

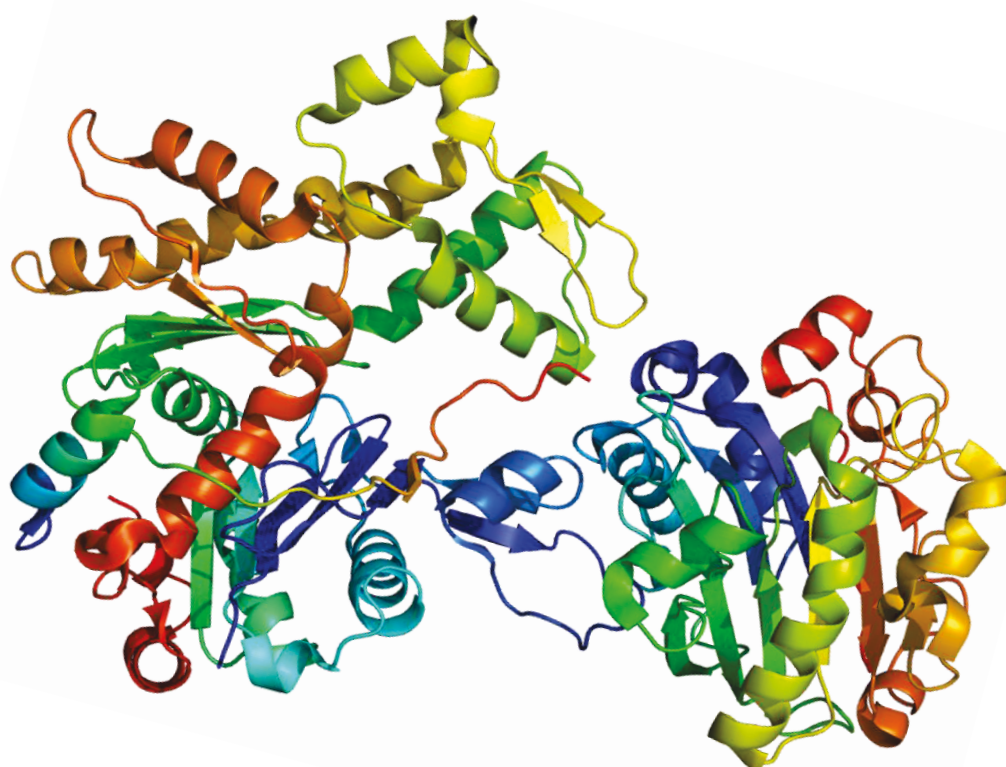
# ANÁLISIS DE LA VÍA PROTUMORAL WIP-YAP/TAZ MEDIANTE PROTEÓMICA Y TRANSCRIPTÓMICA DIFERENCIAL

TESIS DOCTORAL

**Sergio Rivas Muñoz**

Madrid, 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

ANÁLISIS DE LA VÍA PROTUMORAL  
WIP-YAP/TAZ MEDIANTE PROTEÓMICA Y  
TRANSCRIPTÓMICA DIFERENCIAL

SERGIO RIVAS MUÑOZ

Madrid, 2021

Tesis presentada por  
**SERGIO RIVAS MUÑOZ**  
para optar al grado de  
**Doctor**  
por la Universidad Autónoma de Madrid

Trabajo co-dirigido por el  
**Dr. Francisco Wandosell Jurado**  
Profesor de Investigación del CSIC en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”  
y la **Dra. Inés M<sup>a</sup> Antón Gutiérrez**  
Científica Titular del CSIC en el Centro Nacional de Biotecnología

La presente tesis ha sido realizada en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”  
(UAM-CSIC) y en el Centro Nacional de Biotecnología (CSIC)

Los laboratorios del Dr. Wandosell Jurado y la Dra. Antón Gutiérrez forman parte del  
Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas  
(CIBERNED)

Sergio Rivas Muñoz ha recibido financiación del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) y de la Fundación Ramón Areces. El trabajo del laboratorio ha sido financiado en parte por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO/FEDER SAF2015-70368-R y RTI2018-096303-B-C31) y por la Fundación Ramón Areces (XVIII Concurso Nacional Ayudas a la Investigación en Ciencias de la Vida y de la Materia: Interactoma: implicaciones patológicas).

*A mis padres y hermana*

Resulta muy complicado agradecer en pocas palabras todo el apoyo y cariño que me han dado tantas personas a lo largo de estos años, en especial este último, tan complicado por la situación sanitaria que estamos viviendo.

En primer lugar, agradecer a Paco y a Inés el haber confiado en mí para la realización de este trabajo. Gracias por haberme dado la oportunidad de formarme y crecer como investigador y por vuestra paciencia y consejos. Ha sido un gusto trabajar con vosotros.

A mis compañeros, amigos y familia del laboratorio 206. Gracias por hacer que ir a trabajar cada día sea un auténtico placer. Lara, millones de gracias por todo. Desde el primer día cuando me hiciste el *tour* por el CBM hasta hoy que sigues aguantando mis tonterías. No hay palabras para agradecerte todo lo que me has enseñado, tanto apoyo y tantos buenos momentos. Has sido un pilar fundamental para mí. Mario, Marta y Berta, ha sido un lujo poder trabajar al lado de gente tan buena y profesional como vosotros. No he podido tener mejores compañeros. Espero que no me guardéis rencor por mis “toquecitos de atención” en cultivos jajaja. A Carol, porque, aunque su paso por el laboratorio ha sido más corto de lo que nos hubiese gustado, has dejado huella. Gracias por tus consejos tan valiosos. A María José, muchas gracias por escucharme y aconsejarme siempre lo mejor. A los estudiantes que han dejado su huequito en nuestro laboratorio, con tanta ilusión y ganas de aprender. A todos, quiero deciros que me siento un afortunado de haber podido compartir esta experiencia con cada uno de vosotros.

A los chicos del laboratorio 207, siempre dispuestos a ayudar cuando lo he necesitado. Especialmente a Alfredo y Sara, mil gracias por todos vuestros consejos y ayuda.

A Carla, por haber sido tan buena compañera y haber facilitado tanto las cosas.

No puedo dejar de darles infinitas gracias a mis amigos, en especial a Mel, Rubén, Marcos y Chema por su cariño, por escucharme, animarme y apoyarme siempre que lo he necesitado.

Agradecer también a mi familia, que, aunque no entiendan mucho de lo que les cuento a nivel científico, siempre han estado ahí para escucharme y apoyarme. Son ellos los que han hecho posible que yo llegue hasta donde he llegado.

En definitiva, INFINITAS GRACIAS a todos.

---

## ÍNDICE

---

ABREVIATURAS.....	23
RESUMEN .....	29
SUMMARY .....	33
INTRODUCCIÓN .....	37
1. EL CÁNCER .....	39
1.1. Características generales del cáncer .....	39
1.2. Tumores cerebrales: gliomas .....	44
1.2.1. Glioblastoma Multiforme.....	45
1.2.2. Principales alteraciones moleculares en glioblastomas.....	46
1.3. Células madre del cáncer (CSCs) o células iniciadoras de tumores (TICs) .....	48
2. CITOESQUELETO DE ACTINA EN EL PROCESO TUMORAL.....	52
2.1. WIP .....	53
2.1.1. WIP y su papel protumoral estabilizando YAP/TAZ en tumores sólidos.....	56
2.1.1.1. YAP/TAZ en el proceso tumoral .....	58
2.1.1.2. Vía protumoral AKT2-WIP-YAP/TAZ en CSCs de glioblastoma.....	61
2.1.2. WIP posee un papel antitumoral en linfomas mediados por ALK.....	63
2.2. IQGAP1 y su implicación en el desarrollo tumoral.....	64
OBJETIVOS.....	69
MATERIALES Y MÉTODOS.....	73
1. CULTIVOS CELULARES.....	75
1.1. Líneas celulares .....	75
1.2. Medios de cultivo .....	75
1.2.1. DMEM 10% FBS .....	76
1.2.2. RPMI 10% FBS.....	76
1.2.3. Medio <i>stem</i> : CSC-B27 sin vitamina A .....	76
1.3. Subcultivo y congelación de líneas celulares .....	76
1.4. Determinación de la presencia de micoplasmas en los cultivos celulares.....	77
1.4.1. Eliminación de micoplasmas .....	78
2. PLÁSMIDOS.....	78
3. GENERACIÓN DE VECTORES LENTIVIRALES.....	79
4. TRANSDUCCIÓN DE CÉLULAS .....	81



5. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS POR AZUL DE COOMASSIE .....	81
6. FORMACIÓN DE COLONIAS EN AGAR BLANDO .....	82
7. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR ELECTRO-TRANSFERENCIA E INMUNODETECCIÓN ( <i>WESTERN-BLOT</i> ).....	82
7.1. Extracción de proteínas totales y cuantificación. Preparación de la muestra para <i>western-blot</i> .....	82
7.2. Procedimiento de análisis por <i>western-blot</i> .....	83
8. INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS .....	85
8.1. Condiciones de cultivo para inmunoprecipitación.....	85
8.2. Preparación de la muestra para inmunoprecipitación .....	86
8.3. Procedimiento de inmunoprecipitación .....	87
8.4. Análisis proteómico de los inmunoprecipitados.....	88
8.5. Análisis de los resultados proteómicos mediante las herramientas bioinformáticas Venny 2.1 y STRING 11 .....	89
9. INMUNOCITOQUÍMICA .....	89
9.1. Tratamiento de cristales con Poly-L-Lisina.....	89
9.2. Fijación de células adherentes .....	90
9.3. Inmunofluorescencia.....	90
9.3.1. Tinción de filamentos de actina .....	91
9.3.2. Tinción de núcleos.....	91
9.4. Microscopía confocal .....	91
10. SECUENCIACIÓN DE RNA (RNA-seq).....	92
10.1. Extracción de RNA: método del Trizol.....	92
10.2. Purificación de RNA.....	92
10.3. Secuenciación de RNA .....	93
11. CITOMETRÍA DE FLUJO .....	93
11.1. Análisis de ciclo celular con yoduro de propidio.....	93
11.2. Análisis de viabilidad celular con yoduro de propidio .....	94
12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	95
RESULTADOS .....	97
A. ANÁLISIS PROTEÓMICO DIFERENCIAL.....	99
A.1. Análisis comparativo del crecimiento de glioblastoma y linfoma en medio con FBS y medio <i>stem</i> .....	99

A.2. Caracterización de vectores virales para el silenciamiento de AKT2-WIP-YAP/TAZ en células de glioblastoma .....	100
A.3. Análisis proteómico de células de glioblastoma y linfoma .....	102
A.3.1. Puesta a punto del sistema de inmunoprecipitación .....	103
A.3.2. Inmunoprecipitación en células de glioblastoma .....	104
A.3.2.1 Análisis proteómico de los inmunoprecipitados de glioblastoma .....	108
A.3.3. Inmunoprecipitación en células de linfoma.....	111
A.3.3.1 Análisis proteómico de los inmunoprecipitados de linfoma .....	114
A.4. Análisis diferencial de las inmunoprecipitaciones en glioblastoma y linfoma: selección de candidato.....	116
A.5. Análisis del papel de IQGAP1 en el crecimiento de glioblastomas.....	118
A.5.1. Análisis de los niveles de IQGAP1 en glioblastoma.....	118
A.5.2. Selección de vectores virales para el silenciamiento de IQGAP1 .....	119
A.5.3. Análisis del silenciamiento de IQGAP1 en glioblastoma.....	120
A.5.4. Análisis del efecto del silenciamiento de IQGAP1 en proliferación.....	121
A.5.5. Análisis del efecto del silenciamiento de IQGAP1 en ciclo celular .....	122
A.5.6. Análisis del efecto de la sobreexpresión de IQGAP1 en cultivo en agar blando	125
B. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DIFERENCIAL: RNA-seq .....	128
B.1. Análisis comparativo de los resultados RNA-seq mediante Venny 2.1.....	128
B.2. Análisis funcional de los genes alterados.....	139
B.3. Comprobación de la expresión de proteínas de ciclo .....	141
DISCUSIÓN.....	143
1. Estudio del proteoma asociado a WIP en células de glioblastoma y linfoma-ALK+. .....	145
2. Análisis del papel de IQGAP1 en el crecimiento de glioblastomas .....	149
3. Análisis transcriptómico diferencial WIP-YAP/TAZ y comprobación de la expresión de proteínas de ciclo celular .....	153
CONCLUSIONES .....	154
BIBLIOGRAFÍA.....	154
MATERIAL SUPLEMENTARIO .....	154
ANEXO .....	154

---

## ABREVIATURAS

- AKT:** Homólogo del protooncogén del virus murino AKT8
- ALK:** *Anaplastic Lymphoma Kinase* / Quinasa de linfoma anaplásico
- ARP2/3:** *Actin related proteins 2 and 3*
- BRCA1:** *Breast Cancer 1*
- C-terminal:** Carboxy-terminal
- CDC42:** *Cell división cycle 42*
- CDK:** *Cyclin-dependent kinase* / Quinasa dependiente de ciclina
- CMV:** *Human citomegalovirus immediate-early promoter* / Promotor inmediatamente temprano de citomegalovirus
- CSC:** *Cancer Stem Cell* / Célula madre del cáncer
- CTGF:** *Connective tissue growth factor* / Factor de crecimiento de tejido conectivo
- DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
- DMSO:** *Dimethyl Sulfoxide* / Dimetilsulfóxido
- DNA:** *Deoxyribonucleic acid* / Ácido desoxirribonucleico
- EDTA:** *Ethylenediaminetetraacetic acid* / Ácido etilendiaminotetraacético
- EGF:** *Epidermal growth factor* / Factor de crecimiento epidérmico
- EGFR:** *Epidermal growth factor receptor* / Receptor de factor de crecimiento epidérmico
- EMT:** *Epithelial–Mesenchymal Transition* / Transición epitelio-mesénquima
- ERK:** *Extracellular signal-regulated kinase* / Quinasas reguladas por señales extracelulares
- F-actina:** Filamentos de actina
- FBS:** *Fetal Bovine Serum* / Suero fetal bovino
- FGF2:** *Fibroblast Growth Factor-2* / Factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2
- FSC:** *Forward Scatter*
- GB:** Glioblastoma
- GBM:** Glioblastoma Multiforme
- GAPDH:** *Glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase* / Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

**GEO:** *Gene Expression Omnibus*

**GFP:** *Green fluorescent protein* / Proteína fluorescente verde

**GSK3:** *Glycogen synthase kinase 3* / Glucógeno sintasa quinasa 3

**GTPasa:** Proteína hidrolizadora de guanosina trifosfato

**HEPES:** *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid* / Ácido 4 (2 hidroxietil) 1 piperaciniletanosulfónico

**IF:** Inmunofluorescencia

**IGFR-1:** *Insulin-like Growth Factor Receptor 1* / Receptor de factor de crecimiento similar a Insulina

**IQGAP1:** *IQ Motif Containing GTPase Activating Protein 1*

**IR:** *Insulin Receptor* / Receptor de insulina

**kDa:** Kilodalton

**LB:** *Lysogeny Broth* / Medio de cultivo lisogénico

**MAPK:** *Mitogen Activated Protein Kinase* / Proteína quinasa activada por mitógenos

**MDM:** *Murine Double Minute*

**MET:** *Mesenchymal-Epithelial Transition* / Transición mesénquima-epitelio

**mRNA:** *Messenger ribonucleic acid* / Ácido ribonucleico mensajero

**mTOR:** *Mammalian Target Of Rapamycin* / Diana de rapamicina en mamíferos

**NCK:** *Non-catalytic región of tyrosine kinase adaptor protein*

**NF-1:** *Neurofibromin-1* / Neurofibromina-1

**N-terminal:** Amino-terminal

**N-WASP:** *Neural-WASP*

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**ON:** *Over Night* / Durante la noche

**PBS:** *Phosphate saline buffer* / Tampón fosfato salino

**PCNA:** *Proliferating Cell Nuclear Antigen* / Antígeno nuclear de proliferación celular

**PDGFR:** *Platelet-Derived Growth Factor Receptor* / Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas

**PFA:** *Paraformaldehyde* / Paraformaldehído

**PI3K:** *Phosphoinositide 3-Kinase* / Fosfatidilinositol 3-quinasa

**PM:** Peso Molecular

**pRb:** Proteína del Retinoblastoma

**PRD:** *Proline-Rich Domain* / Dominio rico en prolina

**PTEN:** *Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase* / fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa

**RNA:** *Ribonucleic acid* / Ácido ribonucleico

**RPMI:** *Roswell Park Memorial Institute Medium*

**RT:** *Room Temperature* / Temperatura ambiente

**RTK:** *Receptor tyrosine kinase* / Receptor con actividad tirosina quinasa

**SDS:** *Sodium dodecyl sulfate* / Dodecil sulfato sódico

**shRNA:** *Short hairpin RNA* / RNA de horquilla corta

**SSC:** *Side Scatter*

**TAZ:** *Transcriptional co-activator with PDZ binding motif*

**TCGA:** *The Cancer Genome Atlas*

**TIC:** *Tumor Initiating Cell* / Célula iniciadora de tumores

**VSV:** *Vesicular stomatitis virus* / Virus de la estomatitis vesicular

**WASP:** *Wiskott–Aldrich Syndrome Protein*

**WB:** *Western-blot*

**WICH:** *WIP-CR16 homologous*

**WIP:** *WASP Interacting Protein*

**WIRE:** *WIP related*

**YAP:** *Yes-associated protein*

---

## RESUMEN

La proteína WIP ha sido estudiada tradicionalmente por su importante papel en la regulación de la polimerización y organización del citoesqueleto de actina. En los últimos años se han descrito nuevas funciones para esta proteína, siendo una de ellas su participación en el proceso tumoral. En tumores sólidos, WIP presenta una actividad pro-oncogénica, modulando los niveles de los cofactores de transcripción YAP y TAZ, implicados directamente en la progresión tumoral y mantenimiento del fenotipo *stem*. En contraposición, WIP se comporta como un supresor tumoral en células de linfomas mediados por ALK.

El propósito genérico del presente trabajo es analizar las bases moleculares de la actividad dual descrita en WIP. Demostramos que el interactoma asociado a WIP en células de glioblastoma (GB) y en células de linfoma es diferente. Hemos identificado potenciales candidatos que podrían ayudar a explicar el papel dual que muestra WIP en ambos tipos tumorales. De entre los distintos candidatos, focalizamos nuestro trabajo en el estudio de la proteína IQGAP1, aislada de forma exclusiva en células de GB. Hemos analizado su implicación en el crecimiento del GB, observando que la interferencia de IQGAP1 produce una disminución significativa en proliferación celular, al igual que ocurre al interferir WIP, YAP y TAZ. Dicha disminución de la proliferación se debe a que las células interferidas quedan retenidas en la fase G1 del ciclo celular. Por otra parte, la sobreexpresión de IQGAP1 incrementa de forma significativa la capacidad de crecimiento independiente de sustrato de las células de GB. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la importancia de IQGAP1 en la proliferación de las células de GB, pudiendo ser un potencial responsable de la capacidad protumoral que presenta WIP en este tipo de tumor.

Además, realizamos un análisis transcriptómico diferencial mediante RNA-seq en células de GB, identificando un total de 179 genes cuya expresión está bajo el control de la vía protumoral WIP-YAP/TAZ. El análisis funcional de dichos genes muestra una sobre-representación de los procesos relacionados con la regulación del ciclo celular.

Nuestros resultados refuerzan la importancia que poseen la vía pro-oncogénica WIP-YAP/TAZ e IQGAP1 en la progresión tumoral del GB, lo que les convierte en nuevas dianas terapéuticas potenciales.



---

## SUMMARY

WIP protein has traditionally been studied because of its important role in regulating the polymerization and organization of the actin cytoskeleton. In the last years, new functions have been described for this protein, one of them its participation in tumor progression. In solid tumors, WIP has a pro-oncogenic activity, modulating the levels of the transcription cofactors YAP and TAZ, directly involved in tumor progression and maintenance of the stem phenotype. In contrast, WIP behaves as a tumor suppressor in ALK-mediated lymphoma cells.

The generic aim of this work is to analyze the molecular bases of the dual activity described for WIP. We show that the WIP-associated interactome in glioblastoma (GB) cells and in lymphoma cells is different. We have identified potential candidates that could help explain the dual role of WIP in both tumor types. Among the different candidates, we focused our work on the study of the IQGAP1 protein isolated exclusively in GB cells. We have analyzed its involvement in the growth of GB, observing that the interference of IQGAP1 produces a significant decrease in cell proliferation, as it happens when we interfere WIP, YAP and TAZ. This decrease in proliferation is due to the fact that the interfered cells are arrested in the G1 phase of the cell cycle. Conversely, the overexpression of IQGAP1 significantly increases the ability to grow independently of anchoring of GB cells. The results show the importance of IQGAP1 in the proliferation of GB cells, and it may be a potential responsible for the protumoral capacity that WIP presents in this type of tumor.

In addition, we performed a differential transcriptomic analysis using RNA-seq in GB cells, identifying a total of 179 genes whose expression is under the control of WIP-YAP/TAZ protumoral pathway. The functional analysis of these genes shows an overrepresentation of the processes related to the regulation of the cell cycle.

Our results reinforce the importance of the WIP-YAP/TAZ pro-oncogenic pathway and IQGAP1 in GB tumor progression, which makes them potential new therapeutic targets.

# INTRODUCCIÓN

## 1. EL CÁNCER

El cáncer es una de las primeras causas de muerte a nivel mundial. Durante el año 2018 se diagnosticaron 18,1 millones de nuevos casos de cáncer en el mundo, de los cuales murieron 9,6 millones de personas (53%). Se prevé que en el año 2030 esta cifra supere los 13 millones, según datos de las Organización Mundial de la Salud (OMS). En España, datos del Instituto Nacional de Estadística (INE), reflejan que en 2018 el cáncer supuso la segunda causa de muerte por debajo de los 80 años (26%), siguiendo muy de cerca a las enfermedades del sistema circulatorio (28%) (**Figura I1**).

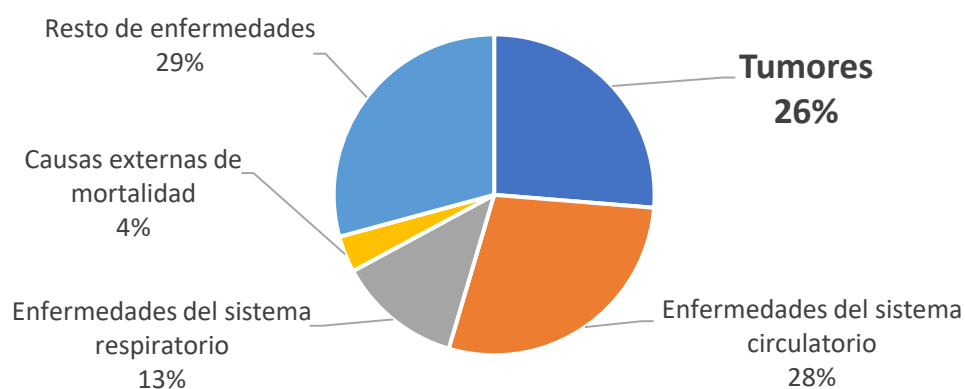


Figura I1 | **Distribución de las causas de muerte en la población española en el año 2018.** Datos del Instituto Nacional de Estadística (INE) según la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE) incluyendo población de ambos sexos y menor de 80 años.

Esta alta tasa de incidencia pone de manifiesto la importancia que adquiere el desarrollo de nuevas herramientas para la prevención y tratamiento del cáncer. La investigación de nuevas dianas terapéuticas, así como el estudio de los mecanismos moleculares de aparición y progresión tumoral, son fundamentales en la lucha contra el cáncer.

### 1.1. Características generales del cáncer

Los tejidos que componen el organismo constituyen una combinación compleja de muchos tipos celulares que deben conservar sus diferencias mientras coexisten en el mismo ambiente. En casi todos los tejidos adultos, las células mueren y se renuevan de forma permanente, a diferentes velocidades y con patrones de recambio muy distintos. En el organismo adulto sano existen mecanismos de control que mantienen en equilibrio la producción y la pérdida celular. Los cánceres se originan a partir de modificaciones de

estos controles y permiten que las células proliferen en exceso en los tejidos con capacidad de auto-renovación.

El cáncer es un grupo heterogéneo de trastornos caracterizados por la presencia de células que no responden a los controles normales de la división. A nivel molecular, podríamos decir que se trata de un grupo de enfermedades genéticas causadas por mutaciones somáticas que afectan genes cuyos productos proteicos alterados, por incremento o por ausencia, perturban señales intracelulares responsables de la fisiología celular, produciendo un crecimiento anormal que conduce a la formación de tumores (Hanahan & Weinberg, 2011).

El proceso por el que una célula normal se convierte en tumoral implica la adquisición, de modo gradual, de una serie de ventajas biológicas esenciales en la fisiología celular que, conjuntamente, podrían dar lugar a un crecimiento maligno (Hanahan & Weinberg, 2000) (**Figura I2**). Dentro de estas ventajas biológicas se encuentran:

- Mantenimiento de las señales de proliferación y supervivencia: capacidad de proliferar de manera independiente a señales mitogénicas.
- Suprimir los mecanismos que regulan el crecimiento normal: insensibilidad a la señalización antiproliferativa.
- Activar mecanismos de invasión y metástasis.
- Favorecer la inmortalidad replicativa: potencial replicativo ilimitado.
- Inducir angiogénesis: capacidad de generar nuevos vasos sanguíneos.
- Resistir a la muerte celular programada (apoptosis).

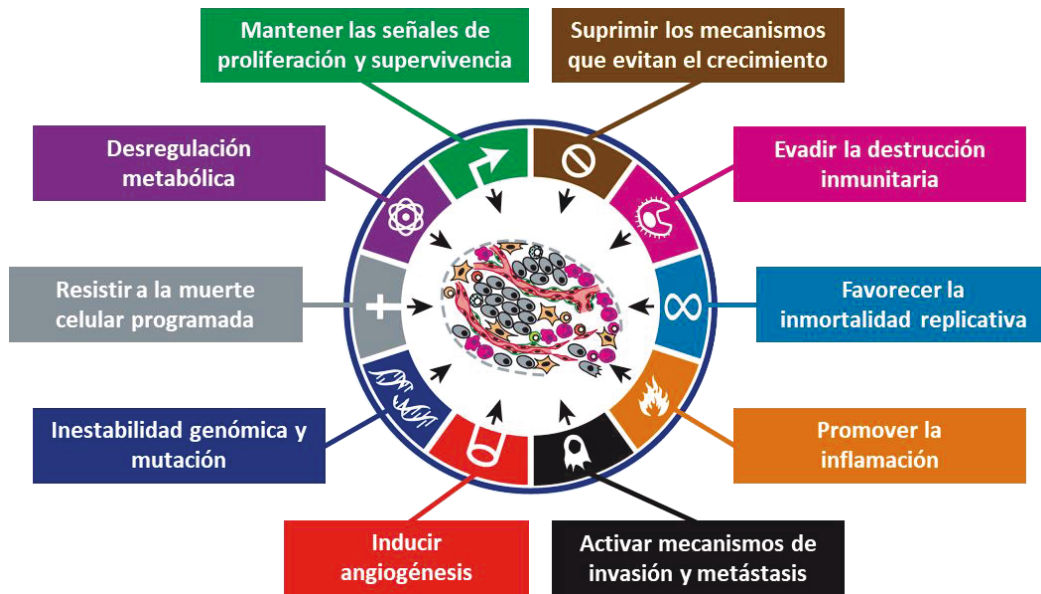


Figura 12 | **Capacidades biológicas que caracterizan a las células tumorales.** Adaptado de (Hanahan & Weinberg, 2011).

Más recientemente y gracias a los avances en la investigación del cáncer de las últimas décadas, se han propuesto nuevas alteraciones esenciales para el desarrollo del tumor (Hanahan & Weinberg, 2011) que se resumen aquí:

- Capacidad de las células tumorales de evadir al sistema inmunitario.
- Promover la inflamación.
- La inestabilidad genómica y aparición de nuevas mutaciones: mutaciones puntuales, cambios epigenéticos, amplificaciones, deleciones cromosómicas, translocaciones, pérdida de heterocigosidad y alteraciones en la regulación transcripcional y en los niveles de expresión génica que pueden traducirse en la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores tumorales que son esenciales para el control de la proliferación.
- La capacidad de modificar o reprogramar el metabolismo celular con el fin de sustentar de forma más eficaz la proliferación neoplásica.

Cabe recordar que el ciclo celular se suele dividir para su análisis en cuatro fases que se denominan G1, S, G2 y M (**Figura I3**). La fase G1 consiste en un primer periodo de crecimiento donde la célula se prepara para la síntesis de DNA. Para hacerlo, entra en la fase S, momento en el que la célula sintetiza una copia de todo su DNA genómico. Una vez se dispone del DNA duplicado y hay una dotación cromosómica extra completa del material genético, la célula entra en la fase G2, una segunda fase de crecimiento donde la célula condensa y organiza el material genético y se prepara para la división celular. El siguiente paso es la fase M, cuando tiene lugar la mitosis. Es decir, la célula reparte las dos copias de su material genético entre sus dos células hijas. La progresión ordenada del ciclo celular está controlada por diferentes componentes de la maquinaria del ciclo que aseguran por completo su correcto funcionamiento (Hochegger et al., 2008; Uhlmann et al., 2011). Pero existen, además, diferentes puntos de control del ciclo celular (*checkpoints*) (**Figura I3**), dependientes de una maquinaria molecular compleja, que evalúan si una célula debe o no avanzar en él o, en su lugar, seguir una opción diferente (Bartek et al., 2004; Recolin et al., 2014).

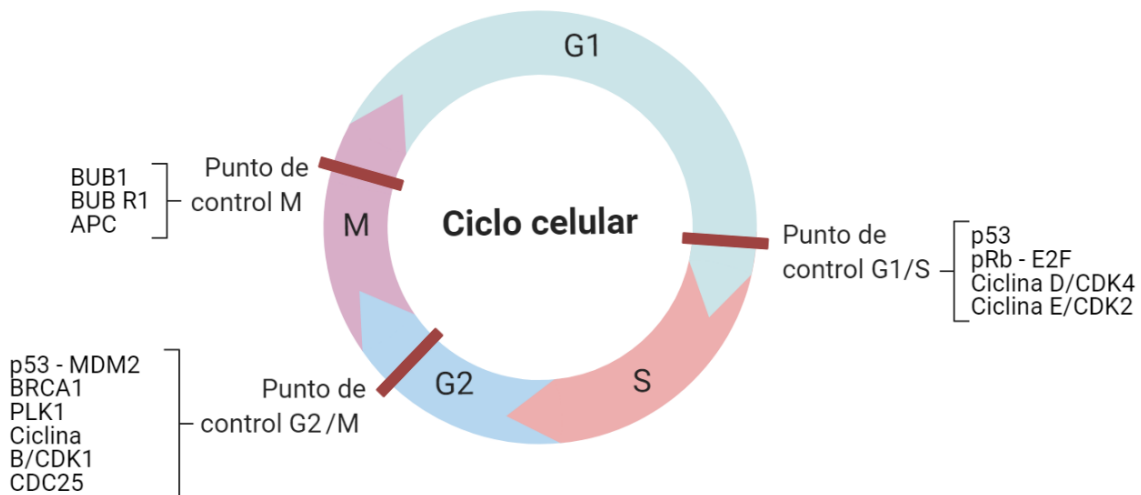


Figura I3 | **Fases del ciclo celular y puntos de control.** Se indican algunas de las proteínas implicadas en cada punto de control.

El primero y más importante de los puntos de control está al final de la fase G1, donde la célula se compromete a dividirse antes de duplicar su genoma y es conocido como punto de restricción (Hume et al., 2020; A. Johnson & Skotheim, 2013). Algunos de los principales reguladores de este punto de control son p53, los complejos ciclina D/CDK4 y ciclina E/CDK2, la proteína del retinoblastoma (pRb) y el factor de transcripción E2F, entre otros, quienes son capaces de inducir la parada del ciclo celular en el punto de control G1/S como respuesta a daño en el DNA, con objeto de evitar su replicación y dar tiempo a activar los diferentes mecanismos que permiten su reparación, proceso en el que interviene una gran diversidad de proteínas incluyendo al supresor de tumores BRCA1 (Gorodetska et al., 2019; Hume et al., 2020).

El segundo punto de control se sitúa entre las fases G2 y M para evitar que entren en mitosis células que no han completado la replicación del DNA o en las que se han detectado errores en el DNA duplicado que no se habían corregido durante la fase S. En este punto de control intervienen proteínas como p53, BRCA1, PLK1, CDC25 o el complejo ciclina B/CDK1, entre muchas otras (Rieder, 2011).

El tercer punto de control, también denominado punto de control del huso, se da durante la fase M, más concretamente entre metafase y anafase. En él se evalúa que todas las cromátidas hermanas están alineadas en la placa metafásica y unidas correctamente a los microtúbulos del huso mitótico (Burke & Stukenberg, 2008; Lara-Gonzalez et al., 2012). Entre las proteínas que intervienen en este punto de control están BUB1, BUB R1 y APC. Una vez superado este punto de control, las cromátidas hermanas se separan y cada célula hija recibe una copia del material genético completo.



## 1.2. Tumores cerebrales: gliomas

Durante el año 2020, los tumores cerebrales representaron solo el 1,6% de nuevos casos diagnosticados de cáncer en España. Sin embargo, pese a su baja incidencia, presentan una alta mortalidad asociada, la cual alcanzó el 68,5% según datos de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) y la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN).

Los tumores cerebrales primarios comprenden un diverso grupo de neoplasias con origen en diferentes linajes celulares del sistema nervioso central. Dentro de los de origen neuroepitelial destacan los gliomas, que constituyen aproximadamente el 80% de los tumores cerebrales malignos (Anjum et al., 2017; Ostrom et al., 2018). Los gliomas son tumores que surgen a partir de células gliales o precursores neuronales. Dependiendo del origen del tipo de célula glial, los gliomas más comunes son los astrocitomas, los oligodendrogliomas y los oligoastrocitomas (derivados de astrocitos, oligodendrocitos, o ambos, respectivamente). De todos ellos, el tipo de tumor glial más frecuente es el astrocitoma, el cual comprende el 75% del total de casos de gliomas (Ricky Chen et al., 2017; Ferguson & Lesniak, 2005; Pulkkanen & Yla-Herttuala, 2005).

En 2007, la OMS propuso un sistema de clasificación de los gliomas en cuatro grados de severidad basado en características patológicas, atendiendo a la combinación de parámetros como la extensión de la masa tumoral, grado de infiltración en el parénquima cerebral, grado de angiogénesis, grado de necrosis o índice de proliferación (Louis et al., 2007).

Gracias al avance en la investigación de la tumorigénesis y el desarrollo tumoral de los últimos años, se han descrito diversas alteraciones genéticas y epigenéticas que han permitido establecer nuevos subgrupos tumorales. Como consecuencia, la OMS actualizó en 2016 su sistema de clasificación de gliomas, basándose no sólo en características patológicas (fenotipo) sino también en características moleculares (genotipo) (Louis et al., 2016). Se introduce, por tanto, la necesidad de contar con la realización de estudios de biología molecular de nuevos marcadores que permiten mejorar el diagnóstico. A pesar de esta clasificación más exhaustiva, la mayoría de los pacientes de glioma reciben idénticos tratamientos, y existen pocas terapias dirigidas. El tratamiento actual consiste en la resección quirúrgica del tumor si es aplicable y

segura, seguida de tratamiento oncológico basado en radioterapia y quimioterapia concomitante (Davis, 2016).

### 1.2.1. Glioblastoma Multiforme

El astrocitoma de grado IV, comúnmente denominado glioblastoma (GB) o GB multiforme (GBM), es el tipo de tumor cerebral primario más común y también el más agresivo. La mayoría de los GB (> 90%) se originan *de novo* en pacientes con una media de edad de 62 años y presentan un desarrollo rápido y altamente agresivo. Son los conocidos como GBs primarios. Por otro lado, existen una minoría de casos de GB que surgen por evolución de un astrocitoma de menor grado, se desarrollan más lentamente y, habitualmente, se dan en pacientes más jóvenes. Son los denominados GBs secundarios (Maher, 2001; Moore & Kim, 2010; Ohgaki & Kleihues, 2013).

Los GBs se caracterizan por ser tumores con una alta tasa mitótica, proliferación microvascular, presencia de áreas necrosadas y, sobre todo, por un alto grado de infiltración en el parénquima cerebral, presentando bordes muy difusos, lo que dificulta enormemente la resección completa del tumor mediante neurocirugía (Vollmann-Zwerenz et al., 2020). Como consecuencia de las limitadas opciones de tratamiento, los pacientes que padecen GB presentan un mal pronóstico y la esperanza de vida media es de 15 meses tras su diagnóstico (Zhu et al., 2017).

Por todas sus propiedades, los GBs son tumores con alta capacidad de migración e invasión, presentando niveles altos de células con fenotipo mesenquimal y con características de célula troncal, en comparación con otro tipo de modelos tumorales más heterogéneos. A nivel celular, se ha propuesto que los GBs se podrían originar y mantener a partir de una subpoblación de células que, dentro del tumor, presentan algunas de las características de las células *stem*, denominadas células madre del cáncer (*cancer stem cells*, CSCs) o células iniciadoras de tumores (*tumor initiating cells*, TICs). Entre dichas características, mantienen un alto nivel de auto-renovación y expresan marcadores presentes en células *stem* primarias de ese linaje (Hanahan & Weinberg, 2011).

### 1.2.2. Principales alteraciones moleculares en glioblastomas

En los últimos años se ha producido un gran avance en el conocimiento de las alteraciones moleculares que subyacen al origen y la progresión de los gliomas (Rajaratnam et al., 2020). La relevancia de las características moleculares llevó a la OMS a actualizar el sistema de clasificación de los gliomas, integrando parámetros moleculares además de la caracterización histológica clásica (Louis et al., 2016). Comprender la patogenia del GB juega un papel clave, no solo en la identificación de biomarcadores de la enfermedad, sino también en el diseño de potenciales agentes quimioterapéuticos (Davis, 2016; Rajaratnam et al., 2020).

Estudios genómicos masivos realizados en GB han puesto de manifiesto el complejo perfil genético que subyace a esta enfermedad (Brennan et al., 2013; Parsons et al., 2008). La red de investigación *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) identificó que la mayoría de los GBs presentan alteraciones en 3 vías principales de señalización: la vía del supresor tumoral p53, la vía de señalización de RTKs (receptores con actividad tirosina quinasa)/RAS/PI3K (fosfatidilinositol 3-quinasa) y la vía de pRB (McLendon et al., 2008). Alteraciones en estas vías tienen como consecuencia la desregulación de la proliferación y el incremento de la supervivencia celular, debido a que la célula tumoral es capaz de escapar a los mecanismos de control del ciclo celular, senescencia y apoptosis (**Figura I4**).

El factor de transcripción p53, codificado por el gen *TP53*, posee un papel fundamental como supresor tumoral. En respuesta a señales de estrés, como daño en el DNA, p53 activa mecanismos de reparación del DNA, parada del ciclo celular y activación de muerte celular por apoptosis. La gran mayoría de GBs (87%) presentan alteraciones en la vía de p53, ya sea por mutaciones del gen *TP53*, amplificación de *MDM2* y *MDM4* (reguladores negativos de p53) o mutación de *CDKN2A* (codifica p14<sup>ARF</sup>, regulador negativo de MDM2/4). Sin embargo, no está clara su implicación pronóstica, principalmente por la diversidad de mutaciones que esta vía presenta (Masui et al., 2012; Ohgaki & Kleihues, 2009).

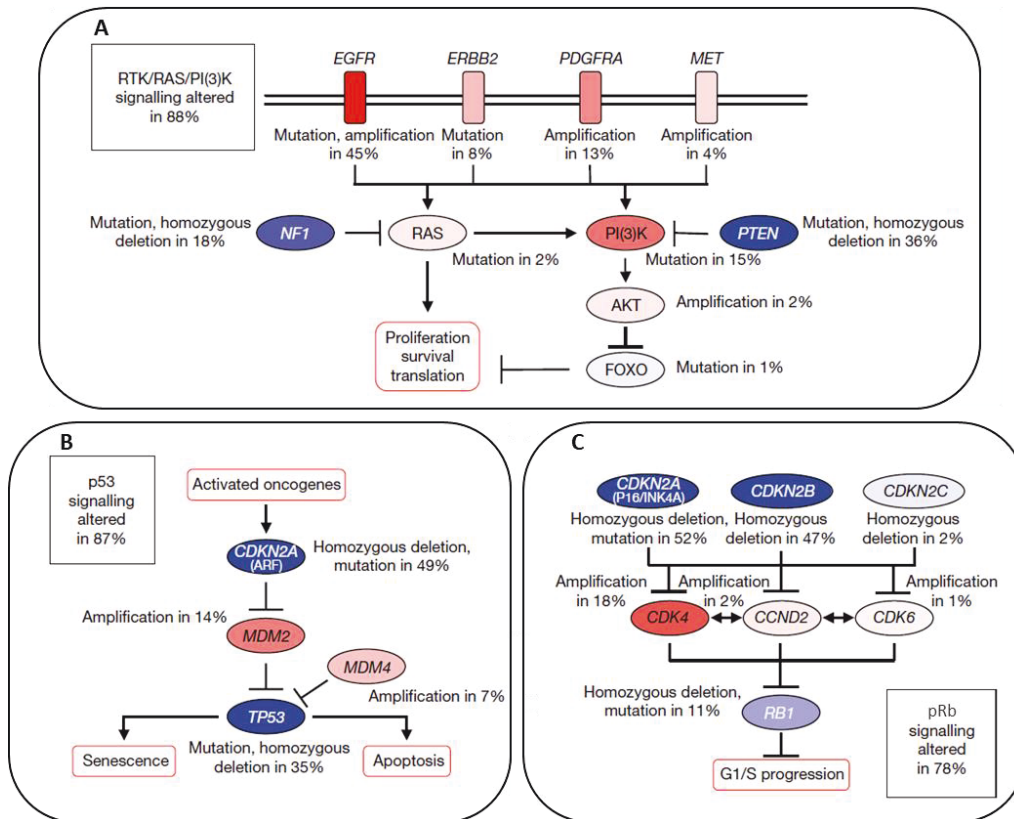


Figura 14 | **Alteraciones genéticas frecuentes en las tres vías de señalización críticas en el desarrollo de GB.** (A) Vía RTK/RAS/PI3K. (B) Vía de p53. (C) Vía de pRb. En rojo se marcan las alteraciones activadoras y en azul las inactivadoras. Adaptado de (McLendon et al., 2008).

La vía de señalización celular RTK/RAS/PI3K es considerada una de las más relevantes implicadas en supervivencia y proliferación. El 88% de los GBs presentan alteraciones genéticas en esta vía (McLendon et al., 2008). Varios RTKs se encuentran sobreexpresados o presentan mutaciones que les mantienen permanentemente activos. Algunos ejemplos son el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) (Hatanpaa et al., 2010; Nazarenko et al., 2012). Los RTKs mutados contribuyen al reclutamiento a la membrana de PI3K, RAS y el resto de las proteínas de la vía de señalización, desencadenando una cascada de transducción de señales (Malumbres & Barbacid, 2003). PI3K, tras fosforilar al inositol, inicia la activación de AKT y, más adelante, del complejo mTORC1 (diana de rapamicina en mamíferos), que funcionan como reguladores centrales del metabolismo celular, proliferación, control del ciclo celular, diferenciación y angiogénesis (Wen et al., 2012). Esta vía de activación se mantiene controlada por la proteína fosfatasa PTEN (fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa), que actúa como supresor tumoral inhibiendo la actividad de PI3K. Es común encontrar mutaciones o deleciones en *PTEN* en GB, lo que hace que la vía PI3K/AKT esté

constitutivamente activa (Kraakstad & Chekenya, 2010). También se han descrito, aunque de forma poco frecuente, mutaciones en RAS y en Neurofibromina-1 (NF-1) que contribuyen a la activación permanente de la ruta de las RAS/RAF/MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos), resultando en un crecimiento y proliferación celular descontrolados (Lo, 2010).

La proteína pRb, codificada por el gen supresor de tumores *RB1*, inhibe la progresión del ciclo celular a nivel del paso desde la fase G1 a la fase S. Cuando es fosforilada por Ciclina D-CDK4-CDK6, pRb se inactiva, favoreciendo la progresión del ciclo celular. Se han descrito mutaciones o deleciones en *RB1*, así como deleciones en los principales activadores (*CDKN2A* y *CDKN2B*) o amplificaciones en los represores más importantes (*CDK4*) de esta vía de señalización. Como consecuencia de dichas alteraciones genéticas, presentes en el 78% de los GBs, se pierde el control del ciclo celular, favoreciendo la hiperproliferación.

De todas las alteraciones genéticas comentadas, las más frecuentes detectadas en GB se dan en los genes que codifican a PTEN y p53. Así, nuestro grupo demostró en células obtenidas a partir de explantes de pacientes de GB, que la mayoría de ellos presentaban mutaciones en p53 y que, además, mostraban capacidad de crecimiento independiente de anclaje y expresaban marcadores de célula *stem*, como CD133 (Escoll et al., 2017). La subpoblación de células CD133<sup>+</sup> se vio incrementada al cultivar las células en un medio definido que favorece el crecimiento de las células de GB como células desdiferenciadas. También demostramos que las versiones mutantes de p53 eran esenciales para mantener el fenotipo oncogénico, mientras que la reducción de p53 mediante shRNA redujo de forma drástica la proliferación de los gliomas ensayados, acompañado de una clara disminución de la cantidad de células CD133<sup>+</sup> (Escoll et al., 2017).

### **1.3. Células madre del cáncer (CSCs) o células iniciadoras de tumores (TICs)**

Tradicionalmente, se han descrito a las células cancerosas como poblaciones relativamente homogéneas dentro del tumor hasta fases tardías de la progresión tumoral, en las cuales se combina la hiperproliferación con un aumento de la

inestabilidad genética, lo que genera distintas subpoblaciones clonales. Sin embargo, durante las últimas décadas, los tumores se han reconocido cada vez más como entidades cuya complejidad se aproxima y puede incluso exceder la de los tejidos sanos (Reya et al., 2001). Los tumores están compuestos por poblaciones heterogéneas de células en distintos estados de diferenciación (de Bruin et al., 2014; Gerlinger et al., 2012). Así, muchos tumores tienen una subpoblación de células neoplásicas desdiferenciadas con características de célula madre denominadas CSCs o TICs (Hanahan & Weinberg, 2011).

La primera evidencia de la existencia de las CSCs fue descrita en 1994 por Lapidot, Bonnet y Dick en un caso de Leucemia Mieloide Aguda (Lapidot et al., 1994). Años más tarde, empleando diferentes marcadores, se ha demostrado la existencia de CSCs en una gran variedad de tumores sólidos: en cáncer de mama (Dontu et al., 2003), colon (O'Brien et al., 2007), pulmón (Eramo et al., 2008), próstata (Collins et al., 2005), páncreas (Li et al., 2007), melanoma (Schatten et al., 2008) o gliomas, donde la subpoblación de células CSCs se caracteriza por expresar el marcador CD133 o presentar un alto contenido de nestina (Chen et al., 2010; Singh et al., 2003).

Todos estos trabajos demuestran que las CSCs constituyen, dentro del tumor, una subpoblación minoritaria de células con ciertas propiedades de las células madre. Entre ellas, se encuentran la capacidad de producir nuevas células no diferenciadas (auto-renovación), capacidad de diferenciarse a múltiples fenotipos mediante división celular asimétrica (Morrison & Kimble, 2006; Rosen & Jordan, 2009) y la habilidad de formar nuevos tumores *in vivo* cuando se realizan xenoinjertos en ratones inmunodeficientes. La célula con fenotipo *stem* tiene baja tasa de proliferación mientras que la célula diferenciada tiene alta tasa proliferativa (Cicalese et al., 2009).

Se cree que las CSCs son las responsables del comienzo del crecimiento del tumor y de su mantenimiento, pudiendo tener además una alta capacidad de migración e invasión. Su origen es una cuestión que actualmente sigue en investigación, aunque se barajan dos teorías. La primera se basa en que las CSCs podrían surgir tras producirse mutaciones en determinadas células *stem* o células progenitoras normales presentes en el tejido, adquiriendo de esta forma la capacidad de generar un tumor. La segunda teoría sugiere que las CSCs provienen de células somáticas diferenciadas que adquieren

propiedades de célula madre debido a alteraciones genéticas y epigenéticas. Pueden existir además factores en el microambiente que desencadenen los pasos iniciales de la formación del tumor (Bjerkvig et al., 2005) (**Figura 15**). El inicio del proceso tumoral tal vez no sea cuestión de un solo tipo celular, sino que podría ser una combinación de mutaciones que generen primero un fenotipo *stem* con una acumulación posterior de mutaciones que impulsen la progresión del tumor.

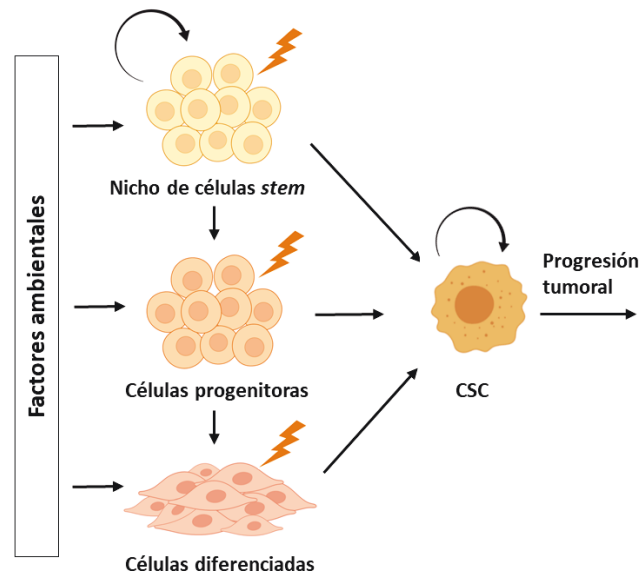


Figura 15 | **Teorías del origen de las CSCs.** Podrían surgir a partir de mutaciones en las células *stem* o progenitoras del tejido, así como de mutaciones en células ya diferenciadas. Adaptación de (Bjerkvig et al., 2005).

A diferencia de las células *stem* normales, las CSCs presentan una gran plasticidad celular, ya que son capaces de entrar y salir del fenotipo *stem*, para proliferar, migrar o invadir, adaptándose al contexto en el que se encuentren (Scheel & Weinberg, 2011).

Se ha relacionado la adquisición de rasgos de CSC con la transdiferenciación que ocurre en el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT, del inglés *Epithelial-Mesenchymal Transition*) (Mani et al., 2008; Morel et al., 2008; A. Singh & Settleman, 2010). El programa EMT puede conferir a tales células la capacidad de auto-renovación, la cual es crucial para su posterior expansión clonal, y puede permitir que las células cancerosas se diseminen físicamente desde los tumores primarios (Brabletz et al., 2005). Por tanto, el programa EMT está implicado en la plasticidad tumoral, que podría darse también de forma reversible desde mesénquima a epitelio (MET, del inglés *Mesenchymal-Epithelial Transition*). Así lo demuestran varias publicaciones que describen la habilidad de las células de GB (o posiblemente su

subpoblación de CSCs) para transdiferenciarse en células de tipo endotelial, pudiendo formar estructuras neovasculares asociadas al tumor (Ricci-Vitiani et al., 2010; Soda et al., 2011).

La gran plasticidad que poseen las CSCs y su capacidad de interconversión entre *stem* y *no-stem* resulta en una variación dinámica de su abundancia, lo que explica la heterogeneidad celular presente en el tumor. Esta capacidad de interconversión entre fenotipos permite al tumor adaptarse, no sólo a diferentes entornos fisiológicos, sino también resistir a tratamientos oncológicos (**Figura 16**). Varias publicaciones han demostrado el importante papel de las CSCs en la resistencia a la quimioterapia y radioterapia (Hanahan & Weinberg, 2011; Makena et al., 2020; Thompson & Haviv, 2011; Zeppernick et al., 2008).

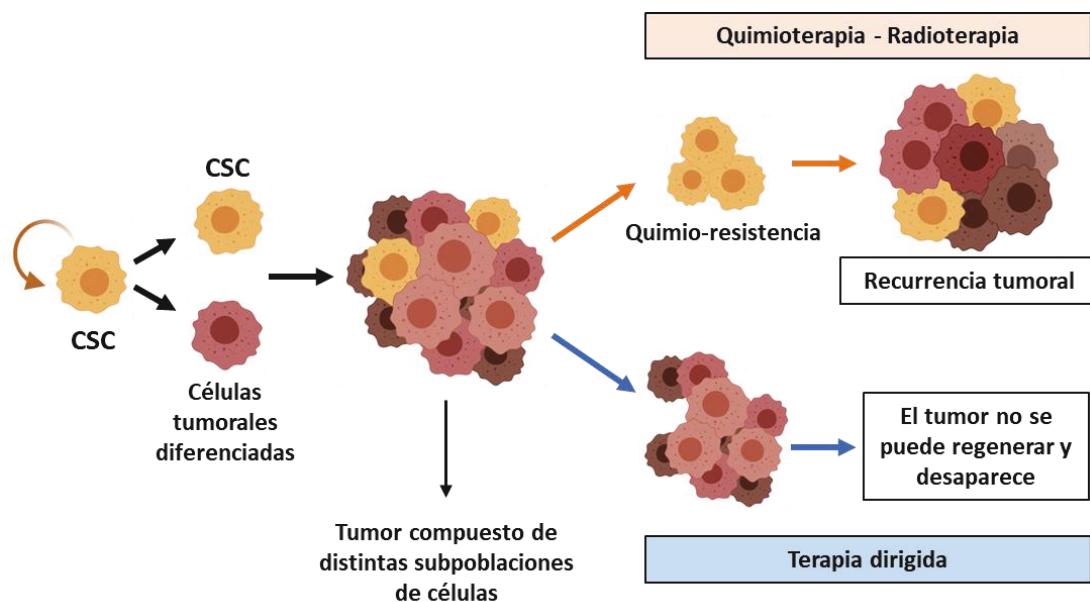


Figura 16 | **Hipótesis de la recurrencia tumoral y la quimio-resistencia causada por las CSCs.** Los tratamientos oncológicos actuales no destruyen a las CSCs, lo que produce recidivas. Terapias dirigidas contra las CSCs podrían destruirlas impidiendo la regeneración del tumor.

Por todo ello, podríamos decir que las CSCs serían las responsables directas del desarrollo del tumor, la metástasis, la resistencia a las terapias oncológicas y, por consecuencia, de la recurrencia de muchos tipos tumorales, lo que las convierte en una diana terapéutica evidente.



## 2. CITOESQUELETO DE ACTINA EN EL PROCESO TUMORAL

El inicio de la transformación tumoral conlleva, no solamente un proceso de reprogramación genética, sino también un cambio de morfología celular y un incremento en la capacidad proliferativa que se fundamentan mayoritariamente en el citoesqueleto microtubular y de actina. El citoesqueleto de actina y el conjunto de proteínas asociadas que lo regulan tienen un papel esencial en migración e invasión (Li et al., 2010; Li et al., 2001), fenómenos celulares clave en procesos patológicos como es el desarrollo del GB (Velpula et al., 2012). Algunas de las señales moleculares que se encuentran alteradas en GB, comentadas anteriormente, son reguladores naturales de la migración celular, como por ejemplo la señalización de RAS/MAPK controlada por PI3K (Castellano et al., 2016). Parte de la misión de estas rutas, a nivel del citoesqueleto celular, es la regulación de la actina, modulando la polimerización o despolimerización de los filamentos de actina y su dinámica. Esta señalización proporciona la fuerza protomotriz necesaria para la formación de estructuras de membrana protrusivas ricas en actina, tales como invadopodia o podosomas, esenciales en el proceso de invasión tanto en células normales como en células tumorales (Eddy et al., 2017; Linder, 2007). Dichas estructuras están asociadas con la secreción y activación de metaloproteasas que degradan la matriz extracelular, permitiendo así la invasión celular. La migración e invasión celulares requieren, por tanto, la integración de varios procesos que incluyen la modulación local de la estructura del citoesqueleto y de las fuerzas contráctiles, el reciclaje de estructuras de adhesión al substrato y la generación de dominios especializados para la degradación focal de la matriz extracelular (Eddy et al., 2017; Gimona et al., 2008).

Entre las proteínas que componen podosomas e invadopodia se encuentran la actina, el complejo nucleador de actina ARP2/3, la proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich (neural) ((N)-WASP) y la proteína de interacción con WASP (WIP), además de un gran número de otros reguladores que controlan la dinámica del citoesqueleto (Chou et al., 2006; García et al., 2012).

El complejo ARP2/3 constituye el eje central de la nucleación de actina, junto a un grupo de proteínas que regulan la polimerización, todas ellas proteínas altamente conservadas en la evolución. Entre ellas, se identificó a WASP y a su homólogo neural

N-WASP, ambos miembros de una familia de proteínas implicadas en la organización de los microfilamentos, la cual incluye también a WAVE1/Scar (Chou et al., 2006; Derry et al., 1994; Machesky & Insall, 1998; Miki et al., 1996, 1998). Cabe destacar que se han identificado homólogos de WASP en muchos tipos celulares eucariotas, desde levadura hasta mamíferos, teniendo en todos ellos un papel crítico en la conexión entre señales activadoras de CDC42 y los microfilamentos de actina. Casi todos los miembros de la familia Rho GTPasas, perteneciente a la superfamilia de Ras, se ha demostrado que regulan la dinámica de actina, pero sólo CDC42 y RAC se han visto asociados directamente con (N)-WASP (Aspenström et al., 1996; Symons et al., 1996). WASP y N-WASP poseen una estructura y función muy similares, diferenciándose principalmente en el tipo celular dónde se expresan: WASP se expresa sólo en células hematopoyéticas (Derry et al., 1995), mientras que N-WASP lo hace de forma ubicua (Miki et al., 1996). Ambos pueden formar complejos con proteínas de interacción con actina y con otras proteínas que participan en la formación de invadopodia y podosomas como son cortactina, miosina II, NCK y TSK5/FISH (Antón et al., 2002; van den Dries et al., 2019).

## 2.1. WIP

La proteína WIP humana posee una longitud de 503 aminoácidos, está codificada por el gen *WIPF1* y se expresa de forma ubicua, aunque mayoritariamente en células de linaje leucocitario (Ramesh et al., 1997). Pertenece a una familia de proteínas ricas en prolina, compuesta además por CR16 y WIRE/WICH (*WIP related/WIP-CR16 homologous*) (Aspenström, 2004, 2005). Presenta una alta homología de secuencia con la proteína de levadura verprolina (Vaduva et al., 1999) y es un 95% idéntica a su versión murina. Posee una estructura multidominio que le permite interaccionar con actina y diversas proteínas que regulan su polimerización y organización, como son cortactina, profilina o (N)-WASP (Antón et al., 2007; Ramesh & Geha, 2009; Sokolik et al., 2020) (**Figura I7**).



