

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**ESTUDIO DE LA FOSFORILACIÓN DE LAS
PROTEÍNAS SPROUTY/SPRED POR p38^{MAPK}
Y PKD Y SU POSIBLE PAPEL EN CÁNCER DE
COLON**

TERESA GRAGERA ALÍA

Madrid, 2012



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



ESTUDIO DE LA FOSFORILACIÓN DE LAS PROTEÍNAS SPROUTY/SPRED POR p38^{MAPK} Y PKD Y SU POSIBLE PAPEL EN CÁNCER DE COLOB

Teresa Gragera Alía

Licenciada en Farmacia (Universidad San Pablo CEU)

Directores de Tesis

Dra. Natalia Martínez Romero

Dr. José M^a Rojas Cabeñeros

Investigadores Titulares de OPI

Centro Nacional de Microbiología

Instituto de Salud Carlos III

Centro Nacional de Microbiología

Instituto de Salud Carlos III

Majadahonda, Madrid

José María Rojas Cabañeros y Natalia Martíenz Romero, Científicos Titulares de OPI del Instituto de Salud Carlos III, dentro de la Unidad de Biología Celular perteneciente al Área de Biología Celular y del Desarrollo del Centro Nacional de Microbiología.

CERTIFICAN: que Dña. Teresa Gragera Alía, licenciada en Farmacia por la Universidad San Pablo CEU de Madrid, ha realizado bajo juestra dirección el trabajo de investigación titulado:

“Estudio de la fosforilación de las proteínas Sprouty/Spred por p38^{MAPK} y PKD y su posible papel en cáncer de colon”

En nuestra opinión, éste trabajo de investigación reúne todas las condiciones requeridas por la legislación vigente, así como la originalidad y calidad científica necesarias, para poder ser presentado y defendido con el fin de optar al grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste donde proceda, firmamos el presente certificado en Majadahonda (Madrid), a 1 de Septiembre de 2012.

Dr. José María Rojas Cabañeros
Científico Titular de OPI

Dra. Natalia Martínez Romero
Científico Titular de OPI

VºBº del Tutor

Dr. Alberto Muñoz Terol
Profesor de Investigación del CSIC

AGRADECIMIENTOS

En los años que ha durado esta tesis han sido muchas las personas que se han involucrado y quisiera agradecer su ayuda y dedicación:

- En primer lugar, agradecer al Dr. José M^a Rojas haberme dado la grandísima oportunidad de realizar la tesis en su laboratorio. Gracias José M^a por animarme y apoyarme en todo, por tu ayuda tanto profesional como personal y por haberte preocupado de mí en todo momento. Gracias por todas las oportunidades que me has brindado en estos años (congresos, charlas, actos, etc), pero sobre todo gracias por tu cariño y tu amistad.

- Gracias a la Dra. Natalia Martínez por toda su ayuda, apoyo, dedicación, su paciencia (infinita) y sobre todo gracias por tu amistad. Gracias por estar siempre ahí para mí y por compartir conmigo tantas cosas, profesionales y no tan profesionales. Gracias por ser la primera siempre en celebrar lo bueno y apoyarme incondicionalmente en lo malo, por todos tus buenos consejos. Gracias por enseñarme tantíiiiiiiiiisimas cosas en todos los aspectos. En resumen, gracias por ser como una hermana para mí.

- Gracias al Instituto de Salud Carlos III y al Programa de becas de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio.

- Gracias al Dr. Alberto Muñoz por la tutoría de mi tesis.

- Gracias a la Dra. Teresa Iglesias por dejarnos las construcciones de PKD y por todos sus consejos.

- Gracias a la Dra. Marina Pollán por su colaboración en el análisis del polimorfismo Sprouty2 P106S.

- Me gustaría agradecer a la Dra. Alicia Ballester sus trabajos preliminares sobre PKD, que dieron lugar a la línea de investigación seguida en este trabajo.

- Quisiera agradecer también al Dr. Ricardo Sánchez Prieto y al Dr. Miguel Ángel de la Cruz Morcillo su participación en los experimentos con los agentes genotóxicos.

- Gracias al Dr. José Luis Oliva, por todo tu cariño y apoyo. Gracias por hacerme un hueco “a tu vera” cuando llegué al laboratorio, por todos esos buenos ratos que hemos pasado juntos, por las risas en las comidas, los cafés después de comer... Gracias por tu amistad.

- Gracias a Carlota por tu cariño durante estos años. Gracias por hacer que las horas en transporte público fueran más amenas y divertidas. Gracias por haber compartido tantas cosas juntas.
- Gracias a Lara por su apoyo, alegría y espontaneidad, por compartir las historias de su vida y por los buenos momentos fuera del laboratorio.
- Gracias a Diana por su alegría y por hacerme partícipe de los momentos especiales de su vida. Y gracias a Jose por ayudarnos tanto con la casa, ¡que bonita la dejaste!. Gracias a los dos por los buenos momentos fuera del laboratorio.
- Gracias a mis compañeros de laboratorio Berta, Judith, Mapi, Ana, Encarni y Alberto por su cariño durante estos años y por haberme brindado su ayuda siempre que lo he necesitado.
- A quienes compartieron el laboratorio y ya se fueron: Andrea, Agustín y Silvia Hernández. Gracias Silvia, por tu cariño y por los buenos momentos que hemos pasado juntas.
- Gracias a Abedul, Florindo y Priscila por alegrar todos mis días. Gracias a Nico, Michi, Bretón, Pegotito y Jimmy por cuidarme a Natalia. Gracias a Ana, Alfonso, Ángeles, Aristarco, Afra, Lorenzo, Rosita, Pulgosi y los que quedan, por hacerme mejor persona y más humana. Gracias a Carlos, por su ayuda y los buenos ratos durante los momentos de espera.
- Gracias a todos mis amigos, que siempre han estado ahí apoyándome y animándome. Gracias especialmente a Elena por las horas de gimnasio, las visitas a Ikea y por ser la mejor “vecina” del mundo.
- Gracias a Dani y Elena por llevarnos de “aguas” por Logroño, y por las quedadas de los fines de semana.
- Gracias a Lola y a Gonzalo por hacerme sentir una más de la familia. Gracias a Marta, Oscar, Daniel y al pequeño Diego.
- Gracias a toda mi familia, en especial a mis tíos Nani y Joan. Gracias por preocuparos tanto por mí, por todos los viajes, Praga, Cracovia, la “cola de los pringaos”, “el chicken”, Londres, Amsterdam, Segovia y muchos sitios más. Gracias por las miles de comidas por Madrid, pero por encima de todo esto, gracias por toodo el cariño. Gracias a Laurita, “mi hermana pequeña”, por su cariño y su alegría.

- Gracias a mis padres, que me lo han dado todo. Gracias por apoyarme y ayudarme en todo momento. Gracias por todos vuestros buenos consejos, por vuestro infinito amor y cariño incondicional.

- Gracias a mi hermano Emiliano, porque siempre está ahí cuando lo necesito. Gracias por ser todo un ejemplo para mí y porque siempre me has apoyado. Gracias por quererme.

- Y por último, gracias Gonzalo por estar a mi lado en todo momento, por tu apoyo, por hacerme sentir especial y sobre todo, gracias por querer compartir tu vida conmigo.

Los miembros de la familia de proteínas Sprouty/Spred han sido descritos como reguladores negativos de la activación de ERK, inducida por diversos factores de crecimiento. En esta Tesis, hemos demostrado como esta familia de proteínas también es capaz de inhibir la activación de ERK en respuesta a estímulos no mitogénicos, como la prostaglandina ciclopentenona PGA_1 .

Se ha descrito que Sprouty2 es fosforilado en respuesta a la acción de distintos factores de crecimiento. En trabajos ya publicados se vio que la quinasa Mnk-1 era capaz de fosforilar a Sprouty2 en las serinas de las posiciones 112 y 121. Mnk-1 es una quinasa regulada directamente por ERK y por $p38^{MAPK}$. Nosotros demostramos que es $p38^{MAPK}$ la responsable de la fosforilación del residuo 112 y no del 121. Hemos comprobado que otra serina treonina quinasa implicada en la regulación y estabilidad de las uniones adherentes, PKD, también se une y fosforila Sprouty2 en este residuo, identificando además que esta interacción tiene lugar a través de la región carboxilo terminal de Sprouty2. Así mismo, hemos comprobado que la sobreexpresión de Sprouty2, pero no del mutante S112A, produce un aumento de la sensibilidad celular al tratamiento con cisplatino y 5-fluoruracilo, aunque este efecto sobre la supervivencia celular parece ser independiente de la acción de $p38^{MAPK}$.

Members of the Sprouty / Spred protein family have been described as negative regulators of ERK activation induced by different growth factors. In this thesis, we have demonstrated that this family is also capable of inhibiting ERK activation in response to non mitogenic stimuli, such as cyclopentenone prostaglandin PGA_1 . Sprouty 2 is phosphorylated in response to growth factors. Previously has been published that Mnk-1 kinase was able to phosphorylate Sprouty2 in serine 112 and 121. Mnk-1 is directly regulated by ERK and $p38^{MAPK}$. We show that $p38^{MAPK}$ is responsible of the phosphorylation of residue 112 but not 121. In addition found that PKD a serine threonine kinase involved in the regulation and stability of adherens junctions, also binds and phosphorylates Sprouty2 in this residue. We show that this interaction occurs via the carboxyl terminal region of Sprouty2. Finally, we found that overexpression of Sprouty2, but not the S112A mutant promotes increased cell sensitivity to cisplatin o 5-fluorouracil treatment, although this effect on cell survival appears to be independent of the action of $p38^{MAPK}$.

ÍNDICE

ÍNDICE

CLAVE DE ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN	13
1. Receptores tirosina quinasa y factores de crecimiento	15
1.1 Estímulos independientes de receptores tirosina quinasa: prostaglandinas	16
1.1.1 Prostaglandinas ciclopentenonas	17
2 Proteínas MAPK.....	18
2.1 JNKs	19
2.2 p38 ^{MAPK}	19
2.3 ERK5.....	20
2.4 ERK1/2.....	20
3 UNIONES CELULARES.....	21
3.1 E-cadherina.....	23
3.2 β -catenina	23
3.3 p120 catenina.....	26
4 Regulación de las uniones adherentes	27
5 Proteína quinasa D (PKD).....	29
6 Familia de proteínas Sprouty / Spred.....	31

OBJETIVOS	35
MATERIALES Y MÉTODOS	39
1.1 MATERIALES.....	41
1.1.1 Líneas celulares.....	41
1.1.2 Material de cultivos celulares.....	41
1.1.3 Anticuerpos.....	42
1.1.4 Cepas bacterianas.....	42
1.1.5 Plásmidos. Descripción y procedencia.....	42
1.1.6 Generación de mutantes.....	44
1.1.7 Oligonucleótidos.....	45
1.2 MÉTODOS.....	45
1.2.1 Transformación de bacterias competentes.....	45
1.2.2 Transfecciones transitorias.....	45
1.2.3 Transfecciones estables.....	45
1.2.4 Inmunoprecipitaciones.....	45
1.2.5 Inmunoblot.....	46
1.2.6 Ensayos de activación transcripcional.....	46
1.2.7 Ensayos de interacción <i>in vitro</i>	46
1.2.8 Ensayos de fosforilación <i>in vitro</i>	47
1.2.9 Marcaje <i>in vivo</i>	47
1.2.10 Inmunofluorescencias.....	48
1.2.11 Silenciamiento génico.....	48
1.2.12 Detección del polimorfismo Sprouty2 P106S.....	48
1.2.13 Ensayos de viabilidad.....	49
1.2.14 Análisis estadístico.....	49
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
1. Efectos de las proteínas Spred sobre la vía de ERK en respuesta a PGA ₁	53
2. Análisis de Sprouty2 como posible diana de p38 α ^{MAPK}	57

3. Análisis de Sprouty2 como posible diana de otras serina-treonina quinasas ... 67	
4. Estudio del papel de Sprouty2 sobre las uniones adherentes en las células epiteliales	76
5. Efecto de Sprouty2 sobre la sensibilidad de las células de cáncer de colon a quimioterapia por agentes genotóxicos.....	81
CONCLUSIONES	87
BIBLIOGRAFÍA	91
ANEXO	113

CLAVE DE ABREVIATURAS

15dPGJ ₂	15-deoxi- Δ 12, 14-PGJ ₂
A	Adenina, adenosina
AA	Ácido araquidónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AP-1	Proteína activadora 1
APC	Proteína acopladora de axina
ARN	Ácido desoxirribonucleico
ASK	<i>Apoptosis Signal-Regulating Kinase</i>
ATF-2	Factor de transcripción activador 2
ATP	Adenosina trifosfato
AU5	Epítipo de fusión de secuencia TDFYLK
BSA	Seroalbúmina Bovina
C	Citidina, citosina
c-Cbl	Casitas B-lineage lymphoma
c-fos	Oncogen viral de osteosarcoma murino FBJ
c-myc	Oncogen viral de la mielocitomatosis
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato
CSKII	Caseina quinasa II
COX	Ciclooxigenasa
CRD	Dominio rico en cisteínas
cyPG	Prostaglandina ciclopentenona
DAG	Diacilglicerol
DAPI	4'6-diamidini-2-fenilindol
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
ECD	Domino extracelular de cadherinas
EDTA	N'N'N'-etilen diamino tetraacetato disódico
EGF	Factor de crecimiento epidérmico

EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EGTA	Ácido etilen glicol tetraacético
ERB	eritroblástico
ERK	Quinasa regulada por señal extracelular
EVH1	Enabled/VASP homology 1 domain
FBS	Suero fetal bovino
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FGFR	Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FRS	Sustrato del receptor de FGF
GEF	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina
Grb2	Proteína 2 unida a receptor de factor de crecimiento
GSK3 β	Quinasa sintasa de glicógeno 3 β
GST	Glutation S transferasa
GTP	Nucleótidos trifosfato de guanina
H-Ras	Harvey-Rous Avian Sarcoma
HA	Hemaglutinina
HDAC7	Histona deacetilasa 7
HeLa	Células de Henrietta Lacks
HEPES	Ácido-4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etano-sulfónico
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
IPTG	Isopropil b-D-1-tiogalactopiranosido
I κ B	Inhibidor de I κ B
IKK	Quinasa I κ B
IL	Interleucina
JNK	Quinasa N terminal de c-jun
K-Ras	Kirsten-Rous Avian Sarcoma
KBD	Dominio de unión a c-kit
KO	<i>Knock out</i>
LB	Medio Luria Bertani

MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MEK	MAPK quinasa o ERK quinasa
mg	Miligramos
MKK	Proteína quinasa de quinasas activadas por mitógenos
ml	Mililitros
MMP	Metaloproteinasa de matriz
MNK ½	Quinasa de interacción com MAPK
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
N-Ras	Neuroblastoma-Rous Avian Sarcoma
NF κ B	Factor nuclear κ B
ng	Nanogramos
NP-40	Nonidet-40
PBS	Tampón fosfato salino
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGA ₁	Prostaglandina A ₁
PGD	Prostaglandina D
PGE	Prostaglandina E
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PHD	Pleckstrin Homology Domain
PKB/AKT	Proteína quinasa B
PKC	Proteína quinasa C
PKD	Proteína quinasa D
PMSF	Fluoruro de metilmetasulfoilo
PTB	Dominio de unión a fosfotirosina
Raf	Factor activador de Ras
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPMI	Medio de Roswel Park Memorial Institute
RTK	Receptor tirosina quinasa
SDS	Dodecil sulfato sódico

SH2	Domino 2 de homología a Src
Shc	Proteína con dominio SH2
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
SOS	Proteína GEF (<i>Son of Sevenless</i>)
SPRD	<i>Sprouty Related Domain</i>
SPRED	<i>Sprouty-Related EVH1 Domain Proteins</i>
Src	Proteína Rous sarcoma virus
TBP	Proteína de unión a la caja TATA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina
TGF- β	Factor de crecimiento tumoral β
TNF	Factor de necrosis tumoral
Tris	Tri(hidroximetil)-aminometano
TTBS	Tampón tris salino-Tween 20
U	Uracilo, uridina
μg	Microgramos
μl	Microlitros
VEGF	Factor de crecimiento vascular
WB	Western blot
wt	<i>Wild type</i> o forma salvaje o silvestre

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. RECEPTORES TIROSINA QUINASA Y FACTORES DE CRECIMIENTO.

La señalización intracelular mediada a través de los receptores tirosina-quinasa (RTK) controla muchos aspectos del destino celular.

Los receptores tirosina quinasa, son una familia de receptores que poseen actividad tirosina quinasa, a través de los cuales se activan distintas rutas de señalización que dan lugar a diversos efectos celulares. De forma general, su estructura consta de un dominio extracelular, un dominio hidrofóbico transmembrana y un dominio citoplasmático (Figura 1). La unión de ligandos específicos al dominio extracelular induce la dimerización del receptor, que estimula su actividad, induciendo auto y trans-fosforilaciones en residuos de tirosina de la región citoplasmática, los cuales, sirven como puntos de anclaje para proteínas implicadas en la ruta de señalización Ras/Raf/MEK/ERK entre otras (Warren and Landgraf, 2006). Entre los ligandos que activan los RTK se encuentran los factores de crecimiento como EGF o FGF.

El EGF es un factor de crecimiento para gran variedad de células y tejidos de origen ectodérmico o mesodérmico. Su receptor, *EGFR* o *ERB1*, uno de los miembros mejor caracterizados de la familia ERB, es capaz de transmitir una gran variedad de señales que pueden generar respuestas celulares como proliferación, supervivencia, diferenciación, inducción de apoptosis e incluso migración celular (Zhang et al., 2007). Los residuos de fosfotirosina del receptor activado son reconocidos por proteínas adaptadoras que poseen dominios SH2 (Koch et al., 1991) o dominios PTB (van der Geer and Pawson, 1995), como son la proteína Grb2 o la proteína Shc. Grb2 interacciona con residuos de fosfotirosina del receptor a través de un único dominio SH2 y mediante dos dominios SH3, se une a regiones específicas ricas en prolinas, como las presentes en Sos, proteína activadora de Ras.

La familia del FGF está formada por una serie de factores de crecimiento, que muestran actividad mitogénica en gran variedad de células de origen mesenquimal, neuronal y epitelial. Están involucrados en numerosos procesos biológicos durante el desarrollo embrionario, cicatrización, hematopoyesis y angiogénesis. Uno de los FGF mejor caracterizados es el FGF básico (bFGF o FGF-2), que presenta alta afinidad por proteoglicanos de membrana, siendo una de sus funciones mejor caracterizadas la neovascularización durante estadios iniciales del desarrollo tumoral (Eswarakumar et al., 2005; Presta et al., 2005). Los factores de crecimiento pertenecientes a esta familia median su señal por unión y activación de cuatro RTK diferentes (FGFR1-FGFR4).

Estos receptores poseen secuencias conservadas, que sirven como punto de anclaje para el dominio PTB de la proteína adaptadora FRS2, la cual es fosforilada por el receptor continuando con la cascada de señalización de Ras/Raf/MEK/ERK, entre otras.

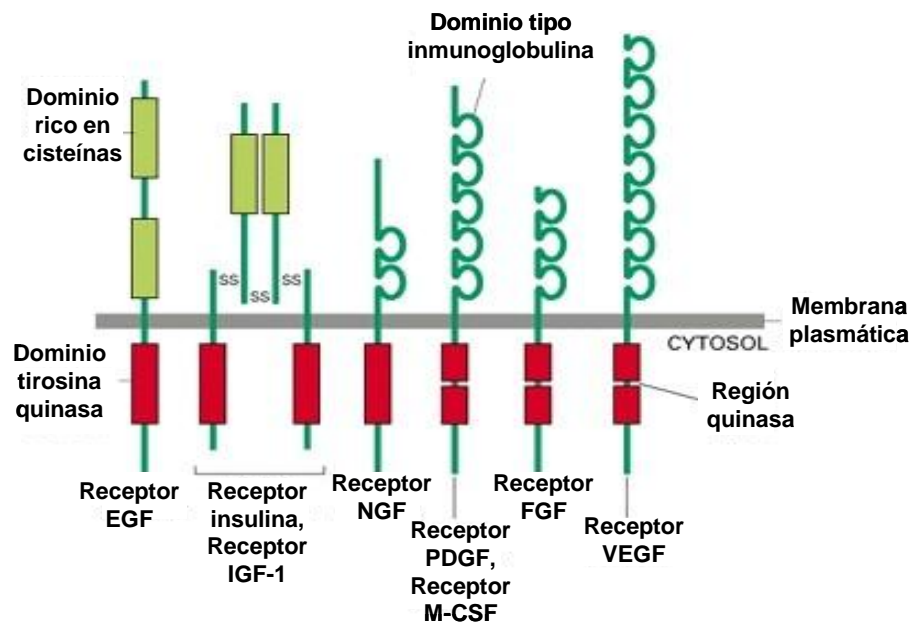


Figura 1: Estructura de seis subfamilias de receptores tirosina quinasa. Imagen tomada de Bruce Alberts et al., Biología molecular de la Célula.

1.1 ESTÍMULOS INDEPENDIENTES DE RECEPTORES TIROSINA QUINASA: PROSTAGLANDINAS

Las prostaglandinas son compuestos de 20 átomos de carbono formados a partir del ácido araquidónico, el cual es liberado de los fosfolípidos de membrana por acción de la fosfolipasa A_2 . Este ácido es transformado por acción de las ciclooxigenasas COX_1 y COX_2 en PGH_2 que a su vez, y por acción de prostaglandinas sintasas específicas, es transformado en los precursores de las diferentes familias de prostaglandinas (Figura 2).

Las prostaglandinas actúan de forma autocrina o paracrina de ahí la denominación de "hormonas locales" (Bos et al., 2004; Funk, 2001). La naturaleza de la acción de las prostaglandinas depende tanto del tipo de receptor, por ejemplo las prostaglandinas ciclopentanonas ejercen sus efectos a través de receptores acoplados a proteínas G-heterotriméricas, como de las diferentes proteínas diana presentes. Entre estas acciones se encuentran, vasodilatación (Kumazawa et al., 2007), vasoconstricción (Arikawa et al., 2006), agregación plaquetaria (Rolin et al., 2006) y la regulación de la inflamación y del sistema inmune (Kabashima and Narumiya, 2003), entre otras.

1.1.1 PROSTAGLANDINAS CICLOPENTENONAS

Las prostaglandinas ciclopentenonas se forman por deshidratación no enzimática de las familias de prostaglandinas PGE y PGD, dando respectivamente PGA_1 y 15-deoxi-d12,14-prostaglandina J_2 (15dPGJ_2). Estructuralmente las prostaglandinas ciclopentenonas se caracterizan por tener en su estructura un grupo carbonilo α,β insaturado en el anillo. Este carbono β es un centro electrofílico, capaz de formar aductos de Michael con nucleófilos tales como los grupos -SH de las cisteínas (Sanchez-Gomez et al., 2004; Shan et al., 2004; Strauss et al., 2000) (Figura 2).

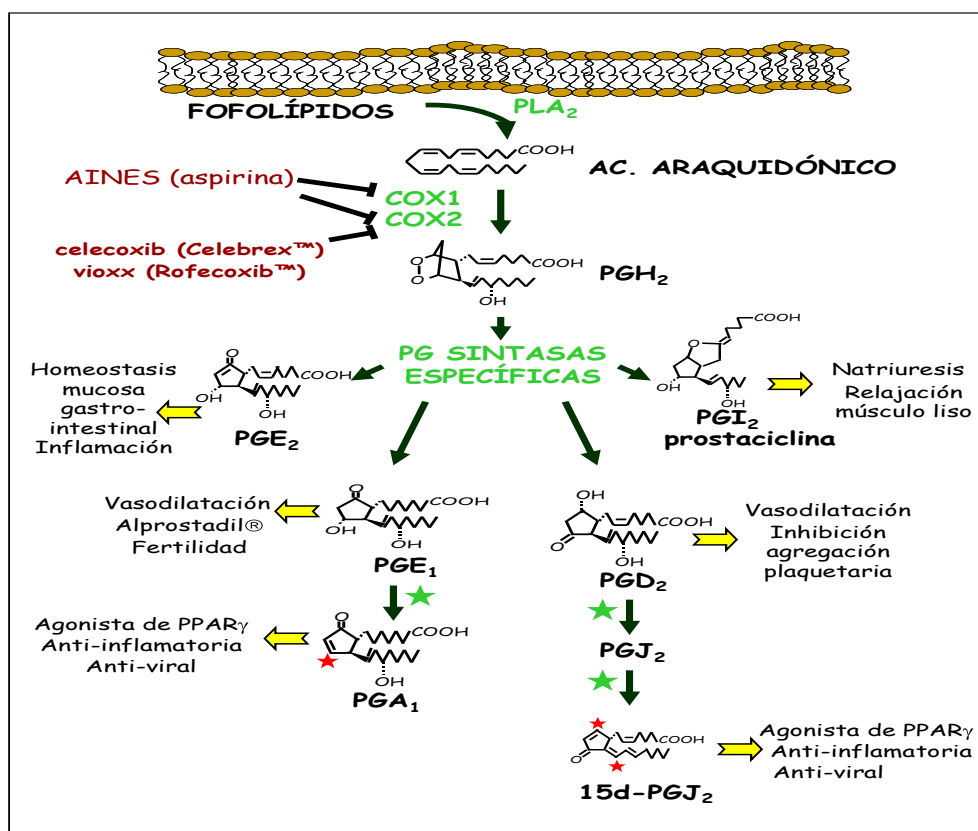


Figura 2: Síntesis del precursor común de todas las PGs, PGH_2 , a partir del ácido araquidónico, dando lugar a las distintas familias de PGs. Las ciclopentanonas (PGA_1 , PGJ_2 y 15d-PGJ_2) se producen por deshidratación espontánea (señalada por una estrella verde). Las estrellas rojas indican los carbonos β capaces de formar aductos de Michael.

Entre los efectos biológicos descritos para las prostaglandinas ciclopentenonas se encuentran la actividad mitogénica de 15dPGJ_2 , la cual se une a la cisteína 184 y activa específicamente a H-Ras, lo que a su vez conduce a la activación de la vía de Ras/Raf/MEK/ERK lo cual, produce un aumento de la proliferación de las células (Oliva et al., 2003). Otro efecto descrito para 15dPGJ_2 es la activación de $\text{PPAR}\gamma$ (Shiraki et al., 2005), factor de transcripción implicado en la diferenciación de adipocitos (Bishop-Bailey, 2000). Además se ha visto que PGA_1 se une, y activa, a H-

N- y K-Ras en un sitio diferente al de 15dPGJ₂ y sin embargo, K y N-Ras ni unen 15dPGJ₂ ni son activados por ésta (Renedo et al., 2007). Por otro lado PGA₁ actúa como inhibidor de la vía NF-κB ya que se une directamente a IKKβ y la 15dPGJ₂ y forma aductos de Michael con la quinasa IκB-quinasa (Rossi et al., 1997). Entre otros efectos, las prostaglandinas ciclopentenonas tienen efectos antivirales (Santoro, 1997), antitumorales (Kato et al., 1986), inducción de estrés oxidativo (Kondo et al., 2001) y apoptosis (Kim et al., 1993).

2. PROTEÍNAS MAPK

Estas proteínas son una familia de enzimas, altamente conservadas, cuya activación por diversos estímulos celulares da lugar a un amplio rango de respuestas. Su actividad está regulada por la combinación de MAPK kinasas (MKKs), MAPK fosfatasas y otras proteínas como por ejemplo, la superfamilia de proteínas Sprouty (Spry)/ Spred, de la cual hablaremos más adelante. La activación requiere la fosforilación en treonina y tirosina (Thr-X-Tyr). Una vez que ésto ocurre, fosforilan a sus sustratos en residuos de serina o treonina, (que pueden ser desde otras quinasas hasta factores de transcripción), desencadenando respuestas celulares tales como proliferación, crecimiento, diferenciación, senescencia o apoptosis (Huang et al., 2010). En mamíferos, existen distintos tipos de MAPK, JNK, proteínas p38^{MAPK}, ERK5 y ERK1/2 (Boutros et al., 2008; Pearson et al., 2001; Wagner and Nebreda, 2009)

(Figura3)

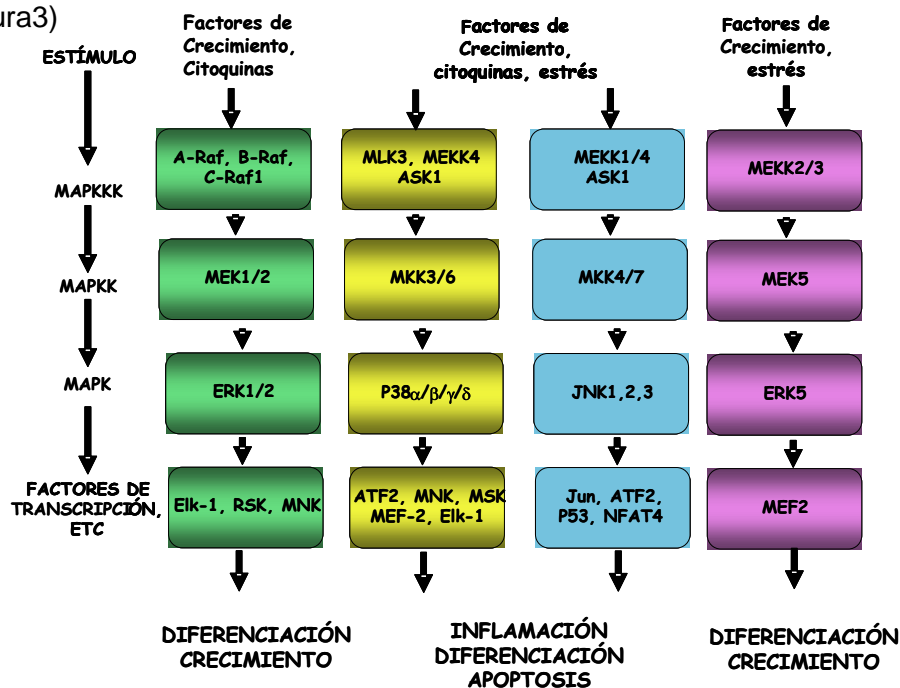


Figura3: La familia de las MAPK, serina/treonina quinasa implicadas en proliferación, diferenciación, estrés, inflamación o apoptosis.

2.1 JNKs

Las proteínas JNKs están codificadas por tres genes, *Mapk8* para JNK1, *Mapk9* para JNK2 y *Mapk0* para JNK3. Los mRNA sufren splicing alternativo que da lugar a unas diez isoformas. JNK1 y JNK2 se expresan de forma ubicua. Por el contrario JNK3 se expresa únicamente en cerebro. La activación de las proteínas JNK se induce principalmente por citoquinas inflamatorias, como IL-1, TNF o factores desencadenantes de estrés celular y requiere la fosforilación en la secuencia Thr-Pro-Tyr (TPY), que es realizada por las quinasas MKK4 y MKK7 (Davis, 2000). El estudio en ratones mostró que mientras los KO de JNK1 o JNK2 no exhibían anomalías, el doble KO interrumpía el desarrollo en la mitad de la gestación por defectos en el cierre del tubo neural, demostrando así, que la función de JNK es necesaria para el desarrollo y la viabilidad de los ratones y que no es específica de la isoforma (Sabapathy et al., 1999). Existe un amplio rango de sustratos de JNK: p53, ATF-2 (Gupta et al., 1996; Gupta et al., 1995) o el factor de transcripción AP-1, que incluye los miembros de la familia Fos y Jun (Weston and Davis, 2007). La familia de las JNKs está implicada en proliferación celular y apoptosis.

2.2 p38

La familia p38^{MAPK} está codificada por cuatro genes: *Mapk14* para p38 α , *Mapk11* para p38 β , *Mapk12* para p38 γ y *Mapk13* para p38 δ . Las isoformas α y β se expresan de forma ubicua, mientras que γ y δ están más restringidas a músculo, piel e hígado (Han et al., 2007). Las quinasas p38 se activan por diferentes estímulos, como citoquinas inflamatorias (IL-1, TNF- α), factores de crecimiento (TGF- β , FGF), condiciones de estrés celular o especies reactivas de oxígeno (ROS). La activación de p38^{MAPK} es regulada por las quinasas MKK3 y MKK6, las cuales a su vez, se activan por otras quinasas como MTK1 y ASK1 (Hui et al., 2007; Ono and Han, 2000). Los estudios de disrupción génica en ratones muestran que la pérdida de p38 α interrumpe el desarrollo de los embriones entre los días 10.5-16.5, por un fallo en la vascularización de la placenta (Adams et al., 2000). La pérdida de p38 γ produce defectos en la secreción de insulina por parte de las células β pancreáticas (Sumara et al., 2009). Por otro lado, se ha visto que ratones a los que les faltan las otras isoformas de p38^{MAPK} son viables y fértiles. La isoforma más estudiada es p38 α . Existen dos grandes grupos de sustratos de p38; por un lado factores de transcripción como p53, ELK1 o ATF2 y por otro quinasas como MNK1 ó MNK2 (Hui et al., 2007; Ono and Han,

2000) y tienen una especial relevancia controlando la diferenciación de varios tipos celulares, así como un papel negativo en la regulación de ciclo celular y la inducción de apoptosis, lo que le confiere un importante papel como supresor tumoral (Bulavina and Fornace, 2004; Hui et al., 2007).

2.3 ERK5

ERK5, también llamada BMK1 (Zhou et al., 1995) es expresada en multitud de tejidos y se activa por diversos estímulos como estrés oxidativo y osmótico (Abe et al., 1996), factores de crecimiento como EGF, FGF o VEGF (Hayashi et al., 2004; Hayashi and Lee, 2004; Kato et al., 1997; Kesavan et al., 2004) y citoquinas como IL-6 (Carvajal-Vergara et al., 2005). También se ha visto activación de ERK5 en condiciones como hipoxia o isquemia (Sohn et al., 2002; Takeishi et al., 1999). Esta activación es llevada a cabo por la quinasa MEK5, que fosforila en dos residuos distintos; una treonina en la posición 218, lo que provoca un cambio conformacional que facilita la fosforilación de la Tyr 220, dando lugar a la completa actividad de ERK5 (Mody et al., 2003). En estudios de disrupción génica se ha visto que los ratones K.O. de ERK5 no son viables ya que su desarrollo embrionario se ve interrumpido en el día 10 aproximadamente, debido a defectos cardiovasculares y a fallos en la formación de los tejidos embrionarios (Roberts et al., 2009). Esta quinasa está implicada en la regulación de la hipoxia, la migración celular y la prevención de la apoptosis.

2.4 ERK1/2

ERK1 y ERK2 se expresan desde estadios tempranos en todos los tejidos con un 83% de homología en sus secuencias, responden a prácticamente a los mismos estímulos y comparten la mayoría de sus funciones. Sin embargo, se han podido encontrar diferencias en cuanto a las funciones que realizan, mediante estudios en ratones KO. Ratones deficientes en ERK1 eran viables y fértiles, pero presentaban alteraciones en la actividad locomotora, en la maduración de timocitos y en la diferenciación de adipocitos (Bost et al., 2005; Mazzucchelli et al., 2002; Pages et al., 1999); mientras que los ratones deficientes en ERK2 mostraron un fenotipo completamente distinto, quedando interrumpida su gestación entre los días 6.5-8.5 del desarrollo embrionario, debido a fallos en la diferenciación del mesodermo y el desarrollo placentario (Hatano et al., 2003; Saba-El-Leil et al., 2003; Yao et al., 2003). Hasta ahora los únicos activadores conocidos de ERK son las proteínas MEK. Para que ERK se active totalmente es necesaria la fosforilación de dos residuos del dominio catalítico (T202/Y204 en ERK1 y T185/Y187 en ERK2) que están separados por un ácido glutámico formando un motivo TEY (Ferrell and Bhatt, 1997).

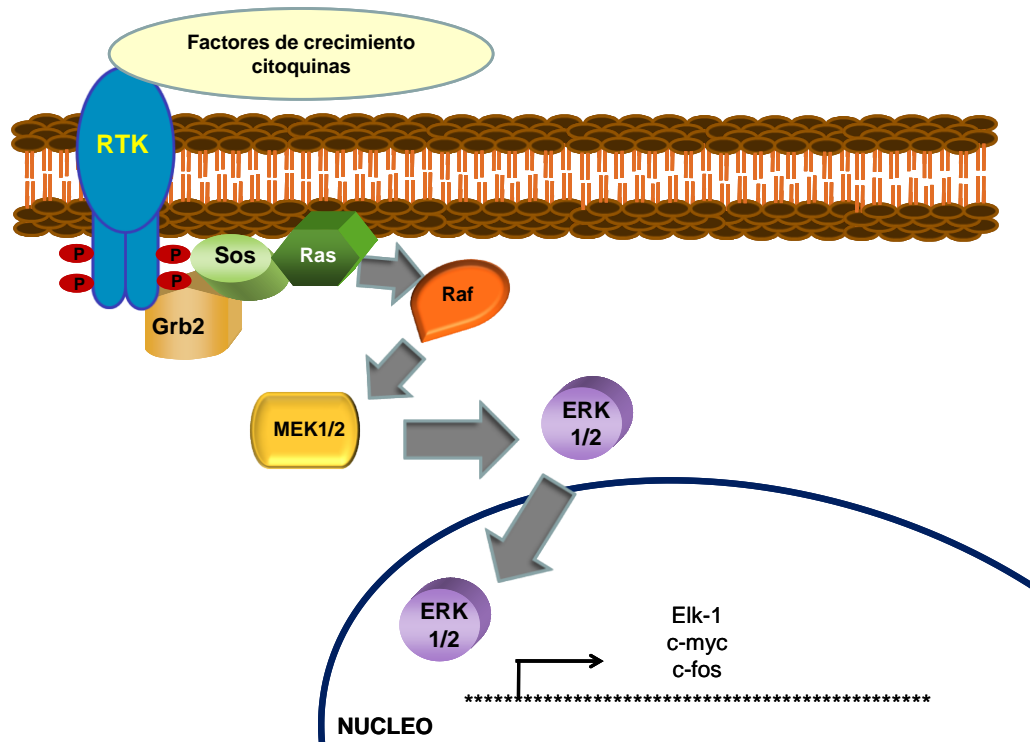


Figura 4: Esquema de la ruta Ras/Raf/MEK/ERK

Tras su fosforilación, ERK dimeriza y puede fosforilar proteínas citoplasmáticas, como Mnk1, o dirigirse al núcleo donde fosforila factores de transcripción, como Elk-1, c-myc o c-fos regulando la expresión génica (Chambard et al., 2007; Dumesic et al., 2009) (Figura 4). La activación de la ruta de ERK tiene un papel importante en proliferación, muerte celular y remodelación del citoesqueleto (Calvo et al., 2010; Huang et al., 2010).

3 UNIONES CELULARES

Las uniones celulares permiten la comunicación entre células vecinas, a través de su membrana plasmática, lo que favorece el anclaje de las mismas al medio que las rodea así como la adhesión celular, lo cual hace que las células se agrupen formando tejidos. Una alteración de estas uniones confiere a las células capacidad invasiva y facilita su migración, pudiendo originar patologías como el cáncer (Meng and Takeichi, 2009).

La adhesión entre las células epiteliales se realiza a través de distintos tipos de uniones (Figura 5):

a) **Uniones estrechas**- están formadas principalmente por claudinas y ocludinas, provocando la exclusión del espacio intercelular e impidiendo así, la difusión de moléculas entre las células y la migración lateral de las proteínas y los lípidos de membrana.

b) **Uniones comunicantes**- están constituidas por proteínas transmembrana o conexinas que conectan las células vecinas y forman poros que permiten el paso selectivo de moléculas.

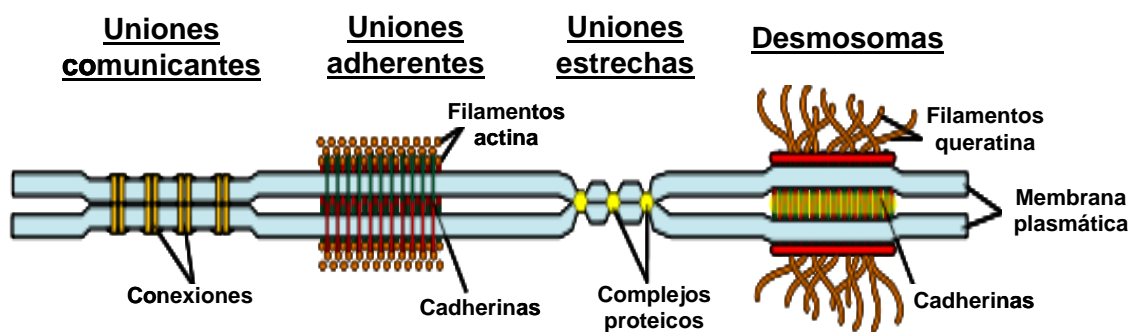


Figura 5: Esquema representativo de los distintos tipos de uniones celulares.

c) **Uniones adherentes y desmosomas**- son uniones que conectan de modo puntual las células del epitelio, con el citoesqueleto de células vecinas, permitiendo así que las células mantengan su forma. Las uniones adherentes son el tipo más abundante y el más importante, ya que tienen un papel fundamental en la adquisición y el mantenimiento de la estructura de los tejidos y además pueden limitar el movimiento celular y la proliferación (Conacci-Sorrell et al., 2002). Estas uniones están mediadas por las cadherinas, proteínas transmembrana que interactúan con cadherinas de células vecinas. La interacción tiene lugar entre los dominios extracelulares de las cadherinas y siempre ocurre en presencia de Ca^{2+} . Existen muchos miembros de la familia de cadherinas, pero la más estudiada es la E-cadherina, principal cadherina del tejido epitelial. Para el correcto establecimiento de las uniones, la E-cadherina ha de interactuar con el citoesqueleto de actina. Esta unión no es directa, se realiza a través de unas proteínas citosólicas que se denominan cateninas. El dominio citosólico de la E-cadherina interactúa con β -catenina, la cual a su vez se une a α -catenina que es la responsable de la unión directa a el citoesqueleto de actina (Cowin and Burke, 1996). Existen otras proteínas asociadas a zonas diferentes del dominio citosólico de la E-cadherina, como p120-catenina, responsable de la estabilidad de las uniones adherentes.

A continuación, en los siguientes apartados, pasaré a describir con más detalle las proteínas en las que se ha centrado este trabajo.

3.1 E-CADHERINA

Es el miembro más estudiado y mejor caracterizado de la familia de las cadherinas. Posee un dominio extracelular, que se divide a su vez en cinco subdominios repetidos, también conocidos como dominios EC (Figura 6). Cada uno de estos subdominios tiene secuencias de unión a calcio conservadas en los distintos miembros de la familia de las cadherinas. La interacción de los iones calcio con estas secuencias regula la conformación del dominio extracelular, de tal forma que cuando el calcio se une a ellos, el dominio extracelular puede interactuar con otras cadherinas de las células vecinas. Por otro lado, su dominio citoplasmático también está muy conservado y es a través de él, que puede unirse a moléculas citoplasmáticas como p120-catenina o a β -cateninas, formando una "estructura" que conecta con el citoesqueleto de actina (Huber et al., 2001).

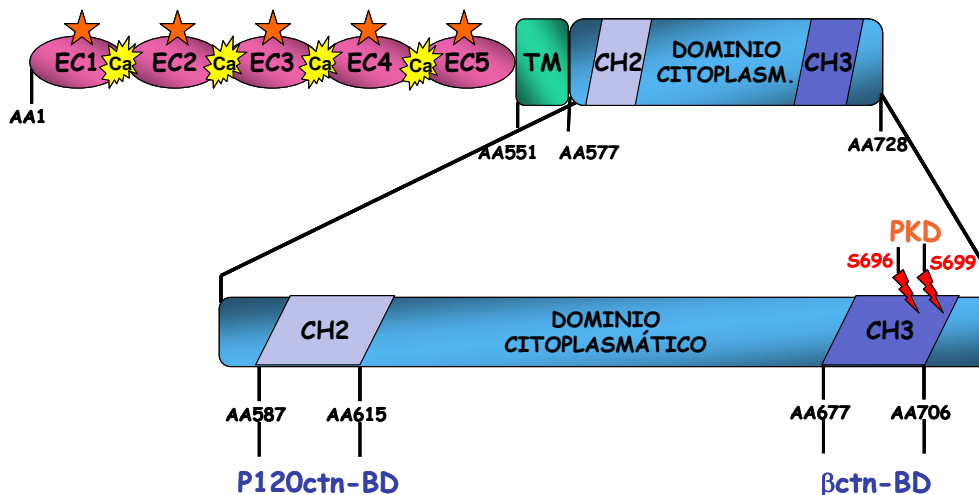


Figura 6: Estructura de E-cadherina, polipéptido de 728 aa, formado por un dominio extracelular, que consta de 5 repeticiones denominadas "Extracelular cadherin repeats" (EC1-EC5), un dominio transmembrana (TM) y un dominio citoplasmático, que posee los sitios de unión a distintos ligandos

3.2 β -catenina

Es una proteína perteneciente a la superfamilia "armadillo", en la cual todos sus miembros comparten un dominio central, denominado "dominio armadillo", gracias al cual, forma complejos con numerosas moléculas.

En la estructura de β -catenina podemos diferenciar tres dominios (Figura 7): un dominio N-terminal, el cual contiene la zona de unión a α -catenina (Aberle et al., 1994) y sitios de fosforilación por la quinasa GSK3 β (Yost et al., 1996). El extremo C-terminal es muy ácido y con él interactúan muchas proteínas de la maquinaria

transcripcional, como la proteína de unión a la caja TATA (TBP) (Hecht et al., 1999), SMAD4 (Nishita et al., 2000) o CREB (Takemaru and Moon, 2000). Además este dominio es esencial para la transcripción mediada por factores de la familia Tcf/Lef (Behrens et al., 1996). Por otro lado, el dominio central o dominio de armadillo, es una estructura rígida que está formado por 12 repeticiones, imperfectas, de 42 aminoácidos cada una. Estos dominios armadillo son zonas de interacción proteína-proteína y, en el caso de β -catenina, de unión a múltiples ligandos tales como E-cadherina, APC o axina, con los que forma complejos que tienen la particularidad de ser excluyentes entre sí (Gottardi and Gumbiner, 2001)

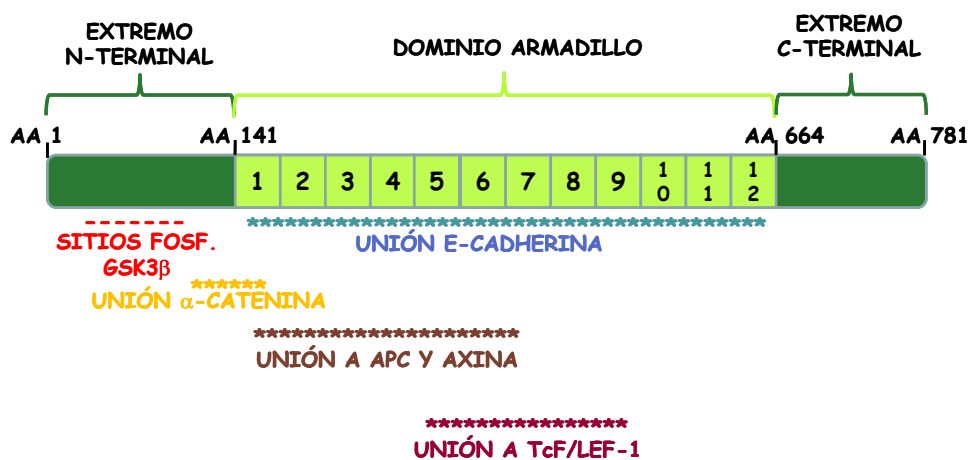


Figura 7: Estructura de β -catenina formada por tres regiones: la región amino terminal, una región central que contiene las doce repeticiones armadillo y una región carboxilo terminal. En esta figura se muestran en diferentes colores, las zonas que sirven para la unión de diferentes moléculas relacionadas con la función de esta proteína.

Su función es crucial en dos importantes procesos: por un lado, en la regulación de la expresión génica a través de la ruta de Wnt (Chen et al., 2001) y por otro en el establecimiento de las uniones adherentes. En cada una de estas funciones, β -catenina debe asociarse a diversas proteínas a fin de poder desarrollar su función (Figura 8).

- Con respecto a las uniones adherentes, β -catenina actúa de puente uniéndose por su dominio armadillo a E-cadherina y por su región N-terminal a α -catenina, la cual a su vez es la responsable de la unión al citoesqueleto de actina. La unión de β -catenina a E-cadherina es muy importante y ocurre en el retículo endoplásmico, tras la biosíntesis de E-cadherina. Una vez se ha producido esta unión, juntas se dirigen hacia la superficie celular, donde rápidamente es reclutada α -

catenina. Cualquier fallo en la unión de estas proteínas, lleva a la degradación de E-cadherina, que quedaría retenida en el retículo y a la consiguiente alteración de las uniones adherentes (van Roy and Berx, 2008).

- En cuanto a su papel como modulador génico, es crucial la regulación de los niveles de β -catenina libre en el citosol. β -catenina libre, es decir, no unida a E-cadherina, es fosforilada por un complejo proteico formado por APC o proteína acopladora axina, la cual recluta a $CKI\alpha$, que fosforila inicialmente en la Ser45 y a GSK3 β , que a su vez fosforila a β -catenina en la Thr 41, Ser 37 y Ser 33. Como consecuencia de esto, β -catenina es poliubiquitinada por la ubiquitina ligasa β -Trcp y posteriormente degradada en el proteasoma (Figura 8). Cuando este sistema de degradación se ve alterado, β -catenina no puede ser degradada y el exceso de β -catenina libre puede trasladarse al núcleo actuando como coactivador de factores de transcripción de la familia Tcf, que inducen la expresión de una gran variedad de genes diana, muchos de ellos implicados en tumorigénesis (Behrens et al., 1996; Liu et al., 2002).

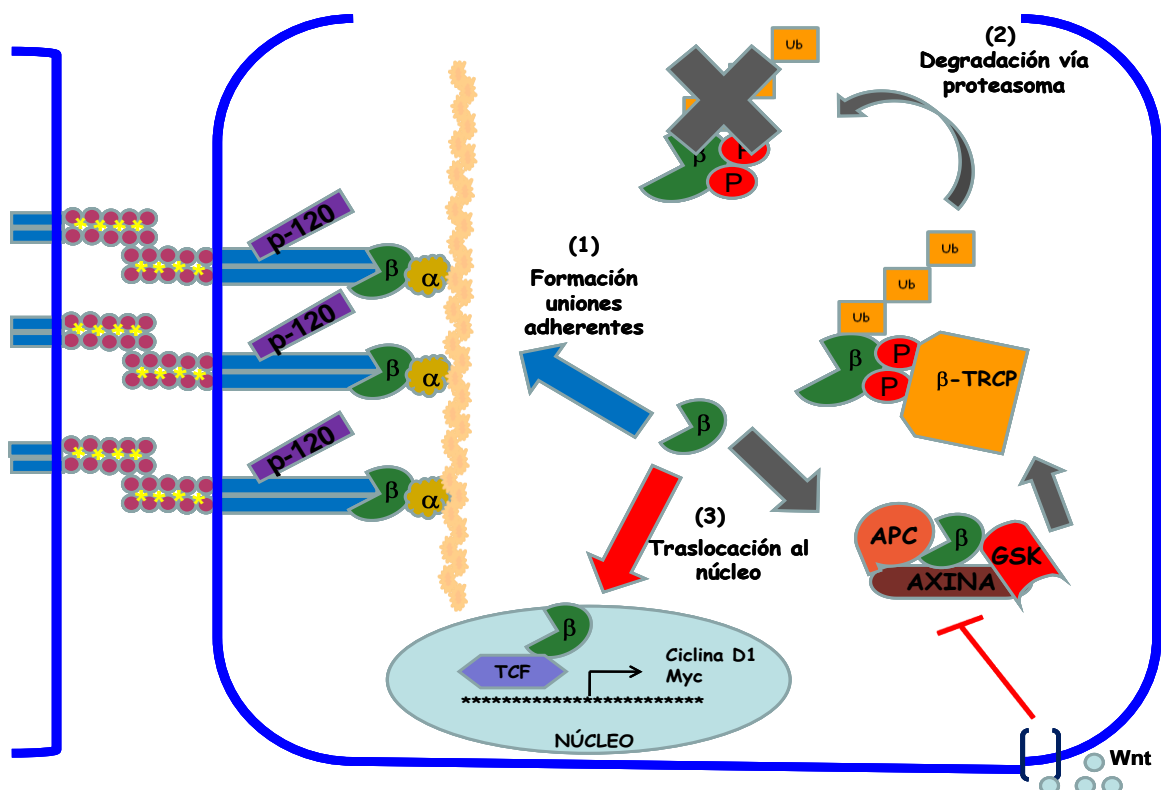


Figura 8: Función y regulación de β -catenina, que mediante su unión a E-cadherina y a α -catenina (1) permite la formación de las uniones adherentes. (2) Cuando la ruta de señalización de Wnt está inhibida, β -catenina libre en el citoplasma se asocia a un complejo proteico, que la dirige a degradación vía proteasoma. (3) Si por el contrario, la ruta de Wnt está activada, se inhibe la degradación de β -catenina la cual, se trasloca al núcleo y activa a distintos genes diana.

3.3 p120-catenina

La proteína p120-catenina se identificó originalmente como un sustrato de la oncoproteína Src (Reynolds et al., 1989) e inicialmente fue llamada p120 cas (cadherin-associated Src substrate), pero posteriormente al descubrirse que también formaba parte del complejo cateninas-cadherinas, se le cambió el nombre por p120ctn (Reynolds et al., 1994). En su estructura consta de un dominio armadillo por el cual se une a E-cadherina, concretamente por las repeticiones 1 a 7 (Shibamoto et al., 1995) (Figura 9). Al contrario que la β -catenina, p120-catenina no interactúa con α -catenina ni con APC (Daniel and Reynolds, 1995), esto justifica su diferente función en el complejo formado con E-cadherina.

El splicing alternativo del gen da lugar a las isoformas de p120-catenina. En el extremo amino terminal existen cuatro inicios de traducción que dan lugar a la expresión de las isoformas 1, 2, 3 y 4 (Keirsebilck et al., 1998). La isoforma más frecuente en células epiteliales y la más implicada en uniones adherentes es la forma denominada p120ctn^{102end} (isoforma 3) (Figura 9).

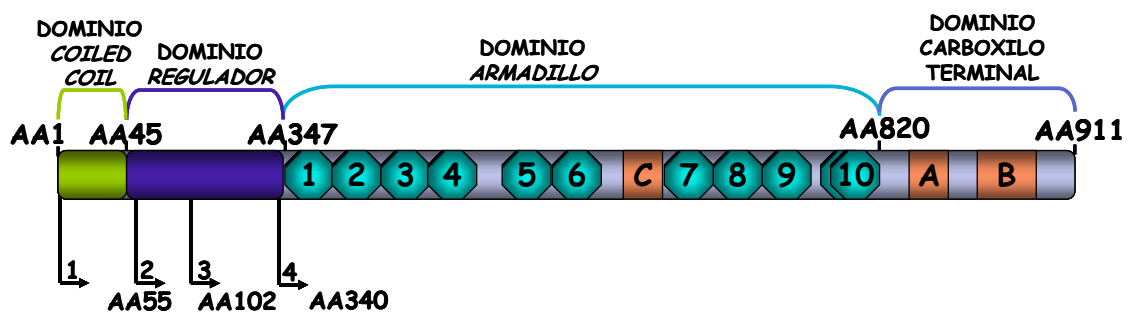


Figura 9: Estructura de p120-catenina, que consta en su región central de un dominio de repeticiones armadillo, una región carboxilo terminal y una región amino terminal formada por el dominio regulatorio y dominio “coiled coil”. El splicing alternativo de esta región da lugar a cuatro isoformas, cada una de ellas con un ATG de inicio distinto (marcado con números 1-4).

Con respecto a la función de p120-catenina se ha visto que su fosforilación en tirosinas aumenta su afinidad por las cadherinas (Calautti et al., 1998; Roura et al., 1999; Xia et al., 2003), pero para que sea fosforilada, tanto en tirosinas como en serinas o treoninas, ha de ser reclutada hacia la membrana, a través de su interacción con las cadherinas (Reynolds et al., 1994; Thoreson et al., 2000). Se ha visto que en células deficientes en E-cadherina, por ejemplo la línea celular L que proviene de fibroblastos de ratón, p120-catenina se encuentra en el citoplasma, mientras que si se reestablece la expresión de E-cadherina, se produce un reclutamiento de p120-

catenina a las uniones adherentes. Esto corrobora que las cadherinas son suficientes y necesarias para reclutar p120-catenina a la membrana y que además, la estequiometría de p120-catenina en los complejos de E-cadherina es similar a la de β -catenina (Nathke et al., 1994). Por otro lado también se ha visto que p120 catenina se asocia a un factor de transcripción, Kaiso, y se cree que juntas se translocan al núcleo pudiendo actuar como un represor transcripcional (Daniel and Reynolds, 1995).

Juntas, estas cateninas regulan la dinámica de las uniones celulares, modulando procesos como el reagrupamiento lateral de cadherinas y la fuerza de unión entre ellas, otorgándole en algunos casos, un papel negativo en la regulación de los contactos celulares (Ohkubo and Ozawa, 1999); otros, por el contrario, le otorgan un papel positivo (Thoreson et al., 2000). Estudios recientes sugieren que otra función adicional de p120-catenina en el complejo de adhesión celular, sería regular el reciclaje de las cadherinas (Davis et al., 2003; Ireton et al., 2002). En condiciones normales el reciclaje de las cadherinas ocurre mediante un mecanismo de endocitosis. Hay trabajos que describen que p120-catenina interaccionaría directamente con E-cadherina evitando su internalización y su posterior degradación, aumentando así la vida media de la E-cadherina y por tanto, la cantidad de E-cadherina disponible en la membrana (Anastasiadis and Reynolds, 2000). Por ejemplo, células de carcinoma de colon SW48, (deficientes en la expresión de p120-catenina), presentan altos niveles de E-cadherina en el citoplasma y por lo tanto, una baja adhesión. Cuando se reestablece la expresión de p120-catenina, se rescata el fenotipo epitelial mediante la estabilización de E-cadherina en la membrana (Ireton et al., 2002) (Figura 10).

4 REGULACIÓN DE LAS UNIONES ADHERENTES

Las uniones adherentes parecen estar sometidas a un continuo recambio y este proceso ha de estar regulado para permitir la adecuada funcionalidad y establecimiento de las mismas, a fin de garantizar la correcta arquitectura de los tejidos.

Podemos hablar de dos formas de regulación:

-Regulación transcripcional: La E-cadherina es considerada la principal molécula de adhesión por lo que su regulación es muy importante. Ha sido descrita ampliamente como supresor tumoral, ya que su desregulación induce disgregación celular y metástasis. Se ha encontrado disminuida su expresión en tumores gástricos, tumores de mama (Birchmeier, 1994) y en tumores colorrectales (Brabletz et al.,

2001). Muchos factores de transcripción están implicados en el control de la expresión de las cadherinas. Por ejemplo, la expresión del factor de transcripción Snail está inversamente relacionado con la de E-cadherina (Cano et al., 2000; Palmer et al., 2004; Pena et al., 2005). Otros factores de transcripción como SIP1, Twist y E12 actúan como represores de la transcripción de E-cadherina a través de su interacción con la E-box (Yang et al., 2004). Recientemente se ha publicado que una familia de miRNA, miR-200, controla los niveles de expresión de la E-cadherina actuando a nivel de los represores transcripcionales de ZEB-1 y ZEB-2 durante la transición epitelio-mesénquima (Gregory et al., 2008; Park et al., 2008). Así mismo, se ha visto que otro miRNA, miR-373, induce la expresión de E-cadherina por el reconocimiento de un sitio de unión en el promotor de la E-cadherina (Li et al., 2006; Place et al., 2008).

