reguladas por AKT, se encuentra mTOR. AKT fosforila e inhibe a TSC2, un inhibidor de Rheb, que activa el complejo mTORC1. Este complejo proteico activa entre otros a la proteína p70S6K, que activa la síntesis de proteínas.

El complejo mTORC2 está formado por mTOR, LST8 y, en lugar de RAPTOR, contiene dos proteínas, RICTOR (*Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR*) y mSin1 (también conocida como MK1 (*MAPK-Associated Protein 1*)). La regulación y funciones de este complejo son menos conocidas que las de mTORC1 aunque, como se comentó anteriormente, se ha descrito recientemente que este complejo activa directamente a AKT por fosforilación de la S473 (193) (figura 13).

La sensibilidad a rapamicina de ambos complejos también es diferente, en concreto, rapamicina inhibe fuertemente mTORC1 por inhibición de su actividad quinasa, mientras que mTORC2 se ve afectado por rapamicina solo en determinados contextos celulares y tras tratamientos prolongados, ya que en este caso solo impide la formación de nuevos complejos mTORC2 (210). Los inhibidores de PI3K LY294002 y wortmanina también son capaces de bloquear la activación de mTOR por AKT (211).

## 2.2. PAPEL DE LA VÍA PI3K-AKT-mTOR EN CÁNCER

El interés sobre PI3K en cáncer comenzó a mitad de los años 80, al asociarse la actividad enzimática de PI3K con la actividad transformante de oncogenes virales como SRC (180). En los últimos años la vía de señalización de PI3K se ha implicado directamente en carcinogénesis, pues esta vía se encuentra desregulada en el 30 % de los tumores humanos esporádicos (179,212), lo que hace pensar que la vía PI3K es una de las vías centrales para el desarrollo y mantenimiento del cáncer (213). Su activación aberrante confiere a las células un aumento de la proliferación y de la supervivencia celular, así como el mantenimiento del metabolismo en condiciones de escasez de factores de crecimiento.

La activación de esta vía de señalización en cáncer se puede producir por varios mecanismos diferentes: amplificaciones de los genes codificantes de los distintos componentes de la cascada, mutaciones puntuales en los mismos o activación por otros oncogenes. En concreto una de las primeras evidencias de la desregulación de PI3K en cáncer humano fue el descubrimiento de la amplificación de genes codificantes para la subunidad catalítica p110 $\alpha$  de PI3K y para AKT2 en cáncer de ovario, mama y páncreas (214). Por otra parte, la secuenciación de los exones de los genes de PI3K de tumores humanos reveló la existencia de mutaciones somáticas en el gen PIK3CA, que codifica para la subunidad catalítica p110 $\alpha$  en el 20-30 % de tumores gástricos, de mama, colon y cerebro examinados (215). Las investigaciones sobre las mutaciones más frecuentes de p110 $\alpha$  han mostrado que éstas incrementan

la actividad de PI3K y conducen la transformación celular *in vitro* e *in vivo* (216,217). También se han encontrado mutaciones en los genes que codifican para la subunidad reguladora p85 $\alpha$  en tumores primarios de colon y ovario (218), AKT1 (219), AKT2 y PDK1 en cáncer de colon (216). Respecto al papel de mTOR, se ha demostrado que la tumorigénesis inducida por la hiperactivación de la PI3K-AKT requiere de mTORC1, ya que su inhibición con rapamicina bloquea la transformación de células tumorales (220,221). Sin embargo, su uso no ha dado los resultados esperados en pacientes, probablemente porque este fármaco no inhibe el complejo mTORC2, de forma que AKT permanece activa (222-224) pudiendo activar otros efectores distintos de mTOR. A pesar de la sorprendente tasa de mutaciones activadoras de p110 $\alpha$ , la pérdida de la fosfatasa de lípidos PTEN sigue pareciendo el mecanismo de activación de la vía de PI3K más frecuente en cánceres humanos incluidos próstata, mama y cerebro (225). De hecho, se piensa que PTEN es el segundo supresor de tumores más comúnmente mutado en humanos, tras p53 (179).

Por último, la vía de PI3K puede ser activada por Ras y los receptores con actividad tirosina quinasa, como EGFR, HER2 y PDGFR, que están activados en muchos cánceres (217). Es frecuente encontrar mutaciones activadoras de PIK3CA junto con otras alteraciones genéticas que activan la vía de PI3K como son la pérdida de PTEN (en mama, endometrio y colon), mutaciones activadoras de Ras (colon) y amplificaciones de HER2 (mama) (226). Aunque las mutaciones en la familia de Ras y la pérdida de PTEN son mutuamente excluyentes en algunos tumores, en melanoma se han encontrado mutaciones simultáneas en RAF y PTEN (179). Una probable explicación es que la activación de la vía de señalización de PI3K por sí sola no es suficiente para la transformación en muchos tipos de cáncer, y para alcanzar una transformación maligna completa en esos tejidos debe ser necesaria la activación simultánea de vías de transducción no solapantes, como la vía de MEK o Ral-GDS (217). En este sentido se ha demostrado que la inhibición combinada de PI3K-mTOR y de MEK es necesaria para disminuir la fosforilación de S6 y promover elevados niveles de apoptosis *in vivo*, lo que da lugar a la regresión de distintos tipos de tumores (227-229).

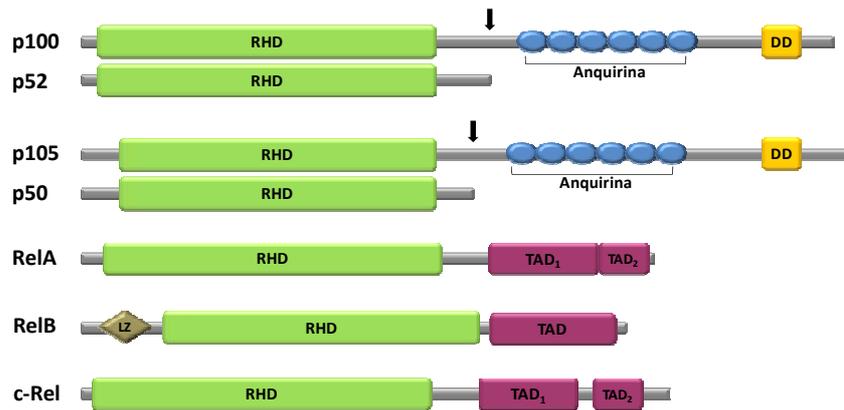
### 3. VÍA DE NF- $\kappa$ B

El factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B, se descubrió en 1986 y se definió como un factor que se encontraba en el núcleo de las células B unido al potenciador (*enhancer*) del gen de la cadena ligera  $\kappa$  de las inmunoglobulinas (230). Estudios posteriores han demostrado que NF- $\kappa$ B se encuentra de forma ubicua en el citoplasma de todos los tipos celulares, desde *Drosophila* hasta la especie humana (231).

NF- $\kappa$ B es una familia de factores de transcripción que regula la expresión de numerosos genes, tanto por inducción como por represión de su transcripción. Así, tras recibir los estímulos apropiados, las proteínas NF- $\kappa$ B participan en un gran número de respuestas fisiológicas y patológicas, entre los que destacan inmunidad, inflamación y desarrollo de diversos tejidos (232). En células de mamíferos, la familia NF- $\kappa$ B está compuesta por 5 proteínas que comparten un dominio de homología REL (RHD) de unos 300 aminoácidos junto al extremo N-terminal (233,234). Este dominio contiene un sitio de unión a ADN, una región de dimerización y una señal de localización nuclear (NLS) (235,236). Estas proteínas pueden subdividirse en dos clases en función de sus secuencias C-terminales (figura 14):

- **Proteínas NF- $\kappa$ B:** NF- $\kappa$ B1 (también conocida como p50) y NF- $\kappa$ B2 (también conocida como p52), cuyos precursores son p105 y p100, respectivamente. Éstos contienen repeticiones de anquirina en el extremo C-terminal, que han de procesarse para dar lugar a las proteínas p50 y p52, capaces de actuar como factores de transcripción nucleares (figura 14).
- **Proteínas Rel:** p65/RelA (también conocida como p65 o RelA), RelB y c-Rel. Estas proteínas se caracterizan por poseer un dominio de transactivación (TAD) en el extremo C-terminal, el cuál es crucial para la activación de la transcripción génica (figura 14).

Las cinco proteínas son capaces de homo- y heterodimerizar, dando lugar a 15 dímeros diferentes, de los cuáles 12 son capaces de unirse al ADN y contribuir a la expresión génica (237). Cada uno de estos dímeros tiene distinto grado de especificidad por los genes diana, lo que da lugar a un amplio espectro de respuestas celulares diferentes. Por ejemplo, p50 y p52 pueden formar homodímeros que funcionan como represores de la transcripción dependiente de NF- $\kappa$ B, ya que impiden la formación de dímeros activadores (238). De todos, los dímeros mejor caracterizados son p50:p65/RelA y p52:RelB (235).



**Figura 14. Miembros de la familia NF- $\kappa$ B.** Representación esquemática de las estructuras de los distintos miembros de proteínas de la familia de NF- $\kappa$ B. RHD es el dominio de homología Rel, característico de esta familia de proteínas y TAD es el dominio de transactivación característico de la subfamilia Rel.

### 3.1. REGULACIÓN Y SEÑALIZACIÓN POR LA VÍA DE NF- $\kappa$ B

Los complejos NF- $\kappa$ B se encuentran retenidos en el citoplasma de forma inactiva. Su activación se produce tras la llegada a la célula de estímulos de naturaleza muy diversa: citoquinas proinflamatorias, factores de crecimiento, agentes que causan daño en el ADN, proteínas virales, etc. (239). Estos estímulos activan diferentes vías de transducción de señales, que a su vez iniciarán la activación de NF- $\kappa$ B. Debido a la existencia de numerosos estímulos y vías de señalización capaces de activar la vía de NF- $\kappa$ B, así como los diferentes dímeros NF- $\kappa$ B, se explica el rango tan amplio de respuestas producido por NF- $\kappa$ B. De todos, el activador de NF- $\kappa$ B más potente posiblemente es la citoquina TNF $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ) (231).

La activación completa de NF- $\kappa$ B comprende varios pasos: la liberación de los complejos NF- $\kappa$ B, su translocación al núcleo, modificaciones post-transduccionales, formación del complejo transcripcional y unión al ADN.

## Liberación de los complejos NF- $\kappa$ B

Existen dos vías principales de liberación de NF- $\kappa$ B (figura 15):

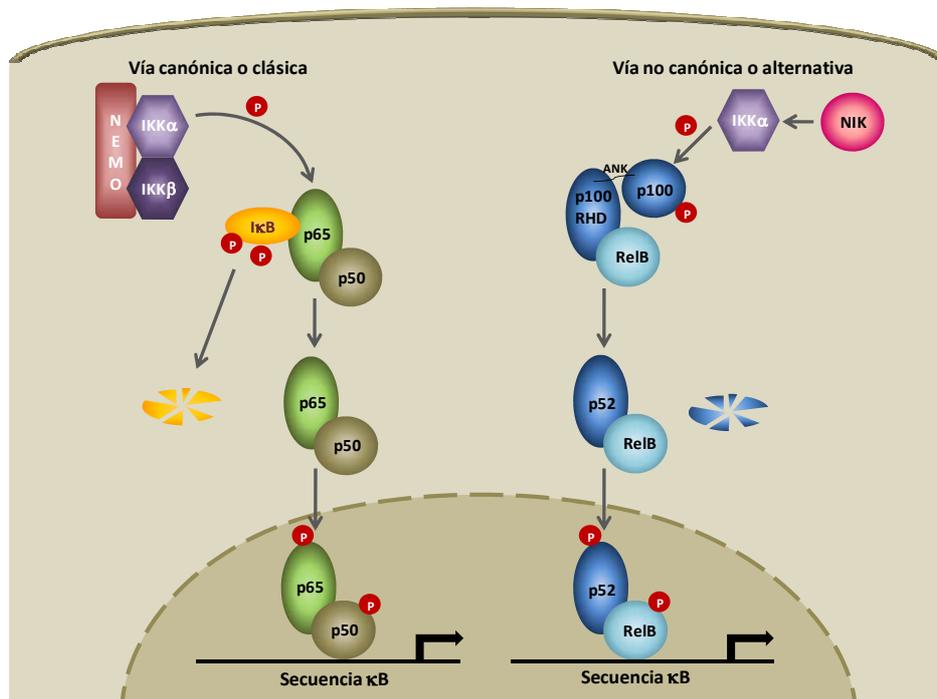
- **Vía canónica o clásica:** Es la vía de activación de NF- $\kappa$ B más frecuente. Se activa en respuesta a TNF $\alpha$ , IL-1 (*InterLeukin-1*), y otros muchos estímulos (235).

En células sin estimulación, las subunidades p50 y p65/RelA se encuentran retenidas en el citoplasma por unión a las proteínas I $\kappa$ Bs (*Inhibitor of  $\kappa$ B*) (235). Las proteínas I $\kappa$ Bs (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  e I $\kappa$ B $\epsilon$ ) poseen un dominio de repetición de anquirina que al unirse a NF- $\kappa$ B oculta la señal de localización nuclear (NLS) de la subunidad p65/RelA, impidiendo su translocación al núcleo. A pesar de que el enmascaramiento que produce I $\kappa$ B $\alpha$  es parcial y los complejos NF- $\kappa$ B-I $\kappa$ B $\alpha$  pueden pasar al núcleo en ausencia de estimulación, I $\kappa$ B $\alpha$  tiene una señal de exportación nuclear (NES) que causa un rápido retorno al citoplasma e impide la unión de NF- $\kappa$ B al ADN (235).

La liberación de NF- $\kappa$ B comienza con la activación del complejo de proteínas IKK (*I $\kappa$ B Kinase*), compuesto por las subunidades catalíticas IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  (también conocidas como IKK1 e IKK2), y la subunidad reguladora IKK $\gamma$  o NEMO (*NF- $\kappa$ B Essential MOdulator*). El complejo activo fosforila a I $\kappa$ B $\alpha$  en los residuos S32 y S36, y como consecuencia se produce su ubiquitinación y degradación por el proteasoma 26S (240). Así, los heterodímeros p50:p65/RelA quedan libres y se produce su rápida translocación al núcleo. De las dos subunidades catalíticas, se ha demostrado mediante experimentos genéticos que IKK $\beta$  es la quinasa predominante de I $\kappa$ B en la vía canónica (241,242). Además estudios de delección de las proteínas IKK han revelado que IKK $\beta$  es necesaria para la activación de NF- $\kappa$ B por TNF $\alpha$  y otros agentes (231).

- **Vía no canónica o alternativa:** En este caso, la subunidad RelB está retenida en el citoplasma por el precursor p100. Un estímulo apropiado, por ejemplo Cd40, LPS, etc., activa la quinasa NIK (*NF- $\kappa$ B-Inducting Kinase*), que a su vez activa a IKK $\alpha$  (242,243). Ésta fosforila a p100, dando lugar a la formación de p52 por ubiquitinación y degradación parcial de p100 por el proteosoma 26S. Así, el heterodímero activo p52:RelB queda libre y se transloca al núcleo para modular la expresión génica. Sin embargo, la formación de p50 a partir de p105 parece independiente de esta vía, ya que p50 se genera durante la

traducción del mRNA, como consecuencia de la proteólisis del polipéptido p105 naciente por el proteasoma 26S (244).

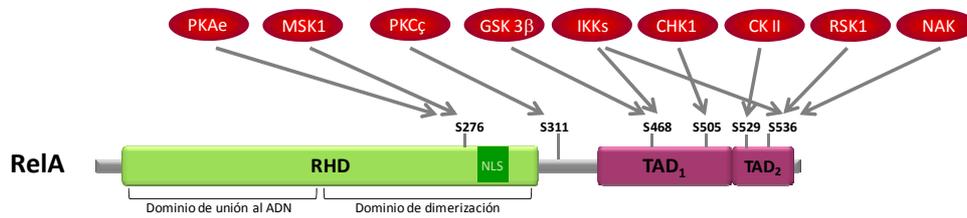


**Figura 15. Principales vías de activación de NF-κB.** En la vía canónica, las proteínas IKKs fosforilan a IκB, lo que induce su degradación, dejando libre el complejo p50:p65/RelA (NF-κB). En la vía alternativa, la proteína IKKα activa fosforila a p100 dando lugar a p52, tras ser procesada por el proteasoma, quedando libre el complejo p52:RelB. Una vez libres ambos complejos, p50:p65/RelA y p52:RelB, se translocan al núcleo donde se unen a secuencias -κB de sus genes diana.

### Modificaciones post-traduccionales

Sin embargo, además de la translocación nuclear, para que NF-κB produzca una máxima respuesta transcripcional debe sufrir una serie de modificaciones, como fosforilaciones y acetilaciones, que son las que determinan la fuerza y la duración de la respuesta de NF-κB. Estas modificaciones determinan su localización y sus propiedades de oligomerización con coactivadores o correpresores, que regulan su unión al ADN (245). Las modificaciones post-traduccionales más ampliamente estudiadas son para p65/RelA (246).

La regulación por fosforilación de RelA se produce por quinasas tanto citosólicas como nucleares que fosforilan residuos del dominio de homología Rel (RHD) y del dominio de transactivación (TAD) (figura 16). Entre los residuos fosforilables caben destacar: la S276 fosforilada por PKA (*Protein Kinase A*) en el citoplasma y por MSK1 (*Mitogen and Stress- activated Kinase-1*) en el núcleo, la S311 por PKC, la S468 por IKK $\beta$ , IKK $\epsilon$  y GSK-3 $\beta$ , la S529 fosforilada por CK2 (*Casein Kinase II*) y la S536 por las IKKs (en el caso de IKK $\beta$  es dependiente de PI3K), NAK (*NF- $\kappa$ B Activating Kinase*) y RSK (246). Todas estas fosforilaciones estimulan la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B. Por ejemplo, en células que carecen de GSK-3 $\beta$  o de NAK, o que han sido tratadas con inhibidores de PI3K, el nivel de transactivación de NF- $\kappa$ B se ve reducido, a pesar de que su liberación de I $\kappa$ B y su translocación al núcleo se producen de forma normal (247). Sin embargo, también existen modificaciones represoras de la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B. Por ejemplo, la fosforilación de la T505 por CHK1 inhibe la transactivación de RelA (245).



**Figura 16. Sitios de fosforilación de p65/RelA y sus quinasas.** Sobre la estructura de la proteína p65/RelA se indican los residuos más importantes para su regulación por fosforilación, así como las quinasas que los fosforilan.

Por otra parte, se ha observado que la acetilación de p65/RelA es también muy importante en la regulación de la función nuclear de NF- $\kappa$ B. A diferencia de la fosforilación, el proceso de acetilación parece estar restringido al núcleo y determina la intensidad y la duración de la respuesta de NF- $\kappa$ B, ya que potencia la unión de p65/RelA al ADN y previene su unión a I $\kappa$ B, lo que disminuye su salida al citosol y por lo tanto sostiene la respuesta durante más tiempo (248,249).

### Formación de multicomplejos transcripcionales y unión al ADN.

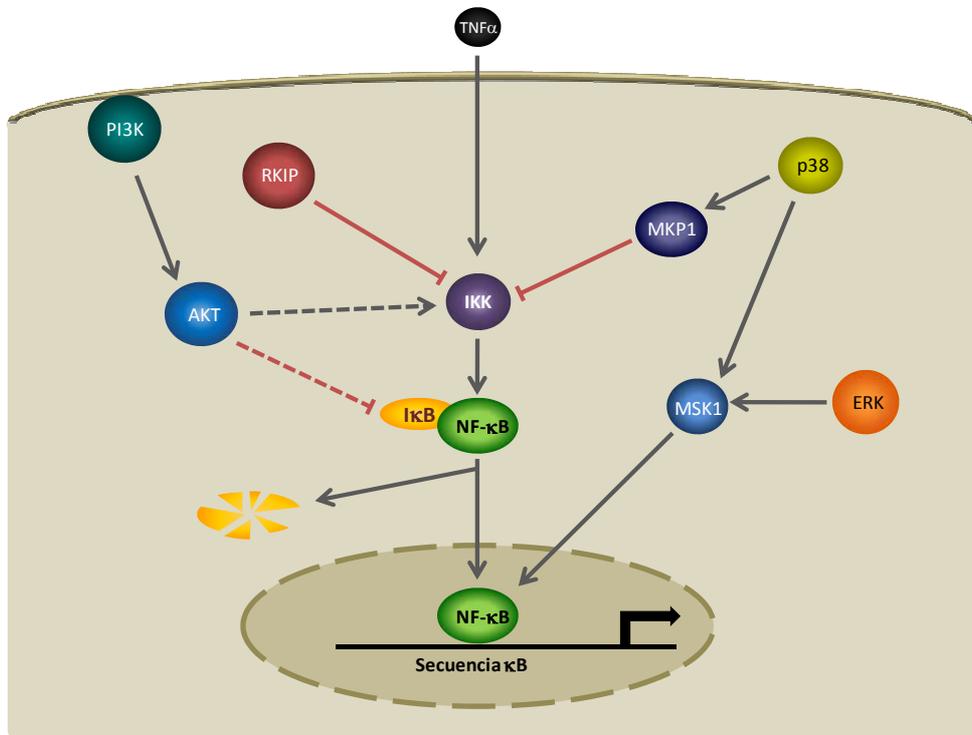
Las modificaciones por fosforilación y acetilación pueden modular la unión de p65/RelA a coactivadores y cofactores de la maquinaria transcripcional. Un ejemplo de ello son los coactivadores p300 y CBP (250,251), que acetilan a p65/RelA en varios residuos (246,247,250,251) y cuya interacción con ella da lugar a un complejo más efectivo para desplazar el complejo represor de la transcripción desacetilador de histonas (*HDAC-Histone deacetylase*) (252,253).

Una vez en el núcleo, y tras estas modificaciones se produce la unión de las diferentes subunidades NF- $\kappa$ B a secuencias  $\kappa$ B del ADN, las cuales contienen una o más secuencias consenso de 10 pares de bases (5'-GGGRNYYYCC-3'), donde R es una purina, Y es una pirimidina y N es cualquier nucleótido, y regulan la transcripción de numerosos genes. Las subunidades NF- $\kappa$ B tienen distinta afinidad por las diferentes secuencias  $\kappa$ B, lo que genera una fina regulación de todos los genes cuya transcripción depende de NF- $\kappa$ B.

### **Vías de señalización que activan NF- $\kappa$ B**

Se han descrito una gran cantidad de inductores e interacciones con proteínas que afectan a la regulación con la vía de NF- $\kappa$ B (254); sin embargo, como se ha comentado anteriormente, los reguladores de la actividad de NF- $\kappa$ B mejor conocidos son aquellos que actúan a través de la vía canónica, a partir de los receptores de la familia de TNF $\alpha$ , receptores similares a Toll (TLRs) y el receptor de IL-1. Además, otras vías de transducción de señales también están implicadas en su activación. Por ejemplo, se ha demostrado que la fosforilación de la S276 de p65/RelA por la proteína MSK1 depende a su vez de la actividad de proteínas MAPK como ERK o p38 MAPK (255). El papel de la proteína p38 MAPK sobre la activación de NF- $\kappa$ B se ha demostrado en distintos sistemas celulares, donde se ha observado que coopera en la expresión de citoquinas activadas por TNF $\alpha$  (256). Además, promueve la diferenciación de miocitos a través del aumento de la actividad de NF- $\kappa$ B de una manera dual, primero reduciendo los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$  y promoviendo la unión de NF- $\kappa$ B al ADN, y segundo potenciando la actividad transactivadora de p65/RelA (257). Por otro lado, se ha demostrado que la inhibición de p38 MAPK por glucocorticoides, a través de la inducción de la fosfatasa dual de MAPKs 1 (MKP-1/DUSP1) la cual inhibe la actividad de las IKKs, inhibe la actividad de NF- $\kappa$ B (258). En cuanto a otras vías de señalización, se ha demostrado la activación de NF- $\kappa$ B por proteínas de la familia de Rho y por sus proteínas GEFs (259-262). También se ha observado que la sobreexpresión de la

proteína AKT o de la subunidad catalítica p110 de la PI3K induce la transactivación mediada por la subunidad p65/RelA (263) y que la proteína AKT regula la activación de NF- $\kappa$ B posiblemente por la fosforilación de IKK o la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  (201,264).



**Figura 17. Vías de señalización que regulan a NF- $\kappa$ B.** En la figura se indican algunas proteínas capaces de regular la vía de NF- $\kappa$ B, así como el componente de la misma sobre el que actúan.

Como regulador negativo, se ha demostrado que RKIP, no solo inhibe las proteínas RAF, sino que también interactúa con distintos componentes de la vía de señalización de NF- $\kappa$ B como TRAF6, TAK1 e IKK $\alpha/\beta$ , inhibiendo la activación de este factor de transcripción (112,113). Por último, también se ha observado, que agentes que producen daño en el ADN, tales como radiaciones UV y doxorrubicina inducen la degradación de I $\kappa$ B de una forma independiente de IKK y aumentan la transcripción mediada por los dímeros p50:p65/RelA (265) (figura 17).

### 3.2. PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE NF- $\kappa$ B EN CÁNCER

NF- $\kappa$ B regula la transcripción de unos 200 genes (231,254). Entre ellos se incluyen genes de proteínas que controlan la apoptosis, la adhesión, la proliferación, respuestas del sistema inmune, la inflamación, respuestas al estrés celular y el remodelado tisular (235,241,242,266,267). La expresión de estos genes está finamente coordinada por otras vías de señalización, por tanto, el resultado de la activación de NF- $\kappa$ B depende de la naturaleza y el contexto celular de su inducción. Así, mientras NF- $\kappa$ B es necesario para una función apropiada del sistema inmune, una activación inapropiada puede contribuir en patologías como inflamación y carcinogénesis.

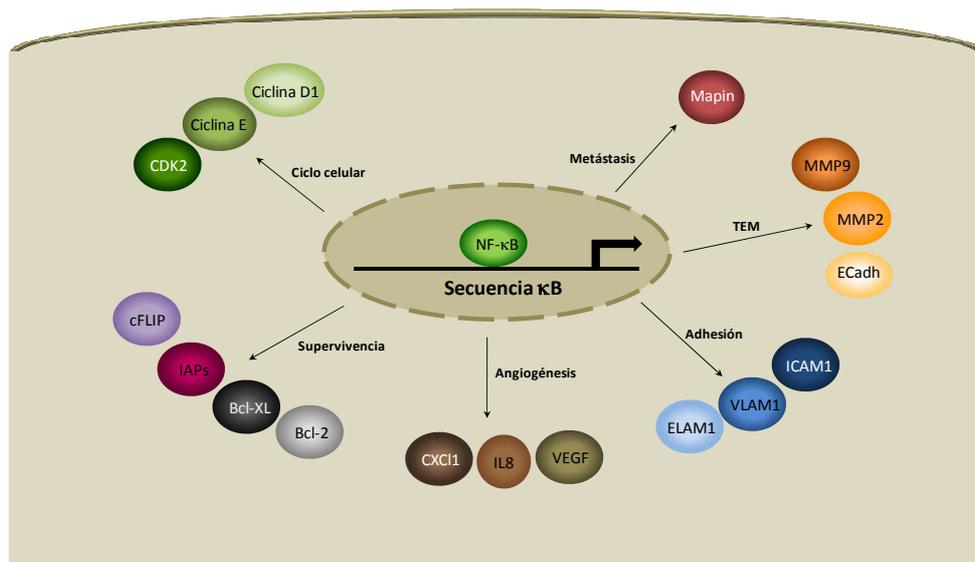
Aunque no se han encontrado mutaciones activadoras en ninguno de los componentes de la vía de señalización de NF- $\kappa$ B en cáncer, si se ha observado un aumento de la actividad de la vía en melanomas (268), cáncer de mama (269), pulmón (270), colon (271), páncreas (272), mielomas (273), linfomas (274) y distintos tipos de leucemias (231,275). La presencia de NF- $\kappa$ B activo en cáncer da lugar a la alteración de distintos procesos como proliferación, apoptosis, migración y angiogénesis (276). La supresión de NF- $\kappa$ B en distintos tipos de células tumorales inhibe la proliferación y da lugar a apoptosis (277). La inhibición del crecimiento de células tumorales por inhibición de NF- $\kappa$ B se ha observado en pulmón, melanoma, etc. (268-270). Además, mediante estudios genéticos en ratones, se ha demostrado que la eliminación de IKK $\beta$  disminuye la progresión de cáncer de colon y mielomas (278) y que el cáncer de mama inducido por HER2 requiere de IKK $\alpha$ , ya que su eliminación retarda el crecimiento de estos tumores (279).

Este factor de transcripción participa en carcinogénesis porque entre sus genes diana se encuentran los miembros del ciclo celular ciclina D1, ciclina E, CDK2 y el protooncogen c-myc (267) y se ha visto que la supresión de NF- $\kappa$ B en determinadas células tumorales causa parada de dicho ciclo. Además, se ha observado que en fibroblastos transformados por Ras o RAF oncogénicos hay un aumento de la expresión de genes inducidos por NF- $\kappa$ B, mediado por un aumento de la degradación de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  (131).

Por otra parte, el papel principal de NF- $\kappa$ B en el desarrollo del cáncer parece ser su función antiapoptótica. NF- $\kappa$ B participa también en la regulación de la expresión de una variedad de proteínas que inhiben la apoptosis y promueven la supervivencia como c-IAP-1, c-IAP-2, XIAP, miembros antiapoptóticos de la familia de Bcl-2, como Bcl-XL, y c-FLIP (276). Además, también se ha demostrado que NF- $\kappa$ B antagoniza con

el efecto proapoptótico de los receptores de muerte a través de la inhibición de la actividad de la cascada de JNKs y la actividad de las especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) (280). Así, en numerosas líneas celulares tumorales se ha demostrado que la resistencia a la apoptosis se debe a una aumento de la actividad de NF-κB, ya que cuando ésta se inhibe, se produce un aumento de la muerte celular (281-285).

Por último, NF-κB no solo está implicado en la iniciación del cáncer, ya que también se ha observado que su activación puede mediar la invasión celular y promover metastasis. NF-κB induce la transición epitelio-mesenquima (EMT) a través de la regulación de la transcripción de E-cadherina, las metaloproteasas MMP2 y MMP9 (Matrix Metalloproteinase 9) y las moléculas de adhesión ICAM-1, VCAM-1 y ELAM-1 (269,286). También puede inducir angiogénesis, a través de la regulación del factor de crecimiento de células endoteliales (VEGF) y otros reguladores angiogénicos como CXCL1, 8 e IL-8 (286). Además, recientemente se ha observado una relación directa entre la activación de NF-κB y el potencial metastático de las células tumorales prostáticas, a través de la inhibición del gen supresor de metástasis Maspin (287).



**Figura 18. Genes regulados por NF-κB que pueden participar en el proceso de carcinogénesis.** En la figura se indican algunos de los genes regulados por NF-κB y los procesos celulares en los que participan.

*Hipótesis y objetivos*



## HIPÓTESIS

Durante el desarrollo de un tumor es necesaria la adquisición de un crecimiento celular descontrolado y para ello es clave la desregulación de la proliferación y la supervivencia celular, entre otros procesos. Así, las células tumorales experimentan un aumento en la tasa de proliferación y son capaces de evadir los mecanismos de muerte celular.

Numerosos estudios publicados hasta la fecha han demostrado que B-RAF es un protooncogén en diferentes tipos de cáncer. La proteína oncogénica <sup>V600E</sup>B-RAF se encuentra presente en un alto porcentaje de tumores. Las células que poseen esta mutación presentan una mayor proliferación y resistencia a morir por apoptosis, presumiblemente por la activación constitutiva de la vía MEK-ERK. Sin embargo, no se conoce por qué algunos de los efectos producidos por la mutación <sup>V600E</sup>B-RAF son distintos a los causados por otras alteraciones genéticas relacionadas con la vía de ERK. Así, los eventos moleculares y las vías de señalización, implicadas en la progresión, agresividad y recurrencia de tumores mediados por <sup>V600E</sup>B-RAF no se conocen en detalle todavía.

Por ello, nos planteamos el estudio de la identificación de nuevos mecanismos por los que la proteína <sup>V600E</sup>B-RAF contribuye al proceso de carcinogénesis, como su relación con las vías de señalización de PI3K-AKT y NF-κB, también implicadas en la progresión tumoral, a través de las cuales podría llevarlos a cabo.

## **OBJETIVOS**

Por todo ello, y teniendo en cuenta los antecedentes expuestos en la introducción, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Estudiar la participación de B-RAF y C-RAF en la proliferación de células tumorales que poseen la proteína B-RAF silvestre u oncogénica.
2. Analizar el papel de las proteínas B-RAF y C-RAF en la supervivencia de células tumorales e identificar los mecanismos a través de los cuales estas proteínas regulan dicho proceso.
3. Determinar el efecto de los cambios en la expresión y la actividad de B-RAF sobre la vía PI3K-AKT y su posible relación con la apoptosis.
4. Estudiar el efecto de la alteración en los niveles de actividad y expresión de B-RAF sobre la actividad de NF- $\kappa$ B y los mecanismos y rutas de señalización implicados.

## *Materiales y métodos*



## 1. MATERIALES

### 1.1. Reactivos

#### Cultivos celulares

- Los medios de cultivo, el suero fetal bobino (FBS), el piruvato sódico, los aminoácidos no esenciales, los antibióticos, el PBS y la solución de Tripsina-EDTA se obtuvieron de Gibco-Invitrogen.
- Los frascos y placas de cultivo de plástico esterilizadas fueron de dos marcas comerciales: Nunc™ Brad Products y Falcon Becton Dickinson Labware.

#### Transfecciones transitorias

- La Lipofectamina™ se obtuvo de Invitrogen.
- Los oligonucleótidos utilizados en los experimentos de ARN de interferencia (*siRNA*) fueron suministrados por Ambion (Applera Hispania).
- El medio Optimem de Gibco-Invitrogen.

#### Western Blot

- La acrilamida, el reactivo de Bradford, los marcadores de peso molecular y el resto de reactivos necesarios para la electroforesis de proteínas se adquirieron de Bio-Rad.
- Las membranas de PVDF, el sistema ECL y las películas fotográficas *Hyperfilm* fueron proporcionadas por GE Healthcare.

#### Proliferación celular

- El azul de Tripán se obtuvo de SIGMA.
- La [<sup>3</sup>H]-timidina utilizada fue proporcionada por Amersham.
- El líquido de centelleo *Optiphase Hisafe 3* se obtuvo de Perkin Elmer.

#### Citometría de flujo

- El yoduro de propidio y la ribonucleasa A se obtuvieron de Sigma.
- El kit para determinar la exposición de fosfatidil serina *Anexin V-FITC Apoptosis Detection Kit* fue suministrado por Calbiochem (Merck Biosciences).
- La sonda tetrametilrodaminmetilester perclorato (TMRM) se obtuvo de SIGMA.

#### Actividad transcripcional

- El kit para la determinación de la actividad luciferasa *Dual-Luciferase® Reporter Assay System*, se obtuvo de Promega.

#### Atividad quinasa

- La proteína G-Sefarosa se obtuvo de GE Healthcare.
- La GST-MEK1 y GST-ERK2 se purificaron como se describe en el apartado 8.1.
- La MBP (*Myelin Basic Protein*) se obtuvo de SIGMA.
- El <sup>32</sup>P-ATP se obtuvo de Perkin Elmer.

### Otros reactivos

- Los inhibidores de proteasas y fosfatasa benzamidina, pepstatina, leupeptina, aprotinina, PMSF, NaF, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> se obtuvieron de SIGMA.
- El resto de los reactivos y productos utilizados (sales, solventes orgánicos, bases y ácidos inorgánicos, detergentes, etc.) fueron de la máxima pureza disponible y se obtuvieron de distintas casas comerciales (Merck, SIGMA, Roche, Panreac, Bio-Rad).

### **1.2. Plásmidos**

- Los plásmidos pEF que contienen el gen que codifica para la forma oncogénica V600E de B-RAF unida al epítipo myc (<sup>V600E</sup>B-RAF) así como los otros mutantes, <sup>G464V</sup>B-RAF, <sup>G466V</sup>B-RAF y <sup>L597V</sup>B-RAF fueron generosamente donados por el Dr. Richard Marais (ICR, Londres, Reino Unido).
- El plásmido pGL3 que contiene el gen reportero de luciferasa 3x NF-κB-Tk-Luc, fue cedido amablemente por la Dra. Marina Lasa (Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), CSIC-UAM, Madrid).
- El plásmido que contiene el gen reportero de renilla, pRL-TK-Renilla, fue generosamente donado por la Dra. Marina Lasa (IIB, CSIC-UAM, Madrid).
- El plásmido que contiene el dominio de unión al DNA de Gal4, fusionado a la secuencia codificante de la proteína p65/RelA humana completa (p65-Gal4) fue obtenido de la colección de plásmidos BCCM/LMBP (*Universiteit Gent*, Gante, Bélgica).
- El plásmido pGL3 que contiene el gen reportero de luciferasa Gal4-Luc y la sonda para el ensayo de retardo en gel fueron amablemente cedidos por la Dra. Marina Lasa (IIB, CSIC-UAM, Madrid).
- El plásmido pcDNA3 que contienen el gen de la proteína RKIP unida al epítipo de hemaglutinina (HA) (pcDNA3-HA-RKIP) fue una donación del Dr. W. Kolch (*University of Glasgow*, Reino Unido).
- El plásmido pcDNA3 que contiene el gen de MSK1 sin actividad quinasa por una mutación de un ácido aspártico por una alanina en el codón 565 (MSK1kd), unido al epítipo Flag, fue generosamente donado por el Dr. D. Alessi (*University of Dundee*, Reino Unido).
- Los plásmidos pGEX-MEK1 y pGEX-ERK2, que codifican para las proteínas de fusión GST-MEK1 y GST-ERK2 respectivamente, fueron cedidos amablemente por el Dr. Richard Marais (ICR, Londres, Reino Unido).

### 1.3. Compuestos inhibidores y activadores

En la Tabla 1 se especifican los diferentes tratamientos con compuestos activadores o inhibidores utilizados en este estudio, así como la concentración final a la que se usaron, la casa comercial que los suministró y las dianas moleculares de los mismos.