Figura 17 | **Dominios estructurales de la proteína WIP.** *V domain*: dominio de homología con verprolina; WH2: *WASP-homology 2*, dominio para unión a actina; ABM-2: Dominio de unión a profilina; PRD: Dominio rico en prolina. Adaptado de (Antón et al., 2007).

En su región N-terminal se encuentra el dominio V, denominado así debido a su alto grado de homología con verprolina, proteína presente en levaduras implicada en la organización de actina, polaridad celular y endocitosis (Donnelly et al., 1993; Thanabalu et al., 2007). El dominio V contiene dos dominios WH2 (*WASP Homology 2*) que le permiten interactuar con actina. El primero de los dominios WH2 contiene un motivo KLKK (Lisina-Leucina-Lisina-Lisina) que permite a WIP unirse a actina. WIP posee tres motivos ABM-2 (*Actin-Based Motility 2*) que le permiten unirse a profilina, proteína involucrada en el equilibrio dinámico de ensamblaje del citoesqueleto de actina. Tras el dominio V, existen multitud de motivos ricos en prolina con función *scaffold*, lo que sirve de unión para proteínas con dominios SH3, como son cortactina (proteína que promueve la polimerización y reorganización del citoesqueleto implicada en la formación de invadopodia y podosomas), NCK (Antón et al., 1998) y CRKL (Sasahara et al., 2002) (proteínas adaptadoras esenciales para la transducción de señales).

WIP es capaz de interactuar con (N)-WASP a través de su dominio C-terminal (Peterson et al., 2007; Sokolik et al., 2020; Volkman et al., 2002).

Durante los últimos años se ha establecido que WIP es una proteína multifuncional (Antón et al., 2007), sin embargo, muchas de sus funciones biológicas están lejos de ser entendidas por completo. Datos de nuestro grupo y de otros grupos de investigación respaldan la participación de WIP en actividades celulares como son proliferación, migración, transición EMT y diferenciación, además de su papel en la regulación de la polimerización de actina, esencial para la formación y función de invadopodia (Antón et al., 2002, 2007; Franco et al., 2012; García et al., 2014).

Utilizando células dendríticas derivadas de ratones deficientes en WIP ( $WIP^{-/-}$ ) (Antón et al., 2002), se ha demostrado que WIP regula la estabilidad y localización de

WASP y, por tanto, es fundamental para la formación de invadopodia y podosomas implicados en adhesión, migración y degradación de la matriz extracelular (Banon-Rodriguez et al., 2013; Chou et al., 2006; García et al., 2012; Moreau et al., 2000) (**Figura 18**). Además, se ha descrito que WIP contribuye tanto a la migración ameboidal como a la mesenquimal (Banon-Rodriguez et al., 2013; Bañón-Rodríguez et al., 2011).

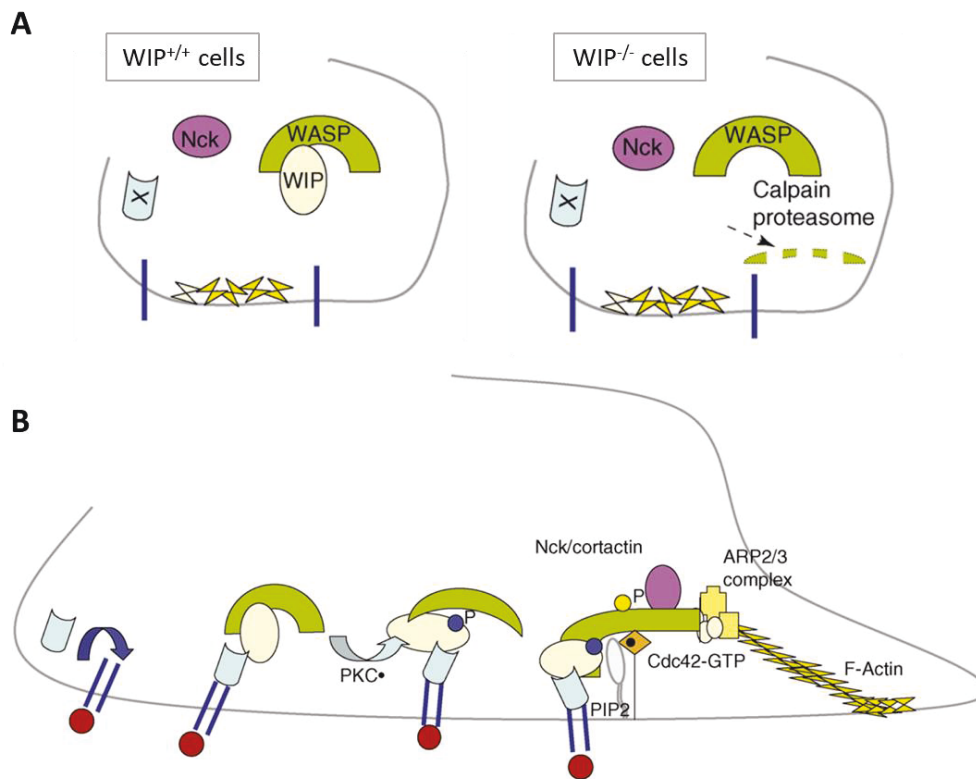


Figura 18 | **WIP regula la estabilidad y la localización de (N)-WASP.** A) En ausencia de WIP ( $WIP^{-/-}$ ), WASP es susceptible de ser degradado por calpaínas y proteosoma. B) WIP es capaz de controlar la localización de (N)-WASP, reclutándolo a la membrana celular en respuesta a señales que estimulan la polimerización de actina. Adaptado de (Antón et al., 2007).

La interacción de (N)-WASP y WIP es esencial en varias funciones celulares. La función de (N)-WASP está regulada por WIP que, *in vitro*, inhibe la nucleación de actina por ARP2/3 mediada por activación de (N)-WASP a través de CDC42 (**Figura 19**) (Miki et al., 1998). De esta manera, WIP regula la polimerización de actina y, por tanto, la reorganización del citoesqueleto (Antón et al., 2007).



Figura 19 | WIP inhibe la nucleación de actina por ARP2/3 mediada por activación de (N)-WASP a través de CDC42.

En los últimos años se ha descrito que el complejo WASP-WIP actuaría como un interruptor de ARP2/3 en los sitios de endocitosis, tras acumularse en un nivel umbral, estableciendo una red de interacciones SH3-dominios ricos en prolina que favorecen el ensamblaje de proteínas adaptadoras y el inicio de la nucleación de actina (Gryaznova et al., 2015; Sun et al., 2017).

### 2.1.1. WIP y su papel protumoral estabilizando YAP/TAZ en tumores sólidos

Recientemente, nuestro grupo ha descrito que WIP es esencial para el mantenimiento del fenotipo de las CSCs (Gargini et al., 2016; Rivas et al., 2018). Inicialmente observamos que, en células obtenidas de explantes de pacientes con GB mutados en p53, existe una fuerte correlación entre la capacidad proliferativa y la presencia de altos niveles de WIP (Escoll et al., 2017; Gargini et al., 2016). De forma complementaria, la sobreexpresión de WIP en astrocitos humanos incrementó su capacidad proliferativa e hizo que expresasen marcadores de célula *stem* neural (CD133). La elevada expresión de WIP correlaciona con el fenotipo tumoral, mientras que la eliminación de WIP mediante shRNA impide el crecimiento de GB *in vitro* e *in vivo*, lo que se traduce en un notable incremento de la supervivencia en ratón (Gargini et al., 2016).

Esta actividad pro-oncogénica que presenta WIP se realiza modulando los niveles proteicos de los cofactores de transcripción YAP (*Yes-associated protein*) y TAZ (*Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif*), los cuales están implicados

directamente en la progresión tumoral y mantenimiento de las CSCs (Cordenonsi et al., 2011; Gargini et al., 2016; Piccolo et al., 2014; Rivas et al., 2018).

La principal forma por la que la célula regula los niveles proteicos de YAP/TAZ es mediante su ubiquitinación y degradación vía proteosoma. El complejo de destrucción de  $\beta$ -catenina, compuesto por APC/axina/GSK3, también participa en la regulación de la estabilidad y transcripción de YAP/TAZ (Azzolin et al., 2012, 2014). YAP/TAZ son capaces de unir axina, lo que permite al complejo interactuar con su ubiquitina ligasa  $\beta$ TrCP, la cual facilita la ubiquitinación y posterior degradación de YAP/TAZ y  $\beta$ -catenina vía proteosoma (Azzolin et al., 2012, 2014).

Nuestro grupo describió que la reducción de los niveles de YAP/TAZ causados por la pérdida de WIP no son compensados ni por estabilización ni por despolimerización de los filamentos de actina. Por tanto, WIP estaría mediando la estabilidad de YAP/TAZ mediante un mecanismo independiente de la polimerización de actina (Gargini et al., 2016). Así, vimos que WIP es capaz de controlar el crecimiento tumoral gracias a su capacidad para estabilizar al complejo YAP/TAZ a través de un mecanismo dependiente del sistema endocítico/endosomal (**Figura I10**). Cuando los niveles de WIP son altos, el complejo APC/axina/GSK3 es secuestrado en cuerpos multivesiculares, quedando inhibida su capacidad para contribuir a destruir YAP/TAZ. Además, nuestro grupo ha demostrado que RAC1, PAK y la formina mDIA, son esenciales para la formación de los cuerpos multivesiculares que permiten a WIP estabilizar YAP/TAZ; la sobreexpresión de RAC-V12 o de PAK-CA/mDIA2 rescatan el fenotipo generado por la pérdida de WIP (Gargini et al., 2016).

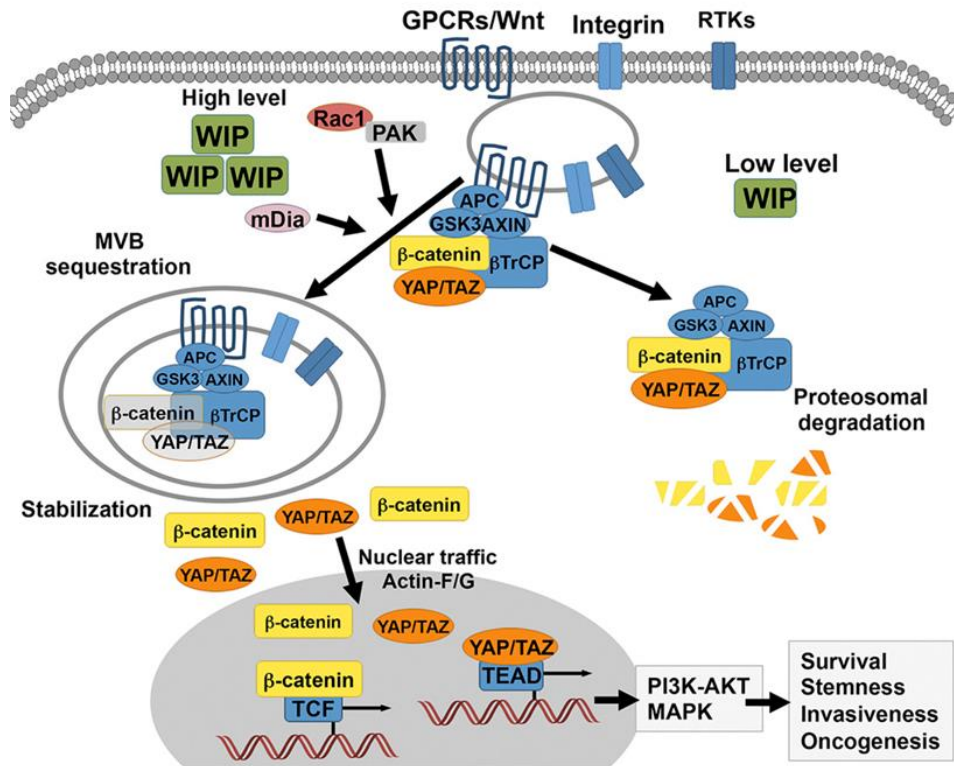


Figura 110 | WIP es capaz de promover la progresión tumoral mediante la estabilización de los cofactores de transcripción YAP/TAZ gracias al secuestro del complejo APC/axina/GSK3 en cuerpos multivesiculares. La formación de los cuerpos multivesiculares es dependiente de RAC1/PAK y la formina mDia. Imagen tomada de (Gargini et al., 2016).

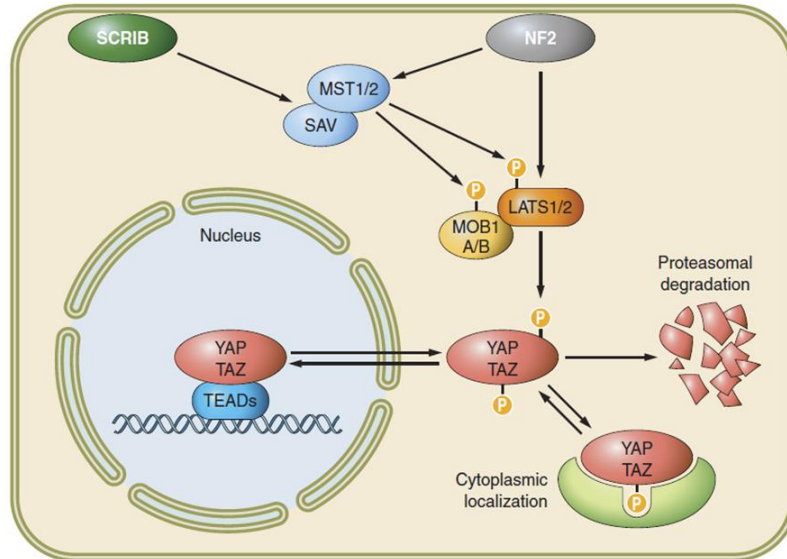
### 2.1.1.1. YAP/TAZ en el proceso tumoral

Los cofactores de transcripción YAP/TAZ regulan importantes procesos biológicos como son el desarrollo, la homeostasis tisular y el cáncer (Azzolin et al., 2014; Cordenonsi et al., 2011; Piccolo et al., 2013). A pesar de que aún se desconocen muchos de los aspectos que rodean a YAP/TAZ, sí es bien conocido su papel como efectores de la vía de señalización Hippo, la cual tiene un importante papel tanto en el control del tamaño de los órganos como en tumorigénesis (Zhao, Li, Lei, et al., 2010). La vía Hippo es una de las rutas que coordinan el crecimiento, el mantenimiento del fenotipo *stem*, la diferenciación y la mecanotransducción, por lo que tiene una profunda implicación en cáncer y la progresión de la metástasis (Mo et al., 2014). Así, se ha descrito que la ruta Hippo se encuentra modificada en varios tumores, lo que conlleva una sobreactivación de YAP/TAZ (Lo Sardo et al., 2018; Masliantsev et al., 2021; Rozengurt et al., 2018).

La vía Hippo está regulada por señales extracelulares, proteínas asociadas a membrana, uniones célula-célula y mecanotransducción (Mo et al., 2014). La activación

de la vía Hippo, desencadena una cascada de fosforilaciones que terminan inhibiendo a los factores de transcripción YAP/TAZ (**Figura I11**). Dicha cascada comienza con la activación de MST1/2 y SAV1, los cuales forman un complejo capaz de fosforilar a las quinasas LATS1/2. A su vez, LATS1/2 son capaces de fosforilar a YAP/TAZ en diferentes serinas, impidiendo su translocación al núcleo por retención en el citoplasma al unirse a proteínas 14-3-3 o incluso favoreciendo su degradación vía proteosoma, tras ser fosforilado por otras quinasas como CK1 (Liu et al., 2010; Moroishi et al., 2015; Yu & Guan, 2013; Zhao et al., 2010). Los mutantes YAPS5A y TAZS4A, que tienen mutadas sus serinas, no pueden ser degradados al no poder ser fosforilados por LATS. Como consecuencia, la sobreexpresión de dichos mutantes genera una alta capacidad tumorigénica (B. Zhao et al., 2007).

Cuando YAP/TAZ no están fosforilados, pueden translocarse al núcleo donde forman complejo con otros factores de transcripción, como TEAD, e inducen la transcripción de genes que promueven la proliferación celular e inhiben apoptosis, como CTGF (*Connective tissue growth factor*) o survivina (Moroishi et al., 2015).



**Figura I11 | YAP/TAZ son los principales efectores de la vía Hippo.** La activación de esta ruta produce la fosforilación de YAP/TAZ, lo que los retiene en el citoplasma, impidiendo su translocación al núcleo, e incluso induce su degradación vía proteosoma al ser fosforilados por otras quinasas. Cuando no están fosforilados, YAP/TAZ pueden alcanzar el núcleo donde, junto a diferentes factores de transcripción, inducen la expresión de sus genes diana. Imagen tomada de (Piccolo et al., 2014).

Además, la localización celular de YAP/TAZ también está regulada por el citoesqueleto de actina, aunque este mecanismo aún no está claro. Así, la estabilización de los filamentos de F-actina mediante el uso de fármacos resulta en una disminución



de los niveles de fosforilación en YAP, lo que favorece su translocación al núcleo (Reddy et al., 2013).

Se ha descrito que existe una correlación directa entre niveles altos de YAP/TAZ y mayor grado de metástasis, así como una mayor capacidad de auto-renovación de las CSCs en carcinogénesis de mama (Q. Chen et al., 2014; Lamar et al., 2012; Vlug et al., 2013). La interferencia de TAZ provoca una disminución de la expresión de genes diana como CTGF y survivina, lo que se traduce en falta de crecimiento y pérdida de la capacidad tumoral (Cordenonsi et al., 2011). Por lo tanto, TAZ sería requerido para mantener la auto-renovación de las CSCs. Además, se ha asociado a TAZ con células que poseen características mesenquimales en GB, siendo necesario para regular la diferenciación mesenquimal y la malignidad en gliomas. TAZ es necesario en las células tumorales que expresan marcadores de invasión, auto-renovación e iniciación del tumor, mostrando una inducción de CTGF, CD44, CAV2 y Fibronectina1 dependiente de TAZ/TEAD (Bhat et al., 2011). Niveles altos de TAZ se asocian a mal pronóstico en pacientes con GB, al potenciar la proliferación celular mediante la vía EGFR/AKT/ERK (Vigneswaran et al., 2021; Yang et al., 2016). TAZ también es responsable de la resistencia a radioterapia en estos pacientes (Zhang et al., 2019).

Se ha descrito que YAP se expresa de manera heterogénea entre las células que componen el GB. Así, la expresión diferencial de YAP promueve la tumorigénesis y conduce al dominio clonal de las células que expresan niveles más altos de YAP (Liu et al., 2019).

Un estudio reciente ha demostrado que YAP/TAZ son necesarios para la transformación oncogénica de células neurales primarias, mantenimiento del fenotipo *stem* y control de la plasticidad en las células de GB, lo que demuestra un papel clave de estos cofactores de transcripción en la patogénesis del GB (Castellan et al., 2021). También se ha identificado a YAP como mediador entre la vía Hippo y la vía PI3K/AKT. YAP es capaz de regular la expresión de miR-29, que tiene como diana a PTEN. Como consecuencia, YAP modula la actividad de PTEN generando un aumento de actividad de AKT (Tumaneng et al., 2012).

Además, se ha descrito que YAP es capaz de interactuar físicamente con versiones mutadas de p53 potenciando su actividad transcripcional pro-proliferativa,

incrementando la expresión de genes como los de las proteínas de ciclo celular ciclina A, ciclina B y CDK1 (Di Agostino et al., 2016).

Debido a su gran implicación en el desarrollo tumoral, YAP/TAZ se han convertido en dianas terapéuticas (Zanconato et al., 2016) para el tratamiento de algunos cánceres como el de piel (Andl et al., 2017), de pulmón (Lo Sardo et al., 2018) o de mama (Zhao et al., 2021). También se ha descrito que podrían ser responsables de la resistencia a tratamientos quimioterapéuticos (Nguyen & Yi, 2019; Reggiani et al., 2020).

### **2.1.1.2. Vía protumoral AKT2-WIP-YAP/TAZ en CSCs de glioblastoma**

La proteína AKT está implicada en numerosos procesos biológicos y patológicos, como regulación del metabolismo, crecimiento celular, supervivencia, proliferación y cáncer (Bhaskar & Hay, 2007; Dummler & Hemmings, 2007; Manning & Cantley, 2007). Diversas señales extracelulares inducen la activación de AKT a través de PI3K, siendo fosforilada en 2 de sus residuos, treonina 308 y serina 473, por PDK1 y el complejo mTORC2 respectivamente (Yang et al., 2004). Finalmente, AKT activa es capaz de regular una gran diversidad de proteínas mediante fosforilación, entre ellas probablemente WIP. La hiperactivación de AKT, ya sea de forma directa por mutación en su gen codificante o indirecta por alteraciones en PTEN, juega un papel clave en cáncer (Georgescu, 2010; Liu et al., 2009). Así, la hiperactivación de AKT promueve protección frente apoptosis e incremento en proliferación (Baselga, 2011; Liu et al., 2009).

Existen tres isoformas de AKT en mamíferos codificadas por 3 genes altamente relacionados (*AKT1*, *AKT2* y *AKT3*), constituyendo una familia de quinasas con una gran homología de secuencia, dominios similares a nivel molecular y que han sido relacionadas con distintas funciones. El papel de cada una de las isoformas en el desarrollo tumoral sigue siendo poco claro y se ha sugerido que podrían ejercer distinta función (Gonzalez & McGraw, 2009; Rivas et al., 2018).

Nuestro grupo ha descrito que no sólo en el linaje de células de glioma, sino también en células de cáncer de mama, el crecimiento de las CSCs y su fenotipo dependen de la expresión y/o actividad de AKT (Gargini et al., 2015, 2016). La inhibición o reducción de AKT compromete la viabilidad celular (Diez et al., 2012; Vanhaesebroeck et al., 2012) y en las CSCs, además, reduce el fenotipo mesenquimal antes de morir

(Gargini et al., 2015). Esto sugiere que algunos elementos dependientes de AKT son esenciales para el mantenimiento del fenotipo y la proliferación de las CSCs.

Hemos visto también que, en células de pacientes de GB mutantes para p53 crecidas como CSC en medio definido, existe una correlación entre niveles altos de WIP y niveles altos de AKT y ERK activados, además de correlacionar también con niveles altos de YAP/TAZ (Escoll et al., 2017). Tras analizar qué isoforma de AKT es la responsable de este hecho, vimos que la deficiencia de AKT2 redujo de forma drástica la expresión de marcadores *stem* (CD133, CD44 o YAP/TAZ) y la proliferación en las CSCs. Además, las células de GB deficientes en AKT2 fueron incapaces de desarrollar tumores tras su implantación en ratones inmunodeficientes (Escoll et al., 2017). El mismo efecto ocurre cuando disminuimos los niveles de WIP o de p53 mutado. Además, la sobreexpresión de WIP compensa los efectos de la pérdida de p53 mutado (Escoll et al., 2017).

Todo ello sugiere la existencia de una nueva vía de señalización oncogénica en las CSCs en la que las funciones de AKT2 para mantener las propiedades *stem* estarían bajo el control de p53 mutado y un sistema de reciclaje de receptores de membrana, regulando a WIP y controlando la estabilidad de YAP/TAZ al prevenir su degradación vía proteosoma (**Figura I12**) (Escoll et al., 2017; Rivas et al., 2018). Apoyando esta teoría, la sobreexpresión de p53 mutante en astrocitos humanos cultivados en condiciones con independencia de anclaje, genera células transformadas que expresan marcadores *stem* y que presentan un incremento en los niveles tanto de WIP como de YAP/TAZ. Estos astrocitos transformados utilizan la vía AKT2-WIP-YAP/TAZ para mantener propiedades de CSC.

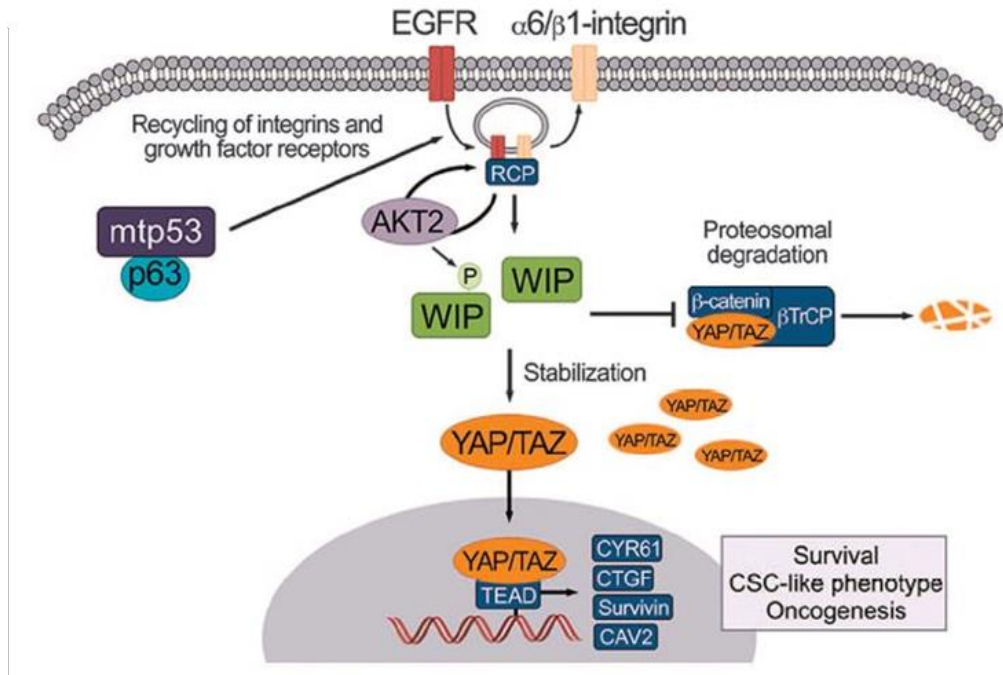


Figura I12 | **Vía protumoral AKT2-WIP-YAP/TAZ.** Modulada de forma positiva por mutaciones en p53 mediante un sistema de reciclaje de receptores de membrana para el mantenimiento del fenotipo *stem* de las CSCs. Aún queda por conocer más a fondo el modo en el que AKT2 regula a WIP para favorecer la estabilización de YAP/TAZ. Imagen tomada de (Escoll et al., 2017).

Hemos demostrado, por tanto, que WIP dirige un nuevo mecanismo que estimula señales de crecimiento y promueve la estabilización de YAP/TAZ, lo que permite a la célula coordinar factores clave en la progresión tumoral como son proliferación, mantenimiento del fenotipo *stem* e invasión.

### 2.1.2. WIP posee un papel antitumoral en linfomas mediados por ALK

Recientemente, en colaboración con el laboratorio de Roberto Chiarle, nuestro grupo ha descrito que en linfomas humanos mediados por ALK (*Anaplastic Lymphoma Kinase*; ALK+) se presenta la situación opuesta a la descrita en tumores sólidos.

Conociendo previamente que los niveles de expresión de WIP fisiológicos son mayores en células de linaje leucocitario, vimos que en estos tumores los niveles de expresión de WIP y WASP son bajos, y que se ven incrementados, tanto a nivel de mRNA como de proteína, después de la eliminación de ALK (Menotti et al., 2019). Estos datos han sido confirmados también en modelos murinos transgénicos con linfoma mediado por ALK (NPM-ALK) (Lai & Ingham, 2013). Así, en aquellos ratones deficientes en WIP (NPM-ALK/WIP<sup>-/-</sup>) o en WASP (NPM-ALK/WASP<sup>-/-</sup>), se acelera la linfomagénesis mediada

por NPM-ALK y disminuye notablemente su supervivencia en comparación con ratones que expresan WIP (NPM-ALK/WIP<sup>+/+</sup>) o WASP (NPM-ALK/WASP<sup>+/+</sup>) (Menotti et al., 2019).

Esto demuestra que WIP está bajo el control de ALK y que presenta un papel como supresor tumoral en linfomas mediados por ALK, puesto que su ausencia incrementa la formación del tumor y disminuye la supervivencia. Dichos datos contrastan totalmente con los descritos anteriormente en tumores sólidos, donde WIP se comporta como un oncogén estabilizando a los cofactores de transcripción YAP/TAZ, lo que potencia proliferación, mantenimiento del fenotipo *stem* y metástasis.

## 2.2. IQGAP1 y su implicación en el desarrollo tumoral

Entre el grupo de proteínas que son capaces de regular la polimerización de actina e interactuar con (N)-WASP, deseamos destacar IQGAP1 (*IQ Motif Containing GTPase Activating Protein 1*) por la implicación que tendrá en el posterior desarrollo del trabajo. Así, las proteínas IQGAP constituyen una familia de proteínas muy conservadas en la evolución, desde levadura hasta vertebrados (Hedman et al., 2015). En humanos, se han identificado 3 isoformas (IQGAP1, IQGAP2 e IQGAP3) (Watanabe et al., 2015), las cuales, a pesar de su alta homología, difieren en su localización tisular. IQGAP1 se expresa de forma ubicua, mientras que IQGAP2 e IQGAP3 lo hacen en tejidos específicos (Brill et al., 1996; Wang et al., 2007).

El primer miembro identificado fue IQGAP1 y es además el más ampliamente estudiado. IQGAP1 ha sido descrito principalmente como una proteína *scaffold* debido a su estructura multidominio, siendo capaz de interactuar con un gran abanico de proteínas (**Figura I13**) (Hedman et al., 2015).

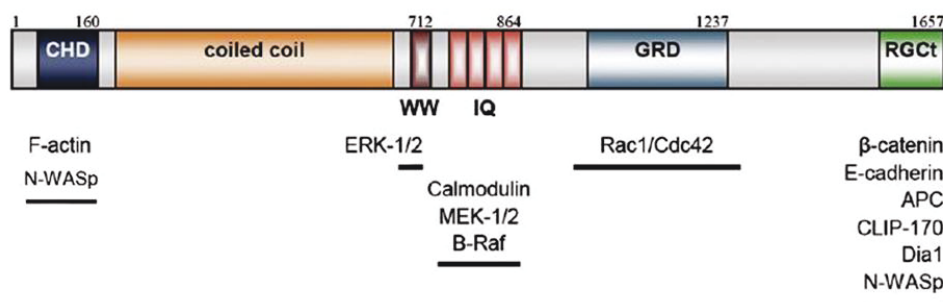


Figura I13 | **Dominios estructurales de la proteína IQGAP1.** CHD: *Calponin Homology Domain*; WW: dominio de repeticiones de triptófano; Dominio con cuatro motivos IQ; GRD: *GTPase-activating protein Related Domain*; RGct: RasGAP-C-terminal. Adaptado de (M. Johnson et al., 2009).

En su estructura, presenta un dominio CHD (*Calponin Homology Domain*) de interacción con F-actina y N-WASP, y un dominio WW de repeticiones de triptófano para interactuar con regiones ricas en prolina presentes en otras proteínas. Cuatro motivos IQ centrales regulados por calmodulina, la cual puede generar cambios conformacionales en IQGAP1, modificando su habilidad para interactuar con ciertas proteínas. Un dominio GRD (*GAP Related Domain*) que carece de actividad GAP, sirviendo principalmente para interactuar con las GTPasas RAC1 y CDC42 y estabilizar su forma activa unida a GTP. Dominio RGcT (RasGAP-C-terminal) de interacción con diversas proteínas como APC,  $\beta$ -catenina o E-cadherina.

Se ha descrito que N-WASP es capaz de interactuar con las regiones N-terminal (Bensenor et al., 2007) y C-terminal (Le Clainche et al., 2007) de IQGAP1. La gran mayoría de investigaciones se han centrado en el estudio de IQGAP1 como regulador de la dinámica del citoesqueleto de actina a través de su capacidad de interactuar con N-WASP, CDC42 y la formina mDIA (Le Clainche et al., 2007; Watanabe et al., 2015). Gracias su estructura multidominio, se ha visto que IQGAP1 actúa como un mediador esencial en diversas cascadas de señalización (Brown & Sacks, 2006), facilitando y coordinando la organización espacio-temporal y la activación secuencial de las moléculas estructurales y de señalización (Malarkannan et al., 2012). Esto hace a IQGAP1 participe en muchos procesos celulares tales como tráfico vesicular, adhesión, migración, invasión y proliferación celular, la mayoría de ellos clave en la progresión tumoral (Johnson et al., 2009; Mataraza et al., 2003; Noritake, 2005; Rittmeyer et al., 2008; Wang et al., 2009; White et al., 2012).

Proteínas de interacción con IQGAP1 como son  $\beta$ -catenina, E-cadherina, CDC42, RAC1 y las proteínas de la vía MAPK juegan un papel importante en la formación de tumores.

Así, en los últimos años existen diversos estudios centrados en la contribución de IQGAP1 a la progresión tumoral. Se ha descrito que IQGAP1 se encuentra sobreexpresada y deslocalizada en numerosos tumores (Johnson et al., 2009; Nabeshima et al., 2002; Rotoli et al., 2017) (mama, ovario, gástrico, colorrectal, pulmón, cerebral, piel), incluyendo gliomas (McDonald et al., 2007). En la mayoría de estos estudios se ha localizado a IQGAP1 en la membrana plasmática de las células tumorales

donde reduce la adhesión célula:célula, promueve la reorganización de actina para favorecer la migración celular e, incluso, se une a diferentes receptores de membrana para ayudar en la señalización de estímulos extracelulares que controlan crecimiento e invasión (Rotoli et al., 2019).

Se han descrito casos clínicos en los que los pacientes con GB en los que hay ausencia de IQGAP1 presentan una mayor supervivencia, superior a 3 años (McDonald et al., 2007). Además, se ha identificado a IQGAP1 como un marcador específico de células que se están amplificando (nestina<sup>+</sup>) en GB (Balenci et al., 2006). El fenotipo de las células IQGAP1<sup>+</sup> es similar al de los progenitores neurales y representan la población más agresiva dentro de la masa tumoral. Más recientemente, se ha analizado la implicación de IQGAP1 en la formación de podosomas e invadopodia, estructuras que favorecen la progresión del GBM (Rotoli et al., 2017). Cabe destacar que IQGAP1 no solo presenta funciones a nivel de citoplasma y membrana, sino que también ha sido localizado en el núcleo. Mediante microscopía confocal, se ha descrito que IQGAP1 es capaz de translocarse al núcleo, donde se acumula durante las fases G1/S del ciclo celular, siendo capaz de interactuar con factores de replicación como PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) (Johnson et al., 2011).

Recientemente, se ha descrito que IQGAP1 es capaz de interactuar directamente con YAP y modular su actividad (Sayedyahosseini et al., 2016). La eliminación de IQGAP1 incrementa significativamente la formación de complejos YAP-TEAD nucleares. Se propone que IQGAP1 pudiera ser un regulador de la vía Hippo, secuestrando a YAP en el citoplasma o compitiendo con TEAD por formar complejo con YAP a nivel nuclear (**Figura I14**).

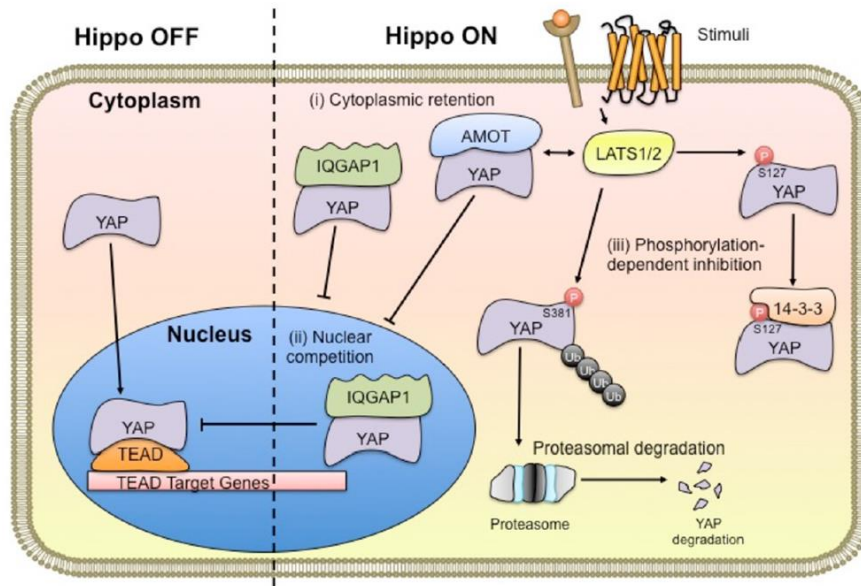


Figura I14 | **Modelo de IQGAP1 en la regulación de la actividad nuclear de YAP.** IQGAP1 sería capaz de secuestrar a YAP en el citoplasma y de competir con TEAD por formar complejo con YAP a nivel nuclear. Adaptado de (Sayedyahosseini et al., 2016).



## OBJETIVOS

Considerando los datos previos que demuestran que WIP posee una función protumoral en GB y supresora de tumores en linfomas-ALK+, marcamos como objetivos globales de este trabajo analizar qué elementos se asocian de modo diferencial a WIP en células de cada tipo tumoral con objeto de identificar candidatos que nos permitan explicar la función protumoral de WIP descrita en GB, así como identificar y estudiar qué genes se encuentran bajo el control de WIP y determinan dicha función.

Para cumplir nuestro propósito, planteamos dos análisis complementarios, a nivel proteómico y a nivel transcriptómico:

- I. Estudiar el proteoma asociado a WIP en líneas celulares de GB y de linfoma-ALK+.
  1. Caracterizar el proteoma asociado a WIP en células de GB y en células de linfoma-ALK+.
  2. Identificar candidatos responsables de la función protumoral de WIP mediante proteómica diferencial.
  3. Analizar la implicación de uno de los candidatos seleccionados, IQGAP1, en la capacidad protumoral de células de GB.
- II. Estudiar el transcriptoma asociado a la función protumoral de WIP en células de GB.
  1. Identificar qué genes están bajo el control de WIP a través de la vía protumoral WIP-YAP/TAZ.
  2. Realizar un análisis funcional de los genes afectados por WIP-YAP/TAZ para definir las principales vías y procesos alterados.

---

# MATERIALES Y MÉTODOS

# 1. CULTIVOS CELULARES

## 1.1. Líneas celulares

Las líneas celulares comerciales humanas utilizadas en este estudio se describen en la **Tabla M1**. En ella se detalla el origen del tejido celular, su procedencia, el tipo de cultivo al que se sometieron y el medio de cultivo correspondiente.

Tabla M1 | Líneas celulares.

Línea Celular	Origen	Procedencia	Tipo de cultivo	Medio de cultivo
<b>U-87 MG</b>	Glioblastoma humano	HTB-14 (ATCC)	Adherencia	DMEM 10% FBS
<b>U-373 MG</b>		HTB-17 (ATCC)	<i>Stem</i>	CSC B27 sin vit A
<b>JB6</b>	Linfoma anaplásico de células grandes (ALCL)-ALK+ humano	Laboratorio Dr. R. Chiarle	Suspensión	RPMI 10% FBS
<b>Karpas-299</b>			<i>Stem</i>	CSC B27 sin vit A
<b>HEK293T</b>	Células epiteliales de riñón embrionario humano	CRL-1573 (ATCC)	Adherencia	DMEM 10% FBS

## 1.2. Medios de cultivo

Las células se crecieron en dos condiciones, en medio rico en FBS (*Fetal Bovine Serum*) o en medio definido (medio *stem*). En ambos casos se mantuvieron en condiciones constantes de 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, y 97% de humedad relativa.

- Las células de origen glioblastoma y la línea celular HEK293T se crecieron en adherencia en medio de cultivo denominado: DMEM (del inglés *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con 10% FBS.
- Las células de origen ALCL-ALK+ se crecieron en suspensión en medio de cultivo denominado: RPMI (del inglés *Roswell Park Memorial Institute Medium*) suplementado con 10% FBS.

- Las líneas celulares tanto de origen glioblastoma como de origen ALCL-ALK+, se crecieron también en medio de cultivo definido denominado: CSC-B27 sin vitamina A (medio *stem*).

La composición de los medios de cultivo utilizados se describe a continuación:

### 1.2.1. DMEM 10% FBS

DMEM (Gibco) suplementado con 10% FBS (Sigma), 4 mM glutamina, 100 U/ml penicilina G y 0,1% mg/ml estreptomicina (PAN-Biotech). Previamente a su uso, el FBS fue inactivado mediante incubación a 56°C durante 30 minutos.

### 1.2.2. RPMI 10% FBS

RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% FBS (Sigma), 4 mM glutamina, 100 U/ml penicilina G y 0,1% mg/ml estreptomicina (PAN-Biotech). Previamente a su uso, el FBS fue inactivado mediante incubación a 56°C durante 30 minutos.

### 1.2.3. Medio *stem*: CSC-B27 sin vitamina A

Mezcla de DMEM:Ham's F12 (1:1) (para glioblastomas) o RPMI 1640 (para linfomas) suplementados con glutamax 1X (Gibco), albumax I 0,5% (Gibco), HEPES 5 mM (Invitrogen), glucosa 0,915% (Sigma), B27 sin vitamina A 1X (Gibco), EGF 20 ng/ml (Peprotech), FGF2 15 ng/ml (Peprotech), heparina 2 µg/ml (Sigma), 100 U/ml penicilina G y 0,1% mg/ml estreptomicina (PAN-Biotech). Se añadió un 20% de medio fresco 2 veces por semana. Con estas condiciones de cultivo se favorece la proliferación de las células de glioblastoma como esferas de células desdiferenciadas. Se comparó la misma condición en las células de linfoma.

## 1.3. Subcultivo y congelación de líneas celulares

Los subcultivos de las distintas líneas celulares se realizaron cuando presentaban una confluencia del 80-85%. Para ello, primero se hizo un lavado de las células con PBS (*Phosphate Buffer Saline*) y se incubaron con una mezcla de 0,25% de Tripsina (BS Difco™)-0,02% EDTA (Calbiochem®) durante 5 minutos a 37°C hasta que se desprendieron. Se resuspendieron en medio DMEM o RPMI (en función del tipo celular)

10% FBS y se centrifugaron a 2.000 xg durante 5 minutos. La frecuencia de subcultivo fue de 3 veces por semana en todos los casos, mientras que la dilución del subcultivo dependió del tipo de línea celular: ratio de 1:3 a 1:5 en líneas celulares de glioblastoma; ratio de 1:8 a 1:10 en líneas celulares de linfoma.

Para el almacenamiento por congelación de las líneas celulares, éstas se resuspendieron en medio de congelación (90% FBS y 10% DMSO) en criotubos, los cuales se enfriaron progresivamente en una cubeta de congelación denominada Mr. Frosty™ (NALGENE) a -80°C. Posteriormente, los criotubos se almacenaron en un tanque de nitrógeno líquido.

La descongelación de las líneas celulares se realizó rápidamente en un baño a 37°C. El exceso de DMSO se eliminó diluyendo las células en medio DMEM o RPMI (en función del tipo celular) 10% FBS y centrifugando a 2.000 xg durante 5 minutos.

La manipulación de los cultivos celulares se realizó de rutina en cabina de clase II en nivel de bioseguridad 2.

## **1.4. Determinación de la presencia de micoplasmas en los cultivos celulares**

La determinación de la presencia de micoplasmas se realizó de forma rutinaria en todas las líneas celulares cada dos meses. Tras 48 horas del último pase celular, se tomaron 500 µl del sobrenadante del cultivo de cada línea y se mantuvo a 4°C hasta su análisis.

La detección de micoplasmas se llevó a cabo mediante un ensayo colorimétrico utilizando el kit "*PlasmoTest™ Mycoplasma Detection Kit*" (Invivogen), basado en la capacidad de reconocer micoplasmas de "TOLL-LIKE-RECEPTOR 2" y de inducir la activación de NF-kB y otros factores de transcripción. En presencia de micoplasmas, el TLR2 expresado en la superficie de las células HEK-blue activa NF-kB y otros factores de transcripción que, a su vez, inducen la secreción de fosfatasa alcalina, una proteína fácilmente detectable por la coloración azul del medio.

Este análisis fue realizado de forma rutinaria por el servicio de Cultivo, Lavado y Esterilización del CBMSO.

### 1.4.1. Eliminación de micoplasmas

Para eliminar la presencia de micoplasmas, se aplicó un tratamiento terapéutico con Plasmocin (Invivogen) 25 µg/ml durante dos semanas, reemplazando el medio de cultivo cada 3-4 días. Tras el tratamiento, se mantuvo la línea celular al menos una semana con medio de cultivo sin Plasmocin para proceder a realizar la prueba de detección de micoplasmas.

## 2. PLÁSMIDOS

Los plásmidos utilizados en el estudio se recogen en la **Tabla M2**. El material genético fue crecido en la bacteria *Escherichia coli* (cepa DH5α) en medio LB con el antibiótico de resistencia correspondiente, siendo en todos los casos ampicilina, a 37°C y en agitación. A partir de estos cultivos, los plásmidos se purificaron mediante el kit de purificación *PureLink HiPure Plasmid Filter DNA* (Invitrogen). Se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Scientific) para cuantificar la concentración y pureza del DNA.

Tabla M2 | Listado de plásmidos utilizados.

Nombre	Nombre Completo	Contenido	Procedencia
<b>shControl</b>	pLKO.1 scramble	shRNA con secuencia irrelevante sin presencia en eucariotas	Addgene (1864)
<b>GFP</b>	pLNT/sffv-eGFP	eGFP	Cedido por Dr. G. Jones
<b>WIP-GFP</b>	pLNT/sffv-WIP-eGFP	WIP humano fusión eGFP	Cedido por Dr. G. Jones
<b>shWIP</b>	shRNA WIPF1, TRCN0000029825	shRNA contra WIP humano	MISSION© shRNA, Sigma
<b>shAKT2</b>	shRNA AKT2, TRCN000005260	shRNA contra AKT2 de ratón, también reconoce el humano	MISSION© shRNA, Sigma
<b>shYAP</b>	pLKO.1 shRNA YAP1	shRNA contra YAP1 humano	Addgene (42540)

<b>shTAZ</b>	shRNA WWTR1, TRCN0000370007	shRNA contra TAZ humano	MISSION© shRNA, Sigma
<b>YAP</b>	pBabe YAP WT	YAP WT humano	Cedido por Dr. K.L. Guan
<b>YAP S5A</b>	pBabe YAP S5A	YAP mutante S5A humano	Cedido por Dr. K.L. Guan
<b>shIQGAP1-5</b>	shRNA IQGAP1, TRCN0000047485	shRNA contra IQGAP1 humano	MISSION© shRNA, Sigma
<b>shIQGAP1-7</b>	shRNA IQGAP1, TRCN0000047487	shRNA contra IQGAP1 humano	MISSION© shRNA, Sigma
<b>shIQGAP1-28</b>	shRNA IQGAP1, TRCN0000298928	shRNA contra IQGAP1 humano	MISSION© shRNA, Sigma
<b>shIQGAP1-30</b>	shRNA IQGAP1, TRCN0000298930	shRNA contra IQGAP1 humano	MISSION© shRNA, Sigma
<b>shIQGAP1-31 (shIQGAP1)</b>	shRNA IQGAP1, TRCN0000298931	shRNA contra IQGAP1 humano	MISSION© shRNA, Sigma
<b>IQGAP1-V5</b>	IQGAP1 pLX307	IQGAP1 humano con proteína <i>tag</i> V5	Addgene (98346)

### 3. GENERACIÓN DE VECTORES LENTIVIRALES

Para el empaquetamiento de los vectores lentivirales se utilizó la línea celular HEK293T. Las células se crecieron en placas p100 hasta alcanzar una confluencia aproximada del 80%, momento en el que se realizó una transfección conjunta de tres plásmidos imprescindibles para la constitución de la partícula viral:

- **pMD2.G:** plásmido de pseudotipado con el gen codificante de la proteína G procedente del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) de la cubierta del lentivirus (Addgene - 12259).
- **pCMVR8.74:** plásmido que codifica las proteínas estructurales del lentivirus, a excepción de la envuelta (cedido por el Dr. D. Trono).
- Plásmido del lentivector de interés a empaquetar (**Tabla M2**).



Para la transfección de los plásmidos, por cada placa p100, se prepararon dos soluciones (**Figura M1**):

- **Solución A:** 750  $\mu$ l de Opti-MEM<sup>®</sup> (Gibco), 2  $\mu$ g del plásmido pMD2.G, 5  $\mu$ g del plásmido pCMVR8.74 y 5  $\mu$ g del plásmido que codifica nuestra secuencia de interés.
- **Solución B:** 750  $\mu$ l de Opti-MEM<sup>®</sup> y 36  $\mu$ l de lipotransfectina (Solmeclas).

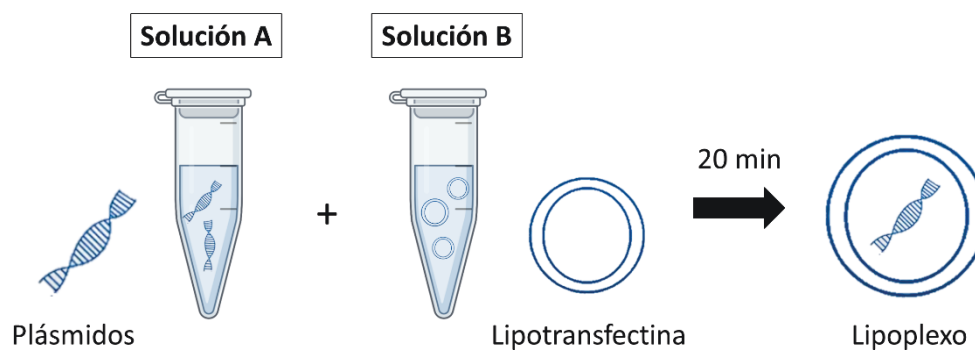


Figura M1 | Procedimiento para la formación de los lipoplexos.

Se mezclaron ambas soluciones y se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente (RT, del inglés *Room Temperature*) para permitir la formación de los lipoplexos. Durante ese tiempo, se lavaron las células con PBS 1X y se les añadieron 3 ml de medio Opti-MEM<sup>®</sup> atemperado. A continuación, se añadió la mezcla de las soluciones A y B a las células goteando suavemente y se incubaron 6 horas a 37°C. Pasado ese tiempo, se cambió el medio de la placa por 7 ml de DMEM 10% FBS y se dejaron incubando 24 horas en el incubador a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, se sustituyó el medio de cultivo por 5,5 ml de medio fresco donde se recogerán los vectores lentivirales, siendo DMEM 10% ó 0% FBS para células cultivadas en presencia o ausencia de suero respectivamente. Veinticuatro horas más tarde, se recogió el medio con las partículas lentivirales y se eliminaron los restos celulares con un filtro de 0,45  $\mu$ m de poro *Low Binding Protein*. Se hicieron alícuotas en criotubos y se preservaron las partículas virales a -80°C hasta su uso.

## 4. TRANSDUCCIÓN DE CÉLULAS

Para la realización de los experimentos de transducción con vectores virales, se consideró como tiempo inicial o tiempo cero el momento en que realizamos la adición del sobrenadante viral. La transducción de las distintas líneas celulares se realizó añadiendo 60  $\mu\text{l}$  de partículas virales, previamente tituladas mediante microscopía de fluorescencia, por cada 100.000 células. Se incubó la transducción durante el tiempo correspondiente a cada experimento, siendo normalmente 48 horas. Pasado ese tiempo, las células se lavaron con PBS 1X y se trataron o almacenaron de distinta forma en función del tipo de experimento a realizar.

## 5. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS POR AZUL DE COOMASSIE

Para hacer una estimación del número de células iniciales y finales en los experimentos, se usó la tinción con azul de Coomassie. Se sembraron 100.000 células en 0,5 ml de medio DMEM 10% FBS por pocillo en placas de 24 pocillos. Una vez adheridas, las células se transdujeron con los vectores lentivirales, tomando este punto como tiempo cero. Transcurrido el tiempo correspondiente, las células fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4%. A continuación, se lavaron dos veces con PBS 1X y se incubaron con 200  $\mu\text{l}$  de solución azul de Coomassie R-250 (azul de Coomassie R-250 al 0,2% en 40% metanol/10% ácido acético) durante una hora a RT. Tras 3 lavados con agua, se añadieron 400  $\mu\text{l}$  de NaOH 0,1 N en 50% de metanol, dejando incubar durante 15 minutos. Finalmente, se paró la reacción añadiendo 400  $\mu\text{l}$  de ácido tricloroacético 10% y se tomaron 200  $\mu\text{l}$  de cada muestra en placa de 96 pocillos para cuantificar la absorbancia a 595 nm.

Esta medida nos da un número de células vivas/adheridas en cada pocillo y por tanto una estimación de la supervivencia celular que más tarde podemos confirmar con determinaciones específicas de muerte/apoptosis.

## 6. FORMACIÓN DE COLONIAS EN AGAR BLANDO

Para los ensayos de crecimiento independiente de anclaje en agar blando se plaquearon 5.000 células viables por cada placa p35. La capa base se hizo mezclando a partes iguales agar estéril 1% calentado a 42°C con medio DMEM completo 2X suplementado con 20% FBS, para obtener una dilución final de agar 0,5% en DMEM completo 1X 10% FBS. Para la capa superior, el agar se diluyó en agua miliQ estéril a 0,7% calentado a 42°C y se mezcló a partes iguales con DMEM completo 2X 20% FBS. La mezcla se dejó enfriar a 37°C y se añadieron inmediatamente las células, quedando a una dilución final de agar 0,35% en DMEM completo 1X 10% FBS con 5.000 células/ml, según se describe en el esquema de la **Figura M2**.

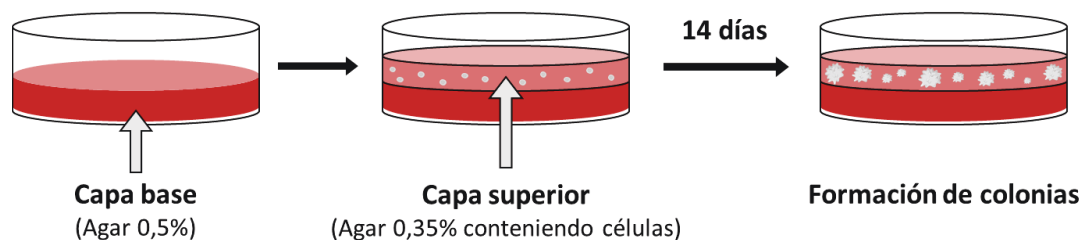


Figura M2 | Representación esquemática del procedimiento seguido para la realización del cultivo en agar blando.

Las células se cultivaron durante 14 días a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 97% de humedad relativa. Posteriormente, se fotografiaron las placas y se contabilizó el número de colonias/placa y el diámetro de las colonias formadas utilizando el software ImageJ.

## 7. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR ELECTROTRANSFERENCIA E INMUNODETECCIÓN (*WESTERN-BLOT*)

### 7.1. Extracción de proteínas totales y cuantificación. Preparación de la muestra para *western-blot*

Las células crecidas en adherencia se lavaron con PBS 1X y se congeló rápidamente la placa en nieve carbónica para ser almacenadas a -80°C. La extracción de proteínas se

llevó a cabo raspando las células en presencia de buffer de lisis frío compuesto por: HEPES pH 7.4 20 mM, NaCl 100 mM, Tritón X-100 al 1%, NaF 100 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, EDTA 5 mM, ácido okadaico 1 μM (Calbiochem) y cóctel de inhibidores de proteasas (*Complete Protease Inhibitor Cocktail*, Roche). Las células crecidas en suspensión se lavaron con PBS 1X y se congelaron a -80°C. La extracción de las proteínas se llevó a cabo resuspendiendo las células en el buffer de lisis frío descrito previamente.

Los lisados se recogieron en un tubo eppendorf y se incubaron en hielo durante 15 minutos. A continuación, se centrifugaron durante 5 minutos a 16.100 xg a 4°C y se recogió el sobrenadante que contiene la fracción proteica soluble.

Para cuantificar la cantidad de proteínas se empleó el sistema *Dc protein assay* de BioRad, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las proteínas se desnaturalizaron en buffer de carga 5X (325 mM Tris-HCl pH 6.8, 25% glicerol, 0,5% azul de bromofenol, 0,5 M DTT y 10% de SDS) calentando las muestras a 85°C durante 10 minutos.

## 7.2. Procedimiento de análisis por *western-blot*

Las proteínas se cargaron en un gel de acrilamida/bisacrilamida 29:1 (Bio-Rad) al 6%, 8% o 10% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) para separarlas en función de su peso molecular. Para la electroforesis se utilizó un buffer de electroforesis compuesto por Tris 25 mM (Sigma), glicina 250 mM (Sigma) y 0,1% SDS, y se mantuvo un voltaje constante de 80V hasta que el frente de proteínas llegó a la parte del gel separador, momento en el que se aumentó el voltaje constante a 120V.

Posteriormente, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Biotech) en buffer de transferencia frío (Tris 25 mM, glicina 250 mM, 20% metanol) con un amperaje constante de 0,3 A durante 2 horas en frío. Se utilizó el sistema *MiniPROTEAN* (Bio-Rad) para la electroforesis y la transferencia de las proteínas.

Para comprobar la correcta transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, esta se tiñó en una solución de rojo Ponceau (Ponceau 0.2% (Sigma), 3% ácido acético glacial (Panreac) en agua). Posteriormente, las membranas se lavaron con PBS-T (PBS-Tween20 0,1%) en agitación. Se bloquearon las uniones inespecíficas de los

anticuerpos a la membrana con leche desnatada al 10% en PBS-T durante una hora a RT en agitación.

A continuación, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios (**Tabla M3**) durante toda la noche (ON, del inglés *Over Night*) a 4°C en agitación.

Tabla M3 | **Listado de anticuerpo primarios.**

PM: Peso molecular; WB: *Western-blot*; IF: Inmunofluorescencia.