Regulación post-transcripcional- se da mediante la fosforilación de una serie de residuos aminoacídicos, lo que altera la estabilidad de los complejos formados por cadherina-cateninas y permite cambios rápidos en las interacciones de dichos complejos. Se ha descrito que tanto β -catenina, como p120-catenina son en algunos casos, sustrato de quinasas como Src (p120-catenina), los receptores de EGF, HGF, PDGF y erb2 (Tsukita et al., 1993) y que estas fosforilaciones regulan las uniones adherentes (Behrens et al., 1993; Hazan and Norton, 1998; Shibata et al., 1996); se ha publicado que el aumento de fosforilación de β -catenina en residuos de tirosina, se correlaciona con el desensamblaje de las uniones adherentes.

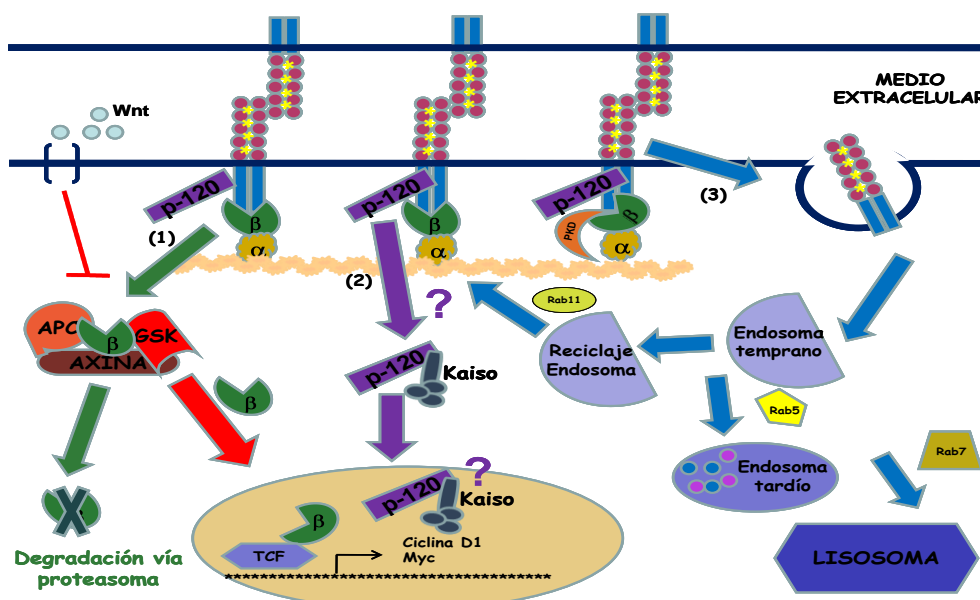


Figura 10: Papel de las distintas cateninas en las uniones adherentes. Las cateninas tienen un papel dual, ya que tienen una doble localización: formando parte de las uniones adherentes o de forma libre en el citoplasma, en cuyo caso, al igual que β -catenina tras la activación de Wnt se trasloca al núcleo (1), p120-catenina se une al factor de transcripción Kaiso y se trasloca al núcleo mediante un mecanismo desconocido (2). La regulación de E-cadherina ocurre mediante un proceso de endocitosis, por el que es transportada a endosoma temprano, del cual puede ser reciclada o pasar a endosoma tardío para su final degradación en el lisosoma (3).

Por otro lado cadherinas (como E-cadherina) pueden fosforilarse en serinas del dominio citosólico por la CKII aumentando su afinidad por β -catenina (Lickert et al., 2000) y estabilizando E-cadherina en la membrana. Otra proteína que regula post-traduccionalmente a E-cadherina, y en la que se ha centrado este trabajo, es PKD, una serina-treonina quinasa, perteneciente a la familia de las Proteína Quinasa C (PKC). PKD fosforila a E-cadherina y la estabiliza en la membrana, lo que favorece la formación de complejos cadherina-cateninas y la agregación celular (Jaggi et al., 2005). Existe una regulación de las uniones adherentes que involucra a las GTPasas de la familia Rho (Rac, Rho y Cdc42) en la funcionalidad de los complejos de adhesión (Kaibuchi et al., 1999).

5 PROTEÍNA QUINASA D (PKD)

La proteína quinasa C_{μ} también conocida como PKD, es un miembro de la familia de las Proteína Quinasa C (PKC), que son serina-treonina quinasas que dependiendo de su actividad enzimática se clasifican en tres grandes grupos: PKC clásicas (α, β_1, β_2 y γ) que se activan por calcio o por diacilglicerol (DAG) y fosfolípidos, PKC noveles (PKC $\delta, \epsilon, \eta, \mu$ y θ) cuya activación es independiente de calcio, se activan únicamente por DAG y fosfolípidos y por último las PKC atípicas (ζ y λ), cuyo mecanismo de activación es independiente tanto del calcio como de los fosfolípidos o el DAG.

Al igual que el resto de los miembros de PKC, PKD tiene un dominio regulador N-terminal, comprendido entre los aminoácidos 1-588, región que consta de (Figura 11):

- Un extremo amino terminal rico en residuos de alanina y prolina
- Dos regiones ricas en cisteínas, también denominadas CRD, con estructuras tipo "dedos de zinc", en las cuales se encuentran los sitios de unión al DAG y ésteres de forbol, y que tiene especial relevancia en la mediación de la traslocación a la membrana de PKD,
- Un dominio ácido, cuya función biológica aun no está clara
- Un dominio PH, de unión a fosfoinositoles, el cual juega un papel muy importante tanto en la regulación como en su interacción con otras proteínas.

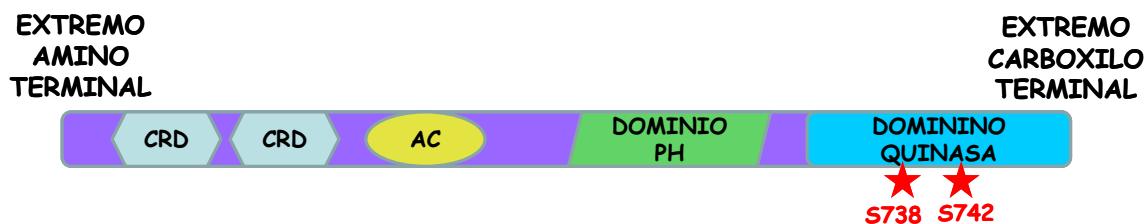


Figura 11: La estructura de la proteína quinasa D (PKD). **CRD:** dominios ricos en cisteína 1 y 2. **AC:** región ácida. **PH:** dominio "pleckstrin homology". **Dominio quinasa** con los residuos responsables de la activación **S738** y **S742**

Tanto la delección del dominio regulador completo, del dominio PH o de los dominios CRD producen la completa activación de la proteína, mostrando el efecto inhibitorio de esta región sobre la actividad quinasa (Iglesias and Rozengurt, 1998, 1999; Zugaza et al., 1996). El dominio catalítico de PKD (situado en la región C-terminal) tiene poca homología con el del resto de los miembros de las PKC, lo cual sugiere que esta proteína tiene una especificidad de sustrato diferente al resto (Zugaza et al., 1996). En cuanto a su activación, PKD puede ser activada por multitud de factores a parte de los ya mencionados, como son el estrés oxidativo, neuropéptidos como la bombesina, vasopresina, endotelina, bradiquinina y angiotensina II ó factores de crecimiento como el PDGF y el FGF. Entre las distintas funciones de PKD se encuentran:

- **Inducción de la apoptosis:** hay estudios en los que se ha visto que PKD interacciona, a través de su dominio PH, con el dominio C-terminal de ASK1, una quinasa reguladora de apoptosis (Storz and Toker, 2003) y también se ha visto que PKD fosforila a la histona deacetilasa 7 (HDAC7), lo cual resulta en una salida de la misma del núcleo y apoptosis celular (Besirli and Johnson, 2006; Parra et al., 2005).

- **Inducción de la proliferación y supervivencia:** numerosos estudios han investigado la implicación de PKD en supervivencia y apoptosis. Se ha visto que en células Swiss 3T3, neuropéptidos como vasopresina o bombesina o los ésteres de forbol activan PKD mediante un mecanismo dependiente de otras PKCs, dando como resultado la síntesis de DNA y la proliferación celular (Guha et al., 2002). También se ha publicado que, bajo condiciones de estrés oxidativo se induce la activación de PKD, a través de un mecanismo mediado por las quinasa Src y Abl y dependiente de otras PKC (Storz et al., 2004). Esta activación de PKD induce la activación del factor de transcripción NF-KB, que protege a la célula de la muerte celular (Storz et al., 2004; Storz and Toker, 2003). También se ha comprobado en hepatocitos que PKD

promueve la supervivencia celular en respuesta a especies reactivas de oxígeno (ROS) (Song et al., 2009) y tiene un papel protector frente a la muerte celular inducida por H₂O₂ en células intestinales (Dequiedt et al., 2005).

- **PKD regula el tamaño tumoral, la capacidad invasiva y la metástasis:** La expresión disminuida de PKD se considera un marcador de invasividad en cáncer de mama. Esto puede ser debido a la función de PKD como regulador negativo de la expresión de MMP (Du et al., 2009). En líneas celulares de cáncer de próstata que tienen una expresión de PKD disminuída, la expresión ectópica de PKD puede fosforilar a β -catenina lo cual la estabiliza en la membrana, favoreciendo la adhesión celular, lo que provoca una disminución de la capacidad invasiva (Mak et al., 2008). Por otro lado, otros trabajos han publicado que en células de tumores gástricos la expresión de PKD está disminuida y esto se correlaciona con un aumento de la mutación de su promotor, sugiriendo que el silenciamiento epigenético de PKD conlleva un aumento de la migración celular y metástasis (Zhukova et al., 2001).

6 FAMILIA DE PROTEÍNAS SPROUTY/SPRED

La familia de proteínas Sprouty se identificó a partir de un análisis genético en *Drosophila melanogaster*, como un regulador negativo de la vía de señalización de ERK, mediada por RTKs (Hacohen et al., 1998). Se vio que en respuesta a FGF, la sobreexpresión de Sprouty disminuía la ramificación traqueal, mientras que la pérdida de la expresión producía hiper-ramificación. Sprouty no sólo afecta a la activación de ERK inducida por FGF, sino también por EGF. En el desarrollo de la glía, las neuronas y los ojos en *Drosophila*, el EGFR juega un papel muy importante y en todos estos tejidos, la pérdida de función de Sprouty durante el desarrollo provoca un aumento del número de células en estos tejidos (Casci et al., 1999).

En vertebrados se han identificado cuatro genes Sprouty, homólogos al de *Drosophila*, que codifican proteínas de un tamaño que oscila entre 34-37KD. De todas las isoformas, Sprouty2 es la que presenta mayor homología entre especies (Minowada et al., 1999) (Figura 12). Estas proteínas en su extremo C-terminal poseen una región rica en cisteínas (que conserva un 55% de homología con la de *Drosophila*) y parece ser la responsable de su traslocación a la membrana, tras la estimulación con factores de crecimiento (Lim et al., 2000). En su región N-terminal poseen un residuo de tirosina conservado en todas las isoformas, que se corresponde con la posición 55 en

Sprouty2 y cuya mutación confiere unas propiedades de dominante negativo con respecto a la proteína salvaje (Impagnatiello et al., 2001) (Figura 12).

El papel de Sprouty es la regulación negativa de la activación de ERK inducida por FGF y VEGF (Impagnatiello et al., 2001). Distintos datos apunta a que Sprouty2 también desempeña un papel en la ruta mediada por EGF (Lim et al., 2000) ya que aumenta la duración de la misma sin afectar a su intensidad debido a su interacción con la ubiquitina ligasa c-Cbl (Egan et al., 2002; Fong et al., 2003; Rubin et al., 2003).

Respecto a el papel de Sprouty2 en la ruta mediada por FGF, aunque inicialmente se creía que la inhibición llevada a cabo por Sprouty2 en esta ruta era a través de Grb2, lo cual impediría la unión de ésta a otras proteínas adaptadoras (Hanafusa et al., 2002; Lao et al., 2006), se demostró que esta unión de Grb2 a otras proteínas adaptadoras no estaba afectada por Sprouty2 (Gross et al., 2001) y que mutantes de Sprouty2 que no unen Grb2 continuaban inhibiendo la activación de ERK (Martinez et al., 2007). Otro posible mecanismo de acción sugerido es que la unión de Sprouty2 a Raf es lo que impide la activación de ERK (Sasaki et al., 2003; Tsavachidou et al., 2004).

Estudios de disrupción génica han aportado más datos para el conocimiento del papel de estas proteínas. Así, el KO de Sprouty1 origina malformaciones del aparato genitourinario (Basson et al., 2005). En el KO de Sprouty2, la mayoría de los ratones morían al poco de nacer, ya que presentaban defectos en el aparato digestivo debido a una hiperplasia del nervio entérico (Taketomi et al., 2005) y los que sobrevivían presentaban anomalías en el órgano de Corti, por lo que eran sordos (Shim et al., 2005). En el KO de Sprouty4, los ratones sufren retraso en el crecimiento, aumento de incisivos y maloclusión, polisindactilia y defectos mandibulares (Taniguchi et al., 2007).

Más recientemente, se ha identificado otra familia de proteínas: la familia Spred, constituida por tres miembros, que tienen conservado el dominio C-terminal rico en cisteínas de las proteínas Sprouty (SPRD) (Figura 12) y que, al igual que en estas, también es responsable de la translocación a la membrana de Spred tras la estimulación mitogénica. Por el contrario, la región N-terminal carece de homología con Sprouty y engloba el dominio EVH1, que es un dominio de interacción con secuencias consenso ricas en prolina (FPPPP) y con afinidad por actina (Ball et al., 2002). En la región central poseen un dominio denominado KBD de interacción con c-Kit (Wakioka et al., 2001).

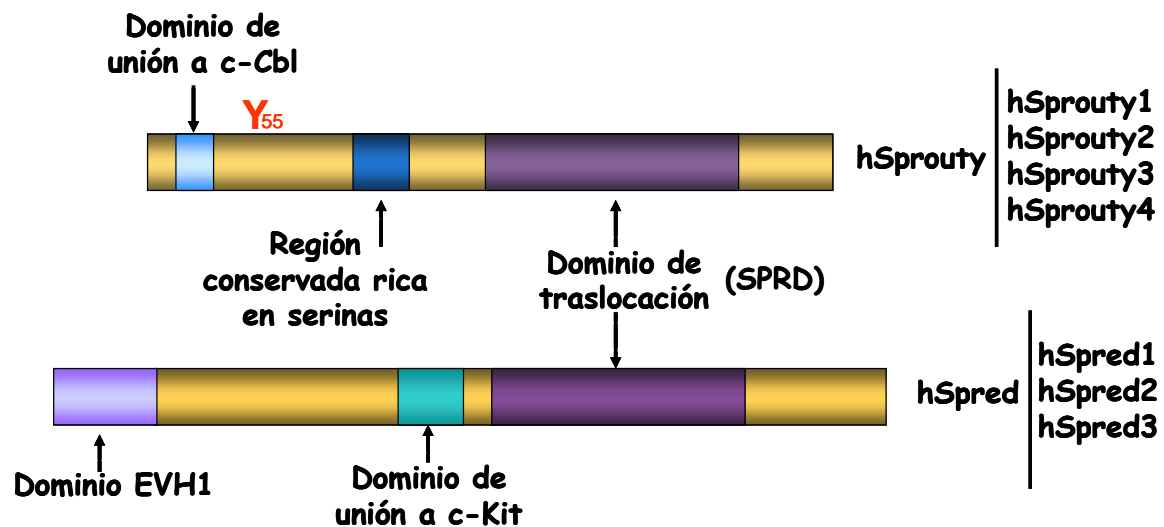


Figura 12: Estructura de la familia de proteínas Sprouty / Spred

El papel de las proteínas Spred es la regulación negativa de la activación de ERK inducida por EGF, FGF y VEGF (Bundschu et al., 2007) y parece ser que los dominios de las proteínas poseen distintas funciones dependiendo de la isoforma de Spred a la que nos refiramos. Así pues, mientras que el dominio SPR parece ser esencial para que Spred2 pueda ejercer su función (Meng et al., 2012; Nobuhisa et al., 2004), en Spred1, es en el dominio EVH1 sobre el que recae la función inhibitoria (Stowe et al., 2012). Estudios de disrupción génica han aportado más datos para el conocimiento del papel de esta familia de proteínas. El KO de Spred1 presentó un crecimiento y desarrollo normal, pero en un modelo de ratón asmático, se observó un aumento de la eosinofilia así como una mayor migración de estas células al pulmón en respuesta a IL5 (Inoue et al., 2005). Además también se ha visto que el KO de Spred1 puede regular negativamente la hematopoyesis en respuesta a IL3 (Nonami et al., 2004). El KO de Spred2 provocaba en los ratones un fenotipo de enanismo parecido a la acondroplasia humana y una inhibición de la hematopoyesis embrionaria (Bundschu et al., 2005; Nobuhisa et al., 2004).

Dadas todas estas características y sabiendo el papel relevante que tiene la vía de Ras/ERK en la regulación de procesos tales como la proliferación o diferenciación, se podría considerar a esta superfamilia de proteínas Sprouty/Spred, como posibles supresores tumorales. Así pues, se ha visto en varios trabajos, que en ciertos tipos de tumores, como son el carcinoma de mama o próstata, la expresión de Sprouty1 y Sprouty2 está disminuida significativamente con respecto al tejido sano circundante

(Kwabi-Addo et al., 2004; Lo et al., 2004). En el caso de linfomas B difusos humanos se ha visto, que el promotor de Sprouty2 está hipermetilado y esto podría relacionarse con el grado de supervivencia (Sanchez et al., 2008). En hepatocarcinomas por ejemplo, se ha observado una reducción de la expresión de Spred1 y Spred2, que además se hace más acusada en metástasis (Yoshida et al., 2006). Sin embargo y en contra de lo que cabría esperar se ha visto que Sprouty2 está sobreexpresado en cáncer de colon, de recto, de ovario y de útero (Barbachano et al., 2010; Lo et al., 2006) pudiendo tener un papel pro-oncogénico.

Con estos precedentes, en este trabajo hemos analizado el papel de la familia de proteínas Sprouty/Spred en la vía de ERK, en respuesta a la prostaglandina ciclopentenona PGA_1 , así como su implicación en la estabilidad de las uniones adherentes y las consecuencias fisiológicas de dicha implicación. De igual modo hemos estudiado el papel de Sprouty2 como sustrato de las serina-treonina quinasas PKD y $p38^{MAPK}$ y sus posibles efectos celulares.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Efectos de las proteínas Sprouty sobre la vía de ERK en respuesta a PGA_1 .
2. Análisis de Sprouty2 como posible diana de $p38^{MAPK}$.
3. Análisis de Sprouty2 como posible diana de otras serina - treonina quinasas.
4. Estudio del papel de Sprouty2 sobre las uniones adherentes en las células epiteliales.
5. Efecto de Sprouty2 sobre la sensibilidad de las células de cáncer de colon a quimioterapia por agentes genotóxicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 MATERIALES

1.1.1 Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas en esta tesis doctoral fueron:

HEK 293T: Línea celular originada a partir de células epiteliales de riñón de embrión humano transformadas con el ADN del adenovirus humano tipo 5, que lleva integrada una copia de la región temprana de SV40. ATCC: CRL-1573.

HeLa: Línea de células epiteliales humanas procedentes de un carcinoma de cervix epitelial de Henrietta Lacks. ATCC: CCL-2.

COS1: Células de riñón de mono verde con morfología de fibroblasto. ATCC: CRL-1650.

SW480: Línea de células derivadas de un adenocarcinoma epitelial de colon. ATCC: CCL-228. Existen dos subpoblaciones descritas con morfología y respuesta hormonal distinta: SW480-ADH (adherentes) y SW480-R (redondeadas).

Todos los tipos celulares a excepción de la línea SW480, fueron mantenidos en DMEM suplementado con 10% FCS, 2 mM glutamina y 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina. Las células SW480 fueron mantenidas en medio RPMI con los mismos suplementos. Cuando las células se privaron de suero, se utilizó el mismo medio en el que se crecen normalmente suplementado además con 10 mM pH 7,5 HEPES, pero sin suero añadido.

1.1.2 Material de cultivos celulares

- DMEM (Gibco)
- Tripsina (Gibco)
- Suero fetal de Ternera (Gibco)
- Antibióticos: 100 U/ml y estreptomina (0,1 mg/ml) (Gibco)
- Glutamina (Gibco)

- DMSO (SCHARLAB)
- HEPES (Gibco)
- Factores de crecimiento: FGF y EGF (Sigma) y PGA₁ (Cayman Chemical)

1.1.3 Anticuerpos

- Anti-AU5, anti-HA y anti- AU5-FITC de ratón de Covance
- Anti- MAPK (ERK-1), anti- myc, anti- GST y anti- proteína quinasa C_μ (PKD) de Santa Cruz
- Anti- fosfo MAPK (ERK1/2) y anti- fosfo C-Raf (338) de Cell Signalling
- Anti- Spred2 de Abcam
- Anti- E-cadherina de Bioscience
- Anti- Sprouty2, anticuerpos monoclonales anti-ratón y anti-conejo conjugados con HRP, de Amersham
- Anti- β-actina de Sigma-Aldrich
- Anti- Alexa Fluor594 cabra anti-ratón y anti- Alexa Fluor647 anti-conejo de Invitrogen
- Anticuerpos monoclonales anti-ratón y anti-conejo conjugados con HRP, de Amersham

1.1.4 Cepas bacterianas

Para el mantenimiento, crecimiento y purificación de ADN plasmídico se utilizó la cepa bacteriana DH5 α de *Escherichia coli*.

Para la producción y extracción de proteínas de fusión se utilizó la cepa BL21 de *Escherichia coli*.

1.1.5 Plásmidos. Descripción y procedencia

Se emplearon estos vectores de expresión en eucariotas: pCDNA3, pCEFL, pEF y pEGFP, controlados por el promotor de citomegalovirus salvo en el caso de pCEFL, que está controlado por el promotor de EF1 α . La mayoría poseen un epítipo (myc, HA, AU5) para su posterior reconocimiento por anticuerpos.

Para la expresión inducible en bacterias de proteínas, se utilizó el vector pGEX-4T-1 (GE Healthcare). Estas construcciones poseen un epítipo GST, para su posterior reconocimiento por anticuerpos.

PLÁSMIDOS	PROCEDENCIA
pCEFL-KZ-HA-ERK1	Laboratorio Dr. Jose M ^a Rojas
pCEFL-KZ-HA-Sprouty2 wt	Laboratorio Dr. Jose M ^a Rojas
pCEFL-KZ-HA-Sprouty2 Y55F	Laboratorio Dr. Jose M ^a Rojas
pCEFL-KZ-HA-Sprouty2 Nter	Laboratorio Dr. Jose M ^a Rojas
pCEFL-KZ-HA-Sprouty2 Cter	Laboratorio Dr. Jose M ^a Rojas
pCEFL-KZ-AU5-Sprouty2 wt	(de Alvaro et al., 2005)
pCEFL-KZ-AU5-Spred1	(Garcia-Dominguez et al., 2011)
pCEFL-KZ-AU5-Spred2	(Garcia-Dominguez et al., 2011)
pCEFL-KZ-AU5-Sprouty2 P59A-P304A	Laboratorio Dr. Jose M ^a Rojas
pCEFL-KZ-AU5	Cedido por el Dr. Silvio Gutkind
pCEFL-KZ-HA	Cedido por el Dr. Silvio Gutkind
pCEFL-KZ-HA-p38 α ^{MAPK}	Cedido por el Dr. Silvio Gutkind
pEF-H6-myc-C-Raf wt	Cedido por el Dr. Silvio Gutkind
pGEX-4T1-GST-MKK6	Cedido por el Dr. Silvio Gutkind
pGEX-4T1-GST-ATF2	Laboratorio Dr. Jose M ^a Rojas
pGEX-4T1-GST-Sprouty2 Nter	Laboratorio Dr. Jose M ^a Rojas
pEFboss- PKD wt	Laboratorio Dr. Jose M ^a Rojas
pEFboss- PKD KD	Cedido por la Dra. Teresa Iglesias
pEFboss- PKD ca	Cedido por la Dra. Teresa Iglesias

PLÁSMIDOS	PROCEDENCIA
pEFboss- PKD Δph	Cedido por la Dra. Teresa Iglesias
pEFboss- PKD ΔCRD	Cedido por la Dra. Teresa Iglesias
pCEFL-KZ-HA-PKD Δ1-321	(Doppler et al., 2007)
pCEFL-KZ-HA- PKD ΔDom Kin	(Doppler et al., 2007)
pCEFL-KZ-HA-Dom Kin PKD	(Doppler et al., 2007)
pGEX-4T1-GST-cyto-E-cadherina	Cedido por el Dr. A. García de los Herreros.
pGEX-4T1-GST-p120 catenina	Cedido por el Dr. A. García de los Herreros.

1.1.6 Generación de mutantes

Todos los mutantes obtenidos mediante mutagénesis dirigida se han comprobado por secuenciación. En la siguiente tabla, se muestran los mutantes que han sido utilizados para realizar este trabajo, así como los oligonucleótidos que se han empleado.

MUTANTES	OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS (5'-3')
Sprouty2 Ser-42 Ala	5' AAAGGATCCCTGGATCAGATCAGA 3'
Sprouty2 Ser-74 → Ala	5' AAAGGATCCACTCAGCACAAACAC 3'
Sprouty2 Ser-97 Ala	5' AAAGGATCCCAGGTCCATTCTTCT 3'
Sprouty2 Ser-101 → Ala	5' AAAGGATCCTCTGCACGAGCCCCT 3'
Sprouty2 Ser-102 Ala	5' AAAGGATCCGCACGAGCCCCTCTG 3'
Sprouty2 Ser-108 → Ala	5' AAAGGATCCAGATCCATAAGCACG 3'
Sprouty2 Ser-110 Ala	5' AAAGGATCCTCCATAAGCACGGTC 3'
Sprouty2 Ser-112 → Ala	5' AAAAGGATCCACGGTCAGCTCAGGG 3'
Sprouty2 Ser-121 Ala	5' GGTCGCGGAGCGCTACGAGGACAAG 3'
→	
Fragmento Sprouty2 59-119	5' AAAAGATCTCGAAACACCAATGAGTAC 3' 5' TTTGCGGCCGCCCCGCGACCCTGAGCTGAC 3'

→

→

1.1.7 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de plásmidos pCEFL fueron los siguientes:

5' AU5- AGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTT

3' AU5- AAGGAACTGGGACCTTCCACGGTGAGGGTG

1.2 MÉTODOS

1.2.1 Transformación de bacterias competentes

La transformación se realizó siguiendo el protocolo descrito por (Hanahan et al., 1983).

1.2.2 Transfecciones transitorias

Las transfecciones transitorias de células HEK 293T o HeLa, se realizarán con el agente de transfección JetPei (Genycell) siguiendo el manual del usuario.

1.2.3 Transfecciones estables

Se generaron células SW480 establemente transfectadas con pCEFL-KZ-AU5, pCEFL-KZ.AU5-Sprouty2 wt, pCEFL-KZ-AU5-Sprouty2 Y55F y pCEFL-KZ-AU5-Sprouty2 S112A seleccionándolas con Neomicina. No se realizó selección clonal, sino que se utilizó el cultivo en masa.

1.2.4 Inmunoprecipitaciones

Las células tratadas previamente se lisan durante 30 minutos a 4°C con 700 µl de un tampón de lisis: HEPES 25 mM pH 7,5, NaCl 300 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 0,2 mM, tritón X-100 1%, glicerofosfato 20 mM, SDS 0,1%, deoxicolato 0,1% y CHAPS 2 mM, añadiendo en el momento de usar PMSF 100 mM, DTT 0,1 M, leupeptina 5 mg/ml y ortovanadato 10 mM. Posteriormente, las muestras se centrifugan 5 minutos a 14.000

rpm. Se toma el sobrenadante (retirando un 10% del volumen obtenido, lo cual supondrá el extracto total) y se incuba con 5 mg/ml del anticuerpo apropiado (anti HA o anti AU5) durante 2 horas a 4°C en rotación. Pasado ese tiempo se añaden 30 ml de γ -bind sepharose o anti ratón IgG sepharose y se incuba durante 1 hora. Se centrifuga 5 minutos a 14000 rpm y se lava la resina con buffer de lisis tres veces.

1.2.5 Inmunoblot

Las proteínas se separaron por SDS/PAGE. Después se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad), que después de incubar con los anticuerpos correspondientes se revelaron con la técnica del ECL (Amersham).

1.2.6 Ensayos de activación transcripcional

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se emplearon para medir la activación transcripcional de Elk-1. Las células se transfectaron con 0,67 ng del ADN de estudio, 35 ng de TATA-Gal4-Luc (gen reportero que contiene el gen que codifica para la enzima *Photinus luciferasa* bajo el control de Gal4), 16,6 ng de pcDNA3-Gal4-Elk1 (el plásmido expresa el factor de transcripción Gal4-Elk1) y 0,1 ng de pRL-TK (plásmido que expresa la enzima *Renilla luciferasa* bajo el control del promotor TK de HSV).

Los extractos celulares se generaron 5 h post-estimulación según el manual de instrucciones del “Dual-Luciferase Kit” (Promega). La luz emitida por las luciferasas *Photinus* y *Renilla* se midieron en el luminómetro OPTOCOMP 1 (MGM Instruments). La actividad luciferasa *Renilla* presente en cada extracto se utilizó para la normalización de la señal de luciferasa, como una medida de la eficiencia de transfección.

1.2.7 Ensayos de interacción *in vitro*

Las proteínas objeto de estudios se purificaron con glutatión-sepharosa (Amersham), a partir de extractos de la cepa *E.coli* BL21 transformadas con los correspondientes plásmidos siguiendo los procedimientos anteriormente descritos (Martinez et al., 2007). Las células eucariotas usadas para el ensayo se lisaron en el tampón MLB:

HEPES 25mM pH 7,5, Tritón X-100 1%, NaCl 150mM, MgCl₂ 10mM, ortovanadato 1 mM, NaF 25 mM, PMSF 1mM y 10mg/ml de leupeptina, aproteinina, pepstatina A e inhibidor de tripsina. Un décimo de los extractos celulares se guardaron y el resto se incubaron con la proteína purificada unida a la resina glutatión-sepharose, durante 1 h/ 4°C. Tanto los extractos, como los ensayos de unión *in vitro* se analizaron por inmunoblot.

1.2.8 Ensayos de fosforilación *in vitro*

Las proteínas usadas como sustrato en la reacción, se purificaron con glutatión-sepharose, a partir de extractos de la cepa *E.coli* BL21 transformados con los correspondientes plásmidos, siguiendo los procedimientos anteriormente descritos (Martinez et al., 2007). Para la elución de las proteínas, se incubaron durante 1 hora con 100-300 ml de buffer de elución: glutatión, TrisHCl pH 7,5 100 mM, ClNa 120 mM, glicerol 10%, EDTA 1mM, β-mercaptoetanol 0,1%, DTT 1 mM, PMSF 1 mM y 10 mg/ml de aproteinina y leupeptina. Las células usadas para el ensayo se lisaron e inmunoprecipitaron siguiendo el procedimiento descrito en inmunoprecipitaciones. Los inmunoprecipitados se lavaron tres veces con buffer quinasa: MOPS pH 7,5 12,5 mM, β-glicerofosfato 12,5 mM, MgCl₂ 7,5 mM, EGTA 0,5 mM, NaF 10 mM y ortovanadato 10 mM. El ensayo de fosforilación se realizó resuspendiendo 20 ml del inmunoprecipitado en 20 ml de buffer quinasa conteniendo una concentración final de 50mM de ATP radiactivo. La mezcla se incubó a 30°C durante 30 minutos. Pasado este tiempo paramos la reacción añadiendo buffer SDS-PAGE.

1.2.9 Marcaje *in vivo*

Las células se privaron de suero durante dos horas y se incubaron en DMEN libre de fosfato durante cuatro horas previo a la adición de 1 mCi de ³²P. Después de una hora las células se lisaron y el extracto se incubó con α-AU5 y γ-bind durante dos horas a 4°C. La resina se lavó tres veces con buffer de lisis y las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE. El resultado se visualizó mediante autorradiografía.

1.2.10 Inmunofluorescencias

Las células se sembraron y se transfectaron sobre cubres circulares. Las células se fijaron en 4% paraformaldehído durante 30 minutos a 4°C. Se lavaron 3 veces durante 5 minutos cada vez con PBS, tras este paso y todos los demás. Las células se permeabilizaron 10 minutos a temperatura ambiente (t/a) con 0,1% Tritón X-100 en PBS. Se bloquearon durante 1 hora con 3% en BSA. Todos los anticuerpos se incubaron en 3% BSA. Los anticuerpos primarios se incubaron 1h t/a a una dilución 1/50, a excepción del anticuerpo anti-AU5-FITC que se empleó a una dilución 1/500. Los anticuerpos secundarios se incubaron durante 1h a una dilución 1/500. En el penúltimo lavado los cubres se incubaron con 1mg/ml DAPI (Calbiochem). Los cubres se montaron sobre los portas con Prolong Gold Antifade Trshrny (Invitrogen). Las inmunofluorescencias se analizaron en el Microscopio Confocal Spectral Leica SP5 AOBs del servicio de microscopía confocal del Instituto de Salud Carlos III, Campus de Majadahonda.

1.2.11 Silenciamiento génico

Para silenciar Sprouty2, las células fueron infectadas con lentivirus que contenían un shRNA dirigido hacia Sprouty2 o un shRNA control, ambos bajo el control del promotor U6. El sistema empleado fue “Mission shRNA lentiviral particles” (Sigma).

1.2.12 Detección del polimorfismo Sprouty2 P106S

El estudio del polimorfismo Sprouty2 P106S para valorar su distribución entre población control y pacientes con cáncer de colon, se realizó en colaboración con el Instituto del Cáncer de Dinamarca y con la Dra. Marina Pollán (CNE, ISCIII). Para ello, muestras de DNA genómico procedentes de linfocitos de sangre periférica se purificaron según los procedimientos habituales y la detección del cambio C-T en la posición 316 de la región codificante de Sprouty2 se efectuó mediante el empleo de las correspondientes sondas TaqMan (Invitrogen) normal y polimórfica.

1.2.13 Ensayos de viabilidad

La viabilidad celular fue evaluada mediante el método de cristal violeta (Hernandez Losa et al., 2003). Las células fueron sembradas 24h antes del tratamiento con la droga, a una concentración de 20×10^4 células/placa. Tras este tiempo, el medio de cultivo se renovó con medio nuevo con diferentes dosis del medicamento correspondiente. Las células fueron fijadas con glutaraldehído 2% durante 20 minutos, se lavaron un par de veces con PBS y se incubaron con cristal violeta durante 20 minutos. El colorante fue recubierto con ácido acético 1% y la densidad óptica fue evaluada a 590nm.

1.2.14 Análisis estadístico

Los valores se muestran como la media +/- error estándar de al menos tres experimentos. La significación estadística se estimó con el test t de Student para dos muestras independientes. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

En el análisis del polimorfismo (Sprouty2 P106S), los OR, intervalos de confianza del 95% y el valor de la p, se calcularon mediante modelos de regresión logística no condicional.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1 EFECTOS DE LAS PROTEÍNAS SPRED SOBRE LA VÍA DE ERK EN RESPUESTA A PGA_1

La sobreexpresión de miembros de la familia de proteínas Sprouty inhibe la activación de ERK inducida por diversos factores de crecimiento como FGF o VEGF (Hacohen et al., 1998) pero no lo hace cuando la activación de ERK es inducida por EGF (Casci et al., 1999). Más recientemente, se identificó una nueva familia de proteínas, Spred, que comparten con las anteriores en su extremo C-terminal una región rica en cisteínas. La función de estas es la regulación negativa de la activación de ERK mediada por factores de crecimiento como EGF, FGF o VEGF (Lim et al., 2000; Wakioka et al., 2001).

En el laboratorio se demostró que la prostaglandina ciclopentenona 15dPGJ2 es capaz de unir covalentemente la cisteína 184 de H-Ras, pero no la de N- o K-Ras (Oliva et al., 2003). Esta unión favorece la activación de la ruta H-Ras- Raf- MEK- ERK, produciendo un aumento en la proliferación de células NIH-3T3. Por otro lado se demostró, que otra prostaglandina ciclopentenona, PGA_1 , une y activa a H-, N- y K-Ras. Esta unión se da a través de las cisteínas 118,181 y 184, pero el residuo al que mayoritariamente se une PGA_1 , es a la cisteína 118, localizada en el dominio de interacción con GTP, lo cual lleva a la activación de las proteínas Ras (Renedo et al., 2007).

Ya que Sprouty2 se había descrito como un regulador negativo de la activación de ERK inducida por determinados factores de crecimiento, como FGF, se comprobó que también es capaz de inhibir la señalización de ERK inducida por PGA_1 , un estímulo no ligado a receptores tirosina quinasa (Tesis Carlota A. García-Domínguez). Dadas las similitudes funcionales y estructurales que existen entre las distintas familias de proteínas Sprouty y Spred, nos planteamos analizar que efectos tendrían tanto Spred1, como Spred2, en la activación de ERK inducida por PGA_1 .

Para ver esto, utilizamos células HeLa y evaluamos la fosforilación de ERK1 en presencia de Sprouty2, Spred1 y Spred2. Los resultados, (Figura 13), muestran que tanto Spred1, como Spred2 se comportan igual que Sprouty2 e inhiben la fosforilación de ERK inducida por PGA_1 . Además, en este ensayo se utilizó un doble mutante, Sprouty2 P59A P304A, que no une Grb2 y que se comporta igual que la proteína salvaje, sugiriendo por tanto, que el mecanismo inhibitorio de Sprouty2 en la activación de ERK1 inducida por PGA_1 es independiente de la unión de Sprouty2 a Grb2.

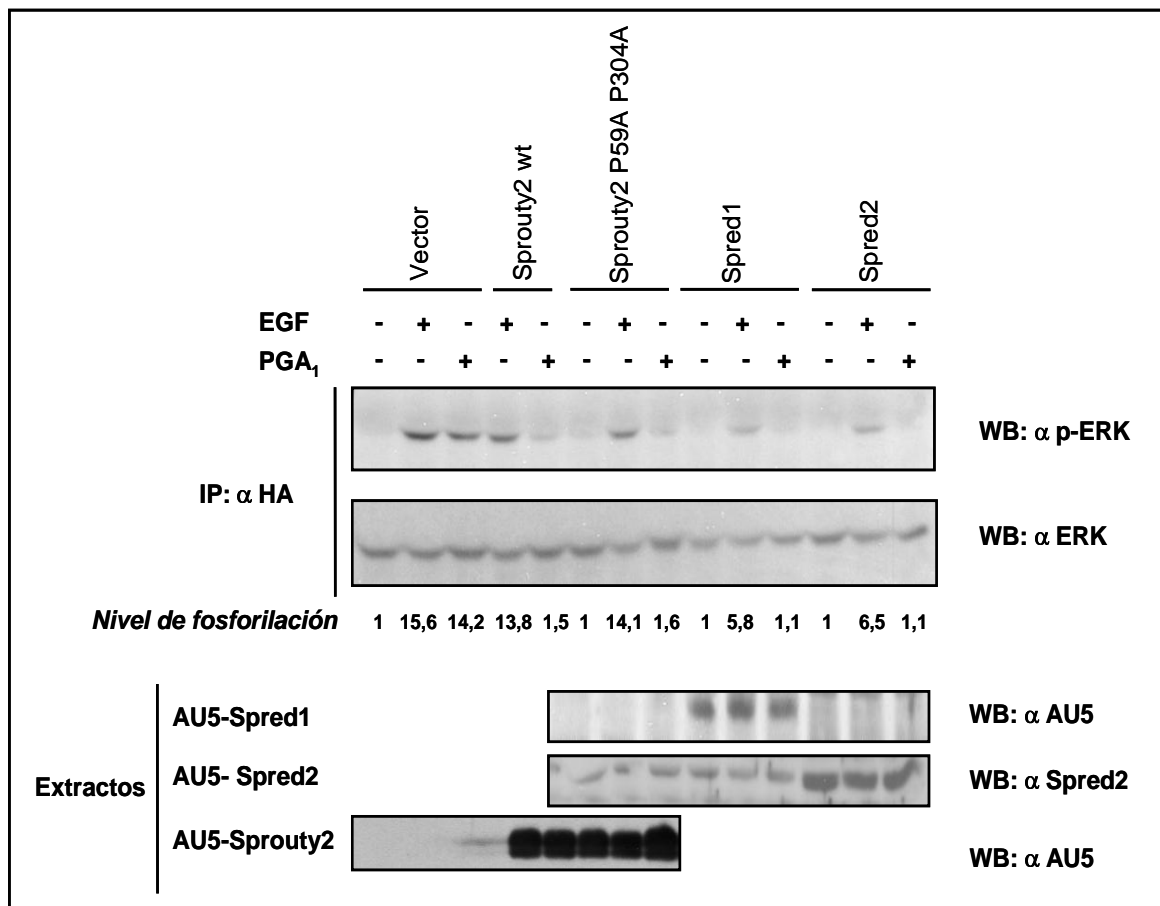


Figura13: Las proteínas Spred inhiben la activación de ERK inducida por PGA₁. Células HeLa fueron co-transfectadas transitoriamente con los plásmidos pCEFL-KZ-HA-ERK1 y con pCEFL-KZ-AU5 (vector), pCEFL-KZ-AU5-Sprouty2, pCEFL-KZ-AU5-Sprouty2 P59AP304A, pCEFL-KZ-AU5-Spred1 y pCEFL-KZ-AU5-Spred2 respectivamente. 24h post-transfección, las células se dejaron en medio sin suero durante 18h y luego se incubaron (+) o no (-) durante 15 minutos con EGF y PGA₁. Un décimo de los lisados celulares totales se utilizaron para detectar las proteínas AU5-Sprouty2, AU5-Spred1 y AU5-Spred2, cuyos resultados se muestran en los paneles inferiores (Extractos). El resto de los extractos se inmunoprecipitaron siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos y se utilizaron para ver los niveles de p-ERK y ERK totales. La fosforilación de p-ERK se cuantificó normalizando respecto a la cantidad de HA-ERK1 inmunoprecipitado, sobre las condiciones basales en presencia de vector en cada caso; S.D. <10%, n=3.

Para corroborar estos resultados, hemos evaluado la activación inducida por PGA₁ del factor de transcripción Elk-1, una diana de ERK. Como se muestra en la Figura 14, Sprouty2, al igual que Spred1 y Spred2, inhibe la activación de Elk-1 inducida por PGA₁.

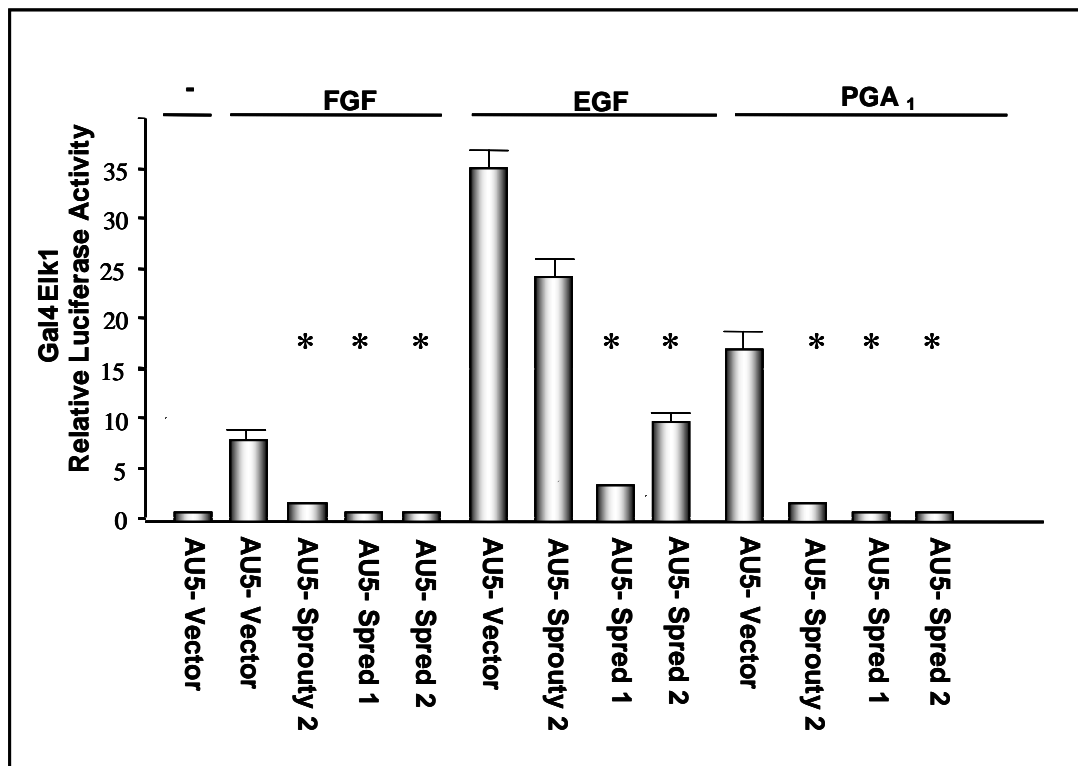


Figura 14: Spred1 y Spred2 inhiben la activación transcripcional de Elk-1 inducida por PGA₁. Células HeLa fueron co-transfectadas transitoriamente con los plásmidos pCEFL-KZ-AU5 (vector), AU5- Spred1, AU5-Spred2 o AU5-Sproutly2, además de los plásmidos necesarios para evaluar la actividad transcripcional de Elk-1 por ensayos luciferasa (ver Materiales y Métodos). 24 horas post-transfección las células se dejaron en ayuno durante 18 horas y tras este tiempo, se incubaron (+) o no (-) con vehículo (-), 100ng/ml EGF, 50ng/ml FGF o 10mM PGA₁ durante 8 horas. Los valores representan los datos normalizados respecto al vector en ayuno. Estos histogramas son representativos de tres ensayos independientes realizados por triplicado (* los resultados se normalizaron respecto a las condiciones basales en presencia de vector en cada caso).

Las proteínas Sproutly/Spred han sido identificadas como reguladores de la activación de ERK mediada por receptores tirosina–quinasa, en respuesta a diferentes estímulos mitogénicos como EGF o FGF. Ambas familias de proteínas regulan negativamente la migración y proliferación (Bundschu et al., 2007; Cabrita and Christofori, 2008). Hasta ahora los efectos de las proteínas Spred parecen estar focalizados en la vía de ERK, ya que no se han observado efectos sobre otras MAP quinasas, como p38 o JNK (King et al., 2005) y es la primera vez que se demuestran los efectos de las proteínas Spred sobre la activación de ERK en respuesta a PGA₁. Con respecto al mecanismo de acción de estas proteínas, se ha visto que las proteínas Spred se asocian constitutivamente a Ras, pero esto no impide ni su activación, ni la traslocación a la membrana de Raf, por lo que la diana de acción debería estar por debajo de Raf (Bundschu et al., 2007). Además se ha descrito que la

sobreexpresión de estas proteínas tiene dos efectos; por un lado aumenta el tiempo que Raf queda retenido en la membrana y disminuye la fosforilación activadora de Raf (serina 338) (Wakioka et al., 2001) y por otro lado, también se ha propuesto que las proteínas Spred inhiben la activación de ERK, interfiriendo en la activación de Ras (King et al., 2005). Con respecto a las proteínas Sprouty, hemos visto que la sobreexpresión de Sprouty2 no reduce la activación de K-Ras ni tras la estimulación con FGF, ni con PGA_1 , con lo cual, pensamos que Sprouty2 inhibe la activación de ERK a un nivel inferior a Ras, probablemente interfiriendo en la activación de Raf (Garcia-Dominguez et al., 2011).

Basándonos en estos precedentes, realizamos un experimento para comprobar si, tanto las proteínas Spred como Sprouty2, tenían algún efecto sobre la fosforilación activadora de Raf (serina 338), bajo la estimulación tanto con factores de crecimiento (EGF), como de PGA_1 .

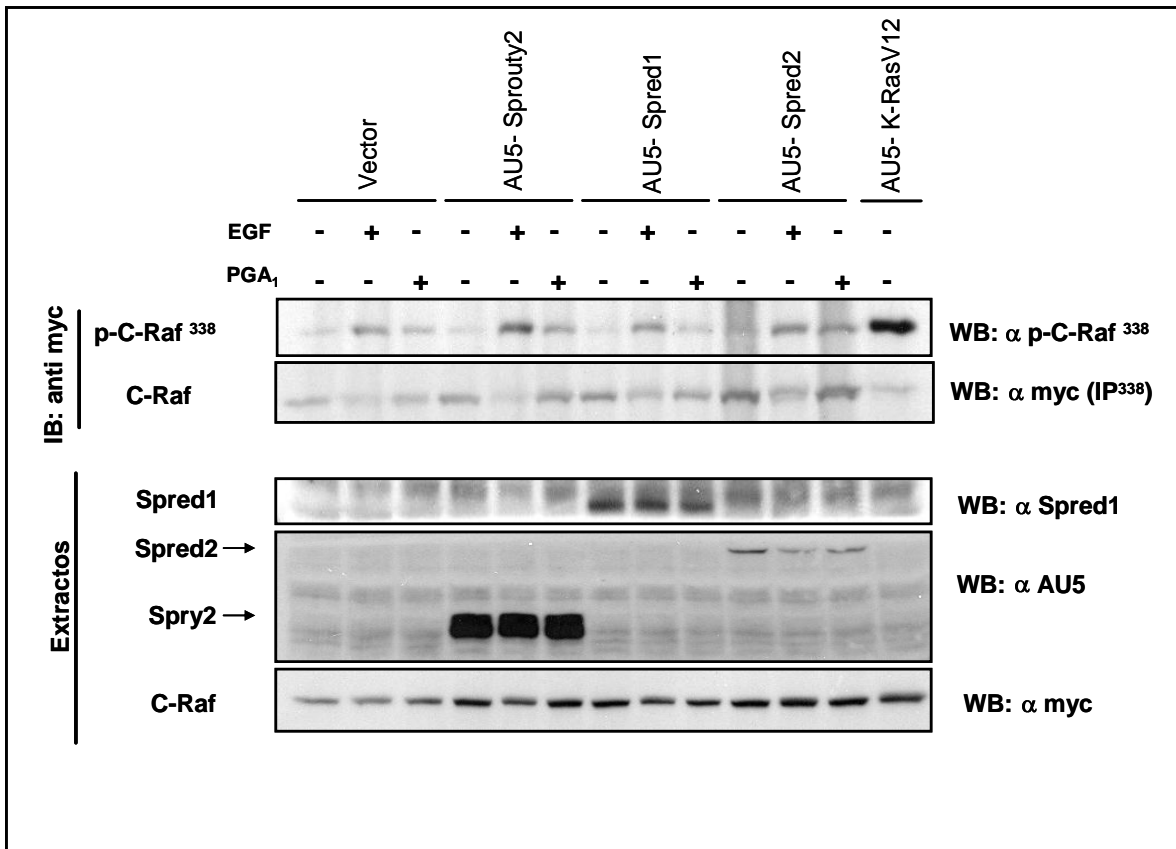


Figura 15: Spred1 y Spred2 no tienen ningún efecto sobre la fosforilación activadora de Raf. Células HeLa fueron co-transfectadas transitoriamente con los plásmidos para vector, Spred1, Spred2 o Sprouty2 y myc-C-Raf. 24h post-transfección, las células se dejaron en medio sin suero durante 18h y luego se incubaron (+) o no (-) durante 15 minutos con EGF y PGA_1 . Un décimo de los extractos celulares se utilizaron para detectar las proteínas AU5-Sprouty2, AU5-Spred1 y AU5-Spred2 y c-Raf, cuyos resultados se muestran en los paneles inferiores (Extractos). El resto de los extractos se inmunoprecipitaron siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos y se utilizaron para ver los niveles de p- C-Raf³³⁸ y C-Raf totales. La figura corresponde a un experimento representativo de tres totales, de resultados similares.

Como se puede observar en la Figura 15, ni Sprouty2, ni Spred, tuvieron ningún efecto sobre la fosforilación activadora de Raf, ni bajo condiciones de estimulación con EGF, ni con PGA_1 . Esto nos hace suponer que ambas proteínas podrían estar actuando en la vía, en un nivel posterior a la activación de Raf.

2 ANÁLISIS DE SPROUTY2 COMO POSIBLE DIANA DE $p38^{MAPK}$

Las proteínas $p38^{MAPK}$ son un grupo de quinasas que se activan por diferentes factores tales como, citoquinas inflamatorias (IL-1, TNF- α), factores de crecimiento (TGF- β , FGF), condiciones de estrés (luz ultravioleta, etc) o especies reactivas de oxígeno (ROS) (Wagner and Nebreda, 2009). Numerosos estudios se han centrado en el papel que tiene esta proteína en los procesos inflamatorios: regular la inducción de COX2 (Bachelor and Bowden, 2004; Xu and Shu, 2007); modular la producción de distintas citoquinas como TNF α , IL-1 o IL-6 (Kumar et al., 2003) mediante el control de factores de transcripción, como NF- κ B (Karin, 2006) o a nivel post-transcripcional, regulando la estabilidad del ARNm y su traducción a proteínas (Clark et al., 2003).

En el apartado anterior, hemos visto que Sprouty2 inhibe la activación de ERK en respuesta a distintos estímulos, algunos de ellos producidos en condiciones inflamatorias, como las prostaglandinas ciclopentenonas. Por otro lado resultados previos del laboratorio, demostraron que la sobreexpresión de Sprouty2 era capaz de activar el factor transcripcional NF- κ B, en cuya regulación se ha descrito que interviene $p38\alpha^{MAPK}$ (Tesis Carlota A. García Domínguez).

Sprouty2 es fosforilado, en respuesta a la estimulación con distintos factores de crecimiento, en residuos de tirosina (Fong et al., 2003; Hall et al., 2003; Rubin et al., 2003). También puede ser fosforilado en residuos de treonina por la quinasa DYRK1A tras la estimulación con FGF (Aranda et al., 2008). De igual modo, se ha visto que los niveles de Sprouty2 están sujetos a una regulación post-traducciona, que implica la fosforilación en distintos residuos de serina de las posiciones 112 y 121 mediada por la quinasa Mnk1 (DaSilva et al., 2006).

Ya que sabemos que Mnk1 es regulada directamente por ERK y por $p38^{MAPK}$, planteamos la posibilidad de que $p38\alpha^{MAPK}$ podía fosforilar directamente a Sprouty2. Para ello realizamos ensayos *in vitro* quinasa en los que, activando $p38\alpha^{MAPK}$ mediante

luz ultravioleta o MKK6, que es una MAPKK que activa directamente a $p38\alpha^{MAPK}$, en presencia o ausencia de el inhibidor SB203580 (específico de $p38\alpha/\beta$), comprobaríamos si esta enzima es capaz de fosforilar a Sprouty2.

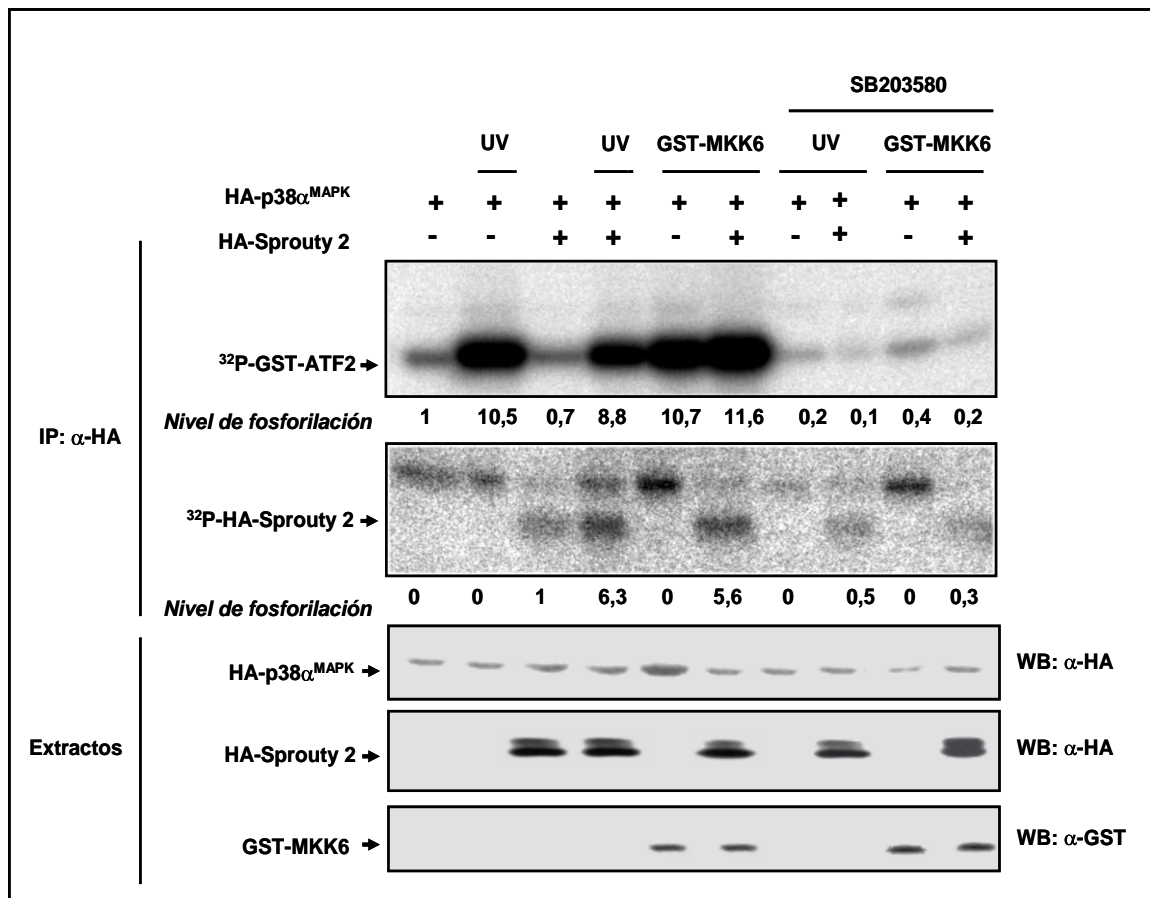


Figura 16: Sprouty2 se fosforila *in vitro* por acción de $p38\alpha^{MAPK}$. Células COS1 fueron transitoriamente transfectadas con pCEFL-KZ-HA- $p38\alpha^{MAPK}$, pCEFL-KZ-HA- Sprouty2 o ambos. Las células se pusieron en ayuno 2 horas antes de la estimulación con luz UV o co-transfectadas con GST-MKK6, para activar $p38\alpha^{MAPK}$. Las células fueron tratadas o no durante 1 hora con $10\mu M$ del inhibidor específico de $p38\alpha/\beta^{MAPK}$ (SB203580). Tras este tiempo las células fueron lisadas y los extractos se inmunoprecipitaron con anti-HA. Los inmunoprecipitados se usaron para realizar un ensayo *in vitro* quinasa. Aproximadamente un décimo del lisado celular se usó para ver los niveles de HA- $p38\alpha^{MAPK}$, HA-Sprouty2 o GSTMKK6. La cuantificación del nivel de fosforilación se realizó con Phosphorimager; normalizando los valores, en cada caso, respecto a los obtenidos con el correspondiente sustrato con $p38\alpha^{MAPK}$ en condiciones basales (S.D. <10%; n=5).

Los resultados obtenidos en este experimento (Figura 16), muestran que Sprouty2 se fosforila *in vitro* en presencia de $p38\alpha^{MAPK}$, tanto si está activada por luz UV, o por MKK6, lo cual nos estaría indicando, que esta fosforilación tenga lugar es dependiente de la activación específica de $p38\alpha^{MAPK}$. Además para apoyar esto, vemos que en presencia del inhibidor químico específico de $p38\alpha^{MAPK}$, SB203580, la fosforilación de Sprouty2 disminuye de manera notable.

La proteína p38 α ^{MAPK} posee en su estructura una secuencia conservada en todas las isoformas, TGY, que está localizada en el sitio de unión al ATP de la quinasa. Diversos trabajos han demostrado que la treonina de esta secuencia, que se encuentra en posición 106, juega un papel relevante en la sensibilidad a determinados inhibidores químicos (Alonso et al., 2000; Enslin et al., 1998). Otra forma de comprobar si esta fosforilación que veíamos en Sprouty2 se debía a la acción específica de p38 α ^{MAPK}, fue usar un mutante de la quinasa en el que se cambiaba el aminoácido en la posición 106, treonina por metionina. Este cambio no afecta a las propiedades de la quinasa, pero confiere a la proteína resistencia frente al inhibidor SB203580. Como se muestra en la Figura 17, la fosforilación de Sprouty2 por este mutante de p38 α ^{MAPK} sigue siendo evidente, tanto en presencia de MKK6, como de luz UV y como era de esperar, no se ve alterada por la presencia del inhibidor SB203580.