**Tabla 1. Compuestos utilizados**

Compuesto	Concentración de uso	Casa comercial	Diana molecular
U0126	10 $\mu$ M	Promega	MEK
BAY 43-9006	10 $\mu$ M	Cedido (*)	RAF, VEGFR
Z-VAD-FMK	40 $\mu$ M	BD Biosciences	Caspasas
Etopósido	50 $\mu$ M	SIGMA	Topoisomerasa II
LY294002	20 $\mu$ M	Stressgen	PI3K
Wortmanina	1 $\mu$ M	SIGMA	PI3K
ALX (**)	30 $\mu$ M	Alexis	AKT
Rapamicina	50 nM	Calbiochem	mTOR
Cicloheximida	5 $\mu$ g/mL	SIGMA	Peptidil transferasa del ribosoma 60S
TNF $\alpha$	2 nM	Peprotech	TNFR
Geldanamicina	1 $\mu$ M	Stressgen	Hsp90

Notas: \* El inhibidor BAY 43-9006 fue cedido por el Dr. Richard Marais (*Institute of Cancer Research* (ICR), Londres, Reino Unido).

\*\* El nombre completo del inhibidor de AKT es *1L-6-Hydroxymethyl-chiro-inositol-2-[(R)-2-O-methyl-3-O-octadecylcarbonate* y para abreviar en este trabajo lo llamamos ALX.

#### 1.4. Anticuerpos

La detección de las proteínas se realizó mediante el uso de los anticuerpos primarios específicos que se detallan en la tabla 2 y los anticuerpos secundarios anti-ratón (SIGMA) y anti-conejo (Dako Citomation) conjugados con peroxidasa (HRP, *Horse Radish Peroxidase*), a una concentración 1:10000 y 1:5000 respectivamente.

**Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados**

Anticuerpo	Casa comercial	Concentración	Peso Molecular (kDa)	Especie
p-ERK	SIGMA	1:2500	44/42	Ratón
ERK-2	Santa Cruz	1:1000	44/42	Ratón
B-RAF	Santa Cruz	1:500	89	Ratón
C-RAF	BD Transduction	1:1000	74	Ratón
Caspasa 3	BD Transduction	1:1000	32	Ratón
$\beta$ -tubulina	SIGMA	1:5000	55	Ratón
Bcl-2	Santa Cruz	1:500	29	Ratón
Bcl-XL	Santa Cruz	1:500	30	Conejo
BIM/BOD	Stressgen (Assay Designs)	1:500	23	Conejo
p-AKT	Cell Signaling	1:500	60	Conejo
AKT total	Santa Cruz	1:1000	60	Conejo
p-p70S6K	Santa Cruz	1:1000	70	Conejo
myc (9E10)	Cedido (***)	1:200	Proteína interés	Ratón
Flag	SIGMA	1:1000	Proteína interés	Ratón
I $\kappa$ B $\alpha$	Santa Cruz	1:500	35	Conejo
p65/RelA	Santa Cruz	1:1000	65	Conejo
PARP	BD Pharmigen	1:250	116	Conejo

Nota: \*\*\* El anticuerpo para myc (9E10) fue obtenido a partir de un hibridoma y fue cedido por el Dr. Richard Marais (ICR, Londres, Reino Unido).

## 2. CULTIVOS CELULARES

### 2.1. Líneas celulares

Para llevar a cabo este trabajo se utilizaron cuatro líneas celulares procedentes de distintos tipos de tumores humanos:

- Línea celular WRO, que procede de un tumor folicular tiroideo (FTC) y contiene la proteína B-RAF silvestre. Fue cedida por el Dr. Alfredo Fusco (*Università degli Studi di Napoli "Federico II"*, Nápoles, Italia).
- Línea celular KAT-18, que procede de un carcinoma anaplásico tiroideo (ATC), y contiene la proteína B-RAF silvestre. Fue cedida por el Dr. Kenneth B. Ain (*University of Kentucky Medical Center*, Kentucky, USA).
- Línea celular NPA, previamente descrita como células tumorales papilares tiroideas (PTC), que una vez analizadas genéticamente han resultado ser células derivadas de melanoma y contienen la proteína oncogénica <sup>V600E</sup>B-RAF. Fue cedida por el Dr. Alfredo Fusco (*Università degli Studi di Napoli "Federico II"*, Nápoles, Italia).
- Línea celular ARO, descrita anteriormente como células tumorales tiroideas anaplásicas (ATC) y actualmente identificadas como células derivadas de cáncer de colon, que contienen la proteína oncogénica <sup>V600E</sup>B-RAF. Fue cedida por la Dra. Pilar Santisteban (IIB-CSIC, Madrid).

### 2.2. Condiciones de cultivo

Las líneas WRO y NPA se cultivaron en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), mientras que las líneas KAT-18 y ARO se cultivaron en medio RPMI-1640. Ambos medios de cultivo suplementados con 10 % de suero fetal bovino (FBS), 1 mM piruvato sódico y 1 % de antibióticos (Penicilina, Estreptomina, Fungizona). Al medio RPMI-1640 además se le añadió el 1 % de aminoácidos no esenciales. Los cultivos se mantuvieron en frascos de 75 cm<sup>2</sup> a 37 °C, con atmósfera húmeda y 5 % de CO<sub>2</sub>, en un incubador Forma Scientific.

La división de los cultivos se realizó cada 3 ó 4 días. Tras alcanzar la confluencia, las células se lavaron con PBS y se despegaron de los frascos de mantenimiento mediante la incubación a 37 °C con una solución de tripsina-EDTA (0,5 g/L de tripsina y 0,2 g/L de EDTA en PBS) durante menos de 5 minutos, según la línea. La tripsina existente en la suspensión celular se neutralizó con medio completo (10 % FBS). Las células se contaron utilizando un hemocitómetro y un microscopio de contraste de fases Leica

DMIL. Para su mantenimiento las células se sembraron en nuevos frascos de cultivo a una densidad aproximada de entre 700 y 1200 células/cm<sup>2</sup>, según la línea celular. Para los distintos experimentos las células se sembraron en placas de 6, 12, o 24 pocillos o en placas p100, aproximadamente 16 horas antes de comenzar el tratamiento correspondiente. La densidad de células sembradas y el tiempo de cada tratamiento dependieron del experimento que se fuera a realizar y se especifican posteriormente en cada tipo de ensayo.

### 3. TRANSFECCIONES TRANSITORIAS

Las transfecciones se realizaron utilizando medio Optimem, libre de suero y antibióticos, y como vehículo de transfección Lipofectamina. Para las distintas transfecciones se sembraron 200000 células en placas de 6 pocillos el día previo a la transfección.

#### 3.1. Transfección de ARN pequeños de interferencia (*siRNA*).

Mediante esta técnica se inhibió específicamente la expresión de determinadas proteínas. Las células se transfectaron con ARN de doble cadena (*siRNA*) específico para cada proteína que se quiere silenciar. Las secuencias utilizadas son:

- B-RAF: 5'-CAGUCUACAAGGGAAAGUGtt-3' y su complementaria.
- C-RAF: 5'-UAGUUCAGCAGUUUGGCUAtt-3' y su complementaria.
- Control de la transfección, SC (*scrambled*): se utilizó un oligo con la secuencia de B-RAF desordenada y su complementaria.

Para ello, se diluyeron 100 pmoles de *siRNA* en Optimem hasta un volumen final de 100 µL y por otro lado se llevaron 4 µL de Lipofectamina hasta un volumen de 100 µL en el mismo medio. A continuación se mezclaron ambas soluciones y se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente. Durante este tiempo las células se lavaron 2 veces con PBS, el medio de cultivo de las células se reemplazó por 800 µL de Optimem y se añadieron a este medio los 200 µL de la mezcla de *siRNA* y Lipofectamina. Las células se incubaron a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> durante 6 horas. Pasado este tiempo se retiró el medio de la transfección y las células se incubaron en medio de cultivo durante 72 ó 96 horas, según el experimento. Transcurrido ese tiempo, se realizaron los análisis correspondientes a cada experimento. Como control de silenciamiento, en cada experimento se analizaron los niveles de expresión de la proteína diana.

### 3.2. Transfección de vectores de expresión.

Mediante esta técnica se sobreexpresaron en las células diversas proteínas exógenas de interés en este estudio. Para homogeneizar la cantidad de ADN transfectado en caso de transfectar diferente número de plásmidos, en todas las transfecciones se transfectó 1 µg total de ADN, compuesto por 200 ng de cada plásmido codificante y el plásmido vacío que no codifica para ninguna proteína hasta completar dicha cantidad. Para ello se preparó la mezcla de ADN plasmídico en 16 µL de PBS. Por otro lado, se llevaron 4 µL de Lipofectamina hasta 16 µL de PBS. Ambas soluciones se mezclaron y se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente. Durante ese tiempo se cambió el medio de cultivo de las células y se dejaron en 1 mL de Optimem. Transcurridos los 20 minutos de incubación, se añadieron los 32 µL de la mezcla de ADN y Lipofectamina a las células y se incubaron durante 6 horas a 37 °C. Pasado ese tiempo se reemplazó el medio de transfección por medio de cultivo completo. El efecto de la sobreexpresión se analizó a las 48 o 72 horas post-transfección, según el experimento.

## 4. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

Para el análisis de la expresión de proteínas, así como para determinar el estado de fosforilación y activación de algunas de ellas, se utilizó la técnica de *Western Blot*.

### 4.1. Obtención de extractos celulares totales.

Una vez terminados los tratamientos correspondientes, las células se lavaron 2 veces con PBS frío y se mantuvieron en hielo durante todo el proceso de extracción. Los extractos de proteínas procedentes de cada pocillo se obtuvieron mediante la adición de tampón de extracción y dilución en proporción 1:4. La composición de dichos tampones es la siguiente:

- Tampón de extracción: 20 mM Tris HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 5 % (v/v) de glicerol, 1,5 M KCl, 1 % (v/v) Tritón X-100, 0,3 % (v/v) β-mercaptoetanol, 5 mM NaF, 0,2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 50 µM fenil-metil-sulfonil fluoruro (PMSF), 1 mM benzamidina, 5 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml pepstatina A y 5 µg/ml aprotinina.
- Tampón de dilución: 20 mM Tris HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 10 % (v/v) glicerol, 1 % (v/v) Tritón X-100, 0,3 % β-mercaptoetanol, 5 mM NaF, 0,2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 50 µM PMSF, 1 mM benzamidina, 5 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml pepstatina A y 5 µg/ml aprotinina.

Los experimentos se realizaron generalmente en placas de 6 pocillos a los que se añadieron 40  $\mu$ l de tampón de extracción; posteriormente, se levantaron las células con la ayuda de un raspador de plástico y a continuación se añadieron 160  $\mu$ l de tampón de dilución a dichos extractos celulares. Éstos se incubaron 10 minutos en hielo y se centrifugaron a 16000 x g (Centrifuga 5415R Eppendorf) durante 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante se paso a otro tubo y se guardó a -80 °C hasta su utilización.

#### **4.2. Obtención de extractos de proteínas nucleares.**

Una vez incubadas con los distintos tratamientos, las células se lavaron 2 veces con PBS frío y se mantuvieron en hielo durante todo el proceso de extracción. Los extractos de proteínas nucleares procedentes de cada pocillo se obtuvieron mediante la adición de 50  $\mu$ l de tampón A y posterior raspado con una espátula de plástico. Después de incubar los extractos 10 minutos en hielo, se añadieron 20  $\mu$ l de tampón sacarosa y se centrifugaron a 2300 x g durante 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante, que contiene los extractos citoplasmáticos, se transfirió a otro tubo y se guardó a -80 °C. El precipitado, que contenía los núcleos celulares, se lavó con 50  $\mu$ l de tampón B. A continuación se centrifugó nuevamente a 2300 x g durante 5 minutos a 4 °C y el precipitado se resuspendió en 30  $\mu$ l de tampón C. Éste se incubó 30 minutos a 4 °C, con agitación orbital, resuspendiéndolo con vórtex cada 5 minutos. Por último, el homogeneizado se centrifugó a 16000 x g durante 5 minutos a 4 °C y el sobrenadante, que contiene los extractos nucleares, se guardó a -80 °C hasta su utilización.

La composición de los tampones utilizados es:

- Tampón A: 20 mM Hepes pH 8, 10 mM KCl, 150  $\mu$ M EDTA, 150  $\mu$ M EGTA, 1,2 % Tritón X-100, 1 mM DTT, 50  $\mu$ M PMSF, 5  $\mu$ g/ml leupeptina, 5  $\mu$ g/ml pepstatina A y 5  $\mu$ g/ml aprotinina.
- Tampón sacarosa: 50 mM Hepes pH 7, 10 mM KCl, 250  $\mu$ M EDTA, 70 % (p/v) sacarosa.
- Tampón B: 20 mM Hepes pH 8, 50 mM NaCl, 25 % de glicerol, 250  $\mu$ M EDTA, 150  $\mu$ M EGTA, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 50  $\mu$ M PMSF, 5  $\mu$ g/ml leupeptina, 5  $\mu$ g/ml pepstatina A y 5  $\mu$ g/ml aprotinina.
- Tampón C: 20 mM Hepes pH 8, 400 mM NaCl, 25 % de glicerol, 250  $\mu$ M EDTA, 150  $\mu$ M EGTA, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 50  $\mu$ M PMSF, 5  $\mu$ g/ml leupeptina, 5  $\mu$ g/ml pepstatina A y 5  $\mu$ g/ml aprotinina.

#### **4.3. Determinación de la concentración de proteínas.**

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford siguiendo el protocolo descrito por el proveedor y utilizando albúmina de suero bobino (BSA) para construir la curva patrón (288).

#### **4.4. Electroforesis y electrotransferencia de proteínas a membrana.**

Las proteínas se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida entre un 8-12 %, según la proteína objeto de estudio, en condiciones reductoras y desnaturalizantes (SDS-PAGE), en presencia de tampón 25 mM Tris base pH 8.3, 190 mM glicina y 0,1 % SDS. Las muestras para la electroforesis se prepararon añadiendo ¼ de su volumen de tampón de carga 4X (0,25 M Tris-HCl pH 6.8, 2 % SDS, 0,5 %  $\beta$ -mercaptoetanol, 20 % glicerol, azul de bromofenol) e hirviéndolas 5 minutos a 95 °C. Finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF, mediante transferencia en húmedo. Se utilizó un tampón de transferencia que contenía 25 mM Tris base pH 8.3, 190 mM glicina, 0,01 % SDS y 20 % de metanol. Al finalizar la transferencia, la membrana se tiñó con el colorante Rojo Ponceau (0,5 % Rojo Ponceau, 5 % ácido acético) para comprobar que las proteínas se habían transferido de forma correcta.

#### **4.5. Inmunodetección de las proteínas.**

Después de la transferencia, las membranas se incubaron con una solución de TTBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0,1 % Tween 20) y 5 % leche sin grasa ó 5 % de BSA durante una hora a temperatura ambiente, para bloquear los sitios de unión inespecíficos. La inmunodetección se llevó a cabo incubando la membrana durante dos horas a temperatura ambiente, o toda la noche a 4 °C, con el anticuerpo primario correspondiente en solución de bloqueo. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TTBS y las membranas se incubaron una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario específico conjugado con peroxidasa de rábano diluido en 1 % de leche o BSA en TTBS. Por último, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TTBS y las proteínas se detectaron mediante quimioluminiscencia utilizando el sistema de ECL™ en películas fotográficas de alta resolución.

#### **4.6. *Stripping* y rehibridación de las membranas con otro anticuerpo.**

En el caso de necesitar ver otra proteína diferente en la misma membrana, antes de reincubar las membranas con el anticuerpo correspondiente a esa segunda proteína,

la membrana se limpió de los anticuerpos anteriores con una solución de *stripping* cuya composición es 2 % SDS, 50 mM Glicina y pH 2.2. A continuación se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TTBS y se repitió el proceso a partir del bloqueo de los sitios inespecíficos.

## 5. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN

### 5.1. Curvas de crecimiento. Tinción con azul de Tripán

Este método se utilizó para realizar las curvas de crecimiento. Para ello, se sembraron 50000 células en placas de 6 pocillos. Al día siguiente de la siembra las células se trataron con los distintos inhibidores y se incubaron durante 0, 24, 48 o 72 horas. Transcurridos esos tiempos las células se levantaron de la placa por incubación con una solución de tripsina-EDTA (0,05 % de tripsina y 0,02 % de EDTA en PBS) durante 5 minutos a 37 °C; una vez despegadas las células de la placa se neutralizó la tripsina con el medio de cultivo completo (10 % FBS). Tras obtener una suspensión celular homogénea, se tomaron 90 µL de ésta y se agregaron 10 µL de azul de Tripán. Las células con daños en su membrana plasmática permiten el paso del colorante, tiñéndose de color azul, y se distinguen fácilmente de las células integras al microscopio. A continuación, desestimando las células con daños en la membrana, se determinó el número de células viables por conteo con una cámara de Neubauer.

### 5.2. Ensayo de incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina

Este método se utilizó para determinar el nivel de síntesis de ADN de las células tras distintos tratamientos. Para ello, se sembraron 50000 células en placas de 12 pocillos. 24 horas después se realizaron los tratamientos correspondientes y durante las 4 últimas horas de tratamiento las células se incubaron en medio con 0,4 µCi/mL de [<sup>3</sup>H]-timidina. Pasado ese tiempo, se retiró este medio, las células se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron con 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 5 % en PBS, durante 15 minutos a 4 °C. A continuación se retiró el TCA, las células se lavaron con metanol y se dejaron secar al aire durante al menos 30 minutos. Por último, las células se solubilizaron en 0,5 mL de una solución NaOH 0,1 M y 1 % de SDS. A los extractos celulares se les añadió 2,2 mL de líquido de centelleo *Optiphase Hisafe 3* y se midieron las desintegraciones por minuto (d.p.m.) en un contador de centelleo líquido tipo β (Guardian 1414 de Wallac, Turku, Finland). Los resultados se expresaron como porcentaje de síntesis de ADN respecto al control.

## 6. ANÁLISIS DE LA MUERTE CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO

En general, las técnicas de citometría de flujo consisten en el marcaje de las células con algún reactivo fluorescente y la posterior medida de la fluorescencia emitida por las células marcadas. Para ello se utilizó el equipo Beckton Dickinson FACScalibur (BD Biosciences), equipado con un láser de  $\lambda_{\text{excitación}}$ : 488nm. Este equipo dispone de tres filtros de adquisición de fluorescencia: FL1 (530/30 nm), FL2 (585/42 nm) y FL3 (660LP). Los resultados obtenidos fueron analizados posteriormente con el programa WinMDI 2.9.

### 6.1. Análisis del contenido celular de ADN por marcaje con yoduro de propidio

El yoduro de propidio (IP) es un fluorocromo que se caracteriza por su capacidad para intercalarse entre los nucleótidos del ARN y del ADN en el interior celular. El grado de marcaje de estas moléculas se puede determinar por medida de la fluorescencia que emite el IP ( $\lambda_{\text{emisión}}$ : 620 nm aproximadamente) y posterior análisis de dicha fluorescencia en un histograma biparamétrico, según el cual se pueden distinguir las diferentes poblaciones celulares con distinto contenido de ADN.

Para determinar el contenido celular de ADN, una vez terminado el tratamiento correspondiente, se recogió en un vial el medio de las placas de cultivo que contenía células en suspensión. A continuación, las células adheridas a la placa se levantaron por incubación con tripsina y se añadieron al tubo que contenía el medio con las células en suspensión. Los tubos se centrifugaron a  $390 \times g$  y  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos y los precipitados obtenidos se lavaron con PBS frío. A continuación las células se fijaron con 80 % de etanol frío a  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante al menos 16 horas. Transcurrido ese tiempo, las células se lavaron con PBS frío y se incubaron en una solución de PBS con 0,1 mg/mL de RNasa A y 5  $\mu\text{g/mL}$  de yoduro de propidio a  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. A continuación las células se adquirieron en un citómetro de flujo y se determinó la fluorescencia emitida a 585/42 nm. Se consideraron células apoptóticas aquellas que poseen un contenido de ADN inferior al de la fase G1.

### 6.2. Determinación del nivel de exposición de fosfatidilserina

Para determinar la exposición de fosfatidil serina (PS) en la cara externa de la membrana celular se utilizó el kit *Anexin V-FITC Apoptosis Detection Kit*. La Anexina V-FITC es una proteína recombinante marcada con el fluorocromo FITC ( $\lambda_{\text{emisión}}$ : 520 nm aproximadamente) que se une fácilmente a las moléculas de PS, lo que nos permite reconocer las células que se encuentran en proceso de muerte. Para distinguir entre

un proceso de apoptosis (en el que aumenta la concentración de PS en el exterior de la célula) y un proceso de necrosis (en el cual se produce la ruptura de la membrana celular permitiendo el paso de la Anexina V-FITC al interior celular donde se puede unir a la PS) se realizó un marcaje simultáneo con IP, que no atraviesa la membrana celular intacta, y por lo tanto solamente marca el ADN de las células necróticas y de las células en fase tardía del proceso de apoptosis. Así, se cuantificó la población de células en proceso de apoptosis temprana (marcadas solo con Anexina V-FITC).

Tras los distintos tratamientos se recogieron tanto las células en suspensión como las adheridas a la placa (mediante la adición de tripsina). Se centrifugaron 5 minutos a  $390 \times g$  a  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , se lavaron con PBS frío, se resuspendieron en un tampón con  $0,5 \mu\text{g/mL}$  de Anexina V-FITC y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. A continuación se centrifugaron 5 minutos a  $390 \times g$  a  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  y se resuspendieron de nuevo en un tampón con  $0,6 \mu\text{g/mL}$  de yoduro de propidio. Las células se adquirieron en un citómetro de flujo y se determinó la fluorescencia emitida a  $530/30 \text{ nm}$  (Anexina V-FITC) y  $585/42 \text{ nm}$  (IP). Se analizaron los porcentajes de células marcadas solo con Anexina V-FITC y marcadas con ambos, yoduro de propidio y Anexina V-FITC.

### **6.3. Determinación del potencial de membrana mitocondrial**

Para determinar el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) de las células se utilizó la sonda tetrametilrodaminmetilester perclorato (TMRM) ( $\lambda_{\text{emisión}}$ :  $575 \text{ nm}$  aproximadamente).

Al finalizar los tratamientos correspondientes, se recogieron tanto las células en suspensión, como las adheridas a la placa (mediante la adición de tripsina). Éstas se centrifugaron 5 minutos a  $390 \times g$  a  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , se lavaron con PBS frío y se resuspendieron en una solución  $50 \text{ nM}$  de sonda TMRM en PBS. Se incubaron a  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos en oscuridad y se mantuvieron en esas condiciones hasta el momento de adquisición en el citómetro de flujo. Para terminar, se analizó la intensidad de la fluorescencia emitida a  $585/42 \text{ nm}$  y se determinó el porcentaje de células con diferente potencial de membrana mitocondrial.

## 7. ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE NF- $\kappa$ B

### 7.1. Cuantificación de la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B por ensayo de luciferasa

Las células se transfectaron con 0,2  $\mu$ g del plásmido reportero de luciferasa pGL3-3xNF- $\kappa$ B-Tk-Luc, que posee un tándem de tres repeticiones del motivo de unión a NF- $\kappa$ B del gen H-2k, incluido en el promotor de la timidina quinasa. Al mismo tiempo se transfectaron con 0,02  $\mu$ g del gen de la proteína renilla, controlado por el promotor de timidina quinasa (pRL-TK-Renilla), como control interno de transfección. Además, dependiendo de las condiciones de cada experimento, las células se trataron con diferentes inhibidores o se cotransfectaron con vectores de expresión de diversas proteínas u oligos de *siRNA* específicos junto con los plásmidos reporteros, tal y como se especifica a continuación y en los respectivos pies de figura:

- En los experimentos en los que se requirió la sobreexpresión de diferentes proteínas, se co-transfectaron los plásmidos codificantes junto con los plásmidos reporteros tal y como se especifica en el apartado 2.1.
- En el caso de los experimentos en que se silenció la expresión de B-RAF, se contranfectaron los plásmidos reporteros de luciferasa y renilla con el *siRNA*, pero en este caso se utilizaron los volúmenes de mezcla de transfección utilizados para transfectar *siRNA* (apartado 2.2.).
- Para los experimentos en los que se trataron las células con distintos fármacos, la transfección se realizó en las mismas condiciones que el primer caso. 24 horas después de la transfección, se añadieron los tratamientos correspondientes.

Una vez finalizados los tratamientos correspondientes, se prepararon los extractos celulares y se determinó la actividad luciferasa y renilla siguiendo el siguiente protocolo adaptado del descrito en el manual de “Luciferase assay system” de Promega: Pasadas 72 horas desde la transfección, las células se lavaron con PBS y se añadieron 100  $\mu$ l de tampón de lisis PLB (*Passive Lysis Buffer*). Los extractos celulares se incubaron 10 minutos en hielo; a continuación se centrifugaron a 16000 x g durante 5 minutos a 4 °C y se recogieron los sobrenadantes. La actividad luciferasa se cuantificó en un luminómetro FB12 (Berthold). Para ello se tomaron 10  $\mu$ l del extracto celular y se le añadió 25  $\mu$ l del tampón que contiene el sustrato de la luciferasa y se midió su actividad. A continuación se añadió a la misma muestra el tampón que contiene el sustrato de la renilla y detiene la acción de la luciferasa, y se midió la actividad renilla. La actividad luciferasa se normalizó con la actividad renilla y se

expresó como número de veces de aumento respecto al control. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias de luciferasa.

## **7.2. Cuantificación de la actividad transactivadora de p65/RelA mediante ensayo de luciferasa**

En este caso las células se cotransfectaron con 0,2 µg del plásmido que codifica para la proteína quimérica formada por el dominio de unión al DNA de Gal4 fusionado a la proteína p65/RelA humana completa (p65-Gal4), junto con los plásmidos reporteros pGal4-Luc (0,4 µg) y el pRL-TK-Renilla (0,02 µg). Tras los distintos tratamientos se prepararon los extractos celulares y se determinaron las actividades luciferasa y renilla como se ha descrito anteriormente.

## **8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD QUINASA DE LAS PROTEÍNAS RAF**

### **8.1. Expresión de las proteínas de fusión GST-MEK1 y GST-ERK2**

Se partió de la cepa bacteriana BL21 de *E. Coli* transformada con el vector de expresión pGEX, que contenía el gen codificante de la proteína de fusión GST-MEK1 o el gen que codifica para GST-ERK2. Tras cultivar las bacterias, la expresión de las proteínas se indujo añadiendo al medio 1 mM de IPTG durante 4-5 horas a 37 °C. A continuación, las células se centrifugaron durante 10 minutos a 2960 x g a 4 °C y el precipitado bacteriano se resuspendió en 20 mL de tampón de homogeneización (1 mM Tris pH 7.5, 5 mM NaCl, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 1 % Tritón X-100, 0,05 % β-mercaptoetanol, 50 µM PMSF, 1 mM benzamidina, 5 µg/mL leupeptina, 5 µg/mL pepstatina A y 5 µg/mL aprotinina). Las células se sonicaron de 6 a 8 veces durante un minuto en hielo y posteriormente se centrifugaron durante 10 minutos a 13800 x g a 4 °C. El sobrenadante se incubó con 0,5 mL de una matriz de Glutation-sefarosa 4B durante 1 hora a 4 °C en un agitador orbital y transcurrido este tiempo se centrifugó a 390 x g durante 5 minutos a 4 °C. A continuación se eluyeron las proteínas GST-MEK1 o GST-ERK2 con una solución que contenía glutation reducido (50 mM Tris pH 8, 20 mM GSH), guardando los sobrenadantes obtenidos. El GSH se eliminó mediante diálisis en un tampón que contenía: 50 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM benzamidina, 10 mM β-mercaptoetanol, 0,03 % NP-40, 5 % glicerol. Tras la diálisis, al extracto celular obtenido se le añadió 10 % de glicerol y se mantuvo a -80 °C hasta su utilización. Para comprobar la pureza y la sobreexpresión de estas

proteínas, los extractos se separaron electroforéticamente y se tiñeron con azul Coomassie.

## 8.2. Inmunoprecipitación de proteínas

La purificación de las proteínas RAF se realizó a partir de extractos celulares preparados con el tampón de lisis REB. La composición de dicho tampón es la siguiente:

- Tampón REB: 20 mM, Tris-HCl pH 7.5, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 10 % (v/v) glicerol, 1 % (v/v) Tritón X-100, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM NaF, 0,2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 50 μM fenil-metil-sulfonil fluoruro, 1 mM benzamidina, 5 μg/ml leupeptina, 5 μg/ml pepstatina A y 5 μg/ml aprotinina.

Para ello se preparó el complejo anticuerpo:proteína G-Sepharosa. La proteína G-Sepharosa se lavó 3 veces con PBS, centrifugándose cada vez a 1500 x g durante 1 minuto a 4 °C. Para cada muestra se utilizaron 10 μL de proteína G-Sepharosa y ésta se incubó con el anticuerpo correspondiente (10 μg en el caso de anti-9E10 y 2 μg en el caso de anti-B-RAF y anti-C-RAF) durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se lavó el complejo 3 veces. A continuación se incubó el extracto celular con el complejo durante 2 horas a 4 °C. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 1500 x g durante 2 minutos a 4 °C para separar el inmunoprecipitado del sobrenadante. El inmunoprecipitado se lavó 3 veces con tampón base, centrifugándolo de nuevo a 1500 x g a 4 °C durante 2 minutos cada vez y tras retirar el sobrenadante se determinó la actividad quinasa como se describe a continuación.

## 8.3. Ensayo actividad quinasa

La actividad quinasa de RAF se determinó mediante un ensayo acoplado que consiste en la activación de la cascada RAF-MEK-ERK en dos pasos. El primero consiste en la activación de MEK por la proteína RAF inmunoprecipitada, que una vez activa, fosforila a ERK. A continuación, la activación de ERK se determinó en una segunda reacción, en la que ERK fosforila al sustrato MBP (*Myelin Basic Protein*). Esta última reacción permite cuantificar el grado de activación de RAF, ya que en el medio de reacción se pone ATP marcado con <sup>32</sup>P.

Para ello, una vez finalizada la inmunoprecipitación, se realizaron 3 lavados sucesivos con 3 tampones de lavado, cuya composición es la misma excepto por la concentración de KCl. La composición común es: 30 mM Tris-HCl pH 7.5, 0,1 mM

EDTA, 0,1 % Tritón X-100, 5 mM NaF, 0,2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 % glicerol, 0,3 % β-mercaptoetanol. La concentración de KCl es 1 M para el primer tampón, 0,1 M para el segundo y nula para el tercero.

A continuación el inmunoprecipitado se resuspendió en 20 μL de tampón MKK/MK que contiene GST-MEK y GST-ERK, sustratos sucesivos de las dos primeras reacciones quinasa (30 mM Tris-HCl pH 7.5, 0,1 mM EDTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % Tritón X-100, 5 mM NaF, 0,2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 8 mM ATP, 0,3 % β-mercaptoetanol, 6,5 μg/mL GST-MEK y 100 μg/mL GST-ERK). La reacción se lleva a cabo a 30 °C durante 30 minutos en el caso de C-RAF y 15 minutos en el caso de B-RAF, ya que B-RAF es mucho más activo que C-RAF. Para detener la reacción se añadieron 20 μL de tampón de parada (30 mM Tris-HCl pH 7.5, 6 mM EDTA, 0,1 % Tritón X-100, 5 mM NaF, 0,2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0,3 % β-mercaptoetanol) que secuestra el Mg<sup>2+</sup> del tampón MKK/MK.

Para la siguiente reacción se tomaron 5 μL del sobrenadante de la mezcla de reacción anterior (IP-MKK/MK-parada) a los que se añadieron 25 μL del tampón MBP (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0,1 mM EDTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % Tritón X-100, 5 mM NaF, 0,2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0,1 mM ATP, 0,3 % β-mercaptoetanol, 200 μL/mL BSA, 50 μCi [γ-<sup>32</sup>P]ATP (3000 Ci/mmol)), que contiene 0,5 mg/mL de MBP. La reacción se llevó a cabo durante 10 minutos a 30 °C. La reacción se detuvo mediante la adición de 25 μL de la mezcla en papel p81 y lavado en ácido fosfórico (75 mM) durante 30 minutos. Así, se eliminó el ATP radioactivo libre, mientras que la MBP fosforilada queda retenida en el papel. Finalmente se cuantificó la cantidad de <sup>32</sup>P contenido en el papel por medida en un contador de centelleo (Winspectral 1414 Liquid Scintillation Counter, WALLAC).

## 9. ANÁLISIS DE LOS DATOS

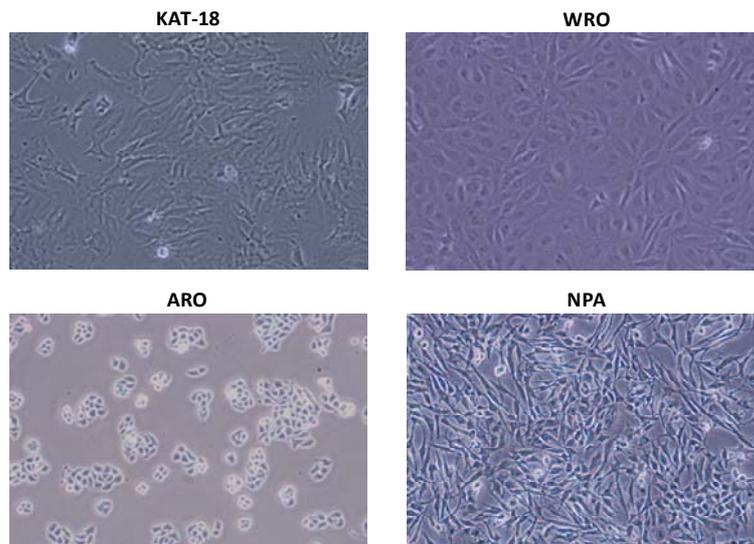
Para el procesamiento de los datos se utilizó el programa informático Microsoft Office Excel. Para el análisis estadístico de los resultados, se realizó una comparación de medias con la prueba T de dos colas y no pareado con el programa Microsoft Office Excel. Las diferencias se consideraron significativas cuando el p-valor fue inferior a 0,05.

## *Resultados*



El objetivo general de este trabajo es determinar la implicación de B-RAF en el proceso de transformación celular e identificar nuevos mecanismos por los que formas mutadas de esta proteína inducen el desarrollo de tumores. Para ello, utilizamos cuatro líneas celulares derivadas de distintos tipos de cáncer, dos que contienen B-RAF silvestre (B-RAF wt), las células WRO, que proceden de un tumor folicular tiroideo (FTC), y las células KAT-18, procedentes de un carcinoma anaplásico tiroideo (ATC), y dos que contienen la mutación V600E (<sup>V600E</sup>B-RAF), las células NPA, previamente descritas como células tumorales papilares tiroideas (PTC), pero que una vez analizadas genéticamente han resultado ser células derivadas de melanoma, y las células ARO, descritas anteriormente como células tumorales tiroideas anaplásicas (ATC) y actualmente identificadas como células derivadas de cáncer de colon.

Como se observa en la figura 19, estas células presentan una morfología distinta. Las células WRO, KAT-18 y NPA poseen un fenotipo similar a fibroblastos, todas ellas crecen en monocapa con morfología celular poligonal y prolongaciones similares a filopodios cuando se encuentran en semiconfluencia, mientras que presentan un engrosamiento del citoplasma y pérdida de las prolongaciones cuando alcanzan la confluencia. En cuanto a las células ARO, estas células crecen formando agregados similares a folicúlos, presentan un citoplasma más pequeño y a pesar de llegar a la confluencia nunca llenan la superficie de cultivo.

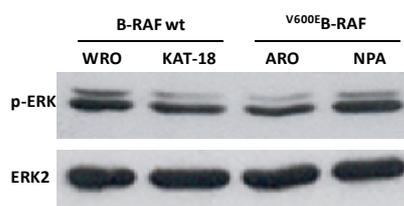


**Figura 19. Morfología de las células KAT-18, WRO, ARO y NPA.** Las células se fotografiaron en un microscopio óptico de contraste de fases.

## 1. EFECTO DE LA VÍA RAF-MEK-ERK SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES

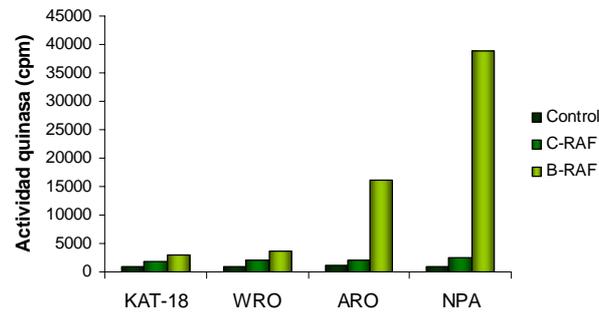
### 1.1. Estado de activación de la vía RAF-MEK-ERK en células KAT-18, WRO, ARO Y NPA

En primer lugar estudiamos el papel que juega B-RAF sobre el estado de activación de la vía MEK-ERK y la proliferación celular en las diferentes líneas tumorales. Para ello, analizamos el estado de fosforilación de ERK, ya que al ser la proteína final de esta cascada de señalización es representativo del estado de activación de la vía. En la figura 20 se puede observar que en todas las líneas celulares, independientemente del estado de activación de B-RAF, la proteína ERK se encuentra fosforilada de forma basal.



**Figura 20. La proteína ERK se encuentra constitutivamente activa en las líneas tumorales estudiadas.** Las líneas celulares WRO, KAT-18, ARO y NPA se incubaron con medio suplementado con 10 % FBS. Posteriormente se prepararon extractos celulares de cada línea y se realizó un *western blot* utilizando un anticuerpo específico de la proteína ERK fosforilada (p-ERK). Las membranas se rehibridaron con un anticuerpo específico de ERK2 como control de carga. Los datos muestran un experimento representativo de tres realizados independientemente con similares resultados.