Anticuerpo	PM (kDa)	Especie	Dilución WB	Dilución IF	Casa Comercial
<b>β-Actina</b>	42	<i>Mouse</i>	1:4000		Sigma-Aldrich (A5441)
<b>GAPDH</b>	37	<i>Mouse</i>	1:1000		Santa Cruz Biotechnology (sc-47724)
<b>AKT2</b>	60	<i>Rabbit</i>	1:1000		Cell Signaling (3063)
<b>YAP/TAZ</b>	70/50	<i>Rabbit</i>	1:1000	1:400	Cell Signaling (8418)
<b>YAP</b>	70	<i>Rabbit</i>		1:100	Cell Signaling (4912S)
<b>N-WASP</b>	65	<i>Rabbit</i>	1:1000		Cell Signaling (4848)
<b>WASL (N-WASP)</b>	65	<i>Rabbit</i>	1:1000		Sigma-Aldrich (HPA005750)
<b>GFP</b>	27	<i>Mouse</i>	1:4000		Roche (11814460001)
<b>IQGAP1</b>	190	<i>Mouse</i>	1:1000	1:250	Santa Cruz Biotechnology (sc-374307)
<b>WIP1112 purificado</b>	55-60	<i>Rabbit</i>	1:600		Producido en el Servicio de proteínas del CNB
<b>WIPF1</b>	55	<i>Rabbit</i>	1:2000		Proteintech (no comercial)
<b>V5</b>	1,5	<i>Mouse</i>	1:5000		Invitrogen (R960-25)
<b>CDK2</b>	33	<i>Mouse</i>	1:1000		BD Transduction Laboratories (51-9001919)
<b>CDK4</b>	32	<i>Mouse</i>	1:1000		BD Transduction Laboratories (51-9001920)
<b>PCNA</b>	36	<i>Mouse</i>	1:1000		BD Transduction Laboratories (51-9002059)
<b>Vinculina</b>	120	<i>Mouse</i>	1:2000		Sigma-Aldrich (V9131)

Posteriormente, se lavaron las membranas y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente atendiendo a la especie del anticuerpo primario incubado

previamente. Los anticuerpos secundarios utilizados se encuentran conjugados con peroxidasa (*Goat Anti-Rabbit IgG*-HRP. Ref: 4030-05; *Goat Anti-Mouse IgG Human ads*-HRP. Ref: 1030-05. Southern Biotech) y se incubaron a una concentración 1:5000 durante 1 hora a RT en agitación. Todos los lavados se hicieron con PBS-T, la preparación de los anticuerpos primarios se realizó en una solución de PBS-T con 5% de BSA y la preparación de los anticuerpos secundarios se realizó en PBS-T.

La inmunoreactividad de las proteínas fue visualizada mediante un sistema de quimioluminiscencia (*Enhanced Chemiluminescence Detection system*, ECL, PerkinElmer Life Sciences) en el que se produce la oxidación del luminol en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, catalizada por la peroxidasa. Se incubaron las membranas durante 1 minuto a RT. Por último, las membranas se expusieron sobre una película fotográfica (*Curix RP2 Plus medical X-ray film*, Agfa HealthCare). Las medidas densitométricas se normalizaron con los valores obtenidos con un anticuerpo control que reconoce proteínas cuyos niveles se mantienen constantes en todas las muestras, corrigiendo así las posibles variaciones en la cantidad total de proteína cargada.

## 8. INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS

### 8.1. Condiciones de cultivo para inmunoprecipitación

Para los ensayos de inmunoprecipitación, se utilizaron la línea celular de glioblastoma U-87 MG y la línea celular linfoma JB6. En cada caso se siguieron diferentes estrategias de cultivo (**Figura M3**) para lograr detectar la proteína de interés en el precipitado:

- Cultivo de glioblastoma U-87 MG para inmunoprecipitación: se siguieron dos estrategias:
  - A) La primera de ellas consistió en cultivar las células U-87 MG en adherencia en medio con FBS, siendo transducidas durante 48 horas con el lentivirus WIP-GFP.
  - B) La segunda estrategia consistió en crecer las células U-87 MG sin transducir en suspensión en medio *stem* (CSC B27 sin vitamina A).

- Cultivo de linfoma JB6 para inmunoprecipitación: se siguieron también dos estrategias:

**A)** La primera de ellas consistió en crecer las células JB6 en medio con FBS y transducirlas durante 48 horas con el lentivirus WIP-GFP.

**B)** La segunda estrategia consistió en crecer las células JB6 en medio con FBS, pero sin transducir.

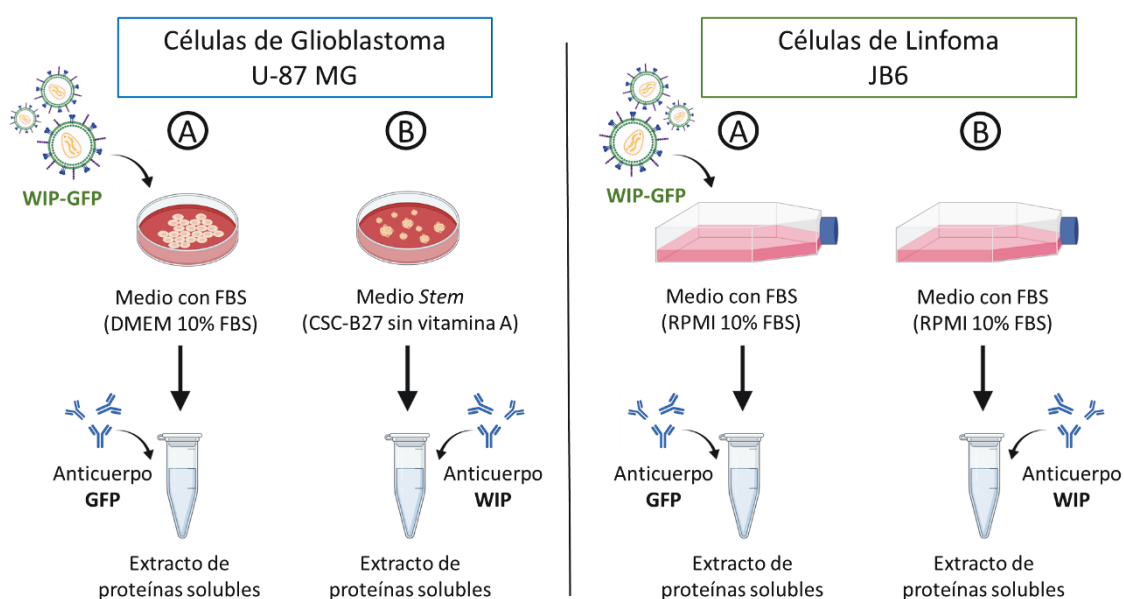


Figura M3 | Estrategias de cultivo seguidas para la realización de los experimentos de inmunoprecipitación.

## 8.2. Preparación de la muestra para inmunoprecipitación

Transcurridos los tiempos y condiciones indicadas anteriormente, se retiró el medio y se lavaron las células dos veces con PBS frío. A continuación, se lisaron las células con buffer de lisis frío (HEPES pH 7.4 20 mM, NaCl 100 mM, Tritón X-100 al 1%, NaF 100 mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM, EDTA 5 mM, ácido okadaico 1  $\mu\text{M}$  (Calbiochem) y cóctel de inhibidores de proteasas (*Complete Protease Inhibitor Cocktail*, Roche). La lisis se realizó en agitación en una noria a 4°C durante 20 minutos. Posteriormente, los lisados se centrifugaron durante 7 minutos a 16.100 xg a 4°C. A continuación, se recogió el sobrenadante y se cuantificó la cantidad de proteínas empleando el sistema *DC protein assay* de BioRad.

De este lisado soluble, se retiraron 60 µg de proteína para su posterior análisis por *western-blot*.

### 8.3. Procedimiento de inmunoprecipitación

Todos los experimentos de inmunoprecipitación se realizaron por duplicado, para ser analizados por *western-blot* y por proteómica. Para cada ensayo de inmunoprecipitación se utilizaron 500 µg de proteínas en un volumen total de 200 µl. En primer lugar, la fracción soluble del lisado total se mezcló con 2 µg de anticuerpo primario, siendo en el caso de las células transducidas con WIP-GFP, anticuerpo contra GFP, y en el caso de células sin transducir, anticuerpo contra WIP (WIP1112), y se incubó la mezcla durante 4 horas en agitación en una noria a 4°C. Una hora antes de terminar dicha incubación, se tomaron 50 µl de bolitas de agarosa conjugadas con proteína A/G (Santa Cruz Biotechnology, sc-2003) en un tubo eppendorf y se lavaron con 500 µl de buffer de lavado (su composición es la misma que la del buffer de lisis exceptuando la cantidad de Tritón X-100 que se reduce a 0,1%). Se realizaron tres lavados a 4°C durante 10 minutos, centrifugando cada vez 1 minuto a 1220 xg para recuperar las bolitas.

Una vez terminada la incubación del lisado proteico con el anticuerpo primario, se añadieron a la mezcla las bolitas A/G agarosa previamente lavadas y se incubó ON en agitación a 4°C. Al día siguiente, se centrifugó 1 minuto a 1220 xg 4°C y se retiró y guardó el sobrenadante, el cual contiene todas las proteínas que no han quedado unidas al complejo bolita A/G-Anticuerpo. Las bolitas A/G, las cuales poseen unido el anticuerpo primario junto a la proteína de interés, se lavaron dos veces con buffer de lavado durante 10 minutos en noria a 4°C. Tras cada lavado, se centrifugaron durante 1 minuto a 1220 xg 4°C para retirar el sobrenadante. En este punto, la muestra a analizar por proteómica se congeló a -80°C hasta su análisis (**Figura M4**).

En todos los experimentos de inmunoprecipitación, se realizó en paralelo un experimento control negativo en el que se utilizó un anticuerpo del mismo isotipo y especie que el anticuerpo primario utilizado en el experimento problema.



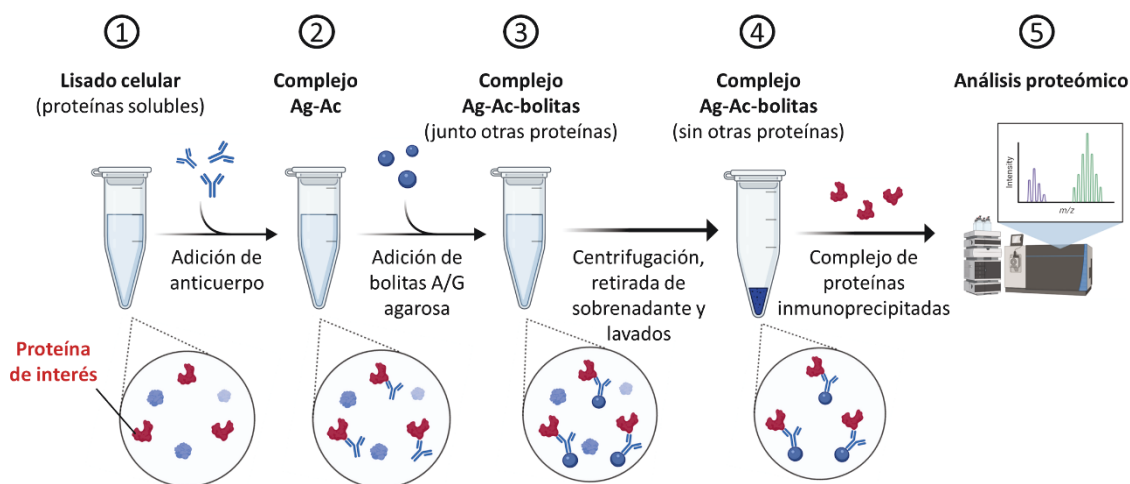


Figura M4 | Representación esquemática del procedimiento seguido para la inmunoprecipitación de las proteínas de interés utilizando bolitas de agarosa conjugadas con proteína A/G. Abreviaturas: Ag (antígeno), Ac (anticuerpo).

## 8.4. Análisis proteómico de los inmunoprecipitados

El análisis proteómico de las muestras fue realizado por el servicio de proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB).

Las muestras se corrieron en un gel concentrador y se digirieron automáticamente en un robot digestor (*Digestion 559*). Los péptidos tripticos obtenidos se analizaron mediante nanocromatografía líquida (modelo Eksigent 1D Plus) acoplada a espectrometría de masas tipo QTOF (modelo SCIEX 5600 TTOF) y la separación se realizó utilizando una columna de fase reversa C18, en un gradiente de 100 minutos. Los espectros MS/MS obtenidos se analizaron mediante el motor de búsqueda Mascot, frente a una base de datos obtenida a partir de UniprotKB formada por 143.666 entradas, desglosada en un 50% (71.833) de entradas *target* (reales) que corresponden a proteínas humanas conteniendo las diferentes isoformas de las proteínas, y un 50% de entradas *decoy* (*REVERSED*), obtenidas mediante reversión de las entradas *target* y que se emplean a efectos estadísticos.

## 8.5. Análisis de los resultados proteómicos mediante las herramientas bioinformáticas Venny 2.1 y STRING 11

Tras el análisis proteómico de las muestras, se obtuvo un fichero Excel donde se muestran las proteínas identificadas con, al menos, un péptido único y con un Mascot *score* igual o superior a 31. Este valor lo marca Mascot como umbral por encima del cual el péptido se considera correctamente identificado con un valor  $p < 0,05$ , dadas las condiciones en las que se realizó el experimento y los parámetros de búsqueda.

Para analizar el listado de proteínas obtenido, en primer lugar, se descartaron de los experimentos problema todas aquellas proteínas que tuviesen en común con su respectivo control negativo, ya que probablemente se trataría de uniones inespecíficas. Para ello, se utilizó la herramienta informática Venny 2.1 (Oliveros, 2007-2015), la cual permite comparar listados de proteínas de diferentes experimentos (experimento control y experimento problema) y obtener un diagrama de Venn que facilita la visualización de los resultados.

Una vez eliminadas las proteínas de los controles negativos, los resultados se analizaron mediante biología de sistemas utilizando la herramienta informática STRING 11 (Szklarczyk et al., 2019) con el fin de obtener la predicción de las funciones biológicas y el análisis de las interacciones proteicas. STRING es una base de datos que recoge las interacciones de proteínas conocidas y previstas, incluidas las asociaciones directas (físicas) e indirectas (funcionales) derivadas de la genómica, de experimentos de alto rendimiento, de co-expresión y de conocimientos previos publicados.

## 9. INMUNOCITOQUÍMICA

### 9.1. Tratamiento de cristales con Poly-L-Lisina

Se utilizaron cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro (Thermo Scientific) como soporte para realizar la inmunocitoquímica. Previo a su uso como soporte celular, los cubreobjetos se lavaron con ácido nítrico, agua y etanol 96% para finalmente ser autoclavados. Se trataron con Poli-L-Lisina (*Poly-L-lysine solution* 0.01%. Sigma

Ref: P4707) para favorecer la adherencia de las células. Para ello se diluyó la Poli-L-Lisina en agua Mili-Q estéril a una dilución 1:10. Se colocó una gota sobre cada cubreobjetos y se dejó incubando durante 2 horas a 37°C. A continuación, se retiró la Poli-L-Lisina y se lavaron los cubreobjetos con agua Mili-Q estéril. Se dejaron secar y se guardaron a 4°C en oscuridad hasta su uso.

## 9.2. Fijación de células adherentes

Las células se sembraron a baja densidad (20.000 células/cm<sup>2</sup>) sobre los cubreobjetos previamente tratados con Poli-L-Lisina.

Para fijar las células, se aspiró la mitad del medio de cultivo del pocillo y se sustituyó por un mismo volumen de PFA al 4%, dejando incubar durante 10 minutos. Pasado el tiempo, se aspiró todo el volumen del pocillo y se añadió PFA al 4% durante 10 minutos. Finalmente, se retiró el PFA, se lavó una vez con PBS y se guardaron los cubreobjetos en nevera a 4°C en PBS hasta el momento del marcaje por inmunofluorescencia.

## 9.3. Inmunofluorescencia

Las células fijadas se lavaron tres veces con PBS y se trataron con cloruro de amonio 50 mM pH 8 durante 10 minutos a RT para reducir la posible autofluorescencia. Posteriormente, se lavaron dos veces con PBS y se permeabilizó la membrana durante 15 minutos a RT con Tritón X-100 al 0,25% en PBS. Se bloquearon las posibles uniones inespecíficas con solución de bloqueo (0,1% de Tritón X-100 y 1% de FBS en PBS) durante 20 minutos a RT. A continuación, se incubó el anticuerpo primario correspondiente (**Tabla M3**) diluido en solución de bloqueo ON en cámara húmeda a 4°C. Transcurrido este tiempo, se realizaron cuatro lavados con PBS conteniendo 0,1% de Tritón X-100 para retirar el exceso de anticuerpo y se incubó el anticuerpo secundario Alexa Fluor® diluido 1:500 en solución de bloqueo durante 1 hora a RT en oscuridad.

En algunas ocasiones se incluyó un paso adicional para el marcaje de filamentos de actina (F-Actina) o de núcleos, detallados más adelante. Finalmente, se realizaron cuatro lavados con PBS y uno con agua Mili-Q para retirar las sales y se montaron los cristales

en un portaobjetos sobre una gota de Fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates, Inc). Una vez seco, se selló con laca de uñas y se guardó a 4°C en oscuridad.

En cada experimento se realizó un control sin la presencia de anticuerpo primario, permitiendo ver así la unión no específica del anticuerpo secundario a la muestra. También se realizó un control de autofluorescencia, el cual carece de anticuerpo primario y secundario.

### 9.3.1. Tinción de filamentos de actina

Para el marcaje del citoesqueleto de actina se utilizó Phalloidina-TRITC (Sigma, P-951). Este marcaje se hizo posterior a la incubación de los anticuerpos secundarios, a una dilución 1:200 en solución de bloqueo (PBS 1X + 0,1% Tritón X100 + 1% FBS), durante 30 minutos a RT en oscuridad. A continuación, se lavó con PBS y se procedió a la tinción de núcleos.

### 9.3.2. Tinción de núcleos

Como marcador nuclear fluorescente se utilizó TO-PRO<sup>®</sup>-3 (ThermoFisher, T-3605) a una dilución 1:2000 en PBS y se incubó durante 30 minutos a RT en oscuridad. Finalmente, se eliminó el exceso de TO-PRO<sup>®</sup>-3, se realizaron cuatro lavados con PBS y uno con agua Mili-Q para retirar las sales, antes del montaje con Fluoromount-G y el sellado.

## 9.4. Microscopía confocal

Para analizar las células y tomar las imágenes se utilizó un microscopio de barrido Láser confocal LSM510 acoplado a un microscopio vertical Axio Imager.Z1 M (Zeiss). Las imágenes se procesaron con el programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), tomando como referencia de señal cero el control de autofluorescencia (sin anticuerpos) y el control sin la presencia de anticuerpo primario (control de autofluorescencia más inespecificidad de los anticuerpos secundarios) correspondientes a cada experimento.

## 10. SECUENCIACIÓN DE RNA (RNA-seq)

### 10.1. Extracción de RNA: método del Trizol

Con el objetivo de analizar posibles cambios en el patrón de expresión génica al transducir las células con diferentes lentivirus de interferencia, se procedió a lisar y secuenciar el RNA.

Para la extracción del RNA se utilizó el método del Trizol. El Trizol® (Invitrogen) es una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que es capaz de mantener la integridad del RNA mientras lisa las células y disuelve los compuestos celulares permitiendo así la extracción de dicho ácido nucleico.

Una vez cultivadas y transducidas las células, se retiró el medio de cultivo y se lavaron una vez con PBS. A continuación, se añadió Trizol a la placa (0,5 ml/placa p60) y se rasparon y recogieron las células rápidamente en tubos eppendorf para congelarlas a -80°C hasta el momento de la extracción del RNA.

En el momento de la extracción, se descongelaron las células, se homogeneizaron y se dejaron incubando con el Trizol durante 5 minutos a RT. Pasado el tiempo, se añadió cloroformo (0,2 ml cloroformo/1 ml de Trizol) para la separación del homogenado en tres fases: acuosa (RNA), orgánica (restos celulares y DNA) y fenólica (restos de Trizol y cloroformo). Se recogió la fase acuosa y se añadió el mismo volumen de etanol 70%, para proceder a la purificación del RNA.

### 10.2. Purificación de RNA

Para purificar el RNA extraído se utilizó el kit *RNeasy Mini Kit* de Quiagen (Ref. 70146), siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, todas las muestras se recuperaron en un volumen de 50 µl de H<sub>2</sub>O libre de RNAsas. Antes de congelar las muestras a -80°C, se tomaron dos pequeñas alícuotas: una se utilizó para medir la concentración y pureza del RNA empleando el equipo NanoDrop™ One (Thermo Scientific), mientras que la otra alícuota se utilizó para analizar la integridad y calidad

del RNA en el servicio de Genómica y Secuenciación Masiva del CBMSO, con el equipo Bioanalizador 2100 (Agilent).

### 10.3. Secuenciación de RNA

La secuenciación de las muestras de RNA fue realizada por la unidad de genómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) utilizando el equipo Illumina HiSeq 2500.

Las muestras de RNA se prepararon a una cantidad de 200 ng en un volumen de 50 µl de H<sub>2</sub>O libre de RNAsas. Se analizaron triplicados para cada condición. Tras el análisis, se obtuvo un archivo de datos FASTQ demultiplexado para cada muestra que contiene las secuencias de las lecturas y sus correspondientes valores de calidad de secuenciación. Tras un primer procesado de datos por parte del servicio de genómica, obtuvimos un archivo Excel donde se refleja la expresión normalizada de cada gen en cada una de las condiciones experimentales.

## 11. CITOMETRÍA DE FLUJO

En cada uno de los experimentos analizados por citometría de flujo se adquirieron un total de 10.000 eventos por muestra en el citómetro FACSCanto A (Becton Dickinson). Dichos eventos fueron pre-seleccionados mediante una región en base a su tamaño y complejidad (parámetros FSC y SSC, del inglés *Forward Scatter* y *Side Scatter*) con el fin de excluir restos celulares u otras partículas contaminantes. Para el análisis de los datos se utilizó el software FlowJo X.

### 11.1. Análisis de ciclo celular con yoduro de propidio

Para el análisis de ciclo celular se utilizó yoduro de propidio, un colorante rojo fluorescente capaz de intercalarse entre las bases nitrogenadas del DNA y RNA, por lo que es necesario previamente eliminar las cadenas de RNA incubando la suspensión celular con RNAsa.

Transcurrido el tiempo determinado para cada ensayo, las células se recogieron por tripsinización, se centrifugaron 5 minutos a 2.000 xg y se lavaron dos veces con PBS frío. Posteriormente, se centrifugaron de nuevo para eliminar el PBS y se fijaron con un volumen de 0,5 ml de etanol 70% frío añadido gota a gota mientras se agita suavemente. Las muestras se mantuvieron un mínimo de 18 horas a -20°C antes de su análisis.

El día del análisis, se añadieron 0,5 ml de PBS a cada muestra para diluir el etanol e incrementar así la eficiencia de la centrifugación. Las muestras se centrifugaron a 1.830 xg durante 5 minutos para retirar el etanol. Se lavaron dos veces añadiendo 1 ml de PBS. Finalmente, las células se resuspendieron en 0,5 ml de tampón de ciclo, compuesto por yoduro de propidio (1  $\mu$ M) y RNAsa (10  $\mu$ M), y se dejaron incubando 30 minutos a RT en oscuridad hasta su posterior análisis en el citómetro de flujo. El yoduro de propidio fue excitado con el láser 488 nm y la fluorescencia se recogió con el detector FL2 (545 $\pm$ 42 nm).

Los resultados fueron analizados con el programa informático FlowJo X y se expresaron en base al contenido en DNA de las células como el porcentaje de éstas que se encuentra en una determinada fase del ciclo celular.

## **11.2. Análisis de viabilidad celular con yoduro de propidio**

La molécula de yoduro de propidio es incapaz de atravesar la membrana celular intacta; sin embargo, cuando las células se mueren, la integridad de la membrana falla y dicha molécula puede entrar y teñir los ácidos nucleicos formando un complejo fluorescente. Para determinar la viabilidad celular, las células se recogieron por tripsinización, se centrifugaron 5 minutos a 2.000 xg y se lavaron dos veces con PBS. Posteriormente, se resuspendieron en 0,5 ml de PBS con 1% de BSA y se añadió yoduro de propidio a una concentración final de 1  $\mu$ g/ml justo en el momento previo a su análisis en el citómetro de flujo.

## 12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa Graphpad Prism. Los valores promedios son los correspondientes a la media aritmética y las barras de error representan el error típico de la media. La comparación estadística del conjunto de datos se realizó usando la prueba t de *Student* en el caso de comparaciones entre dos muestras de datos o mediante un análisis de varianza (ANOVA) cuando se comparan al menos tres grupos independientes. Las diferencias se representan con su significancia correspondiente o valor de  $p$ , siendo  $*p < 0,05$  una diferencia significativa,  $**p < 0,005$  y  $***p < 0,001$  muy significativo. El valor  $p$  es la probabilidad de que la diferencia vista en una muestra ocurra de manera casual bajo la hipótesis nula.



## RESULTADOS

## A. ANÁLISIS PROTEÓMICO DIFERENCIAL

Para el examen del proteoma asociado a WIP que vamos a describir, nos hemos centrado en el análisis de líneas celulares pertenecientes a los dos tipos tumorales de estudio: GB (U-87 MG) y linfoma-ALK+ (JB6). Caracterizamos el crecimiento de las líneas de ambos tipos tumorales en dos condiciones de cultivo diferentes, medio rico en suero (FBS) y medio *stem* (medio definido), para posteriormente, determinar las estrategias a seguir en el aislamiento de WIP mediante inmunoprecipitación. Así, podremos analizar el grupo de proteínas que se asocian a WIP de manera específica en cada tipo tumoral.

### A.1. Análisis comparativo del crecimiento de glioblastoma y linfoma en medio con FBS y medio *stem*

En una primera aproximación, crecimos ambas líneas en dos condiciones de cultivo diferentes, medio rico en suero (que denominaremos a partir de ahora FBS) y medio *stem*, como se detalla en el capítulo de materiales y métodos (**Figura R1**). A partir de extractos celulares solubles obtenidos en estas dos condiciones, caracterizamos los niveles de las proteínas WIP, N-WASP, YAP y TAZ en líneas celulares de los dos tipos tumorales de estudio, usando la línea U-87 MG de GB y la línea JB6 de linfoma-ALK+.

El cultivo de las células de GB en medio con FBS permite su crecimiento en adherencia, mientras que el crecimiento en medio *stem* favorece su proliferación como esferas de células desdiferenciadas (**Figura R1A**). El análisis comparativo mediante *western-blot* (**Figura R1B**) mostró un incremento significativo de los niveles de WIP y N-WASP al crecer las células de GB en medio *stem* (**Figura R1C y R1D**). No se observaron cambios significativos en los niveles de los cofactores de transcripción YAP y TAZ.

En cuanto a las células de linfoma, su cultivo en medio con FBS permite su crecimiento como células en suspensión, mientras que su cultivo en medio *stem* no fue posible ya que las células no proliferaron. El análisis mediante *western-blot* de las células de linfoma (**Figura R1B**) mostró que, al ser cultivadas en medio con FBS, los niveles de expresión de TAZ son indetectables mediante esta técnica. Además, como ya es sabido, no expresan N-WASP. El análisis de los extractos de células de linfoma cultivadas en medio *stem* mostró una pérdida progresiva de todas las proteínas debido a que las

células no fueron capaces de proliferar en este medio de cultivo y, aparentemente, morían, aunque este dato no ha sido analizado (figura R1B).

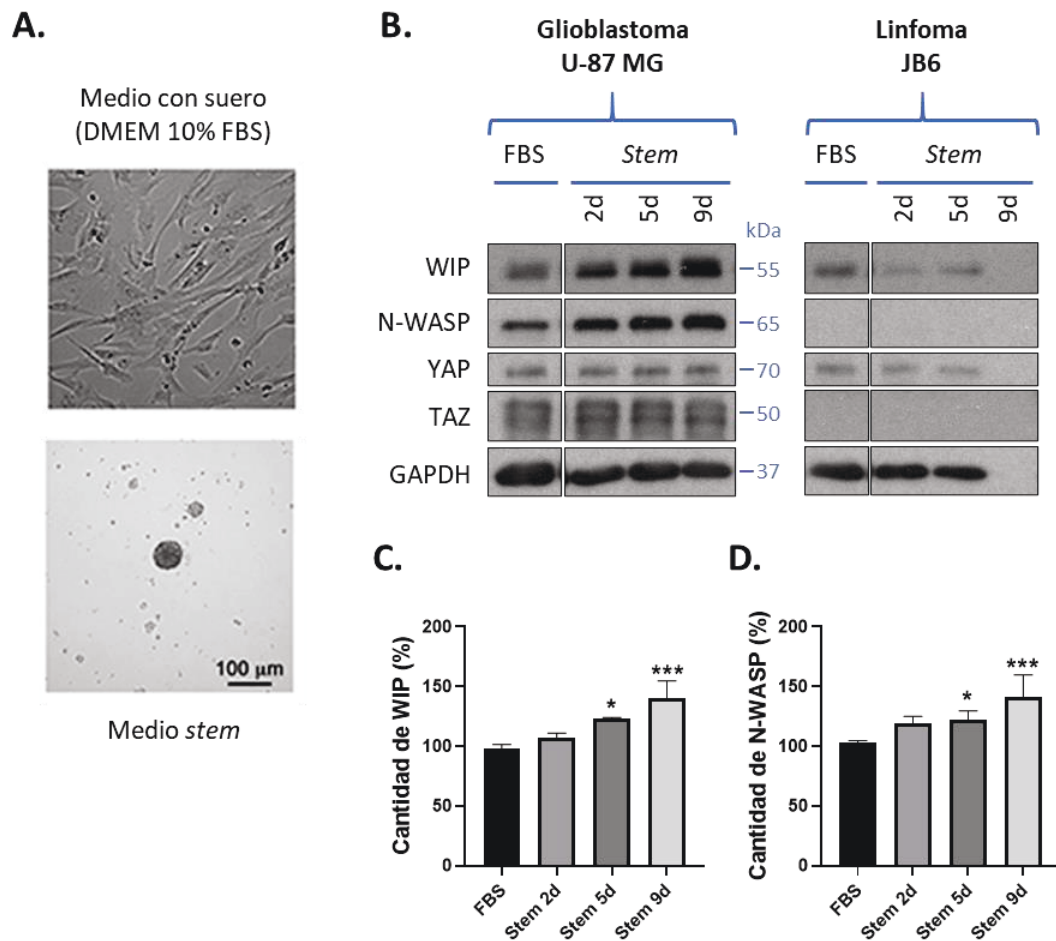


Figura R1 | **Caracterización de las células de GB U-87 MG y linfoma-ALK+ JB6 crecidas en medio con FBS y medio stem.** Las células de GB crecidas en medio *stem* presentan niveles más altos de WIP y N-WASP. Las células de linfoma no pueden ser crecidas en medio *stem*. (A) Imagen representativa del cultivo de células de GB U-87 MG en medio con FBS y medio *stem*. (B) Análisis comparativo por *western-blot* de los extractos solubles de células de GB y linfoma crecidas en medio con FBS y medio *stem* (durante 2, 5 y 9 días) con anticuerpos específicos contra WIP, N-WASP, YAP/TAZ y GAPDH como control de carga. (C) y (D) Cuantificación de la cantidad de WIP y N-WASP, respectivamente, en células de GB normalizada con respecto al cultivo en medio con FBS (n=4). Las barras de error indican el error típico (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,005$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ).

## A.2. Caracterización de vectores virales para el silenciamiento de AKT2-WIP-YAP/TAZ en células de glioblastoma

Nuestro grupo ha demostrado la existencia de una vía de señalización oncogénica AKT2-WIP-YAP/TAZ en las CSCs de GB (Escoll et al., 2017; Gargini et al., 2016). Para el análisis del efecto funcional de la reducción de la cantidad de estas proteínas, hemos usado la técnica de la interferencia de RNA a través de sistemas lentivirales que permiten una transducción cercana al 85-90% de las células. Así, usaremos shRNA de

interferencia para WIP (shWIP), AKT2 (shAKT2), YAP (shYAP) y TAZ (shTAZ), además de un shRNA control contra una secuencia inespecífica (shControl). Tras generar las partículas lentivirales, según se describe en el capítulo de materiales y métodos, transducimos la línea celular U-87 MG de GB.

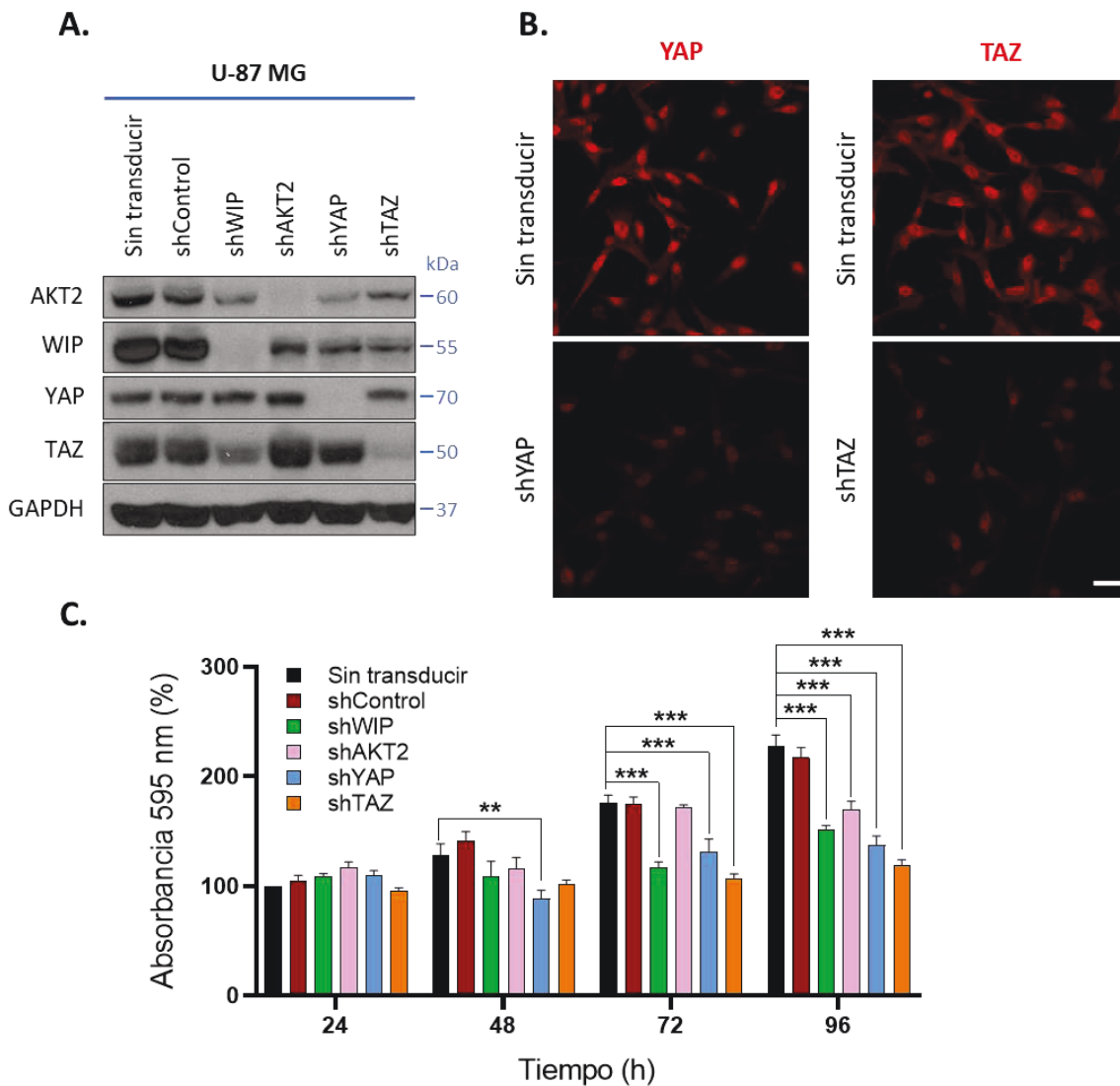


Figura R2 | Caracterización de los vectores lentivirales y análisis de proliferación en células de GB U-87 MG. (A) Comprobación mediante *western-blot* de la eficiencia de los vectores lentivirales shWIP, shAKT2, shYAP y shTAZ a las 48h post-transducción. (B) Comprobación mediante inmunofluorescencia de la actividad de los vectores lentivirales shYAP y shTAZ (barra escala 25 μm). (C) Análisis de proliferación mediante tinción con azul de Coomassie a las 24, 48, 72 y 96h post-transducción. Valores de absorbancia normalizados con respecto a la condición sin transducir del punto de las 24h, considerando este valor como 100% (n=4). Las barras de error indican el error típico (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,005$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ).

A partir de cultivos en paralelo, se comprobó mediante *western-blot* la eficiencia de los distintos shRNA de interferencia usados contra WIP, AKT2, YAP y TAZ a las 48 horas post-transducción. Todos ellos producen una clara bajada de la cantidad de la proteína

diana con respecto a la condición sin transducir, sin darse cambios apreciables en el shRNA control (**Figura R2A**). Se observó que la interferencia de WIP afecta los niveles de TAZ. Además, se comprobó mediante inmunofluorescencia el silenciamiento génico de los vectores lentivirales shYAP y shTAZ, observándose una disminución en la intensidad de fluorescencia (**Figura R2B**). Como tercera comprobación, confirmamos el efecto de los shRNA de interferencia en la proliferación de la línea celular de GB U-87 MG. A partir de cultivos en paralelo, se estimó el número de células iniciales y finales en cada condición usando la tinción con azul de Coomassie (**Figura R2C**). A las 48 horas post-transducción, se observó una tendencia a la baja en la capacidad proliferativa de las células interferidas con shWIP, shAKT2, shYAP y shTAZ, aunque solo la interferencia con shYAP mostró diferencias estadísticamente significativas. A las 72 horas post-transducción ya pudimos observar una disminución significativa en la capacidad proliferativa de aquellas células interferidas con shWIP y shTAZ, además de la vista anteriormente con shYAP. Finalmente, a las 96 horas post-transducción, todas las condiciones, excepto el control, mostraron una clara disminución en proliferación con respecto a la condición sin transducir.

Igualmente, comprobamos la funcionalidad de los vectores lentivirales y su efecto en proliferación en otra línea celular de GB, la U-373 MG (**Figura S1** de la sección de material suplementario). El análisis por *western-blot* mostró una clara bajada de la cantidad de cada proteína diana con respecto a la condición sin transducir, sin darse cambios en el control (**Figura S1A**). El efecto final en proliferación fue muy similar al visto en la línea U-87 MG. A las 96 horas post-transducción, todas las condiciones interferidas, excepto el control, mostraron una disminución significativa de la capacidad proliferativa en comparación a la condición sin transducir (**Figura S1B**).

Los resultados obtenidos en estos experimentos nos permiten confirmar nuestros datos previos de que WIP, AKT2, YAP y TAZ están implicados en la proliferación de las líneas tumorales U-87 MG y U-373 MG de GB.

### **A.3. Análisis proteómico de células de glioblastoma y linfoma**

Ya que WIP presenta una función protumoral en GB (Escoll et al., 2017; Gargini et al., 2016) y una función supresora de tumores en linfoma-ALK+ (Menotti et al., 2019),

decidimos inmunoprecipitar dicha proteína en líneas celulares de ambos tipos tumorales para identificar proteínas asociadas que sean posiblemente responsables de conferir a WIP funciones tumorales opuestas.

### A.3.1. Puesta a punto del sistema de inmunoprecipitación

Una vez caracterizados los niveles de WIP en las líneas celulares de ambos tipos tumorales y en las dos condiciones de cultivo ensayadas, procedimos a establecer qué estrategias nos permitían inmunoprecipitar WIP con mayores garantías de éxito, siendo estas aquellas en las que WIP presenta mayores niveles de proteína.

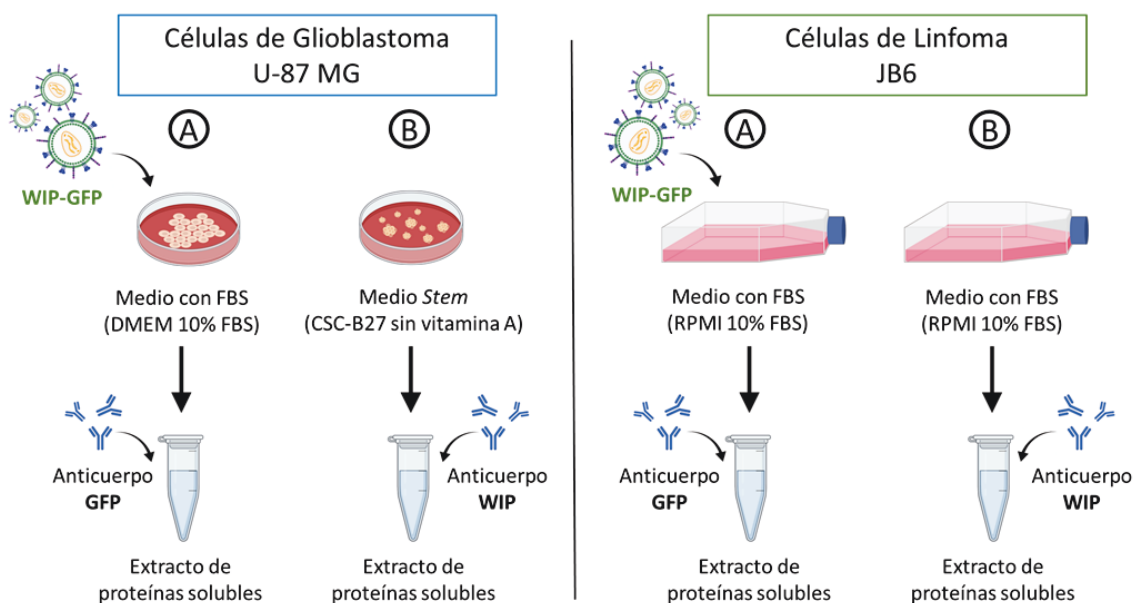


Figura R3 | Estrategias seguidas para la realización de los experimentos de inmunoprecipitación. Representación esquemática de las condiciones de cultivo y procedimientos de inmunoprecipitación seguidos para cada línea celular.

Establecimos dos estrategias de inmunoprecipitación a seguir en cada tipo tumoral (**Figura R3**). En el caso de las células de GB U-87 MG, la primera estrategia (**A**) consistió en crecer las células en medio con FBS e incrementar los niveles de WIP mediante transducción lentiviral con la construcción WIP-GFP para, posteriormente, inmunoprecipitar la proteína de fusión WIP-GFP utilizando un anticuerpo contra GFP. La segunda estrategia (**B**) se basó en crecer las células U-87 MG como células desdiferenciadas en medio *stem*, ya que, como hemos descrito anteriormente, en estas condiciones de cultivo se produce un incremento significativo de la cantidad de WIP. De esta forma, inmunoprecipitamos WIP endógeno utilizando un anticuerpo contra WIP.

En el caso de las células de linfoma-ALK+ JB6, la primera estrategia (**A**) consistió en crecer las células en su correspondiente medio con FBS e incrementar los niveles de WIP mediante transducción lentiviral con la construcción WIP-GFP para, posteriormente, inmunoprecipitar WIP de manera indirecta utilizando un anticuerpo contra GFP. Debido a que las células de linfoma no pudieron proliferar en medio *stem*, como segunda estrategia (**B**) tratamos de aislar WIP endógeno de las células de linfoma crecidas en su correspondiente medio con FBS utilizando un anticuerpo contra WIP.

Cabe reseñar que la unión de GFP a WIP en la construcción WIP-GFP no afecta a la funcionalidad de WIP dentro de las células de GB, al menos a nivel de proliferación (Escoll et al., 2017; Gargini et al., 2016).

### **A.3.2. Inmunoprecipitación en células de glioblastoma**

Siguiendo el planteamiento definido anteriormente como primera estrategia de inmunoprecipitación en células de GB U-87 MG, crecimos dichas células en medio con FBS y las transducimos con la construcción WIP-GFP para incrementar los niveles de WIP (**Figura R4A**). Mediante microscopía de fluorescencia, comprobamos la correcta transducción de las células con WIP-GFP en paralelo a un cultivo de células transducidas con GFP como control (**Figura R4B**). Tras ello, extrajimos las proteínas solubles del cultivo de células transducidas con WIP-GFP y procedimos a inmunoprecipitar WIP de manera indirecta utilizando un anticuerpo contra GFP; en paralelo, se realizó un control negativo utilizando un anticuerpo del mismo isotipo y especie. Una vez finalizado el protocolo de inmunoprecipitación, analizamos el extracto inicial de proteínas solubles, el precipitado y el sobrenadante del experimento problema (el experimento con anticuerpo GFP), así como el precipitado y el sobrenadante del control negativo, mediante *western-blot* (**Figura R4C**). Comprobamos la presencia de WIP-GFP (de manera indirecta marcando GFP) y de N-WASP como proteínas control, estando presentes en el extracto soluble, así como en el precipitado del experimento problema, pero no en el precipitado del control negativo. De esta forma, solo tras confirmar que el inmunoprecipitado de WIP contenía N-WASP, enviamos las muestras al servicio de proteómica del CNB para estudiar su proteoma.

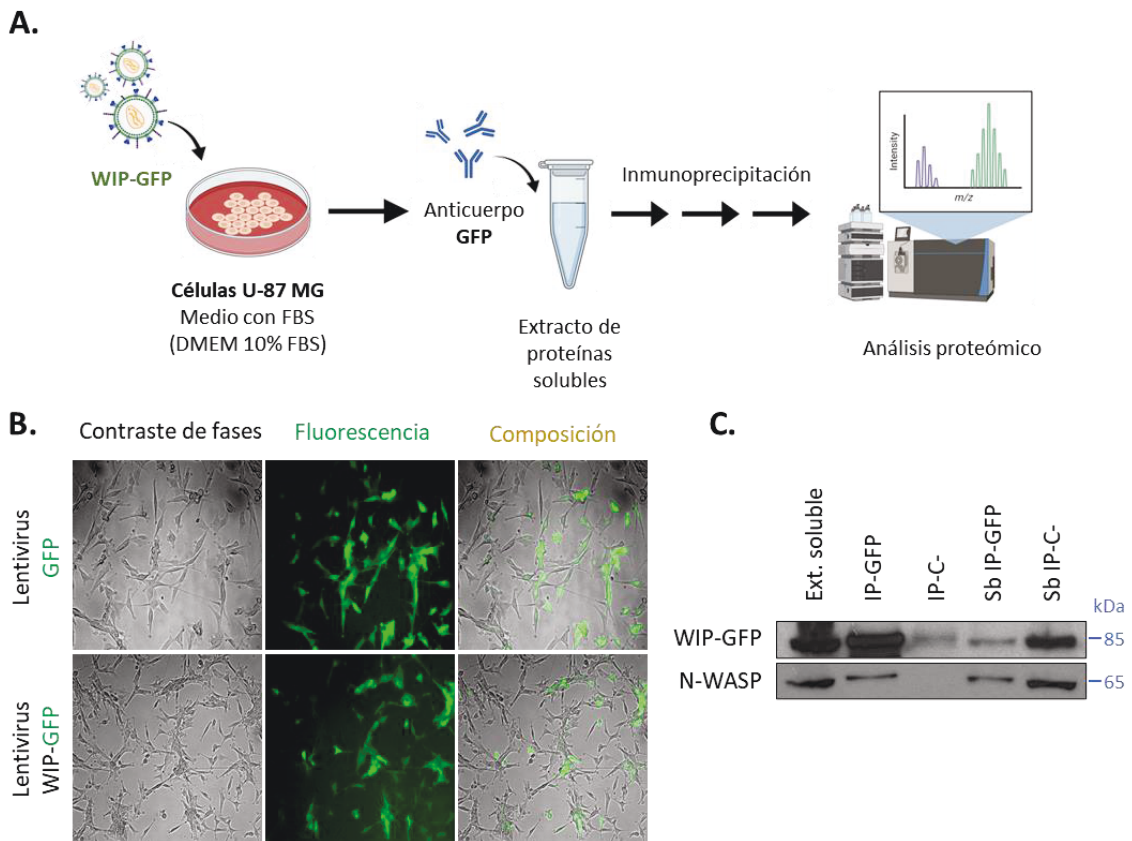


Figura R4 | **Inmunoprecipitación en células de GB U-87 MG crecidas en medio con FBS y transducidas con WIP-GFP.** (A) Representación esquemática del procedimiento experimental. (B) Comprobación de la transducción de WIP-GFP mediante microscopía de fluorescencia. (C) Análisis mediante *western-blot* de la presencia de WIP-GFP y de N-WASP en el inmunoprecipitado. Abreviaturas: Ext. (Extracto), IP (Inmunoprecipitado), C- (Control negativo), Sb (Sobrenadante).

Sobre los listados de proteínas obtenidos en los dos experimentos independientes analizados siguiendo esta estrategia, se descartaron todas aquellas proteínas que tenían en común con sus respectivos controles negativos, ya que probablemente se trata de uniones inespecíficas. Así, obtuvimos un listado de 124 y de 117 proteínas aisladas junto a WIP-GFP en cada uno de los dos experimentos respectivamente (**Figura R5**).



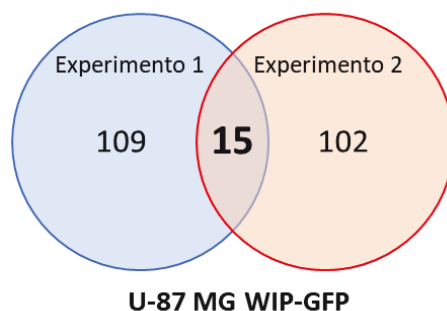


Figura R5 | **Proteínas inmunoprecipitadas en células de GB U-87 MG crecidas en medio con FBS y transducidas con WIP-GFP.** Análisis comparativo mediante Venny 2.1 de los resultados obtenidos al inmunoprecipitar WIP-GFP.

Cuando realizamos el análisis comparativo entre los listados de proteínas de los dos experimentos independientes mediante la herramienta informática Venny 2.1, obtuvimos un listado de 15 proteínas aisladas junto a WIP-GFP en células de GB, las cuales se detallan en la **Tabla R1**.

Por otro lado, siguiendo el planteamiento definido como segunda estrategia de inmunoprecipitación en células de GB, crecimos las células U-87 MG como células indiferenciadas en medio *stem* (**Figura R6A**). Debido a que los niveles de WIP se ven incrementados al crecer las células en estas condiciones, extrajimos las proteínas solubles y procedimos a inmunoprecipitar WIP endógeno utilizando un anticuerpo directamente contra WIP; en paralelo, se realizó un control negativo utilizando un anticuerpo del mismo isotipo y especie. Tras finalizar el procedimiento de inmunoprecipitación, analizamos mediante *western-blot* el extracto inicial de proteínas solubles, el precipitado y el sobrenadante del experimento problema (el experimento con anticuerpo WIP), así como el precipitado y el sobrenadante del control negativo (**Figura R6B**). Así, comprobamos que WIP y N-WASP están presentes en el extracto soluble inicial y en el precipitado del experimento problema, pero no en el precipitado del control negativo. Después de confirmar que la inmunoprecipitación de WIP se realizó correctamente, enviamos la muestra al servicio de proteómica del CNB para estudiar su proteoma.

Tabla R1 | **Proteínas inmunoprecipitadas en células de GB U-87 MG crecidas en medio con FBS y transducidas con WIP-GFP.** Listado de proteínas inmunoprecipitadas junto a WIP-GFP.

Protein	Function
<b>ADP/ATP translocase 2</b>	Catalyzes the exchange of cytoplasmic ADP with mitochondrial ATP across the mitochondrial inner membrane. As part of the mitotic spindle-associated MMXD complex it may play a role in chromosome segregation.
<b>ADP-ribosylation factor 4</b>	GTP-binding protein that functions as an allosteric activator of the cholera toxin catalytic subunit, an ADP-ribosyltransferase. Involved in protein trafficking; may modulate vesicle budding and uncoating within the Golgi apparatus.
<b>Collagen alpha-2(I) chain</b>	Type I collagen is a member of group I collagen (fibrillar forming collagen).
<b>F-box only protein 22</b>	Substrate-recognition component of the SCF (SKP1-CUL1-F-box protein)-type E3 ubiquitin ligase complex. Promotes the proteasome-dependent degradation of key sarcomeric proteins, such as alpha-actinin (ACTN2) and filamin-C (FLNC), essential for maintenance of normal contractile function.
<b>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K</b>	One of the major pre-mRNA-binding proteins. Binds tenaciously to poly(C) sequences. Likely to play a role in the nuclear metabolism of hnRNAs, particularly for pre-mRNAs that contain cytidine-rich sequences. Can also bind poly(C) single-stranded DNA. Plays an important role in p53/TP53 response to DNA damage, acting at the level of both transcription activation and repression.
<b>L-lactate dehydrogenase A chain</b>	This protein is involved in step 1 of the subpathway that synthesizes (S)-lactate from pyruvate.
<b>Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein</b>	Regulates actin polymerization by stimulating the actin-nucleating activity of the Arp2/3 complex. Involved in various processes, such as mitosis and cytokinesis, via its role in the regulation of actin polymerization. Together with CDC42, involved in the extension and maintenance of the formation of thin, actin-rich surface projections called filopodia. In addition to its role in the cytoplasm, also plays a role in the nucleus by regulating gene transcription, probably by promoting nuclear actin polymerization.
<b>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase</b>	PPIases accelerate the folding of proteins. It catalyzes the cis-trans isomerization of proline imidic peptide bonds in oligopeptides.
<b>Protein disulfide-isomerase</b>	Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase (PPIase) that binds to and isomerizes specific phosphorylated Ser/Thr-Pro (pSer/Thr-Pro) motifs. By inducing conformational changes in a subset of phosphorylated proteins, acts as a molecular switch in multiple cellular processes. Regulates mitosis presumably by interacting with NIMA and attenuating its mitosis-promoting activity. Can transactivate multiple oncogenes and induce centrosome amplification, chromosome instability and cell transformation.
<b>Pyruvate kinase PKM</b>	Glycolytic enzyme that catalyzes the transfer of a phosphoryl group from phosphoenolpyruvate (PEP) to ADP, generating ATP. The ratio between the highly active tetrameric form and nearly inactive dimeric form determines whether glucose carbons are channeled to biosynthetic processes or used for glycolytic ATP production. The transition between the 2 forms contributes to the control of glycolysis and is important for tumor cell proliferation and survival.
<b>Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1</b>	Plays a crucial role in regulating the dynamics and assembly of the actin cytoskeleton. Binds to activated CDC42 but does not stimulate its GTPase activity. It associates with calmodulin. Could serve as an assembly scaffold for the organization of a multimolecular complex that would interface incoming signals to the reorganization of the actin cytoskeleton at the plasma membrane. May promote neurite outgrowth. May play a possible role in cell cycle regulation by contributing to cell cycle progression after DNA replication arrest.
<b>Serpin H1</b>	Binds specifically to collagen. Could be involved as a chaperone in the biosynthetic pathway of collagen.
<b>Tubulin alpha-4A chain</b>	Tubulin is the major constituent of microtubules. It binds two moles of GTP, one at an exchangeable site on the beta chain and one at a non-exchangeable site on the alpha chain.
<b>Tubulin beta-3 chain</b>	Tubulin is the major constituent of microtubules. It binds two moles of GTP, one at an exchangeable site on the beta chain and one at a non-exchangeable site on the alpha chain. TUBB3 plays a critical role in proper axon guidance and maintenance.
<b>WAS/WASL-interacting protein family member 1 (Control interno)</b>	Plays a role in the reorganization of the actin cytoskeleton. Contributes with NCK1 and GRB2 in the recruitment and activation of WASL. May participate in regulating the subcellular localization of WASL, resulting in the disassembly of stress fibers in favor of filopodia formation. Plays a role in the formation of cell ruffles (By similarity). Plays an important role in the intracellular motility of vaccinia virus by functioning as an adapter for recruiting WASL to vaccinia virus.

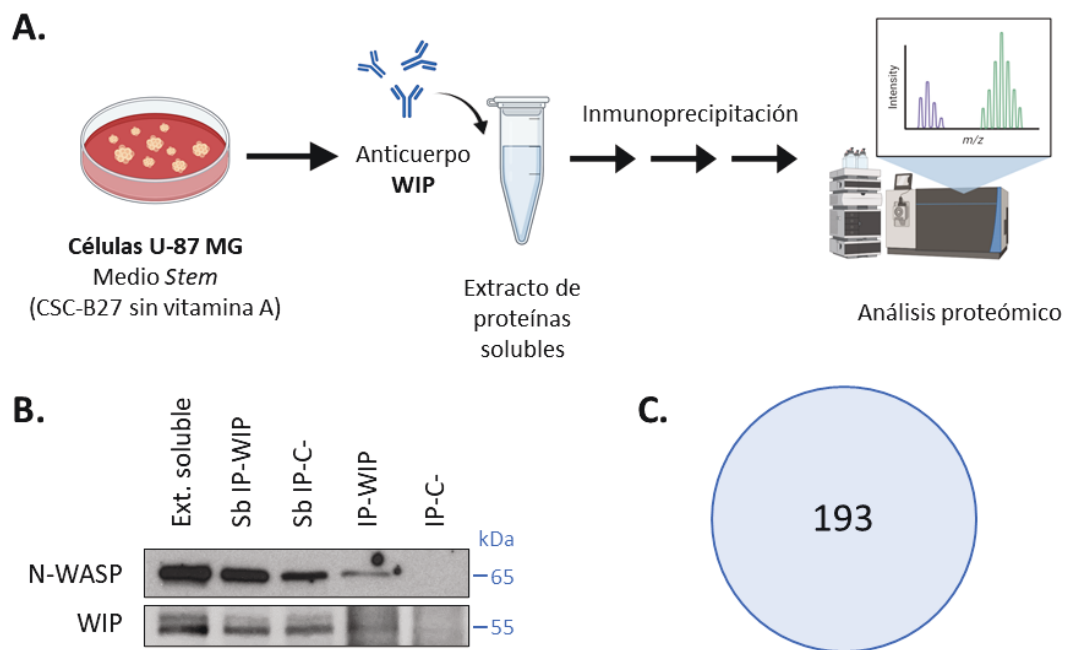


Figura R6 | **Inmunoprecipitación en células de GB U-87 MG crecidas en medio stem.** (A) Representación esquemática del procedimiento experimental. (B) Análisis mediante *western-blot* de la presencia de N-WASP y WIP en el inmunoprecipitado. (C) Proteínas inmunoprecipitadas junto a WIP endógeno. Listado completo de proteínas en **Tabla S1**. Abreviaturas: Ext. (Extracto), IP (Inmunoprecipitado), C- (Control negativo), Sb (Sobrenadante).

Una vez eliminadas del listado de proteínas aquellas presentes en el control negativo, obtuvimos un listado final de 193 proteínas aisladas junto a WIP en células de GB crecidas en medio *stem* (**Figura R6C**), las cuales se detallan en la **Tabla S1** de la sección de material suplementario.

### A.3.2.1 Análisis proteómico de los inmunoprecipitados de glioblastoma

Tras disponer de los listados de proteínas aisladas junto a WIP en cada una de las dos estrategias de inmunoprecipitación seguidas en células U-87 MG de GB, realizamos un análisis combinado de dichos listados mediante la herramienta informática Venny 2.1 (**Figura R7**). Así, obtuvimos un listado final de 8 proteínas inmunoprecipitadas junto a WIP en células de GB, las cuales se detallan en la **Tabla R2**.

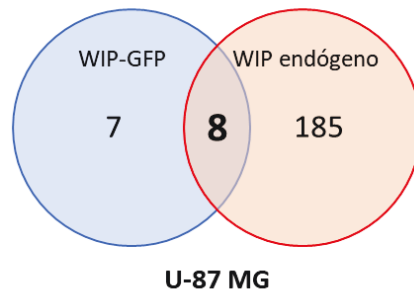


Figura R7 | **Análisis combinado de las proteínas aisladas en las dos estrategias de inmunoprecipitación seguidas en células de GB U-87 MG.** Análisis comparativo mediante Venny 2.1 de las proteínas inmunoprecipitadas junto a WIP-GFP y WIP endógeno al crecer las células de GB en medio con FBS y medio *stem*, respectivamente.