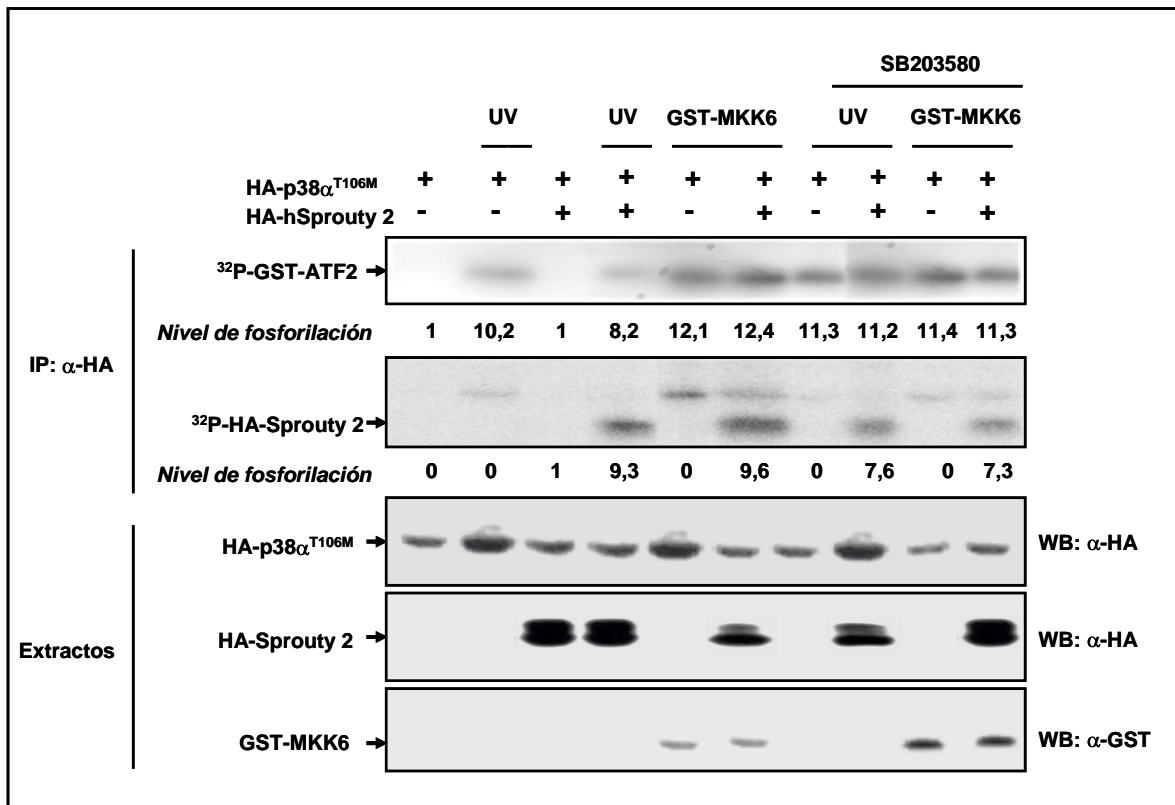


Figura 17 : Sprouty2 se fosforila *in vitro* por el mutante p38^{T106M}. Células COS1 se transfectaron con pCEFL-KZ-HA-p38 α ^{T106M}, pCEFL-KZ-HA-Sprouty 2 o ambas. El ensayo se realizó de la misma manera que se ha indicado en la figura 16. La cuantificación del nivel de fosforilación se realizó con Phosphorimager, normalizando los valores en cada caso, respecto a los obtenidos con el respectivo sustrato, con p38 α ^{T106M} en condiciones basales (S.D. <10%; n=5).

Además de las serinas fosforiladas por Mnk1 (DaSilva et al., 2006), pensamos que otras serinas podrían estar siendo fosforiladas por p38 α ^{MAPK} y para comprobarlo realizamos una serie de construcciones de distintas regiones de Sprouty2 (Figura 18A)

con las que diseñamos nuevamente, ensayos de fosforilación *in vitro*. Como se puede apreciar en la figura 18B, la delección de los primeros 114 aminoácidos de Sprouty2 es suficiente para abolir la fosforilación de la proteína.

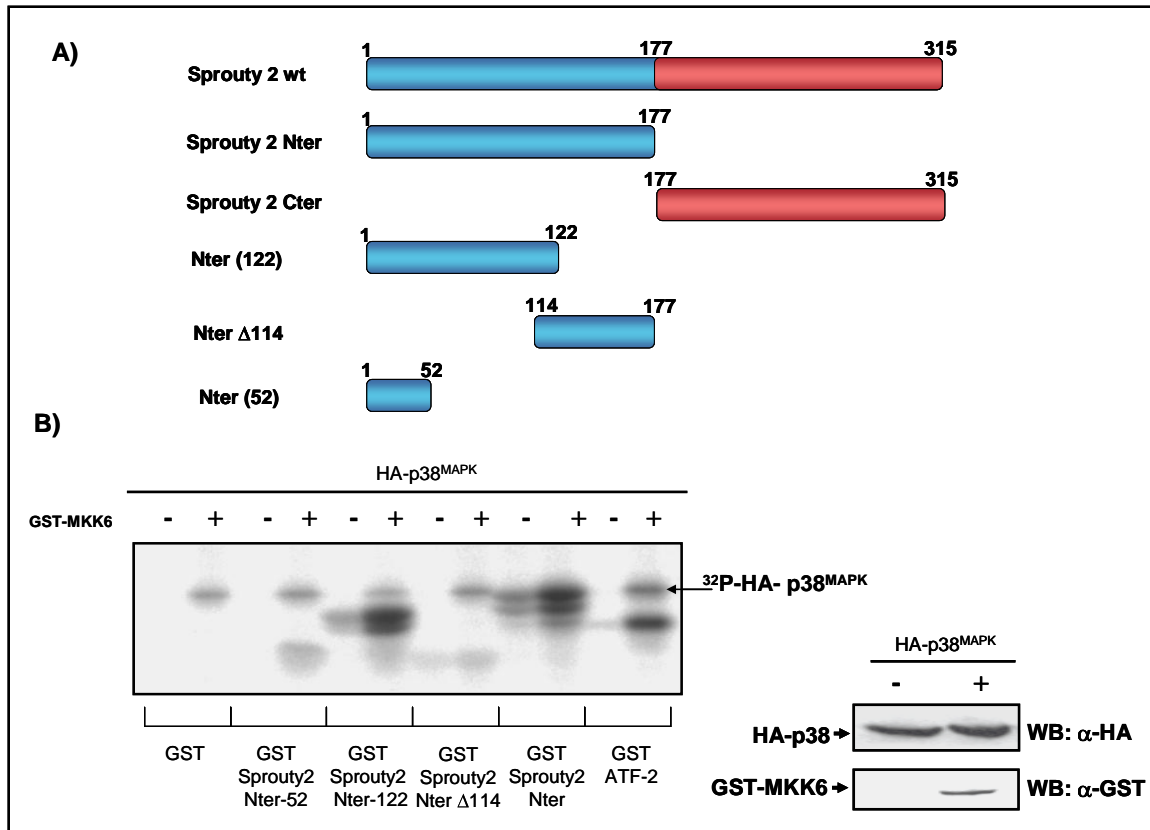


Figura 18: p38 α ^{MAPK} fosforila a Sprouty2 en los primeros 114 aminoácidos. A) Diagrama de las distintas construcciones utilizadas de Sprouty2. B) Se transfectaron células COS1 con las construcciones GST-MKK6 y pCEFL-KZ-HA-p38^{MAPK}. 24 horas post- transfección se lisaron las células y este lisado fue inmunoprecipitado con anticuerpo α -HA. Las construcciones empleadas, fueron expresados como proteínas de fusión con GST en *E.coli* y posteriormente usadas como sustrato en la realización de ensayos *in vitro* quinasa (detallado en el apartado de Materiales y Métodos). La figura corresponde a un experimento representativo de otros tres de resultados similares.

Una vez que identificamos la zona de Sprouty2 donde podían encontrarse los residuos fosforilados por p38 α ^{MAPK}, comenzamos a hacer una serie de mutantes de delección para las serinas que había en esta región. Una vez generados, se fusionaron a GST para su expresión en bacterias *E.coli* y posterior purificación (Figura 19).

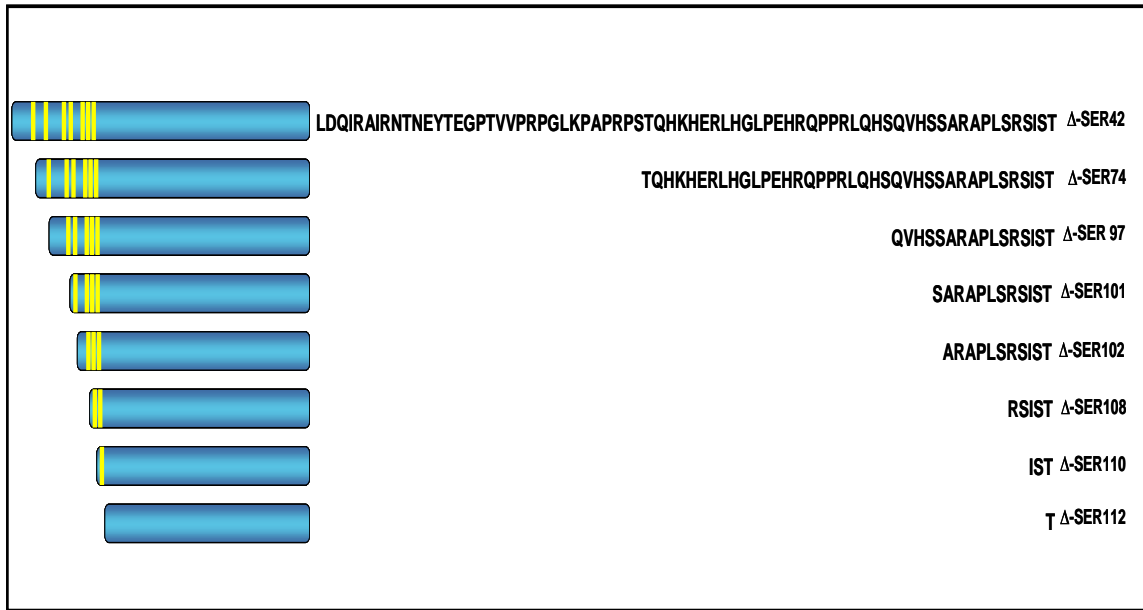


Figura 19: Diagrama de los distintos mutantes de delección de Sprouty2 empleados.

Con estos mutantes realizamos un ensayo *in vitro* quinasa, empleando dichos mutantes como sustrato, en el cual, pudimos comprobar que la fosforilación de Sprouty2 desaparece drásticamente a partir de la delección de la serina 108, pues los mutantes generados a partir de la delección de este residuo, no se fosforilan (Figura 20).

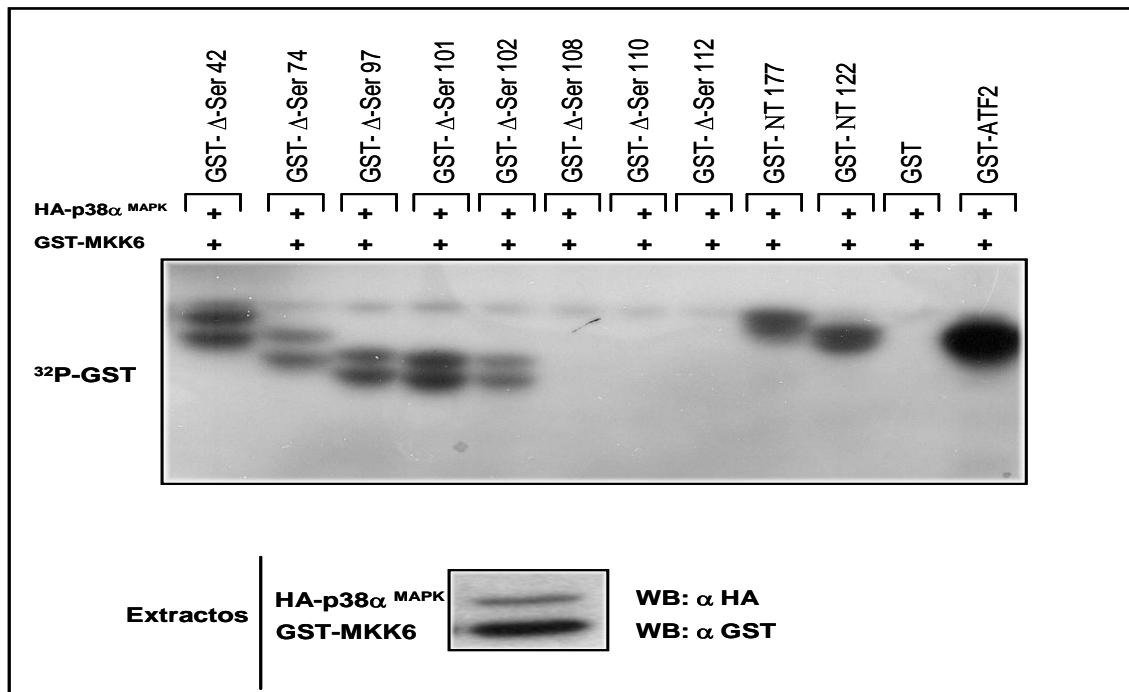


Figura 20: Identificación, por mutantes puntuales, de la región de Sprouty2 fosforilada por p38 α MAPK. Se transfectaron células COS1 con las construcciones GST-MKK6 y pCEFL-KZ-HA- p38 α MAPK. 24 horas post- transfección se lisaron las células y este lisado fue inmunoprecipitado con anticuerpo α -HA. Los mutantes empleados, fueron expresados como proteínas de fusión con GST en *E.coli* y posteriormente usados como sustrato en la realización de ensayos *in vitro* quinasa (detallado en el apartado de Materiales y Métodos).

Para corroborar cual de estos residuos se fosforilaba por $p38\alpha^{MAPK}$ se generaron mutantes puntuales de la región amino terminal de Sprouty2. Estos mutantes se hicieron sustituyendo, el aminoácido serina por alanina. Se fusionaron a GST para su expresión en *E. coli* y tras posterior purificación, se emplearon como sustratos de $p38\alpha^{MAPK}$ en un ensayo de fosforilación *in vitro*.

Como se puede observar en la Figura 21, la mutación de la serina 108 parece no afectar para nada a la fosforilación de Sprouty2. Sin embargo, ésta se ve disminuida en el caso de la serina 110 y mucho más en el mutante de la serina 112.

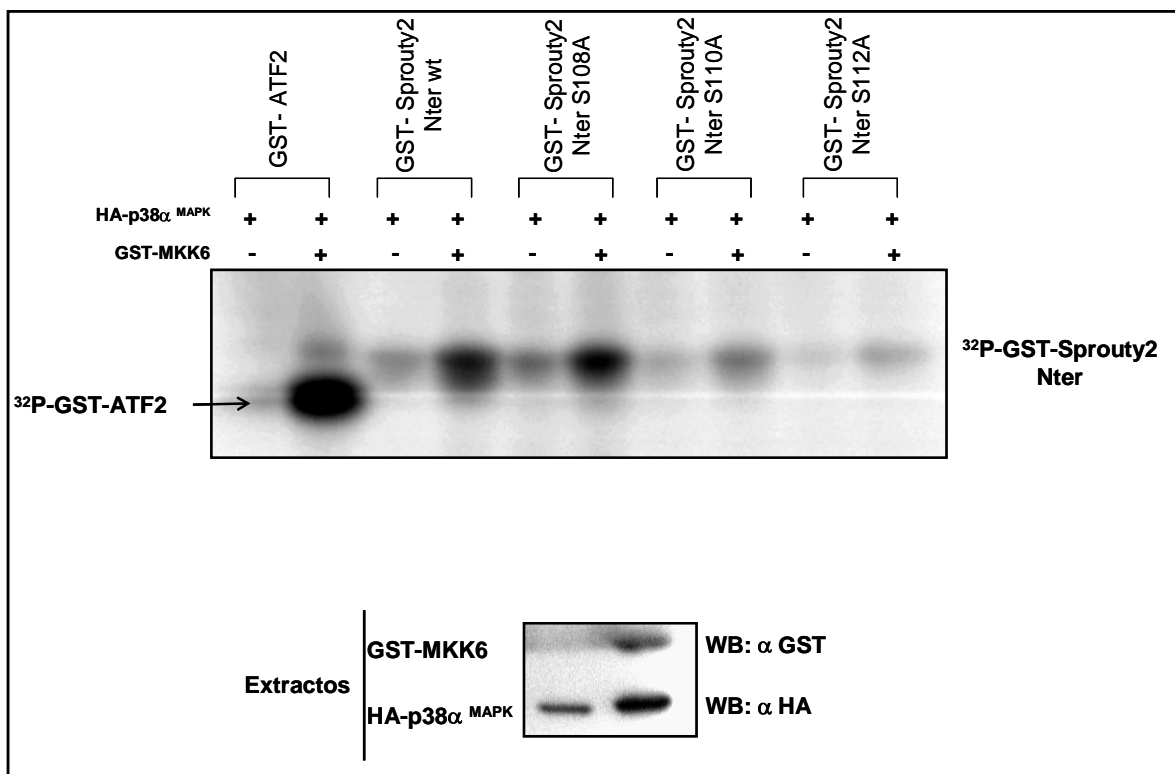


Figura 21: La serinas 110 y 112 de Sprouty2 son fosforiladas *in vitro* por $p38\alpha^{MAPK}$. Células Cos1 fueron transitoriamente transfectadas con las construcciones GST-MKK6 y pCEFL-KZ-HA-p38. 24 horas post-transfección se lisaron las células y este lisado fue inmunoprecipitado con anticuerpo α -HA. Los mutantes de delección empleados, fueron expresados como proteínas de fusión con GST en *E. coli* y posteriormente usadas como sustrato en la realización de ensayos *in vitro* quinasa (detallado en el apartado de Materiales y Métodos). La figura corresponde a un experimento representativo de otros tres de resultados similares.

Por otro lado estos mismos mutantes se emplearon como sustrato de $p38\alpha^{MAPK}$ en un ensayo *in vitro* quinasa en un contexto de proteína Sprouty2 completa. En este caso, el ensayo se realizó con las proteínas Sprouty2 inmunoprecipitadas (Figura 22) observando que, aunque hay disminución de la fosforilación en el mutante Sprouty2 S110A, y algo más en el doble mutante Sprouty2 S108A-S110A, la reducción más acusada se produce con Sprouty2 S112A. Estos datos parecen indicar que es la

serina en posición 112, el residuo objeto de fosforilación. La notable reducción de la fosforilación en las construcciones mutantes Sprouty2 S110A y Sprouty2 S108A-S110A nos induce a pensar que dichos residuos serían necesarios para que la fosforilación tenga lugar, y que podrían constituir parte del sitio de unión de la quinasa a Sprouty2.

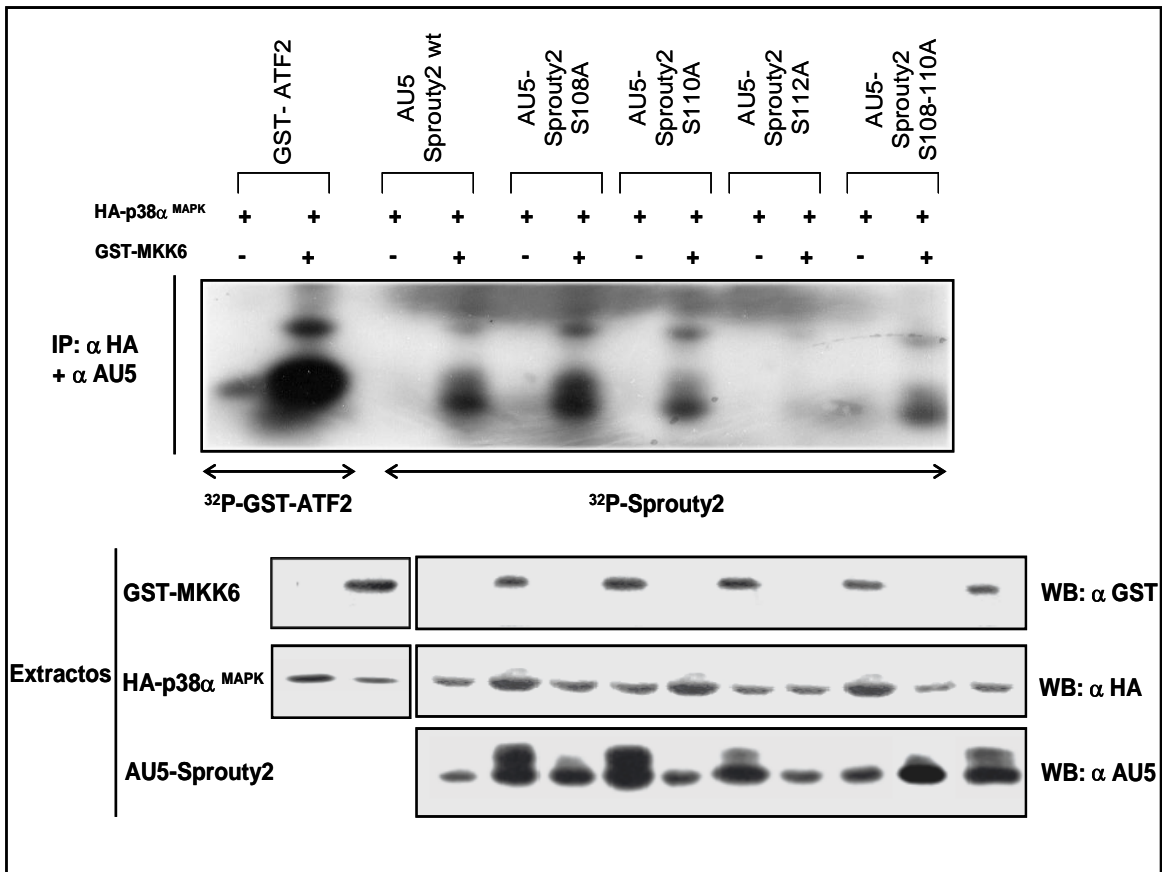


Figura 22: La serina 112 de Sprouty2 es fosforilada *in vitro* por p38 α MAPK. Células Cos1 fueron transitoriamente cotransfectadas con mutantes puntuales de AU5-Sprouty2 en las serinas S108A, S110A, S112A, el doble mutante S108A-S110A y pCEFL-KZ-HA-p38 α MAPK, en presencia o no de GST-MKK6. 24 horas post-transfección se lisaron las células y estos lisados fueron inmunoprecipitados con los anticuerpos α -AU5 y α -HA y usados posteriormente en un ensayo *in vitro* quinasa. En ambos casos, las figuras corresponden a un experimento representativo de otros tres de resultados similares.

Los datos publicados hasta la fecha, afirmaban que las serinas de las posiciones 112 y 121 eran fosforiladas por la quinasa Mnk1 (DaSilva et al., 2006). Dado que nuestros resultados nos indicaban que el residuo diana de la fosforilación por acción de la activación de p38 α MAPK era la serina de la posición 112, quisimos comprobar, en nuestras manos, como se fosforilaban además del mutante Sprouty2 Nter S112A, y el mutante Sprouty2 Nter S121A, el doble mutante Sprouty2 Nter S112A-S121A. Para ello, diseñamos ensayos de fosforilación *in vitro*, en los que además de usar las construcciones antes mencionadas, utilizamos también dos fragmentos de Sprouty2

que comprendían los aminoácidos 50-119, tanto en su versión salvaje, como con la serina de la posición 112 mutada a alanina (Figura 23). Podemos observar cómo mientras la construcción GST-Sprouty2 50-119 parece fosforilarse correctamente, la versión mutada en la serina 112 es suficiente para abolir totalmente dicha fosforilación. Nuevamente podemos ver que el mutante GST-Sprouty2 Nter S112A no se fosforila. En contra de lo que cabría esperar, no observamos reducción de la fosforilación en el mutante GST-Sprouty Nter S121A y si lo vemos en el doble mutante GST-Sprouty2 Nter S112/121A.

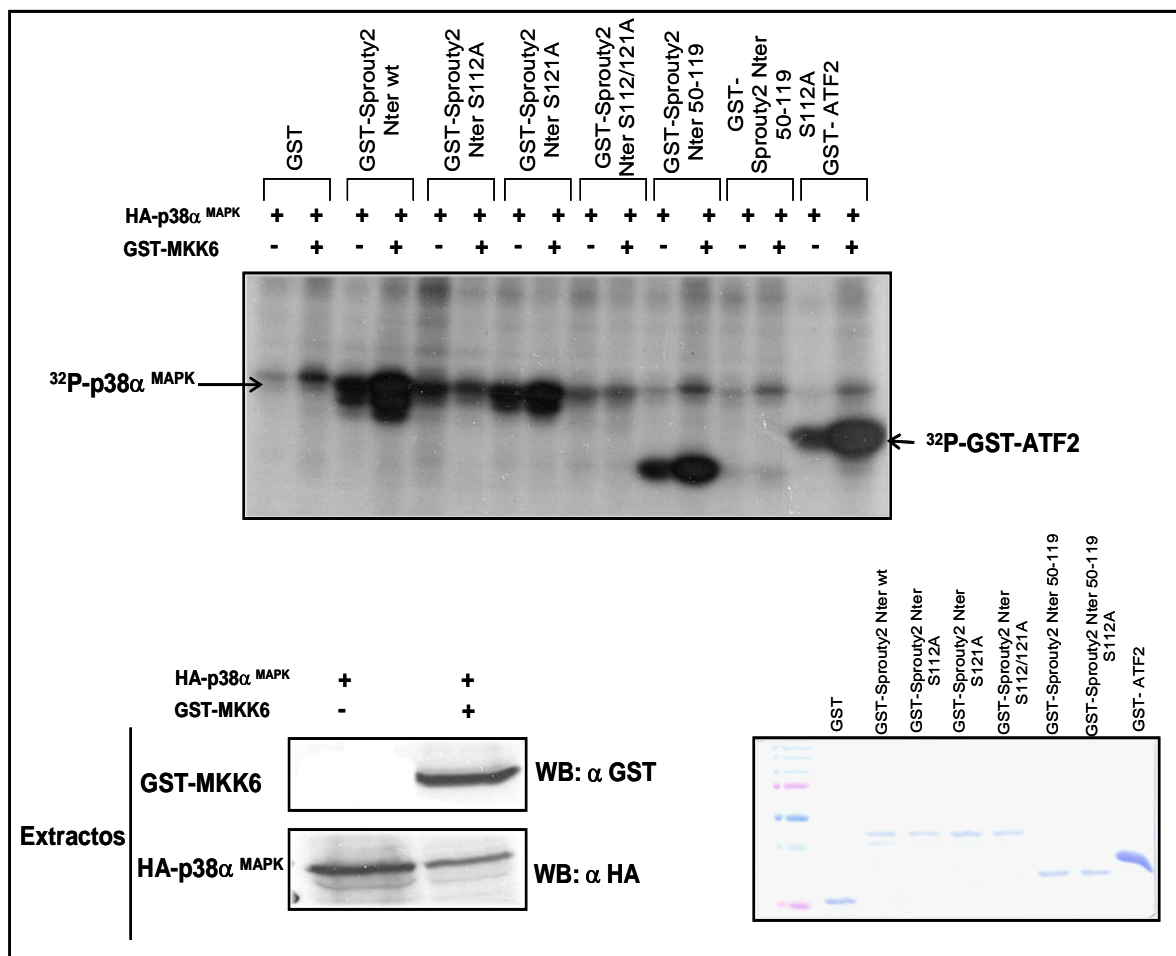


Figura 23: Sólo la serina 112 de Sprouty2 es fosforilada por acción de p38α^{MAPK}. Se transfectaron células 293T con la construcción y pCEFL-KZ-HA-p38α^{MAPK} en presencia o no de GST-MKK6. 24 horas post- transfección se lisaron las células y este lisado fue inmunoprecipitado con anticuerpo anti α-HA. Los mutantes puntuales empleados, fueron expresados como proteínas fusionadas a GST, en bacterias *E.coli* y posteriormente usadas como sustrato en la realización de ensayos *in vitro* quinasa (detallado en el apartado de Materiales y Métodos).

Para corroborar que es la serina de la posición 112 el residuo fosforilable por p38α^{MAPK}, diseñamos un experimento de fosforilación *in vivo*, en el que pudimos confirmar una vez más, que el cambio de la serina en posición 112 por alanina, da

lugar a una proteína que no se fosforila por acción de la activación de $p38\alpha^{MAPK}$ (Figura 24).

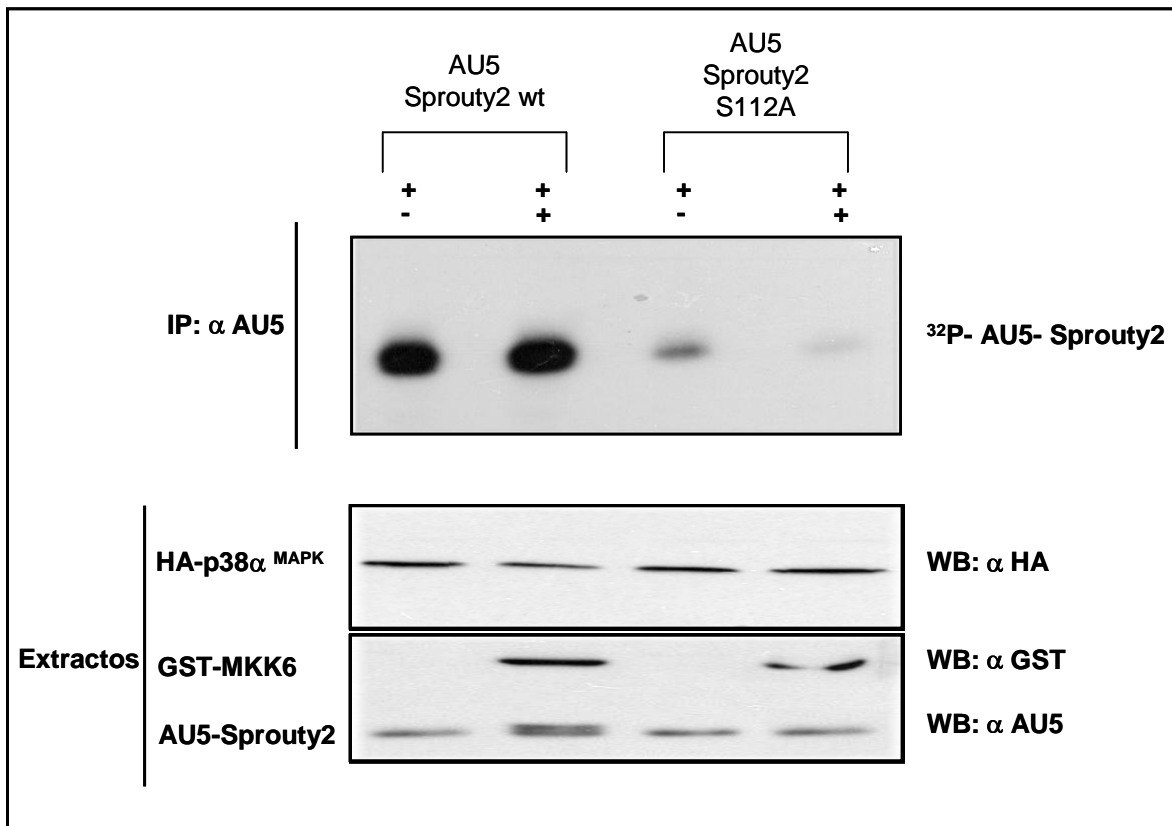


Figura 24: Fosforilación *in vivo* de Sprouty2 por $p38\alpha^{MAPK}$. Se transfecaron células 293T con las construcciones pCEFL-KZ-HA- $p38\alpha^{MAPK}$, pCEFL-KZ-HA-Sprouty2 y pCEFL-KZ-HA-Sprouty2 S112A respectivamente, en presencia (+) o no (-) de GST-MKK6 y se llevó a cabo un ensayo de fosforilación *in vivo* siguiendo el procedimiento descrito en "Materiales y Métodos".

Los resultados obtenidos hasta el momento, parecían indicar que era el residuo de la posición 112 y no el de la 121, la serina diana de dicha fosforilación al menos por $p38\alpha^{MAPK}$. Con el fin de averiguar si esta fosforilación era realizada directamente por $p38\alpha^{MAPK}$, realizamos ensayos de fosforilación *in vitro*, pero esta vez empleamos proteína $p38\alpha^{MAPK}$ purificada de bacteria y lo hicimos a distintas dosis. Empleamos como sustrato las proteínas expresadas en bacterias, GST-Sprouty2 59-119 wt y GST-Sprouty2 59-119 S112A (Figura 25B), Como se puede observar en la Figura 25A, el mutante de Sprouty2 59-119 S112A no se fosforila, al contrario de lo que se puede apreciar con la construcción de Sprouty2 59-119. Estos datos también son apreciables en la cuantificación realizada (Figura 25C).

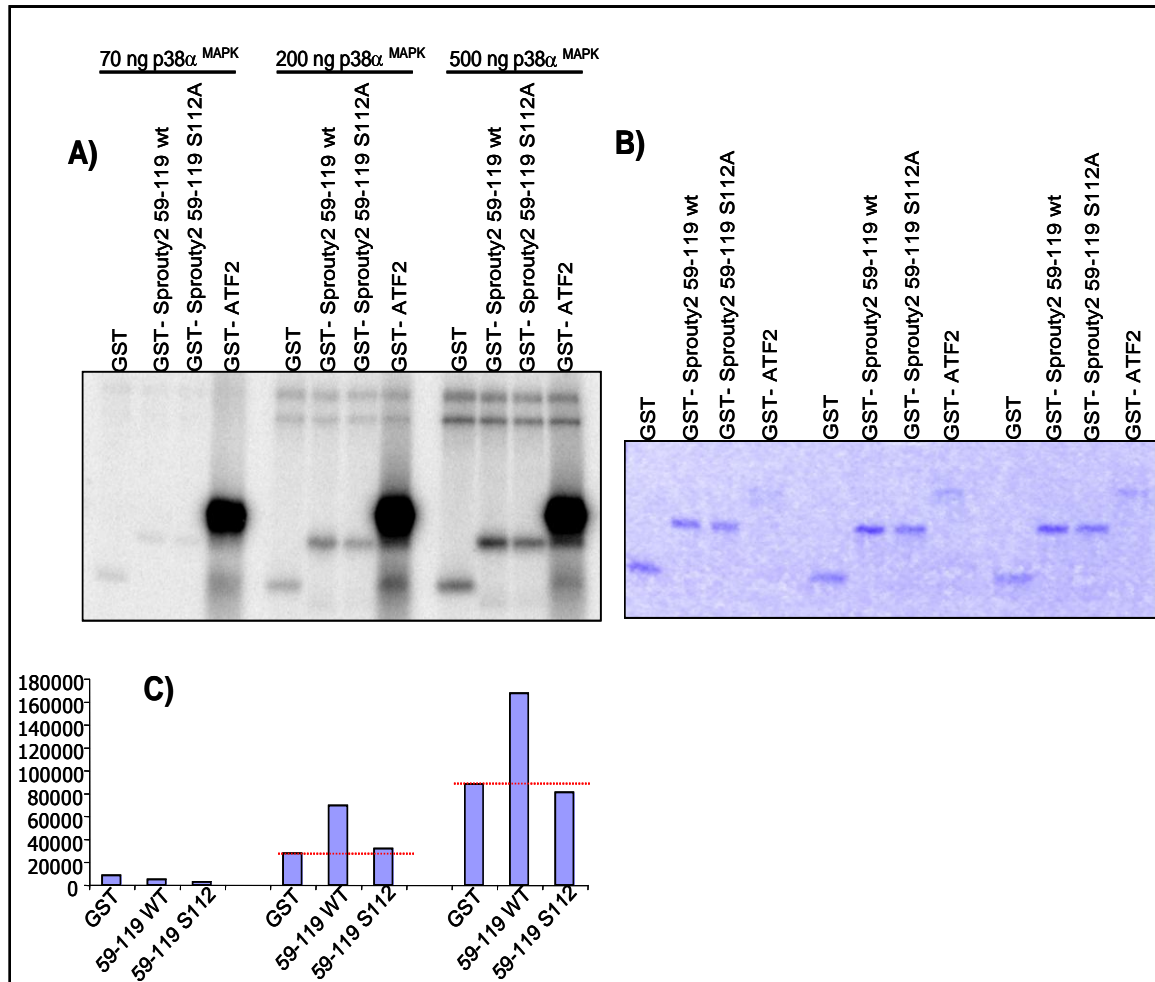


Figura 25: Fosforilación *in vitro* de Sprouty2 por p38 α MAPK A) Las proteínas indicadas se utilizaron como sustrato de la proteína purificada en bacterias *E.coli* GST-p38 α MAPK a distintas concentraciones (70ng, 200ng y 500ng). B) Ponceau que muestra las proteínas fusionadas a GST y expresadas en bacterias *E.coli* que se usaron como sustrato a una concentración de 1 μ g por punto en el ensayo. La realización del ensayo de fosforilación *in vitro* se realizó siguiendo el proceso detallado en “Materiales y Métodos”. C) La cuantificación del proceso se hizo empleando el Phosphorimager; normalizando los valores, en cada caso respecto a los obtenidos con el correspondiente sustrato con p38 α MAPK en condiciones basales.

Los resultados obtenidos mediante la realización de ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*, parecen indicar que la serina de la posición 112 de Sprouty2 es fosforilada directamente por p38 α MAPK. No obstante, esta serina no forma parte del sitio consenso clásico descrito para p38 α MAPK y otras MAP quinasas (Pouysseur et al., 2002). Por todo esto, nos planteamos la posibilidad de que otro tipo de serina-treonina quinasas puedan estar fosforilando esa región, como lo hace p38 α MAPK.

3 ANÁLISIS DE SPROUTY2 COMO POSIBLE DIANA DE OTRAS SERINA-TREONINA QUINASAS

En la búsqueda de otras quinasas que pudieran estar actuando sobre Sprouty2, comprobamos que la serina de la posición 112, forma parte de una de las tres secuencias consenso de fosforilación para la serina treonina quinasa PKC μ (PKD), que existen en Sprouty2. PKD es una quinasa perteneciente a la familia de las PKC noveles, cuya activación es independiente de calcio, pero dependiente de ésteres de forbol y diacilglicerol (Mellor and Parker, 1998; Newton, 1997; Toker, 1998). PKD fosforila a sus sustratos en serina cuando ésta forma parte de la secuencia "LXXXXS" (Blom et al., 1999). En el caso de Sprouty2, dichas secuencias son "LSRSIS¹¹²", "LGSSFS¹⁴¹" y "LFYHCS²³⁰". En primer lugar comprobamos si Sprouty2 y PKD se encontraban localizadas en el mismo compartimento celular. Para ello, realizamos ensayos de inmunofluorescencia. Como se muestra en la Figura 26, existe colocalización celular entre ambas proteínas.

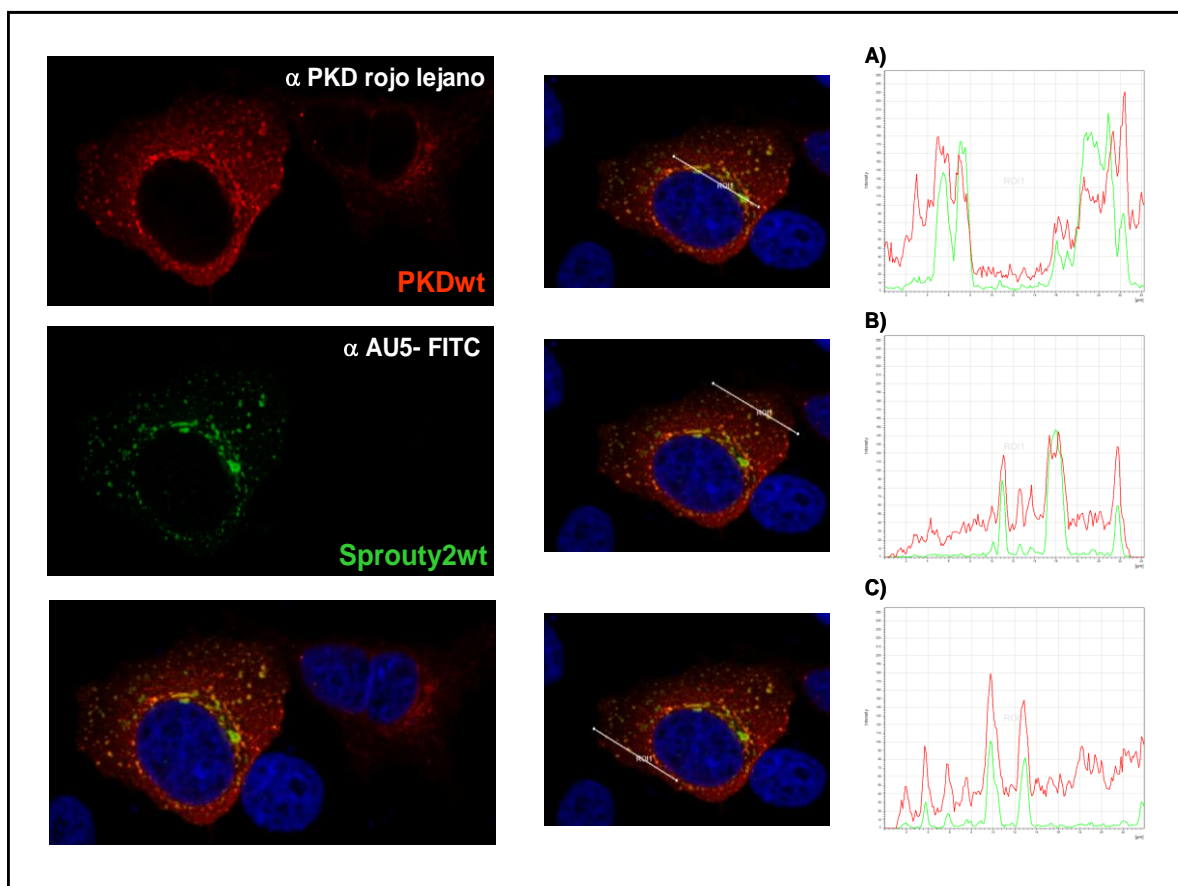


Figura 26: Sprouty2 colocaliza con PKD wt. Co-inmunofluorescencias de Sprouty 2 wt y PKD wt sobreexpresadas en células 293T. La proteína Sprouty2 wt aparece en verde y los núcleos se tiñeron de DAPI (azul) y la proteína PKD wt aparece en rojo. Los paneles A), B) y C) muestran distintos perfiles de localización. La inmunofluorescencia se realizó siguiendo el proceso detallado en "Materiales y Métodos".

Una vez comprobado que su localización celular es la misma, analizamos la posible interacción física de estas dos proteínas mediante ensayos de coimmunoprecipitación. En ellos llevamos en paralelo a Sprouty2, el mutante Sprouty2 Y55F dominante negativo, (Sasaki et al., 2001), y el mutante Sprouty2 S112A, que tiene alterado un posible sitio de fosforilación por PKD. Pudimos observar que las tres formas de Sprouty2 se unen a PKD (Figura 27).

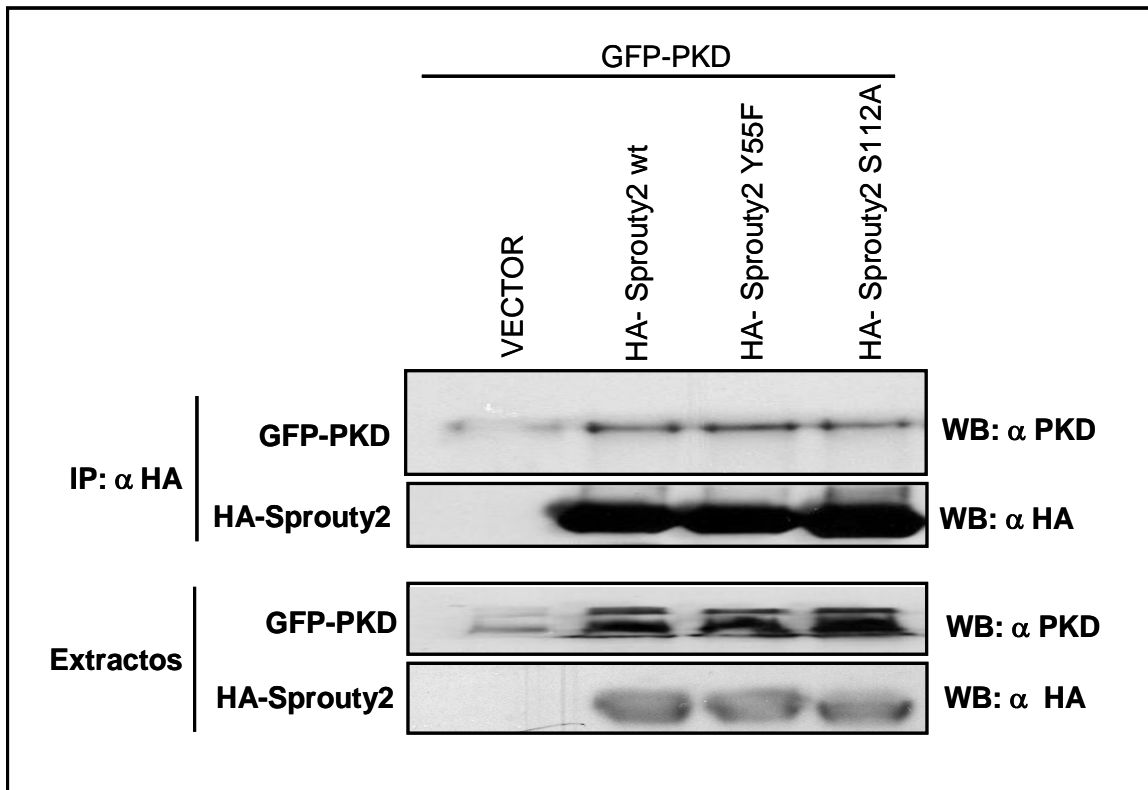


Figura 27: Sprouty2 se une a PKD. Células 293T fueron transfectadas con GFP-PKD, vector (pCEFL-KZ-HA), pCEFL-KZ-HA-Sprouty2 wt, pCEFL-KZ-HA-Sprouty2 Y55F y pCEFL-KZ-HA-Sprouty2 S112A y se realizaron ensayos de coimmunoprecipitación siguiendo el procedimiento detallado en "Materiales y Métodos" Esta figura corresponde a un experimento representativo de otros tres de resultados similares.

Nuestro siguiente objetivo fue realizar una serie de ensayos de fosforilación *in vitro* en los que, se empleó una forma constitutivamente activa de PKD, así como un mutante inactivo de PKD. Los resultados obtenidos muestran que PKD constitutivamente activa fosforila a Sprouty2 y como era de esperar, no lo hace la forma inactiva. (Figura 28).

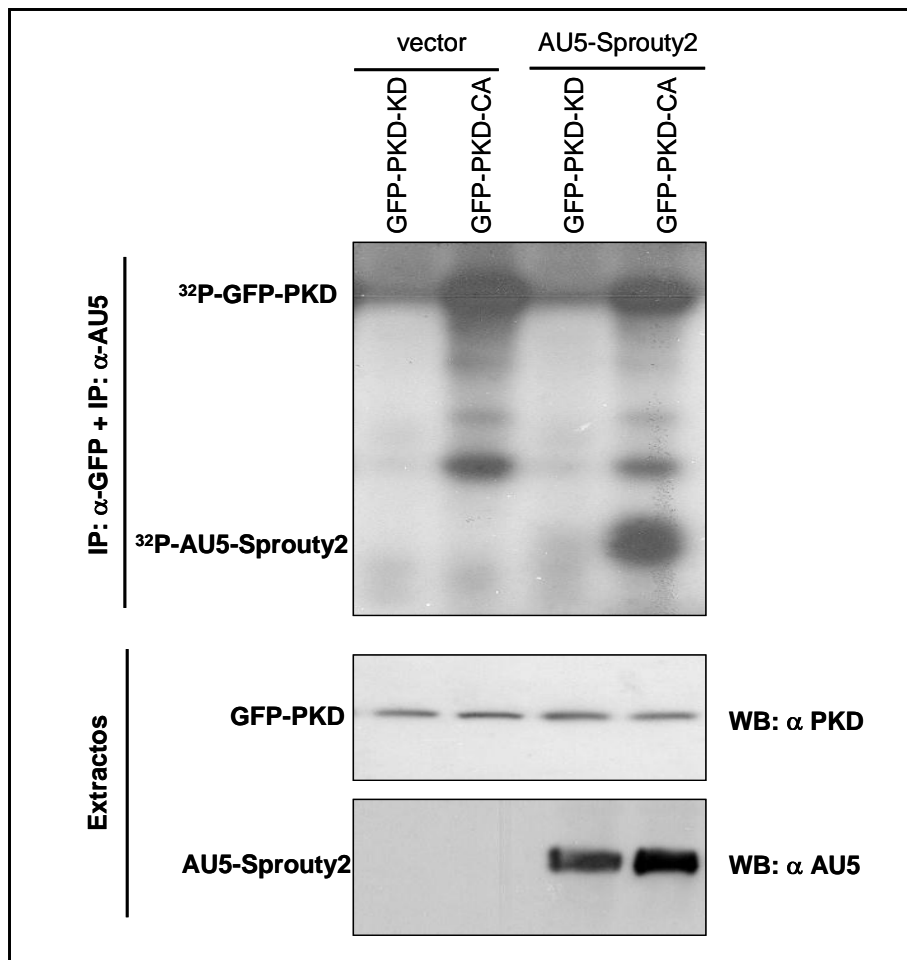


Figura 28: PKD fosforila *in vitro* a Sprouty2. Células 293T fueron transitoriamente cotransfectadas con GFP-PKD constitutivamente activa o GFP-PKD mutante inactivo (KD), vector y pCEFL-KZ-AU5-Sprouty2 respectivamente. 24 horas post-transfección se lisaron las células y estos lisados fueron inmunoprecipitados con los anticuerpos anti α -GFP y anti α -AU5 y usados posteriormente en un ensayo de fosforilación *in vitro*. Est figura corresponde a un experimento representativo de otros tres, con resultados similares.

A la vista de los resultados anteriores, comprobamos si el residuo en posición 112, que previamente hemos mostrado que es el sitio de fosforilación por $p38\alpha^{MAPK}$ y que además, pertenece a una de las tres secuencias consenso de fosforilación por PKD que tiene Sprouty2, era diana de PKD. Para ello realizamos un ensayo de fosforilación *in vitro*. Como se muestra en la Figura 29, la mutación de la serina 112 impide completamente la fosforilación de Sprouty2 por PKD. Para identificar la región de Sprouty2 implicada en la interacción con PKD, realizamos ensayos de coimmunoprecipitación, empleando las construcciones de la región amino (aminoácido 1-177) y carboxilo (aminoácido 177-323) de Sprouty2. Los resultados muestran que la interacción ocurre a través de la región carboxilo terminal de Sprouty2 (Figura 30).

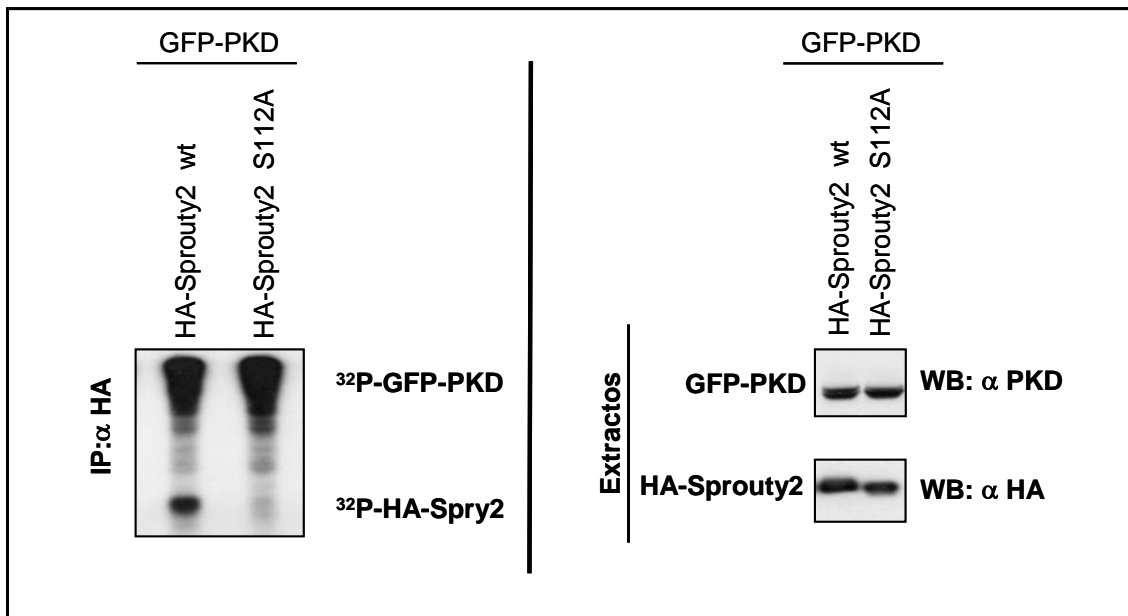


Figura 29: PKD fosforila *in vitro* a Sprouty2 en la serina 112. Se transfectaron células 293T con las construcciones GFP-PKD, pCEFL-KZ-HA-Sprouty2 wt y pCEFL-KZ-HA-Sprouty2 S112A respectivamente y se llevó a cabo un ensayo de fosforilación *in vitro* siguiendo el procedimiento descrito en "Materiales y Métodos".

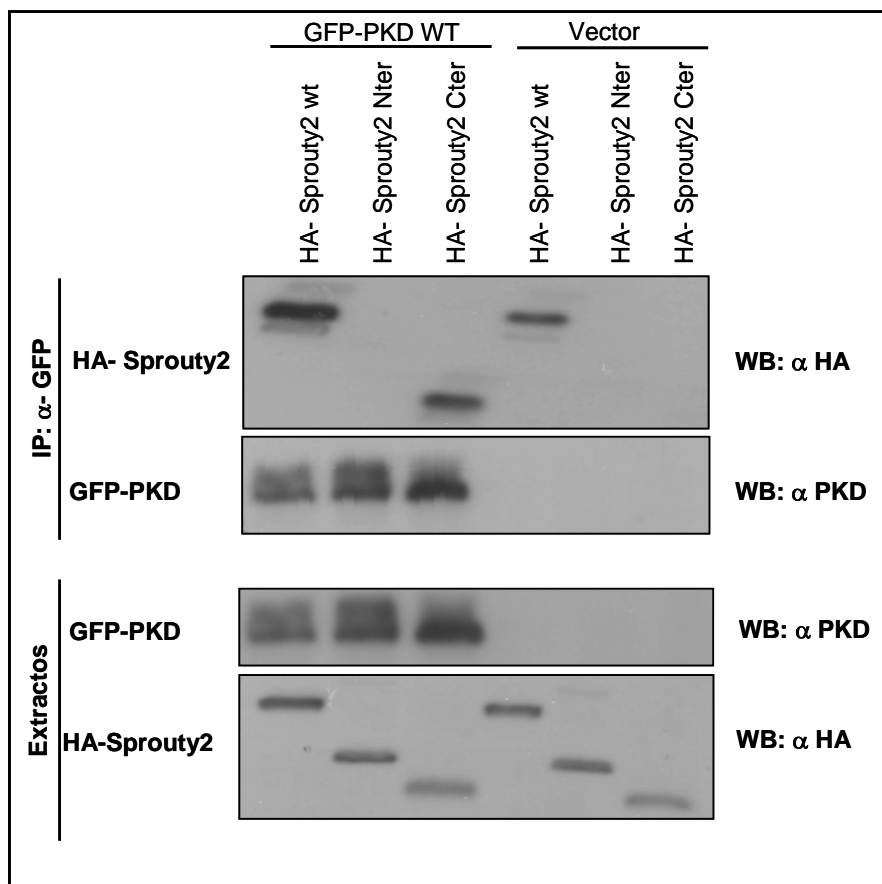


Figura 30: Sprouty2 se une a PKD por su región carboxilo terminal. Células 293T fueron transfectadas con GFP-PKD, pCEFL-KZ-HA-Sprouty2 wt, pCEFL-KZ-HA-Sprouty2 NTerminal y pCEFL-KZ-HA-Sprouty2 CTerminal y se realizaron ensayos de coimmunoprecipitación siguiendo el procedimiento detallado en "Materiales y Métodos". La figura corresponde a un experimento representativo de otros tres de resultados similares.

Para identificar que regiones de PKD interaccionan con Sprouty2, se realizaron ensayos de unión *in vitro*, en los que utilizamos diferentes construcciones truncadas de PKD: un mutante que contiene sólo la región quinasa (PKD dominio quinasa), un mutante de delección del dominio PH (PKD Δ PH), un mutante de delección de las regiones CRD (PKD Δ CRD), un mutante de delección para el dominio quinasa (PKD Δ quinasa) y un mutante en el que se han eliminado el aminoácido 1 al 321 (PKD Δ 1-321) (Figura 31).

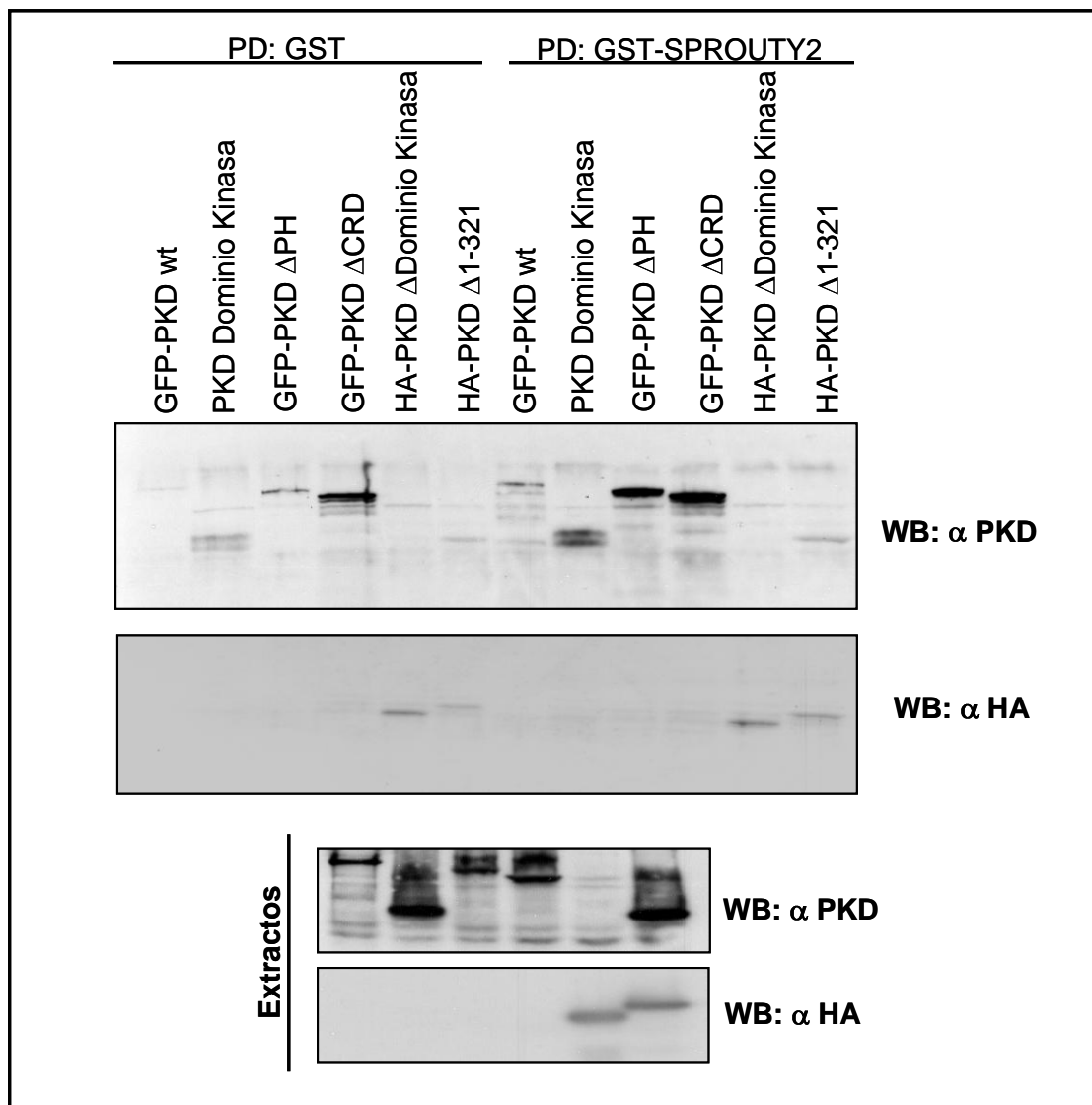


Figura 31: Unión de Sprouty2 a distintas regiones de PKD. Células 293T fueron transfectadas con GFP-PKD wt, GFP-PKD Δ PH, GFP-PKD Δ CRD, PKD-Dominio Quinasa, HA-PKD Δ Quinasa y HA-PKD Δ 1-321 y se incubaron con GST y GST-Sprouty2 respectivamente siguiendo el procedimiento detallado en "Materiales y Métodos"

A partir de los resultados obtenidos y que se muestran en la Figura 31, no podemos identificar una única región de unión de PKD con Sprouty2. Los mutantes que muestran una menor interacción con Sprouty2 son PKD Δ 1-321 y PKD Δ Dominio

quinasa. Esto parece indicar que son las regiones amino terminal y el dominio quinasa de PKD, las implicadas en la unión.