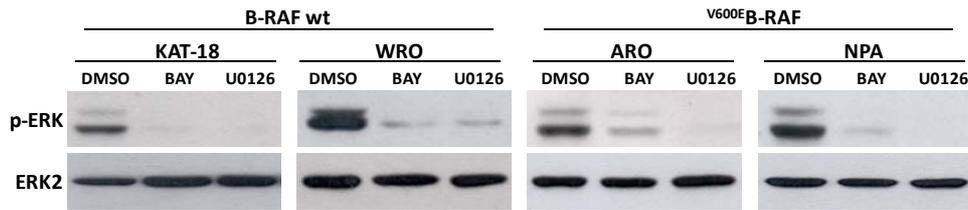
Estas líneas celulares no presentan mutaciones en ninguno de los otros miembros de la familia de proteínas RAF: C-RAF y A-RAF, por lo que estudiamos si existían diferencias en los niveles basales de actividad de las isoformas C-RAF y B-RAF. Para comprobarlo, determinamos sus niveles de activación en las diferentes líneas celulares utilizadas mediante ensayos acoplados de quinasas, tras la inmunoprecipitación de C-RAF o B-RAF con anticuerpos específicos. Como se muestra en la figura 21, los niveles de actividad de C-RAF en todas las líneas celulares son bajos; sin embargo, mientras que la actividad de B-RAF en las células KAT-18 y WRO, que tienen la proteína B-RAF silvestre, también es baja, en las células ARO y NPA, que poseen la mutación V600E, es mucho mayor.



**Figura 21. Actividad quinasa de las proteínas C-RAF y B-RAF en las líneas tumorales estudiadas.**

Las líneas celulares KAT-18, WRO, ARO y NPA se incubaron con medio suplementado con 10 % FBS durante 24 horas. Posteriormente se prepararon extractos celulares de cada línea y se inmunoprecipitaron las proteínas C-RAF y B-RAF con anticuerpos específicos para ellas. A continuación se realizó un ensayo de actividad quinasa en el inmunoprecipitado utilizando GST-MEK, GST-ERK y MBP como sustratos. Los datos muestran un experimento representativo de tres independientes con similares resultados.

A continuación, para demostrar que la fosforilación constitutiva de ERK se debía a la activación de la vía RAF-MEK, determinamos los niveles de fosforilación de estas proteínas utilizando dos inhibidores de esta cascada. Por una parte, utilizamos el inhibidor multiquinasa BAY 43-9006, que bloquea la activación de B-RAF y C-RAF. El otro inhibidor empleado es el U0126. Este inhibidor impide la activación de ERK por MEK, sin afectar a la fosforilación y activación de esta última. Así, cuando analizamos la fosforilación de ERK en presencia de ambos inhibidores, observamos que los tratamientos con BAY 43-9006 o U0126 anulan por completo la fosforilación de ERK pero no la expresión de esta proteína (figura 22). Por lo tanto, la fosforilación constitutiva de ERK en estas células se debe a la activación de la vía RAF-MEK. Sin embargo, el hecho de que las células WRO y KAT-18 no presenten mutaciones en C-RAF y B-RAF indica que esta ruta se regula de forma diferente en células con o sin B-RAF oncogénico.

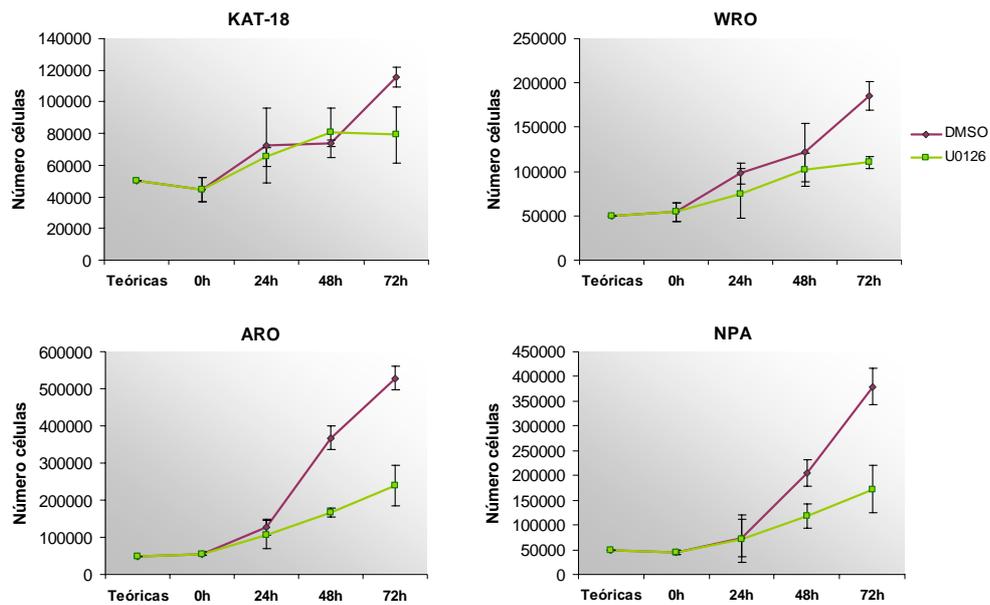


**Figura 22. La proteína ERK está activada por la vía RAF-MEK.** Las líneas celulares KAT-18, WRO, ARO y NPA se incubaron con medio suplementado con 10% FBS durante 24 horas en ausencia o presencia de DMSO, 10  $\mu$ M U0126 o 10  $\mu$ M BAY 43-9006 (BAY). A continuación se prepararon extractos celulares y la fosforilación de ERK1/2 se detectó por *western blot* utilizando un anticuerpo específico de la proteína ERK fosforilada (p-ERK). Las membranas se rehibridaron con un anticuerpo específico de ERK2 como control de carga. Los datos muestran un experimento representativo realizado tres veces con resultados similares.

## 1.2. Papel de la vía RAF-MEK-ERK sobre la proliferación de células KAT-18, WRO, ARO y NPA

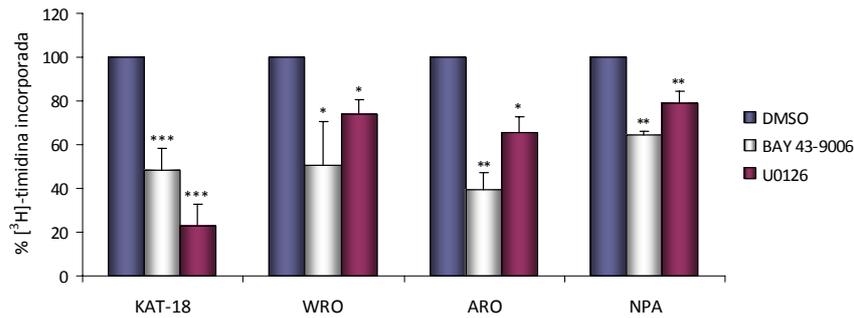
La vía RAF-MEK-ERK ha sido ampliamente descrita como una de las vías responsables del crecimiento incontrolado de las células tumorales. Una vez comprobado su estado de activación, estudiamos la implicación de la misma en la proliferación celular de las diferentes líneas tumorales empleadas, mediante curvas de crecimiento y determinación de los niveles de síntesis de ADN.

Para determinar la implicación de MEK-ERK en el proceso de proliferación celular realizamos curvas de crecimiento en las células KAT-18, WRO, ARO y NPA, sin tratar o tratadas con el inhibidor de MEK U0126, durante 24, 48 y 72 horas. Como se muestra en la figura 23, la inhibición de MEK produce una disminución de la proliferación en las cuatro líneas celulares. Sin embargo, mientras que la inhibición de la proliferación en las células KAT-18 y WRO a las 72 horas de tratamiento fue de aproximadamente un 40 %, en las células con <sup>V600E</sup>B-RAF, ARO y NPA, la inhibición de la proliferación fue mayor, alcanzando aproximadamente un 60 %. Estos resultados demuestran que aunque la proliferación de las distintas líneas celulares tumorales depende de la vía MEK-ERK, las células que poseen la mutación <sup>V600E</sup>B-RAF son mucho más sensibles a la inhibición de MEK que las que poseen B-RAF silvestre (figura 23).



**Figura 23. La inhibición de la vía MEK-ERK disminuye la proliferación celular.** Curvas de crecimiento de células KAT-18, WRO, ARO y NPA tratadas con DMSO o 10  $\mu$ M U0126 durante 0, 24, 48 y 72 horas. Pasados esos tiempos las células viables se cuantificaron mediante conteo con un hemocitómetro. Los datos representan la media  $\pm$  ESM de al menos tres experimentos independientes.

A continuación determinamos los niveles de síntesis de ADN mediante ensayos de incorporación de timidina tritiada ( $[^3\text{H}]$ -timidina) al ADN. Para ello, tratamos las células con los inhibidores BAY 43-9006 y U0126 durante 24 horas y comparamos la cantidad de timidina incorporada por las células tratadas respecto a las células sin tratar. Los resultados muestran que el tratamiento con ambos inhibidores produce una disminución de la síntesis de ADN en las cuatro líneas celulares (figura 24). El porcentaje de inhibición es distinto entre las distintas líneas celulares, pero en todos los casos, la timidina incorporada por las células que tenían inhibida la vía MEK-ERK era entre un 30 y un 80 % menor que en el caso de las células control (figura 24).



**Figura 24. La inhibición de la vía RAF-MEK-ERK produce una disminución de la síntesis de ADN.**

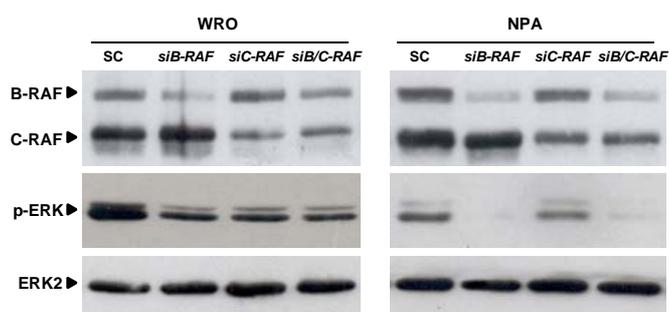
Las líneas celulares KAT-18, WRO, ARO y NPA se trataron durante 24 horas con DMSO, 10  $\mu$ M U0126 o 10  $\mu$ M BAY 43-9006. A continuación se realizó un ensayo de incorporación de [ $^3$ H]-timidina. Los resultados se expresan como porcentajes de incorporación frente a sus respectivos controles. Los datos representan la media  $\pm$  ESM de al menos tres experimentos independientes. La estadística se refiere a los tratamientos respecto a sus controles. \*0,05>P>0,01; \*\*0,01>P>0,001; \*\*\*0,001>P.

### 1.3. Papel de las proteínas RAF en la proliferación de las células WRO y NPA

Hasta el momento hemos observado que la proliferación de las distintas líneas celulares tumorales estudiadas está regulada por la vía RAF-MEK-ERK. Sin embargo, uno de nuestros objetivos es estudiar el papel que la proteína oncogénica  $V^{600E}$ B-RAF ejerce sobre dicha proliferación en las células que contienen esta mutación. Para ello, utilizamos las células WRO, que poseen la proteína B-RAF silvestre, y las células NPA, que contienen la mutación  $V^{600E}$ BRAF, en las cuales eliminamos la expresión de las proteínas B-RAF, C-RAF o ambas con ARNs pequeños de interferencia (*siRNA*) específicos para cada proteína.

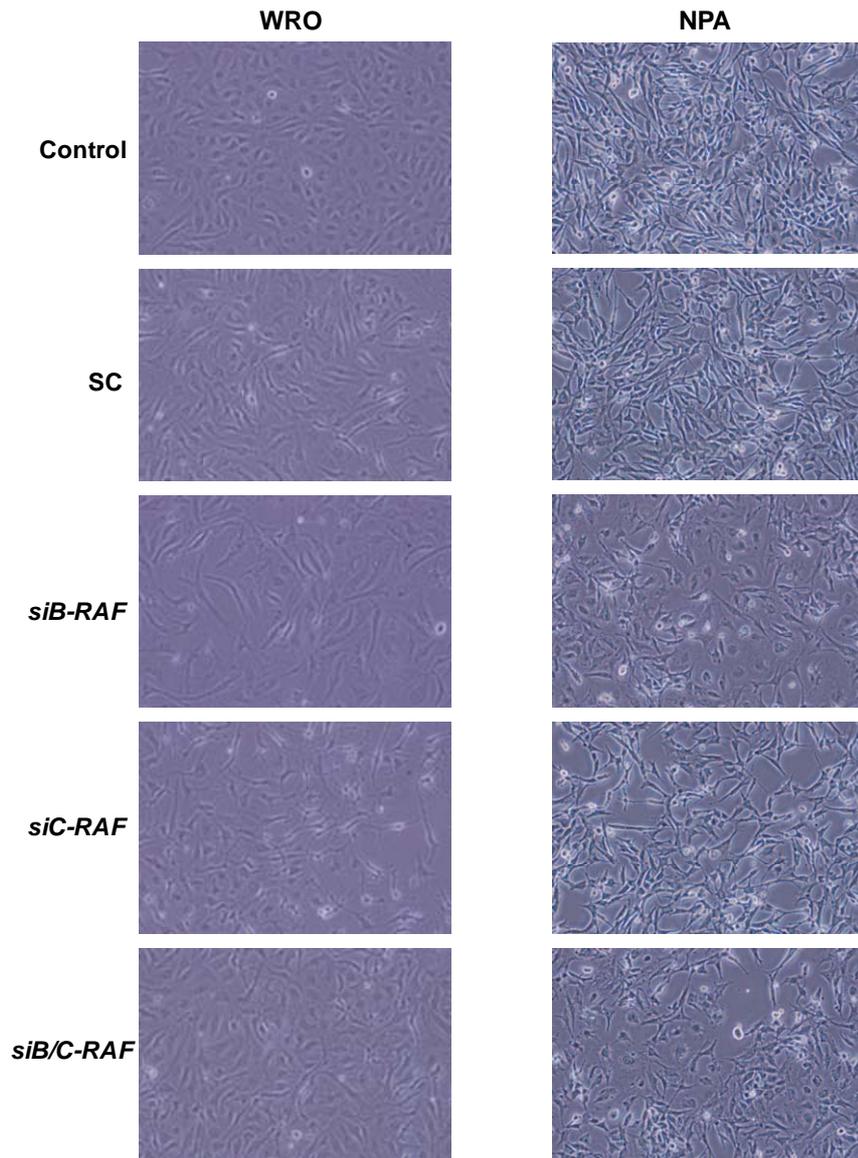
En primer lugar estudiamos qué isoforma de RAF es la responsable de la activación constitutiva de las proteínas ERK. Tras la eliminación de la expresión de estas proteínas, observamos que, en el caso de las células NPA, la falta de expresión de B-RAF produce una inhibición casi total de la fosforilación de ERK, mientras que la falta de expresión de C-RAF sola no produce ningún efecto sobre la fosforilación de estas proteínas y la eliminación conjunta de B-RAF y C-RAF produce el mismo efecto que la

eliminación de la proteína B-RAF sola (figura 25). Sin embargo, en el caso de las células WRO, la falta de expresión de B-RAF produce una disminución en la activación de ERK, pero esta disminución también se observa cuando silenciamos C-RAF o ambas proteínas simultáneamente (figura 25). Estos resultados indican que en las células NPA con la mutación <sup>V600E</sup>B-RAF, esta isoforma es la responsable de la activación constitutiva de ERK, mientras que en las células WRO, que no poseen esta mutación, la fosforilación de ERK es dependiente de B-RAF y C-RAF.



**Figura 25. La fosforilación de ERK depende del estado de activación de B-RAF.** Las células WRO y NPA se transfectaron con un oligo control (SC) u oligos específicos de *siRNA* para B-RAF (*siB-RAF*), C-RAF (*siC-RAF*) o una mezcla de ambos (*siB/C-RAF*). 72 horas después se prepararon los correspondientes extractos celulares y se realizaron *western blots* con anticuerpos específicos para las proteínas B-RAF, C-RAF y ERK fosforilada (p-ERK). Como control de carga se utilizó ERK2. Los datos mostrados son de un experimento representativo de tres independientes con similares resultados.

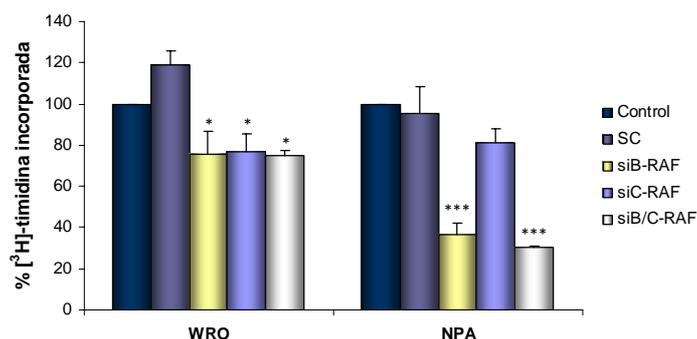
Por otra parte, mediante microscopía óptica, observamos que los tratamientos con los distintos *siRNA*, además de inhibir la fosforilación de ERK, también disminuían el número de células en las placas de cultivo y producían cambios morfológicos en ellas (figura 26). Estos cambios eran mucho más acusados en las células NPA en las que se eliminó la expresión de B-RAF. En comparación con las células control, un alto porcentaje de las células que habían sido tratadas con el *siRNA* específico de B-RAF presentaban una morfología redondeada y un tamaño celular más grande, dando lugar a una población heterogénea (figura 26).



**Figura 26. La inhibición de la expresión de las isoformas de RAF produce cambios morfológicos en las células estudiadas.** Las células WRO y NPA se transfectaron con un oligo control (SC) u oligos específicos de *siRNA* para B-RAF (*siB-RAF*), C-RAF (*siC-RAF*) o una mezcla de ambos (*siB/C-RAF*). 72 horas después las células se fotografiaron en un microscopio óptico de contraste de fases.

A continuación, analizamos los niveles de síntesis de ADN tras la inhibición de la expresión de las proteínas B-RAF y C-RAF mediante ensayos de incorporación de timidina tritiada (figura 27). Los resultados obtenidos fueron paralelos a los observados tras el tratamiento con los inhibidores BAY 43-9006 y U0126 (figura 24). En las células WRO, al eliminar la expresión de cualquiera de las dos isoformas de RAF, B-RAF o C-RAF, se produce un descenso de la síntesis de ADN de aproximadamente el 20 % y la eliminación simultánea de ambas proteínas no produce una disminución mayor (figura 27). Sin embargo, en las células NPA, el silenciamiento de B-RAF disminuye la cantidad de timidina tritiada incorporada en aproximadamente un 65 %, mientras que el silenciamiento de C-RAF apenas tiene efecto y la falta de expresión conjunta de B-RAF y C-RAF tiene el mismo efecto que el silenciamiento de B-RAF solo (figura 27).

Estos resultados demuestran que en las células que poseen la proteína oncogénica  $V^{600E}$ B-RAF la proliferación es dependiente de ella, mientras que en las células que no poseen esta mutación la proliferación es dependiente tanto de B-RAF como de C-RAF. Además, puesto que en las células con  $V^{600E}$ B-RAF la activación de ERK es totalmente dependiente de esta proteína y la eliminación de la actividad de ERK inhibe la proliferación, nuestros datos indican que  $V^{600E}$ B-RAF induce la proliferación a través de la vía MEK-ERK.



**Figura 27. La falta de expresión de C-RAF y B-RAF disminuye la síntesis de ADN de forma distinta en las células WRO y NPA.** Las células WRO y NPA se transfectaron con un oligo control (SC) u oligos específicos de *siRNA* para B-RAF (*siB-RAF*) y C-RAF (*siC-RAF*) o una mezcla de ambos (*siB/C-RAF*). 72 horas después de la transfección se realizó un ensayo de incorporación de [ $^3$ H]-timidina. Los datos representan la media  $\pm$  ESM de al menos tres experimentos independientes. La estadística se refiere a las células transfectadas respecto a sus controles de transfección; \* $0,05 > P > 0,01$ ; \*\*\* $0,001 > P$ .

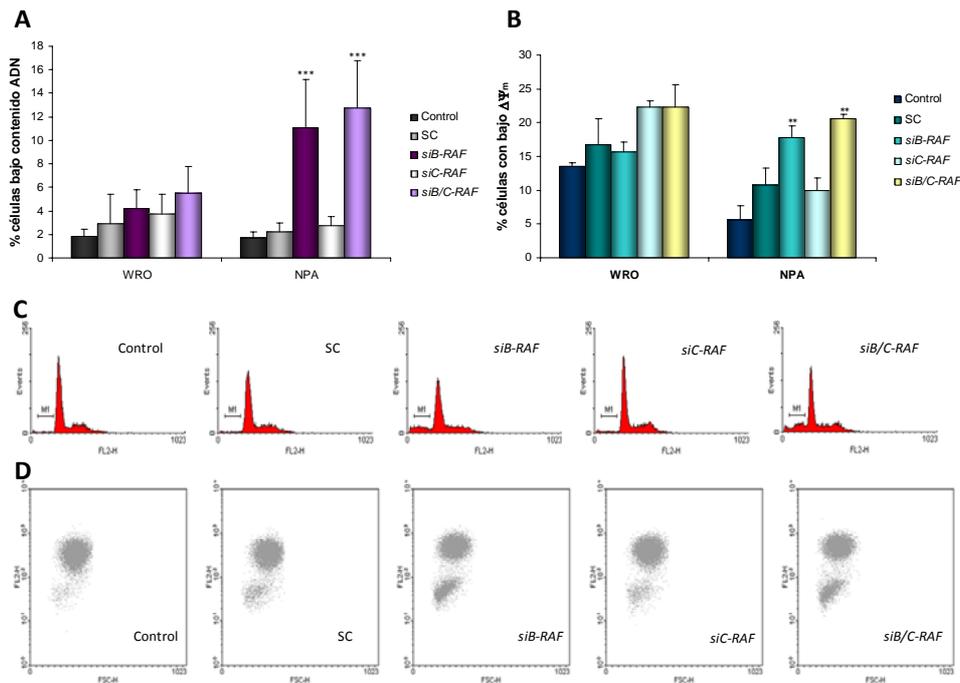
## 2. EFECTO DE B-RAF SOBRE LA APOPTOSIS EN CÉLULAS WRO Y NPA

Además de su participación en la proliferación celular, a las proteínas RAF también se les ha asignado una función antiapoptótica. La función antiapoptótica de B-RAF no ha sido muy estudiada y parece que ésta sería diferente de la de C-RAF, ya que la mayoría de los efectores que median la función antiapoptótica de C-RAF no son regulados por B-RAF; así, en células C-RAF<sup>-/-</sup>, B-RAF está activa y no compensa la falta de C-RAF, y viceversa, en células B-RAF<sup>-/-</sup>, C-RAF no puede compensar la falta de B-RAF para prevenir la apoptosis que se produce en ausencia de esta proteína. Por otra parte, nosotros observamos que además de los cambios morfológicos señalados anteriormente, la eliminación de la expresión de B-RAF en las células NPA también daba lugar a células que tenían el cuerpo celular arrugado y refringente y en algunas de ellas se podía observar la formación de burbujas en la superficie celular, características de la apoptosis (figura 26).

### 2.1. Implicación de las proteínas RAF en la supervivencia de células WRO y NPA

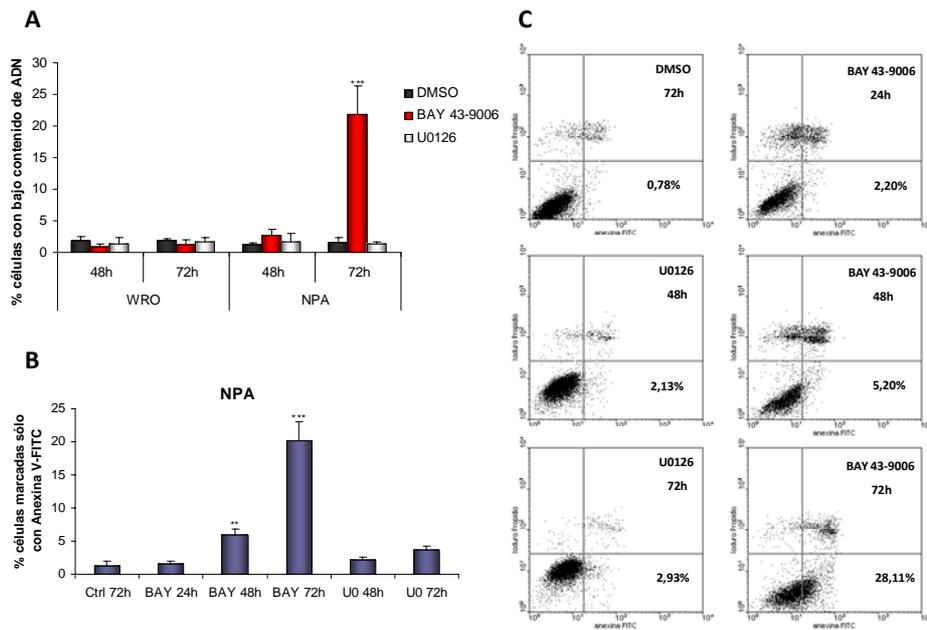
Para estudiar la implicación de B-RAF en la supervivencia de las células tumorales, en primer lugar analizamos las variaciones de la población celular con un contenido de ADN sub-G1 hipoploide, indicativo de apoptosis, mediante citometría de flujo. Para ello, silenciamos la expresión de las proteínas B-RAF y C-RAF en las células WRO y NPA y cuantificamos la muerte celular 96 horas después de la transfección. Como se observa en la figura 28, A y C, la inhibición de la expresión de estas proteínas en las células WRO no produjo un aumento significativo de la muerte celular. Sin embargo, en las células NPA transfectadas con el *siRNA* para B-RAF se producía un incremento de la población de células hipoploides, que alcanzó valores de aproximadamente el 12-15 %, mientras que con el *siRNA* de C-RAF no se observaban modificaciones en los niveles de muerte celular y el silenciamiento simultáneo de ambas proteínas producía un incremento de la muerte celular de aproximadamente un 15 %, similar al obtenido con el silenciamiento de B-RAF solo (figura 28, A y C). Para comprobar si la muerte celular producida por la falta de expresión de B-RAF era apoptosis medimos el porcentaje de células que sufren una caída en el potencial de membrana mitocondrial, otro de los parámetros característicos del proceso de apoptosis. Para ello inhibimos la expresión de las proteínas B-RAF y C-RAF en las células WRO y NPA de la misma forma que en los experimentos anteriores y mediante marcaje con la sonda TMRM determinamos dicho potencial de membrana mitocondrial. En la figura 28, B y D, se puede observar que la falta de expresión de las proteínas RAF en las

células WRO no produce ningún aumento significativo del porcentaje de células con bajo potencial de membrana mitocondrial. Sin embargo, en las células NPA sí se observa un aumento significativo en aquellas que no expresan B-RAF, siendo este aumento de aproximadamente un 10 %, y prácticamente el mismo que al inhibir la expresión de B-RAF y C-RAF simultáneamente (figura 28, B y D). Estos resultados son paralelos a los observados al medir la cantidad de células con bajo contenido de ADN, por lo tanto, podemos afirmar que la proteína <sup>V600E</sup>B-RAF induce supervivencia a las células que la contienen, y que la falta de expresión de esta proteína produce apoptosis en dichas células.



**Figura 28. La falta de expresión de <sup>V600E</sup>B-RAF induce apoptosis en las células NPA.** Las células WRO y NPA se transfectaron con un oligo control (SC) u oligos específicos de *siRNA* para B-RAF (*siB-RAF*) y C-RAF (*siC-RAF*) o una mezcla de ambos (*siB/C-RAF*). 96 horas después de la transfección se midió: A) el porcentaje de células con bajo contenido de ADN en células marcadas con yoduro de propicio y posterior análisis por citometría de flujo; B) el potencial de membrana mitocondrial mediante medida de la fluorescencia de la sonda TMRM por citometría de flujo. Los datos representan la media  $\pm$  ESM de al menos tres experimentos independientes. C) Análisis representativo del ciclo celular por marcaje con yoduro de propicio en células NPA en las que se silenció la expresión de las proteínas RAF con *siRNA* como se indica en la figura. D) Análisis representativo del marcaje con TMRM en células NPA en las que se silenció la expresión de las proteínas RAF con *siRNA* como se indica en la figura. La estadística se refiere en cada línea celular a las células transfectadas respecto a sus controles de transfección. \*\*0,01>P>0,001; \*\*\*0,001>P.

Para confirmar la función antiapoptótica de  $V^{600E}$ B-RAF y ver si esta protección frente a la apoptosis se producía a través de la activación de la vía MEK-ERK, analizamos los niveles de apoptosis en células tratadas con los inhibidores de MEK y RAF, U0126 y BAY 43-9006, respectivamente. En las células WRO ninguno de los dos inhibidores produjo un aumento de los niveles de muerte celular a las 48 o 72 horas de tratamiento (figura 29A). Sin embargo, en las células NPA, mientras que el tratamiento con el inhibidor BAY aumentó significativamente la población celular con bajo contenido de ADN, aproximadamente en un 20 % a las 72 horas, la incubación con el inhibidor U0126 tampoco produjo ninguna modificación sobre la muerte celular a los distintos tiempos de tratamiento (figura 29).



**Figura 29.**  $V^{600E}$ B-RAF protege de la apoptosis de forma independiente de la vía MEK-ERK. Las células WRO y NPA se trataron con DMSO, 10  $\mu$ M BAY 43-9006 (BAY) o 10  $\mu$ M U0126 (UO) durante los tiempos indicados. A) Porcentaje de muerte celular determinado por análisis de la población subG1 hipoploide mediante citometría de flujo. Los datos representan la media  $\pm$  ESM de al menos tres experimentos independientes. B) Niveles de exposición de fosfatidil serina mediante marcaje con Anexina V-FITC en células NPA, determinados mediante citometría de flujo. Los datos representan la media  $\pm$  ESM de al menos tres experimentos independientes. C) Análisis representativo del marcaje con Anexina V-FITC en células NPA tratadas con los inhibidores U0126 y BAY 43-9006. La estadística se refiere en cada caso a los tratamientos respecto a su control. \*\*0,01>P>0,001; \*\*\*0,001>P.

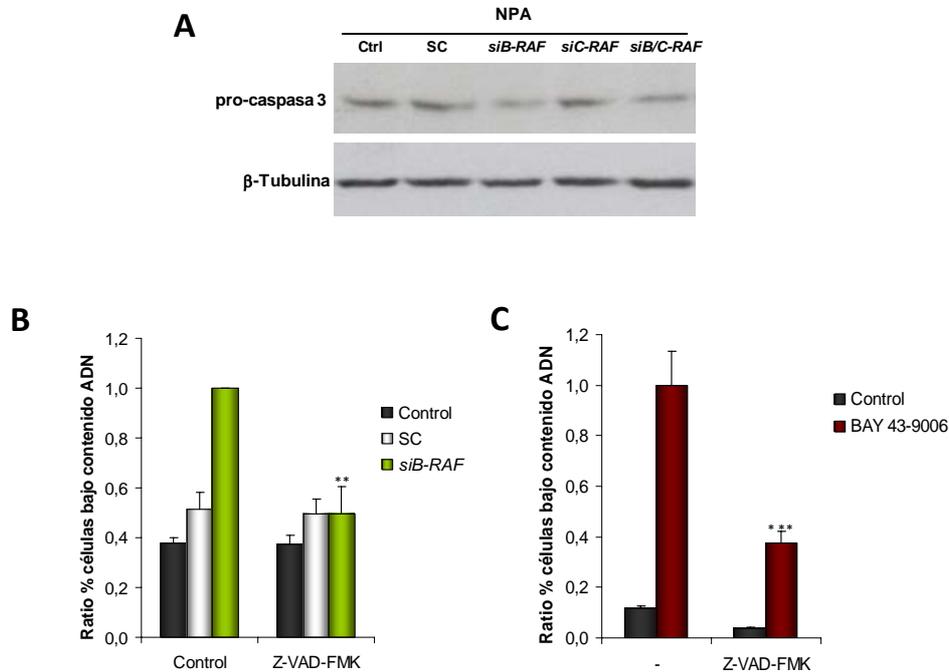
Otro parámetro característico del proceso apoptótico, previo o simultáneo a la degradación del ADN, es la exposición de fosfatidil serina en el exterior de la célula. Así, confirmamos estos resultados determinando mediante marcaje con Anexina V-FITC y posterior análisis por citometría de flujo el nivel de fosfatidil serina expuesta al exterior de la membrana celular en las células NPA. Para ello, tratamos las células con los inhibidores U0126 y BAY 43-9006 durante 24, 48 y 72 horas y medimos el porcentaje de células marcadas solo con Anexina V-FITC (figura 29, B y C). Al igual que ocurría con los experimentos de determinación de la población hipoploide, los resultados obtenidos demuestran que el tratamiento con U0126 tampoco produce un aumento de los niveles basales de células marcadas con Anexina V-FITC, mientras que la incubación con BAY 43-9006 aumenta el porcentaje de células marcadas solo con Anexina V-FITC a medida que aumenta el tiempo de incubación, observándose un incremento de la apoptosis a partir de las 48 horas (figura 29, B y C).

Estos resultados demuestran que la proteína B-RAF oncogénica produce una señal de supervivencia para las células tumorales que la contienen y que su eliminación en estas células induce el proceso de apoptosis por un mecanismo independiente de la activación de la vía MEK-ERK.

## **2.2. Relación entre las proteínas RAF y proteínas de la maquinaria apoptótica celular**

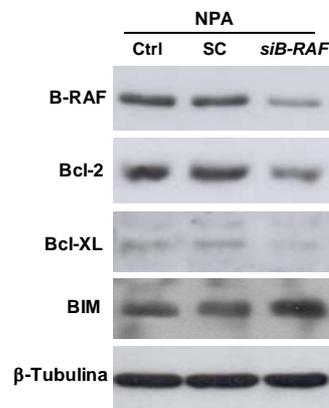
Otro evento indicativo de apoptosis es la activación de la cascada de las caspasas. Para profundizar en el papel de <sup>V600E</sup>B-RAF sobre la apoptosis en las células NPA, también examinamos los efectos de la falta de expresión de B-RAF y de la inhibición de su actividad con BAY 43-9006 sobre la activación de las proteínas proapoptóticas caspasas (figura 30). Estas proteínas se activan por proteólisis y esto es un paso significativo en la fase de ejecución de la apoptosis. En primer lugar analizamos el estado de activación de la proteína caspasa 3 en las células NPA. Para ello, determinamos los niveles de la proteína completa, tras silenciar la expresión de las proteínas RAF con *siRNA*. En la figura 30A se puede observar que la eliminación de <sup>V600E</sup>B-RAF en estas células disminuye los niveles de caspasa 3 inactiva, mientras que la eliminación de C-RAF no tiene ningún efecto. Por otra parte, examinamos si la eliminación de la actividad y/o expresión de <sup>V600E</sup>B-RAF producía apoptosis a través de la activación de caspasas en células NPA. Para ello, las células transfectadas con *siRNA* para B-RAF o incubadas con BAY 43-9006 se pretrataron con el inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK (figura 30, B y C). Los resultados obtenidos demuestran que el

tratamiento de las células NPA con Z-VAD-FMK, de forma previa al silenciamiento de B-RAF, revierte la muerte celular producida por la falta de  $V600E$ B-RAF (figura 30B) y además también bloquea el aumento de muerte celular inducido por BAY 43-9006 (figura 30C), lo que indica que la muerte celular inducida por la falta de expresión o de actividad de B-RAF es apoptosis producida a través de la activación de caspasas.



**Figura 30. La falta de expresión de  $V600E$ B-RAF produce apoptosis a través de la activación de caspasas.** A y B) En las células NPA se silenció la expresión de las proteínas RAF con oligos específicos de *siRNA*. Como control de la transfección se utilizó el oligo de *siRNA* inespecífico SC. A) A las 72 horas se prepararon los correspondientes extractos celulares y se determinaron los niveles de procaspasa 3 inactiva mediante *western blot*, utilizando un anticuerpo específico para la proteína. Como control de carga se utilizó  $\beta$ -tubulina. Los datos muestran un experimento representativo de tres independientes con similares resultados. B) 6 horas después de la transfección con los oligos de *siRNA*, las células NPA se trataron con 40  $\mu$ M Z-VAD-FMK. 96 horas después de la transfección se midió el porcentaje de células con bajo contenido de ADN mediante análisis de las células marcadas con IP por citometría de flujo. Los datos representan la media  $\pm$  ESM de al menos tres experimentos independientes. C) Las células NPA se pretrataron con 40  $\mu$ M Z-VAD-FMK durante 1 hora previa al tratamiento de 72 horas con 10  $\mu$ M BAY 43-9006. Pasado ese tiempo se midió el porcentaje de muerte celular en células marcadas con IP mediante citometría de flujo. Los datos representan la media  $\pm$  ESM de al menos tres experimentos independientes. La estadística se refiere a los tratamientos indicados respecto a los mismos sin pretratar con Z-VAD-FMK; \*\*0,01>P>0,001; \*\*\*0,001>P.