Entre las 8 proteínas están WIP y N-WASP, lo que aporta fiabilidad a los resultados. Además, se aislaron otras proteínas relacionadas con citoesqueleto (IQGAP1 y la isoforma de tubulina alfa 4A), proteínas con función enzimática (ADP/ATP translocasa 2 y la proteína disulfuro isomerasa), una chaperona (serpina H1) y una proteína implicada en ubiquitinación y degradación mediada por proteasoma (F-Box 22).

Utilizando la herramienta informática STRING 11, analizamos las evidencias de interacción descritas entre las 8 proteínas, obteniendo la red de interacciones mostrada en la **Figura R8**. Podemos ver que sólo N-WASP está descrito que interaccione directamente con WIP. Aunque de forma indirecta, hay evidencias de que la proteína IQGAP1 podría interactuar con WIP a través de N-WASP. En cuanto al resto de proteínas, no existen evidencias de interacción descritas con WIP ni con N-WASP.

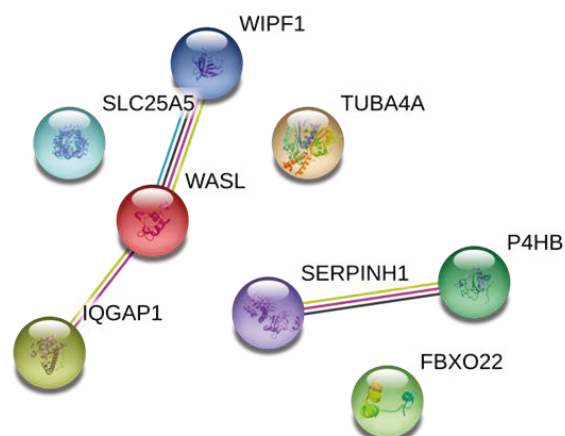


Figura R8 | **Interactoma descrito entre las proteínas aisladas por inmunoprecipitación junto a WIP en células de GB U-87 MG.** Interactoma obtenido mediante la herramienta STRING 11. Cada nodo representa una proteína, nombrada con el nombre de su gen codificante. Un mayor número de puentes entre nodos hace referencia a una mayor evidencia de interacción.

Tabla R2 | **Proteínas inmunoprecipitadas en células de GB U-87 MG.** Listado de proteínas generado por análisis combinado de las proteínas inmunoprecipitadas en las dos estrategias de cultivo seguidas.

Protein	Gen
ADP/ATP translocase 2	<i>SLC25A5</i>
F-box only protein 22	<i>FBXO22</i>
Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein	<i>WASL</i>
Protein disulfide-isomerase	<i>P4HB</i>
Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	<i>IQGAP1</i>
Serpin H1	<i>SERPINH1</i>
Tubulin alpha-4A chain	<i>TUBA4A</i>
WAS/WASL-interacting protein family member 1 (Control interno)	<i>WIPF1</i>

### A.3.3. Inmunoprecipitación en células de linfoma

Al igual que en el caso de células de GB, la primera estrategia de inmunoprecipitación definida para células JB6 de linfoma-ALK<sup>+</sup> consistió en crecer dichas células en medio con FBS e incrementar los niveles de WIP mediante transducción lentiviral de la construcción WIP-GFP (**Figura R9A**).

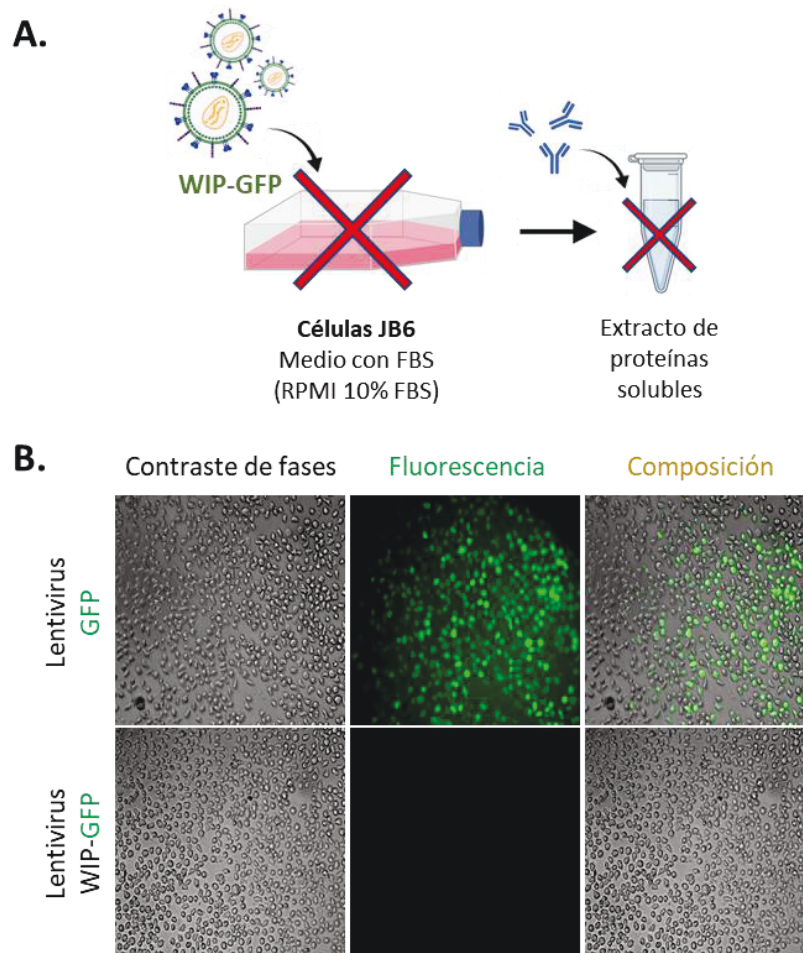


Figura R9 | **Las células de linfoma JB6 no admiten transducción de WIP-GFP.** (A) Representación esquemática del procedimiento experimental. (B) Comprobación de la transducción de GFP y WIP-GFP mediante microscopía de fluorescencia.

Sorprendentemente, observamos que las células JB6 de linfoma transducidas con WIP-GFP parecían no proliferar. Además, en paralelo a un cultivo de células transducidas con GFP, comprobamos mediante microscopía de fluorescencia que las células JB6 no admitieron la transducción de WIP-GFP pero sí la de GFP (**Figura R9B**). Dudando de si este hecho podría deberse a alguna particularidad de esta línea celular, repetimos el mismo procedimiento de transducción en una segunda línea celular de linfoma-ALK<sup>+</sup>, la de Karpas-299. En las células Karpas-299 sucedió exactamente lo mismo observado en

células JB6 (**Figura S2** de la sección de material suplementario). Por tanto, esta primera estrategia de inmunoprecipitación definida para células JB6 de linfoma no pudo llevarse a cabo.

Siguiendo el planteamiento definido anteriormente como segunda estrategia de inmunoprecipitación en células JB6 de linfoma, crecimos las células en medio con FBS e inmunoprecipitamos WIP endógeno utilizando un anticuerpo contra WIP (**Figura R10A**). Tras finalizar el procedimiento de inmunoprecipitación, comprobamos mediante *western-blot* la presencia de WIP en el extracto inicial de proteínas solubles y en el precipitado del experimento problema (inmunoprecipitación con anticuerpo WIP) pero no en el del control negativo (**Figura R10B**). Después de confirmar que la inmunoprecipitación de WIP se realizó correctamente, enviamos la muestra al servicio de proteómica del CNB para estudiar su proteoma.

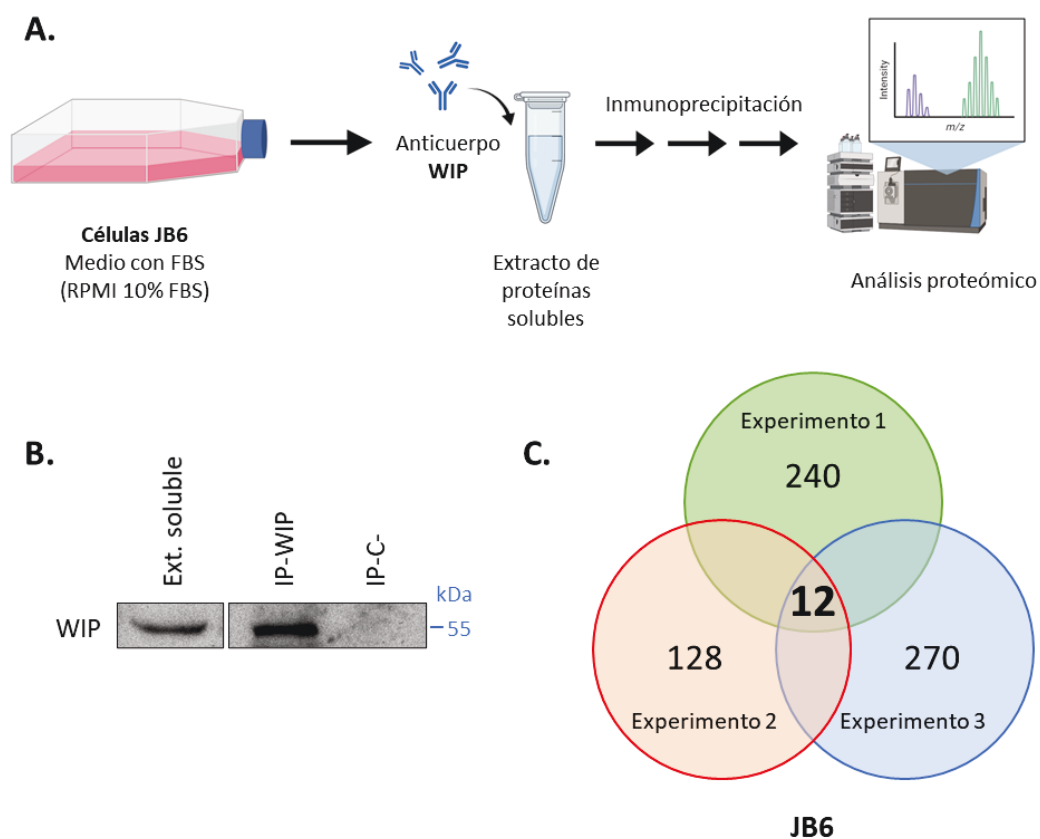


Figura R10 | **Inmunoprecipitación en células de linfoma JB6** crecidas en medio con FBS. (A) Representación esquemática del procedimiento experimental. (B) Análisis mediante *western-blot* de la presencia de WIP en el inmunoprecipitado. (C) Análisis comparativo mediante Venny 2.1 de los resultados obtenidos al inmunoprecipitar WIP endógeno. Abreviaturas: Ext. (Extracto), IP (Inmunoprecipitado), C- (Control negativo).

Tabla R3 | **Proteínas inmunoprecipitadas en células de linfoma JB6 crecidas en medio con FBS.**  
Listado de proteínas inmunoprecipitadas junto a WIP endógeno.

Protein	Gen	Function
<b>26S proteasome regulatory subunit 6B</b>	<i>PSMC4</i>	Component of the 26S proteasome, a multiprotein complex involved in the ATP-dependent degradation of ubiquitinated proteins. This complex plays a key role in the maintenance of protein homeostasis by removing misfolded or damaged proteins, which could impair cellular functions, and by removing proteins whose functions are no longer required. Therefore, the proteasome participates in numerous cellular processes, including cell cycle progression, apoptosis, or DNA damage repair.
<b>26S proteasome regulatory subunit 7</b>	<i>PSMC2</i>	Component of the 26S proteasome, a multiprotein complex involved in the ATP-dependent degradation of ubiquitinated proteins. This complex plays a key role in the maintenance of protein homeostasis by removing misfolded or damaged proteins, which could impair cellular functions, and by removing proteins whose functions are no longer required. Therefore, the proteasome participates in numerous cellular processes, including cell cycle progression, apoptosis, or DNA damage repair.
<b>ADP-sugar pyrophosphatase</b>	<i>NUDT5</i>	Enzyme that can either act as an ADP-sugar pyrophosphatase in absence of diphosphate or catalyze the synthesis of ATP in presence of diphosphate. In absence of diphosphate, hydrolyzes with similar activities various modified nucleoside diphosphates such as ADP-ribose, ADP-mannose, ADP-glucose, 8-oxo-GDP and 8-oxo-dGDP. In presence of diphosphate, mediates the synthesis of ATP in the nucleus by catalyzing the conversion of ADP-ribose to ATP and ribose 5-phosphate. Nuclear ATP generation is required for extensive chromatin remodeling events that are energy-consuming.
<b>DNA replication licensing factor MCM7</b>	<i>MCM7</i>	Acts as component of the MCM2-7 complex (MCM complex) which is the putative replicative helicase essential for 'once per cell cycle' DNA replication initiation and elongation in eukaryotic cells.
<b>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E</b>	<i>EIF3E</i>	Component of the eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF-3) complex, which is required for several steps in the initiation of protein synthesis. The eIF-3 complex specifically targets and initiates translation of a subset of mRNAs involved in cell proliferation, including cell cycling, differentiation and apoptosis, and uses different modes of RNA stem-loop binding to exert either translational activation or repression.
<b>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L</b>	<i>EIF3L</i>	Component of the eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF-3) complex, which is required for several steps in the initiation of protein synthesis. The eIF-3 complex specifically targets and initiates translation of a subset of mRNAs involved in cell proliferation, including cell cycling, differentiation and apoptosis, and uses different modes of RNA stem-loop binding to exert either translational activation or repression.
<b>Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1</b>	<i>NMT1</i>	Adds a myristoyl group to the N-terminal glycine residue of certain cellular and viral proteins.
<b>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U</b>	<i>HNRNPU</i>	DNA- and RNA-binding protein involved in several cellular processes such as nuclear chromatin organization, telomere-length regulation, transcription, mRNA alternative splicing and stability, Xist-mediated transcriptional silencing and mitotic cell progression.
<b>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2</b>	<i>ATP2A2</i>	This magnesium-dependent enzyme catalyzes the hydrolysis of ATP coupled with the translocation of calcium from the cytosol to the sarcoplasmic reticulum lumen.
<b>Serpin H1</b>	<i>SERPINH1</i>	Binds specifically to collagen. Could be involved as a chaperone in the biosynthetic pathway of collagen.
<b>Stimulator of interferon genes protein</b>	<i>TMEM173</i>	Facilitator of innate immune signaling that acts as a sensor of cytosolic DNA from bacteria and viruses and promotes the production of type I interferon.
<b>WAS/WASL-interacting protein family member 1 (Control interno)</b>	<i>WIPF1</i>	Plays a role in the reorganization of the actin cytoskeleton. Contributes with NCK1 and GRB2 in the recruitment and activation of WASL. May participate in regulating the subcellular localization of WASL, resulting in the disassembly of stress fibers in favor of filopodia formation. Plays a role in the formation of cell ruffles. Plays an important role in the intracellular motility of vaccinia virus by functioning as an adapter for recruiting WASL to vaccinia virus.



Los tres experimentos independientes de inmunoprecipitación realizados siguiendo esta estrategia fueron analizados por el servicio de proteómica del CNB, obteniendo un listado de 252, 140 y 282 proteínas respectivamente, tras eliminar aquellas proteínas presentes en sus respectivos controles negativos (**Figura R10C**).

Cuando realizamos un análisis comparativo entre los listados de proteínas de los tres experimentos mediante la herramienta informática Venny 2.1, obtuvimos un listado final de 12 proteínas aisladas en células de linfoma, las cuales se detallan en la **Tabla R3**.

Entre las 12 proteínas aisladas por inmunoprecipitación en células JB6 de linfoma está siempre WIP, como control interno. Además, los datos indican la presencia de proteínas reguladoras del proteasoma 26S (subunidades reguladoras del proteasoma 6B y 7), subunidades del complejo 3 de iniciación de la traducción en eucariotas (subunidades E y L), una ADP-pirofosfatasa de azúcares, la proteína 7 de mantenimiento de mini-cromosomas (MCM7), una N-miristoil-transferasa, una bomba de calcio del retículo endoplasmático (calcio ATPasa 2 del retículo sacoplásmico/endoplásmico), una chaperona (serpina H1), una ribonucleoproteína nuclear (ribonucleoproteína nuclear heterogénea U) y una proteína implicada en la defensa frente a patógenos (proteína estimuladora de los genes del interferón) (**Tabla R3**).

#### **A.3.3.1 Análisis proteómico de los inmunoprecipitados de linfoma**

Utilizando la herramienta informática STRING 11, analizamos las evidencias de interacción descritas entre las 12 proteínas aisladas en células JB6 de linfoma, obteniendo la red de interacciones mostrada en la **Figura R11**.

Podemos ver que entre algunas de las proteínas se describe una red de interacción, todas ellas implicadas de algún modo en procesos que regulan DNA y RNA. Sin embargo, no existen evidencias descritas de interacción de ninguna de las proteínas con WIP.

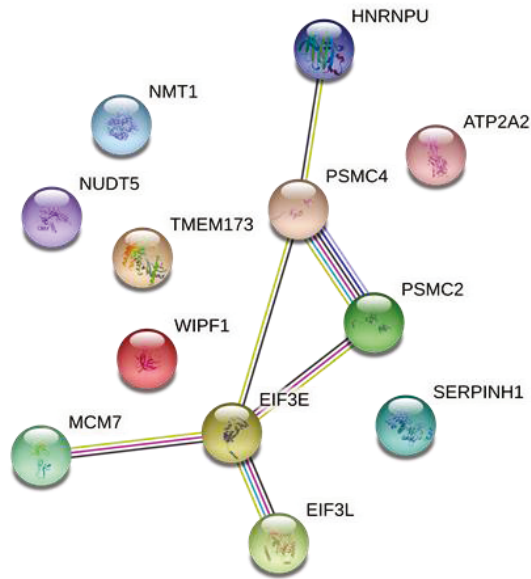


Figura R11 | **Interactoma descrito entre las proteínas aisladas por inmunoprecipitación junto a WIP en células de linfoma JB6.** Interactoma obtenido mediante la herramienta STRING 11. Cada nodo representa una proteína, nombrada con el nombre de su gen codificante. Un mayor número de puentes entre nodos hace referencia a una mayor evidencia de interacción.

## A.4. Análisis diferencial de las inmunoprecipitaciones en glioblastoma y linfoma: selección de candidato

Nuestros resultados obtenidos en los experimentos de inmunoprecipitación demuestran que el interactoma asociado a WIP es diferente en células de GB y en células de linfoma. Una vez obtenidos los listados finales de proteínas inmunoprecipitadas junto a WIP en las líneas celulares de cada tipo tumoral (**Tabla R2** para GB; **Tabla R3** para linfoma), realizamos un análisis diferencial utilizando la herramienta informática Venny 2.1 (**Figura R12A**). Nuestro objetivo fue identificar candidatos aislados de manera exclusiva en cada tipo tumoral que nos permitan entender las funciones opuestas descritas en WIP (**Figura R12B y R12C**).

Tras consultar la bibliografía, entre las 6 proteínas aisladas de manera exclusiva junto a WIP en células de GB, destacaron F-box 22 e IQGAP1 como potenciales candidatos para explicar el papel protumoral de WIP descrito en GB. Ambas proteínas aparecen en la literatura relacionadas con progresión tumoral (Johnson et al., 2009; Randle & Laman, 2016; Sun et al., 2018; White et al., 2009). F-box 22 puede formar parte de un complejo E3 ubiquitina ligasa responsable de la ubiquitinación de diferentes proteínas para su posterior degradación vía proteasoma (complejo SCF, compuesto por 3 elementos: SKP/Cullin/F-box) (Kipreos & Pagano, 2000; Randle & Laman, 2016). Por otro lado, se ha relacionado a IQGAP1 con tumores de GB, donde se propone que pudiese ser un marcador específico de células que se están amplificando (nestina<sup>+</sup>) dentro del tumor (Balenci et al., 2006). Cabe resaltar que también se ha descrito interacción directa entre IQGAP1 y YAP (Sayedyahosseini et al., 2016), una de las principales proteínas implicadas en la vía protumoral descrita por nuestro grupo.

En cuanto a las proteínas aisladas exclusivamente en células de linfoma, existen varios candidatos interesantes como proteínas reguladoras del proteasoma 26S.

En este punto, considerando los resultados obtenidos, la bibliografía descrita y destacando la existencia de evidencias, mostradas en los interactomas, de que podría interactuar con WIP a través de N-WASP (**Figura R12B**), decidimos focalizar nuestro trabajo en el estudio de IQGAP1 y su papel en el crecimiento del GB.

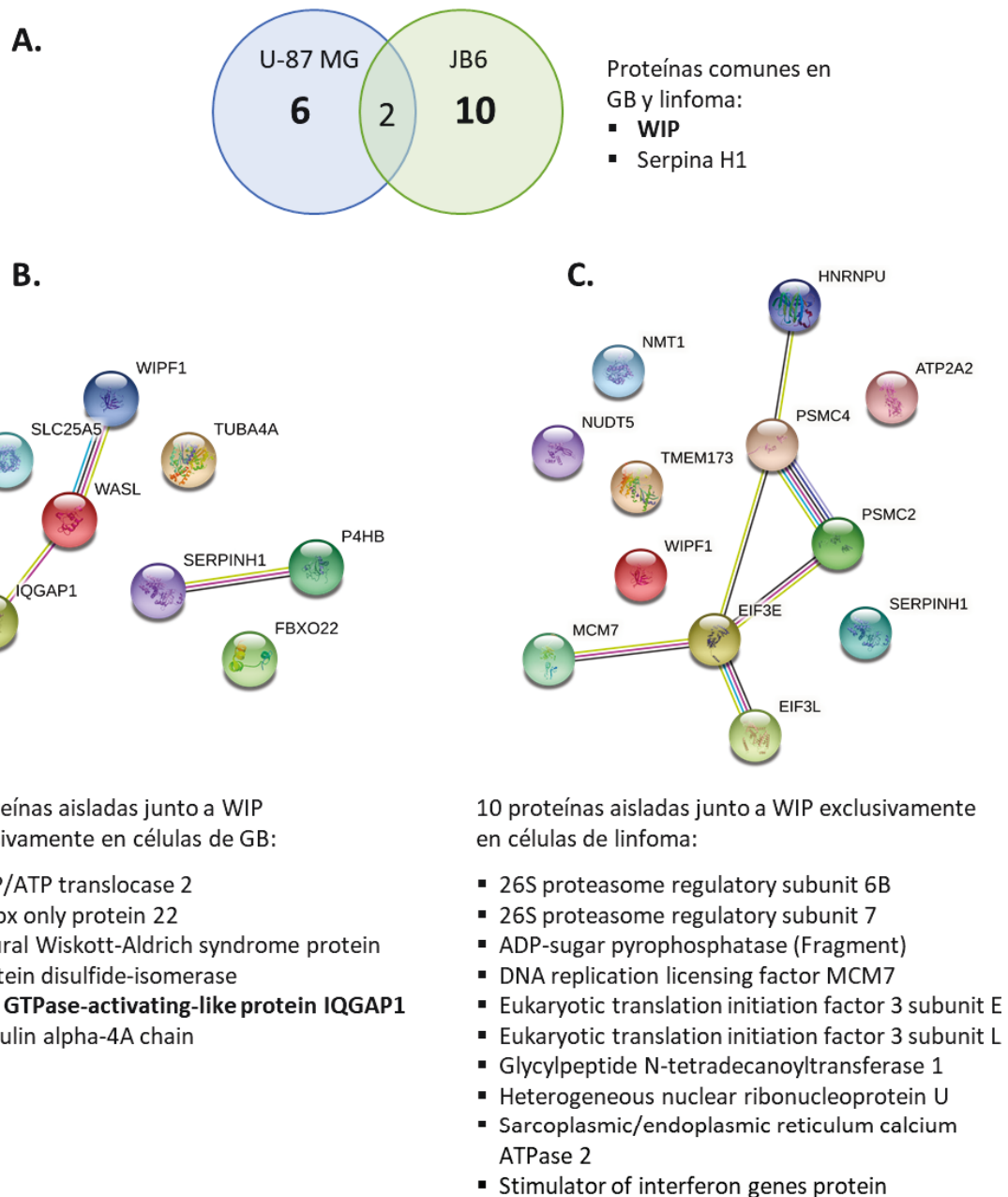


Figura R12 | **Análisis diferencial de las proteínas inmunoprecipitadas junto a WIP en células de GB U-87 MG y linfoma JB6.** (A) Análisis comparativo de las proteínas aisladas por inmunoprecipitación en células de GB y de linfoma utilizando la herramienta Venny 2.1. (B) (Superior) Interactoma descrito entre las 8 proteínas aisladas junto a WIP en células de GB. (Inferior) Listado de las 6 proteínas exclusivas aisladas en GB. (C) (Superior) Interactoma descrito entre las 12 proteínas aisladas junto a WIP en células de linfoma. (Inferior) Listado de las 10 proteínas exclusivas aisladas en células de linfoma. Interactomas descritos mediante la herramienta STRING 11. Cada nodo representa una proteína, nombrada con el nombre de su gen codificante. Un mayor número de puentes entre nodos hace referencia a una mayor evidencia de interacción.

## A.5. Análisis del papel de IQGAP1 en el crecimiento de glioblastomas

### A.5.1. Análisis de los niveles de IQGAP1 en glioblastoma

En primer lugar, caracterizamos los niveles de IQGAP1 en las células U-87 MG de GB. Crecimos las células en medio con FBS y en medio *stem*. El análisis comparativo mediante *western-blot* mostró un incremento significativo de los niveles de IQGAP1 al crecer las células de GB como células desdiferenciadas en medio *stem* (Figura R13A).

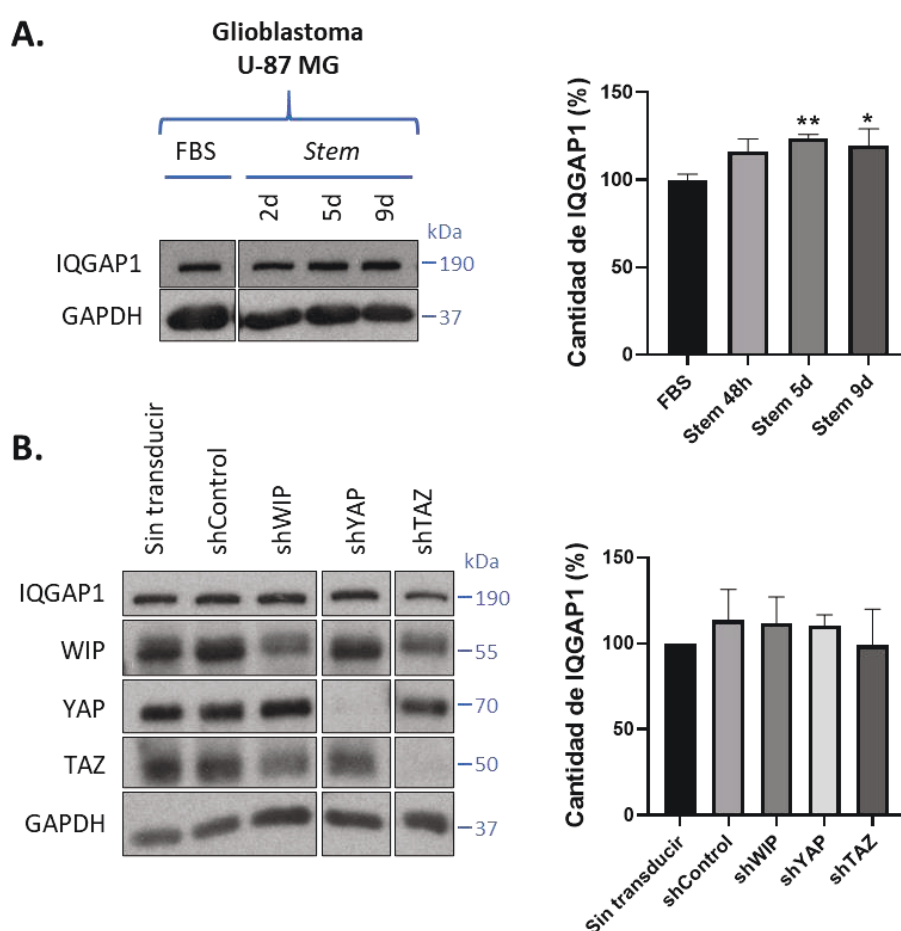


Figura R13 | **Caracterización de los niveles de IQGAP1 en células de GB U-87 MG.** (A) (Izquierda) Análisis por *western-blot* del extracto soluble de células de GB crecidas en medio con FBS y en medio *stem* (durante 2, 5 y 9 días) con anticuerpos específicos contra IQGAP1 y GAPDH como control de carga. (Derecha) Cuantificación de la cantidad de IQGAP1 normalizada con respecto al cultivo en medio con FBS (n=5). (B) (Izquierda) Análisis por *western-blot* del extracto soluble de células de GB crecidas en medio con FBS e interferidas con shControl, shWIP, shYAP y shTAZ. (Derecha) Cuantificación de la cantidad de IQGAP1 normalizada con respecto a la condición sin transducir (n=4). Las barras de error indican el error típico (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,005$ ).

Además, analizamos en células crecidas en medio con FBS si la interferencia de WIP, YAP o TAZ mediante vector lentiviral, afecta a los niveles de IQGAP1. Los resultados

obtenidos mediante *western-blot* indican que no hay cambios significativos en la cantidad de IQGAP1 cuando se interfieren de forma efectiva cualquiera de los tres genes indicados (**Figura R13B**).

### A.5.2. Selección de vectores virales para el silenciamiento de IQGAP1

Para poder evaluar qué efectos provoca en las células de GB la disminución de los niveles proteicos de IQGAP1, adquirimos 5 versiones de shRNA de interferencia para este gen. Una vez generadas las partículas lentivirales, transducimos la línea celular U-87 MG. A partir de cultivos en paralelo, se comprobó mediante *western-blot* la eficiencia de los distintos shRNA de interferencia usados contra IQGAP1. Todos ellos producen una bajada significativa de la cantidad de proteína con respecto a la condición sin transducir (**Figura R14**), siendo la mayor la producida por la versión shIQGAP1-31. Por tanto, seleccionamos esta versión para su uso, que a partir de ahora denominaremos simplemente shIQGAP1.

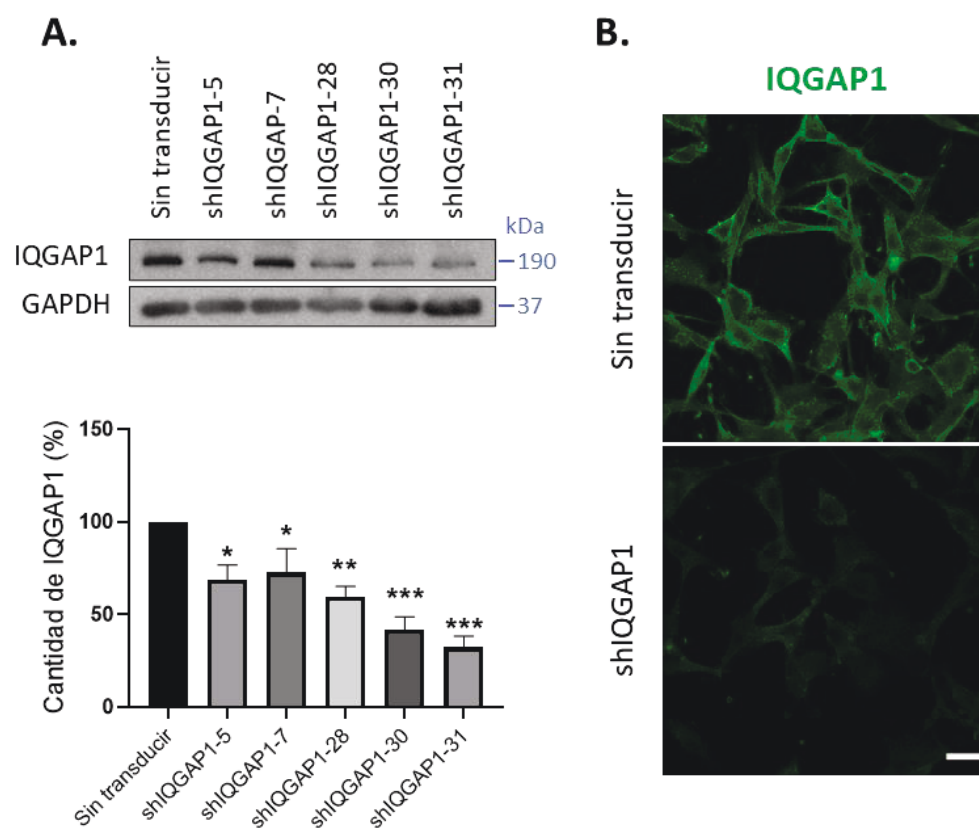


Figura R14 | **Caracterización de vectores lentivirales para el silenciamiento de IQGAP1 en células de GB U-87 MG.** (A) (Superior) Análisis por *western-blot* del extracto soluble de células de GB U87-MG transducidas con diferentes versiones de vector lentiviral shIQGAP1 con anticuerpos específicos contra IQGAP1 y GAPDH como control de carga. (Inferior) Cuantificación de la cantidad de IQGAP1 normalizada con respecto a la condición sin transducir (n=5). (B) Caracterización por inmunofluorescencia de la actividad del vector lentiviral shIQGAP1 seleccionado (barra de escala 25  $\mu$ m). Las barras de error indican el error típico (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,005$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ).

Además, se comprobó mediante inmunofluorescencia la actividad del vector lentiviral shIQGAP1, observándose una notable disminución en la intensidad de fluorescencia (**Figura R14B**), lo que confirma de nuevo su eficiencia.

### A.5.3. Análisis del silenciamiento de IQGAP1 en glioblastoma

Tras seleccionar el vector lentiviral más efectivo para interferir IQGAP1 en células de GB, quisimos analizar si este provoca cambios en los niveles de las principales proteínas de la vía protumoral: WIP, YAP y TAZ (**Figura R15**).

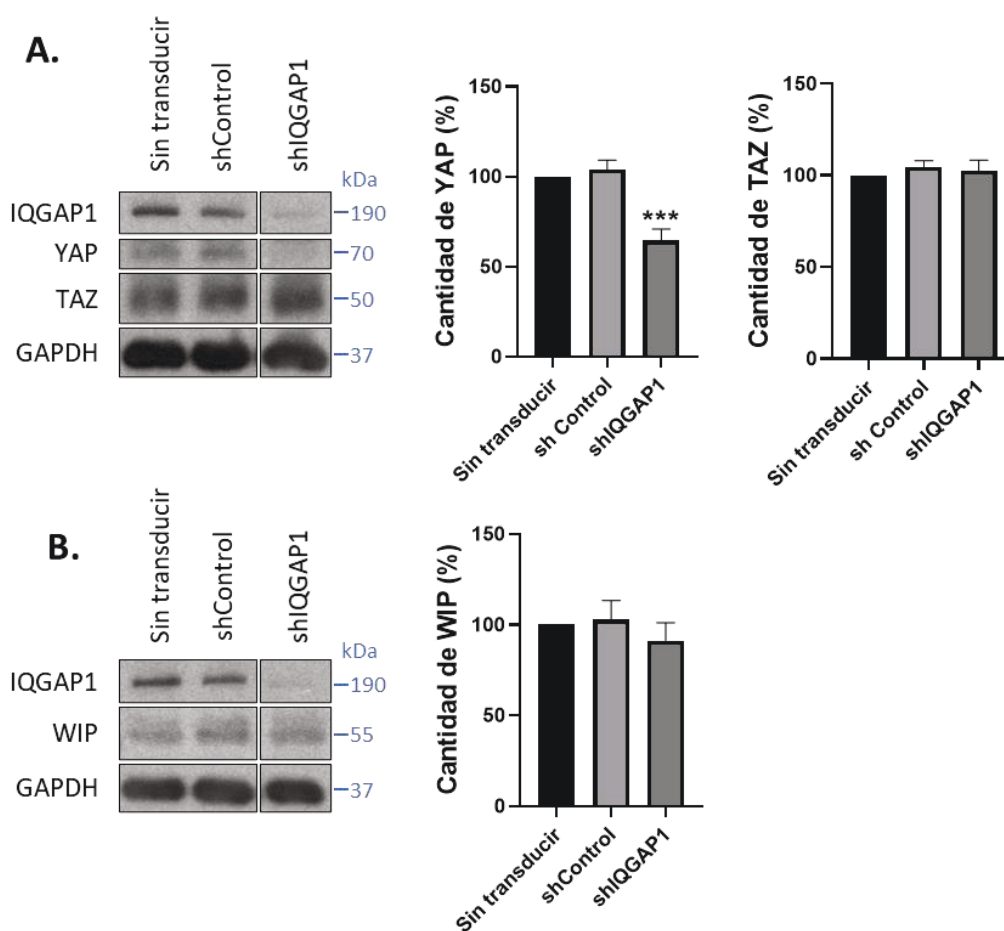


Figura R15 | **Análisis del efecto de la interferencia de IQGAP1 en los niveles de WIP, YAP y TAZ.** (A) (Izquierda) Análisis por *western-blot* del extracto soluble de células de GB U87-MG transducidas con los vectores lentivirales shControl y shIQGAP1 con anticuerpos específicos contra IQGAP1 y GAPDH como control de carga. (Centro y Derecha) Cuantificación de la cantidad de YAP y de TAZ, respectivamente, normalizada con respecto a la condición sin transducir (n=5). (B) (Izquierda) Análisis por *western-blot* del extracto soluble de células de GB U87-MG transducidas con los vectores lentivirales shControl y shIQGAP1 con anticuerpos específicos contra WIP y GAPDH como control de carga. (Derecha) Cuantificación de la cantidad de WIP normalizada con respecto a la condición sin transducir (n=4). Las barras de error indican el error típico (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,005$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ).

Así, tras el análisis de los extractos celulares mediante *western-blot*, pudimos comprobar que la interferencia de IQGAP1 produce, además, una disminución

significativa de los niveles de YAP, sin afectar a los niveles de TAZ (**Figura R15A**) ni tampoco a los niveles de WIP (**Figura R15B**). Considerando que ya ha sido descrita la existencia de una interacción directa entre IQGAP1 y YAP (Sayedyahossein et al., 2016), estos resultados sugieren que IQGAP1 podría modular de algún modo la estabilidad o expresión de YAP.

#### A.5.4. Análisis del efecto del silenciamiento de IQGAP1 en proliferación

Al igual que hicimos previamente con la interferencia de WIP, YAP y TAZ, quisimos analizar el efecto de la interferencia de IQGAP1 en proliferación de células U-87 MG de GB. Se estimó del número de células iniciales y finales usando la tinción con azul de Coomassie (**Figura R16**). A las 72 horas post-transducción, ya pudimos observar una disminución significativa en la capacidad proliferativa de aquellas células interferidas con shIQGAP1, al igual que ocurrió en el caso con las condiciones shWIP, shYAP y shTAZ. A las 96 horas post-transducción, todas las condiciones, excepto el control, continuaron mostrando una clara disminución en proliferación con respecto a la condición sin transducir.

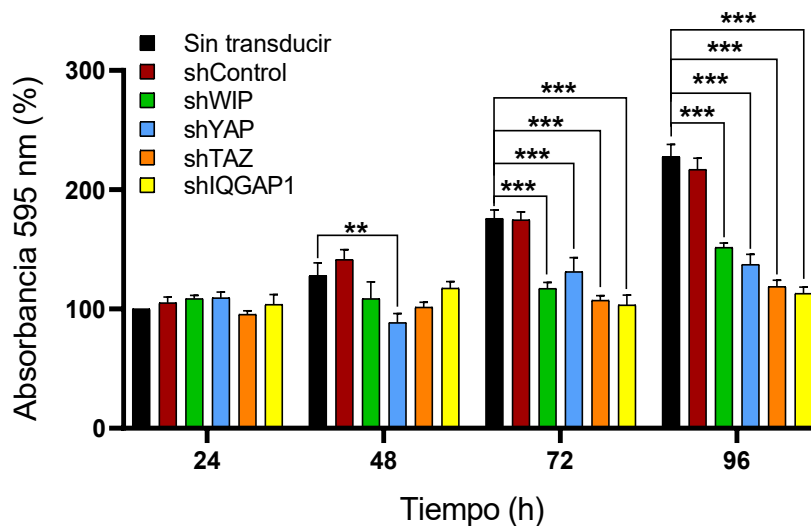


Figura R16 | Análisis del efecto del silenciamiento de IQGAP1 en proliferación de células de GB U-87 MG. Análisis de proliferación mediante tinción con azul de Coomassie a las 24, 48, 72 y 96h post-transducción. Valores de absorbancia normalizados con respecto a la condición sin transducir del punto de las 24h, considerando este valor como 100% (n=4). Las barras de error indican el error típico (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,005$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ).

Del mismo modo, analizamos el efecto de la interferencia de IQGAP1 en la línea celular de GB U-373 MG (**Figura S3**) donde a partir de las 48 horas post-transducción ya se aprecia una disminución significativa de la proliferación. Con estos resultados



podemos concluir que IQGAP1, al igual que WIP, YAP y TAZ, está implicado en la proliferación de las líneas tumorales U-87 MG y U-373 MG de GB.

#### **A.5.5. Análisis del efecto del silenciamiento de IQGAP1 en ciclo celular**

Al transducir las células U-87 MG de GB con los vectores lentivirales shWIP, shYAP, shTAZ y también shIQGAP1, pudimos observar una clara disminución de la proliferación celular mediante tinción de las células con azul de Comassie.

Para poder analizar de modo más exhaustivo y poder determinar en qué fase (G1, S o G2/M) se produce la parada del ciclo celular en las células interferidas, realizamos un análisis mediante citometría de flujo a las 24, 48 y 72 post-transducción en células U-87 MG. El cultivo se realizó en medio con FBS. En cada punto, las células fueron fijadas y teñidas con yoduro de propidio para marcar su DNA y poder cuantificar el porcentaje de población celular que se encuentra en cada fase del ciclo.

En los resultados obtenidos a las 24 horas post-transducción (**Figura R17A**), ya se pudo detectar un incremento significativo en la fracción G1 y una disminución en la fracción S en todas las condiciones interferidas con respecto a las células sin transducir, sin darse cambios en la condición control. No hubo diferencias en la cantidad de células presentes en fase G2/M. A las 48 horas post-transducción (**Figura R17B**), se acentuó aún más el incremento de la cantidad de células en fase G1 y la disminución de las presentes en fase S vistas a las 24 horas en todas las condiciones interferidas. Además, se detectó una disminución significativa de la cantidad de células presentes en fase G2/M en todas las condiciones interferidas con respecto a las células sin transducir, sin mostrarse diferencias en la condición control. En el punto de 72 horas post-transducción (**Figura R17C**), continuaron incrementándose las diferencias vistas en fases G1, S y G2/M. También se evaluó la muerte celular mediante yoduro de propidio en todos los tiempos, no viéndose diferencias en ninguna de las condiciones con respecto a las células sin transducir (**Figura R17A, B y C derecha**).

El aumento de la cantidad de células en fase G1 y la disminución de las presentes en fase S indican claramente que, la interferencia de WIP, YAP, TAZ e IQGAP1 en células de GB, produce una parada del ciclo celular en el punto de restricción G1. La disminución de la cantidad de células en fase G2/M tiene su explicación en que dichas células

continúan el ciclo hasta entrar de nuevo en fase G1, momento en el que detienen su avance.

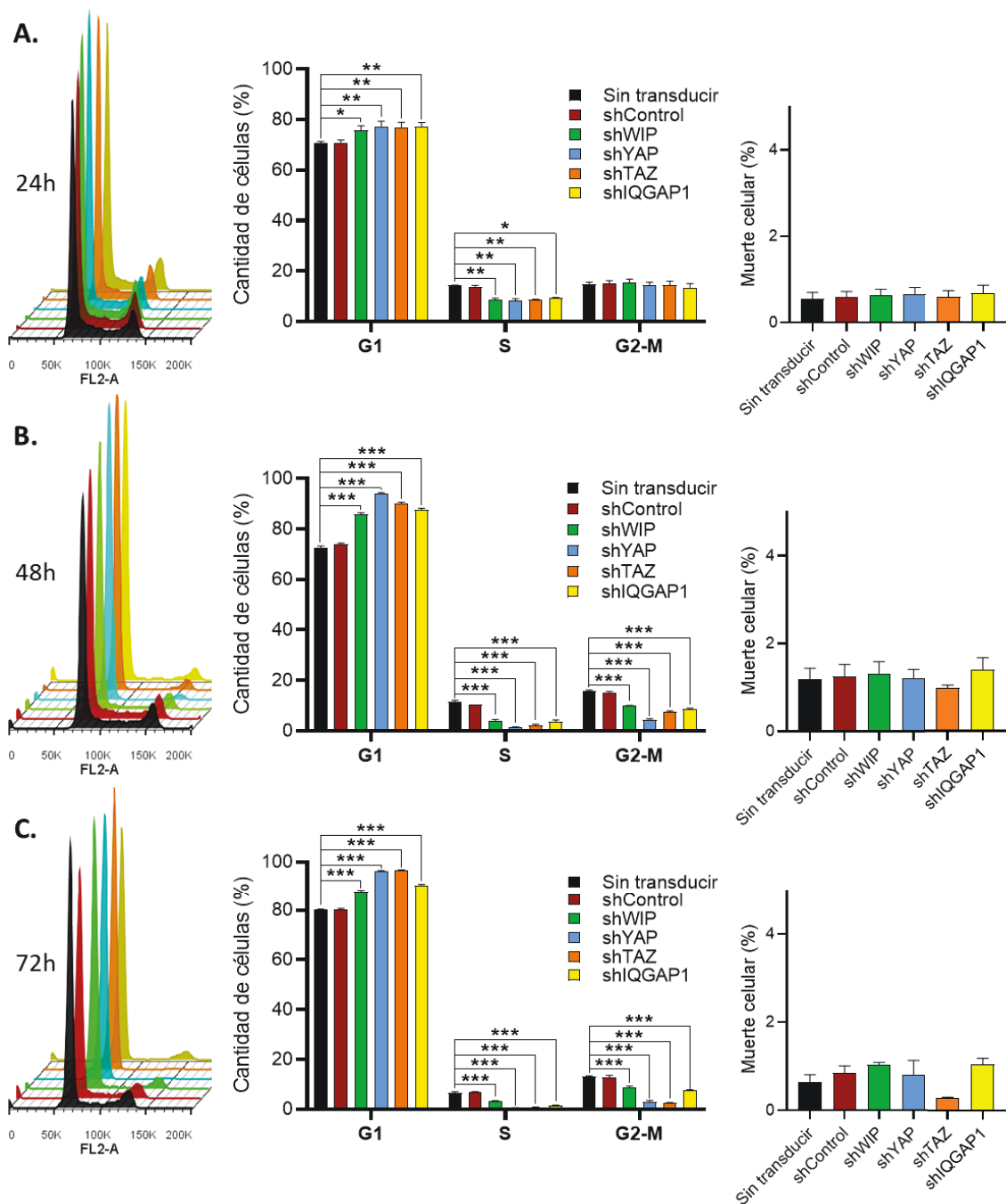


Figura R17 | **Análisis del efecto del silenciamiento de IQGAP1 en ciclo celular en células de GB U-87 MG crecidas en medio con FBS.** (A. B. y C. Izquierda) Histograma representativo del análisis de ciclo celular por citometría de flujo a las 24, 48 y 72h, respectivamente, post-transducción. (A. B. y C. Central) Representación de la distribución de células presentes en cada fase del ciclo celular a las 24, 48 y 72h, respectivamente, pos-transducción. (A. B. y C. Derecha) Análisis de muerte celular por ioduro de propidio tras 24, 48 y 72h, respectivamente, post-transducción (n=3). Las barras de error indican el error típico (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,005$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ).

Además, realizamos un análisis de ciclo celular en células U-87 MG crecidas en medio *stem*, con objeto de comprobar si la interferencia de WIP, YAP, TAZ e IQGAP1 produce el mismo efecto en estas condiciones. Debido a que a las 72 horas post-transducción las células crecidas en medio con FBS ya mostraron marcadas diferencias con respecto a las no transducidas, decidimos tomar este mismo punto temporal para el análisis. Así, a las 72 horas post-transducción, las células crecidas en medio *stem* fueron fijadas y teñidas con yoduro de propidio para cuantificar el porcentaje de población celular que se encuentra en cada fase del ciclo. Mediante citometría de flujo pudimos comprobar que se sigue el mismo patrón visto en las células crecidas en medio con FBS, mostrando un incremento de la fracción celular presente en fase G1 y una disminución de la fracción celular presente tanto en fase S como en fase G2/M (**Figura R18**). No se aprecian diferencias en muerte celular en las diferentes condiciones (**Figura R18 derecha**).

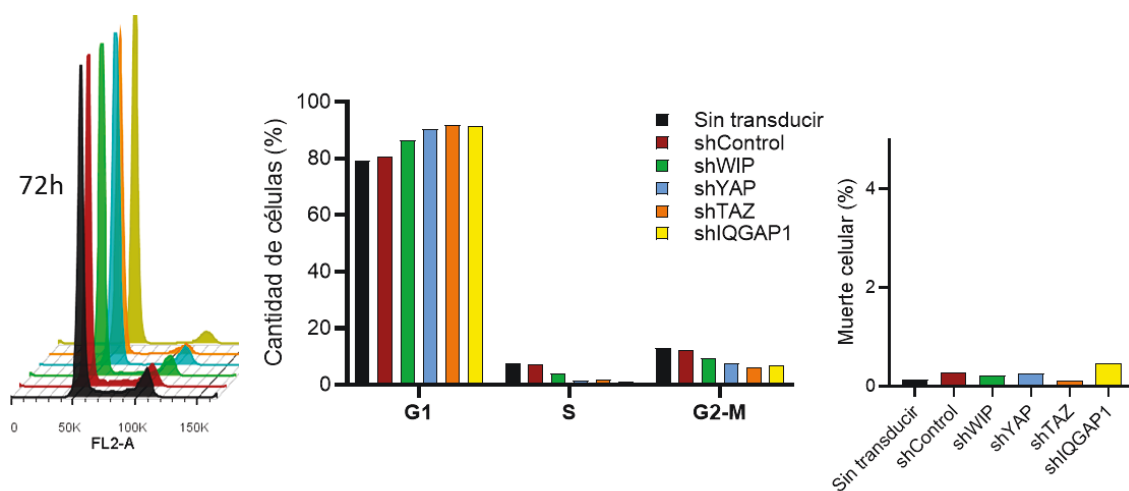


Figura R18 | **Análisis del efecto del silenciamiento de IQGAP1 en ciclo celular en células de GB U-87 MG crecidas en medio *stem*.** (Izquierda) Histograma del análisis de ciclo celular por citometría de flujo a las 72h post-transducción. (Central) Representación de la distribución de células presentes en cada fase del ciclo celular a las 72h post-transducción. (Derecha) Análisis de muerte celular por yoduro de propidio a las 72h post-transducción (n=1).

### A.5.6. Análisis del efecto de la sobreexpresión de IQGAP1 en cultivo en agar blando

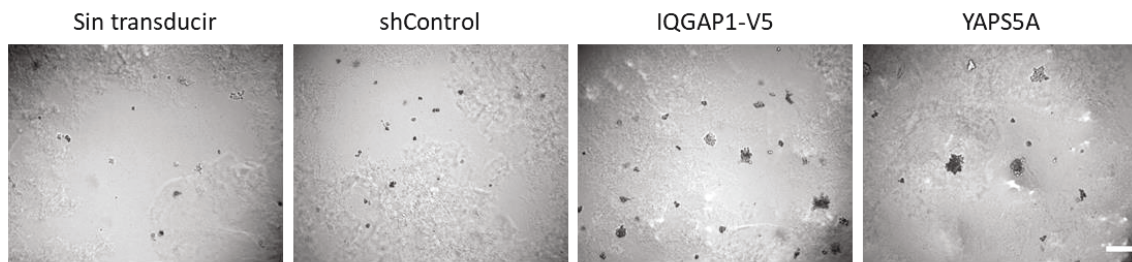
El ensayo de formación de colonias en agar blando es una técnica ampliamente utilizada para evaluar la transformación celular *in vitro*, ya que las células transformadas tienen la capacidad de crecer y dividirse sin unirse a un sustrato (Hanahan & Weinberg, 2011).

Con el fin de evaluar la implicación de IQGAP1 en la capacidad tumoral de las células de GB, realizamos un cultivo en agar blando de células U-87 MG, las cuales fueron previamente transducidas con la construcción IQGAP1-V5 mediante vector lentiviral. Esta construcción nos permite sobreexpresar IQGAP1 como una proteína recombinante junto al péptido etiqueta V5.

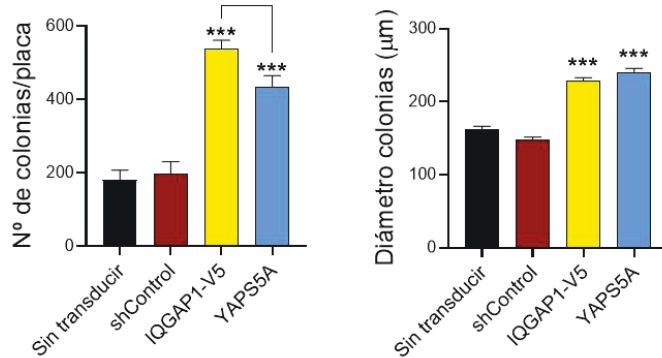
De esta forma, en cultivos paralelos de células U-87 MG crecimos las siguientes condiciones: células transducidas con IQGAP1-V5, células sin transducir o transducidas con shControl como condiciones control, y células transducidas con YAPS5A como control positivo de formación de colonias. Se comprobó la correcta transducción de las células mediante *western-blot*, previo a su cultivo en agar blando (**Figura R19C**). Tras ello, tanto las células sin transducir como las células transducidas se sometieron a un cultivo en agar blando durante 14 días. Una vez finalizado el experimento, se fotografiaron los cultivos (**Figura R19A**) y se cuantificó tanto el número como el diámetro de las colonias generadas en cada condición (**Figura R19B**).

Los resultados muestran que la sobreexpresión de IQGAP1 incrementa de forma significativa la capacidad de las células U-87 MG de formar colonias, de un modo incluso mayor al observado en el control positivo de células transducidas con YAPS5A (**Figura R19B izquierda**). Además de observarse un incremento en el número de colonias, también se observó que estas presentaban un diámetro medio significativamente mayor a los generados en las condiciones control, sin mostrarse diferencias con respecto a los del control positivo YAPS5A.

**A.**



**B.**



**C.**

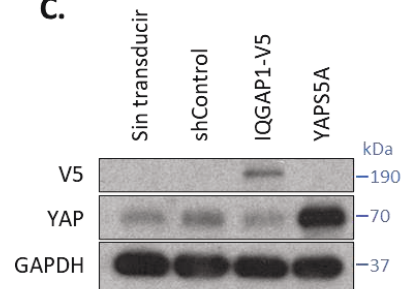


Figura R19 | **Efecto de la sobreexpresión de IQGAP1-V5 en la capacidad tumoral de células de GB U-87 MG.** (A) Imágenes representativas del crecimiento independiente de anclaje (agar blando) tras 14 días en cultivo de las células sin transducir o transducidas con los vectores lentivirales shControl, IQGAP1-V5 o YAP55A (barra de escala 500 µm). (B) Cuantificación del número de colonias/placa y del diámetro medio de las colonias formadas en cada condición. (C) Análisis por *western-blot* de la correcta transducción de las células con anticuerpos específicos contra V5, YAP y GAPDH como control de carga. Las barras de error indican el error típico (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,005$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ).

Quisimos también analizar si la sobreexpresión de IQGAP1 provoca algún cambio en la distribución de las células a lo largo del ciclo celular, por lo que realizamos un estudio de ciclo mediante citometría de flujo a las 48 horas post-transducción (Figura R20).

Los resultados del experimento piloto analizado no mostraron cambios aparentes en la fracción de células presentes en cada fase del ciclo celular con respecto a las condiciones control. Tampoco se observaron cambios en el porcentaje de muerte celular en ninguna de las condiciones.

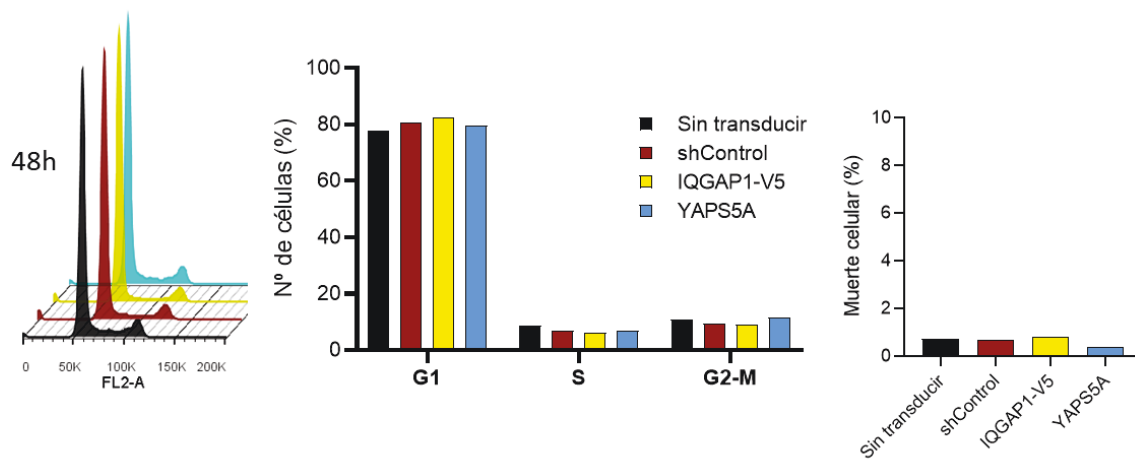


Figura R20 | **Efecto de la sobreexpresión de IQGAP1-V5 en el ciclo celular de células de GB U-87 MG.** (Izquierda) Histograma del análisis de ciclo celular por citometría de flujo a las 48h post-transducción. (Central) Representación de la distribución de células presentes en cada fase del ciclo celular a las 48h pos-transducción (n=1). (Derecha) Análisis de muerte celular por ioduro de propidio a las 48h post-transducción.

Nuestros datos obtenidos en el ensayo de agar blando sugieren que la sobreexpresión de IQGAP1 es capaz de incrementar la capacidad tumoral de las células de GB U-87 MG, confirmando de este modo ser un potencial responsable de la capacidad protumoral que presenta WIP en este tipo de tumor.

## B. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DIFERENCIAL: RNA-seq

En este segundo capítulo, para estudiar con más detalle la función protumoral que presenta WIP a través de su capacidad para estabilizar YAP/TAZ en células de GB, quisimos realizar un análisis de expresión génica en células U-87 MG. El análisis por RNA-seq permite cuantificar el nivel de expresión de genes, prácticamente la totalidad del RNA presente en una célula. El análisis transcriptómico de las muestras fue realizado por la unidad de genómica del CNIC, utilizando el equipo Illumina HiSeq 2500.