Para confirmar los datos obtenidos anteriormente, realizamos ensayos de co-localización con los mutantes de PKD que habían mostrado una menor interacción con Sprouty2 en el experimento anterior; PKD Δ 1-321 (Figura 32) y PKD Δ Dominio quinasa (Figura 34).

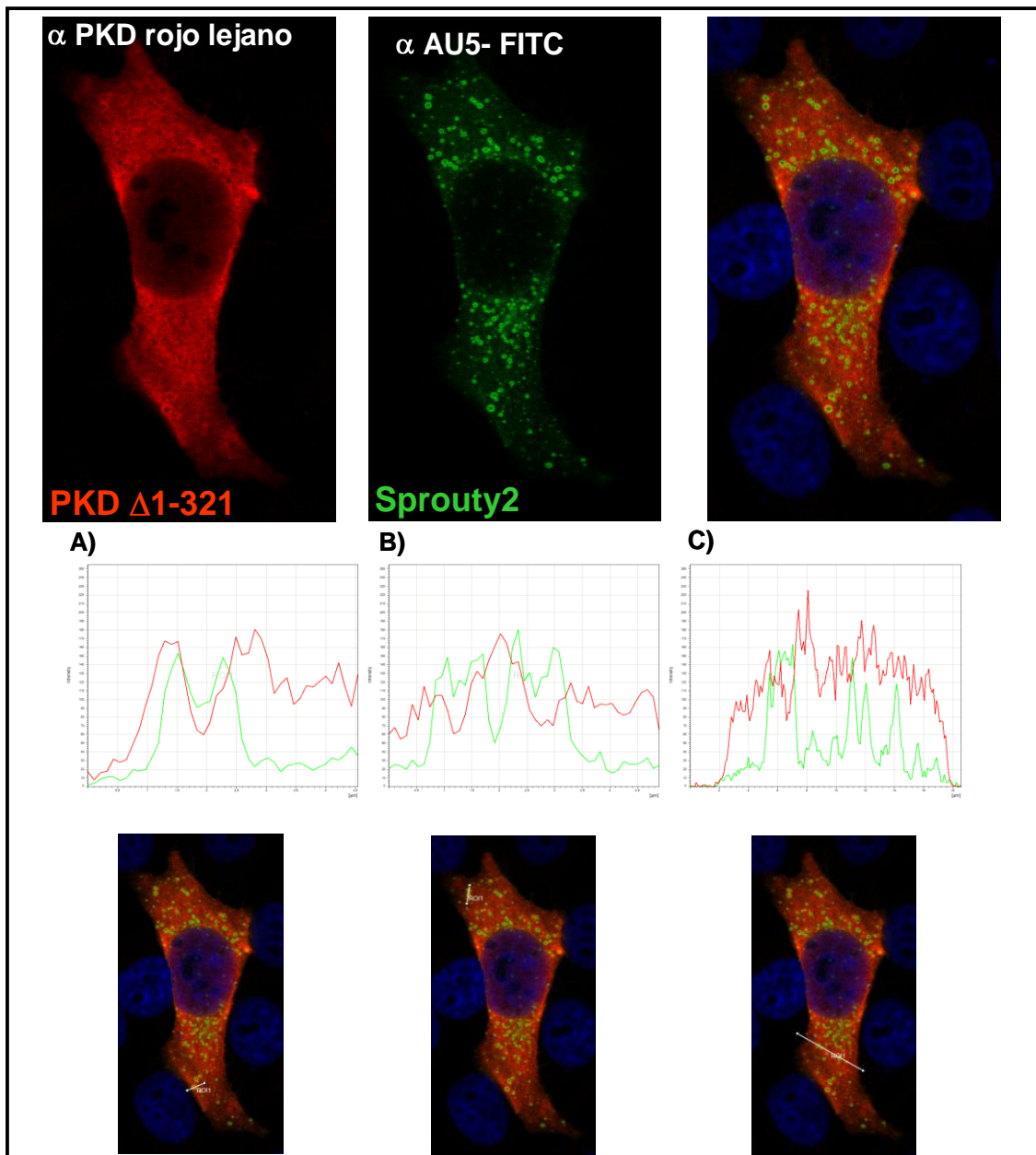


Figura 32. Sprouty2 no colocaliza con PKD Δ 1-321. Co-inmunofluorescencias de Sprouty2 wt y PKD Δ 1-321 sobreexpresados en células 293T. La proteína Sprouty2 wt aparece en verde y los núcleos se tiñeron de DAPI (azul) y la proteína PKD Δ 1-321 aparece en rojo. Los paneles A), B) y C) muestran distintos perfiles de localización. La inmunofluorescencia se realizó siguiendo el proceso detallado en “Materiales y Métodos”.

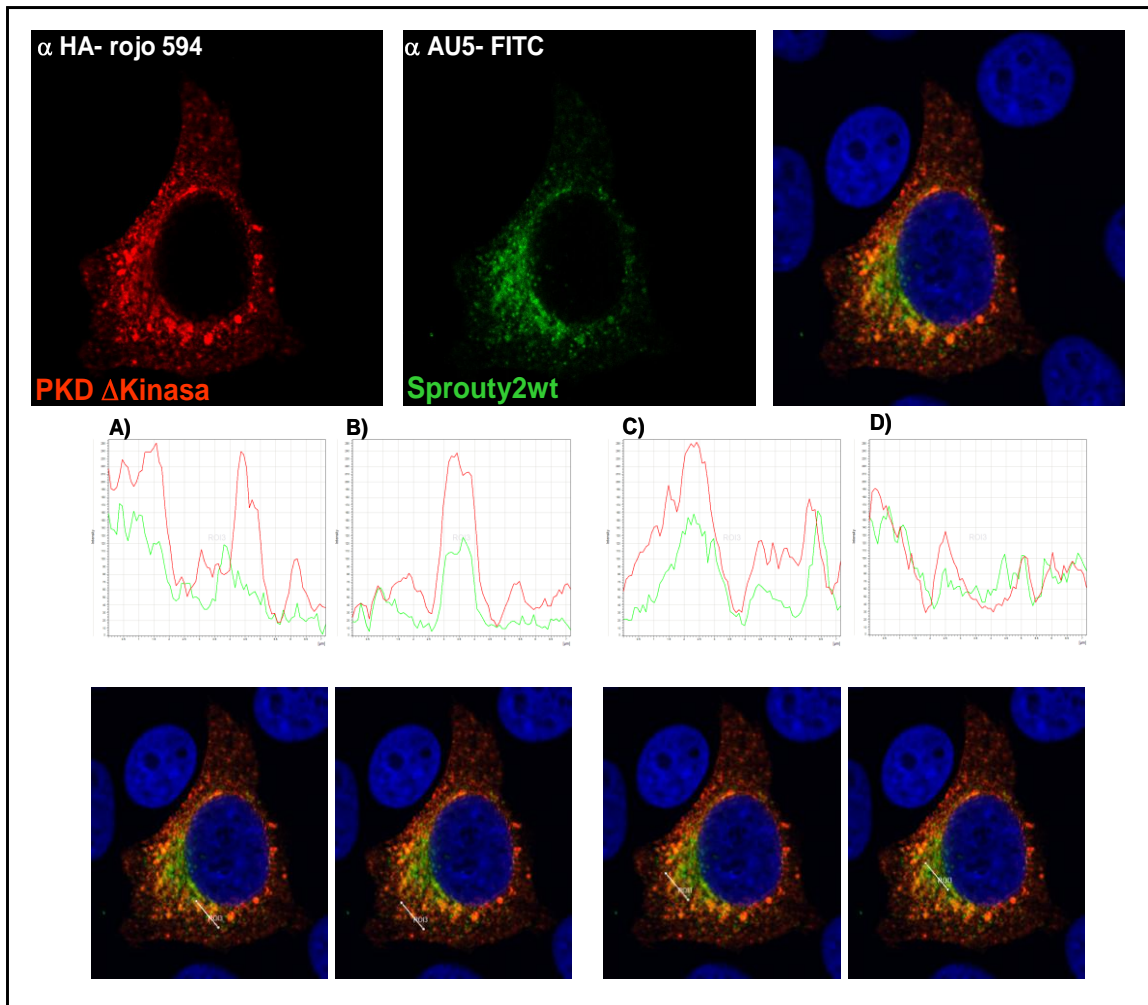


Figura 33: Sprouty2 colocaliza con PKD Δ Dominio quinasa. Co-inmunofluorescencias de Sprouty2 wt y PKD Δ Dominio quinasa sobreexpresadas en células 293T. La proteína Sprouty2 wt aparece en verde y los núcleos se tiñeron de DAPI (azul) y la proteína PKD Δ Dominio quinasa aparece en rojo. La inmunofluorescencia se realizó siguiendo el proceso detallado en “Materiales y Métodos”.

Como podía esperarse, el mutante PKD Δ 1-321 no colocaliza *in vivo* con Sprouty2, sin embargo el mutante PKD Δ Kinasa, que no se une *in vitro* a Sprouty2, si parece tener una misma localización subcelular. Una posible explicación para esto es que la delección de este dominio dirija a la proteína mutante hacia otra localización en la célula o que interactúe con alguna otra proteína que la reclute a una localización distinta de la habitual, haciendo que el destino de este mutante de PKD sea el mismo que el de Sprouty2 wt.

Dadas las similitudes, tanto a nivel funcional como estructural, de la familia de proteínas Sprouty/Spred, observamos que Spred1 posee dos sitios consenso de fosforilación por PKD; "LKIKKS³²³" y "LYHCMS³⁸¹"; y Spred2 tiene una única secuencia de fosforilación; "LYHCMS³⁵⁵". Decidimos estudiar si existía una interacción de las proteínas Spred1 y Spred2 con PKD (Figura 34).

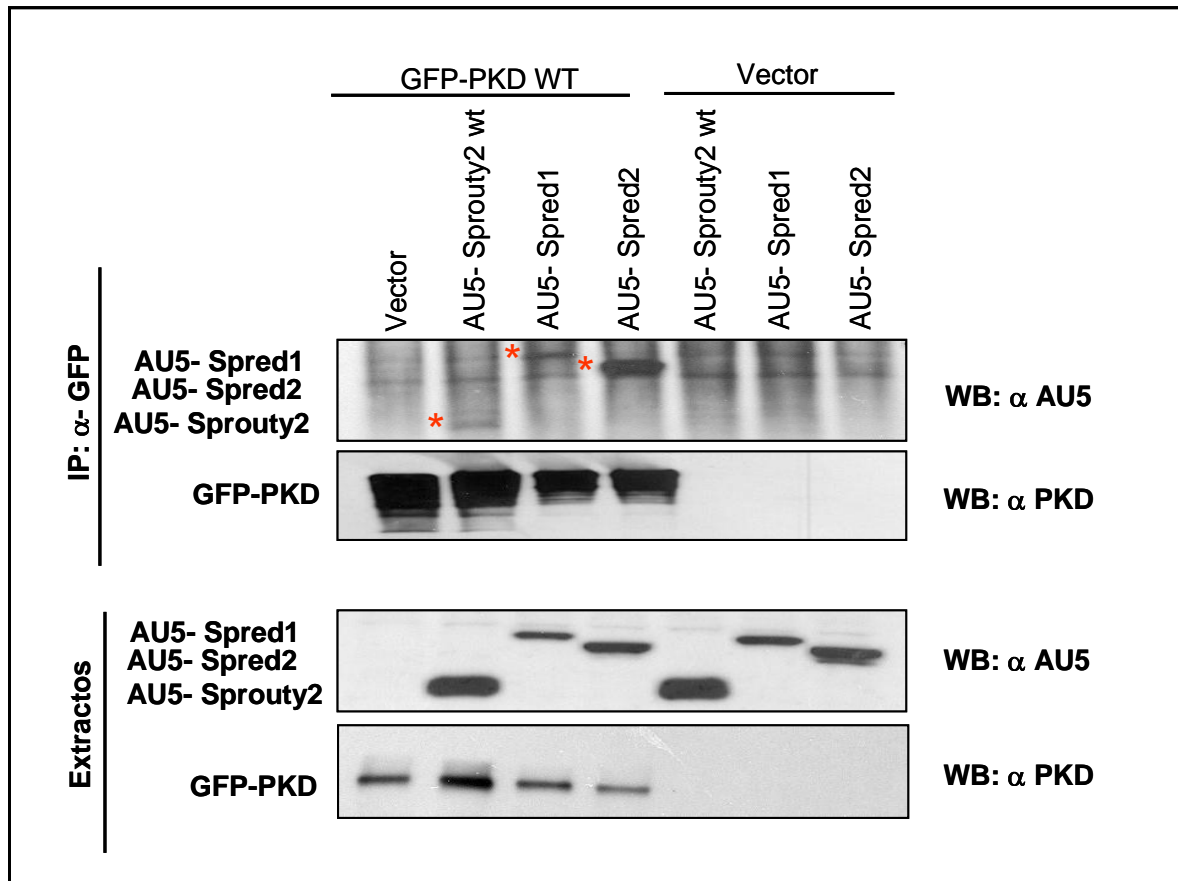


Figura 34: Spred1 y Spred2 se unen a PKD. Células 293T fueron transfectadas con GFP-PKD, pCEFL-KZ-AU5-Sprouty2 wt, pCEFL-KZ-AU5-Spred1 y pCEFL-KZ-AU5-Spred2 y se realizaron ensayos de coimmunoprecipitación siguiendo el procedimiento detallado en "Materiales y Métodos. Los* indican las bandas correspondientes a cada proteína. La figura corresponde a un experimento representativo de otros tres, con resultados similares".

Los resultados obtenidos muestran que tanto Spred1, como Spred2, se unen a PKD así que, siguiendo la misma línea experimental propuesta para Sprouty2, intentamos averiguar que región de PKD podría estar interaccionando con las proteínas Spred, mediante ensayos de coimmunoprecipitación mostrados en la Figura 35. Estos ensayos fueron realizados con los mutantes de PKD que habían mostrado una menor interacción con Sprouty2.

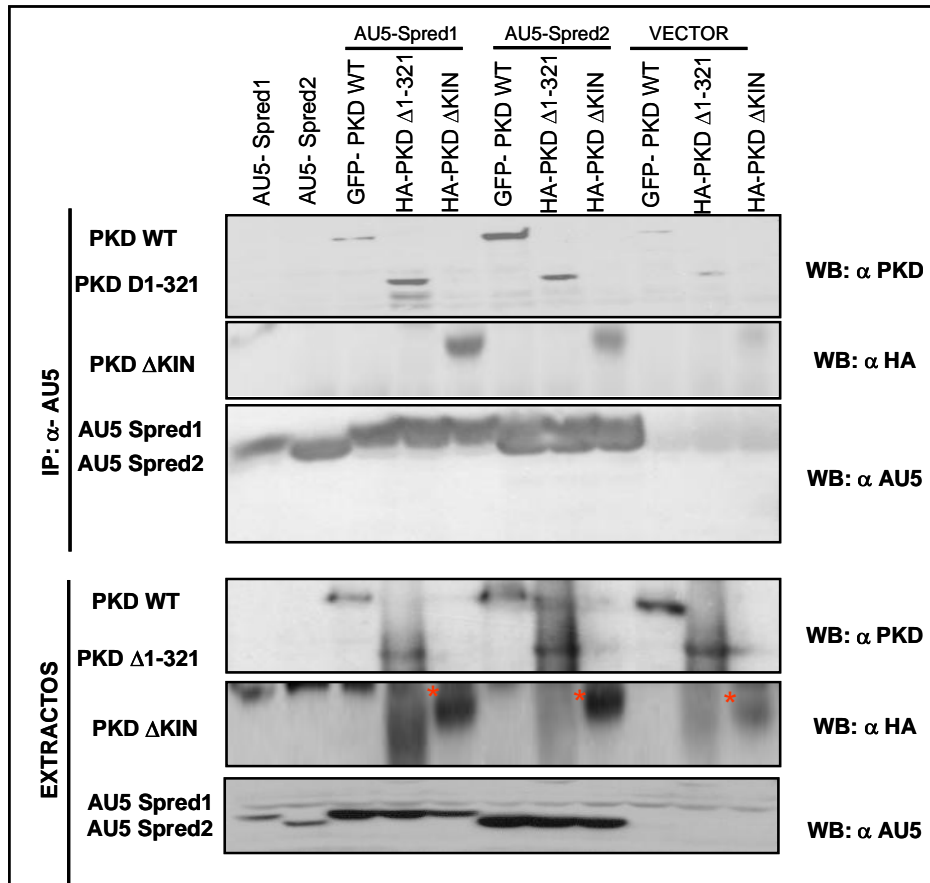


Figura 35: Unión de Sprouty2 a distintas regiones de PKD. Células 293T fueron transfectadas con pCEFL-KZ- AU5-Spred1, pCEFL-KZ-AU5-Spred2, GFP-PKD wt, HA-PKD ΔQuinasa y HA-PKD Δ1-321 y se realizaron ensayos de coimmunoprecipitación siguiendo el procedimiento detallado en "Materiales y Métodos". Los * indican la banda correspondiente a la proteína PKD ΔKIN.

Como se muestra en la figura, las proteínas Spred se unen a los mutantes PKD Δ1-321 y PKD ΔDominio quinasa, que eran los mutantes que mostraban una menor interacción con Sprouty2.

Con los resultados obtenidos no podemos identificar una región concreta de unión de PKD a las proteínas Sprouty2 o Spred1 y Spred2 quizás, debido a que en dicha interacción puedan estar interviniendo más de una región de PKD. No obstante, hemos identificado que es la región carboxilo terminal de Sprouty2 la que está implicada en la interacción con PKD y aunque no hay datos que lo confirmen, pudiera ser, que dado que las proteínas Spred tienen un dominio homólogo a el dominio carboxilo terminal de Sprouty2, fuese también este dominio el responsable de la interacción de las proteínas Spred con PKD.

4 ESTUDIO DEL PAPEL DE SPROUTY2 SOBRE LAS UNIONES ADHERENTES EN LAS CÉLULAS EPITELIALES

Los datos que hay publicados muestran que, la expresión de Sprouty2 en algunos tipos de cáncer depende del tipo de tumor. Así, su expresión se encuentra disminuída en tumores de mama, próstata e hígado y en linfomas B difusos, sugiriendo de esta manera un papel como supresor tumoral (Kwabi-Addo et al., 2004; Sanchez et al., 2008). Por el contrario, en algunos tumores de colon y tumores gástricos, la expresión de Sprouty2 está aumentada (Lo et al., 2006). Esto también se produce en una línea celular derivada de adenocarcinoma de colon, SW480, que a su vez se divide en dos subpoblaciones (Palmer et al., 2004): SW480-ADH, que presentan un fenotipo más epitelial y tienen receptor de vitamina D (VDR) y SW480-R que tienen una morfología más redondeada, no tienen VDR y son altamente tumorigénicas. Ambas subpoblaciones presentan elevados niveles de Sprouty2, sobre todo las SW480-R. Además en un trabajo realizado en colaboración entre nuestro laboratorio con el grupo del Dr. Alberto Muñoz (IIB, CSIC, Madrid), se demostró que en la línea celular SW480-ADH, la sobreexpresión de Sprouty2 wt, como de Sprouty2 Y55F, disminuía los niveles de E-cadherina generando un fenotipo celular más mesenquimal y con menor respuesta a vitamina D (Barbachano et al., 2010) y (Tesis de A. Barbachano).

E-cadherina está implicada en la formación de uniones adherentes. La estabilidad de E-cadherina está regulada por su interacción con determinadas proteínas. p120-catenina se une a la E-cadherina e impide que esta se degrade y de esta forma contribuye a su estabilización en la membrana. Otra proteína responsable de la estabilidad de la E-cadherina es PKD. Esta proteína fosforila a E-cadherina contribuyendo así a su estabilización en la membrana (Jaggi et al., 2005).

En resultados anteriores, hemos mostrado que PKD se une y fosforila a Sprouty2 en la serina 112. Esto nos hizo plantearnos la posibilidad de que Sprouty2, podría estar interfiriendo en la afinidad por E-cadherina de otras de las proteínas responsables de su estabilidad y de esta forma estar alterándola. Mediante ensayos de unión *in vitro* vimos que, tanto Sprouty2 wt como el mutante Sprouty2 Y55F o el mutante Sprouty2 S112A, se unían a E-cadherina. (Figura 36).

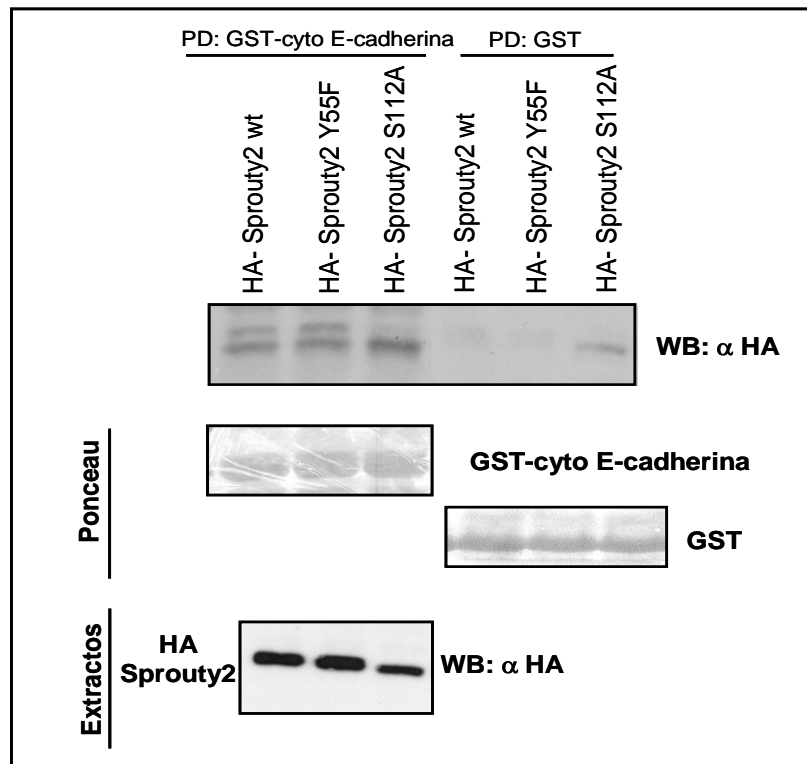


Figura 36. Sprouty2 wt, Sprouty2 Y55F y Sprouty2 S112A se unen a E-Cadherina. Células 293T se transfectaron con pCEFL-KZ-HA-Sprouty2, pCEFL-KZ-HA-Sprouty2 Y55F y con pCEFL-KZ-HA-Sprouty2 S112A respectivamente y se incubaron frente a GST y GST-Cyto-E-cadherina respectivamente siguiendo el proceso detallado en "Materiales y Métodos". Se muestra un experimento representativo de otros tres, con similares resultados.

Nuevamente realizamos ensayos de unión *in vitro* para analizar la afinidad p120-catenina de Sprouty2 swt y de otros mutantes, (Sprouty2 Y55F, Sprouty2 S112A), comprobando que tanto la forma salvaje como Sprouty2 Y55F se unían a p120-catenina y sin embargo, el mutante Sprouty2 S112A no se unía (Figura 37).

Dadas las similitudes, tanto a nivel funcional como estructural, de las familias de proteínas Sprouty/Spred realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación con las proteínas Spred y p120-catenina detectando que, aparentemente, solo Spred2 se une a p120-catenina (Figura 38). Una posible explicación a este resultado puede ser que la región de Spred2 implicada en la unión a p120-catenina sea la región amino terminal, ya que es la que menor homología guarda entre las isoformas lo cual, explicaría el diferente comportamiento entre Spred1 y Spred2.

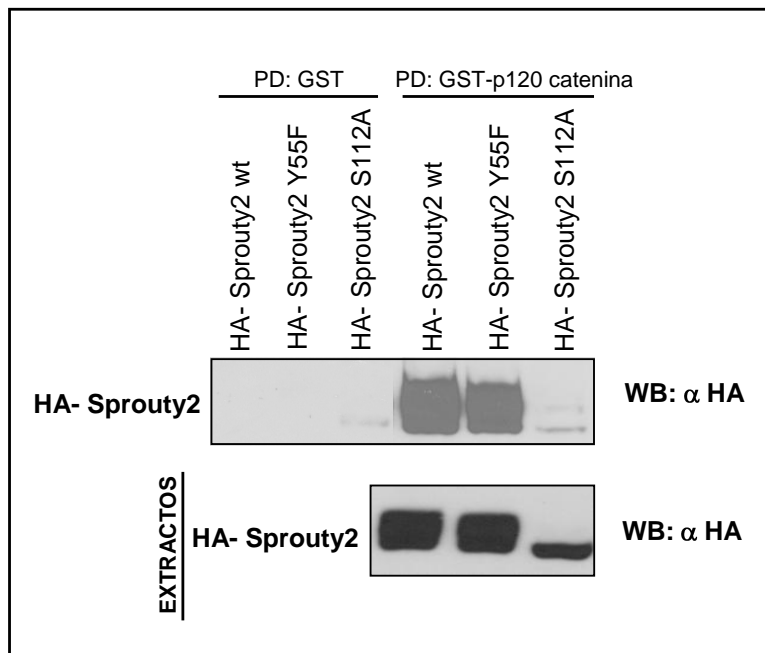


Figura 37. Sprouty2 wt y Sprouty2 Y55F se unen a p120-catenina pero no lo hace Sprouty2 S112A. Células 293T se transfectaron con pCEFL-KZ-HA-Sprouty2, pCEFL-KZ-HA-SproutyY55F y con pCEFL-KZ-HA-SproutyS112A respectivamente y se incubaron frente a GST y GST-p120ctn102-end siguiendo el proceso detallado en "Materiales y Métodos". Se muestra un experimento representativo de otros tres, con resultados similares.

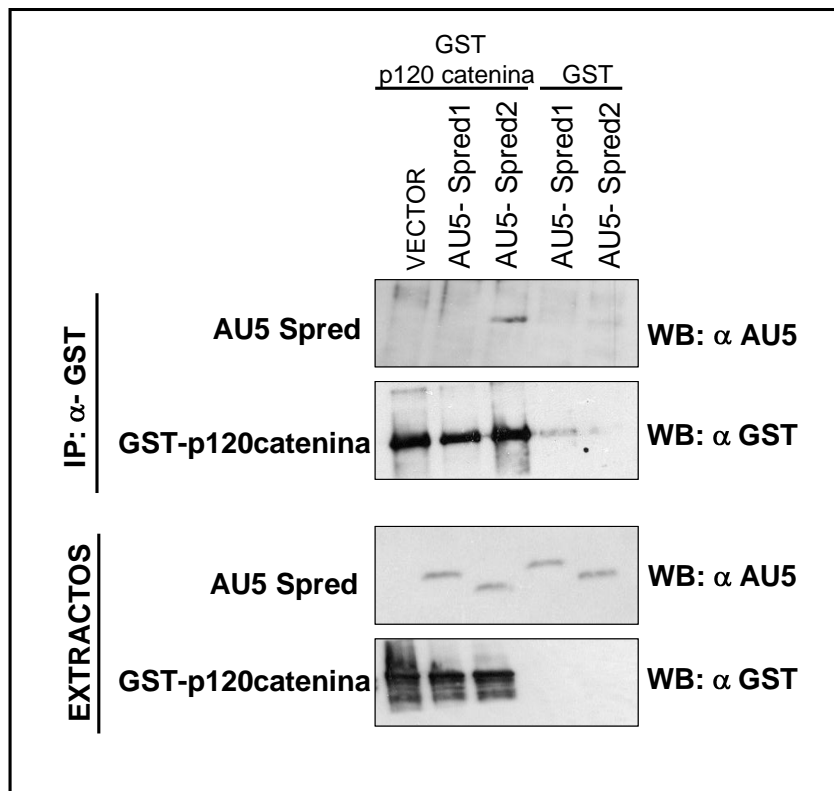


Figura 38. Spred2 se une a p120-catenina. Células 293T se co-transfectaron con GST-p120ctn102-end, vector y con pCEFL-KZ-AU5-Spred1 y pCEFL-KZ-AU5-Spred2 respectivamente y se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación siguiendo el procedimiento descrito en "Materiales y Métodos". Se muestra un experimento representativo de otros tres, con similares resultados.

La estabilidad de la E-cadherina, depende de su unión a otras proteínas como la β -catenina, α -catenina o p120-catenina. Además la fosforilación por otra proteína, PKD, también ayuda a su estabilización. Hemos visto que Sprouty2 interacciona con p120-catenina. La hipótesis que nos planteamos es que Sprouty2 al estar interaccionando con p120-catenina, competiría con E-cadherina, lo cual la desestabilizaría y provocaría una disminución de las uniones adherentes entre las células, teniendo estas un fenotipo más mesenquimal, que explicaría los resultados obtenidos por la sobreexpresión de Sprouty2 wt en las células SW480 ADH (Barbachano et al., 2010).

Otra interacción que hemos visto es la de Sprouty2 con la serina/treonina quinasa PKD, la cual además sabemos que fosforila a esta proteína en la serina 112. Nuestro planteamiento es que ambas proteínas, E-cadherina y Sprouty2, se unen a PKD, pero la sobreexpresión de Sprouty2 estaría desplazando la actividad quinasa de PKD hacia sí mismo, contribuyendo también a la desestabilización de la E-cadherina y a la consiguiente disminución de las uniones adherentes entre las células. Curiosamente el mutante Sprouty2 S112A, que no se fosforila por PKD, no interacciona (*in vitro* e *in vivo*) con p120-catenina. Previamente, y en colaboración con el grupo del Dr. Alberto Muñoz (IIB, CSIC, Madrid), se detectó que su sobreexpresión en células SW480 ADH inducía, a diferencia de lo que pasa con Sprouty2 wt o Sprouty2 Y55F, un fenotipo más epitelial y con mejor respuesta al tratamiento con vitamina D que las células SW480 mock (datos no mostrados. Tesis de A. Barbachano). Este efecto estaba relacionado con una mayor estabilidad de las uniones adherentes, por lo que pensamos que puede ser debido a la incapacidad de Sprouty2 S112A de ser fosforilado por PKD y a una menor afinidad con p120-catenina.

Hemos visto que las proteínas Spred1 y Spred2 se unen a PKD y que en sus respectivas secuencias existen sitios consenso de fosforilación por esta quinasa. Además hemos comprobado que Spred2 se une a p120-catenina, lo cual puede sugerir que Spred2 esté desempeñando un papel similar al de Sprouty2 en cáncer de colon.

Con todos los datos obtenidos anteriormente, nos planteamos si Sprouty2 endógeno de la línea celular SW480, derivada de adenocarcinoma de colon, era funcional o tenía mutaciones inactivantes. Para ello se purificó el ADN genómico y mediante PCR se amplificó el exón 2 de Sprouty2. Encontramos una mutación en la posición 316 de la secuencia codificante que producía un cambio de aminoácido en el residuo 106: prolina por serina. Esta mutación se encuentra en forma heterocigota en estas células

y se ha detectado en otras líneas de cáncer de colon (como las CACO2) y ha sido descrita como un polimorfismo por el National Center for Biotechnology Information. Subclonamos este mutante en el plásmido pCEFL-KZ-HA y realizamos tanto experimentos como ensayos para medir la activación transcripcional de Gal4-Elk1 y analizar el efecto del mutante P106S en la vía de ERK-Elk1. Los datos obtenidos no mostraron ninguna diferencia con respecto a Sprouty2 wt (datos no mostrados). Una posibilidad, no obstante, es que este mutante pudiera tener un comportamiento diferente respecto a la proteína salvaje en la interacción con las proteínas que estabilizan E-cadherina: PKD y p120-catenina.

No sabemos si este mutante es fosforilado por PKD, pero si que hemos observado la interacción de ambas proteínas *in vivo* (datos no mostrados). Sorprendentemente no interacciona con p120-catenina (Figura 39), lo cual en un principio, nos hace pensar en un cierto “carácter favorable” de este mutante sobre las uniones adherentes. En relación con ello, la sobreexpresión ectópica de Sprouty2 P106S en células SW480 ADH produce, según resultados preliminares, un efecto semejante a Sprouty2 S112A; es decir, genera un fenotipo más epitelial que las SW480 ADH mock (datos no mostrados).

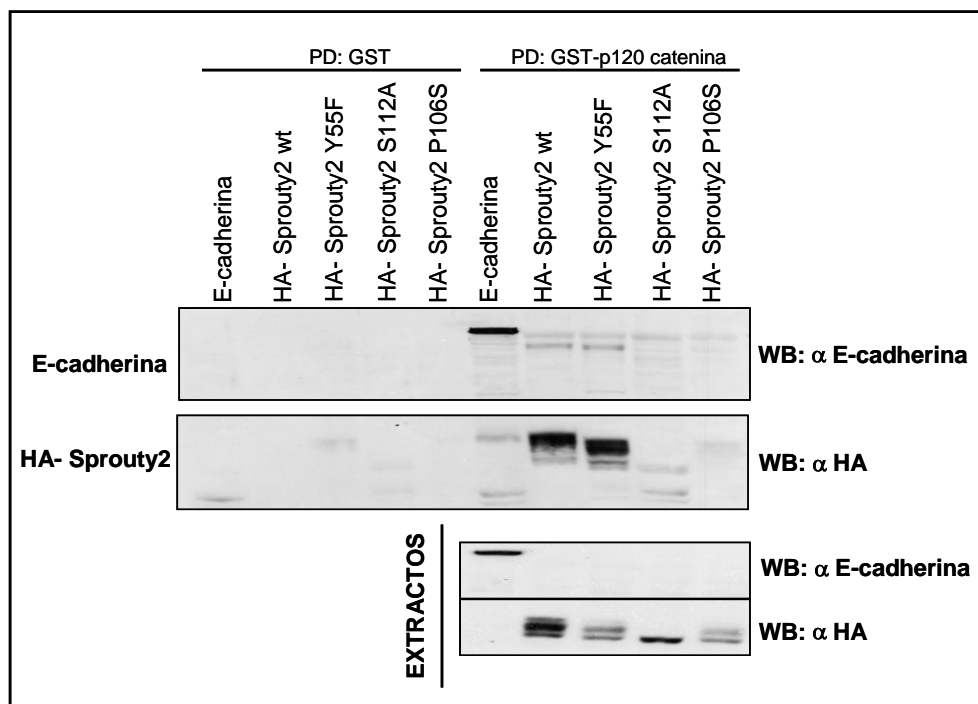


Figura 39. Sprouty2 P106S no se une a p120-catenina. Células 293T se transfectaron con E-cadherina o con distintos mutantes de Sprouty2 y se incubaron con GST o GST-p120ctn102-end, siguiendo el procedimiento detallado en el apartado de “Materiales y Métodos”. Se muestra un experimento representativo de otros tres con similares resultados

Con objeto de determinar si el polimorfismo de Sprouty2 P106S podía suponer un factor de influencia en cáncer colorrectal, se analizó su transmisión por línea germinal en 269 ADNs de individuos afectados frente a 251 controles de individuos sanos de la misma distribución de edad, sexo y localización que los pacientes (procedentes todos del Instituto del Cáncer de Dinamarca). Aunque aparentemente parecía existir una mayor presencia de homocigotos (P106S) en los controles, esta diferencia no tenía significación estadística respecto a un mayor o menor riesgo de padecer cáncer de colon (ver Tabla I del Anexo). Curiosamente, analizando el ADN de diez pacientes procedentes de biopsias de cáncer colorrectal frente al tejido sano en cada caso (cedidas por el Dr. Sánchez Prieto, UCLM, Albacete), detectamos que un caso había presencia “de novo” de este polimorfismo en la muestra tumoral.

5. EFECTO DE SPROUTY2 SOBRE LA SENSIBILIDAD DE LAS CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON A QUIMIOTERAPIA POR AGENTES GENOTÓXICOS

Sprouty2 es capaz de inhibir la apoptosis en respuesta al daño al ADN provocado por agentes quimioterapéuticos como el cisplatino (Edwin and Patel, 2008; Lito et al., 2009). La apoptosis en respuesta al daño al ADN está controlada por HDM2 y por el factor de transcripción p53 (Stiewe, 2007). En condiciones fisiológicas, los niveles del factor de transcripción p53 se regulan por la ubiquitina ligasa HDM2, la cual ubiquitina p53 para su posterior degradación, vía proteasoma. Sin la ubiquitinación de p53 por HDM2, p53 se transloca al núcleo e induce la activación transcripcional de genes implicados en la parada del ciclo celular, reparación del ADN y apoptosis (Vousden and Lu, 2002). En fibroblastos que expresan Ras oncogénico, se ha visto que el papel antiapoptótico que muestra Sprouty2 está mediado por la ruta Akt/HDM2/p53 (Lito et al., 2009).

Una de las terapias antitumorales usada en diversos tipos de sarcomas, carcinomas (pulmón, estómago, ovario...), linfomas y tumores de células germinales es el tratamiento con cisplatino, que se engloba dentro de la familia de fármacos denominados agentes alquilantes. Este tipo de fármacos provocan su acción citotóxica mediante la formación de enlaces covalentes entre sus grupos alquilo y diversas

moléculas nucleofílicas presentes en las células. También pueden alquilar el ARN (Gonzalez et al., 2001; Trimmer and Essigmann, 1999).

Nosotros hemos demostrado que $p38\alpha^{MAPK}$ fosforila a Sprouty2 y por otro lado, en la línea celular SW480-ADH, hay una relación inversa entre los niveles de Sprouty2 y E-cadherina, lo cual contribuye a que las células tengan un fenotipo más mesenquimal (Barbachano et al. 2010). Estos datos nos indujeron a ver el efecto que podría tener la sobreexpresión de Sprouty2 en esta línea celular respecto al tratamiento con agentes alquilantes. Para ello, estas células fueron tratadas con distintas dosis de cisplatino durante 48 horas, y la viabilidad de las mismas fue posteriormente analizada.

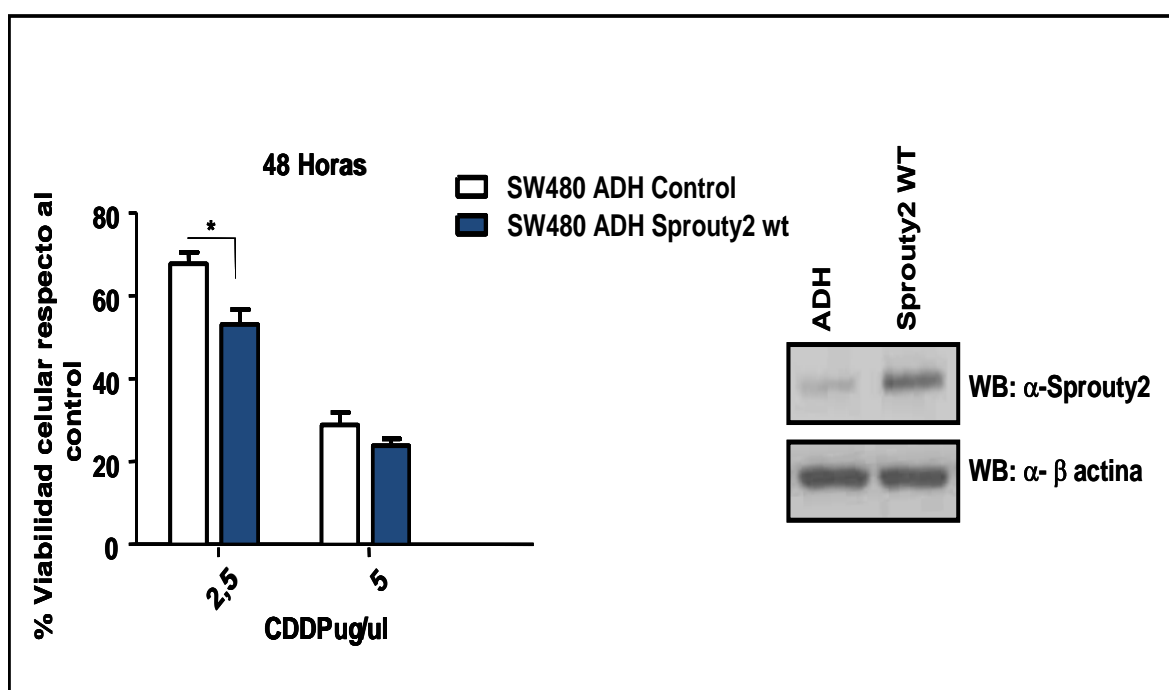


Figura 40. La sobreexpresión de Sprouty2 produce un aumento de la sensibilidad celular al tratamiento con cisplatino. Células SW480 ADH transfectadas establemente con vector (control) o AU5-Sprouty2 wt se sembraron 24 horas antes del tratamiento con el cisplatino. Transcurrido este tiempo, se incubaron con distintas dosis de fármaco y se realizaron los ensayos de viabilidad celular, siguiendo el proceso detallado en el apartado “Materiales y Métodos” (n=5; p<0,05).

Sorprendentemente y en contra de lo que podía esperarse, observamos que la línea estable que sobreexpresa Sprouty2 wt es más sensible a la acción del cisplatino (Figura 40). La siguiente cuestión que nos planteamos, fue ver la respuesta a cisplatino, así como a otros agentes antitumorales usados comúnmente en quimioterapia cuando la expresión de Sprouty2 se suprime. Así que decidimos ampliar el estudio al efecto de otros dos fármacos; el 5-fluoruracilo y la doxorubicina.

El 5-fluoruracilo pertenece al grupo de antitumorales catalogados como antimetabolitos. Es un análogo de pirimidinas y actúa durante la fase S del ciclo celular, porque interfiere en la síntesis del ADN y ARN, inhibiendo por un lado la timidilato sintetasa y por otro lado, se incorpora al ARN. Se emplea fundamentalmente en el tratamiento de carcinomas de recto, mama y colon (Chan and Verrill, 2009; Longley et al., 2003; Raftery et al., 2008; Specenier and Vermorken, 2010).

La doxorubicina es un antibiótico perteneciente a la familia de las antraciclinas. Como mecanismo de acción, destacan su capacidad para intercalarse entre las pares de bases adyacentes de ADN. También inhiben la topoisomerasa II, forman radicales libres que pueden afectar al ADN, alteran la membrana e inhiben la fosforilación oxidativa de las mitocondrias. Es un antibiótico ampliamente usado en el tratamiento de leucemia, linfoma de Hodgkin, carcinoma de vejiga, colon, mama, estómago pulmón, ovario, tiroides, sarcoma de tejido blando o mieloma múltiple (Cummings and Smyth, 1993).

En el siguiente ensayo que realizamos, usamos células SW480 ADH a las que suprimimos la expresión de Sprouty2. Para ello usamos lentivirus para transducir shRNA contra Sprouty2 humano. Obtuvimos líneas estables y de los diferentes clones lentivirales usados, el que mayor reducción causó en los niveles de Sprouty2 fue el clon 5 (Barbachano et al., 2010) y es el que empleamos en los siguientes experimentos. Tratamos a las células transducidas, con el shRNA control y shRNA Sprouty2, con dosis crecientes de cisplatino, 5-fluoruracilo y doxorubicina durante 48 horas, para analizar después el efecto de los distintos fármacos.

Como se puede observar en la Figura 41, el silenciamiento de Sprouty2 hizo que las células fuesen mucho más resistentes a la acción del cisplatino y el 5-fluoruracilo (figura 41A y 41C), ya que la viabilidad de las células en las que se había silenciado Sprouty2, era mayor que la de las células usadas como control, lo cual coincide con los resultados de la Figura 40. Por el contrario, el silenciamiento de Sprouty2 no afecta a la sensibilidad de las células a la acción de la doxorubicina (Figura 41B).

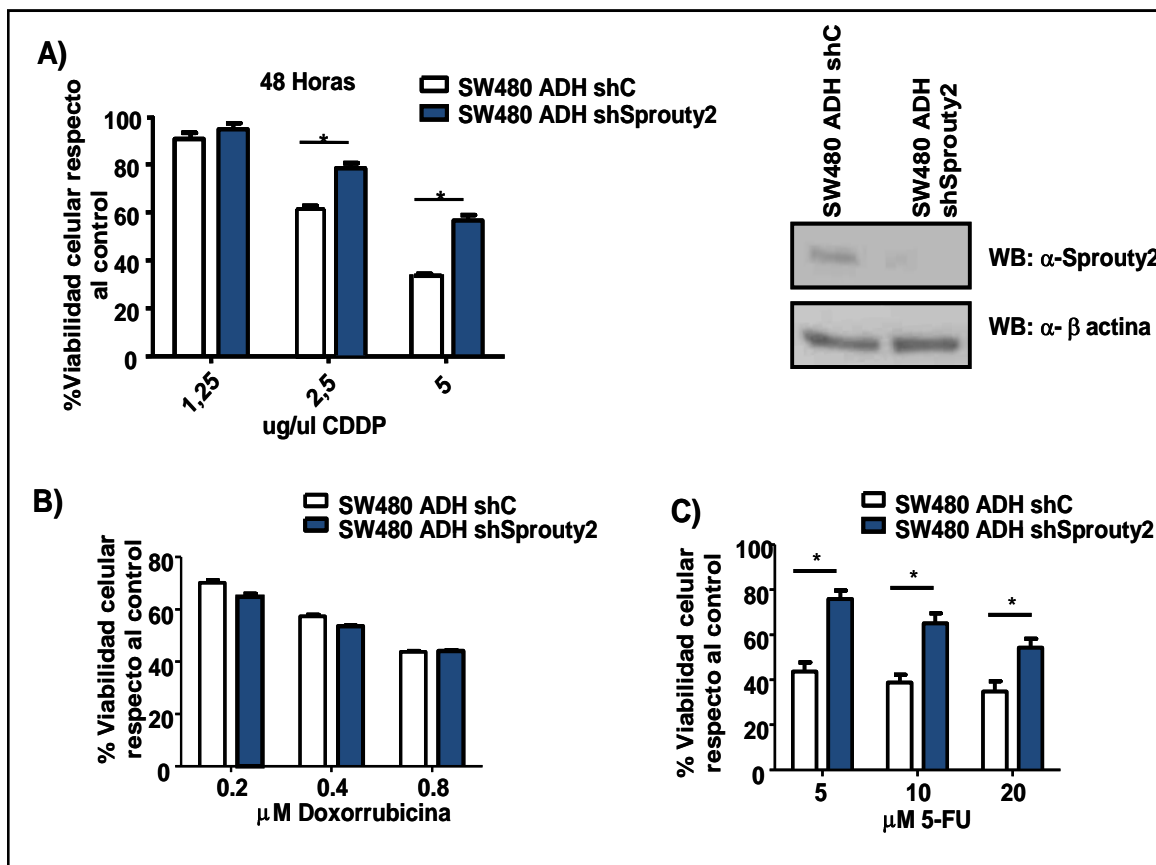


Figura 41. El silenciamiento génico de Sprouty2 produce un aumento de la resistencia de las células al tratamiento con cisplatino y 5-fluoruracilo, pero no al tratamiento con doxorubicina. Células SW480 ADH control o que tenían silenciado Sprouty2 wt se sembraron 24 horas antes del tratamiento con el cisplatino (A), doxorubicina (B) y 5-fluoruracilo (C). Transcurrido este tiempo, las células se incubaron con distintas dosis de fármaco durante 48 horas y se realizaron los ensayos de viabilidad celular, siguiendo el proceso detallado en el apartado “Materiales y Métodos”. En cada caso, n=5; * p<0.01.

Estos datos son en principio opuestos a los ya publicados, en los que se mostraba como el silenciamiento génico de Sprouty2 era capaz de aumentar la sensibilidad de las células a la acción de agentes de daño al ADN, especialmente en fibroblastos humanos transformados con Ras oncogénico (Lito et al., 2009). Sabemos que los efectos antiapoptóticos de Sprouty2 en respuesta al daño al ADN son mediados por la ruta Akt/HDM2/p53, y como las células SW480 ADH poseen p53 mutado, pensamos que esto puede ser una posible explicación a que el efecto que vemos, sea diferente al que ya está publicado. Por otro lado, los resultados con doxorubicina pueden estar relacionados con los distintos mecanismos de acción de este fármaco, algunos independientes del daño al ADN (Cummings and Smyth, 1993) Otra forma descrita de activación de p53, en respuesta al daño en el DNA producido por agentes quimioterapéuticos, es a través de p38 (Sanchez-Prieto et al., 2000). Como hemos

mostrado, Sprouty2 puede ser fosforilado por p38 α ^{MAPK} en la serina 112, con lo cual nos planteamos la posibilidad de que, en el papel regulador de la apoptosis que mostraba Sprouty2 en esta línea celular, estuviera implicada p38 α ^{MAPK}. El siguiente paso en nuestro estudio fue ver qué comportamiento tendrían las células SW480 ADH sobreexpresando Sprouty2 Y55F y Sprouty2 S112A respecto a las que sobreexpresan Sprouty2 wt, al tratarlos con cisplatino. Además analizamos la activación de p38 α ^{MAPK} en células que sobreexpresaban tanto la proteína silvestre, como el mutante que no se fosforilaba por p38 α ^{MAPK}. Las células fueron tratadas con dosis crecientes de cisplatino durante y 48 horas y posteriormente se analizó el efecto de fármaco.

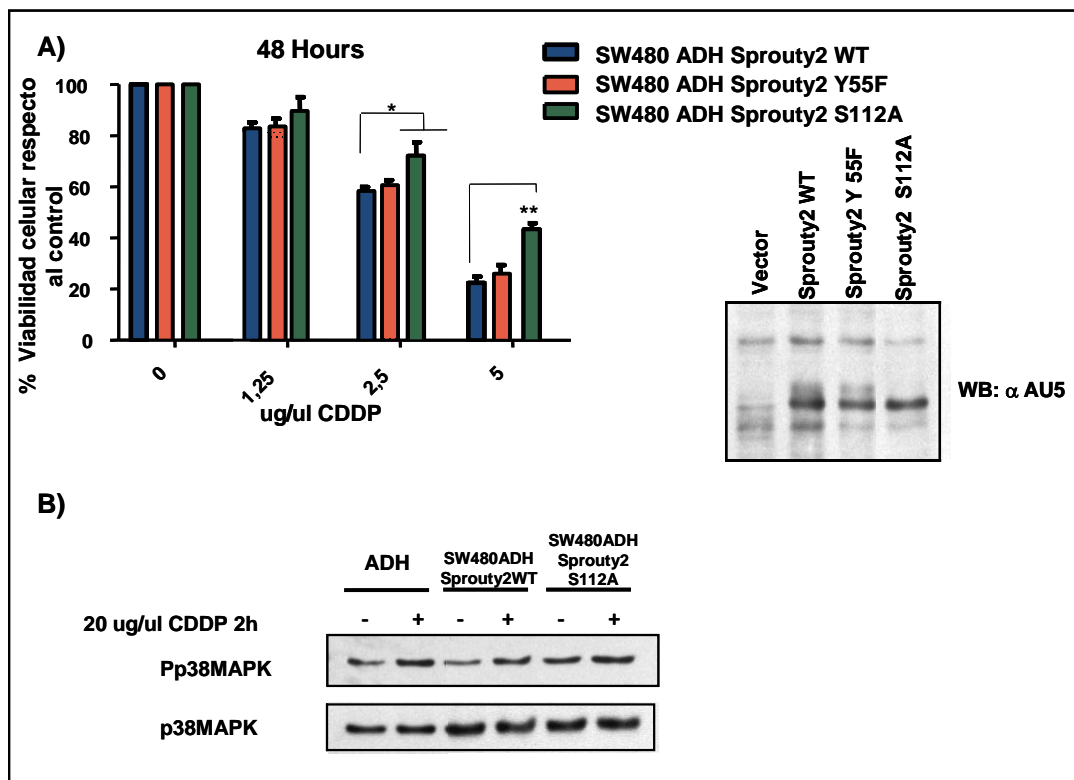


Figura 42. La sobreexpresión de sprouty2 S112A aumenta la resistencia de las células al tratamiento con cisplatino. A) Células SW480 ADH que sobreexpresaban Sprouty2 wt, Sprouty2 Y55F o Sprouty2 S112A se sembraron 24 horas antes del tratamiento con cisplatino. Transcurrido este tiempo, las células se incubaron con dosis crecientes de cisplatino durante 48 horas y se realizaron los ensayos de viabilidad celular, siguiendo el proceso detallado en el apartado “Materiales y Métodos”. B) Células SW480 ADH que sobreexpresaban Sprouty2 wt o Sprouty2 S112A fueron tratadas con 20mg/ml de cisplatino durante 2 horas. Posteriormente se lisaron las células y los extractos celulares se utilizaron para detectar la proteína anti α - p38^{MAPK} y anti α - p-p38^{MAPK}. (n=5; * p<0.05; ** p<0.01).

Como se puede observar, en la Figura 42A, la sobreexpresión del mutante Sprouty2 Y55F produce el mismo efecto que la proteína silvestre y por tanto, aumenta la sensibilidad de las células a la acción del cisplatino. Por el contrario, Sprouty2 S112A, produjo un aumento de resistencia de las células al tratamiento con dicho agente

tumoral (Figura 42B). La activación basal de $p38\alpha^{MAPK}$ era más elevada en las células que expresaban el mutante que no podía ser fosforilado por $p38\alpha^{MAPK}$ que en las otras células, por lo cual, pensamos que su efecto podía deberse a dicha quinasa. Para comprobar dicha hipótesis, volvimos a analizar la viabilidad celular en el tratamiento con cisplatino de células SW480 ADH que sobreexpresaban tanto la forma salvaje de la proteína, como el mutante Sprouty2 S112A y además, las tratamos con el inhibidor químico específico de $p38\alpha^{MAPK}$, SB203580 (Figura 43).

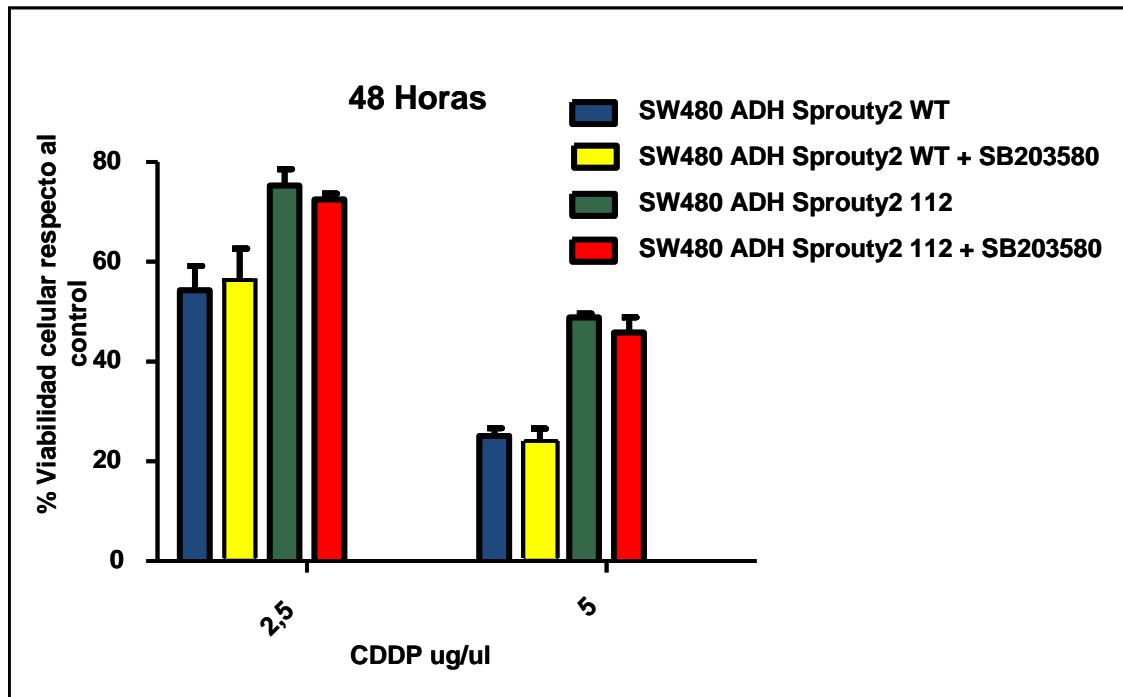


Figura 43. El inhibidor de $p38\alpha^{MAPK}$ (SB203580) no tiene efecto sobre la viabilidad de las células SW480 ADH al tratamiento con cisplatino. Células SW480 ADH que sobreexpresaban Sprouty2 wt o Sprouty2 S112A se sembraron, por duplicado, 24 horas antes del tratamiento con el cisplatino. Transcurrido este tiempo, se incubaron con distintas dosis de cisplatinato y en presencia del inhibidor SB203580. Se realizaron los ensayos de viabilidad celular, siguiendo el proceso detallado en el apartado "Materiales y Métodos" (n=5).

Como se puede apreciar en la Figura 43, ni Sprouty2 wt, ni el mutante que no es fosforilado por $p38\alpha^{MAPK}$, alteraron su comportamiento en presencia del inhibidor químico de $p38\alpha^{MAPK}$. Estos resultados sugieren por tanto, que el efecto de Sprouty2 sobre la sensibilidad de las células a la acción de agentes de daño al ADN es independiente de la acción de $p38\alpha^{MAPK}$ en las células SW480 ADH. Obviamente, y dado que Sprouty2 también es fosforilado en el residuo S112 por PKD, es posible que estos resultados respecto a la sensibilidad a cisplatino, sean dependientes de PKD.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- I. Las proteínas Spred se comportan igual que Sprouty2 en la activación de la vía de ERK en respuesta a PGA_1 .
- II. $p38\alpha^{MAPK}$ y PKD fosforilan a Sprouty2 en la serina 112 *in vitro* e *in vivo*, siendo este residuo, un sitio consenso de fosforilación para PKD. Además, hemos podido detectar interacción *in vitro* e *in vivo* de Sprouty2 con PKD.
- III. La interacción de Sprouty2 y PKD ocurre a través de la región carboxilo terminal de Sprouty2 y nuestros datos sugieren que están implicadas la región amino terminal y el dominio catalítico de PKD.
- IV. Sprouty2 interacciona con E-cadherina y p120-catenina mientras que la mutación en el residuo 112 de Sprouty2, de serina por alanina, reduce la afinidad de Sprouty2 por p120-catenina.
- V. La variante Sprouty2 P106S tiene menor afinidad de Sprouty2 por p120-catenina que Sprouty2 wt.
- VI. Spred2, pero no Spred1, interacciona con p120-catenina.
- VII. La sobreexpresión de Sprouty2 en células SW480 ADH aumenta la sensibilidad al tratamiento con cisplatino y 5F-uracilo; sin embargo su silenciamiento aumenta la resistencia al tratamiento.
- VIII. A diferencia de Sprouty2 wt, el mutante Sprouty2 S112A, cuando se sobreexpresa en células SW480 ADH incrementa su resistencia a cisplatino.