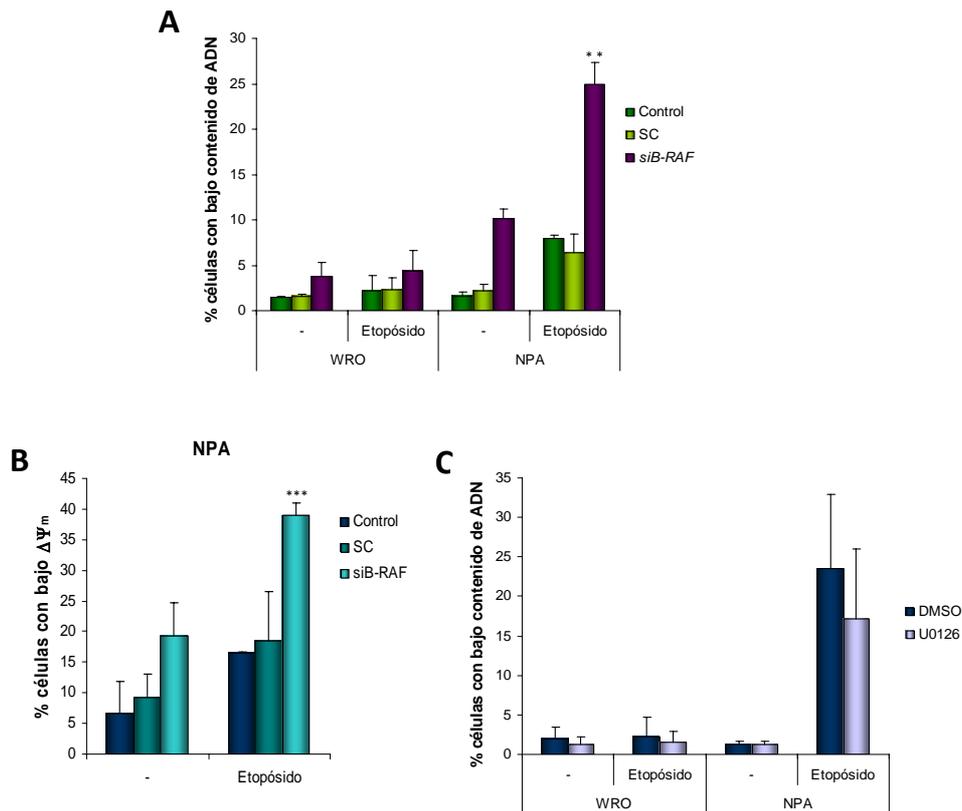
Estudios previos de otros investigadores han demostrado que la sobreexpresión de  $V^{600E}$ B-RAF disminuye los niveles y la actividad de algunas proteínas proapoptóticas de la familia de Bcl-2, como las proteínas “BH3-only” BIM y BAD (289,290). Puesto que nuestros datos muestran que la falta de expresión de  $V^{600E}$ B-RAF aumenta la apoptosis en las células NPA, nos preguntamos si alguna proteína de esta familia sería diana de  $V^{600E}$ B-RAF en estas células. Para ello, estudiamos el efecto del silenciamiento de B-RAF sobre los niveles de expresión de la proteína proapoptótica BIM y las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL mediante *western blot* (figura 31). Nosotros observamos que la falta de expresión de  $V^{600E}$ B-RAF produce una disminución considerable de los niveles de expresión de Bcl-2 y Bcl-XL, mientras que aumenta los niveles de la proteína BIM (figura 31), lo que indica que  $V^{600E}$ B-RAF induce supervivencia celular mediante la regulación de la expresión de estas proteínas de la maquinaria apoptótica de las células.



**Figura 31.**  $V^{600E}$ B-RAF regula la expresión de proteínas implicadas en apoptosis. En las células NPA se silenció la expresión de B-RAF con *siRNA* específico. 72 horas después de la transfección se prepararon extractos celulares y se determinaron los niveles de las proteínas BIM, Bcl-2 y Bcl-XL mediante *western blot*, utilizando anticuerpos específicos para cada una de ellas. Las membranas se rehibridaron con un anticuerpo anti- $\beta$ -tubulina como control de carga. El silenciamiento de B-RAF se comprobó utilizando un anticuerpo específico para esta proteína. Los datos muestran un experimento representativo de tres independientes con similares resultados.

### 2.3. Papel de <sup>V600E</sup>B-RAF sobre la apoptosis producida por el agente proapoptótico etopósido

Las células tumorales suelen presentar una elevada resistencia a la apoptosis y nuestros datos demuestran que los niveles de muerte celular producida por el silenciamiento de B-RAF no son muy altos. Por ello, estudiamos si la falta de expresión de <sup>V600E</sup>B-RAF potenciaba los efectos de algún factor proapoptótico como el etopósido, inhibidor de la topoisomerasa II. Para estos experimentos, una vez silenciada la proteína B-RAF en las células WRO y NPA, las tratamos con etopósido durante 24 horas y cuantificamos la población subG1 hipoploide (figura 32A). Los datos obtenidos muestran que el tratamiento de las células WRO con etopósido no produce ningún aumento de la apoptosis, ni en condiciones basales ni en células que carecen de B-RAF (figura 32A). Sin embargo, la incubación de las células NPA con este inhibidor produce un ligero aumento de la apoptosis en condiciones basales y además la falta de expresión de <sup>V600E</sup>B-RAF potencia este efecto, produciendo un aumento en el porcentaje de muerte en estas células, de aproximadamente un 30 % respecto a las células control (figura 32A). Por otra parte, comprobamos la apoptosis producida por la falta de <sup>V600E</sup>B-RAF y el tratamiento con etopósido en células NPA mediante la determinación de cambios en el potencial de membrana mitocondrial (figura 32B). Para ello tratamos las células con las condiciones anteriores y determinamos dicho potencial de membrana mediante marcaje con la sonda TMRM y análisis por citometría de flujo. Como cabía esperar, observamos que la falta de <sup>V600E</sup>B-RAF aumenta aproximadamente 3 veces el porcentaje de células con bajo potencial de membrana, el tratamiento con etopósido lo aumenta también 3 veces y, en las células que carecen de la proteína B-RAF, el tratamiento con etopósido produce un aumento mucho mayor de la fracción de células con bajo potencial de membrana mitocondrial, de aproximadamente el doble que el producido por la falta de <sup>V600E</sup>B-RAF o el tratamiento con etopósido por separado (figura 32B). Por último, en este caso, también observamos que la muerte producida tanto por la falta de <sup>V600E</sup>B-RAF, como por el etopósido, era independiente de la vía MEK-ERK, ya que tras la incubación con este proapoptótico de las células que previamente habían sido tratadas con U0126 no observamos ningún cambio en el porcentaje de células hipoploides producido por el tratamiento con etopósido únicamente (figura 32C).



**Figura 32. La falta de expresión de  $V^{600E}$ B-RAF potencia la apoptosis producida por el tratamiento con etopósido.** A) En las células WRO y NPA se eliminó la expresión de B-RAF con *siRNA* específico. 72 horas después de la transfección las células se trataron con etopósido (50  $\mu$ M) durante 24 horas. Pasado ese tiempo se midió el porcentaje de células hipoploides por citometría de flujo mediante marcaje con yoduro de propidio. B) Las células NPA se trataron como en A) y se midió el potencial de membrana mitocondrial por citometría de flujo mediante marcaje con la sonda TMRM. C) Las células WRO y NPA se pre-trataron con DMSO o 10  $\mu$ M U0126 durante 24 horas y posteriormente se trataron con etopósido durante otras 24 horas. Se determinó el porcentaje de células hipoploides mediante citometría de flujo por marcaje con yoduro de propidio. Los datos representan la media  $\pm$  ESM de al menos tres experimentos independientes. La estadística se refiere a las células que carecen de B-RAF tratadas con etopósido respecto a los correspondientes controles; \*\*0,01>P>0,001; \*\*\*0,001>P.

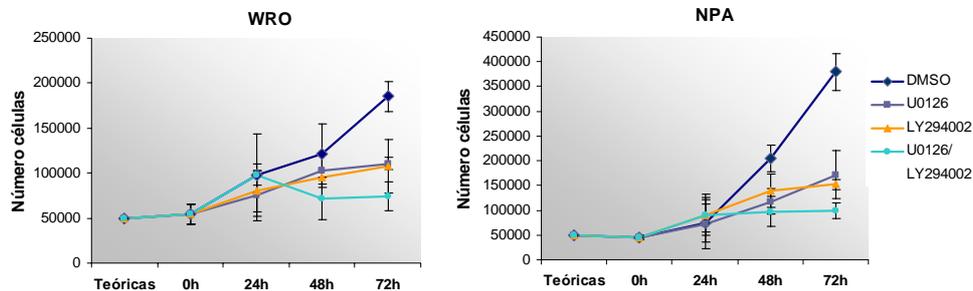
Todos estos resultados demuestran que  $V^{600E}$ B-RAF aumenta la resistencia a la apoptosis en condiciones basales e inducidas por drogas proapoptóticas, a través de un mecanismo independiente de la fosforilación de ERK, la disminución de proteínas proapoptóticas, el aumento de proteínas antiapoptóticas de la familia de Bcl-2 y mediado por la activación de caspasas.

### 3. RELACIÓN ENTRE $V^{600E}$ B-RAF Y LA VÍA PI3K-AKT EN LA SUPERVIVENCIA DE CÉLULAS TUMORALES

Alteraciones en la función de la vía de señalización PI3K-AKT también juegan un papel muy importante en la transformación celular y ha sido ampliamente descrito que esta vía está implicada en la supervivencia celular y en la protección de la apoptosis. Por ello, para conocer si el aumento de la apoptosis provocado por la ausencia de B-RAF tenía lugar a través de la vía PI3K-AKT, nos planteamos estudiar si existía alguna interacción entre ellas.

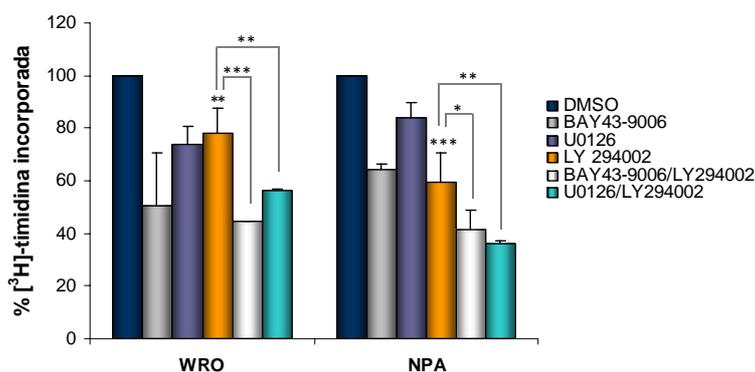
#### 3.1 Papel de PI3K en la proliferación de células tumorales con la mutación $V^{600E}$ B-RAF

En primer lugar comenzamos estudiando si la proteína PI3K tiene algún efecto sobre la proliferación de células que contienen la forma oncogénica  $V^{600E}$ B-RAF. Para ello, examinamos la tasa de proliferación mediante curvas de crecimiento de células WRO y NPA tratadas con el inhibidor de PI3K LY294002 solo y en combinación con U0126. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con LY294002 produce una disminución del crecimiento celular de aproximadamente un 40 % en las células WRO y un 60 % en las células NPA, mientras que la inhibición simultánea de PI3K y MEK con LY294002 y U0126, tiene un efecto cooperativo en ambas líneas celulares, produciendo un descenso en la tasa de proliferación del 60 % y del 80 % en las células WRO y NPA respectivamente (figura 33).



**Figura 33. La inhibición de PI3K disminuye la proliferación celular.** Las células WRO y NPA se trataron con DMSO, 20  $\mu$ M LY294002, 10  $\mu$ M BAY 43-9006 y 10  $\mu$ M U0126 según se indica durante 0, 24, 48 y 72 horas. Pasados esos tiempos se realizaron curvas de crecimiento mediante contaje de las células viables con un hemocitómetro. Los datos representan la media  $\pm$  ESM de al menos tres experimentos independientes.

Estos resultados fueron paralelos a los encontrados al realizar ensayos de incorporación de timidina tritiada (figura 34). El tratamiento con LY294002 en ambas líneas celulares produjo una disminución en la síntesis de ADN de aproximadamente un 30 %, la incubación con U0126, como habíamos mostrado previamente, también disminuyó la incorporación de timidina en un 25 %, mientras que el tratamiento conjunto con ambos inhibidores produjo una disminución aún mayor (un 60 % aproximadamente) (figura 34). Además, en este caso, analizamos el efecto del tratamiento conjunto de LY294002 con BAY 43-9006 y observamos también una mayor disminución de la síntesis de ADN, respecto a los tratamientos por separado, solo en las células NPA (figura 34).

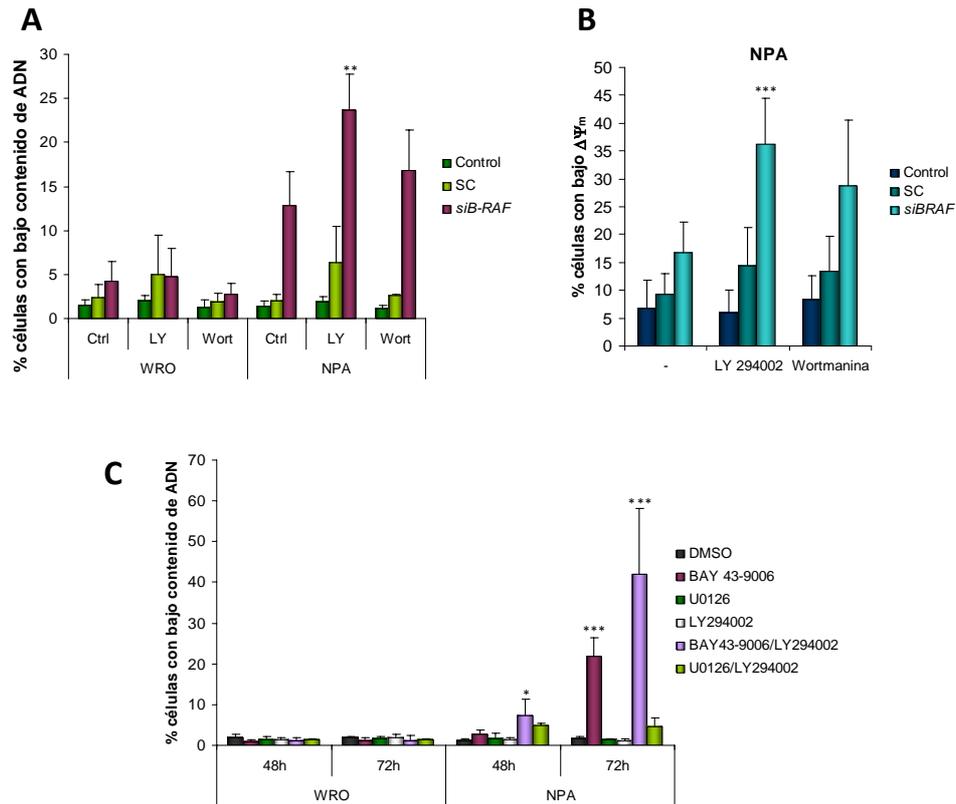


**Figura 34. B-RAF y PI3K colaboran en la proliferación de las células estudiadas.** Las células se trataron con DMSO, 10  $\mu$ M BAY 43-9006, 10  $\mu$ M U0126 y 20  $\mu$ M LY294002 durante 24 horas y se realizó un ensayo de incorporación de timidina tritiada. Los datos representan la media  $\pm$  ESM de al menos tres experimentos independientes. La estadística se refiere a los tratamientos indicados respecto a sus controles; \* 0,05>P>0,01; \*\*0,01>P>0,001; \*\*\*0,001>P.

Por todo esto podemos afirmar que tanto la vía B-RAF-MEK-ERK, como la proteína PI3K, participan en la proliferación de células tumorales que contienen la forma oncogénica <sup>V600E</sup>B-RAF y que la inhibición simultánea de ambas vías tiene un efecto sobre el crecimiento celular más potente que la inhibición las mismas por separado.

### 3.2. Papel de la vía PI3K-AKT-mTOR en la supervivencia inducida por <sup>V600E</sup>B-RAF

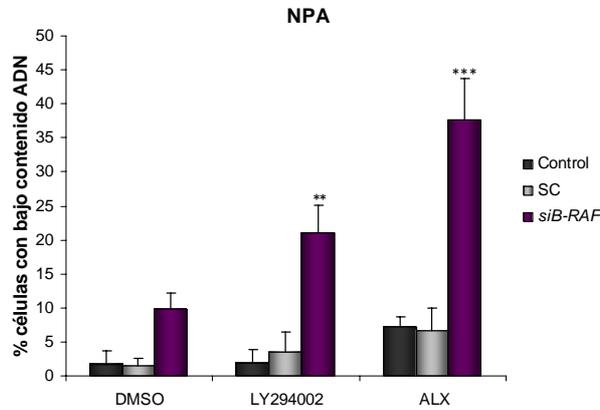
A continuación estudiamos el papel de esta vía sobre la supervivencia celular inducida por <sup>V600E</sup>B-RAF. Para ello, determinamos el porcentaje de células hipoploides mediante citometría de flujo en células WRO y NPA, con y sin B-RAF, en las que inhibimos PI3K con los inhibidores LY294002 y wortmanina. Como se muestra en la figura 35A, el tratamiento con LY294002 o wortmanina por sí solo no indujo muerte celular en ninguna de las dos líneas celulares. Sin embargo, el mismo tratamiento sobre las células NPA en las que se había eliminado previamente la expresión de <sup>V600E</sup>B-RAF produjo un aumento significativo de la apoptosis de aproximadamente un 20 %, respecto a las células control (figura 35A). En el caso de las células WRO, la eliminación de la expresión de B-RAF junto con la inhibición de la actividad de PI3K, no tuvo ningún efecto (figura 35A). Para corroborar estos resultados determinamos el porcentaje de células NPA con caída del potencial de membrana mitocondrial en las mismas condiciones (figura 35B). Los resultados obtenidos fueron similares a los observados en la determinación de la población subG1 hipoploide; la incubación con los inhibidores LY294002 y wortmanina no produjo ningún aumento en el porcentaje de células con bajo potencial de membrana, mientras que el tratamiento con estos inhibidores en células en las que eliminamos la expresión de B-RAF, si lo aumentó significativamente, respecto a las células que no contienen <sup>V600E</sup>B-RAF sin tratar (aproximadamente un 30 %) (figura 35B). Por otra parte, también determinamos la apoptosis en células WRO y NPA tratadas con el inhibidor de PI3K LY294002 solo y en combinación con los inhibidores BAY 43-9006 o U0126 (figura 35C). En este caso, además de la falta de efecto del tratamiento individual con LY294002 vista anteriormente en ambas líneas celulares, observamos que la combinación de LY294002 con U0126 tampoco produce aumento de la población hipoploide. Sin embargo, el tratamiento simultáneo con LY294002 y BAY 43-9006 duplica el porcentaje de células NPA con bajo contenido de ADN respecto al observado tras el tratamiento con BAY 43-9006 solo (figura 35C). Estos datos demuestran que la muerte celular inducida al inhibir conjuntamente <sup>V600E</sup>B-RAF y PI3K también es independiente de la vía MEK-ERK.



**Figura 35. La inhibición de PI3K tiene un efecto sinérgico con la falta de expresión de <sup>V600E</sup>B-RAF en la inducción de apoptosis.** A y B) En células WRO y NPA se silenció la expresión de B-RAF con *siRNA* específico. 48 horas después de la transfección las células se trataron con 20  $\mu$ M LY294002 o 1  $\mu$ M wortmanina, durante otras 48 horas. A) Porcentaje de células hipoploides determinado por citometría de flujo mediante marcaje con yoduro de propidio. B) Potencial de membrana mitocondrial determinado por citometría de flujo mediante marcaje con la sonda TMRM. C) Las células WRO y NPA se trataron con DMSO, 10  $\mu$ M BAY 43-9006, 10  $\mu$ M U0126 o 20  $\mu$ M LY294002 como se indica durante 48 y 72 horas. Se determinó el porcentaje de muerte celular en células marcadas con yoduro de propidio mediante citometría de flujo. Los datos representan la media  $\pm$  ESM de al menos tres experimentos independientes. A y B) La estadística se refiere a las células sin B-RAF tratadas con LY294002 respecto a las células sin B-RAF; \* 0,05>P>0,01; \*\*0,01>P>0,001; \*\*\*0,001>P. C) La estadística se refiere a las células tratadas respecto a su control; \* 0,05>P>0,01; \*\*0,01>P>0,001; \*\*\*0,001>P.

Una vez observado que la inhibición de PI3K produce un aumento de la apoptosis cuando la proteína <sup>V600E</sup>B-RAF no se expresa, estudiamos si este efecto se producía a

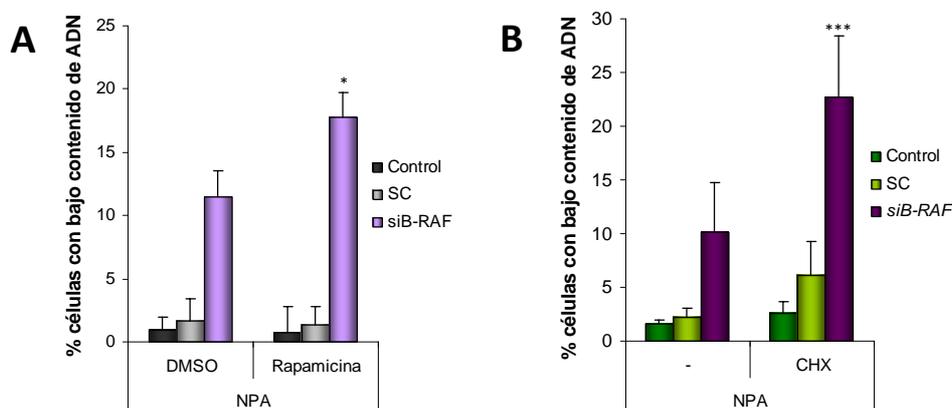
través de su proteína efectora AKT. En primer lugar analizamos los niveles de apoptosis en células NPA, que expresan o carecen de la proteína B-RAF, tratadas con el inhibidor de AKT ALX. Como se observa en la figura 36, la incubación con el inhibidor ALX produjo un ligero aumento de la apoptosis en condiciones basales, pero este aumento fue mucho mayor, de aproximadamente un 40 %, en células a las que se había inhibido la expresión de B-RAF mediante *siRNA* (figura 36).



**Figura 36. La inhibición de AKT aumenta el nivel de apoptosis producido por la falta de expresión de <sup>V600E</sup>B-RAF.** En las células NPA se silenció la expresión de B-RAF con *siRNA* específico. 48 horas después de la transfección se trataron las células con DMSO, 20  $\mu$ M LY294002 o 30  $\mu$ M ALX durante otras 48 horas. El porcentaje de células con bajo contenido de ADN se determinó en células marcadas con yoduro de propidio mediante citometría de flujo. Los datos representan la media  $\pm$  ESM de al menos tres experimentos independientes. La estadística se refiere a las células sin B-RAF tratadas con LY294002 o ALX respecto a las células sin B-RAF; \*\*0,01>P>0,001; \*\*\*0,001>P.

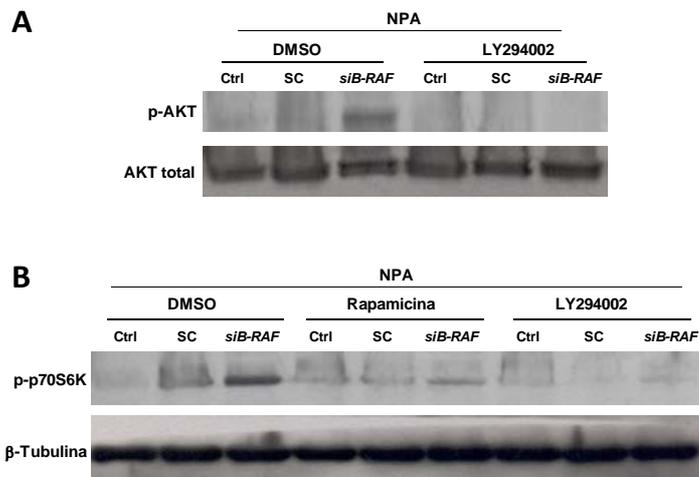
De los diferentes sustratos de AKT que median supervivencia, se ha demostrado que mTOR es un punto de convergencia en el control del crecimiento y supervivencia celular al recibir señales de las vías de Ras y PI3K (179). Es una de las proteínas que participa más activamente en la supresión de la apoptosis de células tumorales y su función también se ha relacionado con la regulación de BIM (289). Puesto que nosotros hemos demostrado anteriormente que la falta de <sup>V600E</sup>B-RAF aumenta la expresión de este factor proapoptótico, analizamos si la inhibición de mTOR tenía algún efecto sobre la apoptosis en función de que las células expresen o no <sup>V600E</sup>B-RAF. Para ello, tras la eliminación de la expresión de B-RAF, tratamos las células NPA con el inhibidor de mTOR rapamicina (figura 37A). Los resultados obtenidos al

determinar los niveles de la población sub-G1 hipoploide muestran que la rapamicina no produce apoptosis en condiciones basales; sin embargo, al igual que ocurría con la inhibición de PI3K o AKT, cuando inhibimos mTOR en células que no expresan B-RAF, la rapamicina potencia el efecto de la falta de este oncogén, produciendo un aumento significativo de la apoptosis de hasta un 20 % (figura 37A). De los dos complejos mTOR existentes, mTORC1 y mTORC2, solo el primero es inhibido por rapamicina y éste complejo está implicado en la síntesis de proteínas a través de la activación de la quinasa p70S6K. Por ello, en último lugar, comprobamos si la inhibición de la síntesis de proteínas también potenciaba el efecto de la ausencia de B-RAF en las células NPA. Para ello, las células con o sin B-RAF, tras el tratamiento con *siRNA*, se incubaron con cicloheximida. Los datos mostrados en la figura 37B demuestran que la inhibición de la síntesis de proteínas produce el mismo efecto que la rapamicina; en células con B-RAF la cicloheximida no tiene ningún efecto, mientras que el mismo tratamiento en células que carecen de B-RAF potencia el efecto de la falta de esta proteína, dando lugar a un aumento de la apoptosis de aproximadamente un 20 % (figura 37B).



**Figura 37. La inhibición de mTOR y de la síntesis de proteínas junto con la falta de expresión de B-RAF produce un aumento sinérgico de la apoptosis.** En las células NPA se silenció la expresión de B-RAF con *siRNA* específico. A) 48 horas después de la transfección las células se trataron con DMSO, 20  $\mu$ M LY294002 o 50 nM rapamicina. B) 72 horas después de la transfección las células se trataron con 5  $\mu$ g/mL cicloheximida (CHX) durante otras 24 horas. Pasadas 96 horas desde la transfección, se determinó el porcentaje de muerte celular en células marcadas con yoduro de propidio mediante citometría de flujo. Los datos representan la media  $\pm$  ESM de al menos tres experimentos independientes. La estadística se refiere a las células sin B-RAF tratadas con rapamicina o cicloheximida respecto a las células sin B-RAF; \* 0,05>P>0,01; \*\*\*0,001>P.

Dado que nuestros datos demuestran que la vía PI3K-AKT-mTOR sinergiza con <sup>V600E</sup>B-RAF en la prevención de la apoptosis y que los mayores niveles de muerte celular se obtienen cuando se inhiben ambas vías, estudiamos la relación entre ellas. En primer lugar determinamos el estado de activación de AKT en células que expresan B-RAF y en aquellas en las que inhibimos su expresión (figura 38A). En este caso, observamos que las células que expresan <sup>V600E</sup>B-RAF no presentan una fosforilación basal de AKT, pero cuando bloqueamos la expresión de B-RAF se produce un aumento significativo de su fosforilación, sin modificar sus niveles de expresión (figura 38A).



**Figura 38. La proteína <sup>V600E</sup>B-RAF inhibe la vía PI3K-AKT-mTOR-p70S6K.** Las células NPA se transfectaron con un oligo control (SC) o un oligo de *siRNA* específico para B-RAF (*siB-RAF*). 48 horas después de la transfección las células se trataron con DMSO, 20  $\mu$ M LY294002 o 50 nM rapamicina como se indica durante 48 horas. Pasadas 72 horas desde la transfección, se prepararon los correspondientes extractos celulares. Los niveles de fosforilación de AKT (p-AKT) (A) y p70S6K (p-p70S6K) (B) se determinaron mediante *western blot* utilizando anticuerpos específico cada una de ellas. Como controles de carga se utilizaron la proteína AKT total (A) y  $\beta$ -tubulina (B). Los datos muestran un experimento representativo de tres independientes con similares resultados.

Además, este aumento de fosforilación de AKT en ausencia de B-RAF, se produce a través de PI3K, ya que la inhibición de la actividad de PI3K con LY294002 anula dicho aumento (figura 38A). Estos resultados indican que la forma oncogénica <sup>V600E</sup>B-RAF inhibe la fosforilación de AKT. Para comprobar que este efecto se transmitía a través de la vía PI3K-AKT-mTOR, estudiamos el efecto de la falta de expresión de B-RAF sobre la proteína sustrato de mTOR p70S6K, la cual participa en la síntesis de proteínas (figura 38B). Al analizar los niveles de fosforilación de p70S6K observamos unos resultados paralelos a los obtenidos con AKT. Esta proteína no se encuentra fosforilada basalmente, pero tras la inhibición de la expresión de <sup>V600E</sup>B-RAF se produce un aumento en su fosforilación (figura 38B). Además, este aumento de la fosforilación de p70S6K es dependiente de PI3K y mTOR, puesto que el tratamiento con los inhibidores de estas proteínas, LY294002 y rapamicina respectivamente, bloquea esta fosforilación (figura 38B), lo que indica que <sup>V600E</sup>B-RAF bloquea la vía de señalización PI3K-AKT-mTOR-p70S6K a nivel de PI3K.

Todos estos datos indican que <sup>V600E</sup>B-RAF se comporta como un inhibidor de la vía PI3K-AKT-mTOR-p70S6K y que su ausencia aumenta la actividad de esta vía, lo que podría explicar los bajos niveles de apoptosis cuando únicamente se elimina su expresión y que la apoptosis sea mucho mayor en ausencia de ambas vías.

#### 4. PAPEL DE <sup>V600E</sup>B-RAF SOBRE LA VÍA DE NF-κB

##### 4.1. Efecto de <sup>V600E</sup>B-RAF sobre la actividad transcripcional de NF-κB

Numerosos estudios han demostrado que NF-κB está involucrado en la regulación de procesos inflamatorios, proliferativos y apoptóticos. Además, este factor de transcripción también juega un papel importante en carcinogénesis promoviendo resistencia a la apoptosis, crecimiento celular y metástasis.

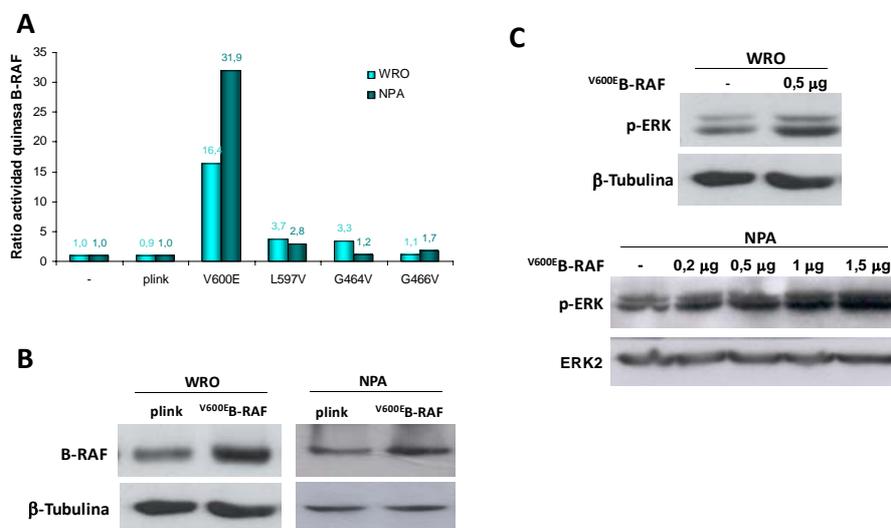
Nuestros resultados muestran que <sup>V600E</sup>B-RAF posee una función antiapoptótica y regula la expresión de algunas proteínas implicadas en apoptosis. Por otra parte, se ha descrito que los genes que codifican para algunas de estas proteínas se regulan por el factor de transcripción NF-κB. Por ello, decidimos estudiar si <sup>V600E</sup>B-RAF ejerce algún tipo de regulación sobre la vía de NF-κB en células tumorales.

En primer lugar analizamos el efecto del nivel de actividad de B-RAF sobre la transcripción dependiente de NF-κB. Para ello, las células se transfectaron con los plásmidos reporteros de luciferasa y renilla, pGL3-3xNF-κB-TK-Luc y pRL-TK-Renilla, junto con diferentes plásmidos que codifican proteínas mutantes de B-RAF con mayor actividad que la proteína B-RAF silvestre: <sup>V600E</sup>B-RAF, con una actividad quinasa alta; <sup>L597V</sup>B-RAF, <sup>G464V</sup>B-RAF y <sup>G466V</sup>B-RAF, con una actividad quinasa intermedia (95). Estos experimentos los realizamos tanto en células WRO como en células NPA, a pesar de que éstas últimas contienen la proteína <sup>V600E</sup>B-RAF endógena, ya que se ha demostrado que la sobreexpresión transfección de esta proteína mutante en estas células potencia los efectos de B-RAF endógeno y aumenta determinados parámetros como la invasión (291).

Previamente, comprobamos la expresión de los distintos mutantes mediante ensayos de actividad quinasa tras inmunoprecipitar las proteínas expresadas ectópicamente con un anticuerpo anti-myc. Como se muestra en la figura 39A, cuando las células se transfectaron con las construcciones <sup>L597V</sup>B-RAF, <sup>G464V</sup>B-RAF y <sup>G466V</sup>B-RAF se observó que estos mutantes poseen entre 1,2 y 4 veces más actividad que la proteína B-RAF silvestre.

Además, como cabía esperar, la transfección con el plásmido que codifica para <sup>V600E</sup>B-RAF mostró que este mutante es mucho más activo, observándose una actividad aproximadamente 16 veces mayor que la actividad de B-RAF silvestre en las células WRO y unas 30 veces en las células NPA (figura 39A). Además, comprobamos que la transfección de <sup>V600E</sup>B-RAF produce un aumento en los niveles de B-RAF en estas

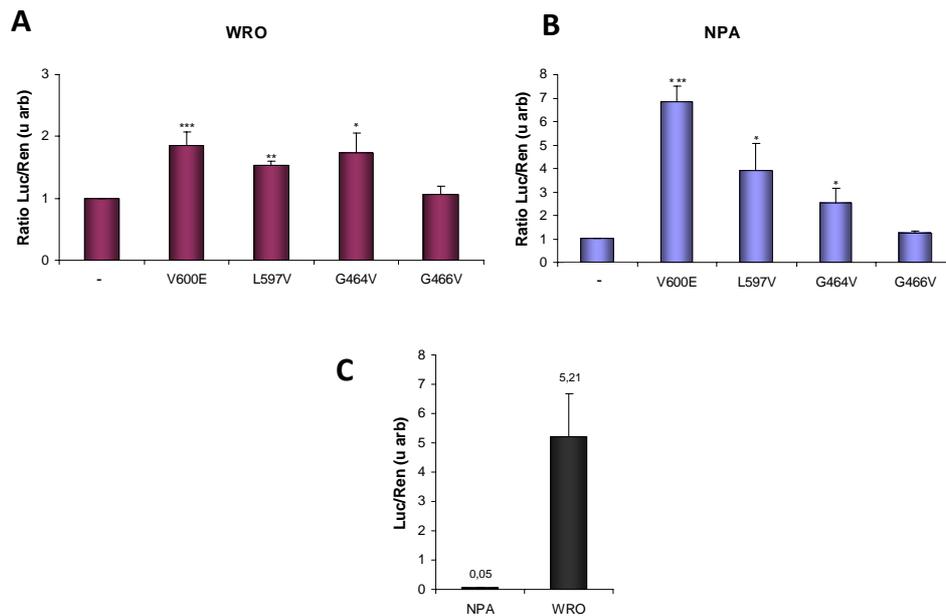
células mediante *western blot* (figura 39B) y demostramos que este aumento de expresión se traduce en un aumento de la fosforilación de ERK en ambas líneas celulares (figura 39C).



**Figura 39. Actividad de distintos mutantes de B-RAF sobrexpresados en células WRO y NPA y su efecto sobre la fosforilación de ERK.** A) Las células WRO y NPA se transfectoraron con el vector vacío (plink) o los plásmidos que codifican para las formas mutantes de B-RAF:  $V600E$  B-RAF (V600E),  $L597V$  B-RAF (L597V),  $G464V$  B-RAF (G464V) y  $G466V$  B-RAF (G466V). 72 horas después de la transfección se prepararon extractos celulares, se inmunoprecipitó la proteína B-RAF exógena con un anticuerpo anti-myc y se realizó un ensayo de actividad quinasa con el inmunoprecipitado. B) Las células WRO y NPA se transfectoraron con el plásmido de  $V600E$  B-RAF. 72 horas después de la transfección se prepararon extractos celulares y se realizó un *western blot* con un anticuerpo específico de B-RAF. C) Las células WRO y NPA se transfectoraron con las concentraciones indicadas de plásmido de  $V600E$  B-RAF. 72 horas después de la transfección se prepararon extractos celulares y se realizó un *western blot* con un anticuerpo específico para ERK fosforilada (p-ERK). B y C) Las membranas se rehibridaron con anticuerpos específicos de  $\beta$ -tubulina o ERK2 como controles de carga. Los datos muestran un experimento representativo de tres independientes con similares resultados.

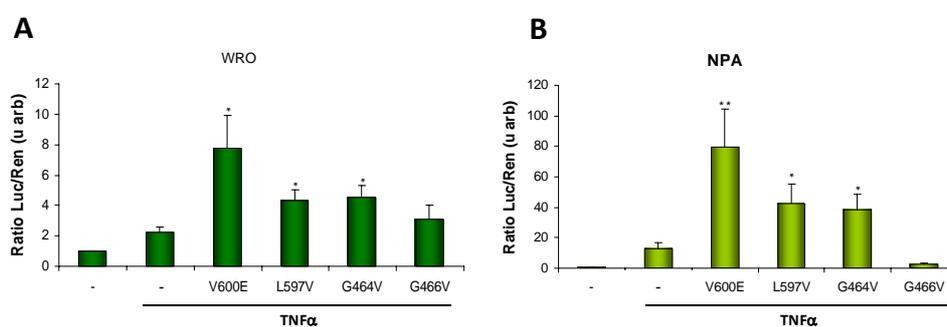
A continuación determinamos la actividad de NF- $\kappa$ B en las mismas condiciones y observamos que la sobreexpresión de los distintos mutantes de B-RAF produce un aumento en la actividad transcripcional dependiente de NF- $\kappa$ B paralelo a su actividad quinasa en ambos tipos celulares, aunque fue mucho mayor en el caso de las células NPA (figura 40). En las células WRO solo se observó un aumento de unas dos veces de la actividad de NF- $\kappa$ B con la sobreexpresión de los mutantes  $G464V$  B-RAF y  $V600E$  B-RAF

(figura 40A). En cuanto a las células NPA, todos los mutantes aumentaron la actividad de NF- $\kappa$ B, pero este aumento fue considerablemente mayor en el caso de las células que sobreexpresan <sup>V600E</sup>B-RAF, donde observamos un incremento de la actividad de NF- $\kappa$ B de unas 8 veces respecto a las células control (figura 40B). Para examinar a que se debían las diferencias tan grandes entre ambas líneas celulares determinamos su actividad NF- $\kappa$ B en condiciones basales. Los resultados obtenidos demostraron que las células WRO poseen unos niveles basales de actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B muy elevados, mientras que las células NPA mostraron una actividad casi indetectable (figura 40C). Esto puede explicar porque la sobreexpresión de los distintos mutantes induce unos aumentos tan pequeños en las células WRO.