### B.1. Análisis comparativo de los resultados RNA-seq mediante Venny 2.1

Quisimos analizar los cambios que se producen en el transcriptoma de células de GB U-87 MG crecidas en medio con FBS cuando interferimos la expresión de WIP, YAP o TAZ mediante vector lentiviral. En primer lugar, comprobamos la correcta interferencia de cada una de las proteínas mediante *western-blot* (**Figura R21A**). Tras ello, extrajimos el RNA de las células interferidas y de células sin transducir como control utilizando el método del Trizol, como se detalla en el capítulo de materiales y métodos. Tras extraer y purificar el RNA, este fue analizado por RNA-seq en la unidad de genómica del CNIC. Se analizaron triplicados para cada condición.

En la **Figura R21B** se muestra el análisis de componentes principales (PCA) de los resultados obtenidos en los triplicados para cada condición. El PCA permite reducir la dimensionalidad del conjunto de datos de tal forma que no se pierda información. El gráfico PCA converge las correlaciones o la falta de ellas entre las condiciones en un gráfico de 2 dimensiones. Las condiciones con correlaciones elevadas se agrupan juntas. Los ejes están ordenados en orden de importancia. Las diferencias entre el primer eje de componente principal (PC1) son más importantes que las diferencias a lo largo del segundo eje del componente principal (PC2). Así, la condición interferida más cercana en el gráfico a la condición control (sin transducir) sería la de shWIP. Por tanto, el silenciamiento de WIP es la condición que menos diferencias muestra con respecto al control.

Las condiciones shYAP y shTAZ serían similares entre sí, siendo ambas las que mayor diferencia muestran con respecto al control (sin transducir), manteniendo ciertas diferencias también con respecto a la condición shWIP.

En la **Figura R21C** se muestra el diagrama de Venn en el que se comparan todos los genes cuya expresión muestra diferencias significativas, ya sea por incremento o disminución, en cada condición con respecto al control. El gráfico muestra que existen 179 genes en común al interferir WIP, YAP o TAZ cuya expresión se ve alterada de forma significativa con respecto a la condición control.

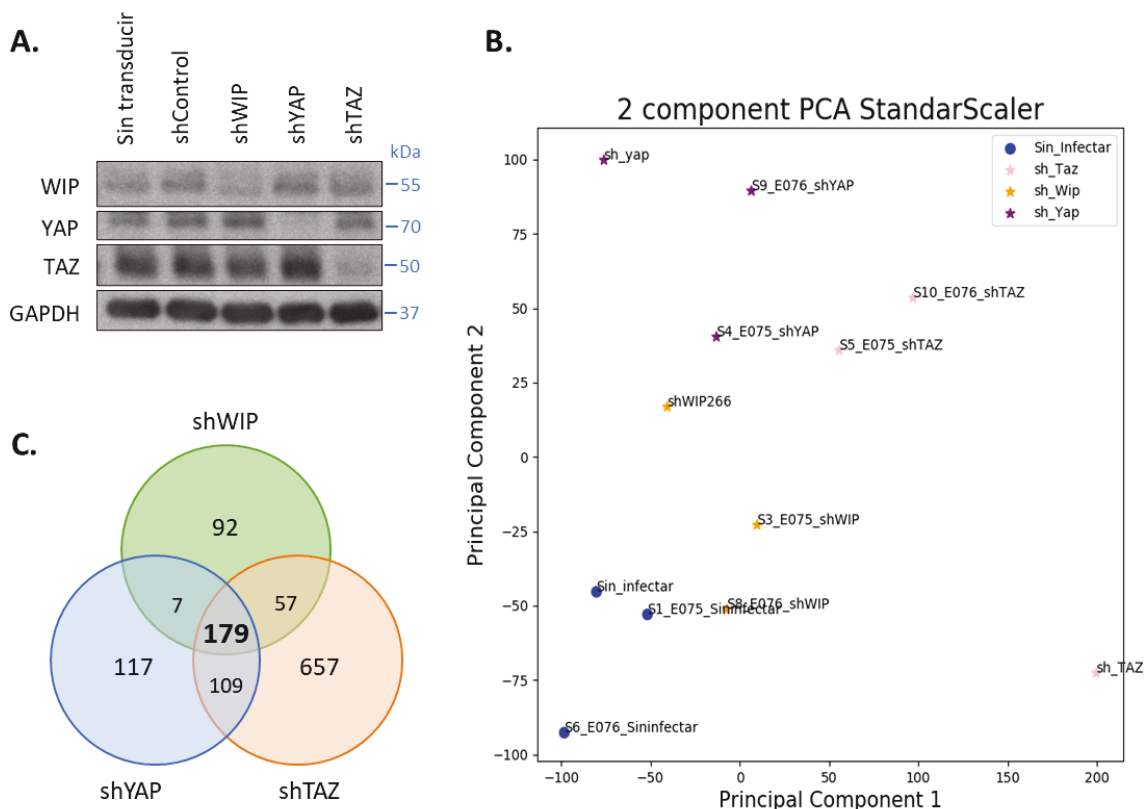


Figura R21 | **Análisis comparativo de los resultados del estudio por RNA-seq en células de GB U-87 MG transducidas con los vectores lentivirales shWIP, shYAP y shTAZ.** (A) Análisis por *western-blot* de la correcta transducción de las células con anticuerpos específicos contra WIP, YAP/TAZ y GAPDH como control de carga. (B) Análisis de componentes principales de las réplicas de cada condición analizadas mediante RNA-seq (n=3). (C) Análisis comparativo del número genes cuya expresión se ve incrementada/disminuida en cada condición mediante la herramienta Venny 2.1.

En la **Figura R22** se expone el *heat map* formado por los 179 genes comúnmente alterados en las 3 condiciones interferidas (shWIP, shYAP y shTAZ) en células U-87 MG de GB. El listado detallado de los genes se muestra en la **Tabla R4**, donde se ordenan de forma alfabética.



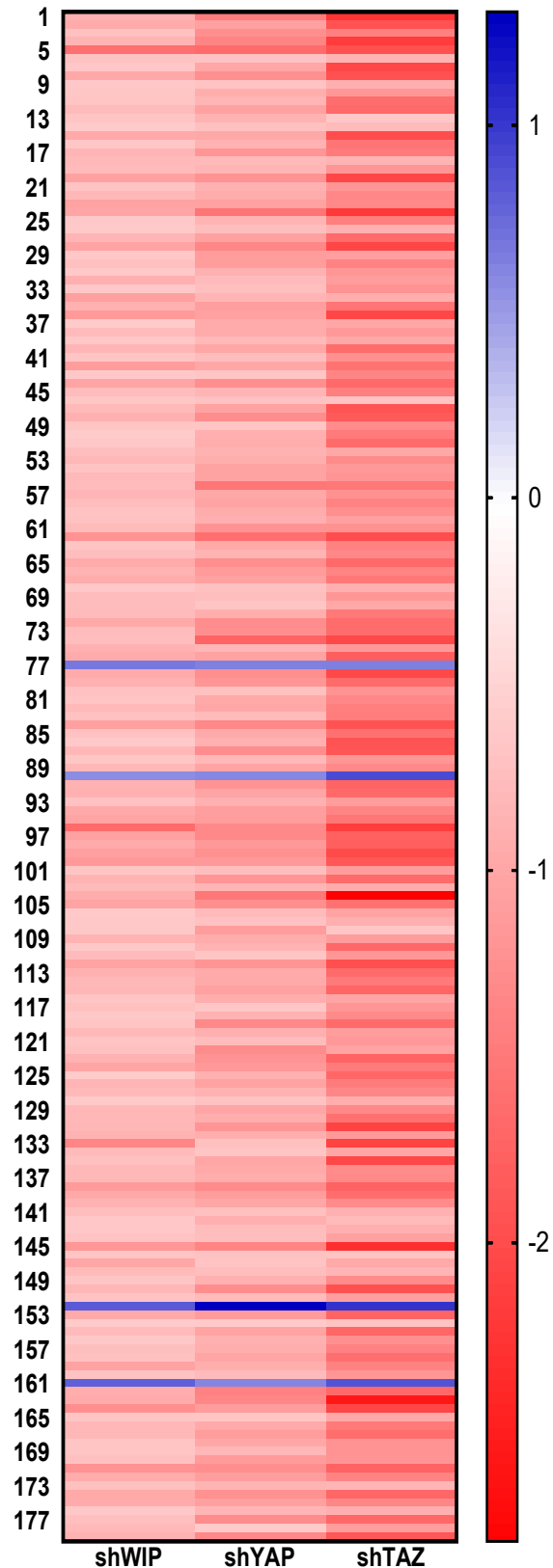


Figura R22 | *Heat map* de los genes comunes cuya expresión se ve incrementada (sombreados en azul) o disminuida (sombreados en rojo) al interferir WIP, YAP y TAZ en células de GB U-87 MG (n=3). Una mayor intensidad de color refleja una mayor diferencia de expresión con respecto a la condición sin transducir. Los datos representados corresponden al logaritmo en base 2 normalizado con respecto a la condición sin transducir. Sólo se muestran genes con un valor  $p < 0,05$ . La lista detallada de genes se muestra en la **Tabla R4**.

Tabla R4 | Genes comunes cuya expresión se ve incrementada (sombreados en azul) o disminuida (sombreados en rojo) al interferir WIP, YAP y TAZ en células de GB U-87 MG. Listado de genes ordenado alfabéticamente. Sólo se muestran los genes con un valor  $p < 0,05$ .

Gen	Name	Function
<b>ANLN</b>	Anillin	Actin-binding protein that plays a role in cell growth and migration, and in cytokinesis.
<b>ARHGAP11A</b>	Rho GTPase-activating protein 11A	In response to DNA damage, the encoded protein interacts with the p53 tumor suppressor protein and stimulates its tetramerization, which results in cell-cycle arrest and apoptosis.
<b>ASF1B</b>	Anti-Silencing Function 1B histone chaperone	Member of the H3/H4 family of histone chaperone proteins. The encoded protein may play a key role in modulating the nucleosome structure of chromatin by ensuring a constant supply of histones at sites of nucleosome assembly.
<b>ASPM</b>	Abnormal spindle-like microcephaly-associated protein	Involved in mitotic spindle regulation and coordination of mitotic processes. The function in regulating microtubule dynamics at spindle poles including spindle orientation, astral microtubule density and poleward microtubule flux seems to depend on the association with the katanin complex formed by KATNA1 and KATNB1.
<b>ATAD2</b>	ATPase family AAA domain-containing protein 2	May be a transcriptional coactivator of the nuclear receptor ESR1 required to induce the expression of a subset of estradiol target genes, such as CCND1, MYC and E2F1. Involved in the estrogen-induced cell proliferation and cell cycle progression of breast cancer cells.
<b>ATAD5</b>	ATPase family AAA domain-containing protein 5	Involved in DNA damage response. Involved in a RAD9A-related damage checkpoint, a pathway that is important in determining whether DNA damage is compatible with cell survival or whether it requires cell elimination by apoptosis.
<b>BIRC5</b>	Baculoviral IAP repeat-containing protein 5	Multitasking protein that has dual roles in promoting cell proliferation and preventing apoptosis. Component of a chromosome passage protein complex (CPC) which is essential for chromosome alignment and segregation during mitosis and cytokinesis
<b>BRCA1</b>	Breast cancer type 1 susceptibility protein	This gene encodes a 190 kD nuclear phosphoprotein that plays a role in maintaining genomic stability, and it also acts as a tumor suppressor. The BRCA1 gene contains 22 exons spanning about 110 kb of DNA. The encoded protein combines with other tumor suppressors, DNA damage sensors, and signal transducers to form a large multi-subunit protein complex known as the BRCA1-associated genome surveillance complex (BASC). This gene product associates with RNA polymerase II, and through the C-terminal domain, also interacts with histone deacetylase complexes.
<b>BRI3BP</b>	BRI3-binding protein	Involved in tumorigenesis and may function by stabilizing p53/TP53.
<b>BRIP1</b>	Fanconi anemia group J protein	Member of the RecQ DEAH helicase family and interacts with the BRCT repeats of breast cancer, type 1 (BRCA1). The bound complex is important in the normal double-strand break repair function of breast cancer, type 1 (BRCA1). This gene may be a target of germline cancer-inducing mutations.
<b>BUB1</b>	Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1	Serine/threonine-protein kinase that performs 2 crucial functions during mitosis: it is essential for spindle-assembly checkpoint signaling and for correct chromosome alignment. Has a key role in the assembly of checkpoint proteins at the kinetochore, being required for the subsequent localization of CENPF, BUB1B, CENPE and MAD2L1.
<b>BUB1B</b>	Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1 beta	Essential component of the mitotic checkpoint. Required for normal mitosis progression. The mitotic checkpoint delays anaphase until all chromosomes are properly attached to the mitotic spindle. Also implicated in triggering apoptosis in polyploid cells that exit aberrantly from mitotic arrest.
<b>C9orf40</b>	C9orf40	Uncharacterized protein . Chromosome 9 open reading frame 40.
<b>CASP8AP2</b>	Caspase 8 associated protein 2	Highly similar to FLASH, a mouse apoptotic protein identified by its interaction with the death-effector domain (DED) of caspase 8. Studies of FLASH protein suggested that this protein may be a component of the death-inducing signaling complex that includes Fas receptor, Fas-binding adapter FADD, and caspase 8, and plays a regulatory role in Fas-mediated apoptosis.
<b>CCNA2</b>	Cyclin A2	Cyclin which controls both the G1/S and the G2/M transition phases of the cell cycle. Functions through the formation of specific serine/threonine protein kinase holoenzyme complexes with the cyclin-dependent protein kinases CDK1 or CDK2. The cyclin subunit confers the substrate specificity of

		these complexes and differentially interacts with and activates CDK1 and CDK2 throughout the cell cycle.
<b>CCNB2</b>	Cyclin B2	Essential for the control of the cell cycle at the G2/M (mitosis) transition.
<b>CCNE2</b>	Cyclin E2	Essential for the control of the cell cycle at the late G1 and early S phase.
<b>CDC25A</b>	Cell division cycle 25C	Tyrosine protein phosphatase which functions as a dosage-dependent inducer of mitotic progression. Directly dephosphorylates CDK1 and stimulates its kinase activity.
<b>CDC45</b>	Cell division cycle 45	Required for initiation of chromosomal DNA replication.
<b>CDC6</b>	Cell division cycle 6	Involved in the initiation of DNA replication. Also participates in checkpoint controls that ensure DNA replication is completed before mitosis is initiated.
<b>CDC7</b>	Cell division cycle 7	Seems to phosphorylate critical substrates that regulate the G1/S phase transition and/or DNA replication. Can phosphorylate MCM2 and MCM3.
<b>CDCA5</b>	Cell division cycle associated 5	Regulator of sister chromatid cohesion in mitosis stabilizing cohesin complex association with chromatin.
<b>CDCA7</b>	Cell division cycle associated 7	Participates in MYC-mediated cell transformation and apoptosis; induces anchorage-independent growth and clonogenicity in lymphoblastoid cells.
<b>CDK1</b>	Cyclin-dependent kinase 1	Plays a key role in the control of the eukaryotic cell cycle by modulating the centrosome cycle as well as mitotic onset; promotes G2-M transition, and regulates G1 progress and G1-S transition via association with multiple interphase cyclins.
<b>CDKN3</b>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 3	May play a role in cell cycle regulation. Dual specificity phosphatase active toward substrates containing either phosphotyrosine or phosphoserine residues.
<b>CDT1</b>	Chromatin licensing and DNA replication factor 1	Involved in the formation of the pre-replication complex that is necessary for DNA replication. The encoded protein can bind geminin, which prevents replication and may function to prevent this protein from initiating replication at inappropriate origins
<b>CENPE</b>	Centromere-associated protein E	Kinesin-like motor protein that accumulates in the G2 phase of the cell cycle. It first appears at the centromere region of chromosomes during prometaphase. This protein is required for stable spindle microtubule capture at kinetochores which is a necessary step in chromosome alignment during prometaphase.
<b>CENPF</b>	Centromere protein F	Required for kinetochore function and chromosome segregation in mitosis.
<b>CENPH</b>	Centromere protein H	Component of the CENPA-NAC complex that plays a central role in assembly of kinetochore proteins, mitotic progression and chromosome segregation.
<b>CENPI</b>	Centromere protein I	Component of the CENPA-NAC complex that plays a central role in assembly of kinetochore proteins, mitotic progression and chromosome segregation.
<b>CENPK</b>	Centromere protein K	Component of the CENPA-NAC complex that plays a central role in assembly of kinetochore proteins, mitotic progression and chromosome segregation.
<b>CENPN</b>	Centromere protein N	Component of the CENPA-NAC complex that plays a central role in assembly of kinetochore proteins, mitotic progression and chromosome segregation.
<b>CENPO</b>	Centromere protein O	Component of the CENPA-NAC complex that plays a central role in assembly of kinetochore proteins, mitotic progression and chromosome segregation.
<b>CENPQ</b>	Centromere protein Q	Component of the CENPA-NAC complex that plays a central role in assembly of kinetochore proteins, mitotic progression and chromosome segregation.
<b>CENPU</b>	Centromere protein U	Component of the CENPA-NAC complex that plays a central role in assembly of kinetochore proteins, mitotic progression and chromosome segregation.
<b>CEP55</b>	Centrosomal protein 55kDa	Recruits PDCD6IP and TSG101 to midbody during cytokinesis. Required for successful completion of cytokinesis.
<b>CEP78</b>	Centrosomal protein 78kDa	Centrosomal protein that is both required for the regulation of centrosome-related events during the cell cycle and required for ciliogenesis.
<b>CHAF1A</b>	Chromatin assembly factor 1 subunit A	Core component of the CAF-1 complex, a complex that is thought to mediate chromatin assembly in DNA replication and DNA repair.
<b>CHAF1B</b>	Chromatin assembly factor 1 subunit B	Complex that is thought to mediate chromatin assembly in DNA replication and DNA repair.
<b>CIP2A</b>	KIAA1524,cancerous inhibitor of PP2A	Oncoprotein that inhibits PP2A and stabilizes MYC in human malignancies. Promotes anchorage-independent cell growth and tumor formation
<b>CKAP2</b>	Cytoskeleton-associated protein 2	Cytoskeleton-associated protein that stabilizes microtubules and plays a role in the regulation of cell division.
<b>CKAP2L</b>	Cytoskeleton associated protein 2-like	Microtubule-associated protein required for mitotic spindle formation and cell-cycle progression in neural progenitor cells.
<b>CKS2</b>	Cyclin-dependent kinases regulatory subunit 2	Binds to the catalytic subunit of the cyclin dependent kinases and is essential for their biological function.

<b>CLSPN</b>	Claspin	Required for checkpoint mediated cell cycle arrest in response to inhibition of DNA replication or to DNA damage induced by both ionizing and UV irradiation. Adapter protein which binds to BRCA1 and the checkpoint kinase CHEK1 and facilitates the ATR-dependent phosphorylation of both proteins.
<b>DBF4</b>	Protein DBF4 homolog A	Regulatory subunit for CDC7 which activates its kinase activity thereby playing a central role in DNA replication and cell proliferation.
<b>DDX11</b>	ATP-dependent DNA helicase DDX11	Involved in genomic stability, including DNA replication and repair, heterochromatin organization and ribosomal RNA synthesis.
<b>DEK</b>	Protein DEK	Involved in chromatin organization.
<b>DEPDC1</b>	DEP domain-containing protein 1A	Involved in transcriptional regulation as a transcriptional corepressor.
<b>DHFR</b>	Dihydrofolate reductase	Key enzyme in folate metabolism. Catalyzes an essential reaction for de novo glycine and purine synthesis, and for DNA precursor synthesis.
<b>DIAPH3</b>	Protein diaphanous homolog 3	Actin nucleation and elongation factor required for the assembly of F-actin structures. Required for cytokinesis, stress fiber formation and transcriptional activation of the serum response factor.
<b>DLGAP5</b>	Disks large-associated protein 5	Potential cell cycle regulator that may play a role in carcinogenesis of cancer cells.
<b>DNA2</b>	DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease DNA2	Key enzyme involved in DNA replication and DNA repair in nucleus and mitochondrion.
<b>DNMT1</b>	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	Enzyme that transfers methyl groups to cytosine nucleotides of genomic DNA. It is the major enzyme responsible for maintaining methylation patterns following DNA replication.
<b>DSN1</b>	Kinetochores-associated protein DSN1 homolog	The encoded protein is required for proper kinetochore assembly and progression through the cell cycle.
<b>DTL</b>	Denticleless protein homolog	Substrate-specific adapter of a DCX (DDB1-CUL4-X-box) E3 ubiquitin-protein ligase complex required for cell cycle control, DNA damage response and translesion DNA synthesis.
<b>E2F1</b>	Transcription factor E2F1	Transcription activator that binds DNA cooperatively with DP proteins through the E2 recognition site, 5'-TTTC[CG]CGC-3' found in the promoter region of a number of genes whose products are involved in cell cycle regulation or in DNA replication.
<b>E2F8</b>	Transcription factor E2F8	Atypical E2F transcription factor that participates in various processes such as angiogenesis and polyploidization of specialized cells. Mainly acts as a transcription repressor that binds DNA independently of DP proteins and specifically recognizes the E2 recognition site 5'-TTTC[CG]CGC-3'. Directly represses transcription of classical E2F transcription factors such as E2F1: component of a feedback loop in S phase by repressing the expression of E2F1, thereby preventing p53/TP53-dependent apoptosis.
<b>ERCC6L</b>	DNA excision repair protein ERCC-6-like	DNA helicase that acts as an essential component of the spindle assembly checkpoint. Contributes to the mitotic checkpoint by recruiting MAD2 to kinetochores and monitoring tension on centromeric chromatin.
<b>ESCO2</b>	N-acetyltransferase ESCO2	Acetyltransferase required for the establishment of sister chromatid cohesion.
<b>EXO1</b>	Exonuclease 1	5'→3' double-stranded DNA exonuclease involved in mismatch repair and eventually also in mitotic recombination between direct repeat.
<b>EZH2</b>	Histone-lysine N-methyltransferase EZH2	Polycomb group (PcG) protein. Catalytic subunit of the PRC2/EED-EZH2 complex, which methylates 'Lys-9' (H3K9me) and 'Lys-27' (H3K27me) of histone H3, leading to transcriptional repression of the affected target gene.
<b>FAM111B</b>	Serine protease FAM111B	Serine protease.
<b>FAM83D</b>	Protein FAM83D	Probable proto-oncogene that regulates cell proliferation, growth, migration and epithelial to mesenchymal transition.
<b>FANCD2</b>	Fanconi anemia group D2 protein	Required for maintenance of chromosomal stability. Promotes accurate and efficient pairing of homologs during meiosis. Involved in the repair of DNA double-strand breaks, both by homologous recombination and single-strand annealing. May participate in S phase and G2 phase checkpoint activation upon DNA damage.
<b>FANCI</b>	Fanconi anemia group I protein	Plays an essential role in the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination and in the repair of interstrand DNA cross-links (ICLs) by promoting FANCD2 monoubiquitination by FANCL and participating in recruitment to DNA repair sites.

<b>FBXO5</b>	F-box only protein 5	Regulator of APC activity during mitotic and meiotic cell cycle. During mitotic cell cycle plays a role as both substrate and inhibitor of APC-FZR1 complex. During G1 phase, plays a role as substrate of APC-FZR1 complex E3 ligase.
<b>FEN1</b>	Flap endonuclease 1	Structure-specific nuclease with 5'-flap endonuclease and 5'-3' exonuclease activities involved in DNA replication and repair
<b>GEN1</b>	Flap endonuclease GEN homolog 1	Endonuclease which resolves Holliday junctions (HJs) by the introduction of symmetrically related cuts across the junction point, to produce nicked duplex products in which the nicks can be readily ligated. Four-way DNA intermediates, also known as Holliday junctions, are formed during homologous recombination and DNA repair, and their resolution is necessary for proper chromosome segregation.
<b>GINS2</b>	DNA replication complex GINS protein PSF2	The GINS complex plays an essential role in the initiation of DNA replication, and progression of DNA replication forks.
<b>GINS4</b>	DNA replication complex GINS protein SLD5	The GINS complex plays an essential role in the initiation of DNA replication, and progression of DNA replication forks.
<b>GTSE1</b>	G2 and S phase-expressed protein 1	Involved in p53-induced cell cycle arrest in G2/M phase by interfering with microtubule rearrangements that are required to enter mitosis.
<b>HELLS</b>	Lymphoid-specific helicase	Plays an essential role in normal development and survival. Involved in regulation of the expansion or survival of lymphoid cells. Required for de novo or maintenance DNA methylation.
<b>HJURP</b>	Holliday junction recognition protein	Centromeric protein that plays a central role in the incorporation and maintenance of histone H3-like variant CENPA at centromeres.
<b>HMGB2</b>	High mobility group protein B2	Multifunctional protein with various roles in different cellular compartments. May act in a redox sensitive manner. In the nucleus is an abundant chromatin-associated non-histone protein involved in transcription, chromatin remodeling and V(D)J recombination and probably other processes. Binds DNA with a preference to non-canonical DNA structures such as single-stranded DNA.
<b>HMGB3</b>	High mobility group protein B3	Multifunctional protein with various roles in different cellular compartments. May act in a redox sensitive manner. Associates with chromatin and binds DNA with a preference to non-canonical DNA structures such as single-stranded DNA.
<b>HMMR</b>	Hyaluronan-mediated motility receptor	Receptor for hyaluronic acid (HA). Involved in cell motility. When hyaluronan binds to HMMR, the phosphorylation of a number of proteins, including PTK2/FAK1 occurs.
<b>ITGA5</b>	Integrin alpha-5	Integrin alpha-5/beta-1 (ITGA5:ITGB1) is a receptor for fibronectin and fibrinogen.
<b>KIF11</b>	Kinesin-like protein KIF11	Motor protein required for establishing a bipolar spindle during mitosis. Required in non-mitotic cells for transport of secretory proteins from the Golgi complex to the cell surface.
<b>KIF15</b>	Kinesin-like protein KIF15	Plus-end directed kinesin-like motor enzyme involved in mitotic spindle assembly.
<b>KIF18A</b>	Kinesin-like protein KIF18A	Microtubule-depolymerizing kinesin which plays a role in chromosome congression by reducing the amplitude of preanaphase oscillations and slowing poleward movement during anaphase, thus suppressing chromosome movements.
<b>KIF18B</b>	Kinesin-like protein KIF18B	In complex with KIF2C, constitutes the major microtubule plus-end depolymerizing activity in mitotic cells. Its major role may be to transport KIF2C and/or MAPRE1 along microtubules.
<b>KIF20B</b>	Kinesin-like protein KIF20B	Plus-end-directed motor enzyme that is required for completion of cytokinesis.
<b>KIF22</b>	Kinesin-like protein KIF22	Kinesin family member that is involved in spindle formation and the movements of chromosomes during mitosis and meiosis.
<b>KIF23</b>	Kinesin-like protein KIF23	Component of the centralspindlin complex that serves as a microtubule-dependent and Rho-mediated signaling required for the myosin contractile ring formation during the cell cycle cytokinesis.
<b>KIF2C</b>	Kinesin-like protein KIF2C	Regulates the turnover of microtubules at the kinetochore and functions in chromosome segregation during mitosis.
<b>KIF4A</b>	Chromosome-associated kinesin KIF4A	Iron-sulfur (Fe-S) cluster binding motor protein that has a role in chromosome segregation during mitosis.
<b>KNL1</b>	Kinetochore scaffold 1	Component of the multiprotein assembly that is required for creation of kinetochore-microtubule attachments and chromosome segregation.

<b><i>KNSTRN</i></b>	Small kinetochore-associated protein	Promotes the metaphase-to-anaphase transition and is required for chromosome alignment, normal timing of sister chromatid segregation, and maintenance of spindle pole architecture.
<b><i>KNTC1</i></b>	Kinetochore-associated protein 1	This gene encodes a protein that is one of many involved in mechanisms to ensure proper chromosome segregation during cell division.
<b><i>LEPROT</i></b>	Leptin receptor gene-related protein	LEPROT is associated with the Golgi complex and endosomes and has a role in cell surface expression of growth hormone receptor and leptin receptor (OBR, or LEPR ), thereby altering receptor-mediated cell signaling.
<b><i>LMNB1</i></b>	Lamin-B1	Component of the nuclear lamina, a fibrous layer on the nucleoplasmic side of the inner nuclear membrane, which is thought to provide a framework for the nuclear envelope and may also interact with chromatin.
<b><i>MAD2L1</i></b>	Mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2A	Spindle-assembly checkpoint component. Prevents the onset of anaphase until all chromosomes are properly aligned at the metaphase plate.
<b><i>MASTL</i></b>	Microtubule associated ser/thr kinase-like	Serine/threonine kinase that plays a key role in M phase by acting as a regulator of mitosis entry and maintenance.
<b><i>MCM2</i></b>	DNA replication licensing factor MCM2	Acts as component of the MCM2-7 complex (MCM complex) which is the putative replicative helicase essential for 'once per cell cycle' DNA replication initiation and elongation in eukaryotic cells.
<b><i>MCM3</i></b>	DNA replication licensing factor MCM3	Acts as component of the MCM2-7 complex (MCM complex) which is the putative replicative helicase essential for 'once per cell cycle' DNA replication initiation and elongation in eukaryotic cells.
<b><i>MCM4</i></b>	DNA replication licensing factor MCM4	Acts as component of the MCM2-7 complex (MCM complex) which is the putative replicative helicase essential for 'once per cell cycle' DNA replication initiation and elongation in eukaryotic cells.
<b><i>MCM5</i></b>	DNA replication licensing factor MCM5	Acts as component of the MCM2-7 complex (MCM complex) which is the putative replicative helicase essential for 'once per cell cycle' DNA replication initiation and elongation in eukaryotic cells.
<b><i>MCM6</i></b>	DNA replication licensing factor MCM6	Acts as component of the MCM2-7 complex (MCM complex) which is the putative replicative helicase essential for 'once per cell cycle' DNA replication initiation and elongation in eukaryotic cells.
<b><i>MCM7</i></b>	DNA replication licensing factor MCM7	Acts as component of the MCM2-7 complex (MCM complex) which is the putative replicative helicase essential for 'once per cell cycle' DNA replication initiation and elongation in eukaryotic cells.
<b><i>MCM8</i></b>	DNA replication licensing factor MCM8	Component of the MCM8-MCM9 complex, a complex involved in the repair of double-stranded DNA breaks (DBSs) and DNA interstrand cross-links (ICLs) by homologous recombination (HR).
<b><i>MCM10</i></b>	Protein MCM10 homolog	Replication initiation factor that brings together the MCM2-7 helicase and the DNA polymerase alpha/primase complex in order to initiate DNA replication. Plays a role in preventing DNA damage during replication.
<b><i>MELK</i></b>	Maternal embryonic leucine zipper kinase	Ser/thr-protein kinase involved in various processes such as cell cycle regulation, self-renewal of stem cells, apoptosis and splicing regulation.
<b><i>MIS18BP1</i></b>	Mis18-binding protein 1	Required for recruitment of CENPA to centromeres and normal chromosome segregation during mitosis.
<b><i>MKI67</i></b>	Proliferation marker protein Ki-67	Required to maintain individual mitotic chromosomes dispersed in the cytoplasm following nuclear envelope disassembly. Associates with the surface of the mitotic chromosome, the perichromosomal layer, and covers a substantial fraction of the chromosome surface.
<b><i>MMS22L</i></b>	Protein MMS22-like	Component of the MMS22L-TONSL complex, a complex that stimulates the recombination-dependent repair of stalled or collapsed replication forks. It may act by mediating the assembly of RAD51 filaments on ssDNA.
<b><i>MND1</i></b>	Meiotic nuclear division protein 1 homolog	Required for proper homologous chromosome pairing and efficient cross-over and intragenic recombination during meiosis. Stimulates both DMC1/LIM15- and RAD51-mediated homologous strand assimilation, which is required for the resolution of meiotic double-strand breaks.
<b><i>MNS1</i></b>	Meiosis-specific nuclear structural protein 1	Class I alpha-mannosidase essential for early N-glycan processing. Progressively trims alpha-1,2-linked mannose residues.
<b><i>MSH6</i></b>	DNA mismatch repair protein MSH6	Component of the post-replicative DNA mismatch repair system (MMR). Heterodimerizes with MSH2 to form MutS alpha, which binds to DNA mismatches thereby initiating DNA repair. MSH6 provides substrate-binding and substrate specificity to the complex.
<b><i>NASP</i></b>	Nuclear autoantigenic sperm protein	Required for DNA replication, normal cell cycle progression and cell proliferation. Forms a cytoplasmic complex with HSP90 and linker H1 histones and stimulates HSP90 ATPase activity.

<b>NCAPD2</b>	Condensin complex subunit 1	Regulatory subunit of the condensin complex required for conversion of interphase chromatin into mitotic-like condense chromosomes.
<b>NCAPD3</b>	Condensin-2 complex subunit D3	Regulatory subunit of the condensin-2 complex, which establishes mitotic chromosome architecture and physical rigidity of the chromatid axis.
<b>NCAPG</b>	Condensin complex subunit 3	Regulatory subunit of the condensin-2 complex, which establishes mitotic chromosome architecture and physical rigidity of the chromatid axis.
<b>NCAPG2</b>	Condensin-2 complex subunit G2	Regulatory subunit of the condensin-2 complex, which establishes mitotic chromosome architecture and physical rigidity of the chromatid axis.
<b>NCAPH</b>	Condensin-2 complex subunit H2	Regulatory subunit of the condensin-2 complex, a complex that seems to provide chromosomes with an additional level of organization and rigidity and in establishing mitotic chromosome architecture.
<b>NDC80</b>	Kinetochore protein NDC80 homolog	Acts as a component of the essential kinetochore-associated NDC80 complex, which is required for chromosome segregation and spindle checkpoint activity.
<b>NEURL1B</b>	E3 ubiquitin-protein ligase NEURL1B	E3 ubiquitin-protein ligase involved in regulation of the Notch pathway through influencing the stability and activity of several Notch ligands.
<b>NSD2</b>	Histone-lysine N-methyltransferase NSD2	Histone methyltransferase which specifically dimethylates nucleosomal histone H3 at 'Lys-36' (H3K36me2).
<b>NUF2</b>	Kinetochore protein NUF2	Acts as a component of the essential kinetochore-associated NDC80 complex, which is required for chromosome segregation and spindle checkpoint activity.
<b>NUSAP1</b>	Nucleolar and spindle-associated protein 1	Microtubule-associated protein with the capacity to bundle and stabilize microtubules. May associate with chromosomes and promote the organization of mitotic spindle microtubules around them.
<b>ORC1</b>	Origin recognition complex subunit 1	Component of the origin recognition complex (ORC) that binds origins of replication. DNA-binding is ATP-dependent.
<b>ORC6</b>	Origin recognition complex subunit 6	Component of the origin recognition complex (ORC) that binds origins of replication. DNA-binding is ATP-dependent. The specific DNA sequences that define origins of replication have not been identified yet.
<b>PARP1</b>	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	Mediates poly-ADP-ribosylation and plays a key role in DNA repair.
<b>PBK</b>	Lymphokine-activated killer T-cell-originated protein kinase	Phosphorylates MAP kinase p38. Seems to be active only in mitosis. When phosphorylated, forms a complex with TP53, leading to TP53 destabilization and attenuation of G2/M checkpoint during doxorubicin-induced DNA damage.
<b>PCNA</b>	Proliferating cell nuclear antigen	Auxiliary protein of DNA polymerase delta and is involved in the control of eukaryotic DNA replication by increasing the polymerase's processibility during elongation of the leading strand.
<b>PLK1</b>	Serine/threonine-protein kinase PLK1	Ser/thr-protein kinase that performs several important functions throughout M phase of the cell cycle, including the regulation of centrosome maturation and spindle assembly, the removal of cohesins from chromosome arms, the inactivation of APC/C inhibitors, and the regulation of mitotic exit and cytokinesis.
<b>PLK4</b>	Serine/threonine-protein kinase PLK4	Serine/threonine-protein kinase that plays a central role in centriole duplication.
<b>POLA1</b>	DNA polymerase alpha catalytic subunit	Catalytic subunit of the DNA polymerase alpha complex which plays an essential role in the initiation of DNA synthesis.
<b>POLA2</b>	DNA polymerase alpha subunit B	Catalytic subunit of the DNA polymerase alpha complex which plays an essential role in the initiation of DNA synthesis.
<b>POLE</b>	DNA polymerase epsilon catalytic subunit A	Catalytic component of the DNA polymerase epsilon complex. Participates in chromosomal DNA replication.
<b>POLQ</b>	DNA polymerase theta	DNA polymerase that promotes microhomology-mediated end-joining (MMEJ), an alternative non-homologous end-joining (NHEJ) machinery triggered in response to double-strand breaks in DNA. MMEJ is an error-prone repair pathway that produces deletions of sequences from the strand being repaired and promotes genomic rearrangements, such as telomere fusions, some of them leading to cellular transformation.
<b>PRC1</b>	Protein regulator of cytokinesis 1	Key regulator of cytokinesis that cross-links antiparrallel microtubules at an average distance of 35 nM. Essential for controlling the spatiotemporal formation of the midzone and successful cytokinesis.
<b>PRIM1</b>	DNA primase small subunit	Catalytic subunit of the DNA primase complex and component of the DNA polymerase alpha complex which play an essential role in the initiation of DNA synthesis.

<b>PRR11</b>	Proline-rich protein 11	Plays a critical role in cell cycle progression.
<b>PSMC3IP</b>	Homologous-pairing protein 2 homolog	Plays an important role in meiotic recombination.
<b>RACGAP1</b>	Rac GTPase-activating protein 1	Component of the centralspindlin complex that serves as a microtubule-dependent and Rho-mediated signaling required for the myosin contractile ring formation during the cell cycle cytokinesis.
<b>RAD51AP1</b>	RAD51-associated protein 1	Participates in DNA damage response associated with the activation of homologous recombination and double-strand break repair pathway.
<b>RAD54L</b>	DNA repair and recombination protein RAD54-like	Involved in DNA repair and mitotic recombination. Functions in the recombinational DNA repair (RAD52) pathway.
<b>RBL1</b>	Retinoblastoma-like protein 1	Key regulator of entry into cell division. Directly involved in heterochromatin formation by maintaining overall chromatin structure and, in particular, that of constitutive heterochromatin by stabilizing histone methylation.
<b>RFC3</b>	Replication factor C subunit 3	The elongation of primed DNA templates by DNA polymerase delta and epsilon requires the action of the accessory proteins proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and activator 1.
<b>RFC4</b>	Replication factor C subunit 4	The elongation of primed DNA templates by DNA polymerase delta and epsilon requires the action of the accessory proteins proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and activator 1.
<b>RFC5</b>	Replication factor C subunit 5	The elongation of primed DNA templates by DNA polymerase delta and epsilon requires the action of the accessory proteins proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and activator 1.
<b>RFWD3</b>	E3 ubiquitin-protein ligase RFWD3	E3 ubiquitin-protein ligase required for the repair of DNA interstrand cross-links (ICL) in response to DNA damage.
<b>RMI1</b>	RecQ-mediated genome instability protein 1	Essential component of the RMI complex that plays an important role in the processing of homologous recombination intermediates to limit DNA crossover formation in cells.
<b>RRM1</b>	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	Provides the precursors necessary for DNA synthesis. Catalyzes the biosynthesis of deoxyribonucleotides from the corresponding ribonucleotides.
<b>RRM2</b>	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2	Provides the precursors necessary for DNA synthesis. Catalyzes the biosynthesis of deoxyribonucleotides from the corresponding ribonucleotides. Inhibits Wnt signaling.
<b>SASS6</b>	Spindle assembly abnormal protein 6 homolog	Central scaffolding component of the centrioles ensuring their 9-fold symmetry. Required for centrosome biogenesis and duplication: required both for mother-centriole-dependent centriole duplication and deuterosome-dependent centriole amplification in multiciliated cells.
<b>SELENOI</b>	Ethanolaminophosphotransferase 1	Catalyzes phosphatidylethanolamine biosynthesis from CDP-ethanolamine. It thereby plays a central role in the formation and maintenance of vesicular membranes.
<b>SFT2D2</b>	Vesicle transport protein SFT2B	May be involved in fusion of retrograde transport vesicles derived from an endocytic compartment with the Golgi complex.
<b>SGO2</b>	Shugoshin 2	Cooperates with PPP2CA to protect centromeric cohesin from separase-mediated cleavage in oocytes specifically during meiosis I. Has a crucial role in protecting REC8 at centromeres from cleavage by separase.
<b>SHCBP1</b>	SHC SH2 domain-binding protein 1	May play a role in signaling pathways governing cellular proliferation, cell growth and differentiation. Acts as a positive regulator of FGF signaling in neural progenitor cells.
<b>SKA1</b>	Spindle and kinetochore-associated protein 1	Component of the SKA1 complex, a microtubule-binding subcomplex of the outer kinetochore that is essential for proper chromosome segregation.
<b>SLC2A3</b>	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3	Facilitative glucose transporter that can also mediate the uptake of various other monosaccharides across the cell membrane.
<b>SMC4</b>	Structural maintenance of chromosomes protein 4	Central component of the condensin complex, a complex required for conversion of interphase chromatin into mitotic-like condensed chromosomes.
<b>SMCHD1</b>	Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain-containing protein 1	Non-canonical member of the structural maintenance of chromosomes (SMC) protein family that plays a key role in epigenetic silencing by regulating chromatin architecture.
<b>SPAG5</b>	Sperm-associated antigen 5	Essential component of the mitotic spindle required for normal chromosome segregation and progression into anaphase. Required for



		chromosome alignment, normal timing of sister chromatid segregation, and maintenance of spindle pole architecture.
<b>SPC25</b>	Kinetochores protein Spc25	Acts as a component of the essential kinetochore-associated NDC80 complex, which is required for chromosome segregation and spindle checkpoint activity.
<b>STIL</b>	SCL-interrupting locus protein	Plays an important role in cellular growth and proliferation; its long-term silencing affects cell survival and cell cycle distribution as well as decreases CDK1 activity correlated with reduced phosphorylation of CDK1.
<b>TACC3</b>	Transforming acidic coiled-coil-containing protein 3	Plays a role in the microtubule-dependent coupling of the nucleus and the centrosome. Involved in the processes that regulate centrosome-mediated interkinetic nuclear migration (INM) of neural progenitors.
<b>TCF19</b>	Transcription factor 19	Potential trans-activating factor that could play an important role in the transcription of genes required for the later stages of cell cycle progression.
<b>TIMELESS</b>	Protein timeless homolog	It controls DNA replication, maintenance of replication fork stability, maintenance of genome stability throughout normal DNA replication, DNA repair and in the regulation of the circadian clock.
<b>TIMP3</b>	Metalloproteinase inhibitor 3	Complexes with metalloproteinases (such as collagenases) and irreversibly inactivates them by binding to their catalytic zinc cofactor.
<b>TMPO</b>	Lamina-associated polypeptide 2, isoform alpha	May be involved in the structural organization of the nucleus and in the post-mitotic nuclear assembly. Plays an important role, together with LMNA, in the nuclear anchorage of RB1.
<b>TOP2A</b>	DNA topoisomerase 2-alpha	Key decatenating enzyme that alters DNA topology by binding to two double-stranded DNA molecules, generating a double-stranded break in one of the strands, passing the intact strand through the broken strand, and religating the broken strand.
<b>TPX2</b>	Targeting protein for Xklp2	Spindle assembly factor required for normal assembly of mitotic spindles. Required for normal assembly of microtubules during apoptosis. Required for chromatin and/or kinetochore dependent microtubule nucleation.
<b>TTF2</b>	Transcription termination factor 2	DsDNA-dependent ATPase which acts as a transcription termination factor by coupling ATP hydrolysis with removal of RNA polymerase II from the DNA template. May contribute to mitotic transcription repression.
<b>TTK</b>	Dual specificity protein kinase TTK	Phosphorylates proteins on serine, threonine, and tyrosine. Probably associated with cell proliferation.
<b>TYMS</b>	Thymidylate synthase	Contributes to the de novo mitochondrial thymidylate biosynthesis.
<b>UBE2C</b>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C	Accepts ubiquitin from the E1 complex and catalyzes its covalent attachment to other proteins. Acts as an essential factor of the anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C), a cell cycle-regulated ubiquitin ligase that controls progression through mitosis. Acts by initiating 'Lys-11'-linked polyubiquitin chains on APC/C substrates, leading to the degradation of APC/C substrates by the proteasome and promoting mitotic exit.
<b>UBE2T</b>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 T	Accepts ubiquitin from the E1 complex and catalyzes its covalent attachment to other proteins. Catalyzes monoubiquitination. Involved in mitomycin-C (MMC)-induced DNA repair. Acts as a specific E2 ubiquitin-conjugating enzyme for the Fanconi anemia complex by associating with E3 ubiquitin-protein ligase FANCL and catalyzing monoubiquitination of FANCD2, a key step in the DNA damage pathway.
<b>UBR7</b>	Putative E3 ubiquitin-protein ligase UBR7	E3 ubiquitin-protein ligase which is a component of the N-end rule pathway.
<b>UHRF1</b>	E3 ubiquitin-protein ligase UHRF1	Multidomain protein that acts as a key epigenetic regulator by bridging DNA methylation and chromatin modification. Specifically recognizes and binds hemimethylated DNA at replication forks via its YDG domain and recruits DNMT1 methyltransferase to ensure faithful propagation of the DNA methylation patterns through DNA replication.
<b>USP1</b>	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1	Negative regulator of DNA damage repair which specifically deubiquitinates monoubiquitinated FANCD2. Also involved in PCNA-mediated translesion synthesis (TLS) by deubiquitinating monoubiquitinated PCNA.
<b>WDHD1</b>	WD repeat and HMG-box DNA-binding protein 1	Acts as a replication initiation factor that brings together the MCM2-7 helicase and the DNA polymerase alpha/primase complex in order to initiate DNA replication.
<b>WDR76</b>	WD repeat-containing protein 76	Specifically binds 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), suggesting that it acts as a specific reader of 5hmC.

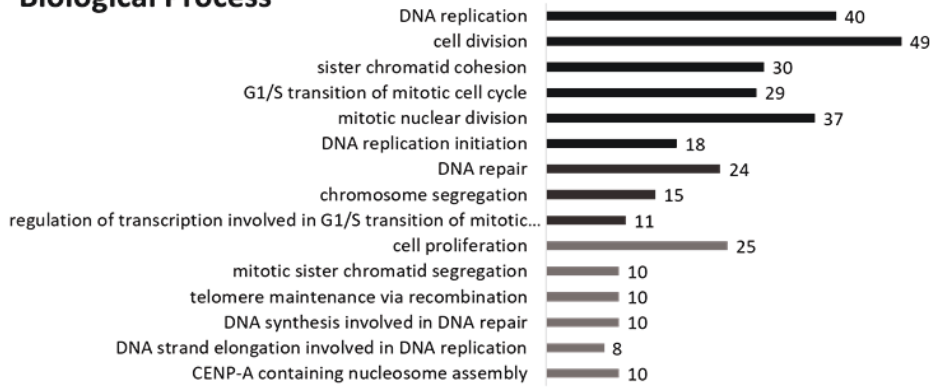
<b>XRCC2</b>	DNA repair protein XRCC2	Involved in the homologous recombination repair (HRR) pathway of double-stranded DNA, thought to repair chromosomal fragmentation, translocations and deletions.
<b>ZGRF1</b>	Protein ZGRF1	This protein contains GRF zinc finger (zf-GRF) and transmembrane domains. GRF zinc fingers are found in a number of DNA-binding proteins.
<b>ZNF367</b>	Zinc finger protein 367	Transcriptional activator. Isoform 1 may be involved in transcriptional activation of erythroid genes.
<b>ZWILCH</b>	Protein zwilch homolog	Essential component of the mitotic checkpoint, which prevents cells from prematurely exiting mitosis. Required for the assembly of the dynein-dynactin and MAD1-MAD2 complexes onto kinetochores.
<b>ZWINT</b>	ZW10 interactor	Part of the MIS12 complex, which is required for kinetochore formation and spindle checkpoint activity.

## B.2. Análisis funcional de los genes alterados

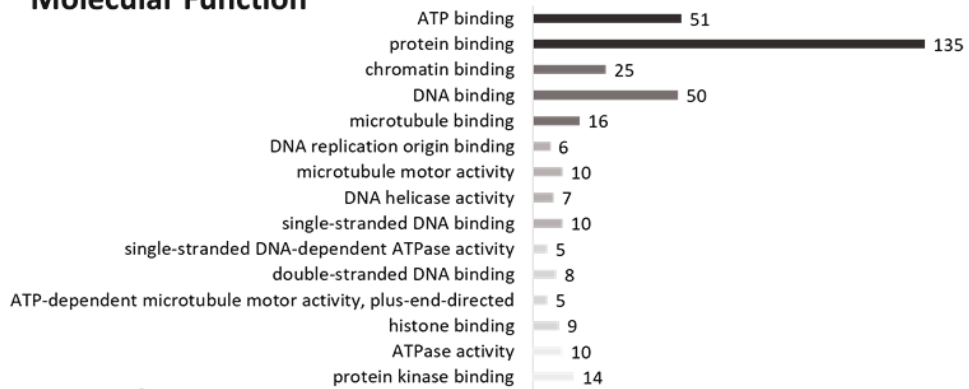
Con esta lista de trabajo se procedió a realizar un análisis funcional de los genes obtenidos en los experimentos de expresión. Para ello se realizó una anotación ontológica de las bases de datos *Gene Ontology* ([www.geneontology.org](http://www.geneontology.org)) y rutas metabólicas KEGG ([www.genome.jp/kegg/](http://www.genome.jp/kegg/)) utilizando la herramienta DAVID (Dennis et al., 2003; Huang et al., 2009) (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) del *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID) de EE. UU. Esta herramienta, además de la clasificación de los genes en las distintas categorías según *Gene Ontology* y vías KEGG, realiza un estudio estadístico en ambos casos para evaluar si hay sobre-representación de los genes diferencialmente expresados. Para el análisis se determinó un valor mínimo de  $p < 0,05$ .

En el análisis funcional mediante la herramienta DAVID del listado de genes comúnmente alterados al interferir WIP, YAP o TAZ en células de GB, cabe destacar una sobre-representación de procesos relacionados con proliferación celular: replicación del DNA, división celular, cohesión de las cromátidas hermanas, transición entre las fases G1/S del ciclo celular, división nuclear mitótica o iniciación de la replicación del DNA, entre otros (**Figura R23 Biological Process**). Dentro de las funciones moleculares alteradas se encuentran principalmente uniones a ATP, a proteínas, a cromatina, a DNA y a microtúbulos (**Figura R23 Molecular Function**). En cuanto a los componentes celulares alterados, destaca fundamentalmente el núcleo (**Figura R23 Cellular Component**). Finalmente, el análisis de vías KEGG mostró una clara afectación de las rutas de ciclo celular y replicación del DNA (**Figura R23 KEGG Pathways**).

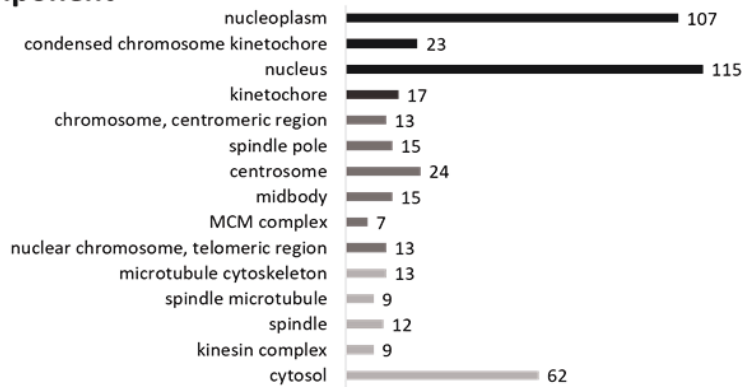
### Biological Process



### Molecular Function



### Cellular Component



### KEGG Pathways

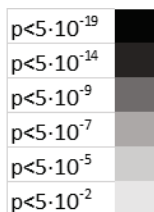
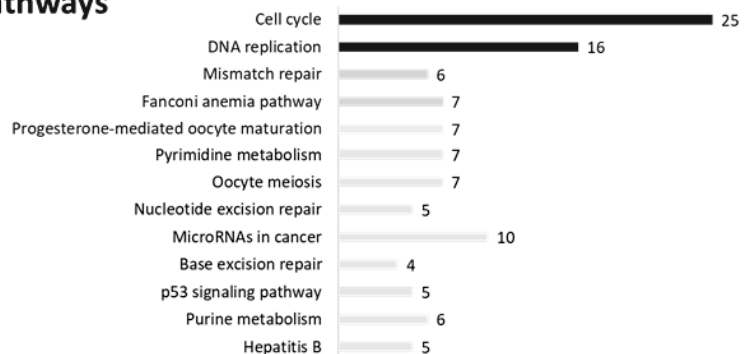


Figura R23 | Categorías GO y vías KEGG comúnmente alteradas al interferir WIP, YAP y TAZ en células de GB U-87 MG. Lista representativa de las principales categorías GO y vías KEGG sobre-representadas de los genes alterados. La longitud de las barras indica el número de genes alterados. La intensidad de las barras indica el valor  $p$ .

Estos resultados ponen de manifiesto la clara implicación que poseen WIP, YAP y TAZ en la proliferación de las células de GB, apoyando así la importancia de la vía protumoral WIP-YAP/TAZ descrita por nuestro grupo de investigación.

### B.3. Comprobación de la expresión de proteínas de ciclo

Los estudios de proliferación, ciclo celular y transcriptómicos realizados en las células U-87 MG de GB, han puesto de manifiesto una clara afectación de la capacidad proliferativa de estas células al interferir WIP, YAP o TAZ, condiciones en las que la expresión de un número importante de genes de ciclo y reparación de DNA se ve reducida. Más concretamente, nuestros resultados parecen indicar una afectación a nivel de transición entre las fases G1 y S del ciclo celular, vista también al interferir IQGAP1.

Por ello, decidimos analizar mediante *western-blot* alguna de las proteínas implicadas en este proceso, como son CDK2, CDK4 y PCNA. Así, en cultivos paralelos en medio con FBS, crecimos células U-87 MG las cuales fueron transducidas con shWIP, shYAP, shTAZ y shIQGAP1, además de shControl, durante 48 horas.

Los resultados obtenidos mostraron una disminución significativa en la cantidad de CDK2 presente en el extracto de proteínas soluble de células U-87 MG al ser interferidas con shWIP, shYAP, shTAZ y shIQGAP1, en comparación con la condición control (**Figura R24A**). Por el contrario, no se apreciaron cambios en los niveles de CDK4 (n=2) y PCNA en ninguna de las condiciones (**Figura R24B y R24C**).

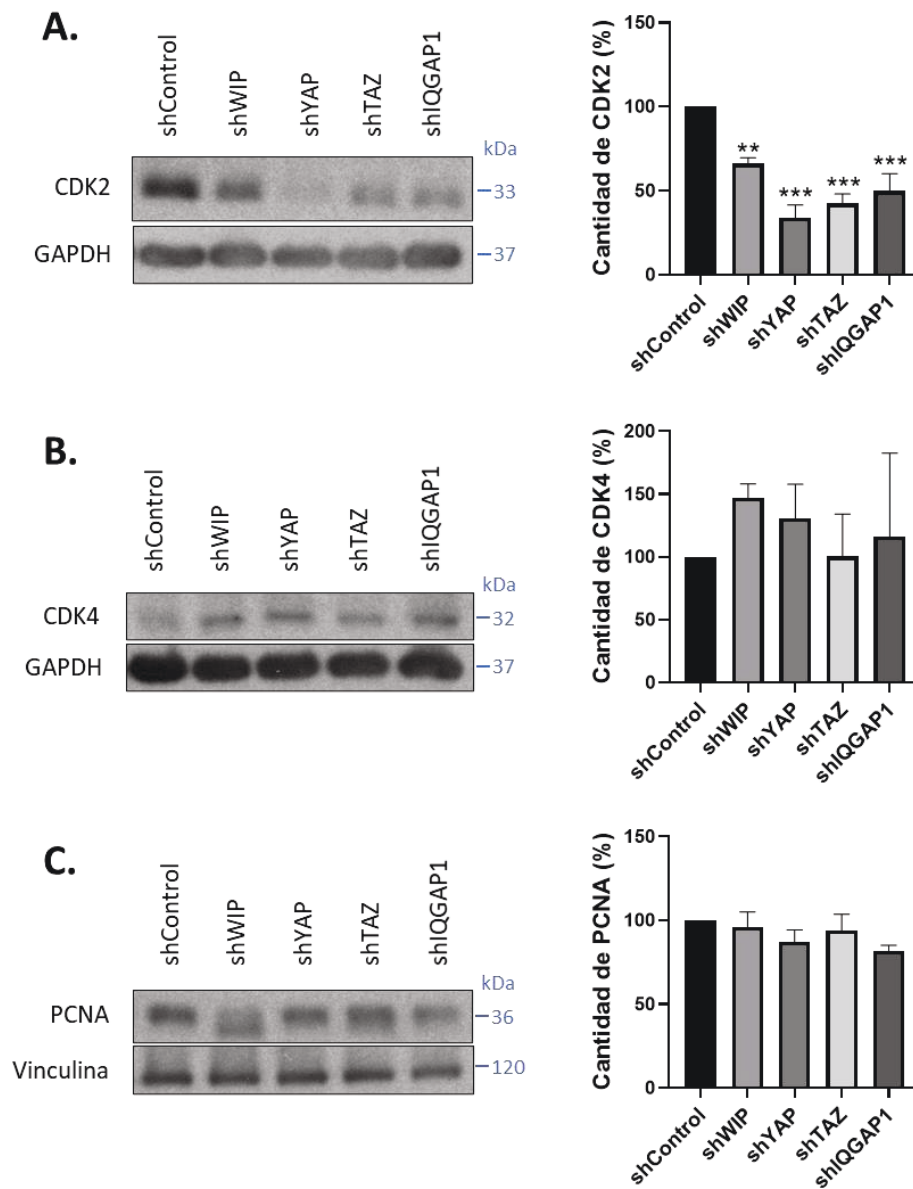


Figura R24 | **Análisis por *western-blot* de proteínas de ciclo.** (A. B. y C. Izquierda) Análisis por *western-blot* del extracto soluble de células de GB U-87 MG con anticuerpos específicos contra CDK2, CDK4 y PCNA, respectivamente, además de contra GAPDH o Vinculina con controles de carga. (A. B. y C. Derecha) Cuantificación de la cantidad de CDK2 (n=3), CDK4 (n=2) y PCNA (n=3), respectivamente, normalizada con respecto a la condición shControl. Las barras de error indican el error típico (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,005$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ).