BIBLIOGRAFÍA

Abe, J., Kusuvara, M., Ulevitch, R.J., Berk, B.C., and Lee, J.D. (1996). Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase. *The Journal of biological chemistry* 271, 16586-16590.

Aberle, H., Butz, S., Stappert, J., Weissig, H., Kemler, R., and Hoschuetzky, H. (1994). Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J Cell Sci* 107 (Pt 12), 3655-3663.

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

Alonso, G., Ambrosino, C., Jones, M., and Nebreda, A.R. (2000). Differential activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms depending on signal strength. *The Journal of biological chemistry* 275, 40641-40648.

Anastasiadis, P.Z., and Reynolds, A.B. (2000). The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. *J Cell Sci* 113 (Pt 8), 1319-1334.

Aranda, S., Alvarez, M., Turro, S., Laguna, A., and de la Luna, S. (2008). Sprouty2-mediated inhibition of fibroblast growth factor signaling is modulated by the protein kinase DYRK1A. *Mol Cell Biol* 28, 5899-5911.

Arikawa, E., Cheung, C., Sekirov, I., Battell, M.L., Yuen, V.G., and McNeill, J.H. (2006). Effects of endothelin receptor blockade on hypervasoreactivity in streptozotocin-diabetic rats: vessel-specific involvement of thromboxane A2. *Can J Physiol Pharmacol* 84, 823-833.

Bachelor, M.A., and Bowden, G.T. (2004). UVA-mediated activation of signaling pathways involved in skin tumor promotion and progression. *Seminars in cancer biology* 14, 131-138.

Ball, L.J., Jarchau, T., Oschkinat, H., and Walter, U. (2002). EVH1 domains: structure, function and interactions. *FEBS letters* 513, 45-52.

Barbachano, A., Ordonez-Moran, P., Garcia, J.M., Sanchez, A., Pereira, F., Larriba, M.J., Martinez, N., Hernandez, J., Landolfi, S., Bonilla, F., *et al.* (2010). SPROUTY-2 and E-cadherin regulate reciprocally and dictate colon cancer cell tumorigenicity. *Oncogene* 29, 4800-4813.

Basson, M.A., Akbulut, S., Watson-Johnson, J., Simon, R., Carroll, T.J., Shakya, R., Gross, I., Martin, G.R., Lufkin, T., McMahon, A.P., *et al.* (2005). Sprouty1 is a critical regulator of GDNF/RET-mediated kidney induction. *Dev Cell* 8, 229-239.

Behrens, J., Vakaet, L., Friis, R., Winterhager, E., Van Roy, F., Mareel, M.M., and Birchmeier, W. (1993). Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene. *J Cell Biol* 120, 757-766.

Behrens, J., von Kries, J.P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., and Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382, 638-642.

Besirli, C.G., and Johnson, E.M., Jr. (2006). The activation loop phosphorylation of protein kinase D is an early marker of neuronal DNA damage. *J Neurochem* 99, 218-225.

Birchmeier, W. (1994). Molecular aspects of the loss of cell adhesion and gain of invasiveness in carcinomas. *Princess Takamatsu Symp* 24, 214-232.

Bishop-Bailey, D. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol* 129, 823-834.

Blom, N., Gammeltoft, S., and Brunak, S. (1999). Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of molecular biology* 294, 1351-1362.

Bos, C.L., Richel, D.J., Ritsema, T., Peppelenbosch, M.P., and Versteeg, H.H. (2004). Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 1187-1205.

Bost, F., Aouadi, M., Caron, L., Even, P., Belmonte, N., Prot, M., Dani, C., Hofman, P., Pages, G., Pouyssegur, J., *et al.* (2005). The extracellular signal-regulated kinase isoform ERK1 is specifically required for in vitro and in vivo adipogenesis. *Diabetes* 54, 402-411.

Boutros, T., Chevet, E., and Metrakos, P. (2008). Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacol Rev* 60, 261-310.

Brabletz, T., Jung, A., Reu, S., Porzner, M., Hlubek, F., Kunz-Schughart, L.A., Knuechel, R., and Kirchner, T. (2001). Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10356-10361.

Bulavin, D.V., and Fornace, A.J., Jr. (2004). p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor. *Adv Cancer Res* 92, 95-118.

Bundschu, K., Knobloch, K.P., Ullrich, M., Schinke, T., Amling, M., Engelhardt, C.M., Renne, T., Walter, U., and Schuh, K. (2005). Gene disruption of Spred-2 causes dwarfism. *The Journal of biological chemistry* 280, 28572-28580.

Bundschu, K., Walter, U., and Schuh, K. (2007). Getting a first clue about SPRED functions. *Bioessays* 29, 897-907.

Cabrita, M.A., and Christofori, G. (2008). Sprouty proteins, masterminds of receptor tyrosine kinase signaling. *Angiogenesis* 11, 53-62.

Calautti, E., Cabodi, S., Stein, P.L., Hatzfeld, M., Kedersha, N., and Paolo Dotto, G. (1998). Tyrosine phosphorylation and src family kinases control keratinocyte cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 141, 1449-1465.

Calvo, F., Agudo-Ibanez, L., and Crespo, P. (2010). The Ras-ERK pathway: understanding site-specific signaling provides hope of new anti-tumor therapies. *Bioessays* 32, 412-421.

Cano, A., Perez-Moreno, M.A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M.J., del Barrio, M.G., Portillo, F., and Nieto, M.A. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2, 76-83.

Carvajal-Vergara, X., Tabera, S., Montero, J.C., Esparis-Ogando, A., Lopez-Perez, R., Mateo, G., Gutierrez, N., Parmo-Cabanas, M., Teixido, J., San Miguel, J.F., *et al.* (2005). Multifunctional role of Erk5 in multiple myeloma. *Blood* 105, 4492-4499.

Casci, T., Vinos, J., and Freeman, M. (1999). Sprouty, an intracellular inhibitor of Ras signaling. *Cell* 96, 655-665.

Clark, A.R., Dean, J.L., and Saklatvala, J. (2003). Post-transcriptional regulation of gene expression by mitogen-activated protein kinase p38. *FEBS letters* 546, 37-44.

Conacci-Sorrell, M., Zhurinsky, J., and Ben-Ze'ev, A. (2002). The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest* 109, 987-991.

Cowin, P., and Burke, B. (1996). Cytoskeleton-membrane interactions. *Current opinion in cell biology* 8, 56-65.

Cummings, J., and Smyth, J.F. (1993). DNA topoisomerase I and II as targets for rational design of new anticancer drugs. *Ann Oncol* 4, 533-543.

Chambard, J.C., Lefloch, R., Pouyssegur, J., and Lenormand, P. (2007). ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1299-1310.

Chan, A., and Verrill, M. (2009). Capecitabine and vinorelbine in metastatic breast cancer. *Eur J Cancer* 45, 2253-2265.

Chen, S., Guttridge, D.C., You, Z., Zhang, Z., Fribley, A., Mayo, M.W., Kitajewski, J., and Wang, C.Y. (2001). Wnt-1 signaling inhibits apoptosis by activating beta-catenin/T cell factor-mediated transcription. *J Cell Biol* 152, 87-96.

Daniel, J.M., and Reynolds, A.B. (1995). The tyrosine kinase substrate p120cas binds directly to E-cadherin but not to the adenomatous polyposis coli protein or alpha-catenin. *Mol Cell Biol* 15, 4819-4824.

DaSilva, J., Xu, L., Kim, H.J., Miller, W.T., and Bar-Sagi, D. (2006). Regulation of sprouty stability by Mnk1-dependent phosphorylation. *Mol Cell Biol* 26, 1898-1907.

Davis, M.A., Ireton, R.C., and Reynolds, A.B. (2003). A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol* 163, 525-534.

Davis, R.J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103, 239-252.

de Alvaro, C., Martinez, N., Rojas, J.M., and Lorenzo, M. (2005). Sprouty-2 overexpression in C2C12 cells confers myogenic differentiation properties in the presence of FGF2. *Mol Biol Cell* 16, 4454-4461.

Dequiedt, F., Van Lint, J., Lecomte, E., Van Duppen, V., Seufferlein, T., Vandenhede, J.R., Wattiez, R., and Kettmann, R. (2005). Phosphorylation of histone deacetylase 7 by protein kinase D mediates T cell receptor-induced Nur77 expression and apoptosis. *J Exp Med* 201, 793-804.

Du, C., Jaggi, M., Zhang, C., and Balaji, K.C. (2009). Protein kinase D1-mediated phosphorylation and subcellular localization of beta-catenin. *Cancer research* 69, 1117-1124.

Dumesic, P.A., Scholl, F.A., Barragan, D.I., and Khavari, P.A. (2009). Erk1/2 MAP kinases are required for epidermal G2/M progression. *J Cell Biol* 185, 409-422.

Edwin, F., and Patel, T.B. (2008). A novel role of Sprouty 2 in regulating cellular apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 283, 3181-3190.

Egan, J.E., Hall, A.B., Yatsula, B.A., and Bar-Sagi, D. (2002). The bimodal regulation of epidermal growth factor signaling by human Sprouty proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6041-6046.

Enslin, H., Raingeaud, J., and Davis, R.J. (1998). Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *The Journal of biological chemistry* 273, 1741-1748.

Eswarakumar, V.P., Lax, I., and Schlessinger, J. (2005). Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 139-149.

Ferrell, J.E., Jr., and Bhatt, R.R. (1997). Mechanistic studies of the dual phosphorylation of mitogen-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry* 272, 19008-19016.

Fong, C.W., Leong, H.F., Wong, E.S., Lim, J., Yusoff, P., and Guy, G.R. (2003). Tyrosine phosphorylation of Sprouty2 enhances its interaction with c-Cbl and is crucial for its function. *The Journal of biological chemistry* 278, 33456-33464.

Funk, C.D. (2001). Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294, 1871-1875.

Garcia-Dominguez, C.A., Martinez, N., Gragera, T., Perez-Rodriguez, A., Retana, D., Leon, G., Sanchez, A., Oliva, J.L., Perez-Sala, D., and Rojas, J.M. (2011). Sprouty2 and Spred1-2 proteins inhibit the activation of the ERK pathway elicited by cyclopentenone prostanoids. *PLoS One* 6, e16787.

Gonzalez, V.M., Fuertes, M.A., Alonso, C., and Perez, J.M. (2001). Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol* 59, 657-663.

Gottardi, C.J., and Gumbiner, B.M. (2001). Adhesion signaling: how beta-catenin interacts with its partners. *Curr Biol* 11, R792-794.

Gregory, P.A., Bracken, C.P., Bert, A.G., and Goodall, G.J. (2008). MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle* 7, 3112-3118.

Gross, I., Bassit, B., Benezra, M., and Licht, J.D. (2001). Mammalian sprouty proteins inhibit cell growth and differentiation by preventing ras activation. *The Journal of biological chemistry* 276, 46460-46468.

Guha, S., Rey, O., and Rozengurt, E. (2002). Neurotensin induces protein kinase C-dependent protein kinase D activation and DNA synthesis in human pancreatic carcinoma cell line PANC-1. *Cancer research* 62, 1632-1640.

Gupta, S., Barrett, T., Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Sluss, H.K., Derijard, B., and Davis, R.J. (1996). Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *Embo J* 15, 2760-2770.

Gupta, S., Campbell, D., Derijard, B., and Davis, R.J. (1995). Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* 267, 389-393.

Hacohen, N., Kramer, S., Sutherland, D., Hiromi, Y., and Krasnow, M.A. (1998). *sprouty* encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the *Drosophila* airways. *Cell* 92, 253-263.

Hall, A.B., Jura, N., DaSilva, J., Jang, Y.J., Gong, D., and Bar-Sagi, D. (2003). hSpry2 is targeted to the ubiquitin-dependent proteasome pathway by c-Cbl. *Curr Biol* 13, 308-314.

Han, Y.C., Zeng, X.X., Wang, R., Zhao, Y., Li, B.L., and Song, M. (2007). [Correlation of p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway to uPA expression in breast cancer]. *Ai Zheng* 26, 48-53.

Hanafusa, H., Torii, S., Yasunaga, T., and Nishida, E. (2002). Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nat Cell Biol* 4, 850-858.

Hatano, N., Mori, Y., Oh-hora, M., Kosugi, A., Fujikawa, T., Nakai, N., Niwa, H., Miyazaki, J., Hamaoka, T., and Ogata, M. (2003). Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development. *Genes Cells* 8, 847-856.

Hayashi, M., Kim, S.W., Imanaka-Yoshida, K., Yoshida, T., Abel, E.D., Eliceiri, B., Yang, Y., Ulevitch, R.J., and Lee, J.D. (2004). Targeted deletion of BMK1/ERK5 in adult mice perturbs vascular integrity and leads to endothelial failure. *J Clin Invest* 113, 1138-1148.

Hayashi, M., and Lee, J.D. (2004). Role of the BMK1/ERK5 signaling pathway: lessons from knockout mice. *J Mol Med (Berl)* 82, 800-808.

Hazan, R.B., and Norton, L. (1998). The epidermal growth factor receptor modulates the interaction of E-cadherin with the actin cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry* 273, 9078-9084.

Hecht, A., Litterst, C.M., Huber, O., and Kemler, R. (1999). Functional characterization of multiple transactivating elements in beta-catenin, some of which interact with the TATA-binding protein in vitro. *The Journal of biological chemistry* 274, 18017-18025.

Huang, P., Han, J., and Hui, L. (2010). MAPK signaling in inflammation-associated cancer development. *Protein Cell* 1, 218-226.

Huber, A.H., Stewart, D.B., Laurents, D.V., Nelson, W.J., and Weis, W.I. (2001). The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover. *The Journal of biological chemistry* 276, 12301-12309.

Hui, L., Bakiri, L., Stepniak, E., and Wagner, E.F. (2007). p38alpha: a suppressor of cell proliferation and tumorigenesis. *Cell Cycle* 6, 2429-2433.

Iglesias, T., and Rozengurt, E. (1998). Protein kinase D activation by mutations within its pleckstrin homology domain. *The Journal of biological chemistry* 273, 410-416.

Iglesias, T., and Rozengurt, E. (1999). Protein kinase D activation by deletion of its cysteine-rich motifs. *FEBS letters* 454, 53-56.

Impagnatiello, M.A., Weitzer, S., Gannon, G., Compagni, A., Cotten, M., and Christofori, G. (2001). Mammalian sprouty-1 and -2 are membrane-anchored phosphoprotein inhibitors of growth factor signaling in endothelial cells. *J Cell Biol* 152, 1087-1098.

Inoue, H., Kato, R., Fukuyama, S., Nonami, A., Taniguchi, K., Matsumoto, K., Nakano, T., Tsuda, M., Matsumura, M., Kubo, M., *et al.* (2005). Spred-1 negatively regulates allergen-induced airway eosinophilia and hyperresponsiveness. *J Exp Med* 201, 73-82.

Ireton, R.C., Davis, M.A., van Hengel, J., Mariner, D.J., Barnes, K., Thoreson, M.A., Anastasiadis, P.Z., Matrisian, L., Bundy, L.M., Sealy, L., *et al.* (2002). A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *J Cell Biol* 159, 465-476.

Jaggi, M., Rao, P.S., Smith, D.J., Wheelock, M.J., Johnson, K.R., Hemstreet, G.P., and Balaji, K.C. (2005). E-cadherin phosphorylation by protein kinase D1/protein kinase C μ is associated with altered cellular aggregation and motility in prostate cancer. *Cancer research* 65, 483-492.

Kabashima, K., and Narumiya, S. (2003). The DP receptor, allergic inflammation and asthma. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 69, 187-194.

Kaibuchi, K., Kuroda, S., Fukata, M., and Nakagawa, M. (1999). Regulation of cadherin-mediated cell-cell adhesion by the Rho family GTPases. *Current opinion in cell biology* 11, 591-596.

Karin, M. (2006). Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 441, 431-436.

Kato, T., Fukushima, M., Kurozumi, S., and Noyori, R. (1986). Antitumor activity of delta 7-prostaglandin A1 and delta 12-prostaglandin J2 in vitro and in vivo. *Cancer research* 46, 3538-3542.

Kato, Y., Kravchenko, V.V., Tapping, R.I., Han, J., Ulevitch, R.J., and Lee, J.D. (1997). BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *Embo J* 16, 7054-7066.

Keirsebilck, A., Bonne, S., Staes, K., van Hengel, J., Nollet, F., Reynolds, A., and van Roy, F. (1998). Molecular cloning of the human p120ctn catenin gene (CTNND1): expression of multiple alternatively spliced isoforms. *Genomics* 50, 129-146.

Kesavan, K., Lobel-Rice, K., Sun, W., Lapadat, R., Webb, S., Johnson, G.L., and Garrington, T.P. (2004). MEK2 regulates the coordinate activation of ERK5 and JNK in response to FGF-2 in fibroblasts. *J Cell Physiol* 199, 140-148.

Kim, I.K., Lee, J.H., Sohn, H.W., Kim, H.S., and Kim, S.H. (1993). Prostaglandin A2 and delta 12-prostaglandin J2 induce apoptosis in L1210 cells. *FEBS letters* 321, 209-214.

King, J.A., Straffon, A.F., D'Abaco, G.M., Poon, C.L., I, S.T., Smith, C.M., Buchert, M., Corcoran, N.M., Hall, N.E., Callus, B.A., *et al.* (2005). Distinct requirements for the

Sprouty domain for functional activity of Spred proteins. *The Biochemical journal* 388, 445-454.

Koch, C.A., Anderson, D., Moran, M.F., Ellis, C., and Pawson, T. (1991). SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* 252, 668-674.

Kondo, M., Oya-Ito, T., Kumagai, T., Osawa, T., and Uchida, K. (2001). Cyclopentenone prostaglandins as potential inducers of intracellular oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* 276, 12076-12083.

Kumar, S., Boehm, J., and Lee, J.C. (2003). p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nature reviews* 2, 717-726.

Kumazawa, M., Iida, H., Uchida, M., Iida, M., Takenaka, M., and Dohi, S. (2007). The comparative effects of intravenous nicardipine and prostaglandin E1 on the cerebral pial arteriolar constriction seen after unclamping of an aortic cross-clamp in rabbits. *Anesth Analg* 104, 659-665.

Kwabi-Addo, B., Wang, J., Erdem, H., Vaid, A., Castro, P., Ayala, G., and Ittmann, M. (2004). The expression of Sprouty1, an inhibitor of fibroblast growth factor signal transduction, is decreased in human prostate cancer. *Cancer research* 64, 4728-4735.

Lao, D.H., Chandramouli, S., Yusoff, P., Fong, C.W., Saw, T.Y., Tai, L.P., Yu, C.Y., Leong, H.F., and Guy, G.R. (2006). A Src homology 3-binding sequence on the C terminus of Sprouty2 is necessary for inhibition of the Ras/ERK pathway downstream of fibroblast growth factor receptor stimulation. *The Journal of biological chemistry* 281, 29993-30000.

Li, L.C., Okino, S.T., Zhao, H., Pookot, D., Place, R.F., Urakami, S., Enokida, H., and Dahiya, R. (2006). Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17337-17342.

Lickert, H., Bauer, A., Kemler, R., and Stappert, J. (2000). Casein kinase II phosphorylation of E-cadherin increases E-cadherin/beta-catenin interaction and strengthens cell-cell adhesion. *The Journal of biological chemistry* 275, 5090-5095.

Lim, J., Wong, E.S., Ong, S.H., Yusoff, P., Low, B.C., and Guy, G.R. (2000). Sprouty proteins are targeted to membrane ruffles upon growth factor receptor tyrosine kinase activation. Identification of a novel translocation domain. *The Journal of biological chemistry* 275, 32837-32845.

Lito, P., Mets, B.D., Appledorn, D.M., Maher, V.M., and McCormick, J.J. (2009). Sprouty 2 regulates DNA damage-induced apoptosis in Ras-transformed human fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* 284, 848-854.

Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G.H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X., and He, X. (2002). Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108, 837-847.

Lo, T.L., Fong, C.W., Yusoff, P., McKie, A.B., Chua, M.S., Leung, H.Y., and Guy, G.R. (2006). Sprouty and cancer: the first terms report. *Cancer Lett* 242, 141-150.

Lo, T.L., Yusoff, P., Fong, C.W., Guo, K., McCaw, B.J., Phillips, W.A., Yang, H., Wong, E.S., Leong, H.F., Zeng, Q., *et al.* (2004). The ras/mitogen-activated protein kinase pathway inhibitor and likely tumor suppressor proteins, sprouty 1 and sprouty 2 are deregulated in breast cancer. *Cancer research* 64, 6127-6136.

Longley, D.B., Harkin, D.P., and Johnston, P.G. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 3, 330-338.

Mak, P., Jaggi, M., Syed, V., Chauhan, S.C., Hassan, S., Biswas, H., and Balaji, K.C. (2008). Protein kinase D1 (PKD1) influences androgen receptor (AR) function in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 373, 618-623.

Martinez, N., Garcia-Dominguez, C.A., Domingo, B., Oliva, J.L., Zarich, N., Sanchez, A., Gutierrez-Eisman, S., Llopis, J., and Rojas, J.M. (2007). Sprouty2 binds Grb2 at two different proline-rich regions, and the mechanism of ERK inhibition is independent of this interaction. *Cell Signal* 19, 2277-2285.

Mazzucchelli, C., Vantaggiato, C., Ciamei, A., Fasano, S., Pakhotin, P., Krezel, W., Welzl, H., Wolfer, D.P., Pages, G., Valverde, O., *et al.* (2002). Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron* 34, 807-820.

Mellor, H., and Parker, P.J. (1998). The extended protein kinase C superfamily. *The Biochemical journal* 332 (Pt 2), 281-292.

Meng, S., Zhang, M., Pan, W., Li, Z., Anderson, D.H., Zhang, S., Ge, B., and Wang, C. (2012). Tyrosines 303/343/353 within the Sprouty-related domain of Spred2 are essential for its interaction with p85 and inhibitory effect on Ras/ERK activation. *Int J Biochem Cell Biol* 44, 748-758.

Meng, W., and Takeichi, M. (2009). Adherens junction: molecular architecture and regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a002899.

Minowada, G., Jarvis, L.A., Chi, C.L., Neubuser, A., Sun, X., Hacoen, N., Krasnow, M.A., and Martin, G.R. (1999). Vertebrate Sprouty genes are induced by FGF signaling and can cause chondrodysplasia when overexpressed. *Development* 126, 4465-4475.

Mody, N., Campbell, D.G., Morrice, N., Peggie, M., and Cohen, P. (2003). An analysis of the phosphorylation and activation of extracellular-signal-regulated protein kinase 5 (ERK5) by mitogen-activated protein kinase kinase 5 (MKK5) in vitro. *The Biochemical journal* 372, 567-575.

Nathke, I.S., Hinck, L., Swedlow, J.R., Papkoff, J., and Nelson, W.J. (1994). Defining interactions and distributions of cadherin and catenin complexes in polarized epithelial cells. *J Cell Biol* 125, 1341-1352.

Newton, A.C. (1997). Regulation of protein kinase C. *Current opinion in cell biology* 9, 161-167.

Nishita, M., Hashimoto, M.K., Ogata, S., Laurent, M.N., Ueno, N., Shibuya, H., and Cho, K.W. (2000). Interaction between Wnt and TGF-beta signalling pathways during formation of Spemann's organizer. *Nature* 403, 781-785.

Nobuhisa, I., Kato, R., Inoue, H., Takizawa, M., Okita, K., Yoshimura, A., and Taga, T. (2004). Spred-2 suppresses aorta-gonad-mesonephros hematopoiesis by inhibiting MAP kinase activation. *J Exp Med* 199, 737-742.

Nonami, A., Kato, R., Taniguchi, K., Yoshiga, D., Taketomi, T., Fukuyama, S., Harada, M., Sasaki, A., and Yoshimura, A. (2004). Spred-1 negatively regulates interleukin-3-

mediated ERK/mitogen-activated protein (MAP) kinase activation in hematopoietic cells. *The Journal of biological chemistry* 279, 52543-52551.

Ohkubo, T., and Ozawa, M. (1999). p120(ctn) binds to the membrane-proximal region of the E-cadherin cytoplasmic domain and is involved in modulation of adhesion activity. *The Journal of biological chemistry* 274, 21409-21415.

Oliva, J.L., Perez-Sala, D., Castrillo, A., Martinez, N., Canada, F.J., Bosca, L., and Rojas, J.M. (2003). The cyclopentenone 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 binds to and activates H-Ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4772-4777.

Ono, K., and Han, J. (2000). The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* 12, 1-13.

Pages, G., Guerin, S., Grall, D., Bonino, F., Smith, A., Anjuere, F., Auberger, P., and Pouyssegur, J. (1999). Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* 286, 1374-1377.

Palmer, H.G., Larriba, M.J., Garcia, J.M., Ordonez-Moran, P., Pena, C., Peiro, S., Puig, I., Rodriguez, R., de la Fuente, R., Bernad, A., *et al.* (2004). The transcription factor SNAIL represses vitamin D receptor expression and responsiveness in human colon cancer. *Nat Med* 10, 917-919.

Park, S.M., Gaur, A.B., Lengyel, E., and Peter, M.E. (2008). The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev* 22, 894-907.

Parra, M., Kasler, H., McKinsey, T.A., Olson, E.N., and Verdin, E. (2005). Protein kinase D1 phosphorylates HDAC7 and induces its nuclear export after T-cell receptor activation. *The Journal of biological chemistry* 280, 13762-13770.

Pearson, L.L., Castle, B.E., and Kehry, M.R. (2001). CD40-mediated signaling in monocytic cells: up-regulation of tumor necrosis factor receptor-associated factor mRNAs and activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Int Immunol* 13, 273-283.

Pena, C., Garcia, J.M., Silva, J., Garcia, V., Rodriguez, R., Alonso, I., Millan, I., Salas, C., de Herreros, A.G., Munoz, A., *et al.* (2005). E-cadherin and vitamin D receptor regulation by SNAIL and ZEB1 in colon cancer: clinicopathological correlations. *Hum Mol Genet* 14, 3361-3370.

Place, R.F., Li, L.C., Pookot, D., Noonan, E.J., and Dahiya, R. (2008). MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1608-1613.

Pouyssegur, J., Volmat, V., and Lenormand, P. (2002). Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochemical pharmacology* 64, 755-763.

Presta, M., Dell'Era, P., Mitola, S., Moroni, E., Ronca, R., and Rusnati, M. (2005). Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 159-178.

Raftery, L., Sanoff, H.K., and Goldberg, R. (2008). Colon cancer in older adults. *Semin Oncol* 35, 561-568.

Renedo, M., Gayarre, J., Garcia-Dominguez, C.A., Perez-Rodriguez, A., Prieto, A., Canada, F.J., Rojas, J.M., and Perez-Sala, D. (2007). Modification and activation of Ras proteins by electrophilic prostanoids with different structure are site-selective. *Biochemistry* 46, 6607-6616.

Reynolds, A.B., Daniel, J., McCrea, P.D., Wheelock, M.J., Wu, J., and Zhang, Z. (1994). Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. *Mol Cell Biol* 14, 8333-8342.

Reynolds, A.B., Roesel, D.J., Kanner, S.B., and Parsons, J.T. (1989). Transformation-specific tyrosine phosphorylation of a novel cellular protein in chicken cells expressing oncogenic variants of the avian cellular src gene. *Mol Cell Biol* 9, 629-638.

Roberts, O.L., Holmes, K., Muller, J., Cross, D.A., and Cross, M.J. (2009). ERK5 and the regulation of endothelial cell function. *Biochem Soc Trans* 37, 1254-1259.

Rolin, S., Masereel, B., and Dogne, J.M. (2006). Prostanoids as pharmacological targets in COPD and asthma. *Eur J Pharmacol* 533, 89-100.

Rossi, A., Elia, G., and Santoro, M.G. (1997). Inhibition of nuclear factor kappa B by prostaglandin A1: an effect associated with heat shock transcription factor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 746-750.

Roura, S., Miravet, S., Piedra, J., Garcia de Herreros, A., and Dunach, M. (1999). Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* *274*, 36734-36740.

Rubin, C., Litvak, V., Medvedovsky, H., Zwang, Y., Lev, S., and Yarden, Y. (2003). Sprouty fine-tunes EGF signaling through interlinked positive and negative feedback loops. *Curr Biol* *13*, 297-307.

Saba-El-Leil, M.K., Vella, F.D., Vernay, B., Voisin, L., Chen, L., Labrecque, N., Ang, S.L., and Meloche, S. (2003). An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development. *EMBO Rep* *4*, 964-968.

Sabapathy, K., Jochum, W., Hochedlinger, K., Chang, L., Karin, M., and Wagner, E.F. (1999). Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2. *Mech Dev* *89*, 115-124.

Sanchez-Gomez, F.J., Cernuda-Morollon, E., Stamatakis, K., and Perez-Sala, D. (2004). Protein thiol modification by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 addition in mesangial cells: role in the inhibition of pro-inflammatory genes. *Mol Pharmacol* *66*, 1349-1358.

Sanchez-Prieto, R., Rojas, J.M., Taya, Y., and Gutkind, J.S. (2000). A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the transcriptional activation of p53 on genotoxic stress by chemotherapeutic agents. *Cancer research* *60*, 2464-2472.

Sanchez, A., Setien, F., Martinez, N., Oliva, J.L., Herranz, M., Fraga, M.F., Alaminos, M., Esteller, M., and Rojas, J.M. (2008). Epigenetic inactivation of the ERK inhibitor Spry2 in B-cell diffuse lymphomas. *Oncogene* *27*, 4969-4972.

Santoro, M.G. (1997). Antiviral activity of cyclopentenone prostanoids. *Trends Microbiol* *5*, 276-281.

Sasaki, A., Taketomi, T., Kato, R., Saeki, K., Nonami, A., Sasaki, M., Kuriyama, M., Saito, N., Shibuya, M., and Yoshimura, A. (2003). Mammalian Sprouty4 suppresses Ras-independent ERK activation by binding to Raf1. *Nat Cell Biol* 5, 427-432.

Sasaki, A., Taketomi, T., Wakioka, T., Kato, R., and Yoshimura, A. (2001). Identification of a dominant negative mutant of Sprouty that potentiates fibroblast growth factor- but not epidermal growth factor-induced ERK activation. *The Journal of biological chemistry* 276, 36804-36808.

Shan, Z.Z., Masuko-Hongo, K., Dai, S.M., Nakamura, H., Kato, T., and Nishioka, K. (2004). A potential role of 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 for induction of human articular chondrocyte apoptosis in arthritis. *The Journal of biological chemistry* 279, 37939-37950.

Shibamoto, S., Hayakawa, M., Takeuchi, K., Hori, T., Miyazawa, K., Kitamura, N., Johnson, K.R., Wheelock, M.J., Matsuyoshi, N., Takeichi, M., *et al.* (1995). Association of p120, a tyrosine kinase substrate, with E-cadherin/catenin complexes. *J Cell Biol* 128, 949-957.

Shibata, T., Ochiai, A., Kanai, Y., Akimoto, S., Gotoh, M., Yasui, N., Machinami, R., and Hirohashi, S. (1996). Dominant negative inhibition of the association between beta-catenin and c-erbB-2 by N-terminally deleted beta-catenin suppresses the invasion and metastasis of cancer cells. *Oncogene* 13, 883-889.

Shim, K., Minowada, G., Coling, D.E., and Martin, G.R. (2005). Sprouty2, a mouse deafness gene, regulates cell fate decisions in the auditory sensory epithelium by antagonizing FGF signaling. *Dev Cell* 8, 553-564.

Shiraki, T., Kamiya, N., Shiki, S., Kodama, T.S., Kakizuka, A., and Jingami, H. (2005). Alpha,beta-unsaturated ketone is a core moiety of natural ligands for covalent binding to peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *The Journal of biological chemistry* 280, 14145-14153.

Sohn, S.J., Sarvis, B.K., Cado, D., and Winoto, A. (2002). ERK5 MAPK regulates embryonic angiogenesis and acts as a hypoxia-sensitive repressor of vascular endothelial growth factor expression. *The Journal of biological chemistry* 277, 43344-43351.

- Song, J., Li, J., Qiao, J., Jain, S., Mark Evers, B., and Chung, D.H. (2009). PKD prevents H₂O₂-induced apoptosis via NF- κ B and p38 MAPK in RIE-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 378, 610-614.
- Specenier, P., and Vermorken, J.B. (2010). Advances in the systemic treatment of head and neck cancers. *Curr Opin Oncol* 22, 200-205.
- Stiewe, T. (2007). The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 7, 165-168.
- Storz, P., Doppler, H., and Toker, A. (2004). Activation loop phosphorylation controls protein kinase D-dependent activation of nuclear factor κ B. *Mol Pharmacol* 66, 870-879.
- Storz, P., and Toker, A. (2003). Protein kinase D mediates a stress-induced NF- κ B activation and survival pathway. *Embo J* 22, 109-120.
- Stowe, I.B., Mercado, E.L., Stowe, T.R., Bell, E.L., Oses-Prieto, J.A., Hernandez, H., Burlingame, A.L., and McCormick, F. (2012). A shared molecular mechanism underlies the human rasopathies Legius syndrome and Neurofibromatosis-1. *Genes Dev* 26, 1421-1426.
- Strauss, K.I., Barbe, M.F., Marshall, R.M., Raghupathi, R., Mehta, S., and Narayan, R.K. (2000). Prolonged cyclooxygenase-2 induction in neurons and glia following traumatic brain injury in the rat. *J Neurotrauma* 17, 695-711.
- Sumara, G., Formentini, I., Collins, S., Sumara, I., Windak, R., Bodenmiller, B., Ramracheya, R., Caille, D., Jiang, H., Platt, K.A., *et al.* (2009). Regulation of PKD by the MAPK p38 δ in insulin secretion and glucose homeostasis. *Cell* 136, 235-248.
- Takeishi, Y., Abe, J., Lee, J.D., Kawakatsu, H., Walsh, R.A., and Berk, B.C. (1999). Differential regulation of p90 ribosomal S6 kinase and big mitogen-activated protein kinase 1 by ischemia/reperfusion and oxidative stress in perfused guinea pig hearts. *Circ Res* 85, 1164-1172.
- Takemaru, K.I., and Moon, R.T. (2000). The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression. *J Cell Biol* 149, 249-254.

Taketomi, T., Yoshiga, D., Taniguchi, K., Kobayashi, T., Nonami, A., Kato, R., Sasaki, M., Sasaki, A., Ishibashi, H., Moriyama, M., *et al.* (2005). Loss of mammalian Sprouty2 leads to enteric neuronal hyperplasia and esophageal achalasia. *Nat Neurosci* 8, 855-857.

Taniguchi, K., Ayada, T., Ichiyama, K., Kohno, R., Yonemitsu, Y., Minami, Y., Kikuchi, A., Maehara, Y., and Yoshimura, A. (2007). Sprouty2 and Sprouty4 are essential for embryonic morphogenesis and regulation of FGF signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 352, 896-902.

Thoreson, M.A., Anastasiadis, P.Z., Daniel, J.M., Ireton, R.C., Wheelock, M.J., Johnson, K.R., Hummingbird, D.K., and Reynolds, A.B. (2000). Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. *J Cell Biol* 148, 189-202.

Toker, A. (1998). Signaling through protein kinase C. *Front Biosci* 3, D1134-1147.

Trimmer, E.E., and Essigmann, J.M. (1999). Cisplatin. *Essays Biochem* 34, 191-211

Tsavachidou, D., Coleman, M.L., Athanasiadis, G., Li, S., Licht, J.D., Olson, M.F., and Weber, B.L. (2004). SPRY2 is an inhibitor of the ras/extracellular signal-regulated kinase pathway in melanocytes and melanoma cells with wild-type BRAF but not with the V599E mutant. *Cancer research* 64, 5556-5559.

Tsukita, S., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., and Tsukita, S. (1993). Submembranous junctional plaque proteins include potential tumor suppressor molecules. *J Cell Biol* 123, 1049-1053.

van der Geer, P., and Pawson, T. (1995). The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction. *Trends Biochem Sci* 20, 277-280.

van Roy, F., and Berx, G. (2008). The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci* 65, 3756-3788.

Vousden, K.H., and Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2, 594-604.

Wagner, E.F., and Nebreda, A.R. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* 9, 537-549.

Wakioka, T., Sasaki, A., Kato, R., Shouda, T., Matsumoto, A., Miyoshi, K., Tsuneoka, M., Komiya, S., Baron, R., and Yoshimura, A. (2001). Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling. *Nature* 412, 647-651.

Warren, C.M., and Landgraf, R. (2006). Signaling through ERBB receptors: multiple layers of diversity and control. *Cell Signal* 18, 923-933.

Weston, C.R., and Davis, R.J. (2007). The JNK signal transduction pathway. *Current opinion in cell biology* 19, 142-149.

Xia, X., Mariner, D.J., and Reynolds, A.B. (2003). Adhesion-associated and PKC-modulated changes in serine/threonine phosphorylation of p120-catenin. *Biochemistry* 42, 9195-9204.

Xu, K., and Shu, H.K. (2007). EGFR activation results in enhanced cyclooxygenase-2 expression through p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of the Sp1/Sp3 transcription factors in human gliomas. *Cancer research* 67, 6121-6129.

Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., and Weinberg, R.A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117, 927-939.

Yao, Y., Li, W., Wu, J., Germann, U.A., Su, M.S., Kuida, K., and Boucher, D.M. (2003). Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12759-12764.

Yoshida, T., Hisamoto, T., Akiba, J., Koga, H., Nakamura, K., Tokunaga, Y., Hanada, S., Kumemura, H., Maeyama, M., Harada, M., *et al.* (2006). Spreds, inhibitors of the Ras/ERK signal transduction, are dysregulated in human hepatocellular carcinoma and linked to the malignant phenotype of tumors. *Oncogene* 25, 6056-6066.

Yost, C., Torres, M., Miller, J.R., Huang, E., Kimelman, D., and Moon, R.T. (1996). The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev* 10, 1443-1454.

Zhang, H., Berezov, A., Wang, Q., Zhang, G., Drebin, J., Murali, R., and Greene, M.I. (2007). ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *J Clin Invest* 117, 2051-2058.

Zhou, G., Bao, Z.Q., and Dixon, J.E. (1995). Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *The Journal of biological chemistry* 270, 12665-12669.

Zhukova, E., Sinnott-Smith, J., and Rozengurt, E. (2001). Protein kinase D potentiates DNA synthesis and cell proliferation induced by bombesin, vasopressin, or phorbol esters in Swiss 3T3 cells. *The Journal of biological chemistry* 276, 40298-40305.

Zugaza, J.L., Sinnott-Smith, J., Van Lint, J., and Rozengurt, E. (1996). Protein kinase D (PKD) activation in intact cells through a protein kinase C-dependent signal transduction pathway. *Embo J* 15, 6220-6230.

ESTUDIO DEL POLIMORFISMO P106S DE SPROUTY2 EN POBLACIÓN DANESA

ANÁLISIS CASOS (CÁNCER DE COLON) VS CONTROLES SANOS

Polimorfismo	Controles	Casos	OR	95% CI	Valor de p
Frecuencias alélicas	36%	33%	0,83 ¹	0,64 – 1,08	0,173
Equilibrio HW: valor de p	0,587	0,405			

MODELO CODOMINANTE

WT	99	119	1,00		
HT	121	125	0,86	0,60 - 1,24	0,417
HH	31	25	0,67	0,37 - 1,21	0,185

MODELO DOMINANTE

WT	99	119	1,00		
HT+HH	121 + 31	125 + 25	0,82	0,58 - 1,16	0,268

MODELO RECESIVO

WT+HT	99 + 121	119 + 125	1,00		
HH	31	25	0,73	0,42 - 1,27	0,263

¹OR por variante alélica

ANÁLISIS SOLO CASOS (DUKES 3 vs DUKES 2)

Polimorfismo	Dukes 2	Dukes 3	OR	95% CI	Valor de p
Frecuencias alélicas	34%	31%	0,88 ¹	0,61 - 1,28	0,510
Equilibrio HW: valor de p	0,250	0,911			

MODELO CODOMINANTE

WT	55	64	1,00		
HT	66	59	0,77	0,46 - 1,27	0,304
HH	12	13	0,93	0,39 - 2,21	0,871

MODELO DOMINANTE

WT	55	64	1,00		
HT+HH	66 + 12	59 + 13	0,79	0,49 - 1,28	0,346

MODELO RECESIVO

WT+HT	55 + 66	64 + 59	1,00		
HH	12	13	1,07	0,47 - 2,42	0,880

¹OR por variante alélica

Sur8 protein regulates neurite outgrowth

Gonzalo León¹, Lucía Sánchez-Ruiloba^{2,3}, Andrea Pérez-Rodríguez¹, Teresa Gragera¹, Natalia Martínez¹, Silvia Hernández¹, Olga Calero^{3,4}, Carlota A. García-Domínguez¹, Lara M. Durá¹, Encarnación Lozano¹, Miguel Calero^{3,4}, Teresa Iglesias^{2,3}, José Luis Oliva^{1,*} and José M. Rojas^{1,*}

¹Unidad de Biología Celular and ⁴Unidad de Encefalopatías Espongiformes, Área de Biología Celular y del Desarrollo, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain.

²Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid, 28029 Madrid, Spain.

³Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas; CIBERNED, Spain.

Running Title: Sur8 is essential for PC12 cell differentiation

Key words: Shoc2 / PC12 / EGF / NGF / ERK

* To whom correspondence should be addressed (both authors contributed equally to this work)

José María Rojas & José Luís Oliva
Unidad de Biología Celular
Área de Biología Celular y del Desarrollo
Centro Nacional de Microbiología
Instituto de Salud Carlos III
carretera Majadahonda-Pozuelo, Km. 2
Majadahonda-28220
MADRID
SPAIN
tel: +34 91 822 3939/3942
fax: +34 91 822 3423
E-mail: jmrojas@isciii.es ; jloliva@isciii.es

ABSTRACT

The Sur8 protein has been implicated in the positive regulation of the Ras-ERK pathway by increasing the functional binding interaction between Ras and Raf, leading to increased ERK activity. Here we found that Sur8 overexpression induced sustained ERK phosphorylation, notably in the case of EGF stimulation, and Sur8 knockdown inhibited ERK activation. We demonstrate that ectopic overexpression of human Sur8 in PC12 cells significantly promotes neurite extension in the presence of EGF, a stimulus that induces proliferation rather than differentiation in these cells. Finally, Sur8 depletion reduces both NGF-induced neurite outgrowth and ERK activation in PC12 cells. Our data indicate that Sur8 is essential to modulate the Ras-ERK signaling outcome in cell differentiation processes involved in neurite outgrowth.

INTRODUCTION

PC12 cells, which are derived from a rat pheochromocytoma, have been used classically as a model to address the biological outcomes due to functional differences of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway (1, 2). This cascade, which involves the Raf, MEK and ERK proteins, can be activated in PC12 cells by two growth factors, epidermal growth factor (EGF) (2), and nerve growth factor (NGF) (3, 4), leading to PC12 proliferation and differentiation, respectively. The duration of ERK signaling is responsible for the distinct biological effects of EGF and NGF stimulation on PC12 cells (1, 2). EGF elicits transient Ras- (and also Rap-) dependent ERK activation (2), yielding PC12 cell proliferation, whereas NGF promotes sustained ERK phosphorylation, which leads to cell differentiation (neurite outgrowth) (2, 5, 6).

Ras proteins (H-, N-, and K-Ras) operate as molecular switches in signal transduction cascades, controlling cell proliferation, differentiation and apoptosis. Ras proteins exist in equilibrium between an active (Ras-GTP) and an inactive (Ras-GDP) state. The action of growth factors increases cellular Ras-GTP levels, enabling interaction of this GTPase with its target protein effectors. Activated Ras stimulates various downstream signaling pathways. A wide range of proteins interact specifically with the Ras-GTP complex, including Raf proteins, members of the Ral-GDS family, PI3K, p120GAP, NF1, MEKK1, Rin1, AF-6, PKC- ζ , and Nore1 (7). For example, Ras-GTP binds directly to Raf proteins, inducing their translocation to membranes where they are activated, in turn triggering induction of the MEK-ERK cascade. Different scaffold proteins bind several components of the Ras/Raf/MEK/ERK cascade, providing molecular signaling platforms, and can thus regulate the Ras-ERK pathway (8, 9).

One of these scaffold proteins is the suppressor of clear homolog (Shoc2) (10), also known as a suppressor of Ras-8 (Sur8) (11). Shoc2/Sur8 is a protein conserved in all metazoans;

it has numerous leucine-rich repeats and selectively binds members of the Ras family (12). Fluorescence resonance energy transfer (FRET) imaging and computational modeling studies showed that Sur8 is essential for Ras-GTP signaling to ERK, because it accelerates the Ras-Raf interaction probably by stabilizing a ternary complex formed by all these proteins (12-14). Furthermore, single mutation of Sur8 causes Noonan-like syndrome, a type of neuro-cardio-facial-cutaneous disorders, by enhancing ERK activation (15). Other group nonetheless proposes an alternative mechanism of action for Sur8, by which this scaffold protein forms a ternary complex with the catalytic subunit of protein phosphatase 1 (PP1c) and M-Ras (a Ras family member), which promotes Raf activity by dephosphorylating its S259 inhibitory residue (16).

Based on Sur8 function as a positive modulator of the ERK-pathway, we hypothesized that this scaffold protein might have a pivotal role in PC12 cell differentiation, a process dependent on sustained ERK activation. Here, we analyzed how ectopic overexpression of Sur8 affects EGF signaling in PC12 cells. Sur8 overexpression renders longer-lasting ERK phosphorylation after EGF stimulation, with a resultant increase in neurite outgrowth. We also found evidence that knockdown of endogenous Sur8 by specific shRNA leads to statistically significant inhibition of NGF-induced PC12 cell differentiation. Our data indicate that the scaffold protein Sur8 contributes to NGF and EGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells.

RESULTS

Ectopic overexpression of Sur8 facilitates sustained ERK activation after stimulation by FGF or EGF.

Sur8 has a synergistic effect on activation of the Ras-Raf-MEK-ERK pathway (12) and is required for rapid Ras interaction with Raf following EGF stimulation (13). Here we examined whether Sur8 overexpression affects the duration of ERK signaling induced by the stimulation of receptor tyrosine kinases (RTK). For this purpose, we stimulated HEK293T cells (transiently transfected with HA-ERK1 and AU5-hSur8) with FGF or EGF, and measured ERK phosphorylation at different times. Sur8 increased not only the ERK activation levels triggered by FGF (Figure 1A) or EGF (Figure 1B), but also the duration of this activation. The kinetics of FGF-induced ERK activation was similar with or without Sur8 overexpression but values increased when Sur8 was overexpressed (Figure 1A), whereas phospho-ERK levels were still detected 4 h post-EGF stimulation in Sur8-transfected cells but for only 30 min in vector-expressing cells (Figure 1B). These data suggest that Sur8 proteins positively regulate the intensity or the duration of ERK activation elicited by EGF and FGF stimulation.

Downregulation of Sur8 reduces phospho-ERK levels induced by RTK activation.

To assess the relevance of Sur8 in the RTK-ERK pathway, we transfected the above cells with siRNA oligonucleotides for Sur8. We observed a reduction in Sur8 protein levels in comparison to HEK293T cells transfected with control siRNA (Figure 2). Sur8 knockdown reduced phospho-ERK levels after stimulation with FGF (Figure 2A), or EGF (Figure 2B), at a rate proportional to the decrease in Sur8 levels. The effects of Sur8 knockdown on EGF/FGF-induced ERK activation support the role of Sur8 as an essential positive-regulator of the RTK-ERK pathway.

Ectopic overexpression of Sur8 enhances EGF-dependent PC12 cell differentiation

ERK signaling duration is a limiting step for the different biological effects of EGF versus NGF in PC12 cells (2, 5, 6). It is tempting to speculate that anything that increases the duration of EGF-dependent ERK activity could modify the EGF effects in PC12 cells. Since Sur8 overexpression increased the duration of EGF-induced ERK activation (Figure 1B), we tested whether Sur8 overexpression in PC12 cells modified the EGF-induced biological fate of these cells. We compared the percentage of cells showing neurites after EGF treatment in PC12 cells transfected with GFP + AU5-hSur8 versus GFP + empty vector (Figure 3 and; Supplemental Figure S1). The percentage of GFP-positive PC12 cells showing neurite outgrowth after EGF treatment was significantly increased in cells overexpressing Sur8 (Figure 3). Ectopic overexpression of Sur8 alone (without EGF or NGF stimulation) was unable to elicit PC12 differentiation (not shown). These results suggest that Sur8 protein modulates the outcome of EGF signaling on PC12 differentiation.

Sur8 downregulation reduces both NGF-induced PC12 differentiation and ERK activation

Sur8 overexpression in PC12 cells had no effect on NGF-stimulated neurite outgrowth (not shown), probably due to the highly sustained NGF-dependent ERK activation in these cells (2, 5, 6). Sur8 could nevertheless be an important factor in NGF-induced PC12 differentiation, given its role in RTK-dependent ERK activation (Figure 2). To test Sur8 effects on PC12 cell differentiation, we downregulated their endogenous levels by shRNA. We transfected PC12 cells with various bi-cistronic expression plasmids carrying specific shRNA to silence rat Sur8, together with cDNA for GFP, and performed a morphological analysis of transfected GFP-positive/shRNA PC12 cells. We observed a sharp reduction in Sur8 protein levels in cells transfected with plasmids 2 and 3 (70% and 80%, respectively) as compared to cells transfected

with control shRNA (Figure 4A). Analysis of NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells transfected with shRNA-Sur8 expression plasmids (2 and 3) or with control shRNA (Figure 4B) showed that shRNA-Sur8 significantly decreased the percentage of cells with neurites (Figure 4C). These results indicate that Sur8 knockdown blocks NGF-promoted PC12 cell differentiation. This reduction of Sur8 protein levels in PC12 cells also correlated with lower ERK activation after NGF stimulation (Figure 5), but had no effect on other kinases such as AKT or GSK3 (Supplemental Figure S2), supporting Sur8 specificity in the ERK pathway. These results show that Sur8 is necessary for appropriate ERK activation and neural differentiation of PC12 cells triggered by neurotrophins such as NGF.

DISCUSSION

The extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway is functionally relevant in converting extracellular stimuli into a wide range of cell responses. ERK-(1/2) are activated by mitogens and are usually upregulated in human tumors (17) and in other pathologies such as Noonan and LEOPARD syndromes (18). This pathway is fine-tuned through different control steps, and Sur8 is one of the players involved. Sur8 is a docking scaffold protein that is conserved in all metazoans, with high binding affinity to Ras and Raf proteins and a synergistic effect on RTK activation of the ERK signaling pathway (12). By accelerating Ras-Raf binding, Sur8 is essential for transmission of the Ras signal to ERK (13). A naturally-occurring human Sur8 mutant was described that yields high phospho-ERK levels, causing a Noonan-like syndrome (15).

Here, we demonstrate that Sur8 is an essential protein for ERK activation, dependent on RTK stimulation. Our results show that downregulation of endogenous Sur8 expression (through specific siRNA and shRNA) significantly reduced phospho-ERK levels after stimulation by FGF, EGF or NGF. Although the role of Sur8 on ERK activation in the EGFR signaling pathway has been described (13, 16, 19), we found the same behavior for Sur8 in other cell systems and for other RTK-dependent signaling routes, such as fibroblast growth factor-receptor (FGFR) and tropomyosin-related kinase (Trk) families. Our results not only are concur with the description of a Sur8 mutant involved in a Noonan-like syndrome by deregulated ERK activation (15), but also with inhibition of the Ras-ERK pathway by Erbin, another protein rich in leucine domains that blocks Sur8 interaction with Raf and Ras, thus down-regulating ERK activation (20).

Based on to the critical role of Sur8 in the RTK-ERK pathway, we showed that ectopic overexpression of Sur8 in epithelial cells was able to increase phospho-ERK levels evoked by

FGF or EGF. We also found that Sur8 overexpression produced persistent ERK activation, with an increase in duration of the effect of ≥ 240 min post-EGFR stimulation. Evidences indicate that differences in ERK activity duration produce variations in signaling that regulate cell fate. ERK signaling duration is a limiting step for the different biological effects of EGF versus NGF in PC12 cells (1, 2). In this cell system, EGF induces rapid, transient ERK activation, eliciting proliferation rather than neurite outgrowth (2); in contrast, NGF induces rapid, sustained ERK phosphorylation that leads to PC12 differentiation (2, 5, 6). It is tempting to speculate that anything that increases the duration of EGF-dependent ERK activity could modify the EGF effects in PC12 cells. Sur8 overexpression produces more persistent EGF-dependent ERK activation, and also enhances EGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells. Although this biological effect is not dramatic, the results obtained were statistically significant and are in agreement with the idea that duration of ERK activity is critical for PC12 cell fate.

Our data suggest that endogenous Sur8 could also be implicated in differentiation processes. Although Sur8 overexpression in PC12 cells had no effect on NGF-stimulated neurite outgrowth, probably due to the highly sustained NGF-dependent ERK activation in these cells (2, 5, 6), Sur8 knockdown significantly reduced both NGF-induced ERK activation and neurite outgrowth. Our data therefore indicate that the Sur8 scaffold protein is essential for appropriate ERK activation and neural differentiation of PC12 cells triggered by neurotrophins such as NGF.

The observation of the same number of GFP-PC12 positive cells at the end of the differentiation assay, independent of their transfection status with shRNA-control-GFP or shRNA-Sur8-GFP plasmids (not shown), suggests that Sur8 downregulation does not affect PC12 cell viability. These results concur with previous reports indicating that PC12 cell survival does not require Ras-ERK pathway activity, but it is instead dependent on PI3K signaling (21) which is unaltered by Sur8 knockdown (Supplemental Figure S2).

The role of Sur8 in differentiation processes could explain both the effects of a dominant mutant form of this protein in developmental disorders such as the Noonan-like syndrome (15), and the defects of the atrioventricular canal that cause early embryonic lethality when the *Shoc2/Sur8* gene is inactivated in mouse endothelial cells (22). Besides being a scaffold protein essential for the RTK-dependent ERK activation pathway, Sur8 could have other roles due to its presence in nuclei (15) that we have observed during PC12 differentiation (García-Domínguez CA et al., manuscript in preparation).

In conclusion, our data support positive modulation by Sur8 of RTK-induced ERK activation. The functional role of this protein could be relevant in the context of variations in Ras-Raf-ERK signaling that regulate cell differentiation processes. Future studies might show Sur8 protein to be useful as target for the design of new therapeutic drugs for several diseases.

MATERIAL AND METHODS

Cell lines

HEK293T cells were maintained in DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Invitrogen); these cells were analyzed after bFGF or EGF stimulation as described (23, 24). PC12 rat pheochromocytoma cells were cultured on collagen-coated plates using DMEM supplemented with 7.5 % FCS, 7.5 % horse serum (Invitrogen), 2 mM glutamine and 1% penicillin/streptomycin. PC12 cells were allowed to differentiate for 1-3 days by adding NGF (100 ng/ml) or EGF (100 ng/ml).

Antibodies and reagents

Rabbit polyclonal antibodies to ERK (ERK1/ERK2) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), anti-phospho-ERK protein was from New England Biolabs (Beverly, MA) and anti-Sur8 from Tebu-Bio (Le-Perray-en-Yvelines, France). Anti-HA and AU5 monoclonal antibodies (mAb) were purchased from Berkeley Antibody Company (Berkeley, CA). Anti β -actin mAb, and recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF), nerve growth factor (NGF), and epidermal growth factor (EGF) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Anti-mouse and rabbit HRP-conjugated mAb were from GE Healthcare Bio-Sciences (Piscataway, NJ).

DNA constructs

The plasmids pCEFL-KZ-HA, pCEFL-KZ-AU5, and pCEFL-KZ-HA-ERK (1 and 2), have been described (23, 24); the pEGFP-C1 plasmid was purchased from Invitrogen. The plasmid containing hSur8 was kindly provided by Dr. Min Han (University of Colorado, Boulder, CO), and Sur8 cDNA was amplified by PCR using specific primers providing Bam HI and Not I sites

at the 5' and 3' ends, respectively. The amplified products were then subcloned into Bgl II and Not I sites within pCEFL-KZ-AU5. SureSilencing plasmids containing different shRNA for rat Sur8 and GFP marker were purchased from SA Biosciences (NM_0011013155): plasmid n° 1 (aagctgtcaatcatgagtatt), plasmid n°2 (tgaaggacaatcagttaacat), plasmid n°3 (ggatgaactgttaacctatt), and control plasmid (ggaatctcattcgatgcatac). Small interfering RNA (siRNA) for human Sur8 were from Applied Biosystems (Carlsbad, CA). The oligonucleotides synthesized corresponded to the human Sur8 encoding region of exon 8.

Transient transfection assays

PC12 cells were nucleofected with shRNA plasmids using the *Amaxa kit V* (VCA-1003) following manufacturer's instructions. PC12 cells were transiently transfected with pCEFL-KZ-AU5-Sur8 or pCEFL-KZ-HA-ERK-1 plasmids using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to manufacturer's protocols. HEK293T cells were transiently transfected with pCEFL-KZ-AU5-Sur8 or pCEFL-KZ-HA-ERK-1/ERK-2 plasmids using Jet-Pei (Polyplus-Transfection, Illkirch, France). All assays were performed 48 h post-transfection. The siRNA duplexes (100 nM) were transfected into HEK293T cells using X-treamGENE siRNA transfection reagent (Roche, Basel, Switzerland).

Immunoprecipitation and immunoblotting

Immunoprecipitation and immunoblot analysis were performed as described (23, 24). Protein extracts were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell) and probed with the appropriate antibody. Blots were developed by a peroxidase reaction using the ECL detection system (GE Healthcare Bio-Sciences).

In vitro quantitative detection of intracellular phospho-ERK, total ERK and other kinases

Total ERK1/2, AKT, and GSK-3 β and their phosphorylated forms phospho-ERK1/2 (pTpY185/187), phospho-AKT (pS473), and phospho-GSK-3 β (pS9) were simultaneously quantitated by xMAP technology on a Luminex 200 platform (Bio-Plex-200, BioRad) using two independent panels custom developed and validated by Biosource. For these experiments, PC12 cells were lysed in Cell Extraction Buffer (Invitrogen) containing 10 mM Tris, pH 7.4, 2 mM Na₃VO₄, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EGTA, 20 mM Na₄P₂O₇, 10% glycerol, 1 mM NaF, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, with protease inhibitors (CompleteTM from Roche and 1mM PMSF). Cell extracts (2 μ g) were analyzed in duplicate according to manufacturer's instructions. The concentration for each analyte was determined by interpolating the mean fluorescence intensity (MFI) for each sample from a standard curve using Bio-Plex System Software and a five-parameter logistic weighting algorithm.

Neurite outgrowth assay

PC12 cells plated onto collagen-coated coverslips in 12-well dishes were transiently transfected and stimulated with NGF (100 ng/ml) or EGF (100 ng/ml) for 72 h. Cells were washed with phosphate-buffered saline before and after being fixed with 4% paraformaldehyde (10 min) and permeabilized with 0.2% Triton X-100 (10 min). Transfected cells were detected by GFP-fluorescence. Alternatively, cells were incubated with anti-AU5 mAb (1h, room temperature). After several washes, cells were incubated with Alexa 488-conjugated secondary antibodies (Molecular Probes, Invitrogen; 1h, room temperature). Cells (50 to 100/condition) were analyzed in a Nikon Eclipse TE200-U microscope. Cells with and without neurites were then counted. Total neurite length from each cell was measured using ImageJ software (National Institutes of Health). Image capture and analyses were performed blind to the experimental conditions. Neurite outgrowth was defined as a process equal to or greater than one cell body in length for EGF treatment, and equal to or greater than two cell bodies in length for NGF

treatment.