**Figura 40. La sobreexpresión de mutantes de B-RAF aumenta la actividad transcripcional dependiente de NF- $\kappa$ B.** A y B) Las células WRO y NPA se cotransfectaron con los plásmidos pGL3-3x NF- $\kappa$ B -TK-Luc y pRL-TK-Renilla junto con el vector vacío o los plásmidos que codifican para los mutantes de B-RAF: <sup>V600E</sup>B-RAF (V600E), <sup>L597V</sup>B-RAF (L597V), <sup>G464V</sup>B-RAF (G464V) y <sup>G466V</sup>B-RAF (G466V). 72 horas después se prepararon extractos celulares y se midió la actividad luciferasa y renilla de los mismos. La actividad luciferasa se normalizó con la actividad renilla y se expresó como número de veces de aumento respecto al control (células transfectadas con el vector vacío). C) Comparativa de la actividad transcripcional basal de NF- $\kappa$ B de las células NPA y WRO. La actividad luciferasa y renilla se determinó como en A). Los datos representan la media  $\pm$  ESM de al menos tres experimentos independientes. La estadística se refiere en cada caso al control de la transfección. \*0,05>P>0,01; \*\*0,01>P>0,001; \*\*\*0,001>P.

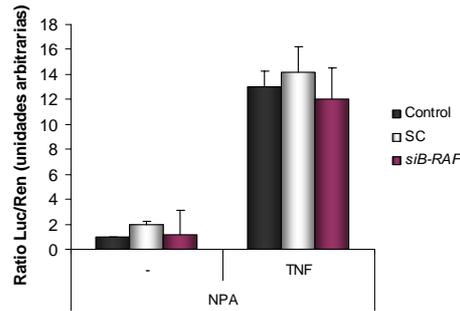
Además, también estudiamos la modificación de la actividad transcripcional dependiente de NF- $\kappa$ B inducida por los distintos mutantes de B-RAF en células estimuladas con TNF $\alpha$ . Como se muestra en la figura 41, el tratamiento con TNF $\alpha$  produjo un aumento de unas 2 veces en la actividad de NF- $\kappa$ B en las células WRO y de aproximadamente unas 10 veces en las células NPA, comparado con las células sin tratar. Por otra parte, los niveles de actividad de NF- $\kappa$ B fueron mucho mayores en las células tratadas con TNF $\alpha$  que sobreexpresan los distintos mutantes, respecto a las tratadas únicamente con esta citoquina. Así, la actividad de NF- $\kappa$ B inducida por TNF $\alpha$  fue aproximadamente 3 veces mayor en las células WRO y unas 5 veces mayor en las células NPA que sobreexpresan <sup>V600E</sup>B-RAF, respecto a las células tratadas con TNF $\alpha$  que únicamente contienen la proteína B-RAF endógena (figura 41, A y B).



**Figura 41.** <sup>V600E</sup>B-RAF estimula la actividad de NF- $\kappa$ B de forma independiente de TNF $\alpha$ . A y B) Las células WRO y NPA se cotransfectaron con los plásmidos pGL3-3x NF- $\kappa$ B -TK-Luc y pRL-TK-Renilla junto con el vector vacío o con los plásmidos que codifican para las formas mutantes de B-RAF: <sup>V600E</sup>B-RAF (V600E), <sup>L597V</sup>B-RAF (L597V), <sup>G464V</sup>B-RAF (G464V) y <sup>G466V</sup>B-RAF (G466V). 48 horas después de la transfección las células se estimularon con 2 nM TNF $\alpha$  durante 24 horas. La actividad luciferasa y renilla se midió en los extractos celulares. La actividad luciferasa se normalizó con la actividad renilla y se expresó como número de veces de aumento respecto al control (células transfectadas con el vector vacío). Los datos representan la media  $\pm$  ESM de al menos tres experimentos independientes. La estadística se refiere al tratamiento con TNF $\alpha$  de las células que sobreexpresan algún mutante respecto al control de la transfección. \*0,05>P>0,01; \*\*0,01>P>0,001.

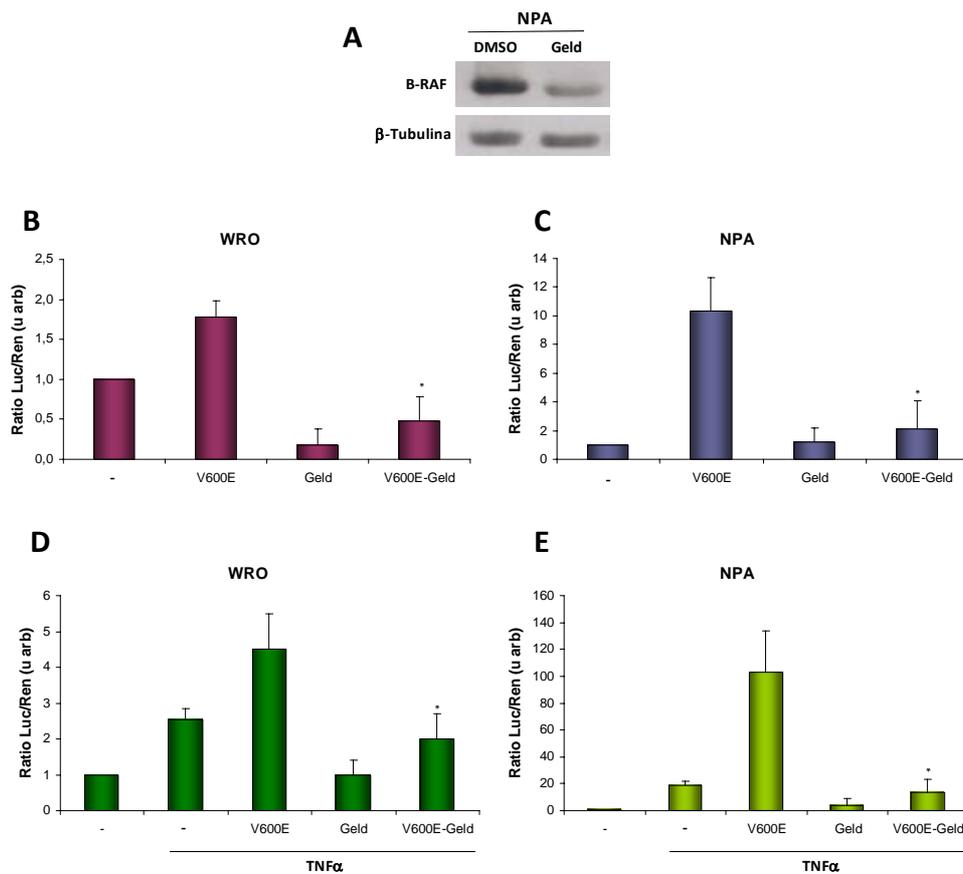
Estos datos indican que B-RAF aumenta la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B proporcionalmente a su actividad quinasa y que dicha activación se realiza de una forma independiente a la ruta de señalización del TNF $\alpha$ .

Para confirmar el papel de B-RAF sobre la transcripción dependiente de NF- $\kappa$ B, examinamos la actividad de este factor de transcripción en las células WRO y NPA tras inhibir la expresión de B-RAF. Debido a los bajos niveles de actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B que poseen las células NPA, cuando analizamos su actividad al inhibir la expresión de B-RAF con *siRNA* no observamos ninguna disminución (figura 42). Como esperábamos, tampoco observamos ninguna disminución de la actividad de NF $\kappa$ B en células tratadas con TNF $\alpha$ , lo que confirma que los efectos producidos por  $V^{600E}$ B-RAF y esta citoquina son independientes. Por todo esto, para confirmar el papel de  $V^{600E}$ B-RAF sobre la actividad transcripcional de NF $\kappa$ B utilizamos otras aproximaciones experimentales.



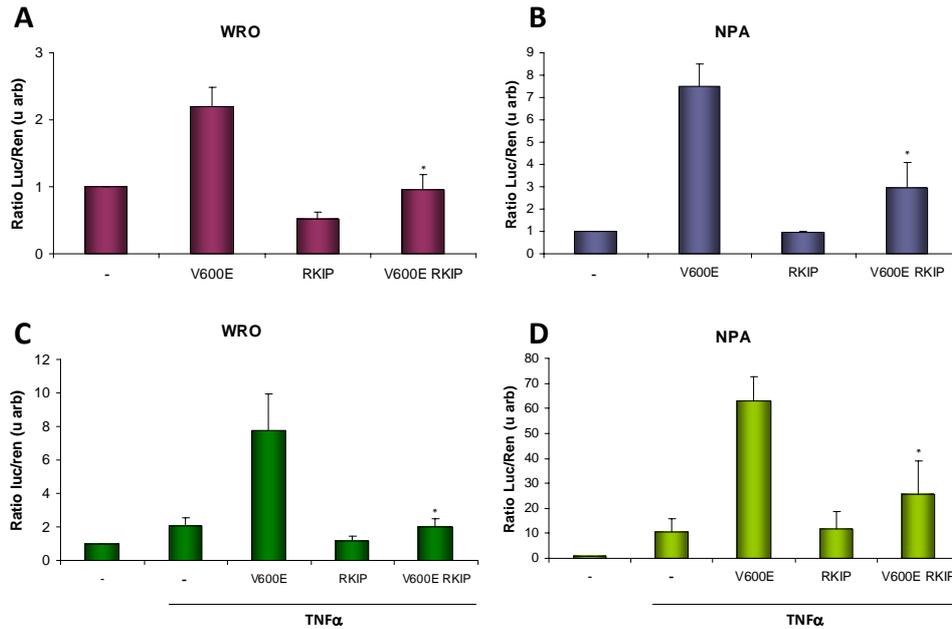
**Figura 42. La falta de expresión de B-RAF no modifica la actividad transcripcional basal de NF- $\kappa$ B en células NPA.** Las células NPA se cotransfectaron con los plásmidos pGL3-3x NF- $\kappa$ B -TK-Luc y pRL-TK-Renilla y el *siRNA* específico para B-RAF, o en su caso el *siRNA* control SC. 48 después de la transfección las células correspondientes se trataron con 2 nM TNF $\alpha$  durante las últimas 24 horas. A las 72 desde la transfección se prepararon extractos celulares y se realizó un ensayo de actividad luciferasa y renilla. La actividad luciferasa se normalizó con la actividad renilla y se expresó como número de veces de aumento respecto al control. Los datos representan la media  $\pm$  ESM de al menos tres experimentos independientes.

Está descrito en la literatura que la chaperona Hsp90 estabiliza a B-RAF y que la inhibición de Hsp90 con geldanamicina produce la desestabilización y degradación de B-RAF, disminuyendo la cantidad de esta proteína en las células (292). Así, estudiamos como la desestabilización de B-RAF oncogénico afecta a la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B. Como control del efecto de la geldamicina sobre los niveles de proteína B-RAF, determinamos los niveles de esta proteína en las células NPA tratadas con este inhibidor y observamos que, efectivamente, disminuye la cantidad de proteína B-RAF en las células (figura 43A). En cuanto a la actividad de NF- $\kappa$ B, los resultados obtenidos demostraron que el tratamiento con geldanamicina revierte totalmente la transcripción dependiente de NF- $\kappa$ B inducida por  $V^{600E}$ B-RAF, tanto en condiciones basales (figura 43, B y C) como tras la estimulación con TNF $\alpha$  (figura 43, D y E).



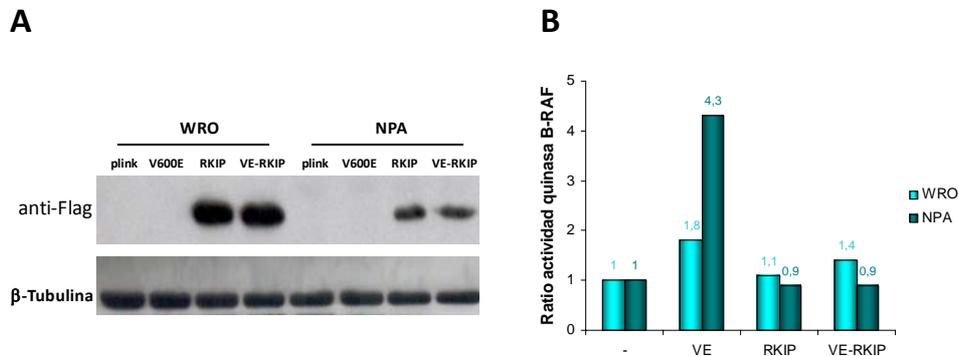
**Figura 43. El inhibidor geldanamicina anula el aumento de la transcripción dependiente de NF- $\kappa$ B inducido por  $V600E$ B-RAF.** A) Nivel de proteína B-RAF en las células NPA tras el tratamiento con DMSO o 1  $\mu$ M geldanamicina (Geld) durante 24 horas. Se prepararon extractos celulares y se realizó un *western blot* con un anticuerpo específico para B-RAF. La membrana se rehibridó con un anticuerpo anti- $\beta$ -tubulina como control de carga. Los datos muestran un experimento representativo de tres con similares resultados. B, C, D y E) Las células WRO y NPA se cotransfectaron con los plásmidos pGL3-3x NF- $\kappa$ B -TK-Luc y pRL-TK-Renilla junto con el plásmido que codifica para  $V600E$ B-RAF (V600E). Pasadas 48 horas de la transfección, las células se trataron con DMSO o 1  $\mu$ M geldanamicina durante 24 horas. Se prepararon extractos celulares y se realizó un ensayo de actividad luciferasa y renilla. La actividad luciferasa se normalizó con la actividad renilla y se expresó como número de veces de aumento respecto al control (células transfectadas con el vector vacío). B y C) Condiciones basales. D y E) Estimulación con 2 nM TNF $\alpha$  durante las últimas 24 horas. Los datos representan la media  $\pm$  ESM de al menos tres experimentos independientes. La estadística se refiere a las células que sobreexpresan  $V600E$ B-RAF tratadas con geldanamicina de respecto a las mismas sin tratar. \*0,05>P>0,01.

Otra forma de regular la actividad de B-RAF es a través de la proteína adaptadora RKIP. En este sentido se ha demostrado que RKIP se une tanto a C-RAF como a B-RAF inhibiendo la actividad de ambas proteínas (110). Por ello, estudiamos el efecto de la sobreexpresión de RKIP sobre la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B inducida por  $V600E$ B-RAF. Como se muestra en la figura 44, la sobreexpresión de RKIP revierte casi por completo la actividad de NF- $\kappa$ B inducida por  $V600E$ B-RAF. Este efecto, al igual que ocurría con la incubación con geldanamicina, ocurre tanto en condiciones basales (figura 44, A y B), como tras la estimulación con TNF $\alpha$  (figura 44, C y D).



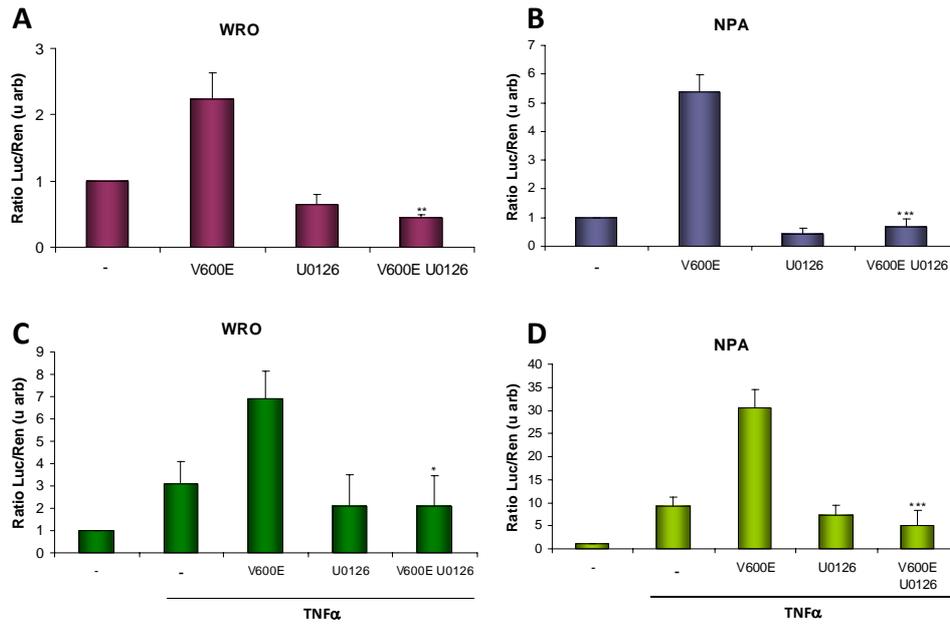
**Figura 44. RKIP inhibe el aumento en la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B inducido por  $V600E$ B-RAF.** Las células WRO y NPA se cotransfectaron con los plásmidos pGL3-3xNF- $\kappa$ B-TK-Luc y pRL-TK-Renilla junto con los plásmidos que codifican para  $V600E$ B-RAF (V600E) y RKIP. Pasadas 72 horas de la transfección, se prepararon extractos celulares y se realizó un ensayo de actividad luciferasa y renilla. La actividad luciferasa se normalizó con la actividad renilla y se expresó como número de veces de aumento respecto al control (células transfectadas con el vector vacío). A y B) Condiciones basales. C y D) Estimulación con TNF $\alpha$  durante las últimas 24 horas. Los datos representan la media  $\pm$  ESM de al menos tres experimentos independientes. La estadística se refiere a las células transfectadas con  $V600E$ B-RAF y RKIP respecto a las células que solo sobreexpresan  $V600E$ B-RAF. \*0,05>P>0,01.

Además, como controles, comprobamos la sobreexpresión de RKIP mediante *western blot* (figura 45A), y cómo la presencia de esta proteína disminuye la actividad quinasa de <sup>V600E</sup>B-RAF en ambas líneas celulares (figura 45B).



**Figura 45. Nivel de expresión de RKIP y su efecto sobre la actividad de B-RAF.** Las células WRO y NPA se transfectaron con los plásmidos que codifican para <sup>V600E</sup>B-RAF y RKIP como se indica. A) 72 horas después de la transfección se prepararon los correspondientes extractos celulares y se determinó el nivel de expresión de la proteína exógena RKIP por *western blot* utilizando un anticuerpo específico para el epítipo Flag. La membrana se rehibridó con un anticuerpo anti- $\beta$ -tubulina como control de carga. Se muestra un experimento representativo de tres con similares resultados. B) 72 horas después de la transfección se determinó el nivel de activación de B-RAF. Para ello se prepararon extractos celulares, se inmunoprecipitó la proteína B-RAF exógena con un anticuerpo anti-myc y se realizó un ensayo de actividad quinasa en el inmunoprecipitado. Los datos muestran un experimento representativo de tres con similares resultados.

Una vez visto que <sup>V600E</sup>B-RAF modula la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B, nos planteamos si este efecto era dependiente o independiente de MEK-ERK. Para ello, realizamos experimentos similares en células WRO y NPA transfectadas con los genes reporteros de luciferasa y renilla, así como con el plásmido de <sup>V600E</sup>B-RAF y las tratamos con el inhibidor de MEK, U0126. Como se observa en la figura 46, la inhibición de MEK produjo una disminución en la actividad de NF- $\kappa$ B inducida por <sup>V600E</sup>B-RAF tanto en condiciones basales (figura 46, A y B) como tras la estimulación con TNF $\alpha$  (figura 46, C y D).



**Figura 46.**  $V600E$  B-RAF aumenta la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B a través de MEK-ERK. Las células WRO y NPA se cotransfectaron con los plásmidos pGL3-3xNF- $\kappa$ B-TK-Luc y pRL-TK-Renilla junto con el plásmido que codifica para  $V600E$  B-RAF (V600E). Pasadas 24 horas las células se trataron con DMSO o 10  $\mu$ M U0126 durante las siguientes 48 horas. Se prepararon extractos celulares y se realizó un ensayo de actividad luciferasa y renilla. La actividad luciferasa se normalizó con la actividad renilla y se expresó como número de veces de aumento respecto al control (células transfectadas con el vector vacío). A y B) Condiciones basales. C y D) Estimulación con TNF $\alpha$  durante las últimas 24 horas. Los datos representan la media  $\pm$  ESM de al menos tres experimentos independientes. La estadística se refiere a las células transfectadas con  $V600E$  B-RAF y tratadas con U0126 respecto a las que solo sobreexpresan  $V600E$  B-RAF. \* $0,05 > P > 0,01$ ; \*\* $0,01 > P > 0,001$ ; \*\*\* $0,001 > P$ .

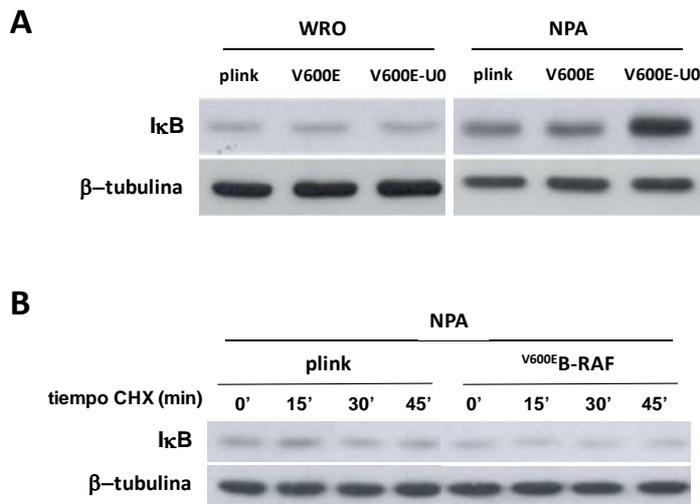
A la vista de todos estos resultados podemos concluir que  $V600E$  B-RAF aumenta la transcripción dependiente de NF- $\kappa$ B y que este aumento se produce a través de un mecanismo dependiente de la vía MEK-ERK.

#### 4.2. <sup>V600E</sup>B-RAF regula la degradación de IκBα y la translocación al núcleo de p65/RelA de manera dependiente de ERK

La función de NF-κB es regulada en parte por un proceso celular que implica la fosforilación y degradación de su proteína inhibidora IκBα. Este proceso deja libre al complejo NF-κB para translocarse al núcleo y activar la transcripción, tras su unión al ADN. Por tanto, para determinar el mecanismo por el que la vía B-RAF-MEK-ERK induce la transcripción dependiente de NF-κB, estudiamos a qué nivel interaccionan ambas vías de señalización, examinando dos parámetros característicos de la actividad de NF-κB, la degradación de IκBα y la translocación de p65/RelA al núcleo, en respuesta a cambios en la actividad de B-RAF.

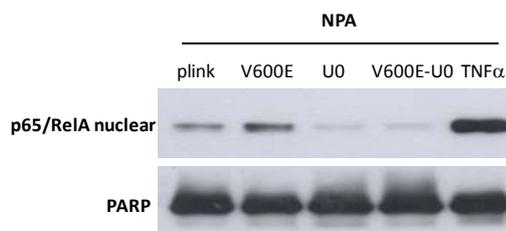
En primer lugar analizamos los niveles de IκBα en extractos citosólicos de células WRO y NPA que sobreexpresan <sup>V600E</sup>B-RAF incubadas en ausencia o presencia del inhibidor U0126, mediante *western blot*. Como se muestra en la figura 47A, al analizar la cantidad total de IκBα expresada en las células observamos que la inhibición de MEK con U0126 produce un aumento de los niveles de IκBα en el citosol; este aumento fue bastante significativo en el caso de las células NPA, respecto a células control sin transfectar y sin tratar (figura 47A).

Sin embargo, la sobreexpresión de <sup>V600E</sup>B-RAF no produce una clara disminución de los niveles de IκBα, indicativos de degradación, como cabría esperar, posiblemente debido al rápido recambio de esta proteína, cuya vida media es muy corta. Para analizar este efecto con mayor precisión, estudiamos la cinética de degradación de IκBα en extractos citosólicos de células transfectadas con <sup>V600E</sup>B-RAF y tratadas con cicloheximida, para inhibir de esta forma la síntesis de nuevas moléculas de IκBα. En este caso, observamos que los niveles de IκBα disminuyeron más rápido en las células NPA que sobreexpresan <sup>V600E</sup>B-RAF respecto a las células control (figura 47B), lo que indica que este oncogén provoca una disminución en la estabilidad de este inhibidor de NF-κB. En el caso de las células WRO, debido a que éstas poseen unos niveles basales muy bajos de IκBα no observamos diferencias tras el tratamiento con cicloheximida (datos no mostrados).



**Figura 47.** <sup>V600E</sup>B-RAF reduce los niveles de IκBα a través de MEK-ERK. A) Las células WRO y NPA se transfectoron con el plásmido que codifica para <sup>V600E</sup>B-RAF (V600E). 24 horas después de la transfección, se trataron las células con DMSO o 10 μM U0126 (UO) durante 48 horas. B) Las células NPA se transfectoron con el plásmido que codifica para <sup>V600E</sup>B-RAF. Se incubaron durante 72 horas y al final de este tiempo se trataron con cicloheximida (CHX) durante los tiempos indicados. A y B) Tras los distintos tratamientos se prepararon extractos citosólicos y se analizó la cantidad de IκBα existente en las células utilizando un anticuerpo específico para esta proteína mediante *western blot*. Las membranas se rehibridaron con un anticuerpo anti-β-tubulina como control de carga. Los datos muestran un experimento representativo de tres experimentos independientes con similares resultados.

Las modificaciones en los niveles de IκBα deberían ir acompañadas de cambios en la translocación de la subunidad p65/RelA al núcleo. Para analizar esta posibilidad determinamos los niveles de p65/RelA en extractos nucleares de células NPA en las que sobreexpresamos <sup>V600E</sup>B-RAF e inhibimos la vía MEK-ERK con el inhibidor U0126. Como se puede observar en la figura 48, en paralelo a la degradación de IκBα observada, la sobreexpresión de <sup>V600E</sup>B-RAF produce un aumento de los niveles de p65/RelA en el núcleo y el tratamiento con el inhibidor U0126 revierte la translocación de p65/RelA al núcleo inducida por <sup>V600E</sup>B-RAF.



**Figura 48.** <sup>V600E</sup>B-RAF aumenta la translocación de p65/RelA al núcleo a través de MEK-ERK. Las células NPA se transfectaron con el plásmido que codifica para <sup>V600E</sup>B-RAF. Pasadas 24 horas de la transfección, se trataron las células con DMSO ó 10  $\mu$ M U0126 (UO) durante 48 horas. Se prepararon extractos nucleares y se analizó la cantidad de p65/RelA existente en el núcleo utilizando un anticuerpo específico para esta proteína mediante *western blot*. Las membranas se rehibridaron con un anticuerpo específico para PARP como control de carga. Los datos muestran un experimento representativo de tres experimentos independientes con similares resultados.

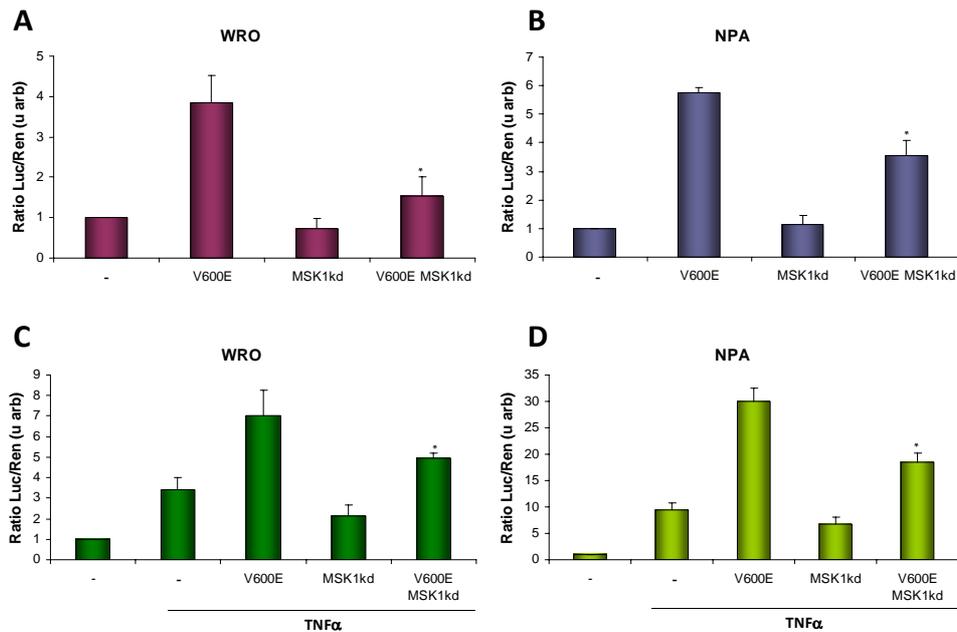
Todos estos datos demuestran que <sup>V600E</sup>B-RAF modifica la transcripción dependiente de NF- $\kappa$ B afectando a la vía canónica de activación de este factor de transcripción, que implica la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  y la translocación de p65/RelA al núcleo, a través de un mecanismo dependiente de la activación de MEK-ERK.

#### 4.3. <sup>V600E</sup>B-RAF aumenta la actividad de transactivación de p65/RelA a través de la vía MEK-ERK-MSK1

Existe un mecanismo de activación de NF- $\kappa$ B alternativo e independiente de la vía canónica y de la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$ , a través de la fosforilación de la subunidad p65/RelA en el residuo S276 por la proteína MSK1, la cual aumenta su capacidad transactivadora. Dado que MSK1 es una proteína efectora de ERK, estudiamos si el aumento de la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B inducido por la vía B-RAF-MEK-ERK también se produce a través de la vía MEK-ERK-MSK1.

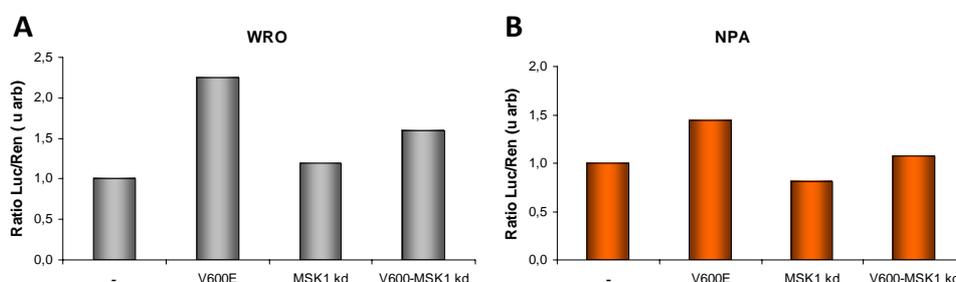
En primer lugar determinamos la transcripción dependiente de NF- $\kappa$ B en células WRO y NPA en las que sobreexpresamos la proteína B-RAF oncogénica junto con la proteína MSK1 catalíticamente inactiva (MSK1kd), que actuó como dominante negativo (figura 49).

La sobreexpresión de MSK1kd no produjo ninguna modificación en la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B en condiciones basales, sin embargo, disminuyó aproximadamente un 50 % la transcripción dependiente de NF- $\kappa$ B inducida por <sup>V600E</sup>B-RAF en las células WRO (figura 49A) y un 40 % en las células NPA (figura 49B). Además, la sobreexpresión de MSK1kd también disminuyó aproximadamente un 40 % la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B inducida por <sup>V600E</sup>B-RAF en células tratadas con TNF $\alpha$  (figura 49, C y D).



**Figura 49. MSK1 es un efector de <sup>V600E</sup>B-RAF en la activación de NF- $\kappa$ B.** Las células WRO y NPA se cotransfectaron con los plásmidos pGL3-3xNF- $\kappa$ B-TK-Luc y pRL-TK-Renilla junto con los plásmidos que codifican para <sup>V600E</sup>B-RAF (V600E) y la proteína MSK1kd. 72 horas después, se prepararon extractos celulares y se realizó un ensayo de actividad luciferasa y renilla. La actividad luciferasa se normalizó con la actividad renilla y se expresó como número de veces de aumento respecto al control (células transfectadas con el vector vacío). A y B) Condiciones basales. C y D) Estimulación con TNF $\alpha$  durante las últimas 24 horas. Los datos representan la media  $\pm$  ESM de al menos tres experimentos independientes. La estadística se refiere a las células que sobreexpresan <sup>V600E</sup>B-RAF y MSK1kd respecto a las que solo sobreexpresan <sup>V600E</sup>B-RAF. \*0,05>P>0,01.

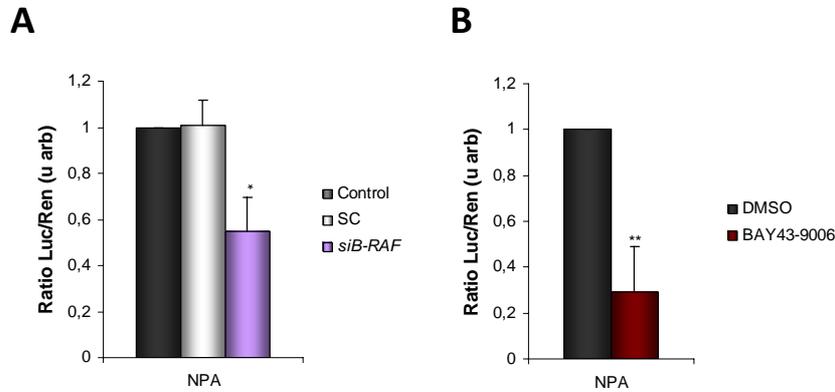
Dado que hemos demostrado la participación de MSK1 en el aumento de la transcripción dependiente de NF- $\kappa$ B inducida por  $V^{600E}$ B-RAF, estudiamos si este efecto dependía de la actividad transactivadora de p65/RelA. Para ello utilizamos un plásmido que codifica para la proteína de fusión p65-Gal4, en el cuál están unidas la secuencia que codifica la proteína p65 completa y la secuencia que codifica el dominio de unión al ADN de Gal4. Esta construcción se transfectó simultáneamente con el plásmido reportero Gal4-Luc y los plásmidos que codifican para  $V^{600E}$ B-RAF y MSK1kd. Así, en función de la activación de p65/RelA, la proteína de fusión p65-Gal4 se unirá más o menos a la secuencia reguladora Gal4 del plásmido reportero Gal4-Luc, expresándose más o menos luciferasa, lo que permite determinar si la vía  $V^{600E}$ B-RAF-MSK1 regula la expresión génica actuando directamente sobre la proteína p65/RelA. Como se observa en la figura 50, la sobreexpresión de  $V^{600E}$ B-RAF en las células WRO y NPA produce un aumento de la actividad transactivadora de p65/RelA, y dicha activación se revierte parcialmente cuando se sobreexpresa la proteína MSK1kd junto con  $V^{600E}$ B-RAF.



**Figura 50.**  $V^{600E}$ B-RAF aumenta la actividad transactivadora de p65/RelA a través de MSK1. Las células WRO y NPA se cotransfectaron con los plásmidos reporteros Gal4-Luc y pRL-TK-Renilla junto con los plásmidos que codifican para la proteína de fusión p65-Gal4, la proteína oncogénica  $V^{600E}$ B-RAF y la proteína MSK1kd. 72 horas después de la transfección se prepararon extractos celulares y se realizó un ensayo de actividad luciferasa y renilla. La actividad luciferasa se normalizó con la actividad renilla y se expresó como número de veces de aumento respecto al control (células transfectadas con el vector vacío). Los datos muestran un experimento realizado por duplicado representativo de tres experimentos independientes con similares resultados

Finalmente, para confirmar el papel de  $V^{600E}$ B-RAF en la activación de p65/RelA, eliminamos la expresión B-RAF con *siRNA* específico e inhibimos su actividad con el inhibidor BAY 43-9006 en células NPA. Utilizando estas condiciones, se observó que el

silenciamiento de <sup>V600E</sup>B-RAF produce una disminución de la actividad de transactivación de p65/RelA de aproximadamente un 50 % (figura 51A) y el tratamiento con BAY 43-9006 de un 60 % (figura 51B). Estos experimentos demuestran que la proteína <sup>V600E</sup>B-RAF aumenta el potencial de transactivación de p65/RelA a través de un mecanismo dependiente de MSK1.



**Figura 51. La falta de expresión o de actividad de <sup>V600E</sup>B-RAF disminuye la actividad transactivadora de p65/RelA.** Las células NPA se cotransfectaron con los plásmidos reporteros Gal4-Luc y pRL-TK-Renilla junto con el plásmido que codifica para la proteína de fusión p65-Gal4. A) Junto con los plásmidos anteriores se cotransfectó el *siRNA* específico de B-RAF o el *siRNA* control, SC. B) A las 24 horas se trataron las células con DMSO o 10  $\mu$ M BAY 43-9006 durante 48 horas. A y B) Pasadas 72 horas desde la transfección, se prepararon extractos celulares y se realizó un ensayo de actividad luciferasa y renilla. La actividad luciferasa se normalizó con la actividad renilla y se expresó como número de veces de aumento respecto al control (células transfectadas con el vector vacío). Los datos muestran un experimento realizado por duplicado representativo de tres experimentos independientes con similares resultados. La estadística se refiere en cada caso al control. \*0,05>P>0,01; \*\*0.01>P>0,001.

Por todo esto podemos concluir que la proteína B-RAF oncogénica incrementa la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B a través de la vía MEK-ERK, la cual actúa sobre su vía de activación canónica, induciendo la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  y promoviendo la translocación al núcleo de p65/RelA; y también incrementa la actividad transactivadora de p65/RelA a través de un mecanismo dependiente de la proteína MSK1. Además, estos datos muestran que este efecto es distinto al observado en apoptosis, donde el papel antiapoptótico de <sup>V600E</sup>B-RAF es independiente de la vía MEK-ERK, lo que demuestra que <sup>V600E</sup>B-RAF no protege de la apoptosis a través de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B.