## DISCUSIÓN

## 1. ESTUDIO DEL PROTEOMA ASOCIADO A WIP EN CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA Y LINFOMA-ALK+.

La proteína WIP ha sido estudiada principalmente por su importante papel en la organización del citoesqueleto de actina y formación de invadopodia, aunque en los últimos años se ha establecido que es una proteína multifuncional, a pesar de que muchas de sus funciones están lejos de ser entendidas por completo (Antón et al., 2002, 2007; Franco et al., 2012; García et al., 2014; Ramesh & Geha, 2009). Nuestro grupo ha descrito que WIP presenta una actividad pro-oncogénica en células de GB, modulando los niveles de los cofactores de transcripción YAP y TAZ, implicados directamente en la progresión tumoral y mantenimiento de las CSCs (Cordenonsi et al., 2011; Gargini et al., 2016; Piccolo et al., 2014; Rivas et al., 2018). Por otro lado, en colaboración con el grupo de Roberto Chiarle, hemos descrito que WIP se comporta como un supresor tumoral en células de linfomas humanos mediados por ALK (Menotti et al., 2019). Estos datos indicarían una conclusión paradójica pero de gran interés: WIP es una proteína con función pro-oncogénica o supresora de tumores dependiendo del linaje celular.

Considerando estos datos previos, nos planteamos en esta tesis analizar el interactoma diferencial asociado a WIP en ambos tipos tumorales con objeto de identificar candidatos que nos permitan explicar la función protumoral de WIP descrita en GB, así como estudiar qué genes se encuentran bajo el control de WIP y determinan dicha función.

Como puesta a punto inicial, caracterizamos el crecimiento de la línea celular U-87 MG de GB como células desdiferenciadas en medio *stem*, condiciones en las que vimos un incremento significativo de la cantidad de WIP en comparación con la detectada al crecer las células adheridas a la placa en medio rico en FBS. Este dato apoya al descrito previamente por nuestro grupo en el que la cantidad de WIP correlaciona con el fenotipo de las CSCs, al menos en GB. También comprobamos, al eliminar/reducir su expresión, que WIP es esencial para el mantenimiento de la proliferación en células de GB (Gargini et al., 2016; Rivas et al., 2018).

Nuestros datos también indican que N-WASP se incrementa de forma paralela a WIP. El incremento de la cantidad de N-WASP visto al crecer las células de GB en condiciones *stem* podría deberse a que ambas proteínas suelen formar un complejo en el que WIP regularía, al menos en parte, la estabilidad de N-WASP (Fried et al., 2014; Moreau et al., 2000), hecho que sí se ha confirmado que ocurre entre WIP y WASP en linfocitos T (de la Fuente et al., 2007).

En paralelo, hemos caracterizado el crecimiento de la línea celular JB6 de linfoma en medio rico en FBS y pudimos comprobar que la cantidad de TAZ que expresan estas células es muy baja. Se ha descrito que TAZ actúa como supresor de tumores en neoplasias hematológicas como el mieloma múltiple, donde su gen codificante, *WWTR1*, se encuentra hipermetilado (Grieve et al., 2019). Además, la sobreexpresión genética de TAZ o el incremento farmacológico de sus niveles mediante agentes desmetilantes, induce apoptosis. Estos datos permiten sugerir que la expresión de altos niveles de TAZ en linajes hematológicos podría comprometer fuertemente la supervivencia. No sería extraño, por tanto, postular que esto ocurra también en las células de linfoma.

Nos resultó sorprendente comprobar que las líneas celulares JB6 o Karpas-299 de linfoma no podían ser cultivadas en medio *stem*. No existe información previa en cuanto al cultivo de las líneas celulares ALCL en medios definidos (libres de suero), ya que su cultivo típico ha sido en medio RPMI en presencia de FBS (Drexler, 2001). Por tanto, debemos suponer que el FBS aporta algún componente al medio de cultivo necesario para la supervivencia y la proliferación de estas células que no está presente en nuestro medio definido *stem*, aun cuando contiene mitógenos como EGF, FGF2 e insulina a alta concentración. Esta última debe activar receptores de tipo IR (*Insulin Receptor*) e IGFR-1 (*Insulin-like Growth Factor Receptor 1*) los cuales, mediante la activación de las vías PI3K-AKT y RAS-MAPK, regulan procesos moleculares que controlan la supervivencia celular y, en asociación con los receptores para EGF y FGF que expresan estas células, también proliferación (Bosch-Barrera et al., 2009).

Tras caracterizar el cultivo de las líneas celulares de GB y linfoma, procedimos a la puesta a punto del proceso de inmunoprecipitación de WIP. En el caso de las células de GB seguimos dos estrategias, inmunoprecipitando la proteína endógena o la sobreexpresada WIP-GFP. Como indicamos en apartado de resultados, el análisis



comparativo de ambas estrategias de inmunoprecipitación mostró 8 proteínas en común, siempre siendo N-WASP el control positivo.

Entre las proteínas aisladas en células de GB, destacaron IQGAP1 y F-box 22 como potenciales candidatos para explicar el papel protumoral de WIP, ya que ambas proteínas aparecen en la literatura relacionadas con progresión tumoral (Johnson et al., 2009; Randle & Laman, 2016; Sun et al., 2018; White et al., 2009). Por un lado, IQGAP1 es una proteína principalmente descrita en funciones relacionadas con el citoesqueleto, modulación de GTPasas (RAC1 y CDC42) y migración celular, lo que le acerca funcionalmente a WIP/WASP (Le Clainche et al., 2007; Watanabe et al., 2015). Por otro lado, F-box 22 pertenece a una familia de proteínas que forman parte de un complejo E3 ubiquitina ligasa responsable de la ubiquitinación de diferentes proteínas para su posterior degradación vía proteasoma 26S (Kipreos & Pagano, 2000). Así, el complejo genérico de ubiquitinación, denominado SCF, estaría compuesto por SKP1/2 (función adaptadora), Cullin (1-7) (función *scaffold*) y F-Box, familia de proteínas que contienen un dominio F-Box el cual aporta especificidad de sustrato al complejo, con capacidad de reconocer a un grupo concreto de proteínas diana para ser marcadas con ubiquitina y posteriormente degradadas (Chen et al., 2015).

Entre las dos proteínas que consideramos candidatas, IQGAP1 presentaba mayores evidencias de poder mostrar una función protumoral en GB por varios motivos: a) existencia de una publicación en la que se propone a IQGAP1 como un biomarcador específico de células que se están amplificando (nestina<sup>+</sup>) dentro del GB; b) se ha descrito interacción directa entre IQGAP1 y YAP (Sayedyahosseini et al., 2016), una de las principales proteínas implicadas en la vía protumoral definida por nuestro grupo; c) la existencia de evidencias, mostradas en los interactomas obtenidos, de que podría interactuar con WIP a través de N-WASP; d) la disponibilidad de reactivos. Por estos motivos centramos nuestro trabajo en analizar el papel de IQGAP1 en el crecimiento del GB como candidato inicial.

En cuanto a los resultados obtenidos en células de linfoma, vimos que las células JB6, así como las Karpas-299, no fueron capaces de proliferar al ser transducidas con la construcción WIP-GFP, cuya expresión tampoco se pudo detectar a las 48 horas post-transducción mediante microscopía de fluorescencia. Este hecho se apoya en datos

publicados, los cuales describen que la sobreexpresión de WIP y de WASP en células ALCL-ALK+ produce una disminución de la proliferación, por parada de las células en fase G1 del ciclo celular (Menotti et al., 2019). Además, también se ha descrito que la sobreexpresión de WASP incrementa la muerte por apoptosis en dichas células, por lo que no sería extraño que hubiese ocurrido lo mismo en nuestras células al sobreexpresar WIP-GFP. Esto explicaría por qué no podemos expresar la proteína de fusión (WIP-GFP) a un nivel suficientemente alto para poder ser detectada mediante microscopía de fluorescencia. Por otro lado, los datos de linfomas-ALK+ sugerían que la expresión de WIP y WASP a la vez sí genera un nivel de estabilidad suficiente para que ambas proteínas se puedan observar y además, esos linfomas pierden capacidad oncogénica (Menotti et al., 2019).

Entre las proteínas aisladas en células de linfoma junto a WIP, destacaron elementos implicados en regular la degradación de proteínas mediada por proteasoma. Es conocido el dato de que WIP regula la estabilidad de WASP, protegiéndolo de ser degradado por calpaínas y proteasoma (de la Fuente et al., 2007). También se ha descrito que WIP es capaz de regular la degradación de SYK (tirosina quinasa que interviene en la diferenciación y activación celular mediada por el receptor de células T, TCR) en mastocitos (Kettner et al., 2004) y, más recientemente, de estabilizar niveles altos de YAP/TAZ en GB. De hecho, nuestros resultados demostraban que la bajada de niveles de YAP/TAZ tras la reducción de WIP se puede compensar por inhibición del proteasoma (Gargini et al., 2016). Todas estas publicaciones ponen de manifiesto el papel de WIP en el control de la degradación de ciertas proteínas, lo que nos lleva a pensar, basándonos en nuestros resultados proteómicos obtenidos en células de linfoma, que pudiese modular, a través de su interacción directa con proteínas reguladoras del proteasoma, la degradación de elementos implicados en proliferación celular.

Por otro lado, el análisis comparativo de las proteínas aisladas por inmunoprecipitación en células de GB y linfoma muestra, además de WIP, solo una proteína coincidente en ambos tumores, serpina H1, la cual actúa como chaperona en la síntesis de colágeno intracelular pero que no hemos asociado, por el momento, a ninguna actividad relacionada con WIP.

Por todo ello, los resultados obtenidos en los experimentos de inmunoprecipitación y proteómica apoyan la hipótesis de nuestro trabajo basada en que el proteoma asociado a WIP en células de GB y de linfoma es diferente.

## 2. ANÁLISIS DEL PAPEL DE IQGAP1 EN EL CRECIMIENTO DE GLIOBLASTOMAS

Tras seleccionar a IQGAP1 como candidata de estudio, quisimos analizar su implicación en el crecimiento de células de GB. Al caracterizar IQGAP1, observamos que sus niveles de proteína se ven significativamente incrementados al crecer las células de GB en medio *stem*. Este dato corrobora los resultados de otros autores donde se observa que IQGAP1 se encuentra sobreexpresada en progenitores neurales de GB de rata que se están amplificando (*nestina*<sup>+</sup>, marcador de células *stem* del sistema nervioso central) al ser crecidos *in vitro* como neuroesferas (Balenci et al., 2006), además de haberse descrito una colocalización de IQGAP1 y *nestina* en estudios de microscopía confocal realizados en muestras de tejido de GB de rata y humano (Balenci et al., 2006; Rotoli et al., 2017).

En contraste, trabajos realizados en carcinoma epitelial de ovario y cáncer gástrico, describen que los niveles de IQGAP1 se encuentran disminuidos en las CSCs (Bessède et al., 2016; Huang et al., 2015). Todo ello indica que, probablemente, IQGAP1 realiza funciones específicas en las CSCs dependiendo del tipo de tejido, ya que no muestra un patrón común.

También vimos que la interferencia de WIP, YAP o TAZ no produjo cambios en los niveles de IQGAP1. Sin embargo, la interferencia de IQGAP1 sí produjo una disminución significativa de los niveles de YAP, sin afectar a los niveles de TAZ ni de WIP. Artículos recientes han descrito que IQGAP1 es capaz de interactuar directamente con YAP y modular su actividad (Anakk et al., 2013; Delgado et al., 2021; Sayedyahosseini et al., 2016), lo que nos lleva a pensar que IQGAP1 podría modular de algún modo la estabilidad o expresión de YAP en células de GB.

Son numerosos los estudios que describen que IQGAP1 se encuentra sobreexpresada en diferentes tipos tumorales, entre ellos el GB (McDonald et al., 2007), lo que le hace ser una proteína claramente relacionada con proliferación y progresión tumoral, directa o indirectamente.

De hecho, apoyando a dichos estudios, un análisis de los datos de tumores primarios humanos de GB obtenidos de la red de investigación denominada *Tumour Cancer Genome Atlas* (TCGA), realizado en colaboración con el Dr. Ramón García-Escudero del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), muestra altos niveles de expresión de IQGAP1 en tumores primarios en comparación con tejido sano (**Figura D1**), lo que pone de manifiesto que IQGAP1 se comporta en células de GB como un oncogén.



Figura D1 | Análisis de los niveles de expresión de IQGAP1 en tumores primarios de GB y en tejido sano. Estudio realizado a partir del conjunto de datos de la red de investigación TCGA.

Además, el análisis por Kaplan-Meier de GBs humanos muestra que pacientes con tumores caracterizados con bajos niveles de IQGAP1 correlacionan con una mayor probabilidad de supervivencia en comparación con aquellos pacientes que poseen tumores caracterizados con altos niveles de IQGAP1 (**Figura D2**). Estos datos son muy similares a los ya publicados por nuestro grupo para el caso de WIP en GBs (Gargini et al., 2016).

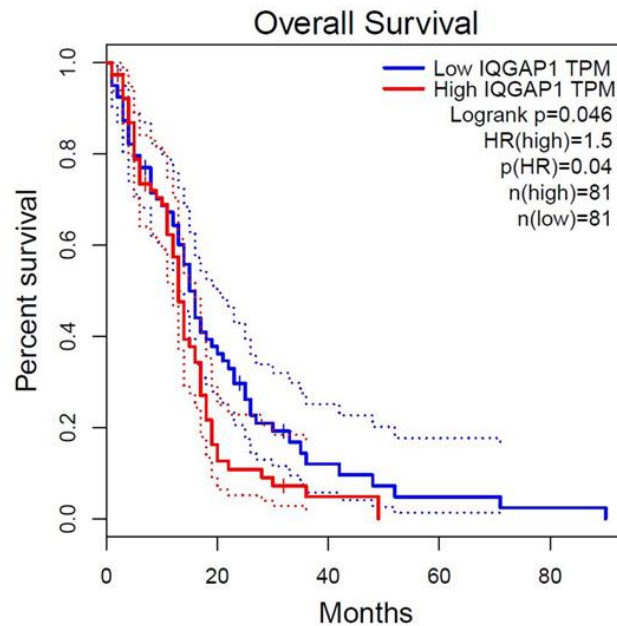


Figura D2 | **Curvas de supervivencia de pacientes con GB caracterizados como alto/bajo nivel de expresión de IQGAP1.** La expresión del gen *IQGAP1* y los datos de supervivencia general de seguimiento de los tumores de GB humano correspondientes a los conjuntos de datos de TCGA y Freije se descargaron respectivamente de Bioportal (<http://www.cbioportal.org>) y de la base de datos GEO (*Gene Expression Omnibus*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>).

Por todo ello, quisimos analizar si IQGAP1 está implicada en la proliferación de células de GB. Nuestros resultados mostraron una disminución significativa de la proliferación al interferir IQGAP1, poniendo de manifiesto su participación en proliferación celular. Como controles internos, pudimos comprobar el mismo efecto al interferir WIP, YAP y TAZ. Vimos también que esa disminución en proliferación no se debía a un freno que ocurre de manera genérica en varios momentos del ciclo celular, sino que las células interferidas quedaban retenidas en fase G1 del ciclo, de manera análoga a lo que ocurre al interferir WIP. Nuestros resultados se ven reforzados por los de otro trabajo donde se describe una acumulación nuclear de IQGAP1 durante las fases G1/S del ciclo celular (Johnson et al., 2011). Por tanto, es posible proponer que IQGAP1 posee un importante papel en el mantenimiento de la proliferación de las células de GB. También es tentador proponer que tanto IQGAP1 como WIP podrían regular algunas de las proteínas que controlan de la transición entre las fases G1/S del ciclo celular (*checkpoints*).

Para profundizar en el estudio del papel protumoral de IQGAP1 en células de GB, realizamos el experimento complementario de sobreexpresión y análisis de la capacidad de las células para crecer de forma independiente de anclaje, mediante el modelo de agar blando. Así, comprobamos que la sobreexpresión de IQGAP1 incrementa significativamente la capacidad de crecimiento independiente de anclaje de las células de GB, al igual que ocurre al sobreexpresar la versión mutante de YAP no degradable (YAPS5A), como nuestro grupo había descrito previamente (Escoll et al., 2017). Además, no vimos cambios en la distribución de las células a lo largo del ciclo celular, aunque este resultado tiene que ser replicado para poder confirmarlo y, por otro lado, para determinar el tiempo que dura el ciclo celular en ambas situaciones.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la importancia de IQGAP1 en la proliferación de las células de GB, pudiendo ser un potencial responsable de la capacidad protumoral que presenta WIP en este tipo de tumor.

Debemos recordar que nuestros datos previos indicaban que la inhibición de RAC1 y de PAK comprometía la capacidad de WIP para estabilizar YAP/TAZ, siendo por tanto proteínas esenciales para que WIP pueda potenciar la proliferación celular y dar lugar a la formación del tumor (Gargini et al., 2016). Por otro lado, se ha descrito que IQGAP1 es capaz de interactuar con RAC1, CDC42 y N-WASP, entre otros (Jacquemet & Humphries, 2013; Li et al., 1999). Si analizamos la existencia de evidencias de interacción que hay descritas entre dichas proteínas e IQGAP1, WIP, YAP y TAZ, mediante la herramienta bioinformática STRING 11, obtenemos la red de interacciones mostrada en la **Figura D3**.

Podemos observar que existen evidencias de interacción entre todas las proteínas, generando un esquema en el que IQGAP1 parece actuar como un puente entre la red de interacción formada por WIP con las diferentes GTPasas (RAC1, CDC42) y efectores (N-WASP, PAK), y la formada por los cofactores de transcripción YAP y TAZ. Como vimos en nuestros resultados del análisis de los componentes de los diferentes interactomas de WIP, parece que la interacción existente entre WIP e IQGAP1 podría darse de forma indirecta a través de N-WASP, CDC42 o RAC1.

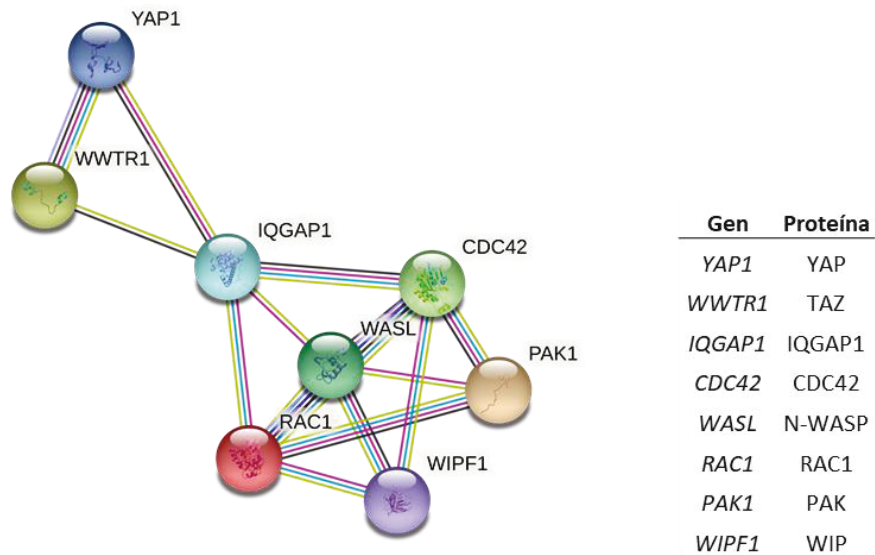


Figura D3 | Red de interacciones descrita entre las GTPasas RAC1 y CDC42, los efectores N-WASP y PAK, WIP, IQGAP1 y los cofactores de transcripción YAP y TAZ. Interactoma obtenido mediante la herramienta STRING 11. Cada nodo representa una proteína, nombrada con el nombre de su gen codificante. Un mayor número de puentes entre nodos hace referencia a una mayor evidencia de interacción.

Sin embargo, queda aún por comprobar la posición jerárquica que existe entre WIP e IQGAP1 para poder dibujar un posible modelo mecánico en el que ambas proteínas queden conectadas regulando la proliferación de las células de GB.

### 3. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DIFERENCIAL WIP-YAP/TAZ Y COMPROBACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE CICLO CELULAR

El segundo objetivo de este trabajo era analizar el transcriptoma diferencial en células de GB para identificar candidatos que expliquen las funciones pro-oncogénicas de WIP. Nuestra hipótesis de trabajo indica que WIP estaría en una posición jerárquica sobre YAP/TAZ, lo que sugiere que deben compartir ciertas dianas genómicas que expliquen su función protumoral análoga.

Analizamos el transcriptoma asociado a WIP, a YAP y a TAZ con objeto de identificar qué genes están bajo el control de WIP que sean análogos a los controlados por los cofactores de transcripción YAP y TAZ. Utilizando la herramienta bioinformática

Venny 2.1, realizamos un análisis diferencial de los genes cuya expresión se ve alterada de forma significativa en común al interferir WIP, YAP o TAZ con respecto a la situación control sin transducir. De esta forma, pudimos identificar los genes comunes cuya expresión está controlada por la vía protumoral WIP-YAP/TAZ. Identificamos un total de 179 genes (**Tabla R4**), los cuales fueron representados en un gráfico *heat map* (**Figura R22**), siendo coloreados en rojo aquellos cuya expresión se ve disminuida (logaritmo en base 2 negativo) o en azul aquellos cuya expresión se ve incrementada (logaritmo en base 2 positivo) con respecto a la situación control. Del total de genes identificados cuya expresión se ve alterada, 175 son reprimidos por la falta de función de WIP, YAP y TAZ, mientras que sólo 4 se ven sobreexpresados.

El análisis funcional de dichos genes, realizado utilizando la herramienta DAVID, mostró una sobre-representación de los procesos relacionados con la regulación del ciclo celular (por ejemplo: *PLK1, PLK4, CCNA2, CCNB2, CDC25A, CDC5-7, CDKN3*), regulación de centrómeros (por ejemplo: *CENPE-F, CENPH-I, CENPK, CENPN, CENPO-Q, CENPU, CEP55, CEP78*), condensación/descondensación de la cromatina (por ejemplo: *CDT1, CHAF1A, CHAF1B, DDX11, DEK, HMGB2-3, NCAPD2, NCAPD3, NCAPG, NCAPG2, NCAPH*), replicación y reparación del DNA (por ejemplo: *CDT1, DNA2, FANCD2, FANCI, FEN1, GEN1, GINS2, GINS4, MCM2-8, MCM10, RAD54L, RBL1, RFC3-5, POLA1, POLA2, POLE, POLQ*), proteínas estructurales y motoras esenciales para la generación y movimiento de cromosomas en el huso mitótico (por ejemplo: *BUB1, BUB1B, KIF11, KNSTRN, KNTC1, KNL1, KIF15, KIF18A-B, KIF20B, KIF22, KIF23, KIF2C, KIF4A*), así como un grupo de proteínas relacionadas con regulación de los procesos de ubiquitinación/degradación (por ejemplo: *UBE2C, UBE2T, UBR7, UHRF1, USP1, NEURL1B, FBXO5, RFWD3, DTL*). Todos ellos son procesos fundamentales relacionados con proliferación celular.

Es interesante resaltar que, entre los genes cuya expresión/transcripción está regulada por WIP-YAP/TAZ, aparecen pro-oncogenes y genes supresores de tumores como son *BRCA1, E2F1* o *E2F8*. De ellos, destaca el gen *BRCA1* que codifica la proteína BRCA1, la cual actúa como un supresor de tumores que ayuda a reparar el DNA dañado y, por tanto, es esencial en el mantenimiento de la estabilidad genética, junto con las proteínas reparadoras codificadas por otros de los genes alterados como son *FANCD2*,



*RAD51*, *RAD54L* o *XRCC2*. Además, *BRCA1* puede interactuar con las proteínas codificadas por los genes *BRIP1*, *BRI3BP* y *TP53* para regular la parada del ciclo celular en el punto de control G1/S como respuesta a daño en el DNA, con objeto de evitar su replicación y dar tiempo a activar los diferentes mecanismos que permiten su reparación (Gorodetska et al., 2019).

Los resultados obtenidos mediante genómica diferencial se complementan, no solo con los obtenidos en los experimentos de proliferación y ciclo celular, sino también con los publicados previamente por nuestro grupo de investigación en los cuales vimos que las mutaciones en p53 promueven la proliferación de las células de GB a través de la vía WIP-YAP/TAZ (Escoll et al., 2017; Gargini et al., 2016). De esta manera, reforzamos la importancia que posee la vía protumoral WIP-YAP/TAZ en la progresión tumoral del GB.

Por otro lado, nuestros resultados muestran que WIP, YAP y TAZ regulan los genes *E2F1* y *E2F8*, junto con los marcadores de ciclo celular *PCNA* y *MKI67*. La familia de los factores de transcripción E2F está implicada en la regulación de la expresión de genes necesarios para la replicación del DNA y la progresión del ciclo celular durante la transición G1/S. Las proteínas E2F generalmente se dividen en dos grupos funcionales: activadores de la transcripción, entre los que se encuentra *E2F1*, que promueven y ayudan a llevar a cabo el ciclo celular y son considerados como protumorales, y los represores de la transcripción, entre los que se encuentra *E2F8*, que inhiben la progresión del ciclo y son considerados supresores de tumores. La proteína pRb es capaz de unirse a los factores E2F activadores, como *E2F1*, lo que impide la transcripción de sus genes diana. Estos factores son liberados del complejo pRb-E2F cuando pRb es hiperfosforilado y, de esta manera, pueden activar a sus genes diana, lo que facilita la progresión del ciclo entre las fases G1/S (Ahlander & Bosco, 2009; Fischer & Müller, 2017).

Asimismo, además de *E2F1*, hay diversos genes regulados por WIP que podrían ser reguladores de la transición entre las fases G1 y S del ciclo celular, como son, *CCNA2*, *CCNE2*, *CDK1*, *CDC7*, *RBL1* o *FBXO5* (cuya proteína codificada forma parte de algunos complejos SCF), entre otros (**Figura D4**).

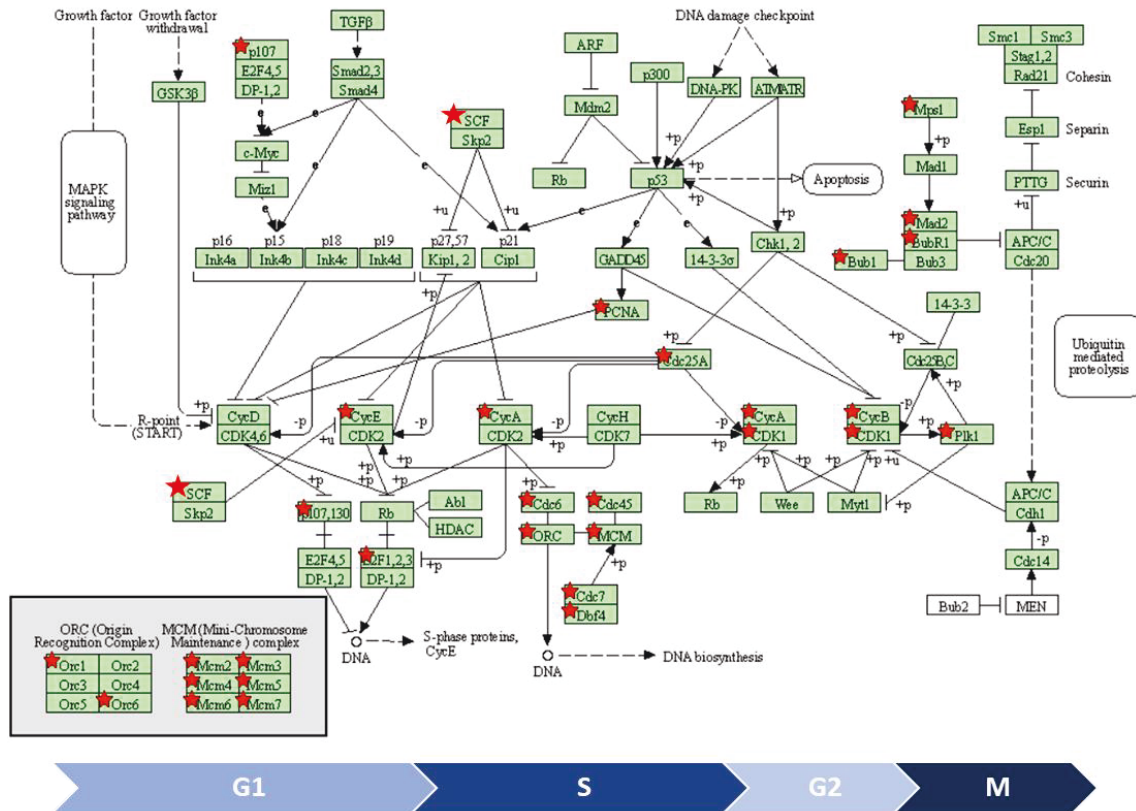


Figura D4 | Representación esquemática de los principales elementos implicados en ciclo celular cuya expresión se ve afectada por la interferencia de WIP-YAP/TAZ en células de GB. Esquema de ciclo celular obtenido de la base de datos de vías KEGG. Aquellos genes cuya expresión se ve significativamente alterada al interferir WIP-YAP/TAZ se marcan con una estrella roja sobre su producto proteico.

Nuestros resultados también indicaban que la interferencia de WIP-YAP/TAZ afecta a elementos implicados en otras fases del ciclo celular, como son *CCNB2*, *PLK1*, *CDC25A*, *TTK*, *BUB1*, *BUB1B* o *MAD2L1*, los cuales están relacionado con la progresión del ciclo entre las fases G2 y M.

A la espera de poder validar mediante q-PCR todos los genes regulados por WIP que hemos identificado en los análisis de RNA-seq, decidimos analizar mediante *western-blot* alguna de las proteínas implicadas en la transición G1/S, como son CDK2, CDK4 y PCNA. Considerando que se trata sólo de un experimento piloto, los datos obtenidos sugieren que la interferencia de WIP, YAP, TAZ e incluso de IQGAP1, produjo una disminución significativa de la cantidad de CDK2, sin apreciarse diferencias en la cantidad de CDK4 y PCNA respecto a la condición control. El hecho de que los niveles de CDK4 y PCNA no se vean modificados puede deberse a que hay un desfase entre la regulación de la cantidad de mRNA y de proteína, por lo que consideramos que para

hacer un análisis más exhaustivo deberíamos considerar hacer una curva temporal hasta 72 horas post-transducción. Además, sería interesante estudiar otros marcadores celulares característicos de la transición entre las fases G1/S del ciclo como son ciclina D1, ciclina E o la proteína pRb para corroborar nuestros resultados.

Los datos aquí obtenidos ponen de manifiesto la importancia de la vía de señalización oncogénica formada por WIP-YAP/TAZ, la cual regula el proceso de proliferación a través del control de la expresión de diversos genes implicados en ciclo celular. Aportamos claves muy novedosas que señalan que WIP y, probablemente, IQGAP1 poseen la capacidad de controlar el ciclo celular a través de la regulación génica que comparten con los cofactores de transcripción YAP y TAZ, siendo la sobreexpresión/sobreactivación de esta vía un fenómeno clave para el avance del proceso oncogénico, al menos en GBs, y, por tanto, una potencial diana terapéutica.

## CONCLUSIONES

1. El proteoma asociado a WIP en células de GB es sustancialmente diferente al de células de linfoma ALCL-ALK+, y solamente detectamos una proteína asociada en común: serpina H1.
2. De las proteínas asociadas a WIP en células de GB, hemos considerado de interés a IQGAP1 y a F-box 22 como potenciales candidatos responsables de la función protumoral de WIP.
3. El estudio realizado sobre IQGAP1 muestra que su silenciamiento, al igual que el de WIP, YAP y TAZ, reduce la proliferación de las células de GB U-87 MG.
4. Además, el silenciamiento de IQGAP1, así como el de WIP, YAP y TAZ, produce una parada del ciclo celular en la transición entre las fases G1/S.
5. La sobreexpresión de IQGAP1 potencia la capacidad tumoral de las células U-87 MG de GB al incrementar su capacidad de crecimiento independiente de anclaje en cultivo en agar blando.
6. A partir de estos resultados, se propone que IQGAP1, en asociación con WIP, posee un papel esencial en el mantenimiento de la proliferación en células de GB, quedando por determinar la jerarquía existente entre ambas proteínas.
7. El análisis transcriptómico diferencial, realizado tras el silenciamiento de la expresión de WIP, YAP o TAZ en células U-87 MG de GB, indica que existen 175 genes comunes cuya expresión se ve significativamente reducida.
8. El análisis funcional de los productos de dichos genes indica que, mayoritariamente, corresponden con reguladores del ciclo celular, reparación y replicación del DNA, proteínas estructurales y motoras esenciales para la generación y movimiento de los cromosomas en el huso mitótico y proteínas relacionadas con regulación de los procesos de ubiquitinación/degradación.
9. Además, se han identificado factores de transcripción importantes en el inicio de la fase G1 del ciclo celular que ponen de manifiesto que WIP tiene capacidad de regular el ciclo celular de forma similar a los cofactores de transcripción YAP y TAZ.
10. Todo ello refuerza la importancia de la vía protumoral WIP-YAP/TAZ en la regulación de la proliferación de células de GB a través del control de la expresión de diversos genes implicados en ciclo celular.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahlander, J., & Bosco, G. (2009). The RB/E2F pathway and regulation of RNA processing. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 384(3), 280–283. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.04.107>
- Anakk, S., Bhosale, M., Schmidt, V. A., Johnson, R. L., Finegold, M. J., & Moore, D. D. (2013). Bile Acids Activate YAP to Promote Liver Carcinogenesis. *Cell Reports*, 5(4), 1060–1069. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.030>
- Andl, T., Zhou, L., Yang, K., Kadekaro, A. L., & Zhang, Y. (2017). YAP and WWTR1: New targets for skin cancer treatment. *Cancer Letters*, 396, 30–41. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.03.001>
- Anjum, K., Shagufta, B. I., Abbas, S. Q., Patel, S., Khan, I., Shah, S. A. A., Akhter, N., & Hassan, S. S. ul. (2017). Current status and future therapeutic perspectives of glioblastoma multiforme (GBM) therapy: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 92, 681–689. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.125>
- Antón, I. M., de la Fuente, M. A., Sims, T. N., Freeman, S., Ramesh, N., Hartwig, J. H., Dustin, M. L., & Geha, R. S. (2002). WIP Deficiency Reveals a Differential Role for WIP and the Actin Cytoskeleton in T and B Cell Activation. *Immunity*, 16(2), 193–204. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00268-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00268-6)
- Antón, I. M., Jones, G. E., Wandosell, F., Geha, R., & Ramesh, N. (2007). WASP-interacting protein (WIP): working in polymerisation and much more. *Trends in Cell Biology*, 17(11), 555–562. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.08.005>
- Antón, I. M., Lu, W., Mayer, B. J., Ramesh, N., & Geha, R. S. (1998). The Wiskott-Aldrich Syndrome Protein-interacting Protein (WIP) Binds to the Adaptor Protein Nck. *Journal of Biological Chemistry*, 273(33), 20992–20995. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.33.20992>
- Aspenström, P. (2004). The mammalian verprolin homologue WIRE participates in receptor-mediated endocytosis and regulation of the actin filament system by distinct mechanisms. *Experimental Cell Research*, 298(2), 485–498. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.04.050>
- Aspenström, P. (2005). The verprolin family of proteins: Regulators of cell morphogenesis and endocytosis. *FEBS Letters*, 579(24), 5253–5259. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.08.053>
- Aspenström, P., Lindberg, U., & Hall, A. (1996). Two GTPases, Cdc42 and Rac, bind directly to a protein implicated in the immunodeficiency disorder Wiskott–Aldrich syndrome. *Current Biology*, 6(1), 70–75. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00423-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00423-2)
- Azzolin, L., Panciera, T., Soligo, S., Enzo, E., Bicciato, S., Dupont, S., Bresolin, S., Frasson, C., Basso, G., Guzzardo, V., Fassina, A., Cordenonsi, M., & Piccolo, S. (2014). YAP/TAZ Incorporation in the  $\beta$ -Catenin Destruction Complex Orchestrates the Wnt Response. *Cell*, 158(1), 157–170. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.013>
- Azzolin, L., Zanconato, F., Bresolin, S., Forcato, M., Basso, G., Bicciato, S., Cordenonsi, M., & Piccolo, S. (2012). Role of TAZ as Mediator of Wnt Signaling. *Cell*, 151(7), 1443–1456. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.027>
- Balenci, L., Clarke, I. D., Dirks, P. B., Assard, N., Ducray, F., Jouvét, A., Belin, M.-F., Honnorat, J., & Baudier, J. (2006). IQGAP1 Protein Specifies Amplifying Cancer Cells in Glioblastoma Multiforme. *Cancer Research*, 66(18), 9074–9082. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0761>

- Bañón-Rodríguez, I., Monypenny, J., Ragazzini, C., Franco, A., Calle, Y., Jones, G. E., & Antón, I. M. (2011). The cortactin-binding domain of WIP is essential for podosome formation and extracellular matrix degradation by murine dendritic cells. *European Journal of Cell Biology*, *90*(2–3), 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2010.09.001>
- Banon-Rodriguez, I., Saez de Guinoa, J., Bernardini, A., Ragazzini, C., Fernandez, E., Carrasco, Y. R., Jones, G. E., Wandosell, F., & Anton, I. M. (2013). WIP Regulates Persistence of Cell Migration and Ruffle Formation in Both Mesenchymal and Amoeboid Modes of Motility. *PLoS ONE*, *8*(8), e70364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070364>
- Bartek, J., Lukas, C., & Lukas, J. (2004). Checking on DNA damage in S phase. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *5*(10), 792–804. <https://doi.org/10.1038/nrm1493>
- Baselga, J. (2011). Targeting the Phosphoinositide-3 (PI3) Kinase Pathway in Breast Cancer. *The Oncologist*, *16*(S1), 12–19. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2011-S1-12>
- Bensenor, L. B., Kan, H.-M., Wang, N., Wallrabe, H., Davidson, L. A., Cai, Y., Schafer, D. A., & Bloom, G. S. (2007). IQGAP1 regulates cell motility by linking growth factor signaling to actin assembly. *Journal of Cell Science*, *120*(4), 658–669. <https://doi.org/10.1242/jcs.03376>
- Bessède, E., Molina, S., Amador, L. A., Dubus, P., Staedel, C., Chambonnier, L., Buissonnière, A., Sifré, E., Giese, A., Bénéjat, L., Rousseau, B., Costet, P., Sacks, D. B., Mégraud, F., & Varon, C. (2016). Deletion of IQGAP1 promotes Helicobacter pylori -induced gastric dysplasia in mice and acquisition of cancer stem cell properties in vitro. *Oncotarget*, *7*(49), 80688–80699. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12486>
- Bhaskar, P. T., & Hay, N. (2007). The Two TORCs and Akt. *Developmental Cell*, *12*(4), 487–502. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.03.020>
- Bhat, K. P. L., Salazar, K. L., Balasubramaniyan, V., Wani, K., Heathcock, L., Hollingsworth, F., James, J. D., Gumin, J., Diefes, K. L., Kim, S. H., Turski, A., Azodi, Y., Yang, Y., Doucette, T., Colman, H., Sulman, E. P., Lang, F. F., Rao, G., Copray, S., ... Aldape, K. D. (2011). The transcriptional coactivator TAZ regulates mesenchymal differentiation in malignant glioma. *Genes & Development*, *25*(24), 2594–2609. <https://doi.org/10.1101/gad.176800.111>
- Bjerkvig, R., Tysnes, B. B., Aboody, K. S., Najbauer, J., & Terzis, A. J. A. (2005). The origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nature Reviews Cancer*, *5*(11), 899–904. <https://doi.org/10.1038/nrc1740>
- Bosch-Barrera, J., Hernández, A., & Abella, L. E. (2009). La vía de la insulina y el factor de crecimiento similar a la insulina, una nueva diana terapéutica en oncología. *Anales Del Sistema Sanitario de Navarra*, *32*(3), 413–421. <https://doi.org/10.4321/S1137-66272009000500011>
- Brabletz, T., Hlubek, F., Spaderna, S., Schmalhofer, O., Hiendlmeyer, E., Jung, A., & Kirchner, T. (2005). Invasion and Metastasis in Colorectal Cancer: Epithelial-Mesenchymal Transition, Mesenchymal-Epithelial Transition, Stem Cells and  $\beta$ -Catenin. *Cells Tissues Organs*, *179*(1–2), 56–65. <https://doi.org/10.1159/000084509>
- Brennan, C. W., Verhaak, R. G. W., McKenna, A., Campos, B., Noushmehr, H., Salama, S. R., Zheng, S., Chakravarty, D., Sanborn, J. Z., Berman, S. H., Beroukhi, R., Bernard, B., Wu, C.-J., Genovese, G., Shmulevich, I., Barnholtz-Sloan, J., Zou, L., Vegesna, R., Shukla, S. A., ... McLendon, R. (2013). The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell*, *155*(2), 462–477. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.034>



- Brill, S., Li, S., Lyman, C. W., Church, D. M., Wasmuth, J. J., Weissbach, L., Bernards, A., & Snijders, A. J. (1996). The Ras GTPase-activating-protein-related human protein IQGAP2 harbors a potential actin binding domain and interacts with calmodulin and Rho family GTPases. *Molecular and Cellular Biology*, *16*(9), 4869–4878. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.9.4869>
- Brown, M. D., & Sacks, D. B. (2006). IQGAP1 in cellular signaling: bridging the GAP. *Trends in Cell Biology*, *16*(5), 242–249. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.03.002>
- Burke, D. J., & Stukenberg, P. T. (2008). Linking Kinetochores-Microtubule Binding to the Spindle Checkpoint. *Developmental Cell*, *14*(4), 474–479. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.03.015>
- Castellan, M., Guarnieri, A., Fujimura, A., Zanconato, F., Battilana, G., Panciera, T., Sladitschek, H. L., Contessotto, P., Citron, A., Grilli, A., Romano, O., Bicciato, S., Fassan, M., Porcù, E., Rosato, A., Cordenonsi, M., & Piccolo, S. (2021). Single-cell analyses reveal YAP/TAZ as regulators of stemness and cell plasticity in glioblastoma. *Nature Cancer*, *2*(2), 174–188. <https://doi.org/10.1038/s43018-020-00150-z>
- Castellano, E., Molina-Arcas, M., Krygowska, A. A., East, P., Warne, P., Nicol, A., & Downward, J. (2016). RAS signalling through PI3-Kinase controls cell migration via modulation of Reelin expression. *Nature Communications*, *7*(1), 11245. <https://doi.org/10.1038/ncomms11245>
- Chen, Q., Zhang, N., Gray, R. S., Li, H., Ewald, A. J., Zahnow, C. A., & Pan, D. (2014). A temporal requirement for Hippo signaling in mammary gland differentiation, growth, and tumorigenesis. *Genes & Development*, *28*(5), 432–437. <https://doi.org/10.1101/gad.233676.113>
- Chen, Ricky, Smith-Cohn, M., Cohen, A. L., & Colman, H. (2017). Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance. *Neurotherapeutics*, *14*(2), 284–297. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0519-x>
- Chen, Ruihuan, Nishimura, M. C., Bumbaca, S. M., Kharbanda, S., Forrest, W. F., Kasman, I. M., Greve, J. M., Soriano, R. H., Gilmour, L. L., Rivers, C. S., Modrusan, Z., Nacu, S., Guerrero, S., Edgar, K. A., Wallin, J. J., Lamszus, K., Westphal, M., Heim, S., James, C. D., ... Phillips, H. S. (2010). A Hierarchy of Self-Renewing Tumor-Initiating Cell Types in Glioblastoma. *Cancer Cell*, *17*(4), 362–375. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.049>
- Chen, Z., Sui, J., Zhang, F., & Zhang, C. (2015). Cullin Family Proteins and Tumorigenesis: Genetic Association and Molecular Mechanisms. *Journal of Cancer*, *6*(3), 233–242. <https://doi.org/10.7150/jca.11076>
- Chou, H.-C., Antón, I. M., Holt, M. R., Curcio, C., Lanzardo, S., Worth, A., Burns, S., Thrasher, A. J., Jones, G. E., & Calle, Y. (2006). WIP Regulates the Stability and Localization of WASP to Podosomes in Migrating Dendritic Cells. *Current Biology*, *16*(23), 2337–2344. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.10.037>
- Cicalese, A., Bonizzi, G., Pasi, C. E., Faretta, M., Ronzoni, S., Giulini, B., Brisken, C., Minucci, S., Di Fiore, P. P., & Pelicci, P. G. (2009). The Tumor Suppressor p53 Regulates Polarity of Self-Renewing Divisions in Mammary Stem Cells. *Cell*, *138*(6), 1083–1095. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.048>
- Collins, A. T., Berry, P. A., Hyde, C., Stower, M. J., & Maitland, N. J. (2005). Prospective Identification of Tumorigenic Prostate Cancer Stem Cells. *Cancer Research*, *65*(23), 10946–10951. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2018>

- Cordenonsi, M., Zanconato, F., Azzolin, L., Forcato, M., Rosato, A., Frasson, C., Inui, M., Montagner, M., Parenti, A. R., Poletti, A., Daidone, M. G., Dupont, S., Basso, G., Bicciato, S., & Piccolo, S. (2011). The Hippo Transducer TAZ Confers Cancer Stem Cell-Related Traits on Breast Cancer Cells. *Cell*, *147*(4), 759–772. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.048>
- Davis, M. (2016). Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clinical Journal of Oncology Nursing*, *20*(5), S2–S8. <https://doi.org/10.1188/16.CJON.S1.2-8>
- de Bruin, E. C., McGranahan, N., Mitter, R., Salm, M., Wedge, D. C., Yates, L., Jamal-Hanjani, M., Shafi, S., Murugaesu, N., Rowan, A. J., Gronroos, E., Muhammad, M. A., Horswell, S., Gerlinger, M., Varela, I., Jones, D., Marshall, J., Voet, T., Van Loo, P., ... Swanton, C. (2014). Spatial and temporal diversity in genomic instability processes defines lung cancer evolution. *Science*, *346*(6206), 251–256. <https://doi.org/10.1126/science.1253462>
- de la Fuente, M. A., Sasahara, Y., Calamito, M., Antón, I. M., Elkhali, A., Gallego, M. D., Suresh, K., Siminovitch, K., Ochs, H. D., Anderson, K. C., Rosen, F. S., Geha, R. S., & Ramesh, N. (2007). WIP is a chaperone for Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASP). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(3), 926–931. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610275104>
- Delgado, E. R., Erickson, H. L., Tao, J., Monga, S. P., Duncan, A. W., & Anakk, S. (2021). Scaffolding Protein IQGAP1 Is Dispensable, but Its Overexpression Promotes Hepatocellular Carcinoma via YAP1 Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, *41*(4), 1–19. <https://doi.org/10.1128/MCB.00596-20>
- Dennis, G., Sherman, B. T., Hosack, D. A., Yang, J., Gao, W., Lane, H. C., & Lempicki, R. A. (2003). DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biology*, *4*(5), P3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12734009>
- Derry, J. M. J., Kerns, J. A., Weinberg, K. I., Ochs, H. D., Volpini, V., Estivill, X., Walker, A. P., & Francke, U. (1995). WASP gene mutations in Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia. *Human Molecular Genetics*, *4*(7), 1127–1135. <https://doi.org/10.1093/hmg/4.7.1127>
- Derry, Jonathan M.J., Ochs, H. D., & Francke, U. (1994). Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell*, *78*(4), 635–644. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90528-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90528-2)
- Di Agostino, S., Sorrentino, G., Ingallina, E., Valenti, F., Ferraiuolo, M., Bicciato, S., Piazza, S., Strano, S., Del Sal, G., & Blandino, G. (2016). YAP enhances the pro-proliferative transcriptional activity of mutant p53 proteins. *EMBO Reports*, *17*(2), 188–201. <https://doi.org/10.15252/embr.201540488>
- Diez, H., Garrido, J. J., & Wandosell, F. (2012). Specific Roles of Akt iso Forms in Apoptosis and Axon Growth Regulation in Neurons. *PLoS ONE*, *7*(4), e32715. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032715>
- Donnelly, S. F. H., Pocklington, M. J., Pallotta, D., & Orr, E. (1993). A proline-rich protein, verprolin, involved in cytoskeletal organization and cellular growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, *10*(3), 585–596. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb00930.x>
- Dontu, G., Al-Hajj, M., Abdallah, W. M., Clarke, M. F., & Wicha, M. S. (2003). Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Proliferation*, *36*(1), 59–72. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2184.36.s.1.6.x>

- Drexler, H. G. (2001). *The Leukemia-Lymphoma Cell Line FactsBook*. Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-221970-2.X5000-1>
- Dummler, B., & Hemmings, B. A. (2007). Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease. *Biochemical Society Transactions*, 35(2), 231–235.  
<https://doi.org/10.1042/BST0350231>
- Eddy, R. J., Weidmann, M. D., Sharma, V. P., & Condeelis, J. S. (2017). Tumor Cell Invadopodia: Invasive Protrusions that Orchestrate Metastasis. *Trends in Cell Biology*, 27(8), 595–607.  
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.03.003>
- Eramo, A., Lotti, F., Sette, G., Piloizzi, E., Biffoni, M., Di Virgilio, A., Conticello, C., Ruco, L., Peschle, C., & De Maria, R. (2008). Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death & Differentiation*, 15(3), 504–514.  
<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402283>
- Escoll, M., Gargini, R., Cuadrado, A., Anton, I. M., & Wandosell, F. (2017). Mutant p53 oncogenic functions in cancer stem cells are regulated by WIP through YAP/TAZ. *Oncogene*, 36(25), 3515–3527. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.518>
- Ferguson, S., & Lesniak, M. S. (2005). Percival Bailey and the classification of brain tumors. *Neurosurgical Focus*, 18(4), 1–6. <https://doi.org/10.3171/foc.2005.18.4.8>
- Fischer, M., & Müller, G. A. (2017). Cell cycle transcription control: DREAM/MuvB and RB-E2F complexes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 52(6), 638–662.  
<https://doi.org/10.1080/10409238.2017.1360836>
- Franco, A., Knafo, S., Banon-Rodriguez, I., Merino-Serrais, P., Fernaud-Espinosa, I., Nieto, M., Garrido, J. J., Esteban, J. A., Wandosell, F., & Anton, I. M. (2012). WIP Is a Negative Regulator of Neuronal Maturation and Synaptic Activity. *Cerebral Cortex*, 22(5), 1191–1202. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhr199>
- Fried, S., Matalon, O., Noy, E., & Barda-Saad, M. (2014). WIP: more than a WASp-interacting protein. *Journal of Leukocyte Biology*, 96(5), 713–727.  
<https://doi.org/10.1189/jlb.2RU0314-162R>
- García, E., Jones, G. E., Machesky, L. M., & Antón, I. M. (2012). WIP: WASP-interacting proteins at invadopodia and podosomes. *European Journal of Cell Biology*, 91(11–12), 869–877.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2012.06.002>
- García, E., Machesky, L. M., Jones, G. E., & Antón, I. M. (2014). WIP is necessary for matrix invasion by breast cancer cells. *European Journal of Cell Biology*, 93(10–12), 413–423.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2014.07.008>
- Gargini, R., Cerliani, J. P., Escoll, M., Antón, I. M., & Wandosell, F. (2015). Cancer Stem Cell-Like Phenotype and Survival Are Coordinately Regulated by Akt/FoxO/Bim Pathway. *STEM CELLS*, 33(3), 646–660. <https://doi.org/10.1002/stem.1904>
- Gargini, R., Escoll, M., García, E., García-Escudero, R., Wandosell, F., & Antón, I. M. (2016). WIP Drives Tumor Progression through YAP/TAZ-Dependent Autonomous Cell Growth. *Cell Reports*, 17(8), 1962–1977. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.10.064>
- Georgescu, M.-M. (2010). PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control. *Genes & Cancer*, 1(12), 1170–1177. <https://doi.org/10.1177/1947601911407325>
- Gerlinger, M., Rowan, A. J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., Tarpey, P., Varela, I., Phillimore, B., Begum, S., McDonald, N.

- Q., Butler, A., Jones, D., Raine, K., Latimer, C., Santos, C. R., ... Swanton, C. (2012). Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *New England Journal of Medicine*, *366*(10), 883–892. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1113205>
- Gimona, M., Buccione, R., Courtneidge, S. A., & Linder, S. (2008). Assembly and biological role of podosomes and invadopodia. *Current Opinion in Cell Biology*, *20*(2), 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.01.005>
- Gonzalez, E., & McGraw, T. E. (2009). The Akt kinases: Isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle*, *8*(16), 2502–2508. <https://doi.org/10.4161/cc.8.16.9335>
- Gorodetska, I., Kozeretska, I., & Dubrovskaya, A. (2019). BRCA Genes: The Role in Genome Stability, Cancer Stemness and Therapy Resistance. *Journal of Cancer*, *10*(9), 2109–2127. <https://doi.org/10.7150/jca.30410>
- Grieve, S., Wajnberg, G., Lees, M., Chacko, S., Weir, J., Crapoulet, N., & Reiman, T. (2019). TAZ functions as a tumor suppressor in multiple myeloma by downregulating MYC. *Blood Advances*, *3*(22), 3613–3625. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000374>
- Gryaznova, T., Kropyvko, S., Burdyniuk, M., Gubar, O., Kryklyva, V., Tsyba, L., & Rynditch, A. (2015). Intersectin adaptor proteins are associated with actin-regulating protein WIP in invadopodia. *Cellular Signalling*, *27*(7), 1499–1508. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.03.006>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, *100*(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hatanpaa, K. J., Burma, S., Zhao, D., & Habib, A. A. (2010). Epidermal Growth Factor Receptor in Glioma: Signal Transduction, Neuropathology, Imaging, and Radioresistance. *Neoplasia*, *12*(9), 675–684. <https://doi.org/10.1593/neo.10688>
- Hedman, A. C., Smith, J. M., & Sacks, D. B. (2015). The biology of IQGAP proteins: beyond the cytoskeleton. *EMBO Reports*, *16*(4), 427–446. <https://doi.org/10.15252/embr.201439834>
- Hochegger, H., Takeda, S., & Hunt, T. (2008). Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *9*(11), 910–916. <https://doi.org/10.1038/nrm2510>
- Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, *4*(1), 44–57. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>
- Huang, L., Xu, S., Hu, D., Lu, W., Xie, X., & Cheng, X. (2015). IQGAP1 Is Involved in Enhanced Aggressive Behavior of Epithelial Ovarian Cancer Stem Cell-Like Cells During Differentiation. *International Journal of Gynecologic Cancer*, *25*(4), 559–565. <https://doi.org/10.1097/IGC.0000000000000394>
- Hume, S., Dianov, G. L., & Ramadan, K. (2020). A unified model for the G1/S cell cycle transition. *Nucleic Acids Research*, *48*(22), 12483–12501. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1002>
- Jacquemet, G., & Humphries, M. J. (2013). IQGAP1 is a key node within the small GTPase network. *Small GTPases*, *4*(4), 199–207. <https://doi.org/10.4161/sgtp.27451>

- Johnson, A., & Skotheim, J. M. (2013). Start and the restriction point. *Current Opinion in Cell Biology*, 25(6), 717–723. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.07.010>
- Johnson, M., Sharma, M., Brocardo, M. G., & Henderson, B. R. (2011). IQGAP1 translocates to the nucleus in early S-phase and contributes to cell cycle progression after DNA replication arrest. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(1), 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.09.014>
- Johnson, M., Sharma, M., & Henderson, B. R. (2009). IQGAP1 regulation and roles in cancer. *Cellular Signalling*, 21(10), 1471–1478. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.02.023>
- Kettner, A., Kumar, L., Antón, I. M., Sasahara, Y., de la Fuente, M., Pivniouk, V. I., Falet, H., Hartwig, J. H., & Geha, R. S. (2004). WIP Regulates Signaling via the High Affinity Receptor for Immunoglobulin E in Mast Cells. *Journal of Experimental Medicine*, 199(3), 357–368. <https://doi.org/10.1084/jem.20030652>
- Kipreos, E. T., & Pagano, M. (2000). The F-box protein family. *Genome Biology*, 1(5), 1–7. <https://doi.org/10.1186/gb-2000-1-5-reviews3002>
- Krakstad, C., & Chekenya, M. (2010). Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. *Molecular Cancer*, 9(1), 135. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-135>
- Lai, R., & Ingham, R. J. (2013). The pathobiology of the oncogenic tyrosine kinase NPM-ALK: a brief update. *Therapeutic Advances in Hematology*, 4(2), 119–131. <https://doi.org/10.1177/2040620712471553>
- Lamar, J. M., Stern, P., Liu, H., Schindler, J. W., Jiang, Z.-G., & Hynes, R. O. (2012). The Hippo pathway target, YAP, promotes metastasis through its TEAD-interaction domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(37), E2441–E2450. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212021109>
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M. A., & Dick, J. E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367(6464), 645–648. <https://doi.org/10.1038/367645a0>
- Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F. G., & Taylor, S. S. (2012). The spindle assembly checkpoint. *Current Biology*, 22(22), R966–R980. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.10.006>
- Le Clainche, C., Schlaepfer, D., Ferrari, A., Klingauf, M., Grohmanova, K., Veligodskiy, A., Didry, D., Le, D., Egile, C., Carlier, M.-F., & Kroschewski, R. (2007). IQGAP1 Stimulates Actin Assembly through the N-Wasp-Arp2/3 Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 282(1), 426–435. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607711200>
- Li, A., Dawson, J. C., Forero-Vargas, M., Spence, H. J., Yu, X., König, I., Anderson, K., & Machesky, L. M. (2010). The Actin-Bundling Protein Fascin Stabilizes Actin in Invadopodia and Potentiates Protrusive Invasion. *Current Biology*, 20(4), 339–345. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.12.035>
- Li, C., Heidt, D. G., Dalerba, P., Burant, C. F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M. F., & Simeone, D. M. (2007). Identification of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cancer Research*, 67(3), 1030–1037. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2030>
- Li, R., Debreceni, B., Jia, B., Gao, Y., Tigyi, G., & Zheng, Y. (1999). Localization of the PAK1-, WASP-, and IQGAP1-specifying regions of Cdc42. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(42), 29648–29654. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.42.29648>

- Li, Y., Tondravi, M., Liu, J., Smith, E., Haudenschild, C. C., Kaczmarek, M., & Zhan, X. (2001). Cortactin potentiates bone metastasis of breast cancer cells. *Cancer Research*, *61*(18), 6906–6911. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11559568>
- Linder, S. (2007). The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends in Cell Biology*, *17*(3), 107–117. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.01.002>
- Liu, C.-Y., Zha, Z.-Y., Zhou, X., Zhang, H., Huang, W., Zhao, D., Li, T., Chan, S. W., Lim, C. J., Hong, W., Zhao, S., Xiong, Y., Lei, Q.-Y., & Guan, K.-L. (2010). The Hippo Tumor Pathway Promotes TAZ Degradation by Phosphorylating a Phosphodegron and Recruiting the SCF $\beta$ -TrCP E3 Ligase\*. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(48), 37159–37169. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.152942>
- Liu, P., Cheng, H., Roberts, T. M., & Zhao, J. J. (2009). Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, *8*(8), 627–644. <https://doi.org/10.1038/nrd2926>
- Liu, Z., Yee, P. P., Wei, Y., Liu, Z., Kawasawa, Y. I., & Li, W. (2019). Differential YAP expression in glioma cells induces cell competition and promotes tumorigenesis. *Journal of Cell Science*, *132*(5). <https://doi.org/10.1242/jcs.225714>
- Lo, H.-W. (2010). Targeting Ras-RAF-ERK and its Interactive Pathways as a Novel Therapy for Malignant Gliomas. *Current Cancer Drug Targets*, *10*(8), 840–848. <https://doi.org/10.2174/156800910793357970>
- Lo Sardo, F., Strano, S., & Blandino, G. (2018). YAP and TAZ in Lung Cancer: Oncogenic Role and Clinical Targeting. *Cancers*, *10*(5), 137. <https://doi.org/10.3390/cancers10050137>
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A., Scheithauer, B. W., & Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*, *114*(2), 97–109. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4>
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, *131*(6), 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
- Machesky, L. M., & Insall, R. H. (1998). Scar1 and the related Wiskott–Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Current Biology*, *8*(25), 1347–1356. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)00015-3](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)00015-3)
- Maher, E. A. (2001). Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes & Development*, *15*(11), 1311–1333. <https://doi.org/10.1101/gad.891601>
- Makena, M. R., Ranjan, A., Thirumala, V., & Reddy, A. P. (2020). Cancer stem cells: Road to therapeutic resistance and strategies to overcome resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1866*(4), 165339. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.11.015>
- Malarkannan, S., Awasthi, A., Rajasekaran, K., Kumar, P., Schuldt, K. M., Bartoszek, A., Manoharan, N., Goldner, N. K., Umhoefer, C. M., & Thakar, M. S. (2012). IQGAP1: A Regulator of Intracellular Spacetime Relativity. *The Journal of Immunology*, *188*(5), 2057–2063. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102439>
- Malumbres, M., & Barbacid, M. (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nature Reviews*

- Cancer*, 3(6), 459–465. <https://doi.org/10.1038/nrc1097>
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M., Campbell, L. L., Polyak, K., Briskin, C., Yang, J., & Weinberg, R. A. (2008). The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell*, 133(4), 704–715. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027>
- Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*, 129(7), 1261–1274. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.009>
- Masliantsev, K., Karayan-Tapon, L., & Guichet, P.-O. (2021). Hippo Signaling Pathway in Gliomas. *Cells*, 10(1), 184. <https://doi.org/10.3390/cells10010184>
- Masui, K., Cloughesy, T. F., & Mischel, P. S. (2012). Molecular pathology in adult high-grade gliomas: from molecular diagnostics to target therapies. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 38(3), 271–291. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2011.01238.x>
- Mataraza, J. M., Briggs, M. W., Li, Z., Entwistle, A., Ridley, A. J., & Sacks, D. B. (2003). IQGAP1 Promotes Cell Motility and Invasion. *Journal of Biological Chemistry*, 278(42), 41237–41245. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304838200>
- McDonald, K. L., O’Sullivan, M. G., Parkinson, J. F., Shaw, J. M., Payne, C. A., Brewer, J. M., Young, L., Reader, D. J., Wheeler, H. T., Cook, R. J., Biggs, M. T., Little, N. S., Teo, C., Stone, G., & Robinson, B. G. (2007). IQGAP1 and IGFBP2: valuable biomarkers for determining prognosis in glioma patients. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 66(5), 405–417. <https://doi.org/10.1097/nen.0b013e31804567d7>
- McLendon, R., Friedman, A., Bigner, D., Van Meir, E. G., Brat, D. J., Mastrogianakis, G. M., Olson, J. J., Mikkelsen, T., Lehman, N., Aldape, K., Yung, W. K. A., Bogler, O., Weinstein, J. N., VandenBerg, S., Berger, M., Prados, M., Muzny, D., Morgan, M., Scherer, S., ... Thomson, E. (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, 455(7216), 1061–1068. <https://doi.org/10.1038/nature07385>
- Menotti, M., Ambrogio, C., Cheong, T.-C., Pighi, C., Mota, I., Cassel, S. H., Compagno, M., Wang, Q., Dall’Olio, R., Minero, V. G., Poggio, T., Sharma, G. G., Patrucco, E., Mastini, C., Choudhari, R., Pich, A., Zamo, A., Piva, R., Giliani, S., ... Chiarle, R. (2019). Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASP) is a tumor suppressor in T cell lymphoma. *Nature Medicine*, 25(1), 130–140. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0262-9>
- Miki, H., Miura, K., & Takenawa, T. (1996). N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *The EMBO Journal*, 15(19), 5326–5335. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00917.x>
- Miki, H., Suetsugu, S., & Takenawa, T. (1998). WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *The EMBO Journal*, 17(23), 6932–6941. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.23.6932>
- Mo, J., Park, H. W., & Guan, K. (2014). The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer. *EMBO Reports*, 15(6), 642–656. <https://doi.org/10.15252/embr.201438638>
- Moore, K., & Kim, L. (2010). Primary Brain Tumors: Characteristics, Practical Diagnostic and Treatment Approaches. In *Glioblastoma* (pp. 43–75). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0410-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0410-2_2)
- Moreau, V., Frischknecht, F., Reckmann, I., Vincentelli, R., Rabut, G., Stewart, D., & Way, M.