Statistical analysis

Data were analyzed statistically using the SPSS software (Chicago, IL). Results are displayed as mean \pm SD of the corresponding number of experiments. Statistical significance was estimated by Student's *t* test for unpaired observations; $p < 0.05$ was considered significant. For immunoblot analysis, we used linear correlations between increasing levels of protein and its signal intensity.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Min Han for providing the hSur8 plasmid. We thank Drs. C. Mark and A. Toraño for the critical reading of this manuscript. GL, TG and LMD were fellows from MEC (GL, TG), and FIS (LMD). LSR held a postdoctoral research contract from CIBERNED. This work was supported by FIS grant (PI08/0642) to EL; CIBERNED to MC; FIS (PI10/00815) to JLO; SAF2008-01951, CAM S-SAL-0202-2006-01 and CIBERNED to TI; and SAF2006-04247, FIS (PI09/0562), RETIC (RD06/0020/0003), and AECC-grant to JMR.

REFERENCES

1. Vaudry D, Stork PJ, Lazarovici P, Eiden LE. Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections. *Science* 2002;296(5573):1648-9.
2. Santos SD, Verveer PJ, Bastiaens PI. Growth factor-induced MAPK network topology shapes Erk response determining PC-12 cell fate. *Nat Cell Biol* 2007;9(3):324-30.
3. Chao MV, Hempstead BL. p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci* 1995;18(7):321-6.
4. D'Arcangelo G, Halegoua S. A branched signaling pathway for nerve growth factor is revealed by Src-, Ras-, and Raf-mediated gene inductions. *Mol Cell Biol* 1993;13(6):3146-55.
5. Qui MS, Green SH. PC12 cell neuronal differentiation is associated with prolonged p21ras activity and consequent prolonged ERK activity. *Neuron* 1992;9(4):705-17.
6. York RD, Molliver DC, Grewal SS, Stenberg PE, McCleskey EW, Stork PJ. Role of phosphoinositide 3-kinase and endocytosis in nerve growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase activation via Ras and Rap1. *Mol Cell Biol* 2000;20(21):8069-83.
7. Rojas JM, Santos E. Ras genes and human cancer: different implications and different roles. *Current Genomics* 2002;3:295-311.
8. Shaw AS, Filbert EL. Scaffold proteins and immune-cell signalling. *Nat Rev Immunol* 2009;9(1):47-56.
9. Bashor CJ, Helman NC, Yan S, Lim WA. Using engineered scaffold interactions to reshape MAP kinase pathway signaling dynamics. *Science* 2008;319(5869):1539-43.
10. Selfors LM, Schutzman JL, Borland CZ, Stern MJ. soc-2 encodes a leucine-rich repeat protein implicated in fibroblast growth factor receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(12):6903-8.
11. Sieburth DS, Sun Q, Han M. SUR-8, a conserved Ras-binding protein with leucine-rich repeats, positively regulates Ras-mediated signaling in *C. elegans*. *Cell* 1998;94(1):119-30.
12. Li W, Han M, Guan KL. The leucine-rich repeat protein SUR-8 enhances MAP kinase activation and forms a complex with Ras and Raf. *Genes Dev* 2000;14(8):895-900.
13. Matsunaga-Udagawa R, Fujita Y, Yoshiki S, Terai K, Kamioka Y, Kiyokawa E, et al. The scaffold protein Shoc2/SUR-8 accelerates the interaction of Ras and Raf. *J Biol Chem* 2010;285(10):7818-26.
14. Yoshiki S, Matsunaga-Udagawa R, Aoki K, Kamioka Y, Kiyokawa E, Matsuda M. Ras and calcium signaling pathways converge at Raf1 via the Shoc2 scaffold protein. *Mol Biol Cell* 2010;21(6):1088-96.
15. Cordeddu V, Di Schiavi E, Pennacchio LA, Ma'ayan A, Sarkozy A, Fodale V, et al. Mutation of SHOC2 promotes aberrant protein N-myristoylation and causes Noonan-like syndrome with loose anagen hair. *Nat Genet* 2009;41(9):1022-6.
16. Rodriguez-Viciano P, Oses-Prieto J, Burlingame A, Fried M, McCormick F. A phosphatase holoenzyme comprised of Shoc2/Sur8 and the catalytic subunit of PP1 functions as an M-Ras effector to modulate Raf activity. *Mol Cell* 2006;22(2):217-30.
17. Sebolt-Leopold JS, Herrera R. Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4(12):937-47.
18. Cesarini L, Alfieri P, Pantaleoni F, Vasta I, Cerutti M, Petrangeli V, et al. Cognitive profile of disorders associated with dysregulation of the RAS/MAPK signaling cascade. *Am J Med Genet A* 2009;149A(2):140-6.
19. Anselmo AN, Bumeister R, Thomas JM, White MA. Critical contribution of linker proteins to Raf kinase activation. *J Biol Chem* 2002;277(8):5940-3.
20. Dai P, Xiong WC, Mei L. Erbin inhibits RAF activation by disrupting the sur-8-Ras-Raf complex. *J Biol Chem* 2006;281(2):927-33.

21. Klesse LJ, Meyers KA, Marshall CJ, Parada LF. Nerve growth factor induces survival and differentiation through two distinct signaling cascades in PC12 cells. *Oncogene* 1999;18(12):2055-68.
22. Yi J, Chen M, Wu X, Yang X, Xu T, Zhuang Y, et al. Endothelial SUR-8 acts in an ERK-independent pathway during atrioventricular cushion development. *Dev Dyn* 2010;239(7):2005-13.
23. Zarich N, Oliva JL, Martinez N, Jorge R, Ballester A, Gutierrez-Eisman S, et al. Grb2 Is a Negative Modulator of the Intrinsic Ras-GEF Activity of hSos1. *Mol. Biol. Cell* 2006;17(8):3591-3597.
24. Martinez N, Garcia-Dominguez CA, Domingo B, Oliva JL, Zarich N, Sanchez A, et al. Sprouty2 binds Grb2 at two different proline-rich regions, and the mechanism of ERK inhibition is independent of this interaction. *Cellular Signalling* 2007;19(11):2277-2285.

FIGURE LEGENDS**Figure 1. Sur8 overexpression enhances the intensity and duration of RTK-elicited ERK activation.**

HEK293T cells transiently co-transfected with 1 μ g pCEFL-KZ-HA-ERK1 and 2 μ g pCEFL-KZ-AU5-hSur8 (Sur8) or 2 μ g pCEFL-KZ-AU5 (-) were serum-starved for 18 h and then incubated with vehicle (0), 25 ng/ml FGF (A), or 10 ng/ml EGF (B), for 5 to 240 min. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-HA antibody and analyzed by immunoblot using anti-p-ERK and -HA antibodies, to determine p-ERK1 and total HA-ERK1. Expression levels of transfected AU5-hSur8 constructs were detected by immunoblotting whole cell extracts (WCL) with the appropriate anti-AU5 antibody (lower blot). Results were similar in three independent experiments. Graphics in each panel represent the time-course of ERK1 activation after stimulation with FGF (A) or EGF (B). Points indicate the ratio of p-ERK1/HA-ERK levels, estimated as the mean of three separate assays (in all cases with a SD \leq 10% of the mean).

Figure 2. Sur8 depletion reduces phospho-ERK levels induced by RTK activation.

HEK293T cells were transiently transfected (100 nM) with either control siRNA (siRNA-control) or human Sur8-specific siRNA (siRNA-Sur8). At 48 h post-transfection, cells were serum-starved for 18 h and then incubated with vehicle (0), 5-25 ng/ml FGF (A), or 10-100 ng/ml EGF (B) for 10 min. Cell lysates were analyzed by immunoblot using anti-p-ERK and -ERK antibodies. *X*-fold increase denotes the ratio p-ERK/ERK levels estimated as the mean of four separate assays (in all cases with a SD \leq 10% of the mean). Sur8 levels were also determined using anti-Sur8 polyclonal antibody and normalized to total ERK levels, expressed as a percentage (bottom histograms). Results were similar in three additional experiments.

Figure 3. Sur8 overexpression increases EGF-induced PC12 differentiation.

A), PC12 cells were co-transfected with plasmids pCEFL-KZ-GFP (0.3 μ g) and pCEFL-KZ-AU5 (0.7 μ g) (top: GFP + EGF) or pCEFL-KZ-GFP (0.3 μ g) and pCEFL-KZ-AU5-hSur8 (0.7 μ g) (bottom: Sur8-GFP + EGF). Transfected PC12 cells were stimulated with EGF (100 ng/ml) for 72 h, fixed, and the presence of extending neurites was analyzed in GFP-positive cells by fluorescence microscopy (right: white arrows). Total cells were visualized with transmitted-light (left). A process equal in length or greater than one cell body was considered a neurite; bars, 10 μ m. PC12 cells co-transfected with pCEFL-KZ-GFP and pCEFL-KZ-AU5-hSur8 but not stimulated with EGF or NGF did not have neurites (not shown). **B)**, histograms represent the percentage of transfected PC12 cells (GFP-positive: GFP vs Sur8-GFP) with neurites after EGF treatment; values are the mean of three separate assays, in which at least 50 GFP-positive cells/assay were analyzed (* $p < 0.01$); bars show SD.

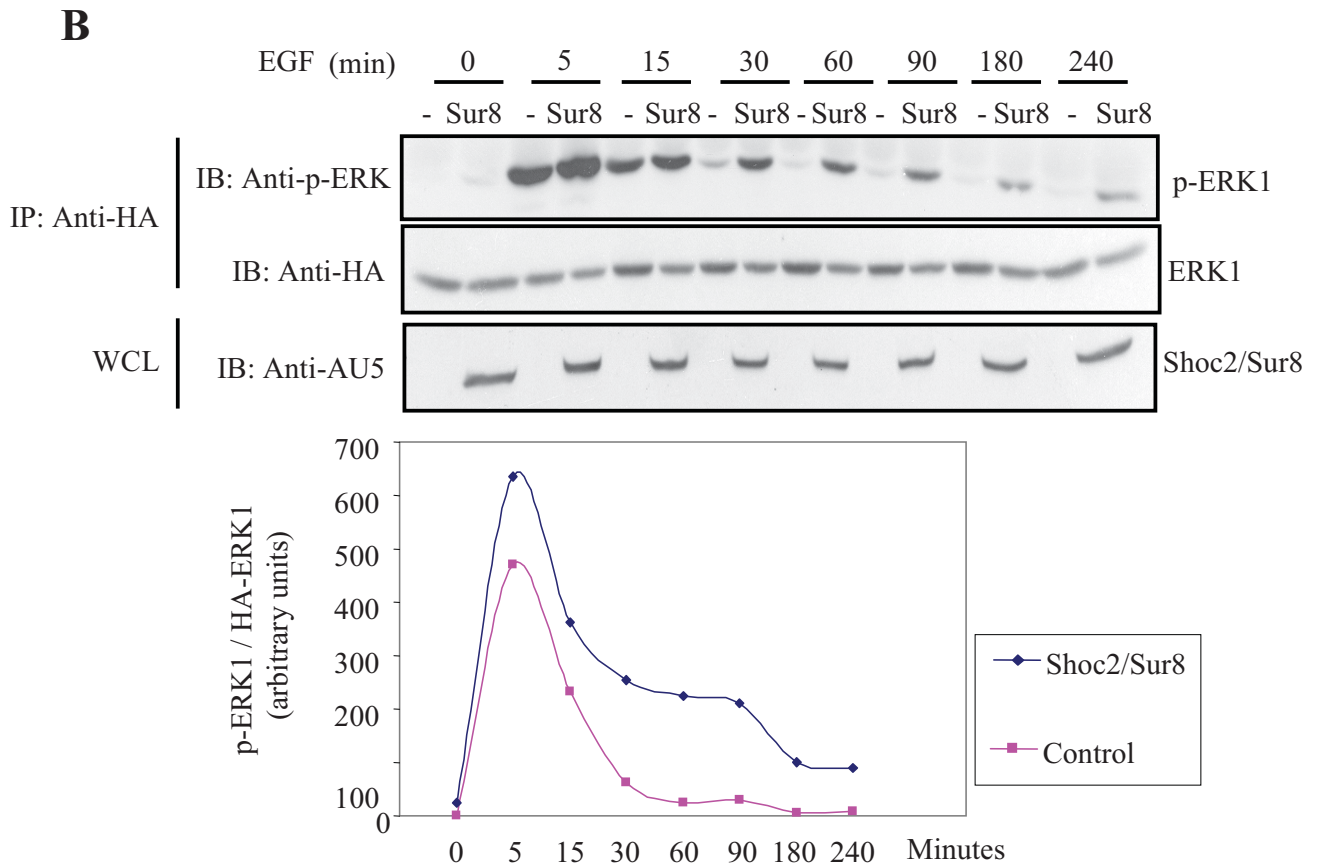
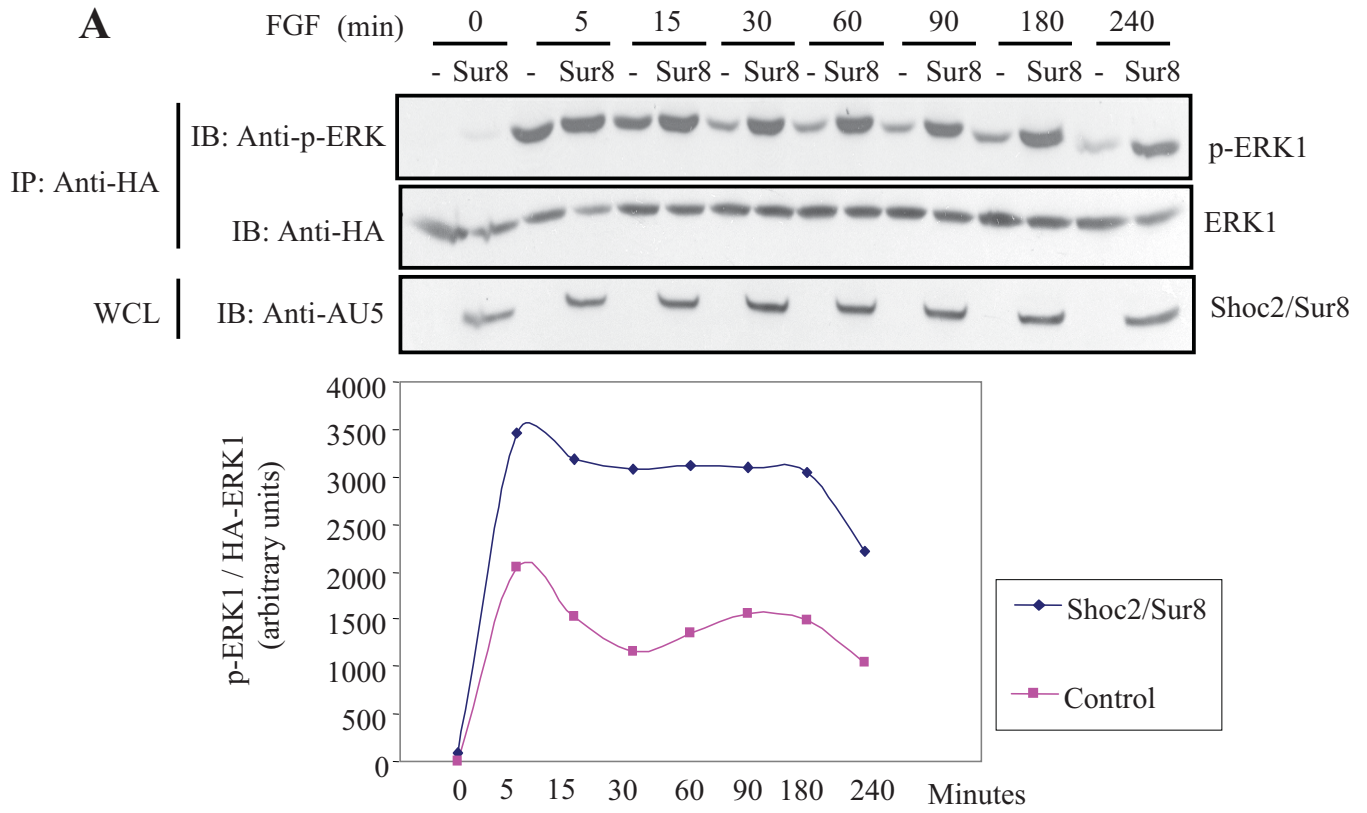
Figure 4. Sur8 knockdown reduces NGF-elicited of PC12 cell differentiation.

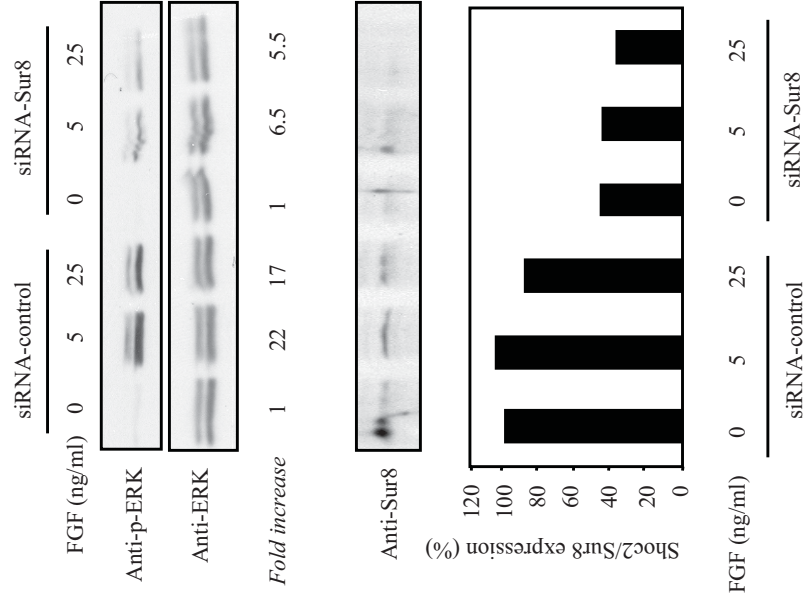
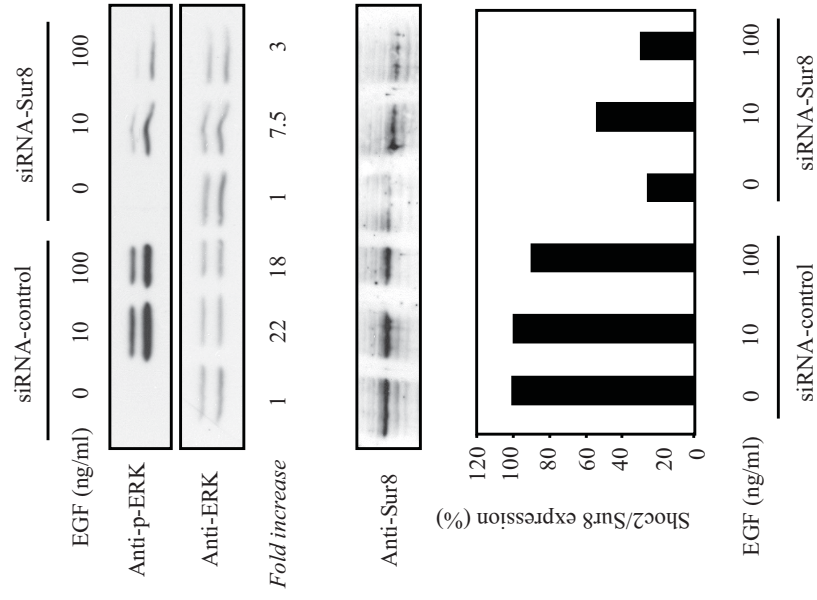
A), PC12 cells were nucleofected with shRNA-control-GFP plasmid (ShRNA Control) or specific rat shRNA-Sur8-GFP plasmids (ShRNA Sur8 #1-3). At 48 h post-transfection, cell lysates were analyzed by immunoblot; Sur8 levels determined using anti-Sur8 polyclonal antibody were normalized to total ERK levels, and expressed as a percentage (right). Results were similar in two additional experiments. **B)**, PC12 cells nucleofected with either shRNA-control-GFP plasmid (ShRNA Control) or specific rat shRNA-Sur8-GFP plasmids (ShRNA Sur8 (2) and (3)) were stimulated with 100 ng/ml NGF for 72 h. After fixing, GFP-positive cells were detected by fluorescence microscopy (right: arrows) and total cells were visualized with transmitted light (left). Extending processes equal in length or greater than two cell bodies were considered neurites; bars, 10 μ m. **C)**, histograms represent the percentage of transfected PC12 cells (GFP-positive) with neurites after NGF treatment; values are the mean of three

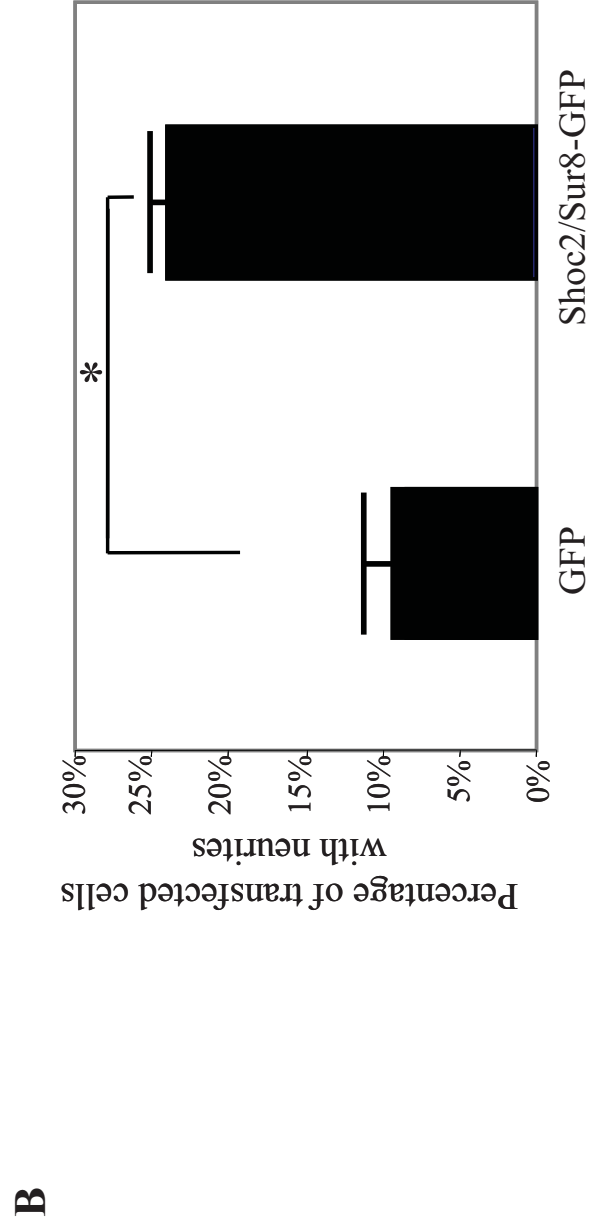
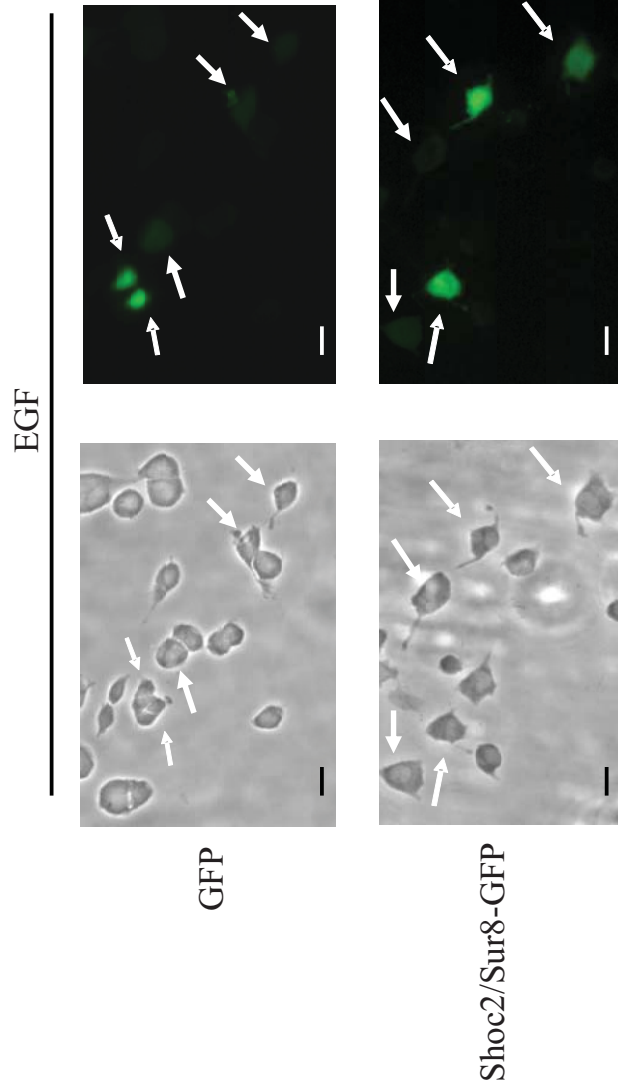
separate assays, in which at least 50 GFP-positive cells/assay were analyzed (*ShRNA Sur8 (2 or 3) vs ShRNA Control; $p < 0.01$), bars show SD.

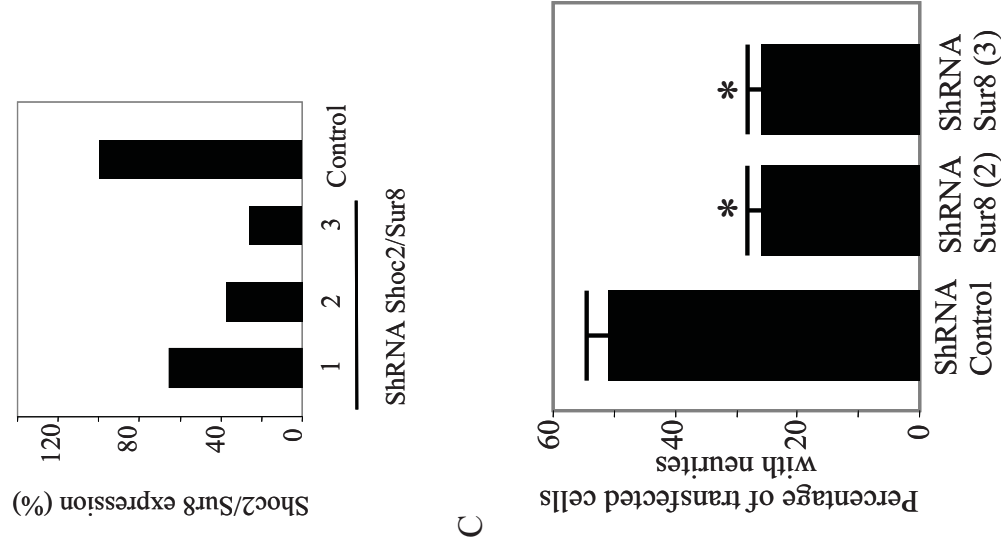
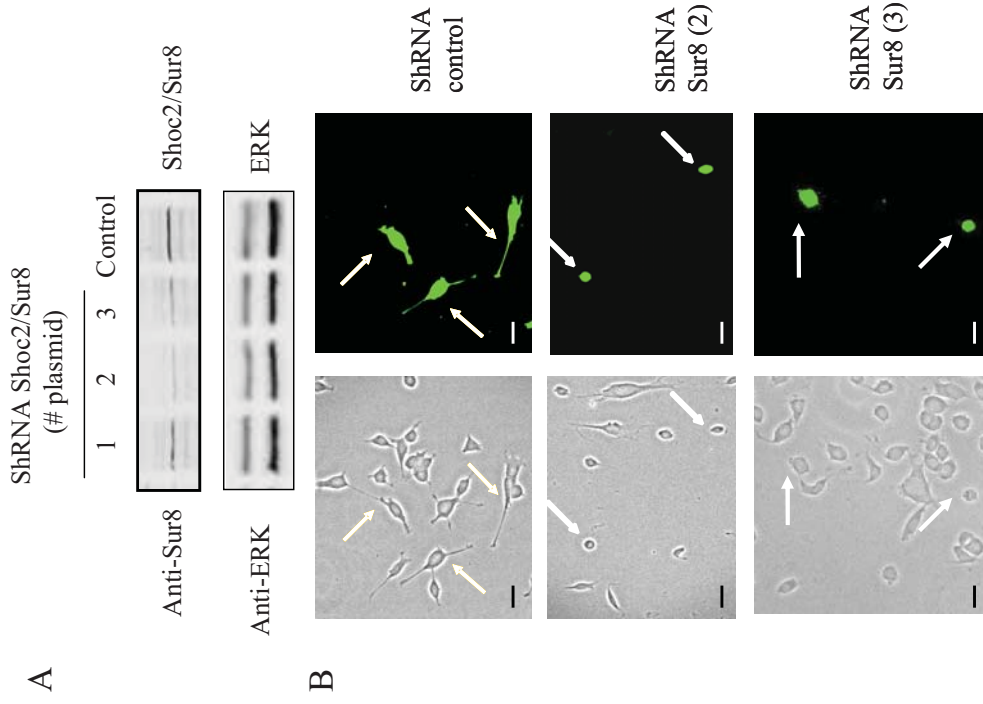
Figure 5. Sur8 knockdown reduces NGF-induced ERK activation in PC12 cells.

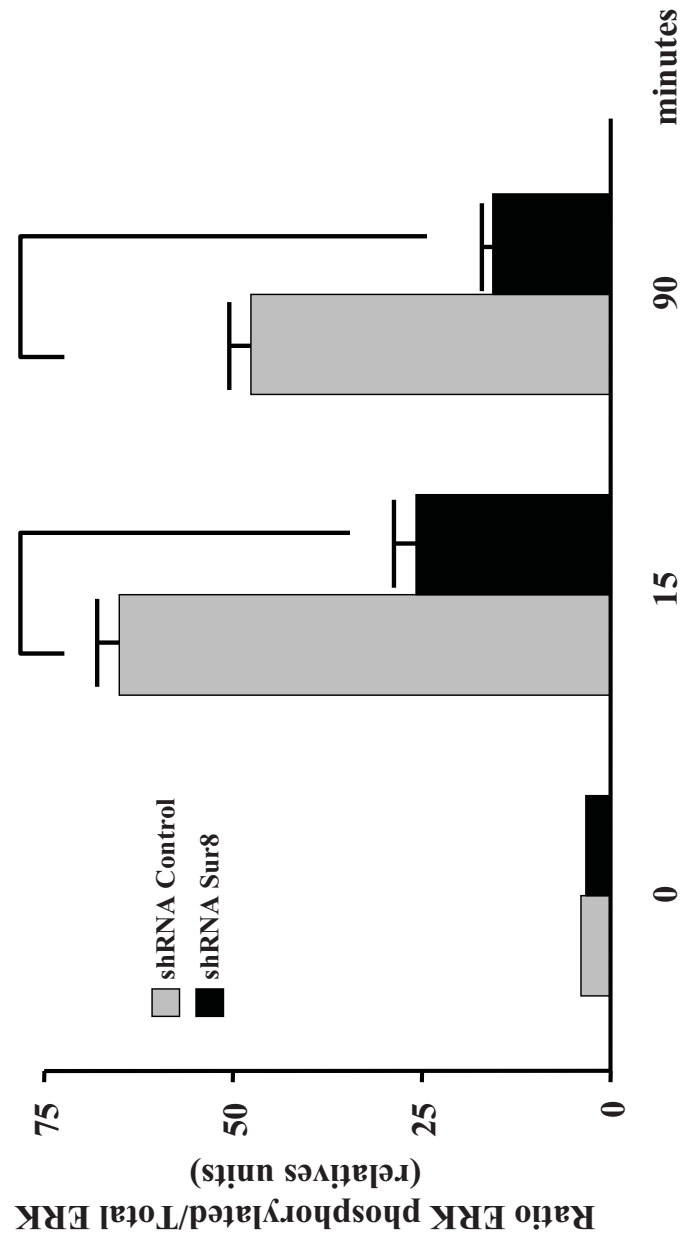
PC12 cells nucleofected with shRNA-control-GFP plasmid (ShRNA Control) or specific rat shRNA-Sur8-GFP #3 plasmid (ShRNA Sur8) were stimulated with 100 ng/ml NGF for the times indicated. In each assay, 2 μ g PC12 cell extracts were analyzed by xMAP technology in a Luminex-200 platform for quantitative and simultaneous detection of phospho-ERK (pTpY183/185) and total ERK protein. Histograms show the ratio of p-ERK/ERK levels at indicated times of post-NGF stimulation; values are the mean of three separate assays performed in duplicate (* $p < 0.001$), bars show SD.



A**B**







Sprouty2 and Spred1-2 Proteins Inhibit the Activation of the ERK Pathway Elicited by Cyclopentenone Prostanoids

Carlota A. García-Domínguez^{1,3}, Natalia Martínez^{1,3}, Teresa Gragera¹, Andrea Pérez-Rodríguez¹, Diana Retana¹, Gonzalo León¹, Agustín Sánchez¹, José Luis Oliva¹, Dolores Pérez-Sala², José M. Rojas^{1*}

¹ Unidad de Biología Celular, Área de Biología Celular y del Desarrollo, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Majadahonda, Madrid, Spain,

² Departamento de Biología Físico-Química, Centro de Investigaciones Biológicas, C.S.I.C., Ramiro de Maeztu 9, Madrid, Spain

Abstract

Sprouty and Spred proteins have been widely implicated in the negative regulation of the fibroblast growth factor receptor-extracellular regulated kinase (ERK) pathway. In considering the functional role of these proteins, we explored their effects on ERK activation induced by cyclopentenone prostanoids, which bind to and activate Ras proteins. We therefore found that ectopic overexpression in HeLa cells of human Sprouty2, or human Spred1 or 2, inhibits ERK1/2 and Elk-1 activation triggered by the cyclopentenone prostanoids PGA₁ and 15d-PGJ₂. Furthermore, we found that in HT cells that do not express Sprouty2 due to hypermethylation of its gene-promoter, PGA₁-provoked ERK activation was more intense and sustained compared to other hematopoietic cell lines with unaltered Sprouty2 expression. Cyclopentenone prostanoids did not induce Sprouty2 tyrosine phosphorylation, in agreement with its incapability to activate tyrosine-kinase receptors. However, Sprouty2 Y55F, which acts as a defective mutant upon tyrosine-kinase receptor stimulation, did not inhibit cyclopentenone prostanoids-elicited ERK pathway activation. In addition, Sprouty2 did not affect the Ras-GTP levels promoted by cyclopentenone prostanoids. These results unveil both common and differential features in the activation of Ras-dependent pathways by cyclopentenone prostanoids and growth factors. Moreover, they provide the first evidence that Sprouty and Spred proteins are negative regulators of the ERK/Elk-1 pathway activation induced not only by growth-factors, but also by reactive lipidic mediators.

Citation: García-Domínguez CA, Martínez N, Gragera T, Pérez-Rodríguez A, Retana D, et al. (2011) Sprouty2 and Spred1-2 Proteins Inhibit the Activation of the ERK Pathway Elicited by Cyclopentenone Prostanoids. PLoS ONE 6(2): e16787. doi:10.1371/journal.pone.0016787

Editor: Kumar Selvarajoo, Keio University, Japan

Received: August 18, 2010; **Accepted:** January 12, 2011; **Published:** February 22, 2011

Copyright: © 2011 García-Domínguez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: CAGD, APR, AS, TG, and GL were recipients of fellowships from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS)-Beca de Formación en Investigación (BEFI) (to CAGD), Comunidad de Madrid (to APR), Instituto de Salud Carlos III (AS), and the Ministerio de Educación y Ciencia (to TG and GL). JLO is member of the Miguel Servet Program (Fondo de Investigaciones Sanitarias -FIS-, Instituto de Salud Carlos III -ISCIII-). This work was supported by grants SAF2006-04247 from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain, FIS-Intrasalud (PS09/00562) and ISCIII-RETIC (Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer; RD06/0020/0003) from the Instituto de Salud Carlos III, and the Spanish Association Against Cancer (AECC) to JMR, and by SAF2009-11642 and RETIC (Red de Investigación de Reacciones Adversas a Alergenos y Fármacos; RD07/0064/0007) from ISCIII, to DPS. Work was also supported by a grant from European Union Cooperation in the field of Scientific and Technical research (COST) Action CM1001 to DPS. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: jmrojas@isciii.es

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Sprouty was identified in *Drosophila melanogaster* as an antagonist of receptor tyrosine kinases (RTK) signaling during different morphogenetic processes, such as the development of the trachea, the eye, the wing and other tissues [1–5]. Currently, four mammalian genes have been identified that encode protein homologues for dSprouty [6]. The mammalian Sprouty isoforms have variable N-terminal sequences but share considerable cysteine-rich sequence homology in their C-termini. Ectopic overexpression of Sprouty2 inhibits fibroblast growth factor (FGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF), but not epidermal growth factor- (EGF) induced ERK activation [7]. In addition, Sprouty2 Y55F mutant is unable to inhibit the ERK signaling after FGF stimulation [7]. Sprouty proteins have also been implicated in the negative feedback regulation of FGF signaling in embryogenesis [8,9], angiogenesis [10] and myogenesis [11]. Although Sprouty2 binds Grb2 constitutively, through an

interaction that involves the N-terminal SH3 domain of Grb2 and two Sprouty2 proline-rich stretches (residues 59–64 and 303–307) [12,13], the inhibitory effect of Sprouty2 on FGF-induced ERK activation is independent of its Grb2-binding capacity [12] and it has no effect on Ras GTP loading [7,12]. By contrast, it has also been suggested that Sprouty2 reduces Raf activation [7]. Sprouty2 localizes mainly in vesicular/endosomal and caveosome structures [2,12,14–17], although it has also been detected at the plasma membrane [12]. Indeed, Sprouty2 interferes with the progression from early to late endosomes affecting activated EGFR trafficking [17]. We have recently detected *hSprouty2* promoter hypermethylation in 37% of B-cell diffuse lymphoma cases, and found that this epigenetic alteration was associated with a significant decrease in the five-year survival rate [18].

Spred family members contain a C-terminal cysteine-rich Sprouty-related domain (SPR) [20,21] with high homology to the C-terminal region of Sprouty proteins. Spred proteins also block RTK and cytokine receptors-triggered ERK activation

[6,19]. In addition, Sprouty inhibits PKC δ and Ca⁺² signaling in *Xenopus*, whereas Spred proteins abolish the Ras-ERK signaling [22]. In mammals, Spred function is also focused on the Ras-ERK pathway [6,19], where it blocks Raf activation [20].

Cyclopentenone prostanoids (cyP) are naturally occurring eicosanoids that show various biological activities, including antiviral [23] and antitumoral effects [24], modulation of the heat shock response [25], induction of oxidative stress [26], and apoptosis [27]. These prostanoids possess an α,β -unsaturated carbonyl group in the cyclopentene ring that favors the formation of Michael adducts with thiol groups in proteins, which is responsible for many of the biological effects of these compounds [28–31]. We have described that H-Ras, but not N- or K-Ras, is a target for the addition of the cyP 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) since it forms a covalent bond with the cysteine 184 of H-Ras [32]. This effect is associated with the activation of the H-Ras-ERK pathway, increased proliferation of NIH-3T3 fibroblasts [32] and protection from apoptosis in MCA3D keratinocytes [33]. In accordance with these effects, we found that 15d-PGJ₂ significantly enhanced the carcinogenic effect of DMBA/TPA in mice skin [33]. In addition, we also found that PGA₁ binds to and activates H-, N- and K-Ras [34] mainly by binding to the cysteine 118 located in the GTP-binding motif, thus differing in the site of interaction of 15d-PGJ₂ with H-Ras. Although the ERK pathway promotes some cellular responses induced by cyP [32,33,35,36], we are not aware of any data suggesting that Sprouty proteins are involved in cyP signaling regulation.

This study was carried out to ascertain whether Sprouty and Spred proteins are able to inhibit ERK activation induced by stimuli different from agonists of tyrosine-kinase receptors, such as cyP.

Materials and Methods

Cell lines

HeLa cells [34] were maintained in DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Invitrogen), and the human hematological cell lines (HT and Karpas 422) [18] were grown RPMI 1640 (Invitrogen) containing 10% FCS.

Transfections and antibodies

Transient transfections were performed using Jet-PeiTM (Polyplus-Transfection, Illkirch, France). All assays were done 48 h post-transfection. Monoclonal antibodies (mAb) to phospho-tyrosine (4G10) and Sprouty2 were from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY), and anti-phospho-ERK protein was from Cell Signaling (Beverly, MA). Rabbit polyclonal antibodies to ERK (ERK1/ERK2) and GST were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), and anti-Spred1 and Spred2 antibodies were from Abcam (Cambridge, MA). Anti-HA and AU5 mAb were from Berkeley Antibody Company (Berkeley, CA), and anti-c-Cbl was from BD Transduction Laboratories (Franklin Lakes, NJ). Anti β -actin and β -laminin mAb, and recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF), and epidermal growth factor (EGF) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). PGA₁ and 15d-PGJ₂ were from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI).

DNA constructs

The plasmids pCEFL-KZ-HA, pCEFL-KZ-AU5, pCEFL-KZ-AU5-hSpry2 wt, pCEFL-KZ-AU5-hSpry2 Y55F, pCEFL-KZ-AU5-hSpry2 P59AP304A, pCEFL-KZ-HA-hSpry2 wt, pCEFL-HA-K-Ras 4B wt, and pCEFL-KZ-HA-ERK (1 and 2), have been previously described [11,12,37]. The cDNA of hSpred1 and hSpred2 were obtained by RT-PCR from mRNA of HeLa cells

using the specific primers and providing sites Bam HI and Not I (hSpred1) or Bam HI and EcoRI (hSpred2) at the 5' and 3' ends, respectively. The amplified products were then subcloned into Bgl II and Not I/EcoRI sites within pCEFL-KZ-AU5. The sequences of the oligonucleotides utilized are available upon request.

Ras-GTP detection

The plasmid pGEX-RBD, containing the Raf Ras-binding domain fused to glutathione S-transferase (GST) was kindly provided by D. Shalloway. The GST-fusion protein was purified following the previous described method [38] from *E. coli* BL21 (DE3) harboring pGEX-RBD to express the fusion protein. In all Ras-GTP detection assays, transfected mammalian cells were lysed in cold lysis buffer [38], and 10 μ g GST-RBD coupled to glutathione-sepharose beads, were added to the extracts and processed following the previous described method [38].

Reporter gene analysis

HeLa cells were co-transfected with 0.6 μ g of constructs encoding hSpry2 wt or mutants, 16 ng pCDNAIII-Gal4-Elk1, 0.1 μ g pRL-TK (containing the *Renilla* luciferase gene under control of the HSV-TK promoter), and 0.3 μ g pGal4-Luc (containing the *Photinus* luciferase gene controlled by six copies of a Gal4 responsive element). Assays were performed as previously described [37].

Statistical analysis

Data were analyzed with SPSS software (Chicago). Results are expressed as the mean \pm SD of the indicated number of experiments. Statistical significance was estimated with Student's *t* test for unpaired observations; $p < 0.05$ was considered significant. For western blot analysis, we used linear correlations between increasing amounts of protein and its signal intensity.

Results and Discussion

Ectopic overexpression of Sprouty2, or Spred1-2, inhibits cyP-induced ERK/Elk1 pathway activation

Sprouty and Spred proteins have been implicated in the negative regulation of ERK signaling after stimulation by FGF [6,19]. Here we examined whether human Sprouty2 (hSpry2) or human Spred (hSpred1 and hSpred2) can be negative regulators of ERK activation induced by cyP (PGA₁ and 15d-PGJ₂). For this purpose, we measured ERK phosphorylation promoted by these cyP in HeLa cells overexpressing HA-ERK2 and AU5-hSpry2 wt, or AU5-hSpry2 Y55F mutant (Fig. 1A). We found that, in a similar way to the described effects on FGF signaling, hSpry2 wt drastically reduced ERK activation after PGA₁ or 15d-PGJ₂ treatment. By contrast, hSpry2 Y55F mutant was unable to inhibit not only FGF-elicited ERK activation, as previously reported [6], but also that of cyP (Fig. 1A). Similar results were obtained when HA-ERK1 was used (not shown). We also tested Elk1 activation, a transcription factor downstream of ERK. hSpry2 wt, but not hSpry2 Y55F, blocked FGF- and PGA₁-induced Elk1 activation (Fig. 1B), data which supports the results obtained by the analysis of phospho-ERK levels. In addition hSpry2 P59A P304A, a double mutant which does not bind Grb2 [12], also reduced Elk1 activation provoked by those stimuli, suggesting that the inhibitory mechanism of Sprouty2 on cyP-induced ERK/Elk1 activation is independent of Grb2-Sprouty2 interaction, as we previously demonstrated for FGF signaling [12].

We observed that, as it was expected [7], hSprouty2 wt or hSpry2 P59AP304A double mutant were unable to shut down the ERK/Elk1 signaling pathway after EGFR activation (Fig. 2),

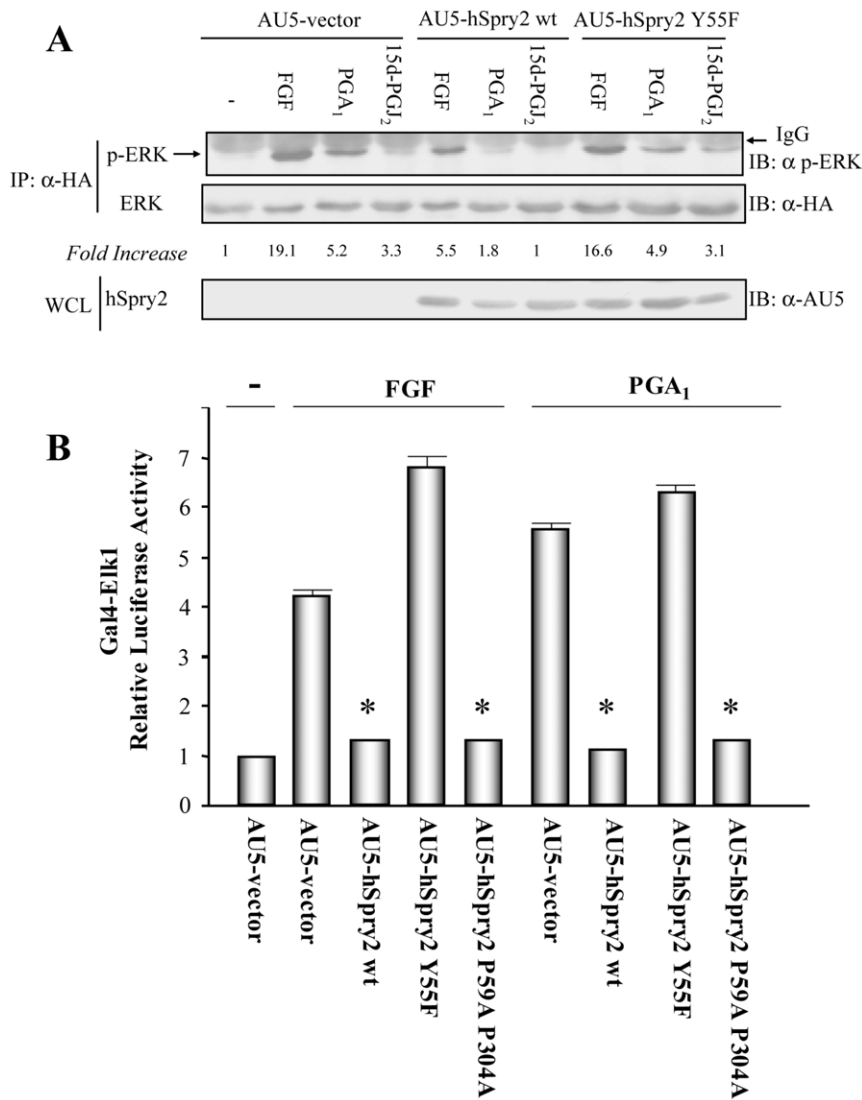


Figure 1. Overexpression of hSprout2 (hSpry2) inhibits cyP-elicited ERK/Elk-1 pathway activation. (A) HeLa cells transiently co-transfected with pCEFL-KZ-HA-ERK1 and either pCEFL-KZ-AU5-hSpry2 wt, pCEFL-KZ-AU5-hSpry2 Y55F, or pCEFL-KZ-AU5 (AU5-vector), were serum-starved for 18 h and then incubated with vehicle (-), 50 ng/ml FGF, or 10 μ M PGA₁ (or 15d-PGJ₂), for 15 min. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-HA mAb, and analyzed by immunoblot using anti-p-ERK and -HA antibodies. Results were similar in three additional experiments. The factor by which values of p-ERK increased is estimated as mean of four separate assays (in each case with a SD lower than 10% of mean). The expression levels of AU5-hSpry2 constructs were detected by immunoblotting whole cell lysates (WCL) with anti-AU5 mAb (lower panel). (B) HeLa cells were co-transfected with pcDNAIII-Gal4-Elk-1, pGal4-Luc, and pRL-TK together with pCEFL-KZ-AU5 containing the indicated hSpry2 constructs in (A), and also pCEFL-KZ-AU5-hSpry2 P59A P304A. The transfected cells were serum-starved for 18 h, incubated with vehicle (-), either 50 ng/ml FGF, or 10 μ M PGA₁, for 8 h, and then assayed for luciferase activity. The data are the mean and SD of three separate assays performed in triplicate (* vs AU5-vector + FGF, or + PGA₁: p<0.001). doi:10.1371/journal.pone.0016787.g001

whereas hSprd1 or hSprd2 reduced phospho-ERK levels stimulated by EGF (Fig. 2A). We found that hSprd1 and hSprd2 also inhibited PGA₁-triggered ERK activation (Fig. 2A), and both hSprd proteins abolished EGF, FGF, or PGA₁-induced Elk1 activation (Fig. 2B).

All these data suggest that both Sprout2 and Sprd1/2 proteins negatively-regulate the cyP-dependent ERK/Elk1 pathway activation.

Absence of Sprout2 expression correlates with enhanced cyP-triggered ERK/Elk1 pathway activation

We have previously demonstrated that human *Sprout2* promoter gene is hypermethylated in the HT cell line (derived

from a B-cell diffuse lymphoma) [18]. Expression analysis of *hSprout2* by RT-PCR and WB indicated the absence of hSprout2 (mRNA and protein) in this cell line [18]; in contrast, the Karpas 422 cell line (also derived from a B-cell diffuse lymphoma), but without epigenetic alterations in the *hSprout2* promoter [18], showed hSprout2 expression (Fig. 3A). In addition, we found that both cell lines express hSprd1 but not hSprd2 protein (Fig. 3A); curiously hSprd1 protein was detected as a double band, probably due to post-translational modifications [6,19]. We therefore analyzed whether the absence of hSprout2 in the HT cells affected ERK activation promoted by PGA₁. We found that PGA₁-elicited phospho-ERK levels in HT cells were higher than in Karpas 422 cells (Fig. 3B). These results concur with Elk1

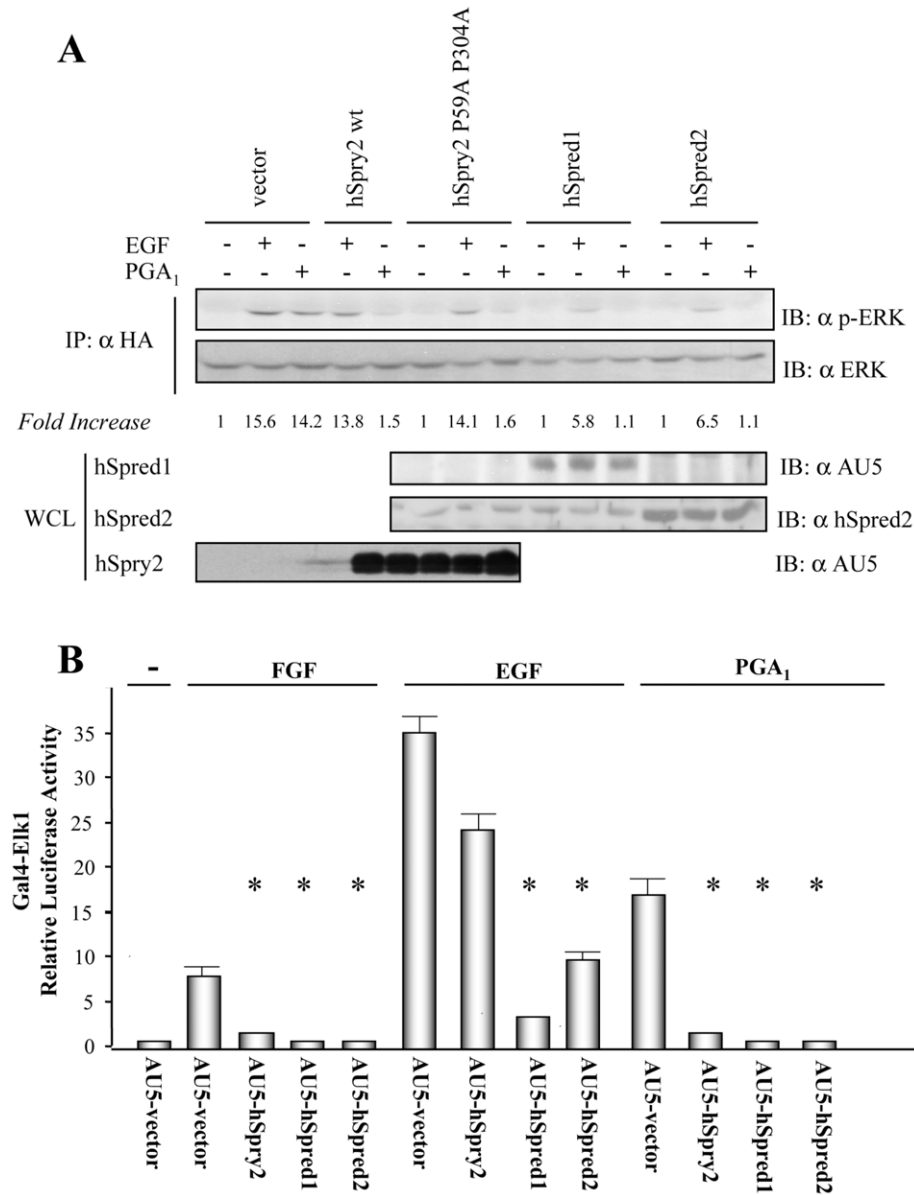


Figure 2. hSpred1 and hSpred2 block PGA₁-induced ERK/Elk-1 pathway activation. (A) HeLa cells transiently co-transfected with pCEFL-KZ-HA-ERK1 and either pCEFL-KZ-AU5-hSpry2 wt, pCEFL-KZ-AU5-hSpry2 P59A P304A, pCEFL-KZ-AU5-hSpred1, pCEFL-KZ-AU5-hSpred2, or pCEFL-KZ-AU5 (AU5-vector), were serum-starved for 18 h and then incubated with vehicle (-), either 100 ng/ml EGF, or 10 μ M PGA₁, for 15 min. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-HA mAb and analyzed by immunoblot using anti-p-ERK and -HA antibodies. Results were similar in three additional experiments. The factor by which values of p-ERK increased is estimated as mean of four separate assays (in each case with a SD lower than 10% of mean). The expression levels of AU5-hSpry2, AU5-hSpred1, or AU5-hSpred2, constructs were detected by immunoblotting WCL with the corresponding mAb (lower panels). (B) HeLa cells were co-transfected with the plasmids pcDNAIII-Gal4-Elk-1, pGal4-Luc, and pRL-TK together with pCEFL-KZ-AU5 containing the indicated hSpry2, or hSpred1, or hSpred2, constructs denoted in (A). The transfected cells were serum-starved for 18 h, incubated with vehicle (-), either 100 ng/ml EGF, or 50 ng/ml FGF, or 10 μ M PGA₁, for 8 h, and then assayed for luciferase activity. The data are the mean and SD of three separate assays performed in triplicate (* vs AU5-vector + FGF, or AU5-vector + EGF, or + PGA₁: $p < 0.001$).

doi:10.1371/journal.pone.0016787.g002

functional activity because we observed higher activation of this transcription factor in HT cells versus Karpas 422 cells after PGA₁ stimulation (Fig. 3C).

All these results are consistent with the expression of hSprouty2 in Karpas 422 cells, and its absence from HT cell line, and support the hSprouty2 role as negative regulator of cyP-triggered ERK pathway activation independently of hSpred1/2 expression levels.

Overexpression of hSprouty2 does not reduce PGA₁-induced K-Ras 4B activation

Several studies have proposed that Sprouty proteins inhibit RTK-dependent Ras activation [2,39], although we have not detected any effect of human Sprouty2 on K-Ras 4B activation levels promoted after RTK stimulation [12]. We previously showed that PGA₁ binds to cysteine 118 of Ras, a residue located in the GTP-binding pocket, which correlates with Ras activation

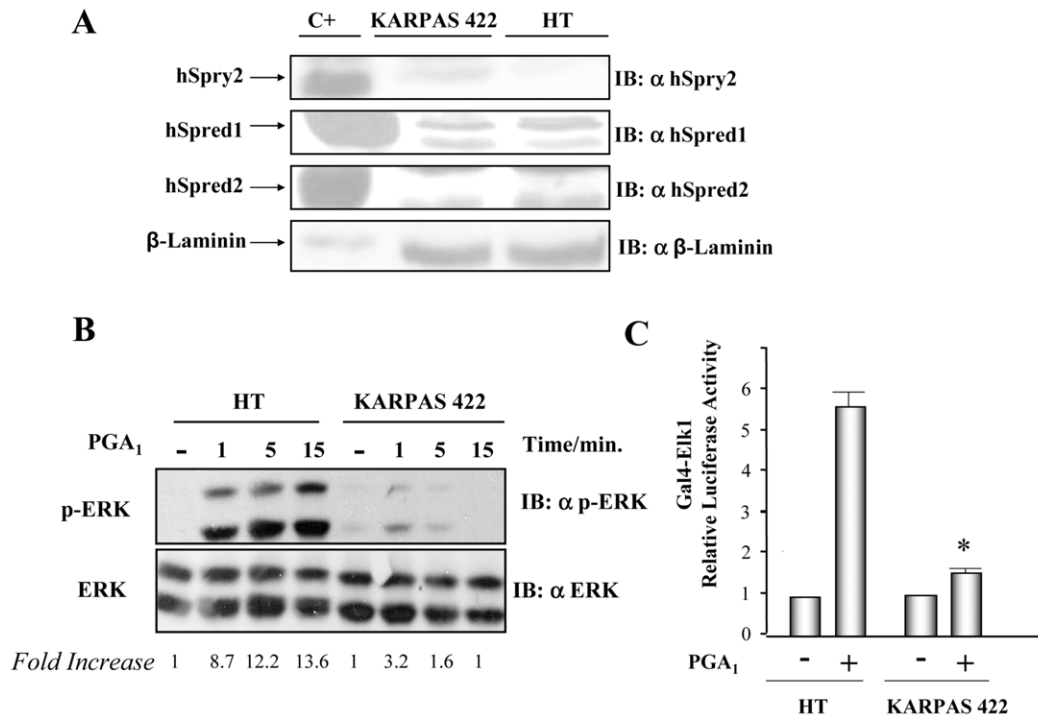


Figure 3. PGA₁-induced ERK/Elk-1 pathway activation depends of hSpry2 expression. (A) Expression levels of hSpry2 (hSpry2), hSprd1, and hSprd2 proteins in HT and Karpas 422 cell lines. Cells were lysed under appropriate conditions and equal amounts of proteins were analyzed by immunoblot. Expression levels were assessed using specific anti-hSpry2, -hSprd1, -hSprd2 and - β Laminin (as loading control) antibodies. C+ (positive control) corresponds to HeLa cells transiently co-transfected with pCEFL-KZ-AU5-hSpry2 wt, pCEFL-KZ-AU5-hSprd1, and pCEFL-KZ-AU5-hSprd2. The figure is from a representative experiment that was repeated two times more with similar results. (B) HT and Karpas 422 cell lines ($5 \cdot 10^6$ cells/point) were stimulated with 10 μ M PGA₁, for the indicated times. Cells were then lysed under appropriate conditions and equal amounts of proteins were analyzed by immunoblot. ERK phosphorylation levels (p42 and p44 proteins) were assessed using specific anti-phospho and total antibodies (as loading control). Results were similar in three additional experiments. The factor by which values of p-ERK increased is estimated as mean of four separate assays (in each case with a SD lower than 10% of mean). (C) HT and Karpas 422 cells were co-transfected with pcDNAIII-Gal4-Elk-1, pGal4-Luc, and pRL-TK. The transfected cells were serum-starved for 18 h, incubated with vehicle (-), or 10 μ M PGA₁, for 8 h, and then assayed for luciferase activity. The data are the mean and SD of four separate assays performed in triplicate (* HT + PGA₁ vs Karpas 422 + PGA₁: $p < 0.001$).

doi:10.1371/journal.pone.0016787.g003

[34]. We thus investigated whether hSprouty2 was able to reduce the K-Ras 4B GTP-loading levels elicited by PGA₁. Although treatment with PGA₁ induced lower K-Ras 4B-GTP levels than EGF stimulation, in both cases hSprouty2 was unable to diminish K-Ras 4B activation (Fig. 4A–B). Our data therefore indicate that hSprouty2 does not have any effect on K-Ras 4B activation induced by EGF, FGF (not shown, and [12]) or PGA₁ (Fig. 4A–B). These results support that in mammalian cells, unlike it happens in *Drosophila* [2], Sprouty2 inhibits ERK pathway downstream of Ras, probably by diminishing Raf activation [7,10] independently of the type of stimulus (RTK or cyP).