*Discusión*



La proteína B-RAF forma parte de la cascada de proteínas quinasas activadas por mitógenos MAPK ERKs, que controla diversos procesos de señalización. Estudios en líneas celulares y ratones modificados genéticamente han asignado a B-RAF un papel en el control de la proliferación y la supervivencia celulares, dos procesos clave para la transformación celular. Además, la proteína B-RAF se encuentra mutada en un alto porcentaje de tumores humanos, pero de las aproximadamente 100 mutaciones encontradas en este gen, la más frecuente es la sustitución de valina por glutámico en la posición 600, <sup>V600E</sup>B-RAF, por lo que actualmente se considera un oncogén. Aunque los estudios funcionales han demostrado que la mayor parte de los procesos regulados por B-RAF se producen a través de la activación de la vía MEK-ERK, existen algunos datos en la literatura que indican que B-RAF oncogénico puede ejercer sus funciones independientemente de esta vía. Por ello, es importante y necesario un mejor entendimiento de la regulación de los procesos biológicos modulados por <sup>V600E</sup>B-RAF en cáncer.

Como se ha comentado al principio de esta memoria, el objetivo de esta Tesis era estudiar los efectos carcinogénicos del oncogén <sup>V600E</sup>B-RAF en cáncer de tiroides. Sin embargo, debido al problema de la mala identificación de las líneas celulares que hemos utilizado, decidimos no incluir gran cantidad de datos que poseemos para evitar redundancias con resultados publicados en la literatura con las mismas líneas celulares, pero identificadas con otro nombre. Por esto, enfocamos la presente memoria de una manera más genérica sobre la implicación de la proteína oncogénica <sup>V600E</sup>B-RAF en los procesos de proliferación y de muerte celular en células tumorales. Para esto, hicimos uso principalmente de dos reconocidas estrategias para la inhibición de las proteínas RAF: el tratamiento con el inhibidor BAY 43-9006 y el uso de *siRNA* específico para las proteínas B-RAF y C-RAF. Además, para determinar si la implicación de la principal vía efectora de RAF, MEK-ERK, participaba también en esos procesos utilizamos el inhibidor específico de MEK U0126. El modelo con el que trabajamos está formado por diferentes líneas celulares derivadas de distintos tumores humanos, de las cuales dos tienen la proteína B-RAF silvestre y dos tienen la proteína oncogénica <sup>V600E</sup>B-RAF. De esta forma podemos comparar el papel de B-RAF en los procesos citados en función de su estado de activación.

Nuestros resultados demuestran que cuando el mutante <sup>V600E</sup>B-RAF está presente, éste es el principal activador de la vía MEK-ERK y es el responsable de la proliferación de las células tumorales que lo contienen.

Por otro lado demostramos que <sup>V600E</sup>B-RAF tiene un papel protector de la apoptosis y que en este proceso están implicadas proteínas de la maquinaria apoptótica celular como BIM y caspasa 3. Sorprendentemente, su papel en apoptosis es independiente de la activación de MEK-ERK, ya que la inhibición de esta vía no tiene ninguna repercusión sobre los niveles de muerte celular. Además, observamos que la vía PI3K-AKT-mTOR coopera con B-RAF en la supervivencia de las células tumorales estudiadas, de tal forma que la inhibición de ambas vías tiene un efecto mayor que solo la inhibición de B-RAF.

Por último, demostramos que <sup>V600E</sup>B-RAF regula la transcripción dependiente de NF- $\kappa$ B por dos mecanismos distintos, uno a través de la vía canónica, disminuyendo la expresión del inhibidor I $\kappa$ B $\alpha$  y aumentando la translocación al núcleo de p65/RelA, y otro, aumentando la transactivación de p65/RelA mediante su fosforilación a través de la quinasa MSK1. Además, demostramos que la activación de NF- $\kappa$ B por <sup>V600E</sup>B-RAF es dependiente de MEK-ERK y, por lo tanto, no está implicada en la supervivencia celular inducida por este oncogén. Sin embargo, la función de este proceso no queda definida en este trabajo.

### **1. La proteína <sup>V600E</sup>B-RAF es responsable de la proliferación celular a través de la activación de la vía MEK-ERK en las células que la contienen.**

Se ha descrito en la literatura que B-RAF es el principal activador de MEK-ERK, tanto en células *in vitro* como en ratones (120), y que la elevada actividad de <sup>V600E</sup>B-RAF, mediante la estimulación de las proteínas endógenas MEK y ERK, induce un aumento de la proliferación y supervivencia celulares (95,141,293,294). Nuestros resultados muestran que, tal y como cabía esperar, las células que poseen la proteína <sup>V600E</sup>B-RAF tienen una actividad basal muy superior a la actividad encontrada en células con B-RAF silvestre. Además, también comprobamos que la actividad de B-RAF, tanto en su forma nativa, como oncogénica es mayor que la de C-RAF en las células estudiadas. Sin embargo, nosotros observamos que la vía MEK-ERK se encontraba activa en todas las células tumorales utilizadas en este trabajo, independientemente del estado de activación de B-RAF, y demostramos que en las células tumorales que tienen la proteína <sup>V600E</sup>B-RAF, ésta es la principal activadora de MEK-ERK, mientras que las células que poseen B-RAF silvestre, la activación de ERK depende tanto de B-RAF como de C-RAF. En las células que contienen el mutante <sup>V600E</sup>B-RAF, la activación constitutiva de ERK desaparece tras la inhibición de la actividad de B-RAF mediante el tratamiento con el inhibidor BAY 43-9006 o la supresión de la expresión de B-RAF con

*siRNA*, mientras que el silenciamiento de la expresión de C-RAF no tiene ningún efecto sobre ERK, al igual que sucede en melanocitos transformados y células de melanoma (141,294). Sin embargo, en las células que contienen la proteína B-RAF silvestre no destaca la actividad de ninguna de las isoformas RAF, ya que, aunque también encontramos que la vía MEK-ERK se encuentra constitutivamente activa, esta activación depende tanto de B-RAF como de C-RAF, pues la eliminación de la expresión de cada una de estas proteínas disminuye el nivel de activación de ERK al mismo nivel. El hecho de que el silenciamiento de B-RAF y C-RAF simultáneo no tenga mayor efecto sobre ERK que el silenciamiento de cada isoforma por separado puede ser debido a que mediante la técnica del *siRNA* no conseguimos la eliminación completa de B-RAF y C-RAF en estas células y por lo tanto queda una actividad residual de estas proteínas.

Estos resultados concuerdan con el modelo propuesto en la literatura donde se demuestra que las proteínas B-RAF y C-RAF presentan un mecanismo bastante complejo de regulación, a través de la formación de homodímeros y heterodímeros, que repercute en la activación de la vía MEK-ERK, siendo la actividad quinasa MEK más alta en los heterodímeros que la de los respectivos monómeros u homodímeros (93,97,98). Así, se ha demostrado que las mutaciones activadoras de B-RAF, como <sup>V600E</sup>B-RAF, fosforilan directamente a MEK (47,95). Sin embargo, tanto B-RAF silvestre, como formas oncogénicas de B-RAF sin actividad quinasa utilizan a C-RAF para activar MEK a través de la formación de heterodímeros. En respuesta a la estimulación por factores de crecimiento y a la activación de Ras, B-RAF silvestre se une a C-RAF y lo activa mediante transfosforilación, aumentando su actividad quinasa sobre MEK (93,97,98). En el caso de los mutantes de B-RAF catalíticamente inactivos, tampoco pueden fosforilar directamente a MEK, pero sí a C-RAF, permitiendo la activación de MEK indirectamente a través de él (98). Por otra parte, para añadir un grado más de complejidad, se ha demostrado recientemente que C-RAF también puede inhibir <sup>V600E</sup>B-RAF, con el objeto de modular la potencia de activación de la vía MEK-ERK y favorecer la transformación, lo que explicaría porqué la proporción de heterodímeros está disminuida el caso de células de melanoma (170). Además, estos autores también demuestran un nuevo mecanismo de acción del inhibidor BAY 43-9006, por el cual éste estabiliza los complejos C-RAF:<sup>V600E</sup>B-RAF, lo que impide la activación de MEK (170). Aunque, todavía no se conoce si C-RAF también puede inhibir B-RAF silvestre, ni si BAY 43-9006 también estabiliza estos heterodímeros, está podría ser la causa de porqué en células que no poseen B-RAF mutado, como las células WRO, aunque la eliminación de C-RAF o B-RAF por separado no elimina completamente la activación de MEK, el tratamiento con este inhibidor si lo haga.

La función más estudiada de B-RAF es su participación en el proceso de proliferación y los mecanismos por los que regula dicho proceso. B-RAF está implicada en la proliferación celular a través de ERK y de sus dianas efectoras, que intervienen en el control de la maquinaria del ciclo celular (40).

En el presente trabajo, nosotros demostramos que la proliferación de células tumorales depende de las proteínas RAF, pero al igual que ocurre con la activación de la vía MEK-ERK, los efectos sobre ella dependen del estado de activación de B-RAF. De nuevo, en las células tumorales NPA que poseen la mutación <sup>V600E</sup>B-RAF, la síntesis de ADN depende fundamentalmente de este oncogén, ya que la eliminación de su expresión con *siRNA* la bloquea casi totalmente, mientras que la eliminación de C-RAF no tiene ningún efecto. Sin embargo, en el caso de las células WRO con B-RAF silvestre, la eliminación de ambas isoformas disminuye la síntesis de ADN a los mismos niveles. Estos datos son paralelos a los observados con la activación de ERK y demuestran, por otra parte, que las células que contienen una mutación en B-RAF son más dependientes de esta vía para proliferar que las células que no poseen B-RAF mutado. Esto se observa en los experimentos de curvas de crecimiento, donde la eliminación de la vía de ERK con el inhibidor de MEK U0126 disminuye mucho más la tasa de crecimiento en células con B-RAF oncogénico que en aquellas que no lo poseen. Estos resultados concuerdan con los datos publicados por otros autores que muestran que cuando <sup>V600E</sup>B-RAF está presente es necesario para la proliferación de las células tumorales, pues la inhibición de su expresión con *siRNA* o de su actividad con BAY 43-9006 disminuye la activación de ERK y la proliferación celular en melanocitos transformados (294), células “derivadas de cáncer de tiroides” y melanoma (141,295,296) y disminuye el crecimiento de tumores xenotransplantados en ratones (141,158,295). Nuestros datos también coinciden con trabajos anteriores en los que se ha descrito que al inhibir MEK con U0126 (141,294) o CI-1040 (297,298) disminuye la tasa de proliferación de células con <sup>V600E</sup>B-RAF, mientras que en células tumorales que contienen B-RAF silvestre y otras alteraciones genéticas, como mutaciones en Ras, la proliferación es más independiente de MEK-ERK, ya que la inhibición de esta vía no tiene grandes efectos sobre la tasa de proliferación celular (297). Así, numerosos autores defienden que las células que poseen <sup>V600E</sup>B-RAF tienen mayor dependencia de MEK-ERK para la proliferación que las células que tienen la proteína B-RAF silvestre (296,297). Esto puede ser debido a que, mientras que B-RAF oncogénico activa ERK e induce la expresión de la ciclina D1 (299,300), en tumores con otras mutaciones la señal de ERK puede ser dispensable para la expresión de esta ciclina y otras vías como PI3K o RalGDS pueden tener mayor importancia sobre la proliferación (301,302).

Sin embargo, nuestros datos son distintos a los publicados por Namba y cols., que demostraron que la inhibición de MEK con U0126 en células WRO no afecta a la tasa de proliferación celular (303), mientras que nuestros resultados demuestran que este inhibidor la disminuye parcialmente. En este caso puntual, tenemos que reseñar que los resultados obtenidos por estos autores se refieren exclusivamente a curvas de crecimiento tras 24 horas de tratamiento con U0126, que quizás es un tiempo demasiado corto para poder sacar conclusiones. Nosotros, además de realizar el conteo celular hasta 72 horas post-tratamiento, estudiamos los niveles de síntesis de ADN y en ambos casos observamos una clara disminución de la tasa de proliferación celular en estas células.

Nuestros resultados ponen de manifiesto que las terapias en el tratamiento contra el cáncer deben plantearse a un nivel mucho más personalizado, partiendo de un diagnóstico más profundo, ya que cada tumor es diferente y, por ejemplo, la inhibición de la vía MEK-ERK podría ser determinante para el éxito de la terapia elegida. En este sentido, ni el inhibidor BAY 43-9006 ni el inhibidor de MEK CI-1040 han producido los efectos deseados en ensayos clínicos, bien porque no son lo suficientemente potentes o porque causan una toxicidad inaceptable (304). Por ello, más recientemente se han desarrollado varios inhibidores específicos de B-RAF, SB590885, PLX4720, PLX4032 y GDC-0879, que inhiben la proliferación de células tumorales con <sup>V600E</sup>B-RAF (175,305) y están dando buenos resultados en ensayos clínicos de pacientes con melanoma producido por este oncogén (306,307). Sin embargo, a pesar de sus efectos antitumorales, algunos de estos inhibidores producen lesiones hiperproliferativas en la piel del 25 % de pacientes con melanoma y en algunos casos carcinomas de células escamosas, los cuales desaparecen tras la retirada de la droga (306). Esta paradoja ha sido resuelta muy recientemente con el descubrimiento de que estos inhibidores específicos inhiben la vía MEK-ERK en células tumorales que poseen la mutación <sup>V600E</sup>B-RAF, pero la activan en otros tipos de tumores que poseen mutaciones en K-Ras y B-RAF silvestre o B-RAF mutado catalíticamente inactivo, a través de la formación de complejos activos B-RAF:C-RAF (99,308,309). Por lo tanto, a pesar de los 25 años de estudio, de la vía Ras-RAF-MEK-ERK, todavía no conocemos en detalle la complejidad de esta vía y son necesarios nuevos estudios sobre la regulación de sus componentes, sobre todo de las proteínas RAF, para poder desarrollar nuevas terapias anticancerígenas efectivas.

## 2. <sup>V600E</sup>B-RAF protege de la apoptosis regulando distintas proteínas de la maquinaria apoptótica, a través de un mecanismo independiente de la vía MEK-ERK

Otra de las características de las células tumorales es su resistencia a morir por apoptosis. En este sentido, nuestros datos también demuestran que la proteína oncogénica <sup>V600E</sup>B-RAF, pero no B-RAF silvestre, induce supervivencia en las células tumorales que la contienen, ya que la eliminación de su expresión o de su actividad aumenta la muerte celular, tanto en condiciones basales como en células tratadas con agentes proapoptóticos. Estos datos concuerdan con los de otros autores que vinculan a <sup>V600E</sup>B-RAF con la supervivencia de células tumorales de diversos tejidos. Por ejemplo, la inhibición de la vía RAF-MEK-ERK con BAY 43-9006 u otros inhibidores de RAF produce apoptosis en células de melanoma (310), de “cáncer de tiroides” (311), de cáncer de cérvix (152), de leucemia (312), así como en tumores xenotransplantados en ratones (295). Además, la eliminación de la expresión de B-RAF oncogénico con *siRNA* también produce apoptosis en células tumorales (141,151,152,293) y regresión de melanoma en ratones (313).

En la mayor parte de los trabajos publicados se da por sentado que la protección de la apoptosis por <sup>V600E</sup>B-RAF es un proceso dependiente de MEK-ERK, dado que este oncogén activa de forma constitutiva esta vía y su inhibición o su eliminación la inhiben y, además, hasta el momento MEK es el único sustrato conocido de B-RAF. Sin embargo, en la mayoría de los trabajos citados sobre la implicación de B-RAF en la supervivencia celular no se determina la implicación de la vía MEK-ERK en este proceso. Solo lo demuestran, por ejemplo, Karasarides y cols. en células de melanoma, en las que U0126 produce el mismo efecto que BAY 43-9006 en apoptosis (141), o Nakayama y cols., que muestran que la inhibición de MEK en células de carcinoma de ovario con <sup>V600E</sup>B-RAF produce un aumento del número de células apoptóticas (298). A diferencia de lo publicado, nuestros resultados demuestran claramente que la supervivencia inducida por <sup>V600E</sup>B-RAF en las células tumorales estudiadas es independiente de la vía MEK-ERK, pues el tratamiento de las células NPA con el inhibidor de MEK U0126 no produce el mismo efecto que la inhibición de la vía con BAY 43-9006 o la eliminación de B-RAF con *siRNA*. Además, esto lo confirmamos en los experimentos con el agente proapoptótico etopósido. Nuestros datos indican que <sup>V600E</sup>B-RAF aumenta la resistencia a la apoptosis inducida por etopósido, pues el tratamiento de las células con *siRNA* específico para B-RAF sensibiliza a nuestras células al tratamiento con este reactivo. Sin embargo, la inhibición de MEK con U0126 no produce ningún efecto. Este resultado es bastante novedoso, pero no es la primera vez que se ha sugerido. En 2007, Rahmani y cols.

demonstraron que la sobreexpresión de un mutante constitutivamente activo de MEK1 produce la activación de ERK, pero no es capaz de revertir la apoptosis inducida por BAY 43-9006; sin embargo este trabajo se realizó en células Jurkat, que no contienen la proteína <sup>V600E</sup>B-RAF de forma endógena (312). Por otra parte, Panka y cols. demostraron que BAY 43-9006 induce apoptosis en células de melanoma que presentan la proteína oncogénica <sup>V600E</sup>B-RAF y que, aunque no todos, algunos de los efectos inducidos por este inhibidor, como la disminución de la expresión de Bcl-2 y Bcl-XL o la despolarización de la membrana mitocondrial, no son dependientes de la inhibición de la vía MEK-ERK (310).

Por otra parte, nosotros también demostramos que la falta de expresión o actividad de <sup>V600E</sup>B-RAF en nuestras células produce apoptosis a través de la activación de la cascada de caspasas. Esto parece oponerse al trabajo de Panka y cols., en el que propusieron que la muerte inducida por BAY 43-9006 en células de melanoma es dependiente de AIF e independiente de caspasas, pues la eliminación de AIF con *siRNA* revierte la muerte celular producida por este inhibidor, pero el inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK no es capaz de hacerlo (310). En nuestro caso, por el contrario, observamos que dicho inhibidor revierte la muerte producida por BAY 43-9006 y por el *siRNA* de B-RAF, lo que está de acuerdo con otros autores que han demostrado que BAY 43-9006 induce apoptosis a través de la activación de las caspasas 2 y 4 (312). La discrepancia entre los datos publicados y los nuestros sobre el mecanismo de acción de BAY 43-9006 puede deberse a que se ha demostrado que este inhibidor no es específico para RAF y que induce una gran cantidad de efectos dependiendo del tipo celular, por ejemplo en células de osteosarcoma impide la progresión tumoral mediante la inhibición de proteínas del citoesqueleto de una forma independiente de la vía MEK-ERK (314). Además, nosotros no profundizamos en si la regulación es a través de caspasas iniciadoras o efectoras, pues la aproximación que utilizamos para determinar su implicación en la apoptosis observada fue el tratamiento con un inhibidor general de caspasas.

Nosotros profundizamos en los mecanismos a través de los cuales <sup>V600E</sup>B-RAF protege frente a la apoptosis a las células que la contienen y demostramos que este oncogén induce supervivencia mediante la regulación de la maquinaria apoptótica de las células. En concreto, demostramos que la eliminación de la expresión de <sup>V600E</sup>B-RAF con *siRNA* disminuye la expresión las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL y promueve la expresión o estabilización de la proteína proapoptótica BIM. Las proteínas de la familia Bcl-2 están involucradas en el control de la apoptosis y desde hace poco han suscitado especial atención como dianas de la vía RAF-MEK-ERK

(290,315,316). La fosforilación directa de la proteína Bcl-2 por ERK aumenta sus propiedades como supresora de la apoptosis (317). Las proteínas proapoptóticas BIM y BAD también son dianas de la vía de señalización RAF-ERK y su fosforilación inactiva su capacidad proapoptótica. Concretamente, la fosforilación de BIM por ERK promueve su ubiquitinación y su consecuente degradación por el proteasoma (318-322). Dos estudios recientes han demostrado que la presencia de <sup>V600E</sup>B-RAF en células de cáncer colorrectal y de melanoma induce resistencia a la muerte producida en ausencia de suero o por agentes quimioterapéuticos, a través de la represión de BIM (148,152). En ambos casos, la inhibición de la vía MEK-ERK produce la desfosforilación de BIM y causa la muerte celular (148,152). Sin embargo, los resultados de Sheridan y cols. muestran que el silenciamiento de la expresión de BIM protege solo parcialmente contra la muerte producida por drogas citotóxicas, mientras que <sup>V600E</sup>B-RAF protege totalmente frente a los mismos estímulos (152). Además, como ya hemos mencionado, Panka y cols. propusieron que la desregulación de Bcl-2 y Bcl-XL producida por BAY 43-9006 en células de melanoma es independiente de la actividad de MEK-ERK, pues no se reproduce por inhibición de MEK con U0126 o PD98059 (310). Estas observaciones sugieren que la inactivación de BIM por <sup>V600E</sup>B-RAF contribuye solo parcialmente a la actividad antiapoptótica de este oncogén y que la regulación de Bcl-2 y Bcl-XL es independiente de la vía MEK-ERK, por lo que <sup>V600E</sup>B-RAF puede estar modulando otros puntos de la maquinaria de muerte celular independientemente de la activación de esta cascada, aunque estos resultados están pendientes de confirmación.

En cuanto a otras vías de señalización moduladas por B-RAF a través de un mecanismo independiente de la vía MEK-ERK, hasta el momento no se conoce nada con detalle, pero todo apunta a que debe existir alguna distinta a ésta. Por ejemplo, en el caso del cáncer de tiroides, no se conoce porqué la mutación en B-RAF está asociada con un mayor grado de agresividad y recurrencia de estos tumores, respecto a otras alteraciones genéticas relacionadas con la vía MEK-ERK, tales como la transversión del receptor tirosina quinasa RET/PTC o mutaciones oncogénicas de la proteína Ras. La respuesta podría estar en la diferente potencia oncogénica de estas alteraciones genéticas o en la existencia de distintos sustratos y eventos moleculares asociados a ellas. En este sentido, se ha demostrado que la expresión inducida de <sup>V600E</sup>B-RAF en células tiroideas de rata da lugar a inestabilidad genética y aumenta la capacidad invasiva de las células, mientras que la expresión de RET/PTC no (144,145). Por otra parte, mediante análisis de expresión génica con *microarrays* en células con una expresión inducida de <sup>V600E</sup>B-RAF o RET/PTC, o en tumores papilares tiroideos humanos con RET/PTC, mutaciones en Ras o B-RAF mutado, se han detectado

distintos patrones de expresión según la mutación presente (144,323). Por lo tanto, estos datos demuestran que existen mecanismos moleculares acoplados específicamente a <sup>V600E</sup>B-RAF que no son compartidos por las otras mutaciones, y que, en algunos casos, podrían ser independientes de la vía MEK-ERK, cuya activación es dependiente de las tres alteraciones genéticas.

De momento, no se conoce ningún sustrato distinto de MEK a través del cual B-RAF ejerza su protección frente a la muerte celular, mientras que en el caso de la proteína C-RAF sí. Se ha demostrado que C-RAF modula la actividad de varios efectores independientemente de su actividad MEK quinasa, como NF-κB, las proteínas proapoptóticas ASK1, MST2 y la quinasa efectora de Rho implicada en migración, ROK $\alpha$ , promoviendo supervivencia, transición epitelio-mesenquima (EMT) e invasión (12, 31). Por lo tanto, dado que B-RAF puede señalar en determinadas circunstancias a través de C-RAF, este podría ser un mecanismo de actuación distinto a Ras y la vía MEK-ERK. Sin embargo, nuestros resultados descartan a C-RAF como mediador de la supervivencia inducida por <sup>V600E</sup>B-RAF, pues hemos demostrado que la inhibición de la expresión de C-RAF no modifica los niveles de muerte celular en nuestro modelo. En este sentido, está ampliamente descrito que, mientras que en las células que poseen B-RAF y C-RAF silvestres muchas funciones dependen de las dos proteínas, las células con <sup>V600E</sup>B-RAF se vuelven “adictas a este oncogén” y el papel de C-RAF no es tan importante.

Otros posibles candidatos son las MAPKs JNK y p38, que también están implicadas en la supervivencia celular en respuesta a diversos estímulos. Nosotros analizamos la expresión y fosforilación de estas proteínas y no encontramos variaciones en ninguna de las dos al inhibir la cascada B-RAF-MEK-ERK a distintos niveles (datos no mostrados). Sin embargo, aunque todavía no hemos profundizado en ello, sí hemos observado que el tratamiento con el inhibidor de JNK SP600125, pero no el tratamiento con el inhibidor de p38 SB203580, revierte parcialmente la muerte celular inducida por la falta de <sup>V600E</sup>B-RAF, por lo que esta vía posiblemente se encuentre desregulada por <sup>V600E</sup>B-RAF, para potenciar su papel en supervivencia (datos no mostrados). Entre los múltiples mecanismos por los que JNK regula el proceso de apoptosis, se ha descrito que puede inhibir distintas proteínas antiapoptóticas y activar proapoptóticas como BIM, BID y BAD (324), lo que puede encajar con la supervivencia inducida por <sup>V600E</sup>B-RAF en nuestras células.

Por otra parte, recientemente se ha observado que <sup>V600E</sup>B-RAF coopera con Rac1b hiperactivado en la protección de la apoptosis de células tumorales colorrectales, pero no se demuestra una conexión directa entre las dos vías (168). La vía de NF-κB

también se ha relacionado con <sup>V600E</sup>B-RAF, pero como discutiremos más adelante, este no parece ser un mecanismo por el que B-RAF proteja de la apoptosis en nuestras células, ya que aunque <sup>V600E</sup>B-RAF activa este factor de transcripción, lo hace de una forma dependiente de MEK-ERK.

### **3. La vía PI3K-AKT-mTOR colabora en la protección de la apoptosis inducida por <sup>V600E</sup>B-RAF**

Una vía destacada por su participación en el proceso de supervivencia en presencia de diferentes estímulos apoptóticos es la vía PI3K-AKT (180,325). El aumento de su actividad, por desregulación en distintos niveles de la cascada, se ha asociado reiteradamente con la progresión tumoral, al otorgar a las células la capacidad de resistir el proceso apoptótico, además de aumentar su proliferación y crecimiento. Diversos estudios relativamente recientes han propuesto la colaboración de la vía B-RAF-MEK-ERK y la vía PI3K-AKT en el proceso de supervivencia. Por ejemplo, en 2006 Bedogni y cols. estudiaron la implicación de la vía PI3K y ERK en un modelo murino transgénico TPRas, que expresa el gen Ha-Ras hiperactivado bajo el promotor de la tirosinasa en melanocitos, y demostraron que tanto la inhibición de la vía PI3K-AKT como la inhibición de la vía RAF-ERK retrasaba el desarrollo de melanomas y disminuía la incidencia tumoral, especialmente cuando los inhibidores LY294002 y U0126 se aplicaban combinados (326). Esta respuesta se producía por disminución de la proliferación, aumento de la apoptosis y disminución de la angiogénesis *in vivo* e *in vitro*. Hace unos meses, Lopez-Fauqued y cols. han demostrado el mismo efecto *in vitro* tras el tratamiento con el inhibidor dual de PI3K-mTOR PI-103 y BAY 43-9006 en células de melanoma en las que Ras estaba activo por tratamiento con factores de crecimiento (327). Sin embargo, *in vivo*, el inhibidor PI-103 aumentaba el tamaño de tumores xenotransplantados en ratones inmunodeprimidos y revertía la apoptosis inducida por BAY 43-9006 (327). Por otra parte, también se ha demostrado en células de melanoma que B-RAF y PI3K son necesarias para la protección de la muerte celular por anoikis, apoptosis inducida por la pérdida o inadecuado contacto con la matriz extracelular (147), aunque no se establece ninguna conexión entre ellas.

Al analizar la implicación de la vía PI3K-AKT en los procesos regulados por <sup>V600E</sup>B-RAF, nosotros demostramos que esta vía también regula la proliferación celular de las células tumorales estudiadas, incluidas las que poseen B-RAF silvestre. Así, la sola inhibición de PI3K con LY294002 disminuye la tasa de proliferación y la síntesis de ADN en nuestras células. Además, el tratamiento simultáneo con LY294002 y los

inhibidores de la vía B-RAF-MEK-ERK tiene un efecto mayor que el tratamiento por separado, por lo que ambas vías intervienen en la proliferación de forma independiente pero cooperativa. Por tanto, no es de extrañar que, como muestran nuestros datos, el papel de PI3K en proliferación también sea independiente del estado de activación de B-RAF. Estos resultados son consistentes con los mencionados anteriormente (326,327) y con aquellos en los que se demuestra la cooperación de PI3K-AKT y ERK en la regulación de la maquinaria del ciclo celular (328).

Sin embargo, en cuanto a su papel en supervivencia, nuestros resultados muestran que la inhibición de la vía PI3K-AKT no produce ningún efecto en condiciones basales, pero participa en la protección que <sup>V600E</sup>B-RAF ejerce frente a la apoptosis. En este caso, parece estar implicada la cascada PI3K-AKT-mTOR-p70S6K. En concreto, en células que carecen de actividad de <sup>V600E</sup>B-RAF, por tratamiento con BAY 43-9006 o eliminación de su expresión con *siRNA*, la inhibición a distintos niveles de la vía con los inhibidores de PI3K LY294002 y wortmanina, con el inhibidor de AKT ALX, o con el inhibidor de mTOR rapamicina, produce un aumento del nivel de apoptosis mucho mayor que el inducido solamente por la falta de expresión o de actividad de <sup>V600E</sup>B-RAF. Esto indica que la inhibición de los distintos componentes de la vía PI3K-AKT-mTOR-p70S6K solo potencia el proceso apoptótico en ausencia de este oncogén. De nuevo, esta cooperación parece independiente de la inactivación de la vía MEK-ERK, pues el tratamiento simultáneo con U0126 y LY294002 no aumenta el porcentaje de células apoptóticas, como si lo hace el tratamiento conjunto con BAY 43-9006 y LY294002 o *siRNA* para B-RAF y LY294006. Estos resultados se oponen a los descritos por otros autores en los que se propone que en la cooperación de ambas vías para la protección de la apoptosis se encuentra involucrada ERK (326,329); sin embargo, concuerdan con nuestros datos sobre una función antiapoptótica de B-RAF independiente de la activación de MEK-ERK.

Las discrepancias pueden deberse a que, por ejemplo, en el trabajo de Bedogni y cols. se utiliza un modelo de ratón con Ras hiperactivado y por lo tanto este oncogén puede estar activando MEK-ERK, por un mecanismo independiente de B-RAF, y otras vías de supervivencia que no sean activadas por B-RAF (326). En este sentido, nosotros hemos demostrado recientemente que <sup>V12</sup>Ras, pero no <sup>V600E</sup>B-RAF, protege de la apoptosis producida por la disminución del contenido celular de colesterol en células de cáncer colorrectal, y que además, esta protección es independiente de la activación de ERK (330). Por otra parte, el trabajo de Qing-Bai She y cols. se realizó en células tumorales de mama MDA-468, en las cuales PTEN está mutado y, por tanto, tienen una activación constitutiva de AKT (329). Sin embargo, en nuestro caso, en las

líneas celulares utilizadas la proteína AKT no se encuentra activada de forma basal. Aún así existía la posibilidad de que la vía estuviese desregulada a otro nivel, como mutaciones en PI3K, pero tampoco es el caso, ya que recientemente se ha publicado un estudio de genotipado de estas líneas celulares en el que se analizó la existencia del oncogén PIK3CA, entre otros, y se ha demostrado que ninguna de estas líneas presenta dicho oncogén, ni tienen actividad AKT constitutivamente activa (331).

Sorprendentemente, nosotros observamos que aunque estas células no tienen AKT constitutivamente fosforilado en condiciones basales, la falta de expresión de <sup>V600E</sup>B-RAF en las células NPA induce la activación de AKT y de la proteína p70S6K que se encuentra por debajo de mTOR en la cascada. Además, dichas activaciones son revertidas por la inhibición de PI3K con LY294002, así como por la inhibición mTOR con rapamicina, en el caso de p70S6K. Estos datos coinciden plenamente con los mostrados por Sala y cols. en células de melanoma y cáncer de colon, donde demuestran que la eliminación de <sup>V600E</sup>B-RAF en estas células produce un aumento de la fosforilación de AKT (151). Este resultado indica que hay una compensación entre la activación de B-RAF y AKT, de forma que <sup>V600E</sup>B-RAF está inhibiendo, al menos en parte, la activación de AKT por PI3K. Esto explicaría porque los niveles de apoptosis observados con la eliminación de <sup>V600E</sup>B-RAF no son muy altos, ya que en este caso la hiperfosforilación de AKT contrarresta este efecto, y por tanto, es necesario inhibir ambas vías para producir una mayor disminución de la supervivencia celular. Por otra parte, es posible que AKT esté parcialmente activa por fosforilación en el residuo de treonina 308 solamente y no sea suficiente para supervivencia. Desde este punto de vista, se puede explicar el hecho de que la inhibición de la vía PI3K-AKT-mTOR-p70S6K por sí sola no tenga ningún efecto en apoptosis, pues AKT ya se encuentra inhibido de alguna forma por <sup>V600E</sup>B-RAF. Sin embargo, LY294002 sí tiene efecto por sí mismo en proliferación lo que sugiere que el efecto de PI3K en este proceso es independiente de AKT, aunque no lo hemos comprobado. Hasta el momento no se ha descrito en la literatura ninguna interacción directa entre <sup>V600E</sup>B-RAF y PI3K-AKT en el sentido que nosotros proponemos; solamente se ha descrito en el sentido contrario, es decir, que AKT es capaz de inhibir B-RAF, pues en células de melanoma AKT3 está frecuentemente activado y fosforila a <sup>V600E</sup>B-RAF inhibiendo parcialmente su actividad hasta un nivel al cual promueve supervivencia, pero no senescencia (169). A la vista de los resultados, nosotros intentamos determinar si el mecanismo por el que <sup>V600E</sup>B-RAF inhibe la activación de AKT por PI3K es mediante una interacción directa entre estas proteínas. Para ello realizamos ensayos de inmunoprecipitación de las proteínas PI3K, AKT, B-RAF y C-RAF, pero en ningún caso observamos interacción de PI3K o AKT con B-RAF o C-RAF y viceversa (datos no mostrados).

Por otra parte, en cuanto a los mecanismos por los que estas vías pueden controlar conjuntamente la apoptosis celular, nosotros solo disponemos de datos preliminares que demuestran que se da, al menos parcialmente, a través de la vía mTOR-p70S6K y la síntesis de proteínas, ya que el tratamiento con cicloheximida tiene un efecto sobre la supervivencia celular similar al observado con el tratamiento con rapamicina. Por lo tanto, este efecto sobre la supervivencia puede ser debido a la doble función de mTOR; por una parte mTORC1 regula la síntesis de proteínas a través de p70S6K y 4E-BP1, y por otra mTORC2 puede activar también AKT, que disminuye la expresión de BIM a través de la fosforilación del factor de transcripción FOXO3A (289).

El hecho de que no conozcamos los mecanismos finales de estas vías para promover supervivencia en estas células no menoscaba la importancia de la cooperación de <sup>V600E</sup>B-RAF y la vía PI3K-AKT-mTOR-p70S6K que nosotros observamos y, aunque aún desconocemos el mecanismo de interacción de estas dos vías, nuestros resultados muestran claramente como la cooperación de ambas modula la supervivencia celular y, por tanto, debe tenerse en cuenta a la hora de diseñar estrategias terapéuticas contra la progresión tumoral.

#### **4. <sup>V600E</sup>BRAF aumenta la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B**

El resultado de la activación de NF- $\kappa$ B depende de la naturaleza y el contexto celular, pero está claro que su desregulación es crucial en cáncer. La activación de NF- $\kappa$ B puede contribuir a la carcinogénesis de múltiples formas: impulsando la proliferación celular, aumentando la supervivencia celular y promoviendo la angiogénesis y la metástasis (276,332,333).

Además de los resultados discutidos anteriormente, nuestro trabajo demuestra que <sup>V600E</sup>B-RAF regula el proceso de transducción de señales necesario para la activación de NF- $\kappa$ B. Nosotros demostramos que la sobreexpresión de mutantes de B-RAF con elevados niveles de actividad quinasa induce la transcripción mediada por NF- $\kappa$ B, aumentando su translocación al núcleo y la transactivación de p65/RelA. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con la apoptosis, en este caso el efecto producido por <sup>V600E</sup>B-RAF es el resultado de un aumento de la actividad de la vía MEK-ERK, dado que la activación de varios parámetros analizados implicados en la activación de NF- $\kappa$ B es inhibida al utilizar el inhibidor de MEK U0126.

Nuestros datos concuerdan con los hallazgos de otros grupos que demuestran que existe una conexión entre la vía Ras-RAF-MEK-ERK y NF- $\kappa$ B, y que <sup>V600E</sup>B-RAF puede jugar un papel importante en la regulación de este factor de transcripción. Por ejemplo, Ikenoue y cols., demostraron que en células NIH3T3 algunos mutantes de B-RAF, con mayor actividad que la proteína silvestre, por mutaciones en el segmento de activación y en el lazo rico en glicina, aumentaban la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B (123). Este efecto era mayor en el caso de los mutantes del segmento de activación de B-RAF, en especial el mutante <sup>V600E</sup>B-RAF (96,123), al igual que nosotros observamos. Además, también se ha demostrado que la presencia de <sup>V600E</sup>B-RAF aumenta la invasión de “células tumorales tiroideas” por activación de NF- $\kappa$ B (291) y recientemente se ha observado que la actividad de este factor de transcripción se encuentra elevada en ratones en los que se sobreexpresa Ras oncogénico y se elimina la expresión de p53 (334). Por otra parte, nuestros datos son totalmente paralelos a los de Palona y cols. en los que utilizan un modelo de células WRO en las que sobreexpresan <sup>V600E</sup>B-RAF de una manera inducible, y de células NPA, en las que también sobreexpresan este oncogén, a pesar de que ya lo contienen de forma endógena, pero en las que se observan mejor los cambios en la activación de NF- $\kappa$ B (291). En nuestro caso, a pesar de que sobreexpresamos <sup>V600E</sup>B-RAF en ambas líneas celulares, observamos unos mayores niveles de activación en las células NPA que en las células WRO. Esto puede ser debido a que en condiciones basales las células WRO presentan unos niveles de actividad de NF- $\kappa$ B cien veces mayores que los de NPA. Estos datos coinciden plenamente con los datos publicados por Pacifico y cols. en las mismas células (335) y, por lo tanto, pueden explicar porqué la expresión de <sup>V600E</sup>B-RAF en las células WRO no da lugar a grandes aumentos en la actividad de NF- $\kappa$ B.