- (2000). A complex of N-WASP and WIP integrates signalling cascades that lead to actin polymerization. *Nature Cell Biology*, 2(7), 441–448. <https://doi.org/10.1038/35017080>
- Morel, A.-P., Lièvre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., & Puisieux, A. (2008). Generation of Breast Cancer Stem Cells through Epithelial-Mesenchymal Transition. *PLoS ONE*, 3(8), e2888. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002888>
- Moroishi, T., Hansen, C. G., & Guan, K.-L. (2015). The emerging roles of YAP and TAZ in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 15(2), 73–79. <https://doi.org/10.1038/nrc3876>
- Morrison, S. J., & Kimble, J. (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*, 441(7097), 1068–1074. <https://doi.org/10.1038/nature04956>
- Nabeshima, K., Shima, Y., Inoue, T., & Koono, M. (2002). Immunohistochemical analysis of IQGAP1 expression in human colorectal carcinomas: its overexpression in carcinomas and association with invasion fronts. *Cancer Letters*, 176(1), 101–109. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(01\)00742-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00742-X)
- Nazarenko, I., Hede, S.-M., He, X., Hedrén, A., Thompson, J., Lindström, M. S., & Nistér, M. (2012). PDGF and PDGF receptors in glioma. *Uppsala Journal of Medical Sciences*, 117(2), 99–112. <https://doi.org/10.3109/03009734.2012.665097>
- Nguyen, C. D. K., & Yi, C. (2019). YAP/TAZ Signaling and Resistance to Cancer Therapy. *Trends in Cancer*, 5(5), 283–296. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.02.010>
- Noritake, J. (2005). IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration. *Journal of Cell Science*, 118(10), 2085–2092. <https://doi.org/10.1242/jcs.02379>
- O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S., & Dick, J. E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, 445(7123), 106–110. <https://doi.org/10.1038/nature05372>
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2009). Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Science*, 100(12), 2235–2241. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01308.x>
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2013). The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clinical Cancer Research*, 19(4), 764–772. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3002>
- Oliveros, J.C. (2007-2015) Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>
- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Truitt, G., Boscia, A., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2018). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015. *Neuro-Oncology*, 20(suppl\_4), iv1–iv86. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy131>
- Parsons, D. W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J. C.-H., Leary, R. J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.-M., Gallia, G. L., Olivi, A., McLendon, R., Rasheed, B. A., Keir, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Busam, D. A., Tekleab, H., Diaz, L. A., ... Kinzler, K. W. (2008). An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science*, 321(5897), 1807–1812. <https://doi.org/10.1126/science.1164382>
- Peterson, F. C., Deng, Q., Zettl, M., Prehoda, K. E., Lim, W. A., Way, M., & Volkman, B. F. (2007). Multiple WASP-interacting Protein Recognition Motifs Are Required for a Functional



- Interaction with N-WASP. *Journal of Biological Chemistry*, 282(11), 8446–8453.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M609902200>
- Piccolo, S., Cordenonsi, M., & Dupont, S. (2013). Molecular Pathways: YAP and TAZ Take Center Stage in Organ Growth and Tumorigenesis. *Clinical Cancer Research*, 19(18), 4925–4930.  
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3172>
- Piccolo, S., Dupont, S., & Cordenonsi, M. (2014). The biology of YAP/TAZ: Hippo signaling and beyond. *Physiological Reviews*, 94(4), 1287–1312.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00005.2014>
- Pulkkanen, K. J., & Yla-Herttuala, S. (2005). Gene Therapy for Malignant Glioma: Current Clinical Status. *Molecular Therapy*, 12(4), 585–598.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.07.357>
- Rajaratnam, V., Islam, M. M., Yang, M., Slaby, R., Ramirez, H. M., & Mirza, S. P. (2020). Glioblastoma: Pathogenesis and Current Status of Chemotherapy and Other Novel Treatments. *Cancers*, 12(4), 937. <https://doi.org/10.3390/cancers12040937>
- Ramesh, N., Anton, I. M., Hartwig, J. H., & Geha, R. S. (1997). WIP, a protein associated with Wiskott-Aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(26), 14671–14676.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.26.14671>
- Ramesh, Narayanaswamy, & Geha, R. (2009). Recent advances in the biology of WASP and WIP. *Immunologic Research*, 44(1–3), 99–111. <https://doi.org/10.1007/s12026-008-8086-1>
- Randle, S. J., & Laman, H. (2016). F-box protein interactions with the hallmark pathways in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 36, 3–17.  
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.09.013>
- Recolin, B., van der Laan, S., Tsanov, N., & Maiorano, D. (2014). Molecular Mechanisms of DNA Replication Checkpoint Activation. *Genes*, 5(1), 147–175.  
<https://doi.org/10.3390/genes5010147>
- Reddy, P., Deguchi, M., Cheng, Y., & Hsueh, A. J. W. (2013). Actin Cytoskeleton Regulates Hippo Signaling. *PLoS ONE*, 8(9), e73763. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073763>
- Reggiani, F., Gobbi, G., Ciarrocchi, A., Ambrosetti, D. C., & Sancisi, V. (2020). Multiple roles and context-specific mechanisms underlying YAP and TAZ-mediated resistance to anti-cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1873(1), 188341.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188341>
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859), 105–111. <https://doi.org/10.1038/35102167>
- Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., Biffoni, M., Todaro, M., Invernici, G., Cenci, T., Maira, G., Parati, E. A., Stassi, G., Larocca, L. M., & De Maria, R. (2010). Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature*, 468(7325), 824–828.  
<https://doi.org/10.1038/nature09557>
- Rieder, C. L. (2011). Mitosis in vertebrates: The G2/M and M/A transitions and their associated checkpoints. *Chromosome Research*, 19(3), 291–306. <https://doi.org/10.1007/s10577-010-9178-z>
- Rittmeyer, E. N., Daniel, S., Hsu, S.-C., & Osman, M. A. (2008). A dual role for IQGAP1 in

- regulating exocytosis. *Journal of Cell Science*, 121(3), 391–403.  
<https://doi.org/10.1242/jcs.016881>
- Rivas, S., Antón, I., & Wandosell, F. (2018). WIP-YAP/TAZ as A New Pro-Oncogenic Pathway in Glioma. *Cancers*, 10(6), 191. <https://doi.org/10.3390/cancers10060191>
- Rivas, S., Gómez-Oro, C., Antón, I., & Wandosell, F. (2018). Role of Akt Isoforms Controlling Cancer Stem Cell Survival, Phenotype and Self-Renewal. *Biomedicines*, 6(1), 29.  
<https://doi.org/10.3390/biomedicines6010029>
- Rosen, J. M., & Jordan, C. T. (2009). The Increasing Complexity of the Cancer Stem Cell Paradigm. *Science*, 324(5935), 1670–1673. <https://doi.org/10.1126/science.1171837>
- Rotoli, D., Morales, M., Maeso, M.-C., Ávila, J., Pérez-Rodríguez, N. D., Mobasher, A., van Noorden, C. J. F., & Martín-Vasallo, P. (2019). IQGAP1, AmotL2, and FKBP51 Scaffoldins in the Glioblastoma Microenvironment. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 67(7), 481–494. <https://doi.org/10.1369/0022155419833334>
- Rotoli, D., Morales, M., Maeso, M. D. C., García, M. D. P., Gutierrez, R., Valladares, F., Ávila, J., Díaz-Flores, L., Mobasher, A., & Martín-Vasallo, P. (2017). Alterations in IQGAP1 expression and localization in colorectal carcinoma and liver metastases following oxaliplatin-based chemotherapy. *Oncology Letters*, 14(3), 2621–2628.  
<https://doi.org/10.3892/ol.2017.6525>
- Rotoli, D., Pérez-Rodríguez, N., Morales, M., Maeso, M., Ávila, J., Mobasher, A., & Martín-Vasallo, P. (2017). IQGAP1 in Podosomes/Invadosomes Is Involved in the Progression of Glioblastoma Multiforme Depending on the Tumor Status. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 150. <https://doi.org/10.3390/ijms18010150>
- Rozengurt, E., Sinnett-Smith, J., & Eibl, G. (2018). Yes-associated protein (YAP) in pancreatic cancer: at the epicenter of a targetable signaling network associated with patient survival. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 3(1), 11.  
<https://doi.org/10.1038/s41392-017-0005-2>
- Sasahara, Y., Rachid, R., Byrne, M. J., de la Fuente, M. A., Abraham, R. T., Ramesh, N., & Geha, R. S. (2002). Mechanism of Recruitment of WASP to the Immunological Synapse and of Its Activation Following TCR Ligation. *Molecular Cell*, 10(6), 1269–1281.  
[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00728-1](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00728-1)
- Sayed-yahosseini, S., Li, Z., Hedman, A. C., Morgan, C. J., & Sacks, D. B. (2016). IQGAP1 Binds to Yes-associated Protein (YAP) and Modulates Its Transcriptional Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 291(37), 19261–19273. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.732529>
- Schatton, T., Murphy, G. F., Frank, N. Y., Yamaura, K., Waaga-Gasser, A. M., Gasser, M., Zhan, Q., Jordan, S., Duncan, L. M., Weishaupt, C., Fuhlbrigge, R. C., Kupper, T. S., Sayegh, M. H., & Frank, M. H. (2008). Identification of cells initiating human melanomas. *Nature*, 451(7176), 345–349. <https://doi.org/10.1038/nature06489>
- Scheel, C., & Weinberg, R. A. (2011). Phenotypic plasticity and epithelial-mesenchymal transitions in cancer and normal stem cells? *International Journal of Cancer*, 129(10), 2310–2314. <https://doi.org/10.1002/ijc.26311>
- Singh, A., & Settleman, J. (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*, 29(34), 4741–4751.  
<https://doi.org/10.1038/onc.2010.215>
- Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., & Dirks, P. B. (2003).

- Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Research*, 63(18), 5821–5828. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14522905>
- Soda, Y., Marumoto, T., Friedmann-Morvinski, D., Soda, M., Liu, F., Michiue, H., Pastorino, S., Yang, M., Hoffman, R. M., Kesari, S., & Verma, I. M. (2011). Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(11), 4274–4280. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016030108>
- Sokolik, C. G., Qassem, N., & Chill, J. H. (2020). The Disordered Cellular Multi-Tasker WIP and Its Protein–Protein Interactions: A Structural View. *Biomolecules*, 10(7), 1084. <https://doi.org/10.3390/biom10071084>
- Sun, R., Xie, H.-Y., Qian, J.-X., Huang, Y.-N., Yang, F., Zhang, F.-L., Shao, Z.-M., & Li, D.-Q. (2018). FBXO22 Possesses Both Protumorigenic and Antimetastatic Roles in Breast Cancer Progression. *Cancer Research*, 78(18), 5274–5286. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-3647>
- Sun, Y., Leong, N. T., Jiang, T., Tangara, A., Darzacq, X., & Drubin, D. G. (2017). Switch-like Arp2/3 activation upon WASP and WIP recruitment to an apparent threshold level by multivalent linker proteins in vivo. *ELife*, 6, 1–25. <https://doi.org/10.7554/eLife.29140>
- Symons, M., Derry, J. M. J., Karlak, B., Jiang, S., Lemahieu, V., McCormick, F., Francke, U., & Abo, A. (1996). Wiskott–Aldrich Syndrome Protein, a Novel Effector for the GTPase CDC42Hs, Is Implicated in Actin Polymerization. *Cell*, 84(5), 723–734. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81050-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81050-8)
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J., & Mering, C. von. (2019). STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D607–D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>
- Thanabalu, T., Rajmohan, R., Meng, L., Ren, G., Vajjhala, P. R., & Munn, A. L. (2007). Verprolin function in endocytosis and actin organization. *FEBS Journal*, 274(16), 4103–4125. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05936.x>
- Thompson, E. W., & Haviv, I. (2011). The social aspects of EMT-MET plasticity. *Nature Medicine*, 17(9), 1048–1049. <https://doi.org/10.1038/nm.2437>
- Tumaneng, K., Schlegelmilch, K., Russell, R. C., Yimlamai, D., Basnet, H., Mahadevan, N., Fitamant, J., Bardeesy, N., Camargo, F. D., & Guan, K.-L. (2012). YAP mediates crosstalk between the Hippo and PI(3)K–TOR pathways by suppressing PTEN via miR-29. *Nature Cell Biology*, 14(12), 1322–1329. <https://doi.org/10.1038/ncb2615>
- Uhlmann, F., Bouchoux, C., & López-Avilés, S. (2011). A quantitative model for cyclin-dependent kinase control of the cell cycle: revisited. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1584), 3572–3583. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0082>
- Vaduva, G., Martinez-Quiles, N., Anton, I. M., Martin, N. C., Geha, R. S., Hopper, A. K., & Ramesh, N. (1999). The Human WASP-interacting Protein, WIP, Activates the Cell Polarity Pathway in Yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 274(24), 17103–17108. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.24.17103>
- van den Dries, K., Linder, S., Maridonneau-Parini, I., & Poincloux, R. (2019). Probing the mechanical landscape – new insights into podosome architecture and mechanics. *Journal*

- of Cell Science*, 132(24). <https://doi.org/10.1242/jcs.236828>
- Vanhaesebroeck, B., Stephens, L., & Hawkins, P. (2012). PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(3), 195–203. <https://doi.org/10.1038/nrm3290>
- Velpula, K. K., Rehman, A. A., Chelluboina, B., Dasari, V. R., Gondi, C. S., Rao, J. S., & Veeravalli, K. K. (2012). Glioma stem cell invasion through regulation of the interconnected ERK, integrin  $\alpha 6$  and N-cadherin signaling pathway. *Cellular Signalling*, 24(11), 2076–2084. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.07.002>
- Vigneswaran, K., Boyd, N. H., Oh, S.-Y., Lallani, S., Boucher, A., Neill, S. G., Olson, J. J., & Read, R. D. (2021). YAP/TAZ Transcriptional Coactivators Create Therapeutic Vulnerability to Verteporfin in EGFR-mutant Glioblastoma. *Clinical Cancer Research*, 27(5), 1553–1569. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-0018>
- Vlug, E. J., van de Ven, R. A. H., Vermeulen, J. F., Bult, P., van Diest, P. J., & Derksen, P. W. B. (2013). Nuclear localization of the transcriptional coactivator YAP is associated with invasive lobular breast cancer. *Cellular Oncology*, 36(5), 375–384. <https://doi.org/10.1007/s13402-013-0143-7>
- Volkman, B. F., Prehoda, K. E., Scott, J. A., Peterson, F. C., & Lim, W. A. (2002). Structure of the N-WASP EVH1 Domain-WIP Complex. *Cell*, 111(4), 565–576. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01076-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01076-0)
- Vollmann-Zwerenz, A., Leidgens, V., Feliciello, G., Klein, C. A., & Hau, P. (2020). Tumor Cell Invasion in Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 1932. <https://doi.org/10.3390/ijms21061932>
- Wang, J.-B., Sonn, R., Tekletsadik, Y. K., Samorodnitsky, D., & Osman, M. A. (2009). IQGAP1 regulates cell proliferation through a novel CDC42-mTOR pathway. *Journal of Cell Science*, 122(12), 2024–2033. <https://doi.org/10.1242/jcs.044644>
- Wang, S., Watanabe, T., Noritake, J., Fukata, M., Yoshimura, T., Itoh, N., Harada, T., Nakagawa, M., Matsuura, Y., Arimura, N., & Kaibuchi, K. (2007). IQGAP3, a novel effector of Rac1 and Cdc42, regulates neurite outgrowth. *Journal of Cell Science*, 120(4), 567–577. <https://doi.org/10.1242/jcs.03356>
- Watanabe, T., Wang, S., & Kaibuchi, K. (2015). IQGAPs as Key Regulators of Actin-cytoskeleton Dynamics. *Cell Structure and Function*, 40(2), 69–77. <https://doi.org/10.1247/csf.15003>
- Wen, P. Y., Lee, E. Q., Reardon, D. A., Ligon, K. L., & Alfred Yung, W. K. (2012). Current clinical development of PI3K pathway inhibitors in glioblastoma. *Neuro-Oncology*, 14(7), 819–829. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nos117>
- White, C. D., Brown, M. D., & Sacks, D. B. (2009). IQGAPs in cancer: A family of scaffold proteins underlying tumorigenesis. *FEBS Letters*, 583(12), 1817–1824. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.05.007>
- White, C. D., Erdemir, H. H., & Sacks, D. B. (2012). IQGAP1 and its binding proteins control diverse biological functions. *Cellular Signalling*, 24(4), 826–834. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.12.005>
- Yang, L., Dan, H. C., Sun, M., Liu, Q., Sun, X., Feldman, R. I., Hamilton, A. D., Polokoff, M., Nicosia, S. V., Herlyn, M., Sebti, S. M., & Cheng, J. Q. (2004). Akt/Protein Kinase B Signaling Inhibitor-2, a Selective Small Molecule Inhibitor of Akt Signaling with Antitumor Activity in Cancer Cells Overexpressing Akt. *Cancer Research*, 64(13), 4394–4399.

- <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0343>
- Yang, R., Wu, Y., Zou, J., Zhou, J., Wang, M., Hao, X., & Cui, H. (2016). The Hippo transducer TAZ promotes cell proliferation and tumor formation of glioblastoma cells through EGFR pathway. *Oncotarget*, *7*(24), 36255–36265. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9199>
- Yu, F.-X., & Guan, K.-L. (2013). The Hippo pathway: regulators and regulations. *Genes & Development*, *27*(4), 355–371. <https://doi.org/10.1101/gad.210773.112>
- Zanconato, F., Battilana, G., Cordenonsi, M., & Piccolo, S. (2016). YAP/TAZ as therapeutic targets in cancer. *Current Opinion in Pharmacology*, *29*, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.05.002>
- Zeppernick, F., Ahmadi, R., Campos, B., Dictus, C., Helmke, B. M., Becker, N., Lichter, P., Unterberg, A., Radlwimmer, B., & Herold-Mende, C. C. (2008). Stem Cell Marker CD133 Affects Clinical Outcome in Glioma Patients. *Clinical Cancer Research*, *14*(1), 123–129. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0932>
- Zhang, L., Cheng, F., Wei, Y., Zhang, L., Guo, D., Wang, B., & Li, W. (2019). Inhibition of TAZ contributes radiation-induced senescence and growth arrest in glioma cells. *Oncogene*, *38*(15), 2788–2799. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0626-0>
- Zhao, B., Li, L., Lei, Q., & Guan, K. L. (2010). The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version. *Genes & Development*, *24*(9), 862–874. <https://doi.org/10.1101/gad.1909210>
- Zhao, B., Li, L., Tumaneng, K., Wang, C.-Y., & Guan, K.-L. (2010). A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF -TRCP. *Genes & Development*, *24*(1), 72–85. <https://doi.org/10.1101/gad.1843810>
- Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R. S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., Zheng, P., Ye, K., Chinnaiyan, A., Halder, G., Lai, Z.-C., & Guan, K.-L. (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes & Development*, *21*(21), 2747–2761. <https://doi.org/10.1101/gad.1602907>
- Zhao, W., Wang, M., Cai, M., Zhang, C., Qiu, Y., Wang, X., Zhang, T., Zhou, H., Wang, J., Zhao, W., & Shao, R. (2021). Transcriptional co-activators YAP/TAZ: Potential therapeutic targets for metastatic breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *133*, 110956. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110956>
- Zhu, P., Du, X. L., Lu, G., & Zhu, J.-J. (2017). Survival benefit of glioblastoma patients after FDA approval of temozolomide concomitant with radiation and bevacizumab: A population-based study. *Oncotarget*, *8*(27), 44015–44031. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17054>

---

**MATERIAL  
SUPLEMENTARIO**

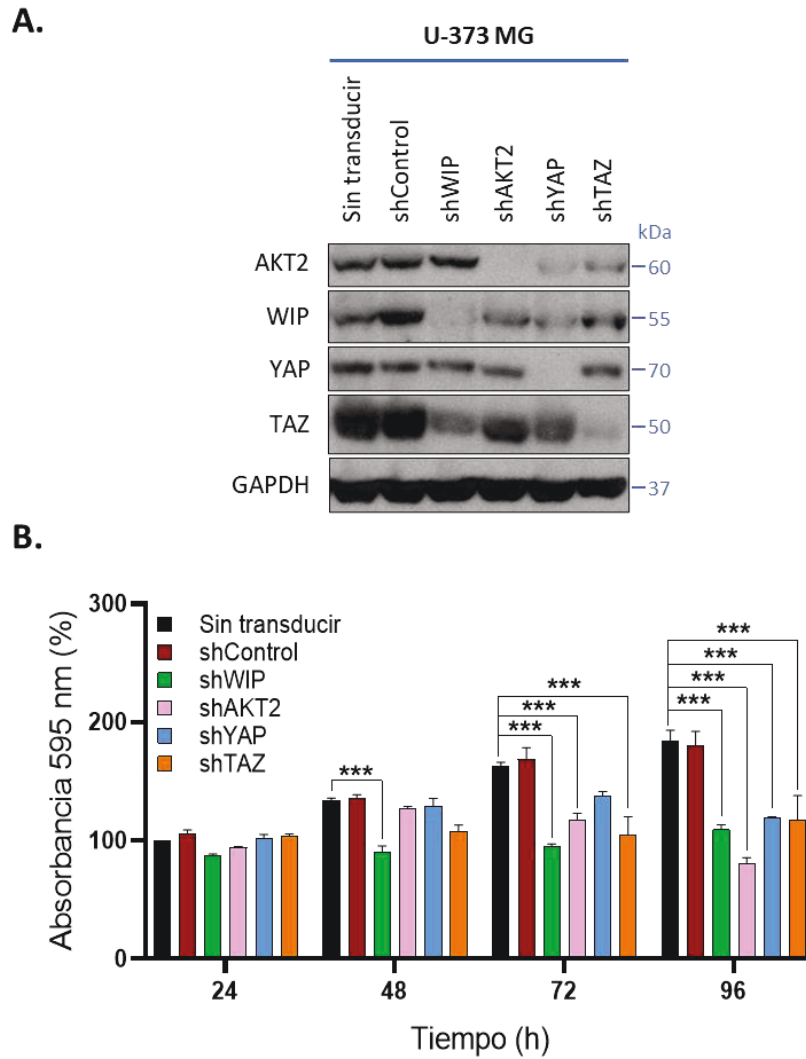


Figura S1 | **Caracterización de los vectores lentivirales y análisis de proliferación en células de GB U-373 MG.** (A) Comprobación mediante *western-blot* de la funcionalidad de los vectores lentivirales shWIP, shAKT2, shYAP y shTAZ. (B) Análisis de proliferación mediante tinción con azul de Coomassie a las 24, 48, 72 y 96h post-transducción. Valores de absorbancia normalizados con respecto a la condición sin transducir del punto de las 24h, considerando este valor como 100%. Las barras de error indican el error típico (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,005$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

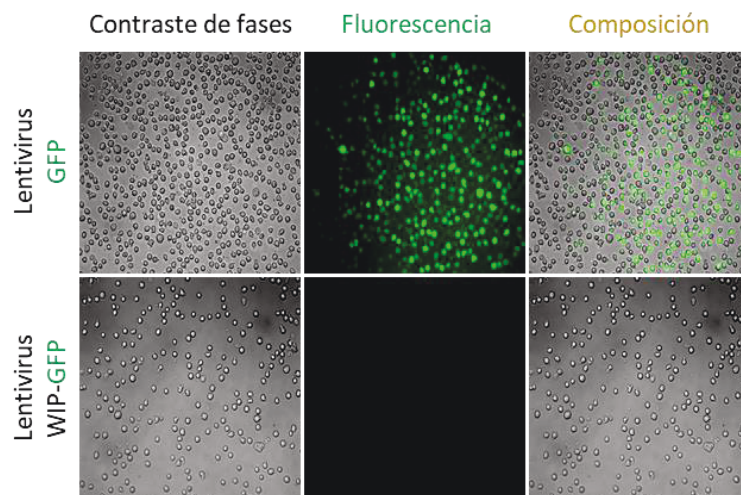


Figura S2 | Las células de linfoma Karpas-299 no admiten transducción de WIP-GFP. Comprobación de la transducción de GFP y WIP-GFP mediante microscopía de fluorescencia.

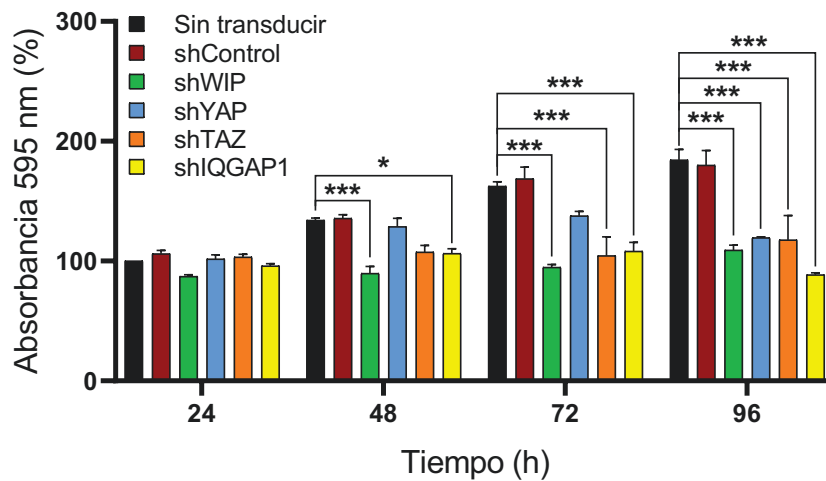


Figura S3 | Análisis del efecto del silenciamiento de IQGAP1 en proliferación de células de GB U-373 MG. Análisis de proliferación mediante tinción con azul de Coomassie a las 24, 48, 72 y 96h post-transducción. Valores de absorbancia normalizados con respecto a la condición sin transducir del punto de las 24h, considerando este valor como 100%. Las barras de error indican el error típico (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,005$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ).



**Tabla S1 | Proteínas inmunoprecipitadas en células de GB U-87 MG crecidas en medio stem.** Listado de proteínas inmunoprecipitadas junto a WIP endógeno.

Protein	Function
<b>14-3-3 protein gamma</b>	Adapter protein implicated in the regulation of a large spectrum of both general and specialized signaling pathways. Binds to a large number of partners, usually by recognition of a phosphoserine or phosphothreonine motif. Binding generally results in the modulation of the activity of the binding partner.
<b>14-3-3 protein theta</b>	Adapter protein implicated in the regulation of a large spectrum of both general and specialized signaling pathways. Binds to a large number of partners, usually by recognition of a phosphoserine or phosphothreonine motif. Binding generally results in the modulation of the activity of the binding partner. Negatively regulates the kinase activity of PDPK1.
<b>14-3-3 protein zeta/delta</b>	Adapter protein implicated in the regulation of a large spectrum of both general and specialized signaling pathways. Binds to a large number of partners, usually by recognition of a phosphoserine or phosphothreonine motif. Binding generally results in the modulation of the activity of the binding partner. Induces ARHGEF7 activity on RAC1 as well as lamellipodia and membrane ruffle formation.
<b>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11</b>	Component of the 26S proteasome, a multiprotein complex involved in the ATP-dependent degradation of ubiquitinated proteins. This complex plays a key role in the maintenance of protein homeostasis by removing misfolded or damaged proteins, which could impair cellular functions, and by removing proteins whose functions are no longer required. Therefore, the proteasome participates in numerous cellular processes, including cell cycle progression, apoptosis, or DNA damage repair. In the complex, PSMD11 is required for proteasome assembly. Plays a key role in increased proteasome activity in embryonic stem cells (ESCs): its high expression in ESCs promotes enhanced assembly of the 26S proteasome, followed by higher proteasome activity.
<b>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14</b>	Component of the 26S proteasome, a multiprotein complex involved in the ATP-dependent degradation of ubiquitinated proteins. This complex plays a key role in the maintenance of protein homeostasis by removing misfolded or damaged proteins, which could impair cellular functions, and by removing proteins whose functions are no longer required. Therefore, the proteasome participates in numerous cellular processes, including cell cycle progression, apoptosis, or DNA damage repair. The PSMD14 subunit is a metalloprotease that specifically cleaves 'Lys-63'-linked polyubiquitin chains within the complex. Plays a role in response to double-strand breaks (DSBs): acts as a regulator of non-homologous end joining (NHEJ) by cleaving 'Lys-63'-linked polyubiquitin, thereby promoting retention of JMJD2A/KDM4A on chromatin and restricting TP53BP1 accumulation. Also involved in homologous recombination repair by promoting RAD51 loading.
<b>40S ribosomal protein S12</b>	RNA binding. Structural constituent of ribosome.
<b>40S ribosomal protein S14</b>	mRNA 5'-UTR binding. RNA binding. Small ribosomal subunit rRNA binding. Structural constituent of ribosome. Translation regulator activity.
<b>40S ribosomal protein S17</b>	RNA binding. Structural constituent of ribosome.
<b>40S ribosomal protein S20</b>	RNA binding. Structural constituent of ribosome.
<b>40S ribosomal protein S27</b>	Component of the small ribosomal subunit. Required for proper rRNA processing and maturation of 18S rRNAs.
<b>40S ribosomal protein S7</b>	mRNA 3'-UTR binding. mRNA 5'-UTR binding. Protein kinase binding. RNA binding. Structural constituent of ribosome. Ubiquitin ligase inhibitor activity.
<b>5~-nucleotidase</b>	Dephosphorylates the 5' and 2'(3')-phosphates of deoxyribonucleotides. Helps to regulate adenosine levels.
<b>60S ribosomal protein L10</b>	Component of the large ribosomal subunit. Plays a role in the formation of actively translating ribosomes. May play a role in the embryonic brain development.
<b>60S ribosomal protein L13</b>	Component of the ribosome, a large ribonucleoprotein complex responsible for the synthesis of proteins in the cell.
<b>60S ribosomal protein L14</b>	Cadherin binding. RNA binding. Structural constituent of ribosome.
<b>60S ribosomal protein L17</b>	RNA binding. Structural constituent of ribosome.
<b>60S ribosomal protein L21</b>	RNA binding. Structural constituent of ribosome.
<b>60S ribosomal protein L22-like 1</b>	RNA binding. Structural constituent of ribosome.
<b>60S ribosomal protein L27</b>	Component of the large ribosomal subunit. Required for proper rRNA processing and maturation of 28S and 5.8S rRNAs.

<b>60S ribosomal protein L38</b>	RNA binding. Structural constituent of ribosome.
<b>60S ribosomal protein L5</b>	Component of the ribosome, a large ribonucleoprotein complex responsible for the synthesis of proteins in the cell. The small ribosomal subunit (SSU) binds messenger RNAs (mRNAs) and translates the encoded message by selecting cognate aminoacyl-transfer RNA (tRNA) molecules. The large subunit (LSU) contains the ribosomal catalytic site termed the peptidyl transferase center (PTC), which catalyzes the formation of peptide bonds, thereby polymerizing the amino acids delivered by tRNAs into a polypeptide chain. The nascent polypeptides leave the ribosome through a tunnel in the LSU and interact with protein factors that function in enzymatic processing, targeting, and the membrane insertion of nascent chains at the exit of the ribosomal tunnel. As part of the 5S RNP/5S ribonucleoprotein particle it is an essential component of the LSU, required for its formation and the maturation of rRNAs. It also couples ribosome biogenesis to p53/TP53 activation. As part of the 5S RNP it accumulates in the nucleoplasm and inhibits MDM2, when ribosome biogenesis is perturbed, mediating the stabilization and the activation of TP53.
<b>60S ribosomal protein L8</b>	Component of the large ribosomal subunit.
<b>60S ribosomal protein L9</b>	RNA binding. rRNA binding. Structural constituent of ribosome.
<b>7-dehydrocholesterol reductase</b>	7-dehydrocholesterol reductase of the cholesterol biosynthetic pathway reducing the C7-C8 double bond of cholesta-5,7-dien-3beta-ol (7-dehydrocholesterol/7-DHC) and cholesta-5,7,24-trien-3beta-ol, two intermediates in that pathway.
<b>Actin-related protein 2</b>	ATP-binding component of the Arp2/3 complex, a multiprotein complex that mediates actin polymerization upon stimulation by nucleation-promoting factor (NPF). The Arp2/3 complex mediates the formation of branched actin networks in the cytoplasm, providing the force for cell motility. Seems to contact the pointed end of the daughter actin filament. In podocytes, required for the formation of lamellipodia downstream of AVIL and PLCE1 regulation. In addition to its role in the cytoplasmic cytoskeleton, the Arp2/3 complex also promotes actin polymerization in the nucleus, thereby regulating gene transcription and repair of damaged DNA. The Arp2/3 complex promotes homologous recombination (HR) repair in response to DNA damage by promoting nuclear actin polymerization, leading to drive motility of double-strand breaks (DSBs).
<b>Actin-related protein 2/3 complex subunit 5</b>	Component of the Arp2/3 complex, a multiprotein complex that mediates actin polymerization upon stimulation by nucleation-promoting factor (NPF). The Arp2/3 complex mediates the formation of branched actin networks in the cytoplasm, providing the force for cell motility. In addition to its role in the cytoplasmic cytoskeleton, the Arp2/3 complex also promotes actin polymerization in the nucleus, thereby regulating gene transcription and repair of damaged DNA. The Arp2/3 complex promotes homologous recombination (HR) repair in response to DNA damage by promoting nuclear actin polymerization, leading to drive motility of double-strand breaks (DSBs).
<b>Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15</b>	General coactivator that functions cooperatively with TAFs and mediates functional interactions between upstream activators and the general transcriptional machinery. May be involved in stabilizing the multiprotein transcription complex. Binds single-stranded DNA. Also binds, <i>in vitro</i> , non-specifically to double-stranded DNA (ds DNA).
<b>Adenylyl cyclase-associated protein</b>	Directly regulates filament dynamics and has been implicated in a number of complex developmental and morphological processes, including mRNA localization and the establishment of cell polarity.
<b>ADP/ATP translocase 2</b>	Catalyzes the exchange of cytoplasmic ADP with mitochondrial ATP across the mitochondrial inner membrane. As part of the mitotic spindle-associated MMXD complex it may play a role in chromosome segregation.
<b>Aldo-keto reductase family 1 member C3</b>	Catalyzes the conversion of aldehydes and ketones to alcohols. Catalyzes the reduction of prostaglandin (PG) D2, PGH2 and phenanthrenequinone (PQ) and the oxidation of 9-alpha,11-beta-PGF2 to PGD2. Functions as a bi-directional 3-alpha-, 17-beta- and 20-alpha HSD. Can interconvert active androgens, estrogens and progestins with their cognate inactive metabolites. Preferentially transforms androstenedione (4-dione) to testosterone.
<b>Alpha-actinin-1</b>	F-actin cross-linking protein which is thought to anchor actin to a variety of intracellular structures. This is a bundling protein.
<b>Alpha-adducin</b>	Membrane-cytoskeleton-associated protein that promotes the assembly of the spectrin-actin network. Binds to calmodulin.
<b>Ankycorbin</b>	Plays a role in actin regulation at the ectoplasmic specialization, a type of cell junction specific to testis. Important for establishment of sperm polarity and normal spermatid adhesion. May also promote integrity of Sertoli cell tight junctions at the blood-testis barrier.
<b>Annexin A5</b>	This protein is an anticoagulant protein that acts as an indirect inhibitor of the thromboplastin-specific complex, which is involved in the blood coagulation cascade.

<b>AP-2 complex subunit alpha-2</b>	Component of the adaptor protein complex 2 (AP-2). Adaptor protein complexes function in protein transport via transport vesicles in different membrane traffic pathways. Adaptor protein complexes are vesicle coat components and appear to be involved in cargo selection and vesicle formation. AP-2 is involved in clathrin-dependent endocytosis in which cargo proteins are incorporated into vesicles surrounded by clathrin (clathrin-coated vesicles, CCVs) which are destined for fusion with the early endosome. The clathrin lattice serves as a mechanical scaffold but is itself unable to bind directly to membrane components. Clathrin-associated adaptor protein (AP) complexes which can bind directly to both the clathrin lattice and to the lipid and protein components of membranes are considered to be the major clathrin adaptors contributing the CCV formation. AP-2 also serves as a cargo receptor to selectively sort the membrane proteins involved in receptor-mediated endocytosis.
<b>AP-2 complex subunit mu</b>	Component of the adaptor protein complex 2 (AP-2). Adaptor protein complexes function in protein transport via transport vesicles in different membrane traffic pathways. Adaptor protein complexes are vesicle coat components and appear to be involved in cargo selection and vesicle formation. AP-2 is involved in clathrin-dependent endocytosis in which cargo proteins are incorporated into vesicles surrounded by clathrin. The clathrin lattice serves as a mechanical scaffold but is itself unable to bind directly to membrane components. Clathrin-associated adaptor protein (AP) complexes which can bind directly to both the clathrin lattice and to the lipid and protein components of membranes are considered to be the major clathrin adaptors contributing the CCV formation.
<b>Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase</b>	Specifically hydroxylates an Asp or Asn residue in certain epidermal growth factor-like (EGF) domains of a number of proteins.
<b>Ataxin-2-like protein</b>	Involved in the regulation of stress granule and P-body formation.
<b>ATPase family AAA domain-containing protein 3A</b>	Essential for mitochondrial network organization, mitochondrial metabolism and cell growth at organism and cellular level. May play an important role in mitochondrial protein synthesis. May also participate in mitochondrial DNA replication. May bind to mitochondrial DNA D-loops and contribute to nucleoid stability. Required for enhanced channeling of cholesterol for hormone-dependent steroidogenesis. Involved in mitochondrial-mediated antiviral innate immunity.
<b>ATP-dependent RNA helicase A</b>	Multifunctional ATP-dependent nucleic acid helicase that unwinds DNA and RNA in a 3' to 5' direction and that plays important roles in many processes, such as DNA replication, transcriptional activation, post-transcriptional RNA regulation, mRNA translation and RNA-mediated gene silencing. Plays a role in DNA replication at origins of replication and cell cycle progression. Plays a role as a transcriptional coactivator acting as a bridging factor between polymerase II holoenzyme and transcription factors or cofactors, such as BRCA1, CREBBP, RELA and SMN1. Binds to the CDKN2A promoter. Plays several roles in post-transcriptional regulation of gene expression.
<b>Beta/gamma crystallin domain-containing protein 1</b>	May function as suppressor of malignant melanoma. It may exert its effects through interactions with the cytoskeleton.
<b>Caldesmon</b>	Actin- and myosin-binding protein implicated in the regulation of actomyosin interactions in smooth muscle and nonmuscle cells (could act as a bridge between myosin and actin filaments). Stimulates actin binding of tropomyosin which increases the stabilization of actin filament structure. In muscle tissues, inhibits the actomyosin ATPase by binding to F-actin. This inhibition is attenuated by calcium-calmodulin and is potentiated by tropomyosin. Interacts with actin, myosin, two molecules of tropomyosin and with calmodulin. Also plays an essential role during cellular mitosis and receptor capping.
<b>Calreticulin</b>	Calcium-binding chaperone that promotes folding, oligomeric assembly and quality control in the endoplasmic reticulum (ER) via the calreticulin/calnexin cycle. This lectin interacts transiently with almost all of the monoglucosylated glycoproteins that are synthesized in the ER. Interacts with the DNA-binding domain of NR3C1 and mediates its nuclear export. Involved in maternal gene expression regulation.
<b>Caprin-1</b>	May regulate the transport and translation of mRNAs of proteins involved in synaptic plasticity in neurons and cell proliferation and migration in multiple cell types. Binds directly and selectively to MYC and CCND2 RNAs. In neuronal cells, directly binds to several mRNAs associated with RNA granules, including BDNF, CAMK2A, CREB1, MAP2, NTRK2 mRNAs, as well as to GRIN1 and KPNB1 mRNAs, but not to rRNAs.
<b>Caspase-14</b>	Non-apoptotic caspase involved in epidermal differentiation. Is the predominant caspase in epidermal stratum corneum. Seems to play a role in keratinocyte differentiation and is required for cornification.
<b>Caveolae-associated protein 3</b>	Regulates the traffic and/or budding of caveolae. Plays a role in caveola formation in a tissue-specific manner. Required for the formation of caveolae in smooth muscle but not

	in the lung and heart endothelial cells. Regulates the equilibrium between cell surface-associated and cell surface-dissociated caveolae by promoting the rapid release of caveolae from the cell surface. Plays a role in the regulation of the circadian clock.
<b>Cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M, isoform CRA_a</b>	Plays a key role in the control of the eukaryotic cell cycle by modulating the centrosome cycle as well as mitotic onset; promotes G2-M transition, and regulates G1 progress and G1-S transition via association with multiple interphase cyclins. Required in higher cells for entry into S-phase and mitosis.
<b>Cofilin-1</b>	Binds to F-actin and exhibits pH-sensitive F-actin depolymerizing activity. Regulates actin cytoskeleton dynamics. Important for normal progress through mitosis and normal cytokinesis. Plays a role in the regulation of cell morphology and cytoskeletal organization. Required for the up-regulation of atypical chemokine receptor ACKR2 from endosomal compartment to cell membrane, increasing its efficiency in chemokine uptake and degradation.
<b>Cold shock domain-containing protein E1</b>	RNA-binding protein involved in translationally coupled mRNA turnover. Implicated with other RNA-binding proteins in the cytoplasmic deadenylation/translational and decay interplay of the FOS mRNA mediated by the major coding-region determinant of instability (mCRD) domain. Required for efficient formation of stress granules.
<b>Coronin</b>	May be a crucial component of the cytoskeleton of highly motile cells, functioning both in the invagination of large pieces of plasma membrane, as well as in forming protrusions of the plasma membrane involved in cell locomotion.
<b>Coronin-2B</b>	May play a role in the reorganization of neuronal actin structure.
<b>Cysteine and glycine-rich protein 1</b>	Could play a role in neuronal development.
<b>Cytospin-A</b>	Involved in cytokinesis and spindle organization. May play a role in actin cytoskeleton organization and microtubule stabilization and hence required for proper cell adhesion and migration.
<b>Desmoplakin</b>	Major high molecular weight protein of desmosomes. Involved in the organization of the desmosomal cadherin-plakoglobin complexes into discrete plasma membrane domains and in the anchoring of intermediate filaments to the desmosomes.
<b>Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex</b>	The pyruvate dehydrogenase complex catalyzes the overall conversion of pyruvate to acetyl-CoA and CO <sub>2</sub> , and thereby links the glycolytic pathway to the tricarboxylic cycle.
<b>Drebrin</b>	Actin cytoskeleton-organizing protein that plays a role in the formation of cell projections. Required for actin polymerization at immunological synapses (IS) and for the recruitment of the chemokine receptor CXCR4 to IS.
<b>E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21</b>	E3 ubiquitin-protein ligase whose activity is dependent on E2 enzymes, UBE2D1, UBE2D2, UBE2E1 and UBE2E2. Forms a ubiquitin ligase complex in cooperation with the E2 UBE2D2 that is used not only for the ubiquitination of USP4 and IKBKB but also for its self-ubiquitination. Component of cullin-RING-based SCF (SKP1-CUL1-F-box protein) E3 ubiquitin-protein ligase complexes such as SCF(SKP2)-like complexes. A TRIM21-containing SCF(SKP2)-like complex is shown to mediate ubiquitination of CDKN1B ('Thr-187' phosphorylated-form), thereby promoting its degradation by the proteasome. Monoubiquitinates IKBKB that will negatively regulates Tax-induced NF-kappa-B signaling. Negatively regulates IFN-beta production post-pathogen recognition by polyubiquitin-mediated degradation of IRF3. Mediates the ubiquitin-mediated proteasomal degradation of IgG1 heavy chain, which is linked to the VCP-mediated ER-associated degradation (ERAD) pathway. Promotes IRF8 ubiquitination, which enhanced the ability of IRF8 to stimulate cytokine genes transcription in macrophages. Plays a role in the regulation of the cell cycle progression.
<b>EF-hand domain-containing protein D2</b>	May regulate B-cell receptor (BCR)-induced immature and primary B-cell apoptosis. Plays a role as negative regulator of the canonical NF-kappa-B-activating branch. Controls spontaneous apoptosis through the regulation of BCL2L1 abundance.
<b>ELAV-like protein 1</b>	RNA-binding protein that binds to the 3'-UTR region of mRNAs and increases their stability. Involved in embryonic stem cells (ESCs) differentiation. With ZNF385A, binds the 3'-UTR of p53/TP53 mRNA to control their nuclear export induced by CDKN2A. Hence, may regulate p53/TP53 expression and mediate in part the CDKN2A anti-proliferative activity.
<b>Elongation factor 1-delta</b>	EF-1-beta and EF-1-delta stimulate the exchange of GDP bound to EF-1-alpha to GTP, regenerating EF-1-alpha for another round of transfer of aminoacyl-tRNAs to the ribosome. Regulates induction of heat-shock-responsive genes through association with heat shock transcription factors and direct DNA-binding at heat shock promoter elements (HSE).

<b>Elongation factor Tu, mitochondrial</b>	Promotes the GTP-dependent binding of aminoacyl-tRNA to the A-site of ribosomes during protein biosynthesis. Plays also a role in the regulation of autophagy and innate immunity. Recruits ATG5-ATG12 and NLRX1 at mitochondria and serves as a checkpoint of the RIG-I/DDX58-MAVS pathway. In turn, inhibits RLR-mediated type I interferon while promoting autophagy.
<b>Emerin</b>	Stabilizes and promotes the formation of a nuclear actin cortical network. Stimulates actin polymerization in vitro by binding and stabilizing the pointed end of growing filaments. Inhibits beta-catenin activity by preventing its accumulation in the nucleus. Acts by influencing the nuclear accumulation of beta-catenin through a CRM1-dependent export pathway. Links centrosomes to the nuclear envelope via a microtubule association.
<b>Eukaryotic initiation factor 4A-I</b>	ATP-dependent RNA helicase which is a subunit of the eIF4F complex involved in cap recognition and is required for mRNA binding to ribosome. In the current model of translation initiation, eIF4A unwinds RNA secondary structures in the 5'-UTR of mRNAs which is necessary to allow efficient binding of the small ribosomal subunit, and subsequent scanning for the initiator codon.
<b>Eukaryotic initiation factor 4A-III</b>	ATP-dependent RNA helicase. Involved in pre-mRNA splicing as component of the spliceosome. Core component of the splicing-dependent multiprotein exon junction complex (EJC) deposited at splice junctions on mRNAs. The EJC is a dynamic structure consisting of core proteins and several peripheral nuclear and cytoplasmic associated factors that join the complex only transiently either during EJC assembly or during subsequent mRNA metabolism. The EJC marks the position of the exon-exon junction in the mature mRNA for the gene expression machinery and the core components remain bound to spliced mRNAs throughout all stages of mRNA metabolism thereby influencing downstream processes including nuclear mRNA export, subcellular mRNA localization, translation efficiency and nonsense-mediated mRNA decay (NMD).
<b>Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1</b>	Functions in the early steps of protein synthesis by forming a ternary complex with GTP and initiator tRNA. This complex binds to a 40S ribosomal subunit, followed by mRNA binding to form a 43S pre-initiation complex. Junction of the 60S ribosomal subunit to form the 80S initiation complex is preceded by hydrolysis of the GTP bound to eIF-2 and release of an eIF-2-GDP binary complex. In order for eIF-2 to recycle and catalyze another round of initiation, the GDP bound to eIF-2 must exchange with GTP by way of a reaction catalyzed by eIF-2B. EIF2S1/eIF-2-alpha is a key component of the integrated stress response (ISR), required for adaptation to various stress: phosphorylation by metabolic-stress sensing protein kinases (EIF2AK1/HRI, EIF2AK2/PKR, EIF2AK3/PERK and EIF2AK4/GCN2) in response to stress converts EIF2S1/eIF-2-alpha in a global protein synthesis inhibitor, leading to a attenuation of cap-dependent translation, while concomitantly initiating the preferential translation of ISR-specific mRNAs, such as the transcriptional activator ATF4, and hence allowing ATF4-mediated reprogramming.
<b>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A</b>	RNA-binding component of the eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF-3) complex, which is required for several steps in the initiation of protein synthesis. The eIF-3 complex associates with the 40S ribosome and facilitates the recruitment of eIF-1, eIF-1A, eIF-2:GTP:methionyl-tRNA <sup>i</sup> and eIF-5 to form the 43S pre-initiation complex (43S PIC). The eIF-3 complex stimulates mRNA recruitment to the 43S PIC and scanning of the mRNA for AUG recognition. The eIF-3 complex is also required for disassembly and recycling of post-termination ribosomal complexes and subsequently prevents premature joining of the 40S and 60S ribosomal subunits prior to initiation. The eIF-3 complex specifically targets and initiates translation of a subset of mRNAs involved in cell proliferation, including cell cycling, differentiation and apoptosis, and uses different modes of RNA stem-loop binding to exert either translational activation or repression.
<b>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C-like protein</b>	Component of the eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF-3) complex, which is required for several steps in the initiation of protein synthesis. The eIF-3 complex associates with the 40S ribosome and facilitates the recruitment of eIF-1, eIF-1A, eIF-2:GTP:methionyl-tRNA <sup>i</sup> and eIF-5 to form the 43S pre-initiation complex (43S PIC). The eIF-3 complex stimulates mRNA recruitment to the 43S PIC and scanning of the mRNA for AUG recognition. The eIF-3 complex is also required for disassembly and recycling of post-termination ribosomal complexes and subsequently prevents premature joining of the 40S and 60S ribosomal subunits prior to initiation. The eIF-3 complex specifically targets and initiates translation of a subset of mRNAs involved in cell proliferation, including cell cycling, differentiation and apoptosis, and uses different modes of RNA stem-loop binding to exert either translational activation or repression.
<b>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I</b>	RNA-binding component of the eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF-3) complex, which is required for several steps in the initiation of protein synthesis. The eIF-3 complex associates with the 40S ribosome and facilitates the recruitment of eIF-1, eIF-1A, eIF-

	<p>2:GTP:methionyl-tRNA<sub>i</sub> and eIF-5 to form the 43S pre-initiation complex (43S PIC). The eIF-3 complex stimulates mRNA recruitment to the 43S PIC and scanning of the mRNA for AUG recognition. The eIF-3 complex is also required for disassembly and recycling of post-termination ribosomal complexes and subsequently prevents premature joining of the 40S and 60S ribosomal subunits prior to initiation. The eIF-3 complex specifically targets and initiates translation of a subset of mRNAs involved in cell proliferation, including cell cycling, differentiation and apoptosis, and uses different modes of RNA stem-loop binding to exert either translational activation or repression.</p>
<p><b>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K</b></p>	<p>Component of the eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF-3) complex, which is required for several steps in the initiation of protein synthesis. The eIF-3 complex associates with the 40S ribosome and facilitates the recruitment of eIF-1, eIF-1A, eIF-2:GTP:methionyl-tRNA<sub>i</sub> and eIF-5 to form the 43S pre-initiation complex (43S PIC). The eIF-3 complex stimulates mRNA recruitment to the 43S PIC and scanning of the mRNA for AUG recognition. The eIF-3 complex is also required for disassembly and recycling of post-termination ribosomal complexes and subsequently prevents premature joining of the 40S and 60S ribosomal subunits prior to initiation. The eIF-3 complex specifically targets and initiates translation of a subset of mRNAs involved in cell proliferation, including cell cycling, differentiation and apoptosis, and uses different modes of RNA stem-loop binding to exert either translational activation or repression.</p>
<p><b>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L</b></p>	<p>Component of the eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF-3) complex, which is required for several steps in the initiation of protein synthesis. The eIF-3 complex associates with the 40S ribosome and facilitates the recruitment of eIF-1, eIF-1A, eIF-2:GTP:methionyl-tRNA<sub>i</sub> and eIF-5 to form the 43S pre-initiation complex (43S PIC). The eIF-3 complex stimulates mRNA recruitment to the 43S PIC and scanning of the mRNA for AUG recognition. The eIF-3 complex is also required for disassembly and recycling of post-termination ribosomal complexes and subsequently prevents premature joining of the 40S and 60S ribosomal subunits prior to initiation. The eIF-3 complex specifically targets and initiates translation of a subset of mRNAs involved in cell proliferation, including cell cycling, differentiation and apoptosis, and uses different modes of RNA stem-loop binding to exert either translational activation or repression.</p>
<p><b>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M</b></p>	<p>Component of the eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF-3) complex, which is required for several steps in the initiation of protein synthesis. The eIF-3 complex associates with the 40S ribosome and facilitates the recruitment of eIF-1, eIF-1A, eIF-2:GTP:methionyl-tRNA<sub>i</sub> and eIF-5 to form the 43S pre-initiation complex (43S PIC). The eIF-3 complex stimulates mRNA recruitment to the 43S PIC and scanning of the mRNA for AUG recognition. The eIF-3 complex is also required for disassembly and recycling of post-termination ribosomal complexes and subsequently prevents premature joining of the 40S and 60S ribosomal subunits prior to initiation. The eIF-3 complex specifically targets and initiates translation of a subset of mRNAs involved in cell proliferation, including cell cycling, differentiation and apoptosis, and uses different modes of RNA stem-loop binding to exert either translational activation or repression.</p>
<p><b>Eukaryotic translation initiation factor 5A</b></p>	<p>mRNA-binding protein involved in translation elongation. Has an important function at the level of mRNA turnover, probably acting downstream of decapping. Involved in actin dynamics and cell cycle progression, mRNA decay and probably in a pathway involved in stress response and maintenance of cell wall integrity. With syntenin SDCBP, functions as a regulator of p53/TP53 and p53/TP53-dependent apoptosis. Regulates also TNF-alpha-mediated apoptosis. May play an important role in brain development and function, and in skeletal muscle stem cell differentiation.</p>
<p><b>F-actin-capping protein subunit alpha-2</b></p>	<p>F-actin-capping proteins bind in a Ca<sup>2+</sup>-independent manner to the fast growing ends of actin filaments (barbed end) thereby blocking the exchange of subunits at these ends. Unlike other capping proteins (such as gelsolin and severin), these proteins do not sever actin filaments.</p>
<p><b>F-actin-capping protein subunit beta</b></p>	<p>F-actin-capping proteins bind in a Ca<sup>2+</sup>-independent manner to the fast growing ends of actin filaments (barbed end) thereby blocking the exchange of subunits at these ends. Unlike other capping proteins (such as gelsolin and severin), these proteins do not sever actin filaments. Plays a role in the regulation of cell morphology and cytoskeletal organization.</p>
<p><b>Fascin</b></p>	<p>Actin-binding protein that contains 2 major actin binding sites. Organizes filamentous actin into parallel bundles. Plays a role in the organization of actin filament bundles and the formation of microspikes, membrane ruffles, and stress fibers. Important for the formation of a diverse set of cell protrusions, such as filopodia, and for cell motility and migration. Mediates reorganization of the actin cytoskeleton and axon growth cone collapse in response to NGF.</p>

<b>Fatty acid-binding protein, epidermal</b>	Intracellular carrier for long-chain fatty acids and related active lipids, such as the endocannabinoid, that regulates the metabolism and actions of the ligands they bind. In addition to the cytosolic transport, selectively delivers specific fatty acids from the cytosol to the nucleus, wherein they activate nuclear receptors. Delivers retinoic acid to the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor delta; which promotes proliferation and survival. May also serve as a synaptic carrier of endocannabinoid at central synapses and thus controls retrograde endocannabinoid signaling. May be involved in keratinocyte differentiation.
<b>F-box only protein 22</b>	Substrate-recognition component of the SCF (SKP1-CUL1-F-box protein)-type E3 ubiquitin ligase complex. Promotes the proteasome-dependent degradation of key sarcomeric proteins, such as alpha-actinin (ACTN2) and filamin-C (FLNC), essential for maintenance of normal contractile function.
<b>Fibronectin</b>	Fibronectins bind cell surfaces and various compounds including collagen, fibrin, heparin, DNA, and actin. Fibronectins are involved in cell adhesion, cell motility, opsonization, wound healing, and maintenance of cell shape. Involved in osteoblast compaction through the fibronectin fibrillogenesis cell-mediated matrix assembly process, essential for osteoblast mineralization. Participates in the regulation of type I collagen deposition by osteoblasts.
<b>Formin-binding protein 1</b>	May act as a link between RND2 signaling and regulation of the actin cytoskeleton. Required to coordinate membrane tubulation with reorganization of the actin cytoskeleton during the late stage of clathrin-mediated endocytosis. Binds to lipids such as phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phosphatidylserine and promotes membrane invagination and the formation of tubules. Also enhances actin polymerization via the recruitment of WASL/N-WASP, which in turn activates the Arp2/3 complex. Actin polymerization may promote the fission of membrane tubules to form endocytic vesicles. May be required for the lysosomal retention of FASLG/FASL.
<b>Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1</b>	RNA-binding protein required for embryonic and postnatal development of muscle tissue.
<b>General transcription factor II-I</b>	Interacts with the basal transcription machinery by coordinating the formation of a multiprotein complex at the C-FOS promoter, and linking specific signal responsive activator complexes. Promotes the formation of stable high-order complexes of SRF and PHOX1 and interacts cooperatively with PHOX1 to promote serum-inducible transcription of a reporter gene driven by the C-FOS serum response element (SRE). Acts as a coregulator for USF1 by binding independently two promoter elements, a pyrimidine-rich initiator (Inr) and an upstream E-box. Required for the formation of functional ARID3A DNA-binding complexes and for activation of immunoglobulin heavy-chain transcription upon B-lymphocyte activation.
<b>Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase</b>	Enzyme with hydroxy-pyruvate reductase, glyoxylate reductase and D-glycerate dehydrogenase enzymatic activities. Reduces hydroxypyruvate to D-glycerate, glyoxylate to glycolate oxidizes D-glycerate to hydroxypyruvate.
<b>Granulins</b>	Secreted protein that acts as a key regulator of lysosomal function and as a growth factor involved in inflammation, wound healing and cell proliferation. Regulates protein trafficking to lysosomes and, also the activity of lysosomal enzymes. Facilitates also the acidification of lysosomes, causing degradation of mature CTSD by CTSB. Also promotes epithelial cell proliferation by blocking TNF-mediated neutrophil activation preventing release of oxidants and proteases. Moreover, modulates inflammation in neurons by preserving neurons survival, axonal outgrowth and neuronal integrity.
<b>GTP-binding nuclear protein Ran</b>	GTPase involved in nucleocytoplasmic transport, participating both to the import and the export from the nucleus of proteins and RNAs. Switches between a cytoplasmic GDP- and a nuclear GTP-bound state by nucleotide exchange and GTP hydrolysis. Nuclear import receptors such as importin beta bind their substrates only in the absence of GTP-bound RAN and release them upon direct interaction with GTP-bound RAN, while export receptors behave in the opposite way. Thereby, RAN controls cargo loading and release by transport receptors in the proper compartment and ensures the directionality of the transport. Interaction with RANBP1 induces a conformation change in the complex formed by XPO1 and RAN that triggers the release of the nuclear export signal of cargo proteins. RAN (GTP-bound form) triggers microtubule assembly at mitotic chromosomes and is required for normal mitotic spindle assembly and chromosome segregation. Required for normal progress through mitosis.
<b>Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha</b>	Guanine nucleotide-binding proteins (G proteins) are involved as modulators or transducers in various transmembrane signaling systems. The G(o) protein function is not clear. Stimulated by RGS14.