PGA₁ treatment does not induce tyrosine phosphorylation of hSprouty2

As it is shown above, hSpry2 Y55F mutant was unable to inhibit cyP-induced ERK/Elk1 pathway activation, whereas hSpry2 P59A P304A double mutant (and hSpry2 P59A single mutant, not shown) showed a potent inhibitory effect (Fig. 1 and 2B). Mutation of tyrosine 55 of Sprouty2 abrogates its inhibitory properties in FGF signaling [7,11,12]. In addition, both, Y55F and P59A mutations impair Sprouty2 phosphorylation at tyrosine 55 [40,41] after RTK stimulation, thus preventing Sprouty2 interaction with the SH2 domain of c-Cbl [14,15]. In order to

confirm whether tyrosine phosphorylation/c-Cbl binding are dispensable events for the inhibitory effect of Sprouty2 on PGA₁ signaling, we explored if cyP triggered this post-translational modification of Sprouty2. PGA₁ was unable to induce hSprouty2 tyrosine-phosphorylation, or hSprouty2 binding to c-Cbl, in sharp contrast to the results obtained after EGF treatment (Fig. 5), and in agreement with a PGA₁ signaling pathway independent of RTK activation. All these results suggest that other aspects relative to tyrosine 55 but unrelated to its phosphorylation and binding affinity to c-Cbl are modulating Sprouty2 functionality, and that Sprouty2 inhibition of PGA₁-dependent ERK activation does not need of Sprouty2 interaction with c-Cbl. The detailed aspects of this mechanism will be the subject of future investigations.

Activation of the ERK-Elk pathway by cyP could occur at various levels. Evidence demonstrates a correlation between the covalent modification of Ras proteins by cyP and Ras-ERK pathway activation. However, other mechanism for Ras or ERK activation could be envisaged, including oxidative stress induction by cyP or their interaction with other cellular targets [42]. Besides their binding to PPARs, cyP have been reported to interact with membrane receptors, including G-protein coupled receptors, and ion channels. Several cyP of the J series have been reported to connect with the DP2 receptor, one of the receptors for PGD₂, also known as CRTH2 (for chemotactic receptor of TH2 cells)

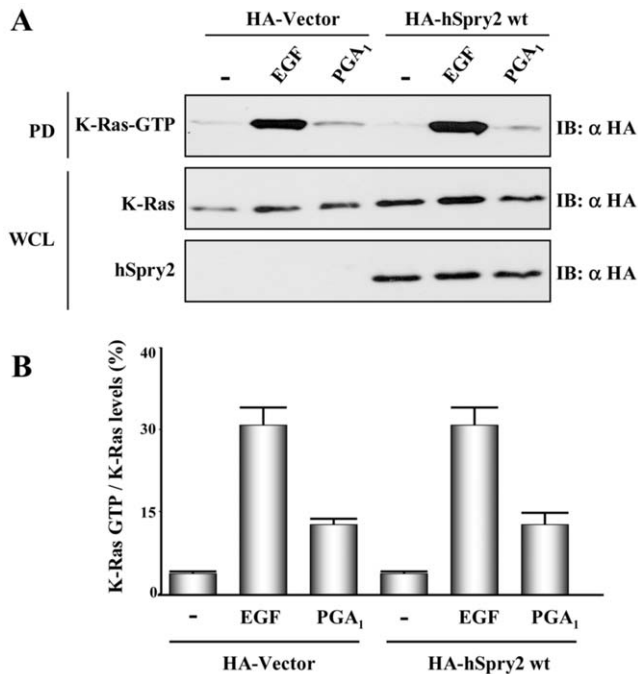


Figure 4. hSprouty2 does not affect PGA₁-induced K-Ras 4B activation. (A) HeLa cells transiently co-transfected with pCEFL-KZ-HA-K-Ras 4B wt and pCEFL-KZ-HA-hSpry2 wt, or pCEFL-KZ-HA (vector), were serum-starved for 18 h and then incubated with vehicle (-), either 100 ng/ml EGF, or 10 μ M PGA₁, for 15 min. Ras-GTP was recovered from cell lysates by binding to immobilized GST containing the Ras-GTP binding domain of Raf (GST-RBD) and detected by immunoblotting with anti-HA mAb (upper panel). The expression levels of HA-K-Ras 4B wt and HA-hSpry2 wt were detected by immunoblotting WCL with the corresponding anti-HA mAb (lower panel). Results were similar in five independent assays. (B) Quantitative analysis of K-Ras-GTP standardized to K-Ras levels for the same type of experiments indicated in (A). The histogram shows the mean and SD of five separate assays. doi:10.1371/journal.pone.0016787.g004

[43]. The dissociation constants for various cyP are in the nanomolar range, with PGD₂ being more potent than D12-PGJ₂ and this PG more potent than 15d-PGJ₂. It has also been reported the interaction of D12-PGJ₂ and 15d-PGJ₂ with DP1 [43]. Whereas DP1 is coupled to G α s-type of G proteins and its activation triggers an increase in cAMP levels, DP2 is thought to be coupled to G α i/o and its activation induces high intracellular Ca²⁺ levels; this could contribute to the modulation of Ras protein activity through RasGRP. CRTH2 activation of G α i proteins has also been reported to stimulate PI3-K, MAPK and PLC γ [44], and both ERK, a member of MAPK family, and PLC γ can be inhibited by Sprouty2 and Spred1/2 proteins [6]. PGD₂, as well as its metabolites dk-PGD₂, PGJ₂, D12-PGD₂, D12-PGJ₂, 15d-PGD₂ and 15d-PGJ₂, have been shown to be potent eosinophilia activators with respect to chemotaxis, actin polymerization, L-selectin shedding and CD11b upregulation, in a CRTH2-dependent manner [45,46]. The role of DP2 in mediating the effects of 15d-PGJ₂ appears nevertheless to be largely cell-dependent. DP2 receptor antagonists appear to block 15d-PGJ₂-elicited enhancement of NGF-induced neurite outgrowth [47]. However, DP2 appears not to be involved in PGD₂ or 15d-PGJ₂ effects on inflammatory resolution [48], on the expression of TLR2 in brain glia [49] or in the derangement of vimentin cytoskeleton and the inhibition of iNOS induction by 15d-PGJ₂ in

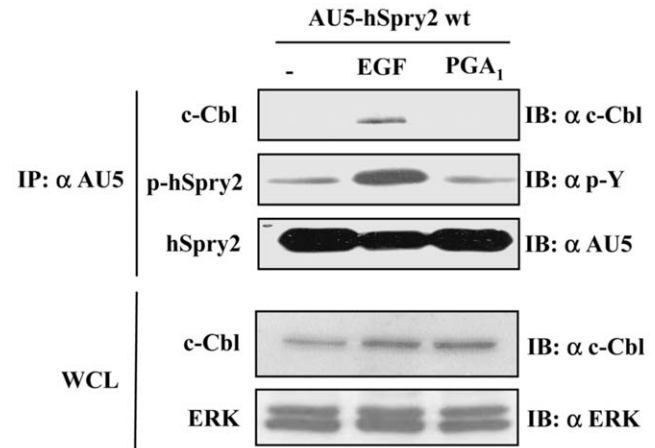


Figure 5. hSprouty2 is not tyrosine-phosphorylated by PGA₁ treatment. HeLa cells transiently transfected with pCEFL-KZ-AU5-hSpry2 wt, were serum-starved for 18 h and then incubated with vehicle (-), 100 ng/ml EGF, or 10 μ M PGA₁, for 15 min. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-AU5 mAb and analyzed by immunoblot using anti-p-Y, -c-Cbl, and -AU5 antibodies. Expression levels of endogenous c-Cbl were detected by immunoblotting with the appropriate anti-c-Cbl antibody (lower blot), and using anti-ERK as loading control. Results were similar in three additional experiments. doi:10.1371/journal.pone.0016787.g005

mesangial cells [50]. Moreover, to the best of our knowledge there are no evidences of PGA₁ interaction with these receptors. In addition, cyP have been recently found to interact with other G-protein coupled receptors. 15d-PGJ₂ has been reported to activate kappa/delta opioid receptors, as suggested by pharmacological evidences [51]. Interestingly, several cyP have been reported to covalently bind and activate the ion channel TRPA1, leading to nociceptive responses [52]. Finally, results from our group have identified the G-protein β 2-like1 subunit as a potential target for covalent modification by PGA₁ [53]. However, the elucidation of the functional significance of these results requires further study.

In conclusion, all the results presented in this study support that the ERK/Elk-1 pathway activation induced by cyP (PGA₁ and 15d-PGJ₂) treatment can be negatively-modulated by Sprouty2 and Spred1-2 proteins. These data suggest that the functional role of these proteins may be relevant not only as regulators of RTK (or G-protein-coupled receptors) signaling [6], but also as modulators of the ERK pathway activation dependent on Ras-GTP loading triggered by other stimuli, such as cyP [32–34].

Our data indicate, that the molecular activity of Sprouty2 on cyP signaling would be downstream of Ras (probably at the level of c-Raf activation), without having any effect on Ras-GTP levels elicited by these prostanoids (Fig. 6). In addition, Sprouty2 P59A P304A double mutant, which lacks the capacity to bind to Grb2 [12], inhibits the ERK/Elk-1 pathway after PGA₁ treatment to a similar extent as Sprouty2 wt, demonstrating that the Sprouty2 activity to repress the PGA₁/ERK/Elk-1 pathway does not require Grb2 binding (Fig. 6). Finally, we found that although Sprouty2 Y55F mutant did not block cyP-induced ERK and Elk-1 activation, the treatment with PGA₁ was unable to provoke *in vivo* tyrosine-phosphorylation of Sprouty2, and c-Cbl/Sprouty2 binding (Fig. 6); however, RTK stimulation (mainly EGFR) induces tyrosine-phosphorylation of Spry2 (at Y55 residue) enhancing its binding affinity to the SH2 domain of c-Cbl, which leads to Spry2 ubiquitination [6]. Our data, suggest that, independently of phosphorylation of tyrosine 55 and c-Cbl binding, this tyrosine

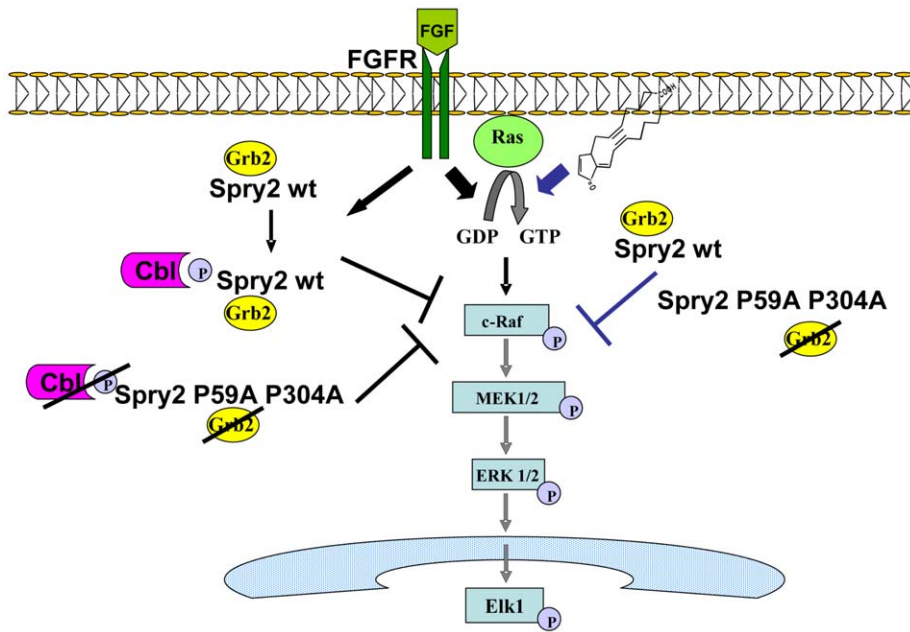


Figure 6. Model of action of hSproutly2 on cyP-triggered Ras/Raf/MEK/ERK/Elk1 signaling pathway. PGA_1 binds to cysteine 118 of Ras and induces Ras-GTP loading and Raf/MEK/ERK/Elk1 pathway activation. Overexpression of Sproutly2 (Spry2) wt or Spry2 P59A P304A double mutant (unable to bind Grb2) block cyP and FGF-elicited ERK phosphorylation but not Ras activation, probably due to an effect on Raf signaling. However, Spry2 Y55F mutant does not inhibit cyP and FGF-induced ERK pathway activation, although treatment with PGA_1 was unable to promote tyrosine-phosphorylation of Spry2; in sharp contrast, RTK activation (mainly EGFR) provokes tyrosine-phosphorylation of Spry2 (at Y55 residue) increasing its binding affinity to the SH2 domain of c-Cbl, which leads to Spry2 ubiquitination.
doi:10.1371/journal.pone.0016787.g006

residue might be involved in additional functions, unexplored to date, which can exert a pivotal role in the molecular inhibitory mechanism of Sproutly2 on the cyP signaling.

Acknowledgments

We thank Drs. S. J. Taylor and D. Shalloway for providing the plasmid pGEX-RBD.

References

- Hacohen N, Kramer S, Sutherland D, Hiromi Y, Krasnow MA (1998) sproutly encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the *Drosophila* airways. *Cell* 92(2): 253–263.
- Casci T, Vinos J, Freeman M (1999) Sproutly, an intracellular inhibitor of Ras signaling. *Cell* 96(5): 655–665.
- Kramer S, Okabe M, Hacohen N, Krasnow MA, Hiromi Y (1999) Sproutly: a common antagonist of FGF and EGF signaling pathways in *Drosophila*. *Development* 126(11): 2515–2525.
- Reich A, Sapir A, Shilo B (1999) Sproutly is a general inhibitor of receptor tyrosine kinase signaling. *Development* 126(18): 4139–4147.
- Dikic I, Giordano S (2003) Negative receptor signalling. *Curr Opin Cell Biol* 15(2): 128–135.
- Cabrita M A, Christofori G (2008) Sproutly proteins, masterminds of receptor tyrosine kinase signaling. *Angiogenesis* 11(1): 53–62.
- Sasaki A, Taketomi T, Wakioka T, Kato R, Yoshimura A (2001) Identification of a dominant negative mutant of Sproutly that potentiates fibroblast growth factor- but not epidermal growth factor-induced ERK activation. *J Biol Chem* 276(39): 36804–36888.
- de Maximy AA, Nakatake Y, Moncada S, Itoh N, Thiery JP, et al. (1999) Cloning and expression pattern of a mouse homologue of *Drosophila* sproutly in the mouse embryo. *Mech Dev* 81(1–2): 213–216.
- Teffi JD, Lee M, Smith S, Leinwand M, Zhao J, et al. (1999) Conserved function of mSpry-2, a murine homolog of *Drosophila* sproutly, which negatively modulates respiratory organogenesis. *Curr Biol* 9(4): 219–222.
- Sasaki A, Taketomi T, Kato R, Saeki K, Nonami A, et al. (2003) Mammalian Sproutly4 suppresses Ras-independent ERK activation by binding to Raf1. *Nat Cell Biol* 5(5): 427–432.
- de Alvaro C, Martinez N, Rojas JM, Lorenzo M (2005) Sproutly-2 overexpression in C2C12 cells confers myogenic differentiation properties in the presence of FGF2. *Mol Biol Cell* 16(9): 4454–4461.
- Martinez N, Garcia-Dominguez CA, Domingo B, Oliva JL, Zarich N, et al. (2007) Sproutly2 binds Grb2 at two different proline-rich regions, and the mechanism of ERK inhibition is independent of this interaction. *Cellular Signalling* 19(11): 2277–2285.
- Lao DH, Chandramouli S, Yusoff P, Fong CW, Saw TY, et al. (2006) A Src homology 3-binding sequence on the C terminus of Sproutly2 is necessary for inhibition of the Ras/ERK pathway downstream of fibroblast growth factor receptor stimulation. *J Biol Chem* 281(40): 29993–30000.
- Rubin C, Litvak V, Medvedovsky H, Zwang Y, Lev S, et al. (2003) Sproutly fine-tunes EGF signaling through interlinked positive and negative feedback loops. *Curr Biol* 13(4): 297–307.
- Hall AB, Jura N, DaSilva J, Jang YJ, Gong D, et al. (2003) hSpry2 is targeted to the ubiquitin-dependent proteasome pathway by c-Cbl. *Curr Biol* 13(4): 308–314.
- Impagnatiello MA, Weitzer S, Gannon G, Compagni A, Cotten M, et al. (2001) Mammalian sproutly-1 and -2 are membrane-anchored phosphoprotein inhibitors of growth factor signaling in endothelial cells. *J Cell Biol* 152(5): 1087–1098.
- Kim HJ, Taylor LJ, Bar-Sagi D (2007) Spatial Regulation of EGFR Signaling by Sproutly2. *Curr Biol* 17(5): 455–461.
- Sanchez A, Setien F, Martinez N, Oliva JL, Herranz M, et al. (2008) Epigenetic inactivation of the ERK inhibitor Spry2 in B-cell diffuse lymphomas. *Oncogene* 27(36): 4969–4972.
- Bundschu K, Walter U, Schuh K (2007) Getting a first clue about SPRED functions. *Bioessays* 29(9): 897–907.
- Wakioka T, Sasaki A, Kato R, Shouda T, Matsumoto A, et al. (2001) Spred is a Sproutly-related suppressor of Ras signalling. *Nature* 412(6847): 647–651.
- Kato R, Nonami A, Taketomi T, Wakioka T, Kuroiwa A, et al. (2003) Molecular cloning of mammalian Spred-3 which suppresses tyrosine kinase-mediated Erk activation. *Biochem Biophys Res Commun* 302(4): 767–772.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CAGD NM DPS JLO JMR. Performed the experiments: CAGD NM TG APR DR GL AS. Analyzed the data: CAGD NM APR TG JLO DPS JMR. Contributed reagents/materials/analysis tools: NM TG APR DR GL AS JLO DPS. Wrote the manuscript: CAGD JMR.

22. Sivak JM, Petersen LF, Amaya E (2005) FGF signal interpretation is directed by Sprouty and Spred proteins during mesoderm formation. *Dev Cell* 8: 689–701.
23. Santoro MG (1997) Antiviral activity of cyclopentenone prostanoids. *Trends Microbiol* 5(7): 276–281.
24. Kato T, Fukushima M, Kurozumi S, Noyori R (1986) Antitumor activity of delta 7-prostaglandin A1 and delta 12-prostaglandin J2 in vitro and in vivo. *Cancer Res* 46(7): 3538–3542.
25. Rossi A, Elia G, Santoro G (1997) Inhibition of nuclear factor kB by prostaglandin A₁: an effect associated with heat shock transcription factor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(2): 746–750.
26. Kondo M, Oya-Ito T, Kumagai T, Osawa T, et al. (2001) Cyclopentenone prostaglandins as potential inducers of intracellular oxidative stress. *J Biol Chem* 276(15): 12076–12083.
27. Kim IK, Lee JH, Sohn HW, Kim HS, Kim SH (1993) Prostaglandin A2 and delta 12-prostaglandin J2 induce apoptosis in L1210 cells. *FEBS Lett* 321(2-3): 209–214.
28. Chen Y, Morrow JD, Roberts LJ, 2nd (1999) Formation of reactive cyclopentenone compounds in vivo as products of the isoprostane pathway. *J Biol Chem* 274(16): 10863–10868.
29. Narumiya S, Ohno K, Fukushima M, Fujiwara M (1987) Site and mechanism of growth inhibition by prostaglandins. III. Distribution and binding of prostaglandin A2 and delta 12-prostaglandin J2 in nuclei. *J Pharmacol Exp Ther* 242: 306–311.
30. Parker J (1996) Prostaglandin A₂ protein interactions and inhibition of cellular proliferation. *Prostaglandins* 50(5-6): 359–375.
31. Cernuda-Morollón E, Pineda-Molina E, Cañada FJ, Pérez-Sala D (2001) 15-Deoxy-D^{12,14}-prostaglandin J₂ inhibition of NF-kB DNA binding through covalent modification of the p50 subunit. *J Biol Chem* 276(38): 35530–35536.
32. Oliva JL, Perez-Sala D, Castrillo A, Martínez N, Canada FJ, et al. (2003) The cyclopentenone 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 binds to and activates H-Ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(8): 4772–4777.
33. Millan O, Rico D, Peinado H, Zarich N, Stamatakis K, et al. (2005) Potentiation of tumor formation by topical administration of 15-deoxy- $\{\Delta\}$ 12,14-prostaglandin J₂ in a model of skin carcinogenesis. *Carcinogenesis* 27(2): 328–336.
34. Renedo M, Gayarre J, Garcia-Dominguez CA, Perez-Rodriguez A, Prieto A, et al. (2007) Modification and Activation of Ras Proteins by Electrophilic Prostanoids with Different Structure are Site-Selective. *Biochemistry* 46(22): 6607–6616.
35. Wilmer WA, Dixon C, Lu L, Hilbelink T, Rovin BH (2001) A cyclopentenone prostaglandin activates mesangial MAP kinase independently of PPARgamma. *Biochem Biophys Res Commun* 281(1): 57–62.
36. Rovin BH, Wilmer WA, Lu L, Doseff AI, Dixon C, et al. (2002) 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 regulates mesangial cell proliferation and death. *Kidney Int* 61(4): 1293–1302.
37. Zarich N, Oliva JL, Martínez N, Jorge R, Ballester A, et al. (2006) Grb2 Is a Negative Modulator of the Intrinsic Ras-GEF Activity of hSos1. *Mol Biol Cell* 17(8): 3591–3597.
38. Zarich N, Oliva JL, Jorge R, Santos E, Rojas JM (2000) The isoform-specific stretch of hSos1 defines a new Grb2-binding domain. *Oncogene* 19(51): 5872–5883.
39. Gross I, Bassit B, Benezra M, Licht JD (2001) Mammalian sprouty proteins inhibit cell growth and differentiation by preventing ras activation. *J Biol Chem* 276(49): 46460–46468.
40. Guy GR, Wong ES, Yusoff P, Chandramouli S, Lo TL, et al. (2003) Sprouty: how does the branch manager work? *J Cell Sci* 116(Pt 15): 3061–3068.
41. Fong CW, Leong HF, Wong ES, Lim J, Yusoff P, et al. (2003) Tyrosine phosphorylation of Sprouty2 enhances its interaction with c-Cbl and is crucial for its function. *J Biol Chem* 278(35): 33456–33464.
42. Diez-Dacal B, Perez-Sala D (2010) Anti-inflammatory prostanoids: focus on the interactions between electrophile signaling and resolution of inflammation. *ScientificWorld Journal* 10: 655–675.
43. Sawyer N, Cauchon E, Chateauneuf A, Cruz RP, Nicholson DW, et al. (2002) Molecular pharmacology of the human prostaglandin D2 receptor, CRTH2. *Br J Pharmacol* 137(2): 1163–1172.
44. Hata AN, Breyer RM (2004) Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther* 103(2): 147–166.
45. Monneret G, Cossette C, Gravel S, Rokach J, Powell WS (2003) 15R-methyl-prostaglandin D2 is a potent and selective CRTH2/DP2 receptor agonist in human eosinophils. *J Pharmacol Exp Ther* 304(1): 349–355.
46. Schuligoi R, Schmidt R, Geisslinger G, Kollrosier M, Peskar BA, et al. (2007) PGD2 metabolism in plasma: kinetics and relationship with bioactivity on DP1 and CRTH2 receptors. *Biochem Pharmacol* 74: 107–117.
47. Hatanaka M, Shibata N, Shintani N, Haba R, Hayata A, et al. (2010) 15d-prostaglandin J2 enhancement of nerve growth factor-induced neurite outgrowth is blocked by the chemoattractant receptor- homologous molecule expressed on T-helper type 2 cells (CRTH2) antagonist CAY10471 in PC12 cells. *J Pharmacol Sci* 113(1): 89–93.
48. Rajakariar R, Hilliard M, Lawrence T, Trivedi S, Colville-Nash P, et al. (2007) Hematopoietic prostaglandin D2 synthase controls the onset and resolution of acute inflammation through PGD2 and 15-deoxyDelta12 14 PGJ2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(52): 20979–20984.
49. Yoon HJ, Jeon SB, Kim IH, Park EJ (2008) Regulation of TLR2 expression by prostaglandins in brain glia. *J Immunol* 180(12): 8400–8409.
50. Stamatakis K, Sanchez-Gomez EJ, Perez-Sala D (2006) Identification of novel protein targets for modification by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 in mesangial cells reveals multiple interactions with the cytoskeleton. *J Am Soc Nephrol* 17(1): 89–98.
51. Pena-dos-Santos DR, Severino FP, Pereira SA, Rodrigues DB, Cunha FQ, et al. (2009) Activation of peripheral kappa/delta opioid receptors mediates 15-deoxy-(Delta12,14)-prostaglandin J2 induced-antinociception in rat temporomandibular joint. *Neuroscience* 163: 1211–1219.
52. Takahashi N, Mizuno Y, Kozai D, Yamamoto S, Kiyonaka S, et al. (2008) Molecular characterization of TRPA1 channel activation by cysteine-reactive inflammatory mediators. *Channels (Austin)* 2(4): 287–298.
53. Garzon B, Gayarre J, Gharbi S, Diez-Dacal B, Sanchez-Gomez EJ, et al. (2010) A biotinylated analog of the anti-proliferative prostaglandin A1 allows assessment of PPAR-independent effects and identification of novel cellular targets for covalent modification. *Chem Biol Interact* 183(1): 212–221.

The cyclopentenone prostaglandin A₁ induces apoptosis through activation of H-Ras and N-Ras

Andrea Pérez-Rodríguez[¶], Berta Anta[¶], Judith Castro[¶], Carlota A. García-Domínguez, Sales Ibiza¹, Natalia Martínez, Silvia Hernández, Gonzalo León, Teresa Gragera, Lara M. Durá, Piero Crespo², Juan M. Serrador³, Dolores Pérez-Sala⁴, Eugenio Santos⁵, José Luís Oliva* and José M. Rojas*

Unidad de Biología Celular, Área de Biología Celular y del Desarrollo, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain

¹Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC). Madrid, Spain
(Current address: Immunobiology Unit. Instituto de Medicina Molecular. Faculdade de Medicina de Lisboa. Lisboa, Portugal)

²Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, Consejo Superior de Investigaciones Científicas –IDICAN– Universidad de Cantabria, Departamento de Biología Molecular, Facultad de Medicina, 39011 Santander, Cantabria, Spain

³Dpto. Biología Celular e Inmunología. Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO). CSIC-UAM. Madrid, Spain

⁴Departamento de Biología Físico-Química. Centro de Investigaciones Biológicas, C.S.I.C., Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain

⁵Centro de Investigación del Cáncer, IBMCC (CSIC-USAL), Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

[¶]These authors contributed equally to this work

Running title: PGA₁-induced apoptosis

Corresponding authors:

José M. Rojas and José Luís Oliva

Unidad de Biología Celular

Área de Biología Celular y del Desarrollo

Centro Nacional de Microbiología

Instituto de Salud Carlos III

Carretera Majadahonda-Pozuelo, Km. 2

28110 Majadahonda

Madrid

Spain

Tel: +34 91 822 3939/3942

Fax: +34 91 822 3423

Mail to: jmrojas@isciii.es; jloliva@isciii.es

The authors declare no competing financial interests.

ABSTRACT

The molecular mechanism by which the cyclopentenone prostaglandin A₁ (PGA₁) negatively regulates cell proliferation remains elusive. Here, we report that PGA₁ triggers apoptosis by a mechanism that induces caspase activity through Ras isoform-specific activation. Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) lacking expression of H- and N-Ras did not undergo apoptosis upon treatment with PGA₁, and this biological effect is recovered by overexpression of either H-Ras, or N-Ras, in these knockout cells.

Consistent with this, the Ras mutant C118S unable to bind PGA₁ does not lead to cell death. Remarkably, PGA₁-induced apoptosis was prompted by the activation of a pool of Ras proteins in the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum. Mechanistic analysis revealed a crucial role of Raf-MEK-ERK signaling in PGA₁-induced apoptosis. These results constitute the first model showing how PGA₁ produce a specific physiological outcome through H- and N-Ras but not K-Ras and highlight the relevance of specific subcellular location of Ras activation.

INTRODUCTION

The mammalian genome contains three *ras* genes that encode the 21-kDa proteins H-Ras, N-Ras, and K-Ras with their two isoforms, K-Ras4A and K-Ras4B, which are generated from two alternative fourth exons. Ras proteins are small GTPases that act as molecular switches connecting a wide spectrum of extracellular signals from cell-surface receptors to intracellular pathways in order to control cell proliferation, differentiation, senescence, and death^{1,2}. Ras proteins are activated by Guanine nucleotide-Exchange Factors (GEFs), which promote the exchange of guanosine diphosphate (GDP) for guanosine triphosphate (GTP), resulting in a conformational change of the tertiary structure of Ras and exposing its effector-loop to interacting partners. The intrinsic GTPase activity of Ras proteins stimulated by GTPase-Activating Proteins (GAPs) restores the GDP-bound state and terminates Ras signaling. Active GTP-bound Ras interacts with effector proteins that modulate different signaling pathways to generate specific biological outcomes³. Because Ras proteins are ubiquitously expressed (except K-Ras4A)^{4,5} and share a high degree of sequence homology and a large number of molecular effectors⁶, it was long assumed that their role was redundant. However, functional redundancy is not complete, as demonstrated by embryonic lethality in K-Ras knockouts^{7,8}. Moreover, several approaches demonstrated that the three Ras proteins play specific roles according to Ras isoform-dependent subcellular compartmentalization⁹⁻¹¹. This observation implies that biochemical and biophysical aspects of specific subcellular sites determine both the Ras isoform and the set of effectors that could be recruited, thus generating different molecular and biological outputs¹².

Cyclopentenone prostaglandins (CyPG) are eicosanoids with a varied spectrum of biological activity, including anti-inflammatory and antitumor effects, induction of

oxidative stress, modulation of heat shock response, and antiviral activity^{13,14}; they are thought to originate from the free radical–induced peroxidation of arachidonic acid (isoprostane pathway)¹⁵ and the dehydration of prostaglandins^{16,17}. CyPG contain an α , β -unsaturated carbonyl group in the cyclopentane ring that favors the formation of Michael adducts with sulfhydryl groups of proteins^{18,19}. This mechanism is responsible for many of the biological properties of these compounds. However, the variety of cellular response to CyPG appears to be cell type–specific and dose-dependent; indeed, cytoprotective and cytotoxic responses have been associated with low and high concentrations of CyPG, respectively^{20,21}. In this regard, we reported that H-Ras is a target for the addition of a typical CyPG, the 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂), and that this effect is associated with specific activation of H-Ras–dependent pathways and increased proliferation and inhibition of apoptosis in NIH3T3 fibroblasts²² and MCA3D keratinocytes²³. Nevertheless, members of the prostaglandin A and J series act as potent inhibitors of some human tumors both *in vitro* and *in vivo*, by inducing cell cycle arrest and apoptosis^{13,16,24}. In endothelial cells, activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) receptors by 15d-PGJ₂ induces nuclear localization of receptors and caspase-mediated apoptosis²⁵, and both 15d-PGJ₂ and PGA₁ induce apoptosis in AGS cells by a PPAR–independent mechanism²⁶. Although the role of CyPG as inducers of apoptosis is well documented, the relationship between Ras activation by CyPG and triggering of apoptosis, or proliferation, is not fully understood. We undertook the present study to explore the molecular mechanisms underlying PGA₁-induced apoptosis. We found that PGA₁ induces apoptosis in mouse fibroblast cells by specific activation of H-Ras and N-Ras at endomembranes and that this process requires activation of extracellular signal–regulated kinases (ERK).

RESULTS

PGA₁ induces apoptosis in fibroblasts

CyPG display potent anti-proliferative activity in various cellular models. These compounds induce cell cycle arrest or apoptosis depending on the cell type and treatment conditions²⁷⁻³⁰. Synchronous starved NIH3T3 cells were incubated in the presence of PGA₁ (see supplemental Fig. S1a) to assess anti-proliferative activity. Cell number decreased sharply, and cell counting revealed no viable cells after 48 h of treatment, even in the presence of strong mitogenic signals such as FGF (Fig. 1a). Flow cytometry analysis of propidium iodide-stained cells revealed that ~ 75% of PGA₁-treated cells showed an increase in hypodiploid DNA content after 24 h (Fig. 1b). In addition, DAPI staining also revealed apoptotic nuclear morphology after 24 h (Fig. 1c). Similar results were obtained in wild-type MEFs (data not shown). Caspase-3 cleavage was examined to verify that the effects of PGA₁ on hypodiploid DNA content reflected apoptosis. Western blotting using an antibody that detects both pro-caspase and activated, cleaved forms of caspase-3 revealed the presence of cleaved caspase-3 in cell lysate from PGA₁-treated cells, as well as cleaved poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), a typical target for activated caspase (Fig. 2a, and supplemental Fig. S1b). Moreover, both annexin V-binding analysis (Fig. 2b) and DNA laddering (Fig. 2c) suggested that this cell death was due to an apoptotic process. In agreement with these data, both caspase-3 activation and the increase in annexin V-positive cells were completely abolished by the pan-caspase inhibitor Z-Asp-CH₂-DCB (Fig. 2d). Taken together, these results strongly suggest that treatment of mouse fibroblast cells with PGA₁ leads to apoptosis through activation of a caspase-dependent pathway.

PGA₁-induced apoptosis requires expression of H-Ras and N-Ras

PGA₁-induced apoptosis has been reported in several cellular models, including cancer cells¹⁶. However, the precise molecular mechanism by which PGA₁ elicits cell elimination remains unclear. We recently reported that PGA₁ binds to and activates H-Ras, N-Ras, and K-Ras to a similar extent³¹. Since Ras proteins promote activation of the effector cascades that trigger apoptosis³², we used a knockout approach to evaluate the potential role these proteins play in mediating PGA₁-dependent apoptosis (supplemental Fig. S1c). Analysis of relevant apoptosis markers upon PGA₁ incubation in MEFs for H-Ras^{-/-} or N-Ras^{-/-} did not reveal differences in caspase-3 activation or in PARP proteolysis compared to wild-type MEFs. Interestingly, in H-Ras^{-/-}/N-Ras^{-/-} double knockout MEFs, PGA₁ failed to induce caspase activation and, therefore, apoptosis (Fig. 3a). Ectopic restitution of H-Ras or N-Ras expression in double knockout cells caused activation of PARP and caspase-3 by PGA₁ (Fig. 3b). Given that PGA₁-induced apoptosis requires expression of H-Ras or N-Ras, we reasoned that overexpression of these isoforms could synergize with the PGA₁ effects. Indeed, PGA₁-induced dose-dependent increases in cleaved caspase-3 levels were much greater in NIH3T3 cell lines stably overexpressing ectopic AU5-H-Ras-wt or AU5-N-Ras-wt than in control cell lines (Fig. 3c, upper panel). In agreement with these data, treatment of Ras-overexpressing fibroblasts with PGA₁ markedly increased the population of annexin V-positive cells (Fig. 3c, lower panel). Moreover, ectopic expression of a dominant negative mutant of H-Ras (H-Ras N17) reduced caspase-3 activation levels upon stimulation with PGA₁ (Fig. 3d). Taken together, these results strongly suggest that signaling by H-Ras and N-Ras (but not K-Ras) is required to promote PGA₁-induced apoptosis.

PGA₁ induces apoptosis through Ras-Cys118

Our previous studies showed that PGA₁ binds preferably to Cys118 in all three Ras proteins, and Cys184 and Cys181 in H-Ras³¹. However, rather than Cys184 or Cys181, PGA₁ activates H-Ras by binding to Cys 118³¹. Since Cys181 is shared by N-Ras and H-Ras, whereas Cys184 is unique to H-Ras, we speculated that Ras-Cys118 was the main target for PGA₁ in mediating apoptosis. To determine the relative contribution of Cys118, double-knockout MEFs were transfected with H-Ras-wt, H-Ras-C118S, or H-Ras-C184S. As shown in Fig. 4a, expression of H-Ras-wt or H-Ras-C184S induced caspase-3 activation in response to PGA₁, whereas expression of H-Ras-C118S did not. Furthermore, analysis of transfected PGA₁-stimulated MEFs showed that the C118S mutant did not increase the annexin V-positive population (Fig. 4b). These data provide strong evidence that Cys118 is necessary for PGA₁-induced apoptosis.

PGA₁ induces Ras activation in endomembranes

The fact that the three Ras isoforms were activated by PGA₁³¹ while double-knockout MEFs did not undergo apoptosis argues for the existence of an H-Ras and N-Ras isoform-specific mechanism. Although Cys118 is a common binding site for PGA₁ in the three Ras isoforms, it is possible that, since PGA₁ only binds K-Ras at this position, the signal originated is not sufficient to trigger apoptosis, thus highlighting the need for additional PGA₁ binding to Cys181 or Cys184 of N-Ras or H-Ras. This led us to speculate that PGA₁-induced apoptosis could probably involve H-Ras and N-Ras activation at specific subcellular localizations. Indeed, a considerable body of evidence supports the notion that Ras signaling, and therefore its biochemical and biological effects, is determined by the intracellular platform from which activation ensues^{33,34}. K-

Ras localize mainly in the plasma membrane, and phosphorylation of serine 181 promotes their redistribution to mitochondria³⁵, whereas H-Ras and N-Ras are associated with both the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum (ER), as well as with the plasma membrane^{9,36}. To examine whether activation of Ras by PGA₁ could be affected by intra-cellular localization, we measured the Ras-GTP levels induced by PGA₁ in HeLa cells transiently transfected with H-Ras targeting either the plasma membrane or endomembrane compartments. We found that M1-H-Ras-SS and KDEL-H-Ras-SS H-Ras constructs targeting the ER and the Golgi apparatus, respectively³⁷, were activated after stimulation by PGA₁ (Fig. 5a). In contrast, LCK-H-Ras-SS and CD8-H-Ras-SS, which directed H-Ras specifically towards the plasma membrane (lipid rafts and bulk membrane respectively³⁷), were not activated by PGA₁. Moreover, as shown in Fig. 5b, activated caspase-3 was detected in double-knockout MEFs transfected with M1-H-Ras-SS and KDEL-H-Ras-SS. To confirm that PGA₁ preferentially activated Ras on endomembranes, we studied the subcellular localization of PGA₁-induced Ras activation *in vivo* using double fluorescence confocal microscopy analysis of CH7C17 Jurkat cells, a human T-cell line that does not express H-Ras, but activates endogenous N-Ras, ERK, and apoptosis in response to either PGA₁ or CD3³⁸ Abs (supplemental Fig. S2). For this purpose, we co-transfected CH7C17 cells with enhanced cyan fluorescent protein (CFP)-H-Ras, which co-distribute between the plasma membrane and the ER/Golgi complex, and YFP-RBD-Raf-1, a yellow fluorescent tracker of H-Ras activation in live cells. Whereas YFP-RBD-Raf-1 was localized throughout the cytoplasm of non-stimulated cells, stimulation with CD3 or PGA₁ increased co-localization of YFP-RBD-Raf-1 with CFP-H-Ras on endomembranes (Fig. 5c) and was significantly higher than on the plasma membrane

(Fig. 5d). Thus, these results strongly suggest that PGA₁ activates Ras proteins in endomembrane compartments.

PGA₁-dependent ERK activation is required for apoptosis

One of the most important signaling pathways downstream of Ras is the Raf/MEK/ERK cascade. Since PGA₁ induced activation of Ras proteins, we assessed activation of these kinases downstream of Ras. Treatment of normal (wt) MEFs with PGA₁ induced activation of Raf, MEK, and ERK, although to a lesser extent than FGF (Fig. 6a). In agreement with these results, PGA₁ treatment promoted significant activation of an Elk-1 luciferase reporter, although this activation was once again weaker than that induced by FGF (Fig. 6b). Despite the weak and short duration of phospho-ERK levels (supplemental Fig. S3), we speculated that this activation could be responsible for the apoptosis observed. To further examine whether ERK activation was required for PGA₁-induced apoptosis, the MEK1/2 inhibitor U0126 was added before PGA₁ treatment (-50 min) and left until the end of PGA₁ treatment. As shown in Fig. 6c, the inhibitor completely blocked caspase-3 activation and the increase in annexin V-positive cells induced by PGA₁ in wild-type MEFs (similar results were obtained when Raf activity was inhibited, data not shown). Taken together, these data strongly suggest that PGA₁ promotes apoptosis through the activation of the Raf/MEK/ERK pathway.

DISCUSSION

Although PGA₁ displays potent anti-proliferative activity, a fundamental yet unanswered question is that of how PGA₁ triggers cell death. The cyclopentane ring of CyPG possesses an α,β -unsaturated carbonyl group that reacts with sulfhydryl groups in cysteine residues of cellular proteins by means of Michael's addition^{18,19}. During recent years, several protein targets have been identified for CyPG, including NF- κ B, AP1, Keap-1, and LKB1³⁹⁻⁴². We recently reported that Ras proteins can be modified by the addition of 15d-PGJ2 and PGA₁; in fact, the three Ras isoforms (H-Ras, N-Ras, and K-Ras4B) bind to and are activated by PGA₁^{22,31}. Our results support the notion that PGA₁ induces apoptosis by a caspase-dependent mechanism that requires either H-Ras or N-Ras, but not K-Ras. We also found that PGA₁-induced apoptosis is likely initiated by a ER/Golgi complex pool of Ras and requires activation of ERK.

Induction of apoptosis by PGA₁ was previously reported in other cell types, such as endothelial cells, gastric epithelial cells, lung cancer cells, prostate cancer cells, and colon cancer cells^{25,26,43,44}, as well as in quiescent mature immune cells⁴⁵. In contrast, some cellular models suggest that PGA₁ protects against apoptosis through a mechanism that involves inhibition of NF- κ B activation⁴⁶. Our results underscore the importance of new findings, namely, that PGA₁-induced apoptosis required expression of H-Ras or N-Ras, but not K-Ras. Indeed, the only MEFs not to show activation of caspase-3 after stimulation with PGA₁ were those that did not harbor both the *H-ras* and the *N-ras* genes; in addition, the percentage of apoptotic cells was similar to that of non-treated cells. Consistent with this observation, the ectopic overexpression of H-Ras or N-Ras in double-knockout MEFs was sufficient to rescue the apoptotic levels induced by PGA₁. Moreover, NIH3T3 cells constitutively overexpressing ectopic H-Ras or N-Ras displayed synergistic enhancement of PGA₁ apoptotic effects, even at low

concentrations. In addition, overexpression of a dominant negative mutant of H-Ras (H-Ras N17) in fibroblasts caused a significant reduction in caspase-3 activation, indicating that functional Ras signaling is essential for PGA₁-induced apoptosis.

The mechanism of activation of Ras proteins by PGA₁ remains elusive, although preliminary results from our laboratory suggest that PGA₁ induces a Ras-active conformation by direct binding without the need for GEF proteins (García-Domínguez C.A. et al, manuscript in preparation). Our previous studies showed that PGA₁ activates H-Ras, N-Ras, and K-Ras4B proteins³¹. Experiments to examine the sites of modification of H-Ras showed that PGA₁ binds to Cys118, Cys181, and Cys184. However, PGA₁ activates H-Ras by binding to Cys118³¹ rather than to Cys181 and Cys184. Since, Cys118 is a common binding site for PGA₁ in the three Ras isoforms, we speculated that it was the main residue for PGA₁ to elicit apoptosis. Indeed, mutation of Cys118 to serine in H-Ras blocks the apoptosis induced by PGA₁.

Our results clearly show that PGA₁ activates Ras proteins in the ER/Golgi complex, but not in the plasma membrane (lipid rafts or bulk membrane). Consistent with these findings, CFP-H-Ras in CH7C17 cells co-localized *in vivo* with YFP-RBD-Raf-1 in endomembrane systems upon stimulation with PGA₁. The reason why Ras proteins are specifically activated by PGA₁ in the ER/Golgi complex remains unknown. A large body of evidence supports the possibility that H-Ras/N-Ras activation can occur in this complex; nevertheless, the specific outcome of this activation remains open to debate. Thus, activated H-Ras targeting the Golgi apparatus has been reported to elicit strong activation of ERK and AKT, but weak activation of JNK, whereas the opposite effects were described when H-Ras targeted the ER⁴⁷. Other studies⁹, however, which used the Golgi apparatus–tethering signal KDELr containing the mutation N193D that fixes it permanently to the Golgi apparatus, reported that activated H-Ras tethered to the

Golgi apparatus (KDEL-HRasV12-SS) only induced Ral and JNK signaling, whereas hyperactive H-Ras targeting the ER (M1-HRasV12-SS) displayed potent activation of ERK and AKT. We observed that PGA₁ induces transitory and weak activation of ERK, although no effects on AKT or JNK phosphorylation were observed. At first glance, the ability of PGA₁ to stimulate transitory activation of ERK appears to contradict most studies about apoptosis induced by Ras-ERK signaling, in which ERK activation was prolonged, whereas transient activation of ERK protects against death^{48,49}. However, overexpression of the hyperactive M1-HRasV12-SS that promotes constitutive ERK activation and generated an anti-apoptotic signal⁹ did not induce apoptosis in wild-type MEFs (data not shown). Thus, our results support the notion that the nature, intensity, duration, and compartmentalization of Ras-ERK signaling provide a specific outcome. Further studies are necessary to elucidate the transduction pathway downstream of ERK that is associated with caspase-3 cleavage upon stimulation with PGA₁.

Our study provides new insight into how PGA₁ generates a specific cellular effect by activating H-Ras and N-Ras in the ER and in the Golgi apparatus. Our findings reveal a novel mechanism by which PGA₁ stimulates apoptosis as a consequence of activation of H-Ras and N-Ras in the ER/Golgi complex, whereas K-Ras was dispensable for this function. Of note, we demonstrate that the Raf-MEK-ERK cascade is the signaling pathway responsible for this cell death through caspase-3 activation. Our results highlight the relevance for physiological outcome of the intensity, duration, and specific subcellular location of Ras activation.

METHODS

Materials. Cell culture medium was purchased from Invitrogen (Carlsbad, California, USA). The pan-caspase inhibitors Z-Asp-CH₂-DCB, U0126, and GW5074 were from BIOMOL Research Laboratories Inc. (Plymouth Meeting, Pennsylvania, USA). PGA₁,

propidium iodide, DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole), and recombinant bFGF were from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). DEA-NO was from Alexis Biochemicals (Carlsbad).

Cell culture. HeLa and NIH3T3 cells were obtained from ATCC (Manassas, Virginia, USA) and cultured in DMEM medium supplemented with 10% FBS (Invitrogen), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), and L-glutamine (2 mM) at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Knock-out MEFs for *H-ras* and/or *N-ras* genes are described elsewhere⁵⁰. CH7C17 cells were cultured in RPMI medium supplemented with 10% FBS (Invitrogen). The synchronization process involved cells being cultured in normal medium for 24 h, serum-starved for 24 h, and then treated with PGA₁ in the absence of serum.

Cell proliferation and cell cycle analysis. Cells (2.5×10^5) were seeded in triplicate in 60-mm dishes and synchronized as described above. They were then treated with FGF, PGA₁, or vehicle (DMSO) for the specified times, trypsinized at different intervals, and counted with a hemocytometer. Cell cycle profiles were determined by propidium iodide staining (0.1 mg/ml) and flow cytometry, as previously described⁵¹.

Annexin V-FITC staining. Cell lines were grown and treated as described above. Apoptosis was determined using fluorescein isothiocyanate–conjugated Annexin V (Annexin V-FITC)/Propidium Iodide Apoptosis Detection Kit (R&D systems, Minneapolis, Minnesota, USA) according to the manufacturer's instructions. Cells that were positive for Annexin V-FITC and/or propidium iodide were analyzed using a BD FACS flow cytometer.

Apoptosis assays. Cells were trypsinized, mounted on glass slides, and then fixed with 70% ethanol. Morphological changes in chromatin structure were assessed after staining with DAPI, as described elsewhere⁵². Apoptosis was characterized according to

chromatin condensation and fragmentation using fluorescence microscopy. The incidence of apoptosis in each preparation was analyzed by counting 500 cells and determining the percentage of apoptotic cells.

DNA constructs. The plasmids used—pCEFL-KZ-AU5, pCEFL-KZ-AU5-H-Ras-wt, pCEFL-KZ-HA-H-Ras-wt, pCEFL-KZ-AU5-N-Ras-wt, and pGEX-GST-Raf-RBD—have been described elsewhere^{22,31,53-56}, as have pCEFL-KZ-AU5-H-Ras-C118S (H-RasC118S), pCEFL-KZ-AU5-H-Ras-C184S pCEFL-KZ-HA-M1-H-RasSS, pCEFL-KZ-HA-KDEL-H-RasSS, pCEFL-KZ-HA-CD8-H-RasSS, pCEFL-KZ-HA-LCK-H-RasSS, pCEFL-KZ-HA-M1-H-RasV12SS, and pCEFL-KZ-HA-KDEL-H-RasV12SS^{9,37} and pEYFP-Raf-RBD and pECFP- H-Ras-wt³⁸.

Cell transfection studies. Transient transfection was performed in NIH3T3, HeLa, and MEFs using Jet-PeiTM (Polyplus-Transfection, Illkirch, France). CH7C17 cells (15×10^6) were transfected using the Pulser X-cell Electroporation System (Bio-Rad, Hercules, California, USA) at 250 V and 1,200 μ F, with 25 μ g of expression plasmids encoding the indicated constructs.

Reporter gene analysis. Cells were transfected with 16 ng of pCDNAIII-Gal4-Elk1, 0.1 μ g of pRL-TK (a plasmid containing the *Renilla* luciferase gene under control of the HSV-TK promoter), and 0.3 μ g of the reporter plasmid pGal4-Luc (containing the *Photinus* luciferase gene controlled by six copies of a Gal4 responsive element).

T-cell activation and confocal microscopy. CH7C17 cells (15×10^6) were serum-starved at 37°C for 2 h before stimulation with DMSO, PGA₁ (30 μ M/15 min), or anti-human CD3 ϵ T3b mAb (5 μ g/ml)³⁸. The spatial distribution of pEYFP-RBD-Raf-1 and pECFP-H-Ras was analyzed as described elsewhere³⁸.

Western blot analysis. Cells were lysed in a buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 2% SDS, and 5% β -mercaptoethanol. Cell extracts (20 μ g protein/lane)

underwent SDS-PAGE before being transferred to PVDF membranes (Millipore, Bedford, Massachusetts). After blocking with 5% milk in 0.1% Tween 20/PBS, membranes were incubated with the primary antibody. The first antibodies were anti-caspase 3 (8G10), anti-PARP, anti-ERK, anti-pERK (thr202/tyr204) (Cell signaling Technology, Beverly, Massachusetts, USA), anti-K-Ras, anti-N-Ras (Santa Cruz, sc-31), anti-CD3ε T3 mAb (ref. 38), anti-actin (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, California, USA), anti-H-Ras (Y132) (Abcam, Cambridge, UK), anti-HA and anti-AU5 monoclonal antibodies (Berkeley Antibody Company, Berkeley, California, USA), and anti-rabbit and anti-mouse (Li-Cor Biosciences, Lincoln, New England, USA). Anti-mouse or anti-rabbit horseradish peroxidase (1:3000, Bio-Rad) was used as a secondary antibody. Bands were visualized using an enhanced chemiluminescence detection kit (ECL, Amersham, Arlington Heights, Illinois, USA).

Ras-GTP detection. The plasmid pGEX-RBD, which contains the Raf-Ras-binding domain fused to glutathione S-transferase (GST), was kindly provided by D. Shalloway. The GST fusion protein was purified following a previously described method²² from *E. coli* BL21 (DE3) harboring the corresponding plasmid to express the protein. In all binding experiments and Ras-GTP detection assays, transfected mammalian cells were lysed in cold lysis buffer²², and 10 µg of the corresponding GST-fusion proteins coupled to glutathione-sepharose beads were added to the extracts and processed as described elsewhere²².

DNA laddering. Floating and adherent cells were collected in TE/Triton buffer (0.2% Triton X-100, 10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA). Following incubation on ice for 10 min, an aliquot of the lysate containing total DNA was removed, and the remaining lysates were centrifuged for 15 min at 14,000 × g and 4°C. Supernatant containing low-molecular-weight DNA was transferred to a fresh tube and treated with DNase-free

RNase A (60 µg/ml) for 1 h at 37°C. SDS (0.5%) and proteinase K (150 µg/ml) were added, and the samples were incubated for 1 h at 50°C. DNA was precipitated by addition of 0.1 volumes of 0.5 M NaCl and 1.0 volume of isopropanol, followed by incubation on ice for 10 min. After centrifugation, DNA in TE buffer (10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA) was analyzed on 2% agarose gels.

Statistical analysis. Data were analyzed using SPSS software (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA). ANOVA was used to test statistical significance. Results are expressed as mean ± SD of the indicated number of experiments. Statistical significance was evaluated using the *t* test for unpaired observations. A *P* value of less than 0.05 was considered significant. Western blots were analyzed using linear correlations between increasing amounts of protein and signal intensity.

ACKNOWLEDGMENTS

APR, GL, TG, and LMD were recipients of fellowships from the Comunidad de Madrid (APR), Ministerio de Educación y Ciencia (GL, TG), and FIS-BEFI (LMD). JLO is member of the Miguel Servet Program (Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de de Salud Carlos III). Grant support was awarded to JMR from Fondo de Investigaciones Sanitarias-Intrasalud (PI09/0562) and the Spanish Association Against Cancer (AECC). JLO received grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (CP07/00141 and PI10/00815). DPS received grants SAF2009-11642 and RETIC (Red de Investigación de Reacciones Adversas a Alergenos y Fármacos) RD07/0064/0007 from the Instituto de San Carlos III. ES received grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (PS09/01979). JMS received grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI070356) and “Ayuda Intramural de Incorporación al CSIC”. ES, JMR, and PC, respectively, received grants RD06/0020/0000, RD06/0020/0003, and RD06/0020/0105 from Instituto de San Carlos III-RETIC (Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

APR, BA, JC, CAGD, and SH performed most of the experiments analyzing PGA₁-elicited Ras activation and cell apoptosis. NM, GL, TG, and LMD were involved in the analysis of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway. JMS and SI designed and performed CH7C17 localization imaging assays. ES provided MEFs and PC provided tagged Ras constructs; both authors contributed to the design of experiments. DPS shared preliminary data and conceived experimental approaches. JMR and JLO conceived and designed experiments, prepared final figures, and wrote the manuscript.

REFERENCES

- 1 Karnoub, A. E. & Weinberg, R. A. Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 517-531 (2008).
- 2 Omerovic, J., Hammond, D. E., Clague, M. J. & Prior, I. A. Ras isoform abundance and signalling in human cancer cell lines. *Oncogene* **27**, 2754-2762 (2008).
- 3 Mitin, N., Rossman, K. L. & Der, C. J. Signaling interplay in Ras superfamily function. *Curr Biol* **15**, R563-574 (2005).
- 4 Furth, M. E., Aldrich, T. H. & Cordon-Cardo, C. Expression of ras proto-oncogene proteins in normal human tissues. *Oncogene* **1**, 47-58 (1987).
- 5 Leon, J., Guerrero, I. & Pellicer, A. Differential expression of the ras gene family in mice. *Mol Cell Biol* **7**, 1535-1540 (1987).
- 6 Buday, L. & Downward, J. Many faces of Ras activation. *Biochim Biophys Acta* **1786**, 178-187 (2008).
- 7 Koera, K. *et al.* K-ras is essential for the development of the mouse embryo. *Oncogene* **15**, 1151-1159 (1997).
- 8 Johnson, L. *et al.* K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes Dev* **11**, 2468-2481 (1997).
- 9 Matallanas, D. *et al.* Distinct utilization of effectors and biological outcomes resulting from site-specific Ras activation: Ras functions in lipid rafts and Golgi complex are dispensable for proliferation and transformation. *Mol Cell Biol* **26**, 100-116 (2006).
- 10 Roy, S. *et al.* Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nat Cell Biol* **1**, 98-105 (1999).
- 11 Prior, I. A. *et al.* GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity. *Nat Cell Biol* **3**, 368-375 (2001).
- 12 Omerovic, J., Laude, A. J. & Prior, I. A. Ras proteins: paradigms for compartmentalised and isoform-specific signalling. *Cell Mol Life Sci* **64**, 2575-2589 (2007).
- 13 Kato, T., Fukushima, M., Kurozumi, S. & Noyori, R. Antitumor activity of delta 7-prostaglandin A1 and delta 12-prostaglandin J2 in vitro and in vivo. *Cancer Res* **46**, 3538-3542 (1986).
- 14 Kim, I. K., Lee, J. H., Sohn, H. W., Kim, H. S. & Kim, S. H. Prostaglandin A2 and delta 12-prostaglandin J2 induce apoptosis in L1210 cells. *FEBS Lett* **321**, 209-214 (1993).
- 15 Musiek, E. S. *et al.* Cyclopentenone isoprostanes are novel bioactive products of lipid oxidation which enhance neurodegeneration. *J Neurochem* **97**, 1301-1313 (2006).
- 16 Straus, D. S. & Glass, C. K. Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Med Res Rev* **21**, 185-210 (2001).
- 17 Roberts, L. J., 2nd & Morrow, J. D. Products of the isoprostane pathway: unique bioactive compounds and markers of lipid peroxidation. *Cell Mol Life Sci* **59**, 808-820 (2002).
- 18 Narumiya, S., Ohno, K., Fukushima, M. & Fujiwara, M. Site and mechanism of growth inhibition by prostaglandins. III. Distribution and binding of prostaglandin A2 and delta 12-prostaglandin J2 in nuclei. *J Pharmacol Exp Ther* **242**, 306-311 (1987).