Dado que nosotros no observamos que la inhibición de la expresión de <sup>V600E</sup>B-RAF disminuya la activación NF- $\kappa$ B en células NPA, probablemente debido a sus bajos niveles basales de actividad, utilizamos dos aproximaciones distintas para ver si la inhibición de <sup>V600E</sup>B-RAF disminuye la actividad de NF- $\kappa$ B, la sobreexpresión de RKIP y el tratamiento con geldanamicina. Así, demostramos que en células que sobreexpresan <sup>V600E</sup>B-RAF, su desestabilización y degradación por inhibición de Hsp90 con geldanamicina y la inhibición de su actividad con RKIP revierten la activación de NF- $\kappa$ B dependiente de este oncogén. Inicialmente, RKIP se describió como un inhibidor de C-RAF por interacción con ella (104), pues actúa como un inhibidor competitivo de la activación de MEK por C-RAF (105), pero posteriormente se ha descrito que B-RAF también es una diana directa de RKIP, independientemente de C-RAF, pues inhibe su actividad quinasa y disminuye la transformación producida por <sup>V600E</sup>B-RAF (110). Por otra parte, se ha descrito que RKIP también puede inhibir la

actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B por interacción con proteínas de la vía de activación de NF- $\kappa$ B, como TAK o NIK, inhibiendo su actividad (112). Además, recientemente se ha propuesto que su interacción con esta vía es como proteína adaptadora que impide la fosforilación y degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  e inhibe la actividad de NF- $\kappa$ B (113). Nuestros datos demuestran que la proteína RKIP es capaz de inhibir la activación de NF- $\kappa$ B inducida por <sup>V600E</sup>B-RAF por la inhibición directa de esta proteína; por una parte la actividad quinasa de <sup>V600E</sup>B-RAF en nuestras células se encuentra disminuida en presencia de RKIP, y aunque no podemos descartar que RKIP, además de inhibir <sup>V600E</sup>B-RAF, actúe sobre la maquinaria de activación de NF- $\kappa$ B, este no parece ser el caso, ya que como han demostrado otros autores las cinéticas de interacción de RKIP con componentes de la vía de NF- $\kappa$ B difiere significativamente de la interacción con las proteínas RAF (112,113). Mientras que RKIP se asocia con las proteínas RAF en condiciones basales, para la asociación con TRAF6 o TAK1 necesita de la activación previa de la vía por determinadas citoquinas (112,113).

Por otra parte, nosotros observamos los mismos efectos cuando incubamos las células con geldanamicina. Esta benzoquinona es un inhibidor de la chaperona Hsp90, la cual ayuda al plegamiento y estabilización de numerosas proteínas, entre las que se encuentra B-RAF. Da Roche Dias y cols. demostraron que la geldanamicina estimula la degradación de B-RAF, con una mayor eficacia sobre formas oncogénicas que sobre la proteína silvestre, y disminuye su señalización en células de melanoma (292). Nosotros también observamos que el tratamiento con geldanamicina induce la degradación de B-RAF y disminuye la actividad de NF- $\kappa$ B inducida por este oncogén. Por lo tanto, estos datos, junto con los obtenidos en los experimentos con RKIP demuestran que <sup>V600E</sup>B-RAF induce la activación de NF- $\kappa$ B.

Además, demostramos que la regulación de NF- $\kappa$ B por <sup>V600E</sup>B-RAF se produce a través de la vía canónica de activación de dicho factor de transcripción, pues <sup>V600E</sup>B-RAF induce la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  y la posterior translocación al núcleo de p65/RelA. Uno de los principales activadores de NF- $\kappa$ B por la vía canónica es el TNF $\alpha$ . Nosotros también estudiamos el papel de <sup>V600E</sup>B-RAF en células estimuladas con esta citoquina y observamos que la activación de NF- $\kappa$ B por <sup>V600E</sup>B-RAF es independiente de la activación de NF- $\kappa$ B por TNF $\alpha$ , pues prácticamente en todos los eventos estudiados sobre la activación de NF- $\kappa$ B por <sup>V600E</sup>B-RAF hemos observado el mismo efecto en ausencia o en presencia de TNF $\alpha$ . Además, hay que destacar que la activación de NF- $\kappa$ B por TNF $\alpha$  en nuestras células es aditiva a la activación por <sup>V600E</sup>B-RAF, lo que indica que ambas formas de activación convergen en algún punto de la vía. Puesto que nosotros hemos observado que <sup>V600E</sup>B-RAF aumenta la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$ , la

conexión entre la vía B-RAF-MEK-ERK y la vía canónica de activación de NF- $\kappa$ B por TNF $\alpha$  podría estar en esta proteína o en los complejos IKK.

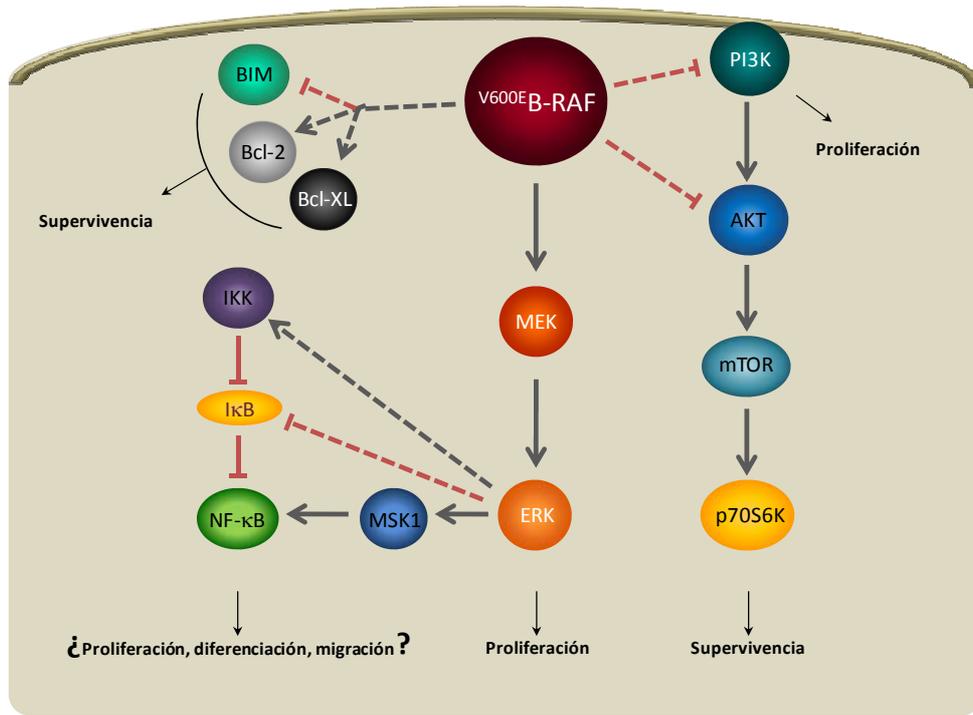
Respecto a la activación del factor NF- $\kappa$ B, aunque se ha considerado que su translocación al núcleo es el principal mecanismo para activar la expresión génica, cada vez se conocen más evidencias de que existen mecanismos adicionales de activación de este factor de transcripción, tales como la fosforilación de la subunidad de transactivación p65/RelA (250,252,253,255,336). La mayoría de estos efectos parecen estar mediados por la quinasa MSK1, que fosforila p65/RelA en el residuo de la S276, evento crucial para la regulación de la transactivación nuclear de p65/RelA (255,337-339). Nosotros demostramos que <sup>V600E</sup>B-RAF aumenta la actividad de NF- $\kappa$ B a través de la vía canónica mediante la activación de la vía MEK-ERK, pues la inhibición de esta vía produce la acumulación de I $\kappa$ B $\alpha$  en el citosol, bloquea la translocación al núcleo de p65 e inhibe la transcripción dependiente de NF- $\kappa$ B. Por otra parte, nuestros resultados también indican que <sup>V600E</sup>B-RAF induce la actividad de transactivación de la subunidad p65/RelA, como se ha demostrado por el ensayo reportero p65-Gal4/Gal4-Luc, a través de un mecanismo dependiente de la proteína quinasa MSK1. Esto lo demostramos mediante la expresión del mutante de MSK1 sin actividad quinasa, que reduce el nivel de la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B inducida por <sup>V600E</sup>B-RAF. Nuestros resultados coinciden con varios trabajos que han demostrado que la proteína MSK1 aumenta el potencial de transactivación de p65/RelA (255,337-339). Por lo tanto, nosotros proponemos una vía en la cual MSK1 actúa como un efector por debajo de <sup>V600E</sup>B-RAF para aumentar la transactivación de p65/RelA. En resumen, nosotros demostramos que <sup>V600E</sup>B-RAF regula la activación de NF- $\kappa$ B de una manera dual, por una parte induce la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  y su disociación de NF- $\kappa$ B, permitiendo de ese modo la translocación nuclear, y por otra, induciendo la transactivación de la subunidad p65/RelA nuclear, a través de MSK1.

Entre las diferentes funciones reguladas por <sup>V600E</sup>B-RAF y/o NF- $\kappa$ B, se ha propuesto que estas proteínas intervienen en la protección de la apoptosis celular. Así, se ha observado que la inhibición de NF- $\kappa$ B en células tumorales aumenta la apoptosis y disminuye la resistencia a agentes quimioterapéuticos (276). En un principio, nosotros pensamos que la función antiapoptótica de <sup>V600E</sup>B-RAF podía estar mediada por la activación de NF- $\kappa$ B, sin embargo, a diferencia de lo observado en el proceso de supervivencia, nuestros resultados demuestran que el efecto de <sup>V600E</sup>B-RAF sobre la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B sí depende de la vía MEK-ERK. Por lo tanto, a la vista de estos resultados, nosotros creemos que la activación de NF- $\kappa$ B por <sup>V600E</sup>B-RAF no participa en la supervivencia celular inducida por este oncogén, pues dicha

supervivencia es independiente de la vía MEK-ERK, mientras que la activación de NF- $\kappa$ B sí depende de ella. En este sentido, Gray-Schopfer y cols. demostraron que la activación de NF- $\kappa$ B con TNF $\alpha$  protege de la apoptosis inducida por la eliminación de la señal de RAF, pero que actúan de una forma independiente (340). Sin embargo, la contribución de NF- $\kappa$ B a la carcinogénesis no se debe exclusivamente a la regulación de la apoptosis, como ya hemos mencionado, también aumenta la proliferación celular (276,341), y puesto que nosotros hemos visto que este proceso sí está regulado por la vía B-RAF-MEK-ERK, la función de NF- $\kappa$ B tras activación por <sup>V600E</sup>B-RAF podría ser en este sentido.

En conclusión, nosotros demostramos que la forma oncogénica <sup>V600E</sup>B-RAF participa en los procesos de proliferación y apoptosis de células tumorales, regulando no solo la vía de MEK-ERK, sino también la vía PI3K-AKT-mTOR-p70S6K y la vía de NF- $\kappa$ B (figura 52). Por lo tanto, parece que juega un papel importantísimo en la generación y progresión de tumores, ya que a través de estas tres vías de señalización se regulan los procesos más importantes relacionados con la carcinogénesis, aumento de la proliferación, evasión de la apoptosis, migración e invasión, y angiogénesis. Además, nosotros identificamos que <sup>V600E</sup>B-RAF tiene un papel antiapoptótico no descrito hasta el momento e independiente de la activación de la vía MEK-ERK. Todos estos datos confirman a <sup>V600E</sup>B-RAF como una mutación iniciadora “*driver*” clave, que puede dirigir el proceso de otras mutaciones secundarias “*passenger*” y, por lo tanto, como una diana terapéutica de especial interés.

Cada vez más evidencias muestran que inhibidores de una diana que funcionan *in vitro* fallan en el tratamiento del cáncer en estudios preclínicos. La resistencia a la apoptosis es una de las propiedades de las células transformadas, y por lo tanto una de las mayores preocupaciones en el tratamiento del cáncer. Los datos que presentamos sobre la necesidad de inhibir <sup>V600E</sup>B-RAF y AKT para lograr unos niveles de apoptosis mayores, debido al aumento de actividad de AKT tras la inhibición de B-RAF, demuestran la necesidad de estudiar estrategias terapéuticas que combinen drogas que inhiban varias vías para dar lugar a la muerte celular. Por todo esto, nuestros datos aportan una valiosa información para diseñar nuevos enfoques terapéuticos que combinen el uso de drogas con protocolos encaminados a disminuir la expresión y/o actividad de B-RAF y otras vías de señalización relacionadas con este oncogén.



**Figura 52. Mecanismos moleculares implicados en la carcinogénesis producida por B-RAF.** En la figura se esquematizan las vías de transducción de señales reguladas por <sup>V600E</sup>B-RAF y se indican los procesos celulares en los que éstas participan, según los resultados obtenidos en nuestro estudio. La proteína oncogénica <sup>V600E</sup>B-RAF induce proliferación a través de la activación de la vía MEK-ERK. PI3K también interviene en este proceso, pero de forma independiente de B-RAF. Por otra parte, <sup>V600E</sup>B-RAF induce supervivencia por regulación de proteínas de la maquinaria apoptótica como BIM, Bcl-2 y Bcl-XL, a través de un mecanismo independiente de MEK-ERK. <sup>V600E</sup>B-RAF y la vía de PI3K colaboran en la supervivencia celular. El mutante <sup>V600E</sup>B-RAF inhibe la actividad de esta vía y la inhibición de ambas es necesaria para obtener unos niveles elevados de apoptosis. Por último, <sup>V600E</sup>B-RAF aumenta la actividad transcripcional de NF-κB, en este caso de forma dependiente de MEK-ERK, por activación de la vía canónica y por activación de la actividad transactivadora de p65/RelA a través de ERK-MSK1.

*Conclusiones*



1. La activación de la vía MEK-ERK depende de C-RAF y B-RAF en células que no contienen mutaciones en ninguna de estas proteínas, mientras que en células que contienen la mutación <sup>V600E</sup>B-RAF, la activación de esta vía es totalmente dependiente de este oncogén.
2. En las células que poseen la proteína <sup>V600E</sup>B-RAF oncogénica, ésta es la principal responsable del proceso de proliferación celular, a través de la activación constitutiva de la vía MEK-ERK.
3. <sup>V600E</sup>B-RAF es una señal de supervivencia. La inhibición de su expresión o de su actividad en las células que la contienen induce apoptosis en condiciones basales y sensibiliza a las células a morir por apoptosis tras el tratamiento con agentes proapoptóticos, como el etopósido.
4. La protección frente a la apoptosis ejercida por <sup>V600E</sup>B-RAF se produce a través de la regulación de proteínas de la maquinaria apoptótica celular, como Bcl-2, Bcl-XL y BIM, por un mecanismo dependiente de caspasas e independiente de la vía MEK-ERK.
5. Además de la vía MEK-ERK, PI3K también es necesaria para la proliferación de células que contienen la mutación <sup>V600E</sup>B-RAF.
6. La vía PI3K-AKT-mTOR coopera con <sup>V600E</sup>B-RAF en la protección de la apoptosis inducida por este oncogén. La inhibición de la vía PI3K-AKT-mTOR y la síntesis de proteínas potencian la apoptosis producida por la ausencia de <sup>V600E</sup>B-RAF.
7. <sup>V600E</sup>B-RAF se comporta como un inhibidor de la vía PI3K-AKT-mTOR-p70S6K y su ausencia aumenta la actividad de esta vía.
8. Mutantes constitutivamente activos de B-RAF aumentan la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B.
9. <sup>V600E</sup>B-RAF induce la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  y aumenta la translocación al núcleo de p65/RelA por un mecanismo dependiente de MEK-ERK.
10. La actividad de transactivación de p65/RelA se incrementa por la presencia de <sup>V600E</sup>B-RAF a través de un mecanismo dependiente de MSK1.



## *Bibliografía*



- (1) Schweppe RE, Klopper JP, Korch C, Pugazhenti U, Benezra M, Knauf JA, et al. Deoxyribonucleic acid profiling analysis of 40 human thyroid cancer cell lines reveals cross-contamination resulting in cell line redundancy and misidentification. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(11):4331-4341.
- (2) Ringel MD. "Thyroid cancer" cell line misidentification: a time for proactive change. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(11):4226-4227.
- (3) Editorial. Identity crisis. *Nature* 2009; 457(7232):935-936.
- (4) Pilli T, Prasad KV, Jayarama S, Pacini F, Prabhakar BS. Potential utility and limitations of thyroid cancer cell lines as models for studying thyroid cancer. *Thyroid* 2009; 19(12):1333-1342.
- (5) Muñoz A. *Cáncer. Genes y Nuevas Terapias*. Hélice; 1997.
- (6) Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1):57-70.
- (7) Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 2007; 35(4):495-516.
- (8) Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26(4):239-257.
- (9) Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res* 1999; 59(7 Suppl):1701s-1706s.
- (10) Slovirer RS. Apoptosis: a guide for the perplexed. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23(1):19-24.
- (11) Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407(6805):770-776.
- (12) Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001; 104(4):487-501.
- (13) Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281(5381):1305-1308.
- (14) Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 1995; 14(22):5579-5588.
- (15) Rapp UR, Rennefahrt U, Troppmair J. Bcl-2 proteins: master switches at the intersection of death signaling and the survival control by Raf kinases. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1644(2-3):149-158.

- (16) Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 2004; 23(16):2861-2874.
- (17) Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* 2006; 13(9):1423-1433.
- (18) Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91(4):479-489.
- (19) van Loo G, van Gurp M, Depuydt B, Srinivasula SM, Rodriguez I, Alnemri ES, et al. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ* 2002; 9(1):20-26.
- (20) Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, et al. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 2000; 192(4):571-580.
- (21) Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 1998; 391(6662):96-99.
- (22) Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(9):647-656.
- (23) Kuwana T, Newmeyer DD. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15(6):691-699.
- (24) Yan N, Shi Y. Mechanisms of apoptosis through structural biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; 21:35-56.
- (25) Donovan M, Cotter TG. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1644(2-3):133-147.
- (26) Newmeyer DD, Bossy-Wetzel E, Kluck RM, Wolf BB, Beere HM, Green DR. Bcl-xL does not inhibit the function of Apaf-1. *Cell Death Differ*. 2000; 7(4):402-407.
- (27) Willis SN, Adams JM. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17(6):617-625.
- (28) Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev* 2001; 15(12):1481-1486.

- (29) Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, et al. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* 1999; 144(5):891-901.
- (30) Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, et al. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* 2000; 14(16):2060-2071.
- (31) Esposti MD. The roles of Bid. *Apoptosis* 2002; 7(5):433-440.
- (32) Sharpe JC, Arnoult D, Youle RJ. Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1644(2-3):107-113.
- (33) Philchenkov A. Caspases: potential targets for regulating cell death. *J Cell Mol Med* 2004; 8(4):432-444.
- (34) Ranjit GB, Cheng MF, Mackay W, Whitacre CM, Berger JS, Berger NA. Poly(adenosine diphosphoribose) polymerase in peripheral blood leukocytes from normal donors and patients with malignancies. *Clin Cancer Res* 1995; 1(2):223-234.
- (35) Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 1997; 388(6639):300-304.
- (36) Chai J, Shiozaki E, Srinivasula SM, Wu Q, Datta P, Alnemri ES, et al. Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* 2001; 104(5):769-780.
- (37) Huang Y, Park YC, Rich RL, Segal D, Myszka DG, Wu H. Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell* 2001; 104(5):781-790.
- (38) Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73(8):2013-2026.
- (39) Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004; 68(2):320-344.
- (40) Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 2007; 26(22):3100-3112.
- (41) Krishna M, Narang H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65(22):3525-3544.
- (42) Marshall CJ. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr Opin Genet Dev* 1994; 4(1):82-89.

- (43) Mercer KE, Pritchard CA. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2003; 1653(1):25-40.
- (44) Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: Multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 2006; 24(1):21-44.
- (45) Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 1995; 80(2):179-185.
- (46) Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take center stage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5(11):875-885.
- (47) Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell* 2004; 6(4):313-319.
- (48) Wellcome Trust Sanger Institute. Catalogue of Somatic Mutations in Cancer [en línea] <http://www.sanger.ac.uk/perl/genetics/CGP/cosmic?action=bygene&ln=BRAF&start=1&end=767&coords=AA:AA>. 2006; Acceso Marzo 2010.
- (49) Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417(6892):949-954.
- (50) Marais R, Marshall CJ. Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf. *Cancer Surv* 1996; 27:101-125.
- (51) Barnier JV, Papin C, Eychene A, Lecoq O, Calothy G. The mouse B-raf gene encodes multiple protein isoforms with tissue-specific expression. *J Biol Chem* 1995; 270(40):23381-23389.
- (52) Storm SM, Cleveland JL, Rapp UR. Expression of raf family proto-oncogenes in normal mouse tissues. *Oncogene* 1990; 5(3):345-351.
- (53) Wittinghofer A, Nassar N. How Ras-related proteins talk to their effectors. *Trends Biochem Sci* 1996; 21(12):488-491.
- (54) Stokoe D, McCormick F. Activation of c-Raf-1 by Ras and Src through different mechanisms: activation in vivo and in vitro. *EMBO J* 1997; 16(9):2384-2396.
- (55) Mizutani S, Koide H, Kaziro Y. Isolation of a new protein factor required for activation of Raf-1 by Ha-Ras: partial purification from rat brain cytosols. *Oncogene* 1998; 16(21):2781-2786.
- (56) Inouye K, Mizutani S, Koide H, Kaziro Y. Formation of the Ras dimer is essential for Raf-1 activation. *J Biol Chem* 2000; 275(6):3737-3740.

- (57) Weber CK, Slupsky JR, Herrmann C, Schuler M, Rapp UR, Block C. Mitogenic signaling of Ras is regulated by differential interaction with Raf isozymes. *Oncogene* 2000; 19(2):169-176.
- (58) Yan J, Roy S, Apolloni A, Lane A, Hancock JF. Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 1998; 273(37):24052-24056.
- (59) Hancock JF. Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4(5):373-385.
- (60) Apolloni A, Prior IA, Lindsay M, Parton RG, Hancock JF. H-ras but not K-ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway. *Mol Cell Biol* 2000; 20(7):2475-2487.
- (61) Chiu VK, Bivona T, Hach A, Sajous JB, Silletti J, Wiener H, et al. Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nat Cell Biol* 2002; 4(5):343-350.
- (62) Choy E, Chiu VK, Silletti J, Feoktistov M, Morimoto T, Michaelson D, et al. Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell* 1999; 98(1):69-80.
- (63) Tzivion G, Avruch J. 14-3-3 Proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem* 2002; 277(5):3061-3064.
- (64) Dhillon AS, Pollock C, Steen H, Shaw PE, Mischak H, Kolch W. Cyclic AMP-dependent kinase regulates Raf-1 kinase mainly by phosphorylation of serine 259. *Mol Cell Biol* 2002; 22(10):3237-3246.
- (65) Light Y, Paterson H, Marais R. 14-3-3 antagonizes Ras-mediated Raf-1 recruitment to the plasma membrane to maintain signaling fidelity. *Mol Cell Biol* 2002; 22(14):4984-4996.
- (66) Clark GJ, Drugan JK, Rossman KL, Carpenter JW, Rogers-Graham K, Fu H, et al. 14-3-3 zeta negatively regulates raf-1 activity by interactions with the Raf-1 cysteine-rich domain. *J Biol Chem* 1997; 272(34):20990-20993.
- (67) Rommel C, Radziwill G, Lovric J, Noeldeke J, Heinicke T, Jones D, et al. Activated Ras displaces 14-3-3 protein from the amino terminus of c-Raf-1. *Oncogene* 1996; 12(3):609-619.
- (68) Abraham D, Podar K, Pacher M, Kubicek M, Welzel N, Hemmings BA, et al. Raf-1-associated protein phosphatase 2A as a positive regulator of kinase activation. *J Biol Chem* 2000; 275(29):22300-22304.
- (69) Jaumot M, Hancock JF. Protein phosphatases 1 and 2A promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3 interactions. *Oncogene* 2001; 20(30):3949-3958.

- (70) Ory S, Zhou M, Conrads TP, Veenstra TD, Morrison DK. Protein Phosphatase 2A Positively Regulates Ras Signaling by Dephosphorylating KSR1 and Raf-1 on Critical 14-3-3 Binding Sites. *Curr Biol* 2003; 13(16):1356-1364.
- (71) King AJ, Sun H, Diaz B, Barnard D, Miao W, Bagrodia S, et al. The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338. *Nature* 1998; 396(6707):180-183.
- (72) Marais R, Light Y, Paterson HF, Marshall CJ. Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *EMBO J* 1995; 14(13):3136-3145.
- (73) Fabian JR, Daar IO, Morrison DK. Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase. *Mol Cell Biol* 1993; 13(11):7170-7179.
- (74) Mason CS, Springer CJ, Cooper RG, Superti-Furga G, Marshall CJ, Marais R. Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *EMBO J* 1999; 18(8):2137-2148.
- (75) Marais R, Light Y, Paterson HF, Mason CS, Marshall CJ. Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *J Biol Chem* 1997; 272(7):4378-4383.
- (76) Chow YH, Pumiglia K, Jun TH, Dent P, Sturgill TW, Jove R. Functional mapping of the N-terminal regulatory domain in the human Raf-1 protein kinase. *J Biol Chem* 1995; 270(23):14100-14106.
- (77) King AJ, Wireman RS, Hamilton M, Marshall MS. Phosphorylation site specificity of the Pak-mediated regulation of Raf-1 and cooperativity with Src. *FEBS Lett* 2001; 497(1):6-14.
- (78) Tilbrook PA, Colley SM, McCarthy DJ, Marais R, Klinken SP. Erythropoietin-stimulated Raf-1 tyrosine phosphorylation is associated with the tyrosine kinase Lyn in J2E erythroleukemic cells. *Arch Biochem Biophys* 2001; 396(1):128-132.
- (79) Sun H, King AJ, Diaz HB, Marshall MS. Regulation of the protein kinase Raf-1 by oncogenic Ras through phosphatidylinositol 3-kinase, Cdc42/Rac and Pak. *Curr Biol* 2000; 10(5):281-284.
- (80) Chaudhary A, King WG, Mattaliano MD, Frost JA, Diaz B, Morrison DK, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates Raf1 through Pak phosphorylation of serine 338. *Curr Biol* 2000; 10(9):551-554.
- (81) Chiloeches A, Mason CS, Marais R. S338 phosphorylation of Raf-1 is independent of phosphatidylinositol 3-kinase and Pak3. *Mol Cell Biol* 2001; 21(7):2423-2434.
- (82) Zhang BH, Guan KL. Activation of B-Raf kinase requires phosphorylation of the conserved residues Thr598 and Ser601. *EMBO J* 2000;19(20):5429-5439.
- (83) Chong H, Lee J, Guan KL. Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation. *EMBO J* 2001; 20(14):3716-3727.

- (84) Dumaz N, Light Y, Marais R. Cyclic AMP blocks cell growth through Raf-1-dependent and Raf-1-independent mechanisms. *Mol Cell Biol* 2002; 22(11):3717-3728.
- (85) Wu J, Dent P, Jelinek T, Wolfman A, Weber MJ, Sturgill TW. Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science* 1993; 262(5136):1065-1069.
- (86) Tzivion G, Luo Z, Avruch J. A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. *Nature* 1998; 394(6688):88-92.
- (87) Yip-Schneider MT, Miao W, Lin A, Barnard DS, Tzivion G, Marshall MS. Regulation of the Raf-1 kinase domain by phosphorylation and 14-3-3 association. *Biochem J* 2000; 351(Pt 1):151-159.
- (88) Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D, et al. Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res* 2001; 56:127-155.
- (89) Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 2000; 351 Pt 2:289-305.
- (90) Tzivion G, Shen YH, Zhu J. 14-3-3 proteins; bringing new definitions to scaffolding. *Oncogene* 2001; 20(44):6331-6338.
- (91) Dumaz N, Marais R. Protein kinase A blocks Raf-1 activity by stimulating 14-3-3 binding and blocking Raf-1 interaction with Ras. *J Biol Chem* 2003; 278(32):29819-29823.
- (92) Zimmermann S, Moelling K. Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science* 1999; 286(5445):1741-1744.
- (93) Rushworth LK, Hindley AD, O'Neill E, Kolch W. Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization. *Mol Cell Biol* 2006; 26(6):2262-2272.
- (94) Noble C, Mercer K, Hussain J, Carragher L, Giblett S, Hayward R, et al. CRAF autophosphorylation of serine 621 is required to prevent its proteasome-mediated degradation. *Mol Cell* 2008; 31(6):862-872.
- (95) Wan PTC, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 2004; 116(6):855-867.
- (96) Ikenoue T, Hikiba Y, Kanai F, Tanaka Y, Imamura J, Imamura T, et al. Functional Analysis of Mutations within the Kinase Activation Segment of B-Raf in Human Colorectal Tumors. *Cancer Res* 2003; 63(23):8132-8137.

- (97) Weber CK, Slupsky JR, Kalmes HA, Rapp UR. Active Ras induces heterodimerization of cRaf and BRaf. *Cancer Res* 2001; 61(9):3595-3598.
- (98) Garnett MJ, Rana S, Paterson H, Barford D, Marais R. Wild-type and mutant B-RAF activate C-RAF through distinct mechanisms involving heterodimerization. *Mol Cell* 2005; 20(6):963-969.
- (99) Heidorn SJ, Milagre C, Whittaker S, Nourry A, Niculescu-Duvas I, Dhomen N, et al. Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell* 2010; 140(2):209-221.
- (100) Rajakulendran T, Sahmi M, Lefrancois M, Sicheri F, Therrien M. A dimerization-dependent mechanism drives RAF catalytic activation. *Nature* 2009; 461(7263):542-545.
- (101) Stancato LF, Silverstein AM, Owens-Grillo JK, Chow YH, Jove R, Pratt WB. The hsp90-binding antibiotic geldanamycin decreases Raf levels and epidermal growth factor signaling without disrupting formation of signaling complexes or reducing the specific enzymatic activity of Raf kinase. *J Biol Chem* 1997; 272(7):4013-4020.
- (102) Grammatikakis N, Lin J, Grammatikakis A, Tschlis PN, Cochran BH. p50cdc37 acting in concert with Hsp90 is required for Raf-1 function. *Mol Cell Biol* 1999; 19(3):1661-1672.
- (103) Zhu J, Balan V, Bronisz A, Balan K, Sun H, Leicht DT, et al. Identification of Raf-1 S471 as a novel phosphorylation site critical for Raf-1 and B-Raf kinase activities and for MEK binding. *Mol Biol Cell* 2005; 16(10):4733-4744.
- (104) Yeung K, Seitz T, Li S, Janosch P, McFerran B, Kaiser C, et al. Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature* 1999; 401(6749):173-177.
- (105) Yeung K, Janosch P, McFerran B, Rose DW, Mischak H, Sedivy JM, et al. Mechanism of suppression of the Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway by the raf kinase inhibitor protein. *Mol Cell Biol* 2000; 20(9):3079-3085.
- (106) Xing H, Kornfeld K, Muslin AJ. The protein kinase KSR interacts with 14-3-3 protein and Raf. *Curr Biol* 1997; 7(5):294-300.
- (107) Douziech M, Sahmi M, Laberge G, Therrien M. A KSR/CNK complex mediated by HYP, a novel SAM domain-containing protein, regulates RAS-dependent RAF activation in *Drosophila*. *Genes Dev* 2006; 20(7):807-819.
- (108) Schaeffer HJ, Catling AD, Eblen ST, Collier LS, Krauss A, Weber MJ. MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science* 1998; 281(5383):1668-1671.

- (109) Trakul N, Menard RE, Schade GR, Qian Z, Rosner MR. Raf Kinase Inhibitory Protein Regulates Raf-1 but Not B-Raf Kinase Activation. *J Biol Chem* 2005; 280(26):24931-24940.
- (110) Park S, Yeung ML, Beach S, Shields JM, Yeung KC. RKIP downregulates B-Raf kinase activity in melanoma cancer cells. *Oncogene* 2005; 24(21):3535-3540.
- (111) Lorenz K, Lohse MJ, Quitterer U. Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2. *Nature* 2003; 426(6966):574-579.
- (112) Yeung KC, Rose DW, Dhillon AS, Yaros D, Gustafsson M, Chatterjee D, et al. Raf kinase inhibitor protein interacts with NF-kappaB-inducing kinase and TAK1 and inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 2001; 21(21):7207-7217.
- (113) Tang H, Park S, Sun S, Trumbly R, Ren G, Tsung E, et al. RKIP inhibits NF-kappaB in cancer cells by regulating upstream signaling components of the IkappaB kinase complex. *FEBS Lett.* 2010; 584(4):662-668.
- (114) Chatterjee D, Bai Y, Wang Z, Beach S, Mott S, Roy R, et al. RKIP Sensitizes Prostate and Breast Cancer Cells to Drug-induced Apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279(17):17515-17523.
- (115) Akaishi J, Onda M, Asaka S, Okamoto J, Miyamoto S, Nagahama M, et al. Growth-suppressive function of phosphatidylethanolamine-binding protein in anaplastic thyroid cancer. *Anticancer Res* 2006; 26(6B):4437-4442.
- (116) Granovsky AE, Rosner MR. Raf kinase inhibitory protein: a signal transduction modulator and metastasis suppressor. *Cell Res* 2008; 18(4):452-457.
- (117) Papin C, Denouel A, Calothy G, Eychene A. Identification of signalling proteins interacting with B-Raf in the yeast two-hybrid system. *Oncogene* 1996; 12(10):2213-2221.
- (118) Pritchard CA, Samuels ML, Bosch E, McMahon M. Conditionally oncogenic forms of the A-Raf and B-Raf protein kinases display different biological and biochemical properties in NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 1995; 15(11):6430-6442.
- (119) Pritchard CA, Hayes L, Wojnowski L, Zimmer A, Marais RM, Norman JC. B-raf acts via the ROCKII/LIMK/cofilin pathway to maintain actin stress fibers in fibroblasts. *Mol Cell Biol* 2004; 24(13):5937-5952.
- (120) Huser M, Luckett J, Chiloeches A, Mercer K, Iwobi M, Giblett S, et al. MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function. *EMBO J* 2001; 20(8):1940-1951.
- (121) Mercer K, Chiloeches A, Huser M, Kiernan M, Marais R, Pritchard C. ERK signaling and oncogene transformation are not impaired in cells lacking A-Raf. *Oncogene* 2002; 21(3):347-355.

- (122) Leicht DT, Balan V, Kaplun A, Singh-Gupta V, Kaplun L, Dobson M, et al. Raf kinases: Function, regulation and role in human cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2007; 1773(8):1196-1212.
- (123) Ikenoue T, Hikiba Y, Kanai F, Aragaki J, Tanaka Y, Imamura J, et al. Different Effects of Point Mutations within the B-Raf Glycine-Rich Loop in Colorectal Tumors on Mitogen-Activated Protein/Extracellular Signal-Regulated Kinase Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase and Nuclear Factor kappaB Pathway and Cellular Transformation. *Cancer Res* 2004; 64(10):3428-3435.
- (124) Mercer K, Giblett S, Green S, Lloyd D, DaRocha Dias S, Plumb M, et al. Expression of Endogenous Oncogenic V600E-B-raf Induces Proliferation and Developmental Defects in Mice and Transformation of Primary Fibroblasts. *Cancer Res* 2005; 65(24):11493-11500.
- (125) Stanton VP, Jr, Nichols DW, Laudano AP, Cooper GM. Definition of the human raf amino-terminal regulatory region by deletion mutagenesis. *Mol Cell Biol* 1989; 9(2):639-647.
- (126) Heidecker G, Huleihel M, Cleveland JL, Kolch W, Beck TW, Lloyd P, et al. Mutational activation of c-raf-1 and definition of the minimal transforming sequence. *Mol Cell Biol* 1990; 10(6):2503-2512.
- (127) Brown JR, Nigh E, Lee RJ, Ye H, Thompson MA, Saudou F, et al. Fos family members induce cell cycle entry by activating cyclin D1. *Mol Cell Biol* 1998; 18(9):5609-5619.
- (128) Roovers K, Assoian RK. Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. *Bioessays* 2000 ; 22(9):818-826.
- (129) Wojnowski L, Zimmer AM, Beck TW, Hahn H, Bernal R, Rapp UR, et al. Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice. *Nat Genet* 1997; 16(3):293-297.
- (130) Liu Q, Fan J, McMahon M, Prince AM, Zhang P. Role of the oncogenic Raf-1 in orchestration of discrete nuclear factor-kappaB-activating pathways. *Mol Cell Biol Res Commun* 2001; 4(6):381-389.
- (131) Arsur M, Mercurio F, Oliver AL, Thorgeirsson SS, Sonenshein GE. Role of the I-kappaB kinase complex in oncogenic Ras- and Raf-mediated transformation of rat liver epithelial cells. *Mol Cell Biol* 2000; 20(15):5381-5391.
- (132) Neshat MS, Raitano AB, Wang H, Reed JC, Sawyers CL. The survival function of the Bcr-Abl oncogene is mediated by Bad-dependent and -independent pathways: roles for phosphatidylinositol 3-kinase and Raf. *Mol Cell Biol* 2000; 20(4):1179-1186.
- (133) Von Gise A, Lorenz P, Wellbrock C, Hemmings B, Berberich-Siebelt F, Rapp UR, et al. Apoptosis suppression by Raf-1 and MEK1 requires MEK- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signals. *Mol Cell Biol* 2001; 21(7):2324-2336.