- 19 Sanchez-Gomez, F. J., Cernuda-Morollon, E., Stamatakis, K. & Perez-Sala, D. Protein thiol modification by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 addition in mesangial cells: role in the inhibition of pro-inflammatory genes. *Mol Pharmacol* **66**, 1349-1358 (2004).
- 20 Stamatakis, K., Sanchez-Gomez, F. J. & Perez-Sala, D. Identification of novel protein targets for modification by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 in mesangial cells reveals multiple interactions with the cytoskeleton. *J Am Soc Nephrol* **17**, 89-98 (2006).
- 21 Musiek, E. S., Milne, G. L., McLaughlin, B. & Morrow, J. D. Cyclopentenone eicosanoids as mediators of neurodegeneration: a pathogenic mechanism of oxidative stress-mediated and cyclooxygenase-mediated neurotoxicity. *Brain Pathol* **15**, 149-158 (2005).
- 22 Oliva, J. L. *et al.* The cyclopentenone 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 binds to and activates H-Ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4772-4777 (2003).
- 23 Millan, O. *et al.* Potentiation of tumor formation by topical administration of 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 in a model of skin carcinogenesis. *Carcinogenesis* **27**, 328-336 (2006).
- 24 Sasaki, H. *et al.* Human ovarian cancer cell lines resistant to cisplatin, doxorubicin, and L-phenylalanine mustard are sensitive to delta 7-prostaglandin A1 and delta 12-prostaglandin J2. *Gynecol Oncol* **41**, 36-40 (1991).
- 25 Bishop-Bailey, D. & Hla, T. Endothelial cell apoptosis induced by the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligand 15-deoxy-Delta12, 14-prostaglandin J2. *J Biol Chem* **274**, 17042-17048 (1999).
- 26 Liu, J. D. *et al.* Involvement of c-jun N-terminal kinase activation in 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2-and prostaglandin A1-induced apoptosis in AGS gastric epithelial cells. *Mol Carcinog* **37**, 16-24 (2003).
- 27 de Bittencourt, P. I., Jr., Miyasaka, C. K., Curi, R. & Williams, J. F. Effects of the antiproliferative cyclopentenone prostaglandin A1 on glutathione metabolism in human cancer cells in culture. *Biochem Mol Biol Int* **45**, 1255-1264 (1998).
- 28 Tsubouchi, Y. *et al.* Inhibition of human lung cancer cell growth by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists through induction of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **270**, 400-405 (2000).
- 29 Chinetti, G. *et al.* Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* **273**, 25573-25580 (1998).
- 30 Kawahito, Y. *et al.* 15-deoxy-delta(12,14)-PGJ(2) induces synoviocyte apoptosis and suppresses adjuvant-induced arthritis in rats. *J Clin Invest* **106**, 189-197 (2000).
- 31 Renedo, M. *et al.* Modification and activation of Ras proteins by electrophilic prostanoids with different structure are site-selective. *Biochemistry* **46**, 6607-6616 (2007).
- 32 Cox, A. D. & Der, C. J. The dark side of Ras: regulation of apoptosis. *Oncogene* **22**, 8999-9006 (2003).
- 33 Philips, M. R. Compartmentalized signalling of Ras. *Biochem Soc Trans* **33**, 657-661 (2005).
- 34 Omerovic, J. & Prior, I. A. Compartmentalized signalling: Ras proteins and signalling nanoclusters. *Febs J* **276**, 1817-1825 (2009).
- 35 Bivona, T. G., Quatela, S. & Philips, M. R. Analysis of Ras activation in living cells with GFP-RBD. *Methods Enzymol* **407**, 128-143 (2006).

- 36 Rocks, O. *et al.* An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms. *Science* **307**, 1746-1752 (2005).
- 37 Arozarena, I. *et al.* Activation of H-Ras in the endoplasmic reticulum by the RasGRF family guanine nucleotide exchange factors. *Mol Cell Biol* **24**, 1516-1530 (2004).
- 38 Ibiza, S. *et al.* Endothelial nitric oxide synthase regulates N-Ras activation on the Golgi complex of antigen-stimulated T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 10507-10512 (2008).
- 39 Cernuda-Morollon, E., Pineda-Molina, E., Canada, F. J. & Perez-Sala, D. 15-Deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 inhibition of NF-kappaB-DNA binding through covalent modification of the p50 subunit. *J Biol Chem* **276**, 35530-35536 (2001).
- 40 Perez-Sala, D., Cernuda-Morollon, E. & Canada, F. J. Molecular basis for the direct inhibition of AP-1 DNA binding by 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2. *J Biol Chem* **278**, 51251-51260 (2003).
- 41 Levonen, A. L. *et al.* Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem J* **378**, 373-382 (2004).
- 42 Wagner, T. M., Mullally, J. E. & Fitzpatrick, F. A. Reactive lipid species from cyclooxygenase-2 inactivate tumor suppressor LKB1/STK11: cyclopentenone prostaglandins and 4-hydroxy-2-nonenal covalently modify and inhibit the AMP-kinase kinase that modulates cellular energy homeostasis and protein translation. *J Biol Chem* **281**, 2598-2604 (2006).
- 43 Chiang, P. C. *et al.* Induction of Fas clustering and apoptosis by coral prostanoid in human hormone-resistant prostate cancer cells. *Eur J Pharmacol* **542**, 22-30 (2006).
- 44 Cassidy, P. B. *et al.* Thioredoxin reductase is required for the inactivation of tumor suppressor p53 and for apoptosis induced by endogenous electrophiles. *Carcinogenesis* **27**, 2538-2549 (2006).
- 45 Bureau, F. *et al.* Constitutive nuclear factor-kappaB activity preserves homeostasis of quiescent mature lymphocytes and granulocytes by controlling the expression of distinct Bcl-2 family proteins. *Blood* **99**, 3683-3691 (2002).
- 46 He, J. K., Gu, Z. L. & Fan, P. S. Inhibitory effects of prostaglandin A1 on apoptosis of rat cardiac microvascular endothelial cells was mediated by NF-kappaB. *Acta Pharmacol Sin* **23**, 331-335 (2002).
- 47 Chiu, V. K. *et al.* Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nat Cell Biol* **4**, 343-350 (2002).
- 48 Arany, I., Megyesi, J. K., Kaneto, H., Price, P. M. & Safirstein, R. L. Cisplatin-induced cell death is EGFR/src/ERK signaling dependent in mouse proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **287**, F543-549 (2004).
- 49 di Mari, J. F., Davis, R. & Safirstein, R. L. MAPK activation determines renal epithelial cell survival during oxidative injury. *Am J Physiol* **277**, F195-203 (1999).
- 50 Castellano, E., De Las Rivas, J., Guerrero, C. & Santos, E. Transcriptional networks of knockout cell lines identify functional specificities of H-Ras and N-Ras: significant involvement of N-Ras in biotic and defense responses. *Oncogene* **26**, 917-933 (2007).
- 51 Nakagawa, M. *et al.* Phorbol ester-induced G1 phase arrest selectively mediated by protein kinase Cdelta-dependent induction of p21. *J Biol Chem* **280**, 33926-33934 (2005).

- 52 Tanaka, Y., Gavrielides, M. V., Mitsuuchi, Y., Fujii, T. & Kazanietz, M. G. Protein kinase C promotes apoptosis in LNCaP prostate cancer cells through activation of p38 MAPK and inhibition of the Akt survival pathway. *J Biol Chem* **278**, 33753-33762 (2003).
- 53 Rojas, J. M. *et al.* A 15 amino acid stretch close to the Grb2-binding domain defines two differentially expressed hSos1 isoforms with markedly different Grb2 binding affinity and biological activity. *Oncogene* **12**, 2291-2300 (1996).
- 54 Taylor, S. J. & Shalloway, D. Cell cycle-dependent activation of Ras. *Curr Biol* **6**, 1621-1627 (1996).
- 55 Zarich, N., Oliva, J. L., Jorge, R., Santos, E. & Rojas, J. M. The isoform-specific stretch of hSos1 defines a new Grb2-binding domain. *Oncogene* **19**, 5872-5883 (2000).
- 56 Jorge, R. *et al.* HSos1 contains a new amino-terminal regulatory motif with specific binding affinity for its pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* **277**, 44171-44179 (2002).

FIGURE LEGENDS

Figure 1. PGA₁ promotes cell death in NIH3T3 cells. **a)** Serum-starved cultures of cells were treated with 30 μM PGA₁, 50 ng/ml FGF, or DMSO every 24 h. *Left panel*, cells were collected at 24, 48, or 72 h and scored by cell counting; data are presented as mean ± SD (n=3). *Right panel*, cell morphology was recorded by phase-contrast micrograph 24 h after treatment. **b)** Analysis of sub-G1 (hypodiploid) DNA content in NIH3T3 cells 24 h after addition of 30 μM PGA₁ or DMSO; results are expressed as mean ± SD (n=5). **c)** *Upper panel*, a representative picture of NIH3T3 cells after DAPI staining. Nuclear morphology is shown 24 h after treatment with DMSO or with 30 μM PGA₁. Arrows highlight the apoptotic nuclei. *Lower panel*, the percentage of apoptotic nuclei was determined by DAPI staining 24 h after addition of DMSO or 30 μM PGA₁; results are expressed as mean ± SD of five independent experiments. **P≤0.001 compared with non-stimulated (DMSO) cells.

Figure 2. PGA₁ stimulates apoptotic cell death. Serum-starved cultures of wild-type MEFs were stimulated with 30 μM PGA₁ or DMSO and harvested 3 h after treatment (see supplemental Fig. S1A. **a)** Lysates prepared from cells were analyzed by Western blotting for pro- and cleaved forms of caspase-3 and PARP. Detection of β-actin (actin) was used as a loading control, and the levels of cleaved caspase 3, which were determined by densitometry, are provided at the bottom of the Western blot (SD < 10% average in each case). **b)** Twenty-four hours after treatment with 30 μM PGA₁ or DMSO, cells were analyzed for apoptosis using annexin V/FITC staining in a FACS flow cytometer and the percentage of apoptosis was determined. **c)** Low-molecular-weight DNA was isolated and fractionated on agarose gels 24 h after treatment with 30

μM PGA₁ or DMSO (see “Methods”). **d**) Cells stimulated with 30 μM PGA₁ or DMSO in the presence or absence of Z-Asp-CH₂-DCB (20 μM) were harvested 3 h after treatment. *Upper panel*, cell lysates were prepared and analyzed using Western blot as in **a**. The levels of cleaved caspase 3, determined by densitometry, are provided at the bottom of the Western blot (SD < 10% average in each case). All experiments (**a-d**) were carried out 4 times with similar results. *Lower panel*, annexin V/FITC staining analysis was performed as in **b**. Results are expressed as mean ± SD (n=3), ***P≤0.001 and **P≤0.01 compared with non-stimulated (DMSO) cells. In all cases, similar results were obtained with NIH3T3 cells (data not shown).

Figure 3. Apoptosis induced by PGA₁ depends on H-Ras and N-Ras. Serum-starved WT, H-Ras^{-/-}, N-Ras^{-/-}, or H-Ras^{-/-}/N-Ras^{-/-} MEFs were stimulated with 30 μM PGA₁ or DMSO and harvested 3 h after treatment. **a**) *Upper panel*, a representative Western blot analysis as in Figure 2a. Three additional experiments gave similar results and the levels of cleaved caspase 3, which were determined by densitometry, are provided at the bottom of each Western blot (SD < 10% average in each case). *Lower panel*, annexin V/FITC staining analysis was performed as in Figure 2a. Results (mean ± SD, n=4) are expressed as fold-increase in the percentage of DMSO-treated cells ***P≤0.001. **b**) H-Ras^{-/-}/N-Ras^{-/-} MEFs transiently transfected with pCEFL-KZ-AU5-H-Ras-wt (AU5-H-Ras), pCEFL-KZ-AU5-N-Ras-wt (AU5-N-Ras), or pCEFL-KZ-AU5 (Vector) were serum-starved for 24 h and then incubated with vehicle (-) or 30 μM PGA₁ (+). wt MEFs (WT) were analyzed in parallel using the same stimuli. Cell lysates were obtained 3 h after treatment and analyzed using Western blot; the expression level of the ectopic AU5-Ras was assessed using anti-AU5. The levels of cleaved caspase 3 (**b-d**), which were determined by densitometry, are provided at the bottom of the Western blot.

The figures indicate the average levels of cleaved caspase-3 relative to controls of at least four independent experiments (SD < 10% average in each case). **c)** NIH3T3 cells stably transfected with pCEFL-KZ-AU5-H-Ras-wt (AU5-H-Ras), pCEFL-KZ-AU5-N-Ras-wt (AU5-N-Ras), or pCEFL-KZ-AU5 (Vector) were serum-starved for 24 h and then incubated with vehicle (-) or PGA₁ (10 and 30 μM) and harvested 3 h after treatment. *Upper panel*, cell lysates were analyzed using Western blot as in Figure **3b**. *Lower panel*, annexin V/FITC staining analysis was performed as in Figure **2b** (using 30 μM of PGA₁). Results (mean ± SD, n=3) are expressed as fold-increase in the percentage of DMSO-treated cells, ***P≤0.001 and *P≤0.05 compared with non-stimulated (DMSO) cells. **d)** NIH3T3 cells transiently transfected with pCEFL-KZ-AU5-H-Ras-N17 (H-RasN17) or pCEFL-KZ-AU5 (Vector) were serum-starved for 24 h and then incubated with vehicle (-) or 30 μM PGA₁ (+). Cell lysates were obtained 3 h after treatment and analyzed using Western blot as in panel **a**.

Figure 4. Ras-Cys118 is necessary for PGA₁-induced apoptosis. H-Ras^{-/-}/N-Ras^{-/-} MEFs transiently transfected with pCEFL-KZ-AU5-H-Ras-wt (H-RasWT), pCEFL-KZ-AU5-H-Ras-C118S (H-RasC118S), or pCEFL-KZ-AU5-H-Ras-C184S (H-RasC184S), were serum-starved for 24 h and then incubated with vehicle (-) or 30 μM PGA₁ (+). **a)** Cell lysates were obtained 3 h after treatment and analyzed using Western blot; the expression level of ectopic AU5-Ras was assessed using anti-AU5. The results shown are from a representative experiment, and similar results were obtained from three additional, separate experiments. The levels of cleaved caspase 3, which were determined by densitometry, are provided at the bottom of the Western blot (SD < 10% average in each case). **b)** Annexin V/FITC staining analysis was performed as in Figure

2B. Results (mean \pm SD, n=4) are expressed as the fold-increase in the percentage of DMSO-treated cells, *** P \leq 0.001 compared with non-stimulated (DMSO) cells.

Figure 5. Activation of Ras by PGA₁ occurs in endomembrane compartments. a)

HeLa cells transiently transfected with pCEFL-KZ-HA-H-Ras-wt, pCEFL-KZ-HA-M1-H-RasSS, pCEFL-KZ-HA-KDEL-H-RasSS, pCEFL-KZ-HA-LCK-H-RasSS, or pCEFL-KZ-HA-CD8-H-RasSS were serum-starved for 24 h and then incubated with DMSO, EGF (100 ng/ml, for 15 min), or PGA₁ (30 μ M for 15 min.). Ras-GTP was recovered from cell lysates by binding to immobilized GST containing the Ras-GTP binding domain of Raf and detected by immunoblotting with anti-HA monoclonal antibody (upper panel). The expression levels of the transfected HA-H-Ras constructs were detected by immunoblotting the cell extracts with the corresponding anti-HA monoclonal antibody (lower panel). The results shown are from a representative experiment, and similar results were obtained from three additional, separate experiments. Ras-GTP levels were determined by densitometry and are shown at the bottom of the Western blot (SD < 10% average in each case, n=4). **b)** H-Ras^{-/-}/N-Ras^{-/-} MEFs transiently transfected with pCEFL-KZ-HA-H-Ras-wt (WT), pCEFL-KZ-HA-M1-H-RasSS (M1), or pCEFL-KZ-HA-KDEL-H-RasSS (KDEL) were serum-starved for 24 h and then incubated with vehicle (-) or 30 μ M PGA₁ (+). Cell lysates were obtained 3 h after treatment and were analyzed using Western blot; the expression level of the ectopic HA-Ras was assessed using anti-HA. Levels of cleaved caspase 3 were determined by densitometry and are provided at the bottom of the Western blot (SD < 10% average in each case). **c)** CH7C17 cells transiently co-transfected with pEYFP-Raf-RBD (yellow, RBD-Raf-1) and pECFP-H-Ras-wt (cyan, H-Ras-CFP) were serum-starved for 24 h and then incubated with DMSO (non-stimulated), 30 μ M PGA₁, or 5

μg/ml anti CD3 Ab. The subcellular localization of RBD-Raf-1 and H-Ras was recorded using confocal fluorescence microscopy at 15 min after treatment. Right, the corresponding profile analysis of the intensity and distribution of H-Ras (cyan solid line) and RBD-Raf-1 (yellow dashed line) along a cross-section of the regions of interest R1-3 (ER/Golgi) are shown. **d)** Comparative quantitative analysis of the cellular localization of YFP-RBD-Raf-1 (RBD) in CH7C17 cells transiently co-transfected with pEYFP-Raf-RBD and pECFP-H-Ras-wt. Histograms show the ratio of YFP-RBD-Raf-1/CFP-H-Ras accumulation in the ER/Golgi complex (white) or at the plasma membrane (PM) (green) of CH7C17 cells. At least 100 cells were scored for each condition. Data are expressed as mean ± SD of three independent experiments. ***P≤0.001 and *P≤0.05 compared with non-stimulated (DMSO) cells (-).

Figure 6. ERK activation is necessary for PGA₁-dependent apoptosis. Serum-starved wt MEFs were stimulated with 30 μM PGA₁, FGF, or DMSO. **a)** Lysates prepared from cells 15 min after treatment underwent Western blotting for relevant components of the Raf/MEK/ERK pathway. Similar results were obtained in three additional experiments. The levels of p-cRaf, p-MEK1/2, and p-ERK1/2, which were determined by densitometry, are provided at the bottom of each Western blot (SD < 10% average in each case, n=4). **b)** Cells were co-transfected with the plasmids pcDNAIII-Gal4-Elk1, pGal4-Luc, and pTK-Renilla 24 h prior to synchronization. Firefly luciferase activity was determined 6 h after stimulation with PGA₁ and normalized to Renilla luciferase activity. Results, in arbitrary units (AU), are expressed as mean ± SD (n=3). **c)** MEK1/2 inhibitor U0126 (5 μM) was added 50 min before PGA₁ treatment (30 μM) and left in the medium until processing. *Upper panel.* Cell lysates were prepared and analyzed using Western blot for detection of cleaved caspase-

3. Similar results were obtained in three additional experiments, and the levels of cleaved caspase 3, which were determined by densitometry, are provided at the bottom of the Western blot (SD < 10% average in each case). *Lower panel*, annexin V/FITC staining analysis was performed as in Figure 2**b** (using PGA₁ 30 μM). Results (mean ± SD, n=4) are expressed as a fold increase in the percentage of DMSO-treated cells, **P≤0.001 compared with non-stimulated (DMSO) cells.

Supplementary Figures

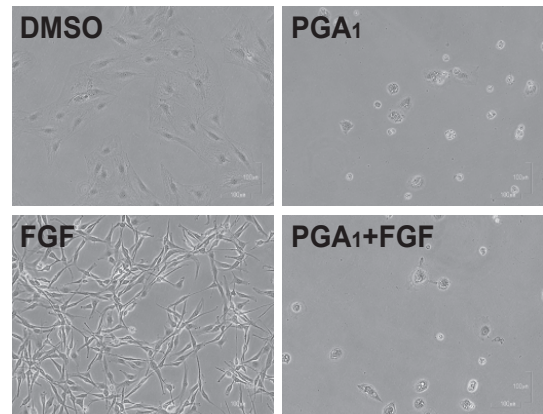
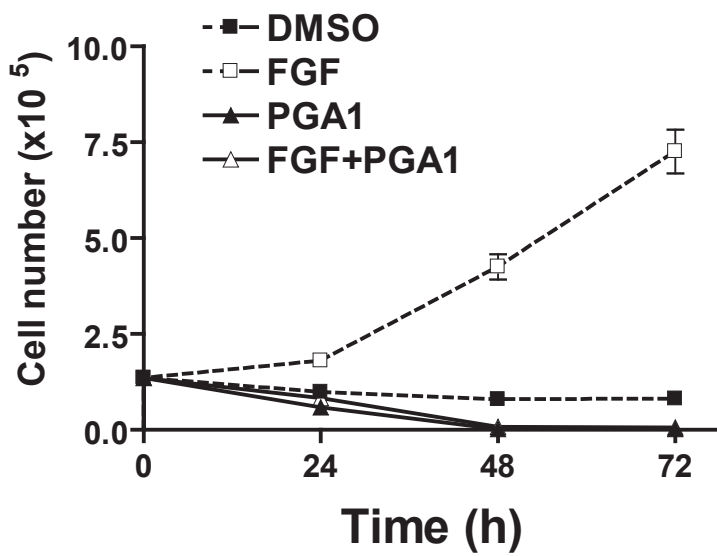
Figure S1. **a)** Schematic representation of the protocol followed in most studies. PGA₁ was added 24 h after serum deprivation, which corresponds to the G0/G1 phase. In cell proliferation assays, the medium was removed every 24 h, and fresh medium plus PGA₁ was added. **b)** Dose-response analysis for PGA₁. Wild-type MEFs were stimulated with different concentrations of PGA₁ and harvested 3 h after treatment. Lysates prepared from cells were analyzed by Western blotting for detection of cleaved forms of caspase-3 and PARP. Levels of cleaved caspase 3 and cleaved PARP, as determined by densitometry, are provided at the bottom of the blot (SD < 10% average in each case, n=4). **c)** Analysis of Ras isoform protein levels in MEFs. Starved cultures of MEFs were treated with 30 μM PGA₁ or DMSO and harvested 3 h after treatment. Cell lysates were analyzed using Western blotting for H-ras, N-ras, and K-Ras. Detection of β-actin (Actin) was used as a loading control. Similar results were observed in three independent experiments.

Figure S2. PGA₁ induces Ras-ERK activation and apoptosis in CH7C17 cells. **a)** Serum-starved CH7C17 cells were stimulated with DMSO, anti-CD3 (5 μg/ml), or PGA₁ (30 μM). N-Ras-GTP levels were assessed by pull-down assays. Levels of N-Ras activation, which were determined by densitometry are provided at the bottom of the Western blot (SD < 10% average in each case, n=3). **b)** Annexin V/FITC staining analysis of CH7C17 cells stimulated with DMSO or PGA₁ (30 μM). Results (mean ± SD, n=3) are expressed as a fold increase over the percentage of annexin V–positive cells after incubation with DMSO. **P<0.01 compared with non-stimulated (DMSO)

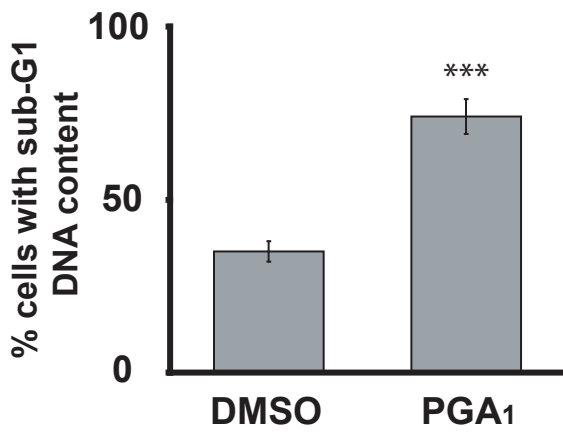
cells. **c)** Lysates prepared from CH7C17 cells previously stimulated with DMSO, anti-CD3 (5 µg/ml), or PGA₁ (30 µM for indicated times) underwent Western blotting for ERK and p-ERK. Levels of ERK1/2 activation, which were determined by densitometry, are provided at the bottom of the Western blot (SD < 10% average in each case, n=3).

Figure S3. Analysis of PGA₁-elicited ERK activation. **a)** Time-course analysis for PGA₁. Wild type MEFs were stimulated with 30 µM PGA₁ or DMSO and harvested at the indicated times. **b)** Dose-response analysis for PGA₁. Wild-type MEFs were stimulated with different concentrations of PGA₁ or EGF (100 ng/ml) and harvested 15 min after treatment. **c)** Starved cultures of MEFs were treated with 30 µM PGA₁ or DMSO (-) and harvested 15 min after treatment. In all cases, lysates prepared from cells underwent Western blotting for pERK and ERK. Similar results were observed in three independent experiments. **d)** Serum starved cultures of MEFs treated with 30 µM PGA₁ or DMSO in the presence of the MEK1/2 inhibitor U0126 (5 µM) added 50 min before PGA₁ treatment and left in the medium until processing. Values indicate the fold induction in pERK levels normalized to total ERK levels and DMSO, as determined by densitometry (SD < 10% average in each case; n=4).

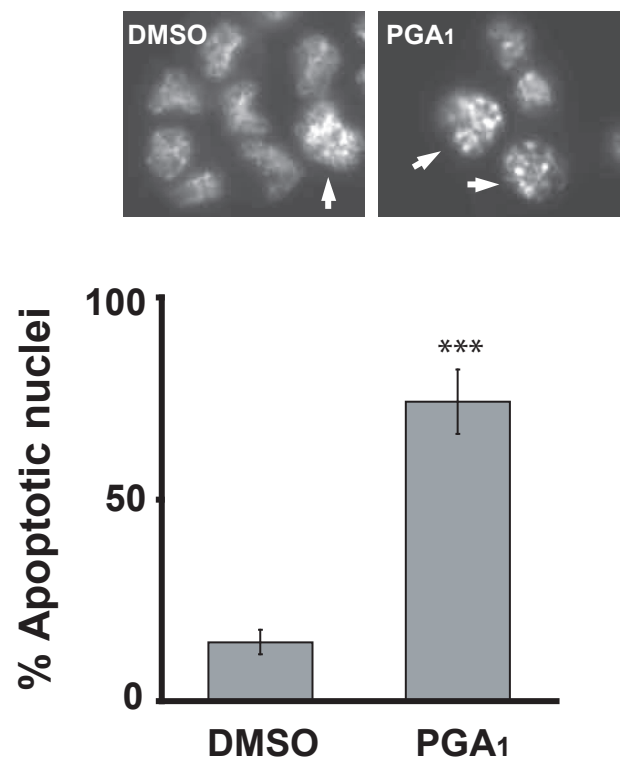
a

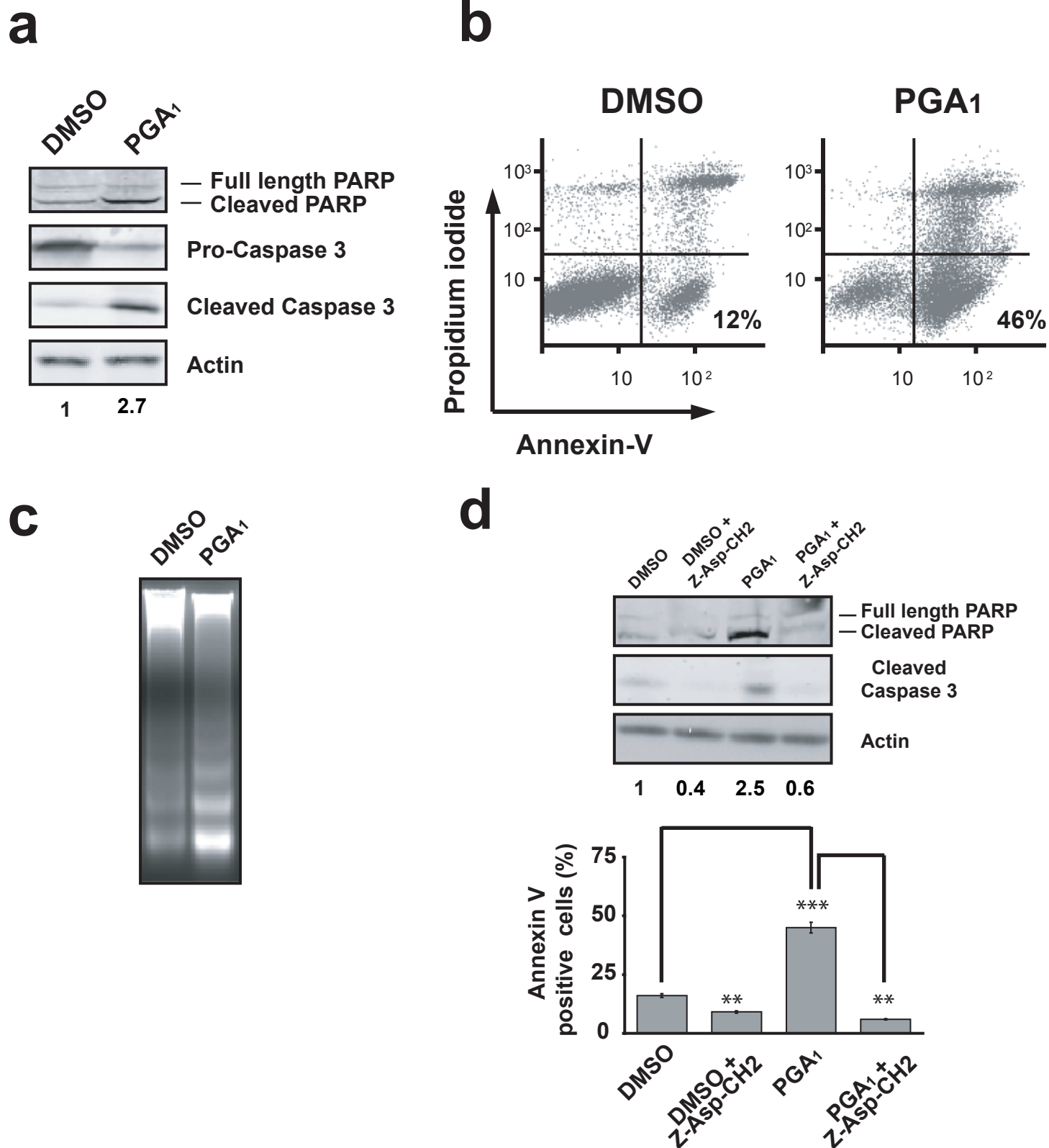


b

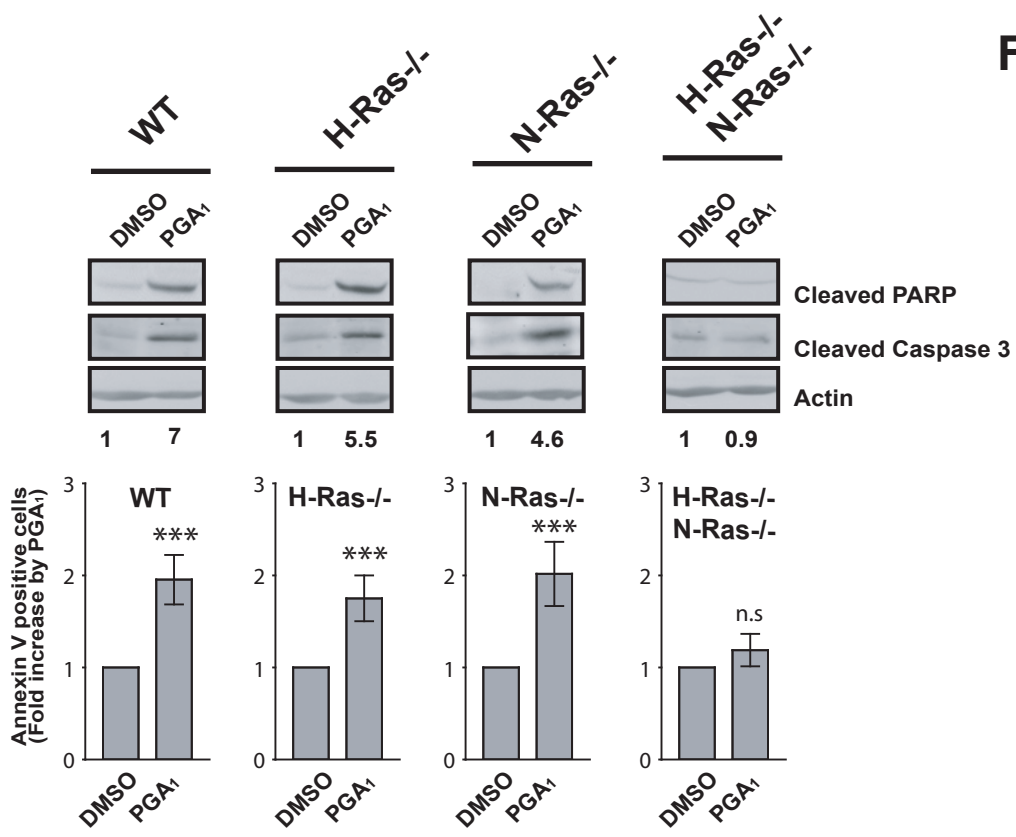


c

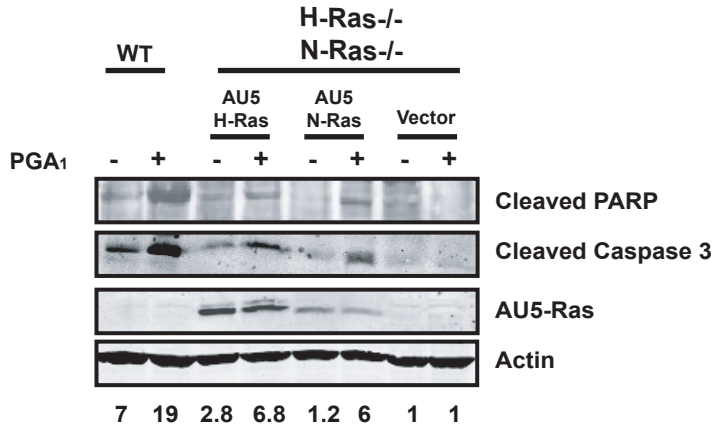




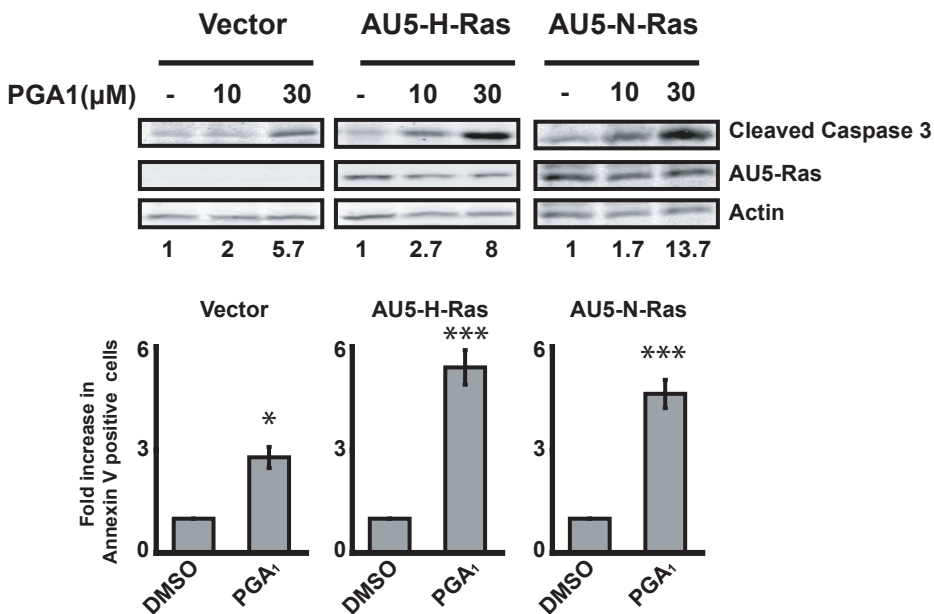
a



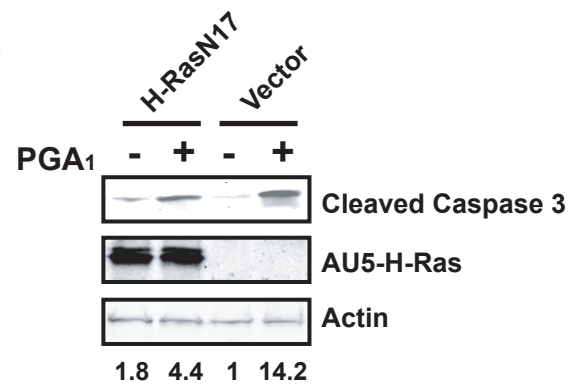
b



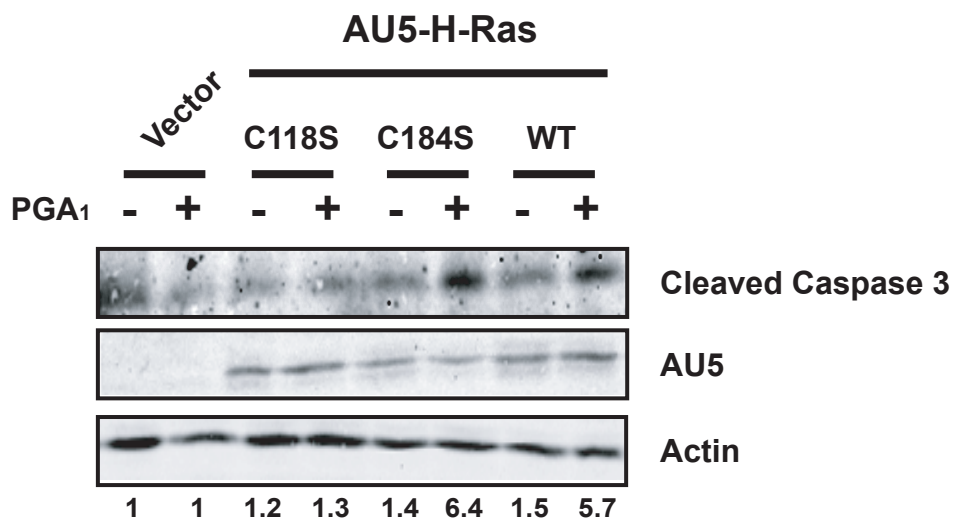
c



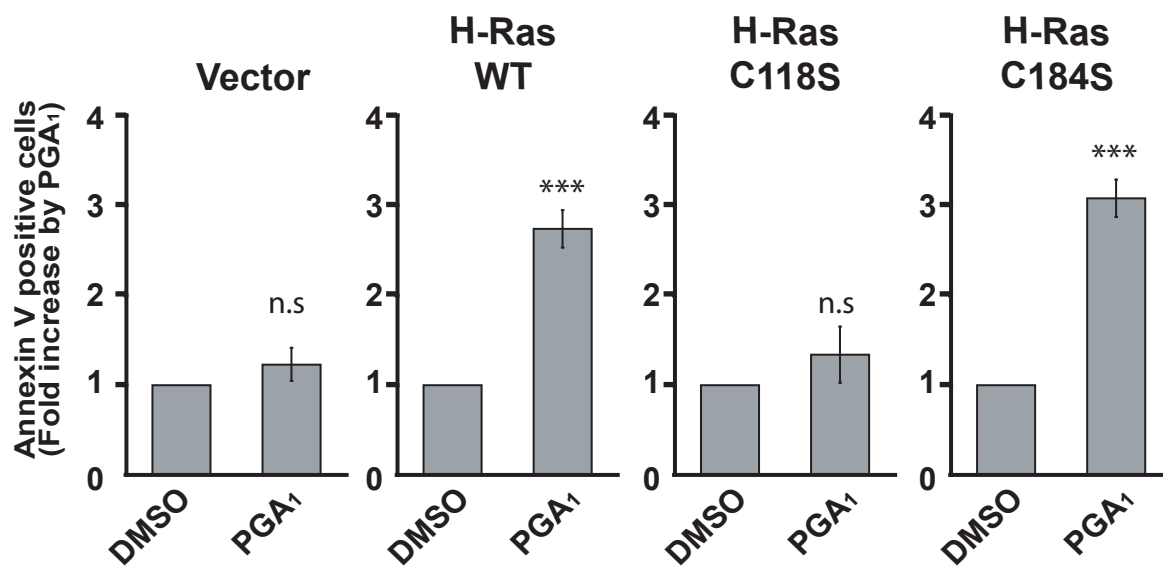
d



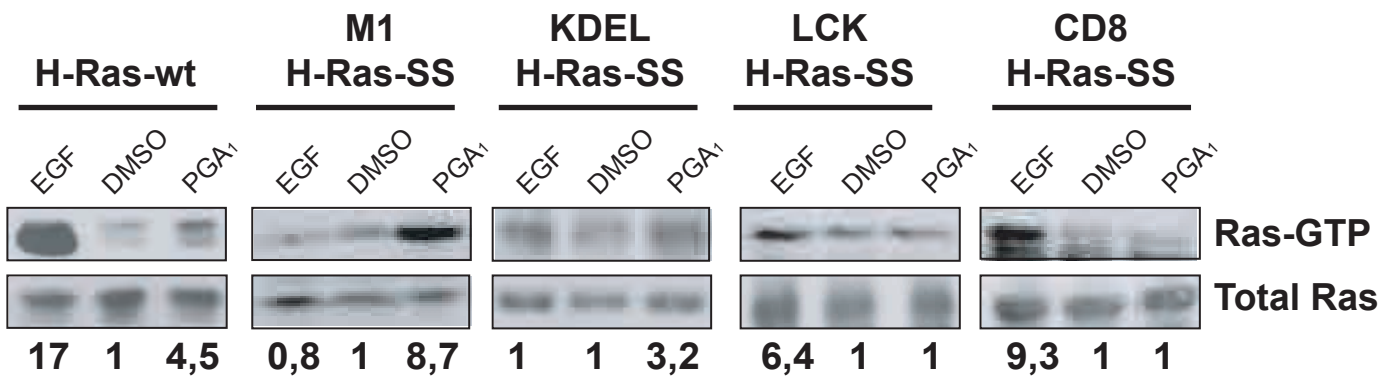
a



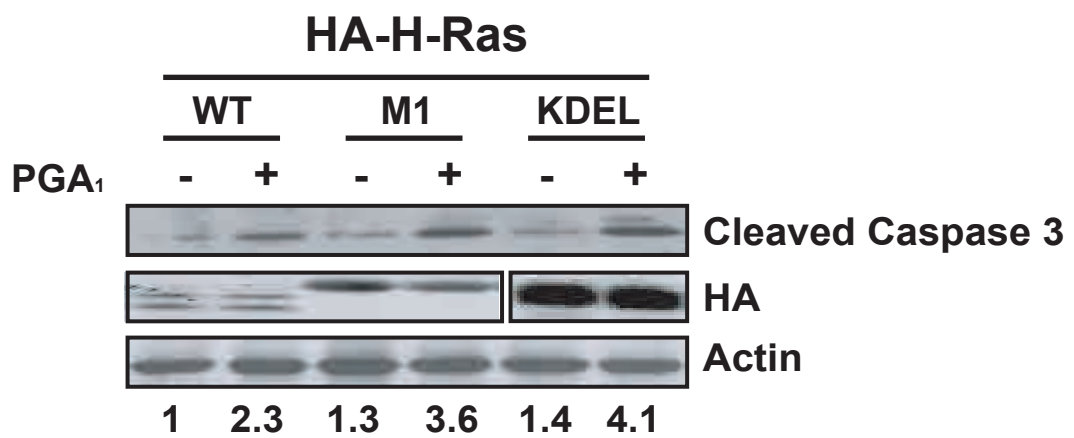
b



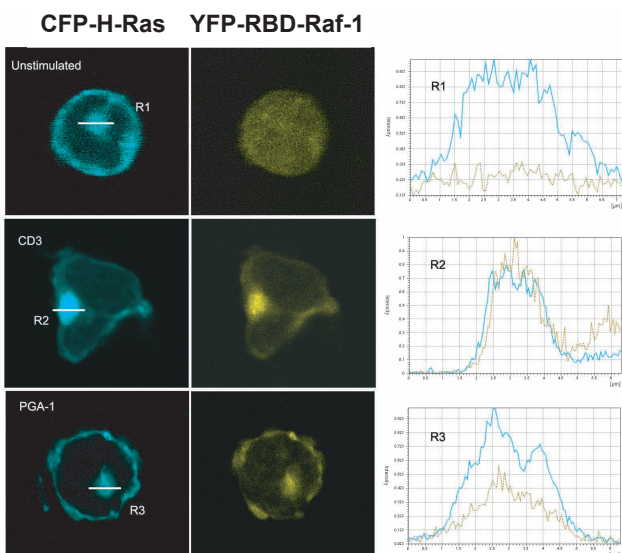
a



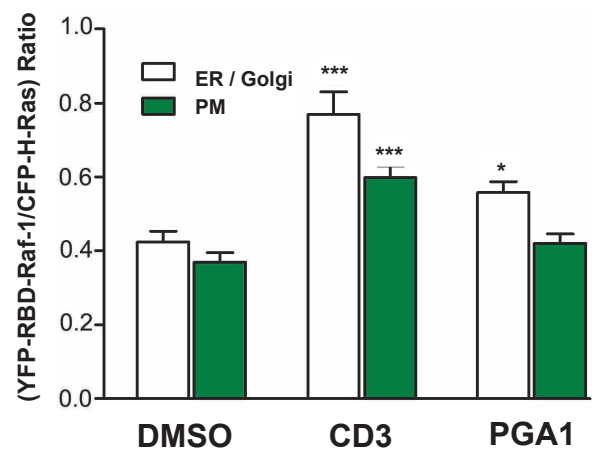
b

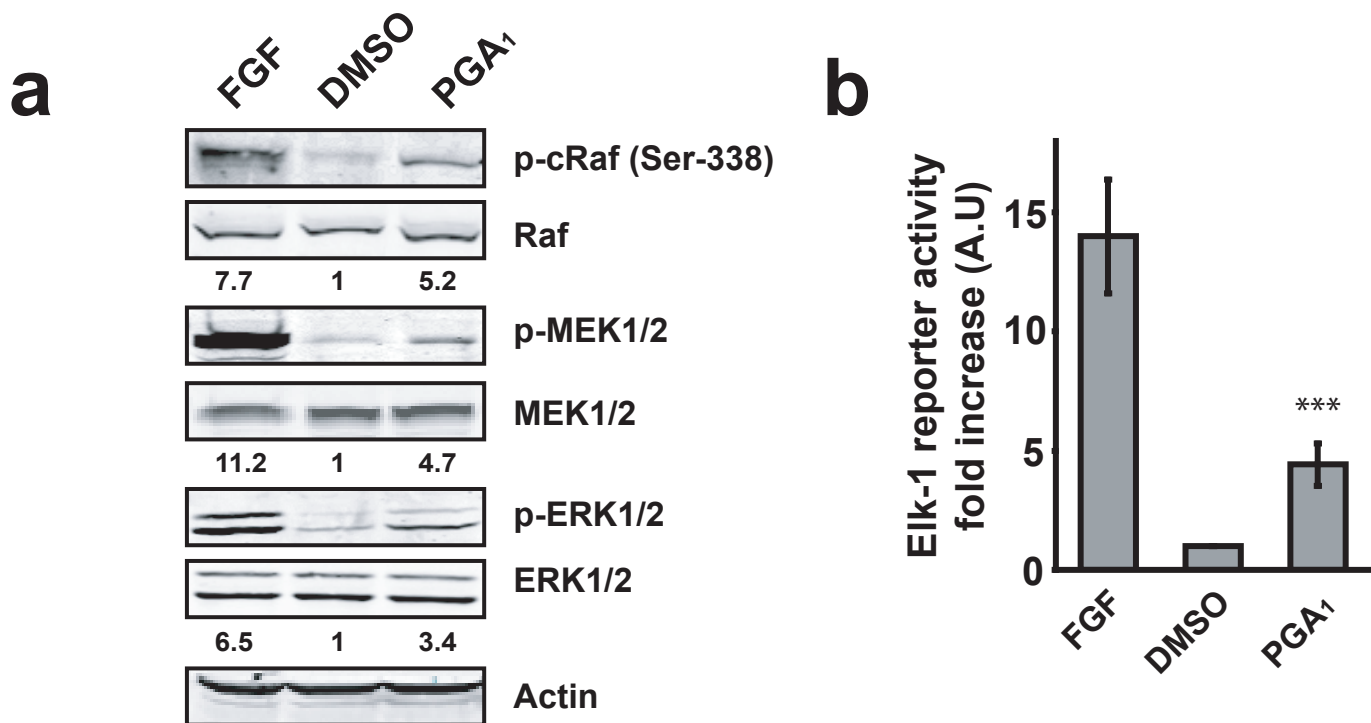


c

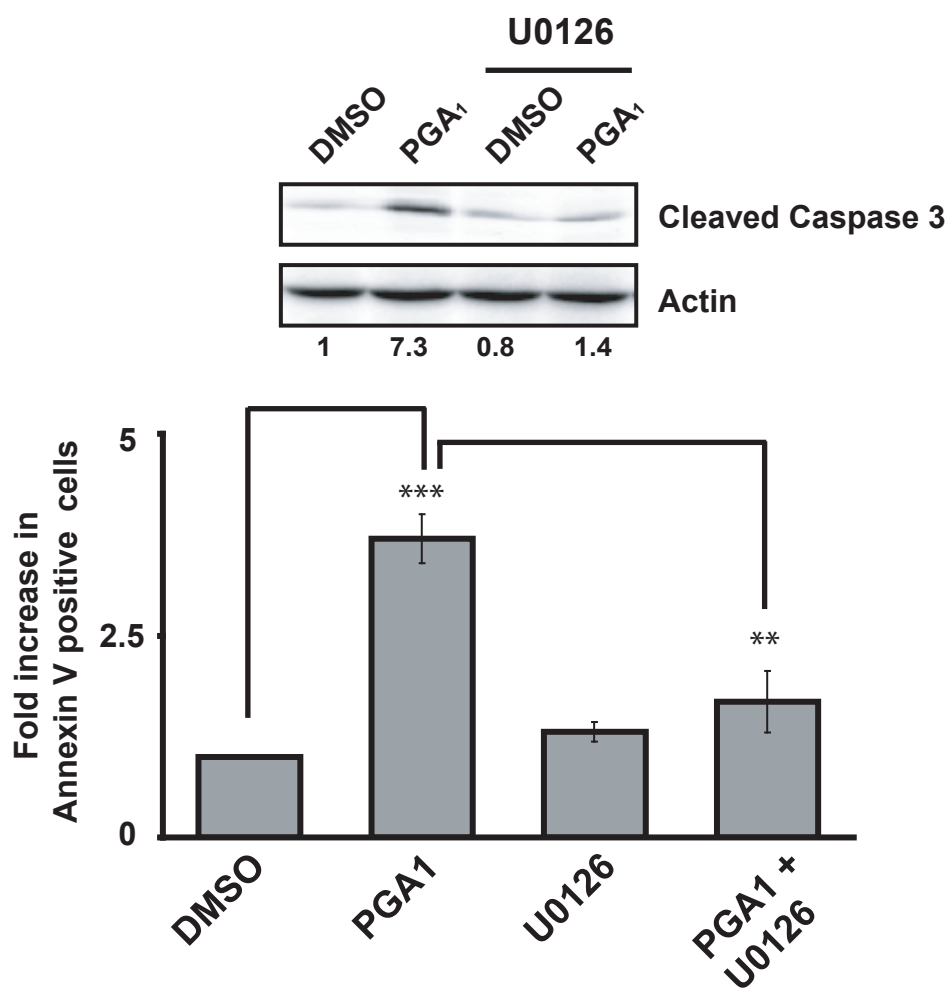


d

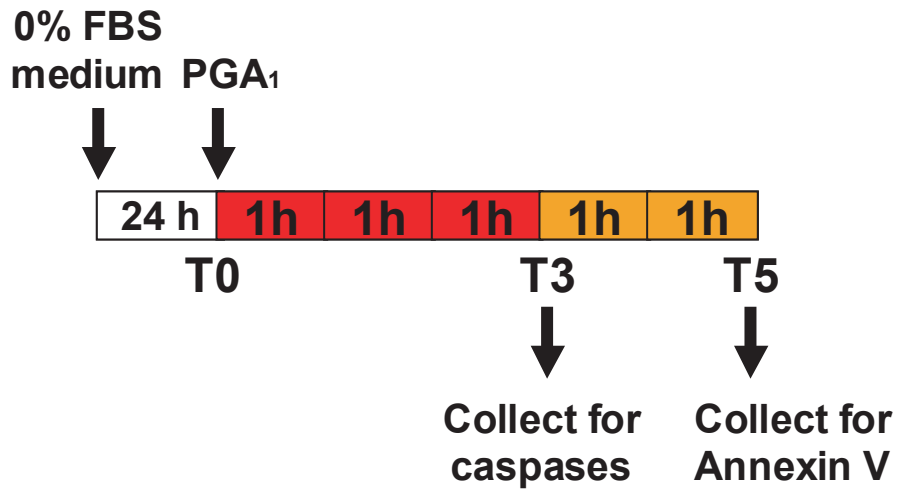




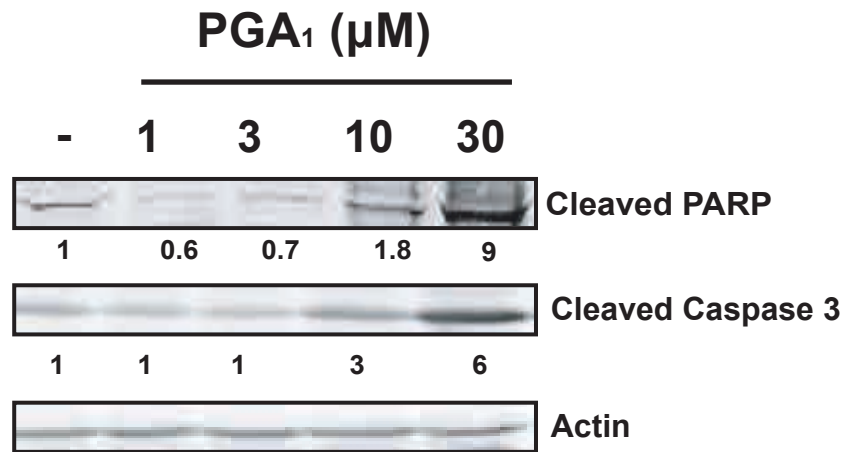
c



a



b



c

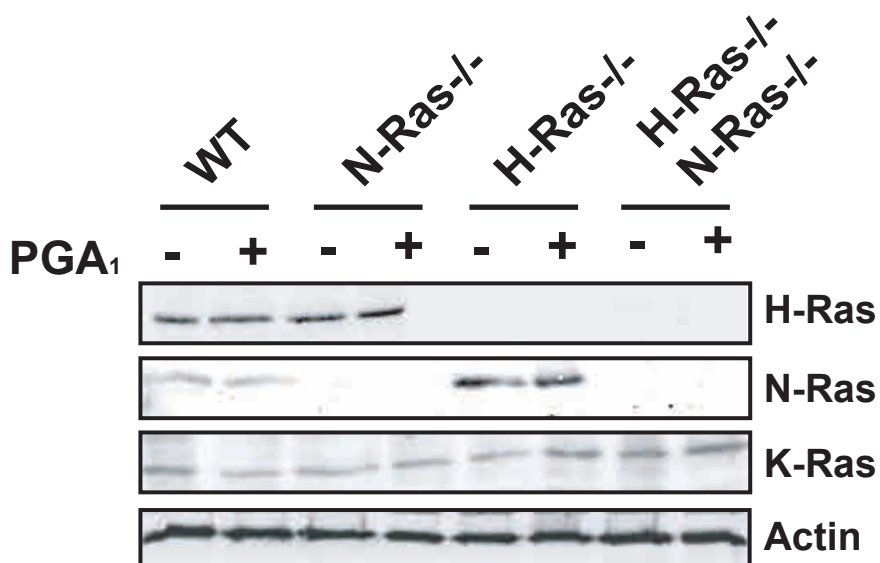
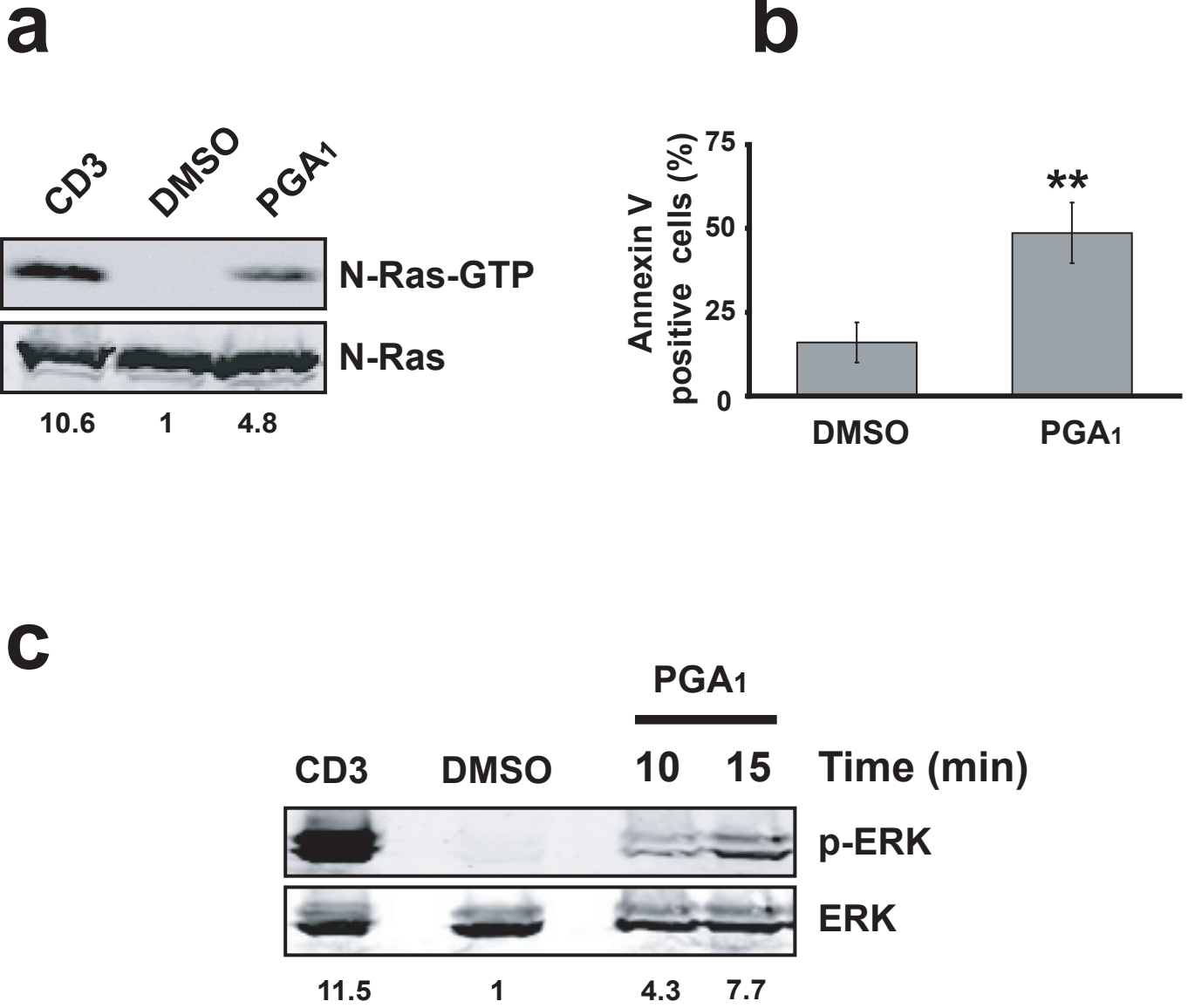
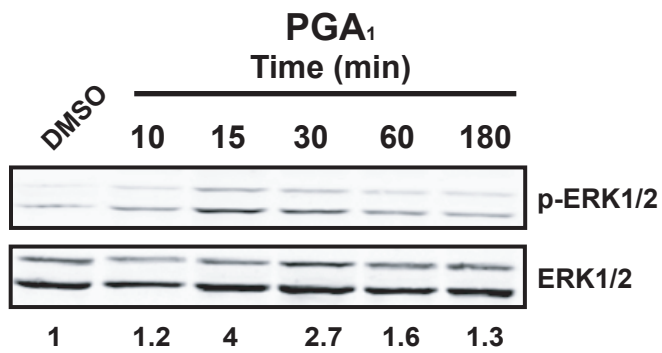


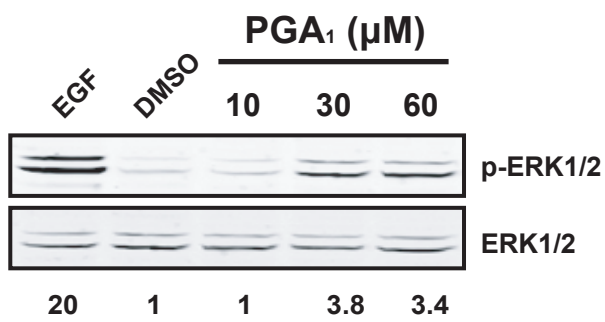
FIGURE S2



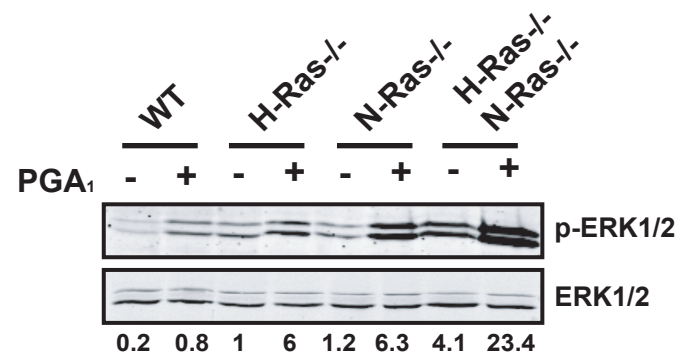
a



b



c



d