- (134) Chen J, Fujii K, Zhang L, Roberts T, Fu H. Raf-1 promotes cell survival by antagonizing apoptosis signal-regulating kinase 1 through a MEK-ERK independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(14):7783-7788.
- (135) O'Neill E, Rushworth L, Baccharini M, Kolch W. Role of the kinase MST2 in suppression of apoptosis by the proto-oncogene product Raf-1. *Science* 2004; 306(5705):2267-2270.
- (136) Erhardt P, Schremser EJ, Cooper GM. B-Raf inhibits programmed cell death downstream of cytochrome c release from mitochondria by activating the MEK/Erk pathway. *Mol Cell Biol* 1999; 19(8):5308-5315.
- (137) Wiese S, Pei G, Karch C, Troppmair J, Holtmann B, Rapp UR, et al. Specific function of B-Raf in mediating survival of embryonic motoneurons and sensory neurons. *Nat Neurosci* 2001; 4(2):137-142.
- (138) Wellcome Trust Sanger Institute. Catalogue of Somatic Mutations in Cancer [en línea] <http://www.sanger.ac.uk/perl/genetics/CGP/cosmic?action=bygene&ln=RAF1&start=1&end=649&coords=AA:AA>. 2006; Acceso Marzo, 2010.
- (139) Wellcome Trust Sanger Institute. Catalogue of Somatic Mutations in Cancer [en línea] <http://www.sanger.ac.uk/perl/genetics/CGP/cosmic?action=bygene&ln=ARAF&start=1&end=607&coords=AA:AA>. 2006; Acceso Marzo, 2010.
- (140) Houben R, Becker JC, Kappel A, Terheyden P, Broecker E, Goetz R, et al. Constitutive activation of the Ras-Raf signaling pathway in metastatic melanoma is associated with poor prognosis. *J. Carcinog* 2004; 3(1):6.
- (141) Karasarides M, Chiloehes A, Hayward R, Niculescu-Duvaz D, Scanlon I, Friedlos F, et al. B-RAF is a therapeutic target in melanoma. *Oncogene* 2004; 23(37):6292-6298.
- (142) Emuss V, Garnett M, Mason C, Marais R. Mutations of C-RAF Are Rare in Human Cancer because C-RAF Has a Low Basal Kinase Activity Compared with B-RAF. *Cancer Res* 2005; 65(21):9719-9726.
- (143) Riesco-Eizaguirre G, Rodriguez I, De la Vieja A, Costamagna E, Carrasco N, Nistal M, et al. The BRAFV600E oncogene induces transforming growth factor beta secretion leading to sodium iodide symporter repression and increased malignancy in thyroid cancer. *Cancer Res* 2009; 69(21):8317-8325.
- (144) Mesa C, Jr, Mirza M, Mitsutake N, Sartor M, Medvedovic M, Tomlinson C, et al. Conditional activation of RET/PTC3 and BRAFV600E in thyroid cells is associated with gene expression profiles that predict a preferential role of BRAF in extracellular matrix remodeling. *Cancer Res* 2006; 66(13):6521-6529.

- (145) Mitsutake N, Knauf JA, Mitsutake S, Mesa C, Jr, Zhang L, Fagin JA. Conditional BRAFV600E expression induces DNA synthesis, apoptosis, dedifferentiation, and chromosomal instability in thyroid PCCL3 cells. *Cancer Res* 2005; 65(6):2465-2473.
- (146) Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev* 2007; 28(7):742-762.
- (147) Boisvert-Adamo K, Aplin AE. B-RAF and PI-3 kinase signaling protect melanoma cells from anoikis. *Oncogene* 2006; 25(35):4848-4856.
- (148) Wickenden JA, Jin H, Johnson M, Gillings AS, Newson C, Austin M, et al. Colorectal cancer cells with the BRAF(V600E) mutation are addicted to the ERK1/2 pathway for growth factor-independent survival and repression of BIM. *Oncogene* 2008; 27(57):7150-7161.
- (149) Cartledge RA, Thomas GR, Cagnol S, Jong KA, Molton SA, Finch AJ, et al. Oncogenic BRAF(V600E) inhibits BIM expression to promote melanoma cell survival. *Pigment Cell Melanoma Res* 2008; 21(5):534-544.
- (150) Liu D, Liu Z, Jiang D, Dackiw AP, Xing M. Inhibitory effects of the mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor CI-1040 on the proliferation and tumor growth of thyroid cancer cells with BRAF or RAS mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(12):4686-4695.
- (151) Sala E, Mologni L, Truffa S, Gaetano C, Bollag GE, Gambacorti-Passerini C. BRAF silencing by short hairpin RNA or chemical blockade by PLX4032 leads to different responses in melanoma and thyroid carcinoma cells. *Mol Cancer Res* 2008; 6(5):751-759.
- (152) Sheridan C, Brumatti G, Martin SJ. Oncogenic B-RafV600E inhibits apoptosis and promotes ERK-dependent inactivation of Bad and Bim. *J Biol Chem* 2008; 283(32):22128-22135.
- (153) Klein RM, Spofford LS, Abel EV, Ortiz A, Aplin AE. B-RAF regulation of Rnd3 participates in actin cytoskeletal and focal adhesion organization. *Mol Biol Cell* 2008; 19(2):498-508.
- (154) Argast GM, Croy CH, Coutts KL, Zhang Z, Litman E, Chan DC, et al. Plexin B1 is repressed by oncogenic B-Raf signaling and functions as a tumor suppressor in melanoma cells. *Oncogene* 2009; 28(30):2697-2709.
- (155) Old WM, Shabb JB, Houel S, Wang H, Coutts KL, Yen CY, et al. Functional proteomics identifies targets of phosphorylation by B-Raf signaling in melanoma. *Mol Cell* 2009; 34(1):115-131.
- (156) Liang S, Sharma A, Peng HH, Robertson G, Dong C. Targeting mutant (V600E) B-Raf in melanoma interrupts immunoeediting of leukocyte functions and melanoma extravasation. *Cancer Res* 2007; 67(12):5814-5820.

- (157) Kumar SM, Yu H, Edwards R, Chen L, Kazianis S, Brafford P, et al. Mutant V600E BRAF increases hypoxia inducible factor-1alpha expression in melanoma. *Cancer Res* 2007; 67(7):3177-3184.
- (158) Sharma A, Trivedi NR, Zimmerman MA, Tuveson DA, Smith CD, Robertson GP. Mutant V599EB-Raf regulates growth and vascular development of malignant melanoma tumors. *Cancer Res* 2005; 65(6):2412-2421.
- (159) Sumimoto H, Imabayashi F, Iwata T, Kawakami Y. The BRAF-MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells. *J Exp Med* 2006; 203(7):1651-1656.
- (160) Zheng B, Jeong JH, Asara JM, Yuan YY, Granter SR, Chin L, et al. Oncogenic B-RAF negatively regulates the tumor suppressor LKB1 to promote melanoma cell proliferation. *Mol Cell* 2009; 33(2):237-247.
- (161) Sharma A, Tran MA, Liang S, Sharma AK, Amin S, Smith CD, et al. Targeting mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in the mutant (V600E) B-Raf signaling cascade effectively inhibits melanoma lung metastases. *Cancer Res* 2006; 66(16):8200-8209.
- (162) Zhu J, Woods D, McMahon M, Bishop JM. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev* 1998; 12(19):2997-3007.
- (163) Wajapeyee N, Serra RW, Zhu X, Mahalingam M, Green MR. Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell* 2008; 132(3):363-374.
- (164) Gray-Schopfer VC, Cheong SC, Chong H, Chow J, Moss T, Abdel-Malek ZA, et al. Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16? *Br.J.Cancer* 2006; 95(4):496-505.
- (165) Yu H, McDaid R, Lee J, Possik P, Li L, Kumar SM, et al. The role of BRAF mutation and p53 inactivation during transformation of a subpopulation of primary human melanocytes. *Am J Pathol* 2009; 174(6):2367-2377.
- (166) Dankort D, Curley DP, Cartlidge RA, Nelson B, Karnezis AN, Damsky WE, Jr, et al. Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nat Genet* 2009; 41(5):544-552.
- (167) Zhuang D, Mannava S, Grachtchouk V, Tang WH, Patil S, Wawrzyniak JA, et al. C-MYC overexpression is required for continuous suppression of oncogene-induced senescence in melanoma cells. *Oncogene* 2008; 27(52):6623-6634.
- (168) Matos P, Oliveira C, Velho S, Goncalves V, da Costa LT, Moyer MP, et al. B-Raf(V600E) cooperates with alternative spliced Rac1b to sustain colorectal cancer cell survival. *Gastroenterology* 2008; 135(3):899-906.

- (169) Cheung M, Sharma A, Madhunapantula SV, Robertson GP. Akt3 and mutant V600E B-Raf cooperate to promote early melanoma development. *Cancer Res* 2008; 68(9):3429-3439.
- (170) Karreth FA, DeNicola GM, Winter SP, Tuveson DA. C-Raf inhibits MAPK activation and transformation by B-Raf(V600E). *Mol Cell* 2009; 36(3):477-486.
- (171) Dhomen N, Reis-Filho JS, da Rocha Dias S, Hayward R, Savage K, Delmas V, et al. Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer Cell* 2009;15(4):294-303.
- (172) Dankort D, Filenova E, Collado M, Serrano M, Jones K, McMahon M. A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors. *Genes Dev* 2007; 21(4):379-384.
- (173) Goel VK, Ibrahim N, Jiang G, Singhal M, Fee S, Flotte T, et al. Melanocytic nevus-like hyperplasia and melanoma in transgenic BRAFV600E mice. *Oncogene* 2009; 28(23):2289-2298.
- (174) Knauf JA, Ma X, Smith EP, Zhang L, Mitsutake N, Liao XH, et al. Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. *Cancer Res* 200; 65(10):4238-4245.
- (175) Tsai J, Lee JT, Wang W, Zhang J, Cho H, Mamo S, et al. Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(8):3041-3046.
- (176) Hoeflich KP, Herter S, Tien J, Wong L, Berry L, Chan J, et al. Antitumor efficacy of the novel RAF inhibitor GDC-0879 is predicted by BRAFV600E mutational status and sustained extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway suppression. *Cancer Res* 2009; 69(7):3042-3051.
- (177) Rameh LE, Cantley LC. The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem* 1999; 274(13):8347-8350.
- (178) Vanhaesebroeck B, Leevers SJ, Panayotou G, Waterfield MD. Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci* 1997; 22(7):267-272.
- (179) Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 2006; 441(7092):424-430.
- (180) Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase-AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(7):489-501.

- (181) Yu J, Zhang Y, McIlroy J, Rordorf-Nikolic T, Orr GA, Backer JM. Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110 catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Mol Cell Biol* 1998; 18(3):1379-1387.
- (182) Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, et al. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 1994; 370(6490):527-532.
- (183) Kodaki T, Woscholski R, Hallberg B, Rodriguez-Viciana P, Downward J, Parker PJ. The activation of phosphatidylinositol 3-kinase by Ras. *Curr Biol* 1994; 4(9):798-806.
- (184) Franke TF. PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* 2008; 27(50):6473-6488.
- (185) Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 1999; 13(22):2905-2927.
- (186) Bellacosa A, Chan TO, Ahmed NN, Datta K, Malstrom S, Stokoe D, et al. Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene* 1998; 17(3):313-325.
- (187) Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJC, Frech M, et al. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem* 1997; 272(50):31515-31524.
- (188) Sable CL, Filippa N, Filloux C, Hemmings BA, Van Obberghen E. Involvement of the pleckstrin homology domain in the insulin-stimulated activation of protein kinase B. *J Biol Chem* 1998; 273(45):29600-29606.
- (189) Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, et al. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 1996; 15(23):6541-6551.
- (190) Vanhaesebroeck B, Alessi DR. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 2000; 346(3):561-576.
- (191) Stokoe D, Stephens LR, Copeland T, Gaffney PRJ, Reese CB, Painter GF, et al. Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science* 1997; 277(5325):567-570.
- (192) Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PRJ, Reese CB, et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B $\alpha$ . *Curr Biol* 1997; 7(4):261-269.
- (193) Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. *Science* 2005; 307(5712):1098-1101.

- (194) Maira S, Galetic I, Brazil DP, Kaech S, Ingley E, Thelen M, et al. Carboxyl-terminal modulator protein (CTMP), a negative regulator of PKB/Akt and v-Akt at the plasma membrane. *Science* 2001; 294(5541):374-380.
- (195) Sato S, Fujita N, Tsuruo T. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc. Natl. Acad Sci USA* 2000; 97(20):10832-10837.
- (196) Gao T, Furnari F, Newton AC. PHLPP: A phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell* 2005; 18(1):13-24.
- (197) Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997; 91(2):231-241.
- (198) del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 1997; 278(5338):687-689.
- (199) Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998; 282(5392):1318-1321.
- (200) Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999; 96(6):857-868.
- (201) Romashkova JA, Makarov SS. NF-kappaB is a target of Akt in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 1999; 401(6748):86-90.
- (202) Rossig L, Jadidi AS, Urbich C, Badorff C, Zeiher AM, Dimmeler S. Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. *Mol Cell Biol* 2001; 21(16):5644-5657.
- (203) Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A. Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol* 1999; 9(11):601-604.
- (204) Mayo LD, Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(20):11598-11603.
- (205) Frame S, Cohen P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* 2001; 359(1):1-16.
- (206) Liang J, Slingerland JM. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle* 2003; 2(4):339-345.

- (207) Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK, Han K, et al. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *NatMed* 2002; 8(10):1153-1160.
- (208) Fujita N, Sato S, Katayama K, Tsuruo T. Akt-dependent phosphorylation of p27Kip1 promotes binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *JBiol Chem* 2002; 277(32):28706-28713.
- (209) Manning BD, Cantley LC. United at last: the tuberous sclerosis complex gene products connect the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway to mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *Biochem Soc Trans* 2003; 31(3):573-578.
- (210) Sabatini DM. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(9):729-734.
- (211) Brunn GJ, Williams J, Sabers C, Widerrecht G, Lawrence JC, Jr., Abraham RT. Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. *EMBO J* 1996; 15(19):5256-5267.
- (212) Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(12):921-929.
- (213) Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(8):550-562.
- (214) Luo J, Manning BD, Cantley LC. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell* 2003; 4(4):257-262.
- (215) Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 2004; 304(5670):554.
- (216) Samuels Y, Diaz LA, Jr, Schmidt-Kittler O, Cummins JM, DeLong L, Cheong I, et al. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell* 2005; 7(6):561-573.
- (217) Wong KK, Engelman JA, Cantley LC. Targeting the PI3K signaling pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2010 Feb; 20(1):87-90.
- (218) Philp AJ, Campbell IG, Leet C, Vincan E, Rockman SP, Whitehead RH, et al. The phosphatidylinositol 3'-kinase p85alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors. *Cancer Res* 2001 ; 61(20):7426-7429.
- (219) Carpten JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL, Robbins CM, et al. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* 2007; 448(7152):439-444.

- (220) Majumder PK, Febbo PG, Bikoff R, Berger R, Xue Q, McMahon LM, et al. mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways. *Nat Med* 2004; 10(6):594-601.
- (221) Wendel HG, De Stanchina E, Fridman JS, Malina A, Ray S, Kogan S, et al. Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. *Nature* 200; 428(6980):332-337.
- (222) Galanis E, Buckner JC, Maurer MJ, Kreisberg JI, Ballman K, Boni J, et al. Phase II trial of temsirolimus (CCI-779) in recurrent glioblastoma multiforme: a North Central Cancer Treatment Group Study. *J Clin Oncol* 2005; 23(23):5294-5304.
- (223) Chan S, Scheulen ME, Johnston S, Mross K, Cardoso F, Dittrich C, et al. Phase II study of temsirolimus (CCI-779), a novel inhibitor of mTOR, in heavily pretreated patients with locally advanced or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(23):5314-5322.
- (224) Chang SM, Wen P, Cloughesy T, Greenberg H, Schiff D, Conrad C, et al. Phase II study of CCI-779 in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Invest New Drugs* 2005; 23(4):357-361.
- (225) Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997; 275(5308):1943-1947.
- (226) Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 2008; 27(41):5497-5510.
- (227) Engelman JA, Chen L, Tan X, Crosby K, Guimaraes AR, Upadhyay R, et al. Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nat Med* 2008; 14(12):1351-1356.
- (228) Hoeflich KP, O'Brien C, Boyd Z, Cavet G, Guerrero S, Jung K, et al. In vivo antitumor activity of MEK and phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors in basal-like breast cancer models. *Clin Cancer Res* 2009; 15(14):4649-4664.
- (229) Mirzoeva OK, Das D, Heiser LM, Bhattacharya S, Siwak D, Gendelman R, et al. Basal subtype and MAPK/ERK kinase (MEK)-phosphoinositide 3-kinase feedback signaling determine susceptibility of breast cancer cells to MEK inhibition. *Cancer Res* 2009; 69(2):565-572.
- (230) Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986; 47(6):921-928.
- (231) Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: The enemy within. *Cancer Cell* 2004; 6(3):203-208.

- (232) Wietek C, O'Neill LAJ. Diversity and regulation in the NF- $\kappa$ B system. *Trends Biochem Sci* 2007; 32(7):311-319.
- (233) Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14:649-683.
- (234) Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:225-260.
- (235) Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 2004; 18(18):2195-2224.
- (236) Huxford T, Malek S, Ghosh G. Structure and mechanism in NF-kappaB/IkappaB signaling. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1999; 64(Signaling and Gene Expression in the Immune System):533-540.
- (237) Hoffmann A, Natoli G, Ghosh G. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene* 2006; 25(51):6706-6716.
- (238) Perkins ND, Gilmore TD. Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. *Cell Death Differ* 2006; 13(5):759-772.
- (239) Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 2002; 109(Rev. Suppl.):S81-S96.
- (240) Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF-kappaB activity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:621-663.
- (241) Pasparakis M, Luedde T, Schmidt-Supprian M. Dissection of the NF-kappaB signaling cascade in transgenic and knockout mice. *Cell Death Differ* 2006; 13(5):861-872.
- (242) Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004; 25(6):280-288.
- (243) Perkins ND. Oncogenes, tumor suppressors and p52 NF-kappaB. *Oncogene* 2003; 22(48):7553-7556.
- (244) Lin L, DeMartino GN, Greene WC. Cotranslational biogenesis of NF-kappaB p50 by the 26S proteasome. *Cell* 1998; 92(6):819-828.
- (245) Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(1):49-62.
- (246) Perkins ND. Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene* 2006; 25(51):6717-6730.

- (247) Chen L, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5(5):392-401.
- (248) Arenzana-Seisdedos F, Thompson J, Rodriguez MS, Bachelier F, Thomas D, Hay RT. Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 1995; 15(5):2689-2696.
- (249) Arenzana-Seisdedos F, Turpin P, Rodriguez M, Thomas D, Hay RT, Virelizier JL, et al. Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *J Cell Sci* 1997; 110 ( Pt 3):369-378.
- (250) Zhong H, Voll RE, Ghosh S. Phosphorylation of NF-kappaB p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell* 1998; 1(5):661-671.
- (251) Hoberg JE, Popko AE, Ramsey CS, Mayo MW. IkappaB kinase 1-mediated derepression of SMRT potentiates acetylation of RelA/p65 by p300. *Mol Cell Biol* 2006; 26(2):457-471.
- (252) Zhong H, May MJ, Jimi E, Ghosh S. The phosphorylation status of nuclear NF-kappaB determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol Cell* 2002; 9(3):625-636.
- (253) Zhong H, SuYang H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Ghosh S. The transcriptional activity of NF-kappaB is regulated by the IkappaB-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell* 1997; 89(3):413-424.
- (254) Gilmore TD. nf-kb.org [en línea] <http://people.bu.edu/gilmore/nf-kb/index.html>. Accessed Marzo, 2010.
- (255) Vermeulen L, De Wilde G, Van Damme P, Vanden Berghe W, Haegeman G. Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *EMBO J* 2003; 22(6):1313-1324.
- (256) Vanden Berghe W, Plaisance S, Boone E, De Bosscher K, Schmitz ML, Fiers W, et al. p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J Biol Chem* 1998; 273(6):3285-3290.
- (257) Baeza-Raja B, Munoz-Canoves P. p38 MAPK-induced nuclear factor-kappaB activity is required for skeletal muscle differentiation: role of interleukin-6. *Mol Biol Cell* 2004; 15(4):2013-2026.
- (258) King EM, Holden NS, Gong W, Rider CF, Newton R. Inhibition of NF-kappaB-dependent transcription by MKP-1: transcriptional repression by glucocorticoids occurring via p38 MAPK. *J Biol Chem* 2009; 284(39):26803-26815.

- (259) Montaner S, Perona R, Saniger L, Lacal JC. Multiple signalling pathways lead to the activation of the nuclear factor kappaB by the Rho family of GTPases. *J Biol Chem* 1998; 273(21):12779-12785.
- (260) Montaner S, Perona R, Saniger L, Lacal JC. Activation of serum response factor by RhoA is mediated by the nuclear factor-kappaB and C/EBP transcription factors. *J Biol Chem* 1999; 274(13):8506-8515.
- (261) Perona R, Montaner S, Saniger L, Sanchez-Perez I, Bravo R, Lacal JC. Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev* 1997; 11(4):463-475.
- (262) Anwar KN, Fazal F, Malik AB, Rahman A. RhoA/Rho-associated kinase pathway selectively regulates thrombin-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells via activation of I kappa B kinase beta and phosphorylation of RelA/p65. *J Immunol* 2004; 173(11):6965-6972.
- (263) Sizemore N, Leung S, Stark GR. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in response to interleukin-1 leads to phosphorylation and activation of the NF-kappaB p65/RelA subunit. *Mol Cell Biol* 1999; 19(7):4798-4805.
- (264) Yuan ZQ, Feldman RI, Sun M, Olashaw NE, Coppola D, Sussman GE, et al. Inhibition of JNK by cellular stress- and tumor necrosis factor alpha-induced AKT2 through activation of the NF kappa B pathway in human epithelial Cells. *J Biol Chem* 2002; 277(33):29973-29982.
- (265) Tergaonkar V. NFkappaB pathway: a good signaling paradigm and therapeutic target. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38(10):1647-1653.
- (266) Gerondakis S, Grossmann M, Nakamura Y, Pohl T, Grumont R. Genetic approaches in mice to understand Rel/NF-kappaB and I $\kappa$ B function: transgenics and knockouts. *Oncogene* 1999; 18(49):6888-6895.
- (267) Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999; 18(49):6853-6866.
- (268) Yang J, Pan WH, Clawson GA, Richmond A. Systemic targeting inhibitor of kappaB kinase inhibits melanoma tumor growth. *Cancer Res* 2007; 67(7):3127-3134.
- (269) Chua HL, Bhat-Nakshatri P, Clare SE, Morimiya A, Badve S, Nakshatri H. NF-kappaB represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2. *Oncogene* 2007; 26(5):711-724.
- (270) Tew GW, Lorimer EL, Berg TJ, Zhi H, Li R, Williams CL. SmgGDS regulates cell proliferation, migration, and NF-kappaB transcriptional activity in non-small cell lung carcinoma. *J Biol Chem* 2008; 283(2):963-976.

- (271) Scartozzi M, Bearzi I, Pierantoni C, Mandolesi A, Loupakis F, Zaniboni A, et al. Nuclear factor- $\kappa$ B tumor expression predicts response and survival in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab-irinotecan therapy. *J Clin Oncol* 2007; 25(25):3930-3935.
- (272) Weichert W, Boehm M, Gekeler V, Bahra M, Langrehr J, Neuhaus P, et al. High expression of RelA/p65 is associated with activation of nuclear factor- $\kappa$ B-dependent signaling in pancreatic cancer and marks a patient population with poor prognosis. *Br J Cancer* 2007; 97(4):523-530.
- (273) Annunziata CM, Davis RE, Demchenko Y, Bellamy W, Gabrea A, Zhan F, et al. Frequent engagement of the classical and alternative NF- $\kappa$ B pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell* 2007; 12(2):115-130.
- (274) Zou P, Kawada J, Pesnicak L, Cohen JI. Bortezomib induces apoptosis of Epstein-Barr virus (EBV)-transformed B cells and prolongs survival of mice inoculated with EBV-transformed B cells. *J Virol* 2007; 81(18):10029-10036.
- (275) Rae C, Langa S, Tucker SJ, MacEwan DJ. Elevated NF- $\kappa$ B responses and FLIP levels in leukemic but not normal lymphocytes: reduction by salicylate allows TNF-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(31):12790-12795.
- (276) Naugler WE, Karin M. NF- $\kappa$ B and cancer-identifying targets and mechanisms. *Curr Opin Genet Dev* 2008; 18(1):19-26.
- (277) Bharti AC, Aggarwal BB. Nuclear factor- $\kappa$ B and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochem Pharmacol* 2002; 64(5-6):883-888.
- (278) Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, et al. IKK $\beta$  links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 2004; 118(3):285-296.
- (279) Cao Y, Luo JL, Karin M. I $\kappa$ B kinase  $\alpha$  kinase activity is required for self-renewal of ErbB2/Her2-transformed mammary tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(40):15852-15857.
- (280) Papa S, Bubici C, Zazzeroni F, Pham CG, Kuntzen C, Knabb JR, et al. The NF- $\kappa$ B-mediated control of the JNK cascade in the antagonism of programmed cell death in health and disease. *Cell Death Differ* 2006; 13(5):712-729.
- (281) Rahman KM, Ali S, Aboukameel A, Sarkar SH, Wang Z, Philip PA, et al. Inactivation of NF- $\kappa$ B by 3,3'-diindolylmethane contributes to increased apoptosis induced by chemotherapeutic agent in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2007; 6(10):2757-2765.
- (282) Singh S, Shi Q, Bailey ST, Palczewski MJ, Pardee AB, Iglehart JD, et al. Nuclear factor- $\kappa$ B activation: a molecular therapeutic target for estrogen receptor-negative and epidermal growth

factor receptor family receptor-positive human breast cancer. *Mol Cancer Ther* 2007; 6(7):1973-1982.

(283) Mi J, Zhang X, Liu Y, Reddy SK, Rabbani ZN, Sullenger BA, et al. NF-kappaB inhibition by an adenovirus expressed aptamer sensitizes TNFalpha-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 359(3):475-480.

(284) Tapia MA, Gonzalez-Navarrete I, Dalmases A, Bosch M, Rodriguez-Fanjul V, Rolfe M, et al. Inhibition of the canonical IKK/NF kappa B pathway sensitizes human cancer cells to doxorubicin. *Cell Cycle* 2007; 6(18):2284-2292.

(285) Carvalho G, Fabre C, Braun T, Grosjean J, Ades L, Agou F, et al. Inhibition of NEMO, the regulatory subunit of the IKK complex, induces apoptosis in high-risk myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Oncogene* 2007; 26(16):2299-2307.

(286) Basseres DS, Baldwin AS. Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene* 2006; 25(51):6817-6830.

(287) Luo JL, Tan W, Ricono JM, Korchynskiy O, Zhang M, Gonias SL, et al. Nuclear cytokine-activated IKKalpha controls prostate cancer metastasis by repressing Maspin. *Nature* 2007; 446(7136):690-694.

(288) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976 May 7; 72:248-254.

(289) Gillings AS, Balmanno K, Wiggins CM, Johnson M, Cook SJ. Apoptosis and autophagy: BIM as a mediator of tumour cell death in response to oncogene-targeted therapeutics. *FEBS J* 2009; 276(21):6050-6062.

(290) Polzien L, Benz R, Rapp UR. Can BAD pores be good? New insights from examining BAD as a target of RAF kinases. *Adv Enzyme Regul* 2009.

(291) Palona I, Namba H, Mitsutake N, Starenki D, Podtcheko A, Sedliarou I, et al. BRAFV600E promotes invasiveness of thyroid cancer cells through nuclear factor kappaB activation. *Endocrinology* 2006; 147(12):5699-5707.

(292) da Rocha Dias S, Friedlos F, Light Y, Springer C, Workman P, Marais R. Activated B-RAF is an Hsp90 client protein that is targeted by the anticancer drug 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin. *Cancer Res* 2005; 65(23):10686-10691.

(293) Hingorani SR, Jacobetz MA, Robertson GP, Herlyn M, Tuveson DA. Suppression of BRAF(V599E) in human melanoma abrogates transformation. *Cancer Res* 2003; 63(17):5198-5202.

- (294) Wellbrock C, Ogilvie L, Hedley D, Karasarides M, Martin J, Niculescu-Duvaz D, et al. V599E-BRAF is an oncogene in melanocytes. *Cancer Res* 2004; 64(7):2338-2342.
- (295) Salvatore G, De Falco V, Salerno P, Nappi TC, Pepe S, Troncione G, et al. BRAF is a therapeutic target in aggressive thyroid carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12(5):1623-1629.
- (296) Preto A, Goncalves J, Rebocho AP, Figueiredo J, Meireles AM, Rocha AS, et al. Proliferation and survival molecules implicated in the inhibition of BRAF pathway in thyroid cancer cells harbouring different genetic mutations. *BMC Cancer* 2009; 9:387.
- (297) Solit DB, Garraway LA, Pratilas CA, Sawai A, Getz G, Basso A, et al. BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature* 200; 439(7074):358-362.
- (298) Nakayama N, Nakayama K, Yeasmin S, Ishibashi M, Katagiri A, Iida K, et al. KRAS or BRAF mutation status is a useful predictor of sensitivity to MEK inhibition in ovarian cancer. *Br J Cancer* 2008; 99(12):2020-2028.
- (299) Kerkhoff E, Rapp UR. Induction of cell proliferation in quiescent NIH 3T3 cells by oncogenic c-Raf-1. *Mol Cell Biol* 1997;17(5):2576-2586.
- (300) Weber JD, Raben DM, Phillips PJ, Baldassare JJ. Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G1 phase. *Biochem J* 199; 326 ( Pt 1)(Pt 1):61-68.
- (301) Hamad NM, Elconin JH, Karnoub AE, Bai W, Rich JN, Abraham RT, et al. Distinct requirements for Ras oncogenesis in human versus mouse cells. *Genes Dev* 2002; 16(16):2045-2057.
- (302) Gonzalez-Garcia A, Pritchard CA, Paterson HF, Mavria G, Stamp G, Marshall CJ. RalGDS is required for tumor formation in a model of skin carcinogenesis. *Cancer Cell* 2005; 7(3):219-226.
- (303) Namba H, Nakashima M, Hayashi T, Hayashida N, Maeda S, Rogounovitch TI, et al. Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(9):4393-4397.
- (304) Halilovic E, Solit DB. Therapeutic strategies for inhibiting oncogenic BRAF signaling. *Curr Opin Pharmacol* 2008; 8(4):419-426.
- (305) King AJ, Patrick DR, Batorsky RS, Ho ML, Do HT, Zhang SY, et al. Demonstration of a genetic therapeutic index for tumors expressing oncogenic BRAF by the kinase inhibitor SB-590885. *Cancer Res* 2006; 66(23):11100-11105.

- (306) Flaherty K, Puzanov I, Sosman J, Kim K, Ribas A, McArthur G, et al. Phase I study of PLX4032: Proof of concept for V600EBRAF mutation as a therapeutic target in human cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(15s).
- (307) Schwartz GK, Robertson S, Shen A, Wang E, Pace L, Dials H, et al. A phase I study of XL281, a selective oral RAF kinase inhibitor, in patients (Pts) with advanced solid tumor. *J Clin Oncol* 2009; 27(15s).
- (308) Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, Brandhuber BJ, Anderson DJ, Alvarado R, et al. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* 2010; 464(7287):431-435.
- (309) Poulikakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, Rosen N. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* 2010; 464(7287):427-430.
- (310) Panka DJ, Wang W, Atkins MB, Mier JW. The Raf inhibitor BAY 43-9006 (Sorafenib) induces caspase-independent apoptosis in melanoma cells. *Cancer Res* 2006; 66(3):1611-1619.
- (311) Ouyang B, Knauf JA, Smith EP, Zhang L, Ramsey T, Yusuff N, et al. Inhibitors of Raf kinase activity block growth of thyroid cancer cells with RET/PTC or BRAF mutations in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 2006; 12(6):1785-1793.
- (312) Rahmani M, Davis EM, Crabtree TR, Habibi JR, Nguyen TK, Dent P, et al. The kinase inhibitor sorafenib induces cell death through a process involving induction of endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 2007;27(15):5499-5513.
- (313) Hoeflich KP, Gray DC, Eby MT, Tien JY, Wong L, Bower J, et al. Oncogenic BRAF is required for tumor growth and maintenance in melanoma models. *Cancer Res* 2006;66(2):999-1006.
- (314) Pignochino Y, Grignani G, Cavalloni G, Motta M, Tapparo M, Bruno S, et al. Sorafenib blocks tumour growth, angiogenesis and metastatic potential in preclinical models of osteosarcoma through a mechanism potentially involving the inhibition of ERK1/2, MCL-1 and ezrin pathways. *Mol Cancer* 2009;8:118.
- (315) Balmanno K, Cook SJ. Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ* 2009; 16(3):368-377.
- (316) Fesik SW. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(11):876-885.
- (317) Deng X, Ruvolo P, Carr B, May WS,Jr. Survival function of ERK1/2 as IL-3-activated, staurosporine-resistant Bcl2 kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(4):1578-1583.

- (318) Ewings KE, Hadfield-Moorhouse K, Wiggins CM, Wickenden JA, Balmanno K, Gilley R, et al. ERK1/2-dependent phosphorylation of BimEL promotes its rapid dissociation from Mcl-1 and Bcl-xL. *EMBO J.* 2007; 26(12):2856-2867.
- (319) Ley R, Balmanno K, Hadfield K, Weston C, Cook SJ. Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim. *J Biol Chem* 2003; 278(21):18811-18816.
- (320) Luciano F, Jacquelin A, Colosetti P, Herrant M, Cagnol S, Pages G, et al. Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function. *Oncogene* 2003; 22(43):6785-6793.
- (321) Ley R, Ewings KE, Hadfield K, Cook SJ. Regulatory phosphorylation of Bim: sorting out the ERK from the JNK. *Cell Death Differ* 2005; 12(8):1008-1014.
- (322) Marani M, Hancock D, Lopes R, Tenev T, Downward J, Lemoine NR. Role of Bim in the survival pathway induced by Raf in epithelial cells. *Oncogene* 2004; 23(14):2431-2441.
- (323) Giordano TJ, Kuick R, Thomas DG, Misek DE, Vinco M, Sanders D, et al. Molecular classification of papillary thyroid carcinoma: distinct BRAF, RAS, and RET/PTC mutation-specific gene expression profiles discovered by DNA microarray analysis. *Oncogene* 2005; 24(44):6646-6656.
- (324) Putcha GV, Le S, Frank S, Besirli CG, Clark K, Chu B, et al. JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron* 2003; 38(6):899-914.
- (325) Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci* 2004; 29(5):233-242.
- (326) Bedogni B, Welford SM, Kwan AC, Ranger-Moore J, Saboda K, Powell MB. Inhibition of phosphatidylinositol-3-kinase and mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 prevents melanoma development and promotes melanoma regression in the transgenic TPRas mouse model. *Mol Cancer Ther* 2006; 5(12):3071-3077.
- (327) Lopez-Fauqued M, Gil R, Grueso J, Hernandez-Losa J, Pujol A, Moline T, et al. The dual PI3K/mTOR inhibitor PI-103 promotes immunosuppression, in vivo tumor growth and increases survival of sorafenib-treated melanoma cells. *Int J Cancer* 2010; 126(7):1549-1561.
- (328) Mirza AM, Gysin S, Malek N, Nakayama K, Roberts JM, McMahon M. Cooperative regulation of the cell division cycle by the protein kinases RAF and AKT. *Mol Cell Biol* 2004; 24(24):10868-10881.
- (329) She QB, Solit DB, Ye Q, O'Reilly KE, Lobo J, Rosen N. The BAD protein integrates survival signaling by EGFR/MAPK and PI3K/Akt kinase pathways in PTEN-deficient tumor cells. *Cancer Cell* 2005; 8(4):287-297.

- (330) Calleros L, Sanchez-Hernandez I, Baquero P, Toro MJ, Chiloeches A. Oncogenic Ras, but not V600E-BRAF, protects from cholesterol depletion-induced apoptosis through the PI3K/AKT pathway in colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* 2009; 30(10):1670-1677.
- (331) Leboeuf R, Baumgartner JE, Benezra M, Malaguarnera R, Solit D, Pratilas CA, et al. BRAFV600E mutation is associated with preferential sensitivity to mitogen-activated protein kinase kinase inhibition in thyroid cancer cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(6):2194-2201.
- (332) Namba H, Saenko V, Yamashita S. Nuclear factor- $\kappa$ B in thyroid carcinogenesis and progression: a novel therapeutic target for advanced thyroid cancer. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2007; 51(5):843-851.
- (333) Bollrath J, Greten FR. IKK/NF- $\kappa$ B and STAT3 pathways: central signalling hubs in inflammation-mediated tumour promotion and metastasis. *EMBO Rep* 2009; 10(12):1314-1319.
- (334) Meylan E, Dooley AL, Feldser DM, Shen L, Turk E, Ouyang C, et al. Requirement for NF- $\kappa$ B signalling in a mouse model of lung adenocarcinoma. *Nature* 2009; 462(7269):104-107.
- (335) Pacifico F, Mauro C, Barone C, Crescenzi E, Mellone S, Monaco M, et al. Oncogenic and anti-apoptotic activity of NF- $\kappa$ B in human thyroid carcinomas. *J Biol Chem* 2004; 279(52):54610-54619.
- (336) Sasaki CY, Barberi TJ, Ghosh P, Longo DL. Phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 defines an I $\kappa$ B $\alpha$ -independent NF- $\kappa$ B pathway. *J Biol Chem* 2005; 280(41):34538-34547.
- (337) Calleros L, Lasa M, Toro MJ, Chiloeches A. Low cell cholesterol levels increase NF $\kappa$ B activity through a p38 MAPK-dependent mechanism. *Cell Signalling* 2006; 18(12):2292-2301.
- (338) Kefaloyianni E, Gaitanaki C, Beis I. ERK1/2 and p38-MAPK signalling pathways, through MSK1, are involved in NF- $\kappa$ B transactivation during oxidative stress in skeletal myoblasts. *Cell Signal* 2006; 18(12):2238-2251.
- (339) Joo JH, Jetten AM. NF- $\kappa$ B-dependent transcriptional activation in lung carcinoma cells by farnesol involves p65/RelA(Ser276) phosphorylation via the MEK-MSK1 signaling pathway. *J Biol Chem*. 2008; 283(24):16391-16399.
- (340) Gray-Schopfer VC, Karasarides M, Hayward R, Marais R. Tumor necrosis factor- $\alpha$  blocks apoptosis in melanoma cells when BRAF signaling is inhibited. *Cancer Res* 2007; 67(1):122-129.
- (341) Bargou RC, Emmerich F, Krappmann D, Bommert K, Mapara MY, Arnold W, et al. Constitutive nuclear factor- $\kappa$ B-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest* 1997; 100(12):2961-2969.



Para la realización de esta tesis he contado con una ayuda predoctoral FPI-UAH.