<b>Heat shock protein beta-1</b>	Small heat shock protein which functions as a molecular chaperone probably maintaining denatured proteins in a folding-competent state. Plays a role in stress resistance and actin organization.
<b>Heat shock-related 70 kDa protein 2</b>	Molecular chaperone implicated in a wide variety of cellular processes, including protection of the proteome from stress, folding and transport of newly synthesized polypeptides, activation of proteolysis of misfolded proteins and the formation and dissociation of protein complexes. Plays a pivotal role in the protein quality control system, ensuring the correct folding of proteins, the re-folding of misfolded proteins and controlling the targeting of proteins for subsequent degradation.
<b>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0</b>	mRNA-binding component of ribonucleosomes. Specifically binds AU-rich element (ARE)-containing mRNAs. Involved in post-transcriptional regulation of cytokines mRNAs.
<b>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1</b>	Involved in the packaging of pre-mRNA into hnRNP particles, transport of poly(A) mRNA from the nucleus to the cytoplasm and may modulate splice site selection. May bind to specific miRNA hairpins. Binds to the IRES and thereby inhibits the translation of the apoptosis protease activating factor APAF1.
<b>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0</b>	Binds with high affinity to RNA molecules that contain AU-rich elements (AREs) found within the 3'-UTR of many proto-oncogenes and cytokine mRNAs. Also binds to double- and single-stranded DNA sequences in a specific manner and functions a transcription factor. Each of the RNA-binding domains specifically can bind solely to a single-stranded non-monotonous 5'-UUAG-3' sequence and also weaker to the single-stranded 5'-TTAGGG-3' telomeric DNA repeat. Binds RNA oligonucleotides with 5'-UUAGGG-3' repeats more tightly than the telomeric single-stranded DNA 5'-TTAGGG-3' repeats. Binding of RRM1 to DNA inhibits the formation of DNA quadruplex structure which may play a role in telomere elongation. May play a role in the regulation of the rhythmic expression of circadian clock core genes.
<b>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F</b>	Component of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) complexes which provide the substrate for the processing events that pre-mRNAs undergo before becoming functional, translatable mRNAs in the cytoplasm. Plays a role in the regulation of alternative splicing events. Binds G-rich sequences in pre-mRNAs and keeps target RNA in an unfolded state.
<b>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H</b>	This protein is a component of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) complexes which provide the substrate for the processing events that pre-mRNAs undergo before becoming functional, translatable mRNAs in the cytoplasm. Mediates pre-mRNA alternative splicing regulation. Inhibits, together with CUGBP1, insulin receptor (IR) pre-mRNA exon 11 inclusion in myoblast. Binds to the IR RNA. Binds poly(RG).
<b>Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1</b>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) that associates with nascent pre-mRNAs, packaging them into hnRNP particles. The hnRNP particle arrangement on nascent hnRNA is non-random and sequence-dependent and serves to condense and stabilize the transcripts and minimize tangling and knotting. Packaging plays a role in various processes such as transcription, pre-mRNA processing, RNA nuclear export, subcellular location, mRNA translation and stability of mature mRNAs. Forms hnRNP particles with at least 20 other different hnRNP and heterogeneous nuclear RNA in the nucleus. Involved in transport of specific mRNAs to the cytoplasm in oligodendrocytes and neurons: acts by specifically recognizing and binding the A2RE (21 nucleotide hnRNP A2 response element) or the A2RE11 (derivative 11 nucleotide oligonucleotide) sequence motifs present on some mRNAs, and promotes their transport to the cytoplasm. Specifically binds single-stranded telomeric DNA sequences, protecting telomeric DNA repeat against endonuclease digestion.
<b>Immunoglobulin heavy constant alpha 2</b>	Constant region of immunoglobulin heavy chains. Immunoglobulins, also known as antibodies, are membrane-bound or secreted glycoproteins produced by B lymphocytes. In the recognition phase of humoral immunity, the membrane-bound immunoglobulins serve as receptors which, upon binding of a specific antigen, trigger the clonal expansion and differentiation of B lymphocytes into immunoglobulins-secreting plasma cells. Secreted immunoglobulins mediate the effector phase of humoral immunity, which results in the elimination of bound antigens. The antigen binding site is formed by the variable domain of one heavy chain, together with that of its associated light chain. Thus, each immunoglobulin has two antigen binding sites with remarkable affinity for a particular antigen. The variable domains are assembled by a process called V-(D)-J rearrangement and can then be subjected to somatic hypermutations which, after exposure to antigen and selection, allow affinity maturation for a particular antigen. Ig alpha is the major immunoglobulin class in body secretions.
<b>Immunoglobulin kappa variable 3D-20</b>	V region of the variable domain of immunoglobulin light chains that participates in the antigen recognition.



<b>Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1</b>	Intracellular channel that mediates calcium release from the endoplasmic reticulum following stimulation by inositol 1,4,5-trisphosphate. Involved in the regulation of epithelial secretion of electrolytes and fluid through the interaction with AHCYL1. Plays a role in ER stress-induced apoptosis.
<b>Junction plakoglobin</b>	Common junctional plaque protein. The membrane-associated plaques are architectural elements in an important strategic position to influence the arrangement and function of both the cytoskeleton and the cells within the tissue. The presence of plakoglobin in both the desmosomes and in the intermediate junctions suggests that it plays a central role in the structure and function of submembranous plaques. Acts as a substrate for VE-PTP and is required by it to stimulate VE-cadherin function in endothelial cells.
<b>Kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 3, isoform CRA_a</b>	
<b>Kelch-like protein 22</b>	Substrate-specific adapter of a BCR (BTB-CUL3-RBX1) E3 ubiquitin ligase complex required for chromosome alignment and localization of PLK1 at kinetochores. The BCR(KLHL22) ubiquitin ligase complex mediates monoubiquitination of PLK1, leading to PLK1 dissociation from phosphoreceptor proteins and subsequent removal from kinetochores, allowing silencing of the spindle assembly checkpoint (SAC) and chromosome segregation. Monoubiquitination of PLK1 does not lead to PLK1 degradation. The BCR(KLHL22) ubiquitin ligase complex is also responsible for the amino acid-stimulated 'Lys-48' polyubiquitination and proteasomal degradation of DEPDC5. Through the degradation of DEPDC5, releases the GATOR1 complex-mediated inhibition of the TORC1 pathway. It is therefore an amino acid-dependent activator within the amino acid-sensing branch of the TORC1 pathway, indirectly regulating different cellular processes including cell growth and autophagy.
<b>Keratin, type I cytoskeletal 17</b>	Type I keratin involved in the formation and maintenance of various skin appendages, specifically in determining shape and orientation of hair. Involved in tissue repair. May be a marker of basal cell differentiation in complex epithelia and therefore indicative of a certain type of epithelial 'stem cells'.
<b>Keratin, type II cytoskeletal 1b</b>	Cornification. Keratinization.
<b>Keratin, type II cytoskeletal 6B</b>	Structural constituent of cytoskeleton.
<b>Lamina-associated polypeptide 2, isoform alpha</b>	May be involved in the structural organization of the nucleus and in the post-mitotic nuclear assembly. Plays an important role, together with LMNA, in the nuclear anchorage of RB1. TP and TP5 may play a role in T-cell development and function. TP5 is an immunomodulating pentapeptide.
<b>LanC-like protein 1</b>	Functions as glutathione transferase. Catalyzes conjugation of the glutathione (GSH) to artificial substrates 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) and p-nitrophenyl acetate. Mitigates neuronal oxidative stress during normal postnatal development and in response to oxidative stresses probably through GSH antioxidant defense mechanism.
<b>La-related protein 1</b>	RNA-binding protein that regulates the translation of specific target mRNA species downstream of the mTORC1 complex, in function of growth signals and nutrient availability. Interacts on the one hand with the 3' poly-A tails that are present in all mRNA molecules, and on the other hand with the 7-methylguanosine cap structure of mRNAs containing a 5' terminal oligopyrimidine (5'TOP) motif, which is present in mRNAs encoding ribosomal proteins and several components of the translation machinery. The interaction with the 5' end of mRNAs containing a 5'TOP motif leads to translational repression by preventing the binding of EIF4G1. When mTORC1 is activated, LARP1 is phosphorylated and dissociates from the 5' untranslated region (UTR) of mRNA. Does not prevent binding of EIF4G1 to mRNAs that lack a 5'TOP motif. Interacts with the free 40S ribosome subunit and with ribosomes, both monosomes and polysomes. Under normal nutrient availability, interacts primarily with the 3' untranslated region (UTR) of mRNAs encoding ribosomal proteins and increases protein synthesis. Associates with actively translating ribosomes and stimulates translation of mRNAs containing a 5'TOP motif, thereby regulating protein synthesis, and as a consequence, cell growth and proliferation. Stabilizes mRNAs species with a 5'TOP motif, which is required to prevent apoptosis.
<b>LIM and SH3 domain protein 1</b>	Plays an important role in the regulation of dynamic actin-based, cytoskeletal activities.
<b>LIM domain and actin-binding protein 1</b>	Actin-binding protein involved in actin cytoskeleton regulation and dynamics. Increases the number and size of actin stress fibers and inhibits membrane ruffling. Inhibits actin filament depolymerization. Bundles actin filaments, delays filament nucleation and reduces formation of branched filaments. Plays a role in cholesterol homeostasis.

	Influences plasma cholesterol levels through regulation of intestinal cholesterol absorption.
<b>L-lactate dehydrogenase B chain</b>	This protein is involved in step 1 of the subpathway that synthesizes (S)-lactate from pyruvate.
<b>Lysozyme</b>	Lysozymes have primarily a bacteriolytic function; those in tissues and body fluids are associated with the monocyte-macrophage system and enhance the activity of immunoagents.
<b>Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5</b>	F-actin-binding protein which plays a role in cross-linking actin to other cytoskeletal proteins and also binds to microtubules. Plays an important role in ERBB2-dependent stabilization of microtubules at the cell cortex. Acts as a positive regulator of Wnt receptor signaling pathway and is involved in the translocation of AXIN1 and its associated complex (composed of APC, CTNNB1 and GSK3B) from the cytoplasm to the cell membrane. Has actin-regulated ATPase activity and is essential for controlling focal adhesions (FAs) assembly and dynamics. Interaction with CAMSAP3 at the minus ends of non-centrosomal microtubules tethers microtubules minus-ends to actin filaments, regulating focal adhesion size and cell migration. May play role in delivery of transport vesicles containing GPI-linked proteins from the trans-Golgi network through its interaction with GOLGA4.
<b>Microtubule-associated protein 1B</b>	Facilitates tyrosination of alpha-tubulin in neuronal microtubules. Phosphorylated MAP1B may play a role in the cytoskeletal changes that accompany neurite extension. Possibly MAP1B binds to at least two tubulin subunits in the polymer, and this bridging of subunits might be involved in nucleating microtubule polymerization and in stabilizing microtubules. Acts as a positive cofactor in DAPK1-mediated autophagic vesicle formation and membrane blebbing.
<b>Myosin light chain 6B</b>	Regulatory light chain of myosin. Does not bind calcium.
<b>Myosin phosphatase Rho-interacting protein</b>	Targets myosin phosphatase to the actin cytoskeleton. Required for the regulation of the actin cytoskeleton by RhoA and ROCK1. Depletion leads to an increased number of stress fibers in smooth muscle cells through stabilization of actin fibers by phosphorylated myosin. Overexpression of MRIP as well as its F-actin-binding region leads to disassembly of stress fibers in neuronal cells.
<b>Myosin-11</b>	Muscle contraction.
<b>Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein</b>	Regulates actin polymerization by stimulating the actin-nucleating activity of the Arp2/3 complex. Involved in various processes, such as mitosis and cytokinesis, via its role in the regulation of actin polymerization. Together with CDC42, involved in the extension and maintenance of the formation of thin, actin-rich surface projections called filopodia. In addition to its role in the cytoplasm, also plays a role in the nucleus by regulating gene transcription, probably by promoting nuclear actin polymerization. Binds to HSF1/HSTF1 and forms a complex on heat shock promoter elements (HSE) that negatively regulates HSP90 expression. Plays a role in dendrite spine morphogenesis. Decreasing levels of DNMBP (using antisense RNA) alters apical junction morphology in cultured enterocytes, junctions curve instead of being nearly linear.
<b>Non-POU domain-containing octamer-binding protein</b>	DNA- and RNA binding protein, involved in several nuclear processes. Binds the conventional octamer sequence in double-stranded DNA. Also binds single-stranded DNA and RNA at a site independent of the duplex site. Involved in pre-mRNA splicing, probably as a heterodimer with SFPQ. Interacts with U5 snRNA, probably by binding to a purine-rich sequence located on the 3' side of U5 snRNA stem 1b. Together with PSCP1, required for the formation of nuclear paraspeckles. The SFPQ-NONO heteromer associated with MATR3 may play a role in nuclear retention of defective RNAs. The SFPQ-NONO heteromer may be involved in DNA unwinding by modulating the function of topoisomerase I/TOP1. The SFPQ-NONO heteromer may be involved in DNA non-homologous end joining (NHEJ) required for double-strand break repair and V(D)J recombination and may stabilize paired DNA ends. NONO is involved in transcriptional regulation. The SFPQ-NONO-NR5A1 complex binds to the CYP17 promoter and regulates basal and cAMP-dependent transcriptional activity. NONO binds to an enhancer element in long terminal repeats of endogenous intracisternal A particles (IAPs) and activates transcription. Regulates the circadian clock by repressing the transcriptional activator activity of the CLOCK-ARNTL/BMAL1 heterodimer. Important for the functional organization of GABAergic synapses. Plays a specific and important role in the regulation of synaptic RNAs and GPHN/gephyrin scaffold structure, through the regulation of GABRA2 transcript.
<b>Nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 2</b>	Binds RNA.
<b>Peroxisredoxin-5, mitochondrial</b>	Thiol-specific peroxidase that catalyzes the reduction of hydrogen peroxide and organic hydroperoxides to water and alcohols, respectively. Plays a role in cell protection against

	oxidative stress by detoxifying peroxides and as sensor of hydrogen peroxide-mediated signaling events.
<b>Peroxiredoxin-6</b>	Thiol-specific peroxidase that catalyzes the reduction of hydrogen peroxide and organic hydroperoxides to water and alcohols, respectively. Can reduce H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> and short chain organic, fatty acid, and phospholipid hydroperoxides. Also has phospholipase activity, can therefore either reduce the oxidized sn-2 fatty acyl group of phospholipids (peroxidase activity) or hydrolyze the sn-2 ester bond of phospholipids (phospholipase activity).
<b>Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 2</b>	Phosphatidylinositol (PtdIns) phosphatase that specifically hydrolyzes the 5-phosphate of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub> ) to produce PtdIns(3,4)P <sub>2</sub> , thereby negatively regulating the PI3K (phosphoinositide 3-kinase) pathways. Plays a central role in regulation of PI3K-dependent insulin signaling, although the precise molecular mechanisms and signaling pathways remain unclear. While overexpression reduces both insulin-stimulated MAP kinase and Akt activation, its absence does not affect insulin signaling or GLUT4 trafficking. Confers resistance to dietary obesity. May act by regulating AKT2, but not AKT1, phosphorylation at the plasma membrane. Part of a signaling pathway that regulates actin cytoskeleton remodeling. Required for the maintenance and dynamic remodeling of actin structures as well as in endocytosis, having a major impact on ligand-induced EGFR internalization and degradation. Participates in regulation of cortical and submembraneous actin by hydrolyzing PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub> thereby regulating membrane ruffling. Regulates cell adhesion and cell spreading. Required for HGF-mediated lamellipodium formation, cell scattering and spreading. Acts as a negative regulator of EPHA2 receptor endocytosis by inhibiting via PI3K-dependent Rac1 activation. Acts as a regulator of neuritogenesis by regulating PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub> level and is required to form an initial protrusive pattern, and later, maintain proper neurite outgrowth. Acts as a negative regulator of the FC-gamma-RIIA receptor (FCGR2A). Mediates signaling from the FC-gamma-RIIB receptor (FCGR2B), playing a central role in terminating signal transduction from activating immune/hematopoietic cell receptor systems. Involved in EGF signaling pathway. Upon stimulation by EGF, it is recruited by EGFR and dephosphorylates PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub> . Plays a negative role in regulating the PI3K-PKB pathway, possibly by inhibiting PKB activity.
<b>Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein</b>	May play a role in the regulation of mRNA stability. Binds to the 3'-most 134 nt of the SERPINE1/PAI1 mRNA, a region which confers cyclic nucleotide regulation of message decay. Seems to play a role in PML-nuclear bodies formation.
<b>Plectin</b>	Interlinks intermediate filaments with microtubules and microfilaments and anchors intermediate filaments to desmosomes or hemidesmosomes. Could also bind muscle proteins such as actin to membrane complexes in muscle. May be involved not only in the filaments network, but also in the regulation of their dynamics. Structural component of muscle. Isoform 9 plays a major role in the maintenance of myofiber integrity.
<b>Poly(U)-binding-splicing factor PUF60</b>	DNA- and RNA-binding protein, involved in several nuclear processes such as pre-mRNA splicing, apoptosis and transcription regulation.
<b>Prelamin-A/C</b>	Lamins are components of the nuclear lamina, a fibrous layer on the nucleoplasmic side of the inner nuclear membrane, which is thought to provide a framework for the nuclear envelope and may also interact with chromatin. Lamin A and C are present in equal amounts in the lamina of mammals. Plays an important role in nuclear assembly, chromatin organization, nuclear membrane and telomere dynamics. Required for normal development of peripheral nervous system and skeletal muscle and for muscle satellite cell proliferation. Required for osteoblastogenesis and bone formation. Also prevents fat infiltration of muscle and bone marrow, helping to maintain the volume and strength of skeletal muscle and bone. Required for cardiac homeostasis.
<b>Pre-mRNA-splicing factor CWC22 homolog</b>	Required for pre-mRNA splicing as component of the spliceosome. Promotes exon-junction complex (EJC) assembly. Hinders EIF4A3 from non-specifically binding RNA and escorts it to the splicing machinery to promote EJC assembly on mature mRNAs. Through its role in EJC assembly, required for nonsense-mediated mRNA decay.
<b>Probable ATP-dependent RNA helicase DDX41</b>	Probable ATP-dependent RNA helicase. Is required during post-transcriptional gene expression. May be involved in pre-mRNA splicing.
<b>Probable phosphoglycerate mutase 4</b>	This is the product of a processed gene created by retroposition from mRNA of an expressed gene. This gene seems to be expressed.
<b>Prohibitin-2</b>	Protein with pleiotropic attributes mediated in a cell-compartment- and tissue-specific manner, which include the plasma membrane-associated cell signaling functions, mitochondrial chaperone, and transcriptional co-regulator of transcription factors and sex steroid hormones in the nucleus. Also regulates cytochrome-c oxidase assembly (COX) and mitochondrial respiration. Binding to sphingoid 1-phosphate (SPP) modulates its regulator activity. Acts as a mediator of transcriptional repression by nuclear hormone receptors via

	recruitment of histone deacetylases. Functions as an estrogen receptor (ER)-selective coregulator that potentiates the inhibitory activities of antiestrogens and represses the activity of estrogens. In the plasma membrane, is involved in IGFBP6-induced cell migration.
<b>Proteasome endopeptidase complex</b>	Cleavage of peptide bonds with very broad specificity.
<b>Proteasome subunit alpha type</b>	Component of the 20S core proteasome complex involved in the proteolytic degradation of most intracellular proteins. This complex plays numerous essential roles within the cell by associating with different regulatory particles. Associated with two 19S regulatory particles, forms the 26S proteasome and thus participates in the ATP-dependent degradation of ubiquitinated proteins. The 26S proteasome plays a key role in the maintenance of protein homeostasis by removing misfolded or damaged proteins that could impair cellular functions, and by removing proteins whose functions are no longer required. Associated with the PA200 or PA28, the 20S proteasome mediates ubiquitin-independent protein degradation. This type of proteolysis is required in several pathways including spermatogenesis (20S-PA200 complex) or generation of a subset of MHC class I-presented antigenic peptides (20S-PA28 complex).
<b>Protein ARPC4-TTLL3</b>	Protein-glycine ligase activity. Actin filament polymerization. Arp2/3 complex-mediated actin nucleation. Protein polyglycylation.
<b>Protein disulfide-isomerase A6</b>	May function as a chaperone that inhibits aggregation of misfolded proteins. Negatively regulates the unfolded protein response (UPR) through binding to UPR sensors such as ERN1, which in turn inactivates ERN1 signaling. May also regulate the UPR via the EIF2AK3 UPR sensor. Plays a role in platelet aggregation and activation by agonists such as convulxin, collagen and thrombin.
<b>Protein disulfide-isomerase</b>	This multifunctional protein catalyzes the formation, breakage and rearrangement of disulfide bonds. At the cell surface, seems to act as a reductase that cleaves disulfide bonds of proteins attached to the cell. May therefore cause structural modifications of exofacial proteins. Inside the cell, seems to form/rearrange disulfide bonds of nascent proteins. At high concentrations, functions as a chaperone that inhibits aggregation of misfolded proteins. At low concentrations, facilitates aggregation (anti-chaperone activity). May be involved with other chaperones in the structural modification of the TG precursor in hormone biogenesis. Also acts a structural subunit of various enzymes such as prolyl 4-hydroxylase and microsomal triacylglycerol transfer protein MTTP. Receptor for LGALS9; the interaction retains P4HB at the cell surface of Th2 T helper cells, increasing disulfide reductase activity at the plasma membrane, altering the plasma membrane redox state and enhancing cell migration.
<b>Protein LSM12 homolog</b>	Protein binding.
<b>Protein LSM14 homolog A</b>	Essential for formation of P-bodies, cytoplasmic structures that provide storage sites for translationally inactive mRNAs and protect them from degradation. Acts as a repressor of mRNA translation. May play a role in mitotic spindle assembly.
<b>Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A</b>	Key regulator of protein phosphatase 1C (PPP1C). Mediates binding to myosin. As part of the PPP1C complex, involved in dephosphorylation of PLK1. Capable of inhibiting HIF1AN-dependent suppression of HIF1A activity.
<b>Protein S100-A7</b>	Calcium-dependent protein binding. Calcium ion binding. RAGE receptor binding. Zinc ion binding.
<b>Protein S100-A8</b>	S100A8 is a calcium- and zinc-binding protein which plays a prominent role in the regulation of inflammatory processes and immune response. It can induce neutrophil chemotaxis and adhesion. Predominantly found as calprotectin (S100A8/A9) which has a wide plethora of intra- and extracellular functions. The intracellular functions include: facilitating leukocyte arachidonic acid trafficking and metabolism, modulation of the tubulin-dependent cytoskeleton during migration of phagocytes and activation of the neutrophilic NADPH-oxidase. Activates NADPH-oxidase by facilitating the enzyme complex assembly at the cell membrane, transferring arachidonic acid, an essential cofactor, to the enzyme complex and S100A8 contributes to the enzyme assembly by directly binding to NCF2/P67PHOX. The extracellular functions involve proinflammatory, antimicrobial, oxidant-scavenging and apoptosis-inducing activities.
<b>Protein unc-45 homolog A</b>	Acts as co-chaperone for HSP90. Prevents the stimulation of HSP90AB1 ATPase activity by AHSA1. Positive factor in promoting PGR function in the cell. Necessary for normal cell proliferation. Necessary for normal myotube formation and myosin accumulation during muscle cell development.
<b>Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2</b>	Catalyzes the cross-linking of proteins, such as WDR54, and the conjugation of polyamines to proteins.

<b>Protocadherin gamma-A9</b>	Potential calcium-dependent cell-adhesion protein. May be involved in the establishment and maintenance of specific neuronal connections in the brain.
<b>Putative 40S ribosomal protein S10-like</b>	RNA binding. Structural constituent of ribosome.
<b>Ras GTPase-activating protein-binding protein 2</b>	Scaffold protein that plays an essential role in cytoplasmic stress granule formation which acts as a platform for antiviral signaling.
<b>Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1</b>	Plays a crucial role in regulating the dynamics and assembly of the actin cytoskeleton. Binds to activated CDC42 but does not stimulate its GTPase activity. It associates with calmodulin. Could serve as an assembly scaffold for the organization of a multimolecular complex that would interface incoming signals to the reorganization of the actin cytoskeleton at the plasma membrane. May promote neurite outgrowth. May play a possible role in cell cycle regulation by contributing to cell cycle progression after DNA replication arrest.
<b>Ras-related protein Rab-1A</b>	The small GTPases Rab are key regulators of intracellular membrane trafficking, from the formation of transport vesicles to their fusion with membranes. Rabs cycle between an inactive GDP-bound form and an active GTP-bound form that is able to recruit to membranes different sets of downstream effectors directly responsible for vesicle formation, movement, tethering and fusion. RAB1A regulates vesicular protein transport from the endoplasmic reticulum (ER) to the Golgi compartment and on to the cell surface, and plays a role in IL-8 and growth hormone secretion. Regulates the level of CASR present at the cell membrane. Plays a role in cell adhesion and cell migration, via its role in protein trafficking. Plays a role in autophagosome assembly and cellular defense reactions against pathogenic bacteria. Plays a role in microtubule-dependent protein transport by early endosomes and in anterograde melanosome transport.
<b>Ras-related protein Rab-5C</b>	Protein transport. Probably involved in vesicular traffic.
<b>Ras-related protein Rab-7a</b>	Key regulator in endo-lysosomal trafficking. Governs early-to-late endosomal maturation, microtubule minus-end as well as plus-end directed endosomal migration and positioning, and endosome-lysosome transport through different protein-protein interaction cascades. Plays a central role, not only in endosomal traffic, but also in many other cellular and physiological events, such as growth-factor-mediated cell signaling, nutrient-transporter mediated nutrient uptake, neurotrophin transport in the axons of neurons and lipid metabolism. Also involved in regulation of some specialized endosomal membrane trafficking, such as maturation of melanosomes, pathogen-induced phagosomes (or vacuoles) and autophagosomes. In concert with RAC1, plays a role in regulating the formation of RBs (ruffled borders) in osteoclasts. Controls the endosomal trafficking and neurite outgrowth signaling of NTRK1/TRKA. Regulates the endocytic trafficking of the EGF-EGFR complex by regulating its lysosomal degradation.
<b>Receptor of-activated protein C kinase 1</b>	Scaffolding protein involved in the recruitment, assembly and/or regulation of a variety of signaling molecules. Interacts with a wide variety of proteins and plays a role in many cellular processes. Component of the 40S ribosomal subunit involved in translational repression. Involved in the initiation of the ribosome quality control (RQC), a pathway that takes place when a ribosome has stalled during translation, by promoting ubiquitination of a subset of 40S ribosomal subunits. Binds to and stabilizes activated protein kinase C (PKC), increasing PKC-mediated phosphorylation. May recruit activated PKC to the ribosome, leading to phosphorylation of EIF6. Inhibits the activity of SRC kinases including SRC, LCK and YES1. Inhibits cell growth by prolonging the G0/G1 phase of the cell cycle. Involved in PKC-dependent translocation of ADAM12 to the cell membrane. Promotes apoptosis by increasing oligomerization of BAX and disrupting the interaction of BAX with the anti-apoptotic factor BCL2L. Regulates cell surface expression of some GPCRs such as TBXA2R. Plays a role in regulation of FLT1-mediated cell migration. Promotes migration of breast carcinoma cells by binding to and activating RHOA.
<b>Regulator of nonsense transcripts 1</b>	RNA-dependent helicase and ATPase required for nonsense-mediated decay (NMD) of mRNAs containing premature stop codons. Is recruited to mRNAs upon translation termination and undergoes a cycle of phosphorylation and dephosphorylation; its phosphorylation appears to be a key step in NMD.
<b>Rho guanine nucleotide exchange factor 7</b>	Acts as a RAC1 guanine nucleotide exchange factor (GEF) and can induce membrane ruffling. Functions in cell migration, attachment and cell spreading. Promotes targeting of RAC1 to focal adhesions. May function as a positive regulator of apoptosis. Downstream of NMDA receptors and CaMKK-CaMK1 signaling cascade, promotes the formation of spines and synapses in hippocampal neurons.
<b>Ribonuclease inhibitor</b>	Ribonuclease inhibitor which inhibits RNASE1, RNASE2 and ANG. May play a role in redox homeostasis.

<b>Ribosomal protein L15</b>	Cadherin binding. RNA binding. Structural constituent of ribosome.
<b>Ribosomal protein L19</b>	RNA binding. Structural constituent of ribosome.
<b>RNA transcription, translation and transport factor protein</b>	RNA-binding protein involved in modulation of mRNA transcription by Polymerase II. Component of the tRNA-splicing ligase complex and is required for tRNA ligation. May be required for RNA transport.
<b>RNA-binding motif, single-stranded-interacting protein 3</b>	Binds poly(A) and poly(U) oligoribonucleotides.
<b>RNA-binding protein EWS</b>	Might normally function as a transcriptional repressor. EWS-fusion-proteins (EFPS) may play a role in the tumorigenic process. They may disturb gene expression by mimicking, or interfering with the normal function of CTD-POLII within the transcription initiation complex. They may also contribute to an aberrant activation of the fusion protein target genes.
<b>Serine/arginine-rich splicing factor 6</b>	Plays a role in constitutive splicing and modulates the selection of alternative splice sites. Plays a role in the alternative splicing of MAPT/Tau exon 10. Binds to alternative exons of TNC pre-mRNA and promotes the expression of alternatively spliced TNC. Plays a role in wound healing and in the regulation of keratinocyte differentiation and proliferation via its role in alternative splicing.
<b>Serine/arginine-rich-splicing factor 1</b>	Plays a role in preventing exon skipping, ensuring the accuracy of splicing and regulating alternative splicing. Interacts with other spliceosomal components, via the RS domains, to form a bridge between the 5'- and 3'-splice site binding components, U1 snRNP and U2AF.
<b>Serine/arginine-rich-splicing factor 2</b>	Necessary for the splicing of pre-mRNA. It is required for formation of the earliest ATP-dependent splicing complex and interacts with spliceosomal components bound to both the 5'- and 3'-splice sites during spliceosome assembly. It also is required for ATP-dependent interactions of both U1 and U2 snRNPs with pre-mRNA. Interacts with other spliceosomal components, via the RS domains, to form a bridge between the 5'- and 3'-splice site binding components, U1 snRNP and U2AF. Binds to purine-rich RNA sequences, either 5'-AGSAGAGTA-3' (S=C or G) or 5'-GTTCGAGTA-3'. Can bind to beta-globin mRNA and commit it to the splicing pathway. The phosphorylated form (by SRPK2) is required for cellular apoptosis in response to cisplatin treatment.
<b>Serine/arginine-rich-splicing factor 7</b>	Required for pre-mRNA splicing. Can also modulate alternative splicing in vitro. Represses the splicing of MAPT/Tau exon 10. May function as export adapter involved in mRNA nuclear export such as of histone H2A. Binds mRNA which is thought to be transferred to the NXF1-NXT1 heterodimer for export (TAP/NXF1 pathway); enhances NXF1-NXT1 RNA-binding activity. RNA-binding is semi-sequence specific.
<b>Serine/threonine-protein phosphatase</b>	Phosphoprotein phosphatase activity.
<b>Serine/threonine-protein phosphatase PGAM5, mitochondrial</b>	Displays phosphatase activity for serine/threonine residues, and, dephosphorylates and activates MAP3K5 kinase. Has apparently no phosphoglycerate mutase activity. May be regulator of mitochondrial dynamics. Substrate for a KEAP1-dependent ubiquitin ligase complex. Contributes to the repression of NFE2L2-dependent gene expression. Acts as a central mediator for programmed necrosis induced by TNF, by reactive oxygen species and by calcium ionophore.
<b>Serine-threonine kinase receptor-associated protein</b>	The SMN complex plays a catalyst role in the assembly of small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs), the building blocks of the spliceosome. Thereby, plays an important role in the splicing of cellular pre-mRNAs. Most spliceosomal snRNPs contain a common set of Sm proteins SNRPB, SNRPD1, SNRPD2, SNRPD3, SNRPE, SNRPF and SNRPG that assemble in a heptameric protein ring on the Sm site of the small nuclear RNA to form the core snRNP. In the cytosol, the Sm proteins SNRPD1, SNRPD2, SNRPE, SNRPF and SNRPG are trapped in an inactive 6S pICln-Sm complex by the chaperone CLNS1A that controls the assembly of the core snRNP. Dissociation by the SMN complex of CLNS1A from the trapped Sm proteins and their transfer to an SMN-Sm complex triggers the assembly of core snRNPs and their transport to the nucleus. STRAP plays a role in the cellular distribution of the SMN complex. Negatively regulates TGF-beta signaling but positively regulates the PDPK1 kinase activity by enhancing its autophosphorylation and by significantly reducing the association of PDPK1 with 14-3-3 protein.
<b>Serpin B12</b>	Inhibits trypsin and plasmin, but not thrombin, coagulation factor Xa, or urokinase-type plasminogen activator.
<b>Serpin B4</b>	May act as a protease inhibitor to modulate the host immune response against tumor cells.
<b>Serpin H1</b>	Binds specifically to collagen. Could be involved as a chaperone in the biosynthetic pathway of collagen.
<b>Smoothelin</b>	Structural protein of the cytoskeleton.

<b>Spectrin beta chain</b>	Spectrin is the major constituent of the cytoskeletal network underlying the erythrocyte plasma membrane. It associates with band 4.1 and actin to form the cytoskeletal superstructure of the erythrocyte plasma membrane.
<b>S-phase kinase-associated protein 1</b>	Essential component of the SCF (SKP1-CUL1-F-box protein) ubiquitin ligase complex, which mediates the ubiquitination of proteins involved in cell cycle progression, signal transduction and transcription. In the SCF complex, serves as an adapter that links the F-box protein to CUL1. The functional specificity of the SCF complex depends on the F-box protein as substrate recognition component. SCF(BTRC) and SCF(FBXW11) direct ubiquitination of CTNNB1 and participate in Wnt signaling. SCF(FBXW11) directs ubiquitination of phosphorylated NFKBIA. SCF(BTRC) directs ubiquitination of NFKBIB, NFKBIE, ATF4, SMAD3, SMAD4, CDC25A, FBXO5, CEP68 and probably NFKB2. SCF(SKP2) directs ubiquitination of phosphorylated CDKN1B/p27kip and is involved in regulation of G1/S transition. SCF(SKP2) directs ubiquitination of ORC1, CDT1, RBL2, ELF4, CDKN1A, RAG2, FOXO1A, and probably MYC and TAL1. SCF(FBXW7) directs ubiquitination of cyclin E, NOTCH1 released notch intracellular domain (NICD), and probably PSEN1. SCF(FBXW2) directs ubiquitination of GCM1. SCF(FBXO32) directs ubiquitination of MYOD1. SCF(FBXO7) directs ubiquitination of BIRC2 and DLGAP5. SCF(FBXO33) directs ubiquitination of YBX1. SCF(FBXO11) directs ubiquitination of BCL6 and DTL but does not seem to direct ubiquitination of TP53. SCF(BTRC) mediates the ubiquitination of NFKBIA at 'Lys-21' and 'Lys-22'; the degradation frees the associated NFKB1-RELA dimer to translocate into the nucleus and to activate transcription. SCF(CCNF) directs ubiquitination of CCP110. SCF(FBXL3) and SCF(FBXL21) direct ubiquitination of CRY1 and CRY2. SCF(FBXO9) directs ubiquitination of TTI1 and TELO2. SCF(FBXO10) directs ubiquitination of BCL2.
<b>Splicing factor U2AF 35 kDa subunit</b>	Plays a critical role in both constitutive and enhancer-dependent splicing by mediating protein-protein interactions and protein-RNA interactions required for accurate 3'-splice site selection. Recruits U2 snRNP to the branch point. Directly mediates interactions between U2AF2 and proteins bound to the enhancers and thus may function as a bridge between U2AF2 and the enhancer complex to recruit it to the adjacent intron.
<b>Supervillin</b>	Forms a high-affinity link between the actin cytoskeleton and the membrane. Is among the first costameric proteins to assemble during myogenesis and it contributes to myogenic membrane structure and differentiation. Appears to be involved in myosin II assembly. May modulate myosin II regulation through MLCK during cell spreading, an initial step in cell migration. May play a role in invadopodial function. May be involved in modulation of focal adhesions. Supervillin-mediated down-regulation of focal adhesions involves binding to TRIP6.
<b>TATA-binding protein-associated factor 2N</b>	RNA and ssDNA-binding protein that may play specific roles during transcription initiation at distinct promoters. Can enter the preinitiation complex together with the RNA polymerase II (Pol II).
<b>T-complex protein 1 subunit alpha</b>	Component of the chaperonin-containing T-complex (TRiC), a molecular chaperone complex that assists the folding of proteins upon ATP hydrolysis. The TRiC complex mediates the folding of WRAP53/TCAB1, thereby regulating telomere maintenance. As part of the TRiC complex may play a role in the assembly of BBSome, a complex involved in ciliogenesis regulating transports vesicles to the cilia.
<b>T-complex protein 1 subunit gamma</b>	Component of the chaperonin-containing T-complex (TRiC), a molecular chaperone complex that assists the folding of proteins upon ATP hydrolysis. The TRiC complex mediates the folding of WRAP53/TCAB1, thereby regulating telomere maintenance. As part of the TRiC complex may play a role in the assembly of BBSome, a complex involved in ciliogenesis regulating transports vesicles to the cilia.
<b>T-complex protein 1 subunit theta</b>	Component of the chaperonin-containing T-complex (TRiC), a molecular chaperone complex that assists the folding of proteins upon ATP hydrolysis. The TRiC complex mediates the folding of WRAP53/TCAB1, thereby regulating telomere maintenance. As part of the TRiC complex may play a role in the assembly of BBSome, a complex involved in ciliogenesis regulating transports vesicles to the cilia.
<b>Transcription factor A, mitochondrial</b>	Binds to the mitochondrial light strand promoter and functions in mitochondrial transcription regulation. Component of the mitochondrial transcription initiation complex, composed at least of TFB2M, TFAM and POLRMT that is required for basal transcription of mitochondrial DNA. Required for accurate and efficient promoter recognition by the mitochondrial RNA polymerase. Promotes transcription initiation from the HSP1 and the light strand promoter by binding immediately upstream of transcriptional start sites. Bends the mitochondrial light strand promoter DNA into a U-turn shape via its HMG boxes. Required for maintenance of normal levels of mitochondrial DNA. May play a role in organizing and compacting mitochondrial DNA.

<b>Transcriptional activator protein Pur-beta</b>	Has capacity to bind repeated elements in single-stranded DNA such as the purine-rich single strand of the PUR element located upstream of the MYC gene. Plays a role in the control of vascular smooth muscle (VSM) alpha-actin gene transcription as repressor in myoblasts and fibroblasts. Participates in transcriptional and translational regulation of alpha-MHC expression in cardiac myocytes by binding to the purine-rich negative regulatory (PNR) element.
<b>Transmembrane protein 33</b>	Acts as a regulator of the tubular endoplasmic reticulum (ER) network. Suppresses the RTN3/4-induced formation of the ER tubules. Positively regulates PERK-mediated and IRE1-mediated unfolded protein response signaling.
<b>Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial</b>	Mitochondrial trifunctional enzyme catalyzes the last three of the four reactions of the mitochondrial beta-oxidation pathway. The mitochondrial beta-oxidation pathway is the major energy-producing process in tissues and is performed through four consecutive reactions breaking down fatty acids into acetyl-CoA. Among the enzymes involved in this pathway, the trifunctional enzyme exhibits specificity for long-chain fatty acids. It acylates monolysocardiolipin into cardiolipin, a major mitochondrial membrane phospholipid which plays a key role in apoptosis and supports mitochondrial respiratory chain complexes in the generation of ATP.
<b>tRNA-splicing ligase RtcB homolog</b>	Catalytic subunit of the tRNA-splicing ligase complex that acts by directly joining spliced tRNA halves to mature-sized tRNAs by incorporating the precursor-derived splice junction phosphate into the mature tRNA as a canonical 3',5'-phosphodiester. May act as an RNA ligase with broad substrate specificity, and may function toward other RNAs.
<b>Tropomodulin-3</b>	Blocks the elongation and depolymerization of the actin filaments at the pointed end. The Tmod/TM complex contributes to the formation of the short actin protofilament, which in turn defines the geometry of the membrane skeleton.
<b>Tropomyosin alpha-1 chain</b>	Binds to actin filaments in muscle and non-muscle cells. Plays a central role, in association with the troponin complex, in the calcium dependent regulation of vertebrate striated muscle contraction.
<b>Tropomyosin alpha-4 chain</b>	Binds to actin filaments in muscle and non-muscle cells. Plays a central role, in association with the troponin complex, in the calcium dependent regulation of vertebrate striated muscle contraction.
<b>Tubulin alpha-4A chain</b>	Tubulin is the major constituent of microtubules. It binds two moles of GTP, one at an exchangeable site on the beta chain and one at a non-exchangeable site on the alpha chain.
<b>Tyrosine--tRNA ligase</b>	Catalyzes the attachment of tyrosine to tRNA(Tyr) in a two-step reaction: tyrosine is first activated by ATP to form Tyr-AMP and then transferred to the acceptor end of tRNA(Tyr).
<b>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10</b>	Hydrolase that can remove conjugated ubiquitin from target proteins such as p53/TP53, BECN1, SNX3 and CFTR. Acts as an essential regulator of p53/TP53 stability: in unstressed cells, specifically deubiquitinates p53/TP53 in the cytoplasm, leading to counteract MDM2 action and stabilize p53/TP53. Following DNA damage, translocates to the nucleus and deubiquitinates p53/TP53, leading to regulate the p53/TP53-dependent DNA damage response.
<b>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase</b>	Ubiquitin-protein hydrolase involved both in the processing of ubiquitin precursors and of ubiquitinated proteins. This enzyme is a thiol protease that recognizes and hydrolyzes a peptide bond at the C-terminal glycine of ubiquitin. Also binds to free monoubiquitin and may prevent its degradation in lysosomes. The homodimer may have ATP-independent ubiquitin ligase activity.
<b>Unconventional myosin-Ib</b>	Motor protein that may participate in process critical to neuronal development and function such as cell migration, neurite outgrowth and vesicular transport.
<b>Unconventional myosin-Id</b>	Unconventional myosin that functions as actin-based motor protein with ATPase activity. Plays a role in endosomal protein trafficking, and especially in the transfer of cargo proteins from early to recycling endosomes.
<b>Vesicle-associated membrane protein 3</b>	SNARE involved in vesicular transport from the late endosomes to the trans-Golgi network.
<b>WAS/WASL-interacting protein family member 1 (Control interno)</b>	Plays a role in the reorganization of the actin cytoskeleton. Contributes with NCK1 and GRB2 in the recruitment and activation of WASL. May participate in regulating the subcellular localization of WASL, resulting in the disassembly of stress fibers in favor of filopodia formation. Plays a role in the formation of cell ruffles. Plays an important role in the intracellular motility of vaccinia virus by functioning as an adapter for recruiting WASL to vaccinia virus.
<b>YTH domain family, member 3, isoform CRA_a</b>	RNA binding.
<b>Zinc-alpha-2-glycoprotein</b>	Stimulates lipid degradation in adipocytes and causes the extensive fat losses associated with some advanced cancers. May bind polyunsaturated fatty acids.



---

ANEXO



Review

## Role of Akt Isoforms Controlling Cancer Stem Cell Survival, Phenotype and Self-Renewal

Sergio Rivas <sup>1,2,3</sup> , Carla Gómez-Oro <sup>2</sup>, Inés M. Antón <sup>2,3,\*</sup> and Francisco Wandosell <sup>1,3,\*</sup><sup>1</sup> Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), 28049 Madrid, Spain; srivas@cnb.csic.es<sup>2</sup> Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), 28049 Madrid, Spain; cgomez@cnb.csic.es<sup>3</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), 28031 Madrid, Spain

\* Correspondence: ianton@cnb.csic.es (I.M.A.); fwandosell@cbm.csic.es (F.W.)

Received: 31 January 2018; Accepted: 6 March 2018; Published: 7 March 2018

**Abstract:** The cancer stem cell (CSC) hypothesis suggests that tumours are maintained by a subpopulation of cells with stem cell properties. Although the existence of CSCs was initially described in human leukaemia, less evidence exists for CSCs in solid tumours. Recently, a CD133+ cell subpopulation was isolated from human brain tumour exhibiting stem cell properties in vitro as well as the capacity to initiate tumours in vivo. In the present work, we try to summarize the data showing that some elements of the Phosphoinositide 3-kinase Class I (PI3K)/ Thymoma viral oncogene protein kinase (Akt) pathway, such the activity of PI3K Class I or Akt2, are necessary to maintain the CSC-like phenotype as well as survival of CSCs (also denoted as tumour-initiating cells (TICs)). Our data and other laboratory data permit a working hypothesis in which each Akt isoform plays an important and specific role in CSC/TIC growth, self-renewal, maintaining survival, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenotype, not only in breast cancer, but also in glioma. We suggest that a more complete understanding is needed of the possible roles of isoforms in human tumours (iso-signalling determination). Thus, a comprehensive analysis of how hierarchical signalling is assembled during oncogenesis, how cancer landmarks are interconnected to favour CSC and tumour growth, and how some protein isoforms play a specific role in CSCs to ensure that survival and proliferation must be done in order to propose/generate new therapeutic approaches (alone or in combination with existing ones) to use against cancer.

**Keywords:** signaling in cancer; Akt; PI3K; glioma; CSCs; TICs; proliferation; survival

### 1. Introduction

Glioblastoma (GBM) is the most common and aggressive subtype of the malignant gliomas, which is characterized by intense proliferation, invasion, and intratumour heterogeneity. The previous classification of gliomas that was generated by the World Health Organization (WHO) organized this tumour type in four classes. WHO grade I corresponds to astrocytic, oligodendroglial, and mixed oligo-astrocytic gliomas, and includes the most common pediatric gliomas. WHO grade II are low-grade gliomas, whereas the most aggressive tumours and high-grade or anaplastic, fast-growing gliomas are designated WHO grades III and IV. In human populations, the most frequent and malignant type is GBM WHO grade IV. In 2016, the WHO shifted to a new classification system based on both phenotype and genotype [1], where the diffuse gliomas include WHO grade II and III astrocytic tumors, grade II and III oligodendroglomas, and grade IV GBM. In the most aggressive GBMs, mutations in the genes of tumour protein p53 (TP53) and phosphatase and tensin homolog (PTEN) as well as epidermal growth factor receptor (EGFR) amplifications are quite common [1].

The description in many tumour types of “biological plasticity”, showing that a single, theoretically homogeneous population of cells may generate phenotypically heterogeneous cells in distinct states of

differentiation, and the presence of stem-like markers inside these tumour populations have led to the cancer stem cell (CSC) hypothesis. This hypothesis suggests that the oncogenic capacity and biological plasticity of a tumour is that is maintained by a minor fraction of cells with stem-like properties, denoted as CSCs or tumor-initiating cells (TICs). In some cases, these are detectable by the high level expression of markers, such as hyaluronic acid receptor (CD44), prominin-1 (CD133), Nestin, or SRY (sex-determining region Y)-box 2 (Sox2), are expressed, among others.

This hypothesis was initially supported by the identification of stem-like cell populations in human leukaemia [2,3], and cells with analogous properties have been described in many solid tumors. In brain tumors, a subpopulation CD133+ cells were characterized as CSCs [4], and when isolated, they exhibited CSC properties *in vitro* and *in vivo* [5,6]. The ability for self-renewal as well as the capacity to generate different cell phenotypes provides a suitable explanation for the heterogeneity of CSC subpopulations that are observed within tumours [4]. Additionally, the identification and characterization of highly tumorigenic subpopulations within gliomas has opened the possibility of development of novel anti-glioma therapeutics.

## 2. CSCs/TICs

Cancer cells initiate and drive tumour progression forward, carrying oncogenic and tumour suppressor mutations that define cancer as a genetic disease. Independently of semantic questions about whether they should be denoted as CSCs or TICs, these tumour cell subpopulations possess the ability to self-renew and produce differentiating progeny, much like their normal counterpart. One open question is whether they are derived from normal stem cell populations, or may be generated from a “dedifferentiation” of a more differentiated cell. Indeed, Ronald DePinho’s group demonstrated that the combined loss of tumour suppressor proteins p16 and p19, from the *Ink4a/Arf* locus, enables mature astrocyte dedifferentiation through EGFR activation. Certainly, the transduction of *Ink4a/Arf*<sup>(-/-)</sup> neural stem cells (NSCs), or astrocytes with constitutively active EGFR, induced a comparably high-grade glioma phenotype [7,8]. Thus, it has been proposed that oncogene-induced dedifferentiation of mature cells in the brain to a stem/progenitor-like state leads to heterogeneous glioma tumours (for review see [9]). When considering all these data, the initiation of oncogenesis perhaps is not a question of “unique cell type”, but might be a combination of mutations that first generate this stem-like phenotype with a subsequent accumulation of mutation that boost the oncogenic progression.

The genetically-acquired plasticity of these cells allows progression and maintenance of this aggressive tumour type, and even formation of its own blood vessels by transdifferentiation [10]. The data also supports the view that was originally proposed by Ronald DePinho and his group [7], that the dysregulation of specific genetic pathways, rather than the cell of origin, dictates the emergence and phenotype of high-grade gliomas [8]. For many tumour types, it is generally accepted that when a primary tumour is formed, a CSC subpopulation is generated that may self-renew as well as generate more differentiated derivatives, and that these heterogeneous progeny form and increase the tumour size. However, we still do not have much information about how this process of interconversion occurs *in vivo*, or the mechanism that regulates the dynamic equilibrium that exists between non-CSCs and CSCs.

CSCs/TICs can be defined operationally through their ability to efficiently seed new tumours upon inoculation into recipient host mice [11,12]. This functional definition is often complemented by measuring markers that are also expressed by the normal stem cells of the tissue-of-origin [13]. Indeed, in almost all gliomas and tumour cells from neural lineages we have analysed, we obtained and enriched CSC-like cells using defined cell culture media in an anchorage-independent system [6,14,15]. Expression of glioma stem-markers, such as CD133, Nestin, and Sox2 is significantly increased in tumours growing in suspension, as neurospheres [16–18]. In fact, CD133+ and CD133– subpopulations that were obtained from primary tumours presented differential gene repertoires and dissimilar capacity to generate new tumours *in vivo* upon implantation in immunodeficient

mice [17,19–23]. CD133 is a membrane protein interconnected with the Phosphoinositide 3-kinase Class I (PI3K)/Thymoma viral oncogene protein kinase (Akt) pathway; phosphorylation of tyrosine-828 within its C-terminal cytoplasmic domain mediates direct interaction with the PI3K 85 kDa regulatory subunit (p85) and favours the preferential activation of the Akt pathway in glioma stem cells relative to matched non-stem cells [24].

Certainly, it is plausible that the phenotypic plasticity working within tumours may produce bidirectional interconversion between CSCs and non-CSCs, resulting in a dynamic variation in the relative abundance of CSCs and explaining the cellular intratumoral heterogeneity. Indeed, we do not have complete evidence showing that in gliomas there is an intrinsically heterogeneous CSC-like population with a gradation of CD133, Nestin, and Sox2, but it appears to be plausible.

Recent research has linked the acquisition of CSC traits with the epithelial-mesenchymal transition (EMT) trans-differentiation program [25–27]. Induction of EMT in certain cellular models can bring many of the defining features of “stem cells”, and stem-like cells that were isolated either from mouse or human mammary glands or mammary carcinomas similarly express EMT markers (snail, vimentin and fibronectin) [26]. The EMT program can confer on such cells the self-renewal capability that is crucial to their subsequent clonal expansion [28], and may allow for cancer cells to physically disseminate from primary tumours, a capacity that was developed by many tumour cells. In addition, EMT cells may generate antigenic phenotypes that were associated with both normal and cancer stem cells.

Thus, the EMT program is implicated in tumour plasticity, which can be engaged reversibly from EMT to mesenchymal-epithelial transition (MET) [29]. For example, an EMT can convert epithelial carcinoma cells into mesenchymal, fibroblast-like cancer cells that may well assume the duties of cancer-associated fibroblasts (CAFs) in some tumours [30,31]. Remarkably, several recent reports have documented the ability of glioblastoma cells (or possibly their associated CSC subpopulations) to transdifferentiate into endothelial-like cells that can substitute for *bona fide* host-derived endothelial cells in forming a tumour-associated neovasculature [10,31,32].

Tumour heterogeneity has important implications for effective cancer therapies. The heterogeneity and capacity for interconversion among phenotypes make tumours more adaptable not only in different physiological and tissue environments, but also in the resistance to therapy. It has been reported in a variety of tumour types that some cells with CSC properties are more resistant to chemotherapeutic treatments or radiotherapy [25,33,34], which may help to explain the recurrence of many tumour types.

### 3. The “Long Road” to Oncogenesis

In 2011, Hanahan and Weinberg proposed a framework for understanding the significant diversity of neoplastic diseases, using six general hallmarks modified in all cancer types [35]. They postulated that normal cells evolving to a neoplastic state, must acquire a succession of these hallmark capabilities, and that the multistep process of human tumour pathogenesis may be reorganized by the need of incipient cancer cells to become tumorigenic and ultimately malignant. Among these hallmarks, sustained cell survival and proliferation in combination with evasion of apoptotic checkpoints are early capabilities that are enhanced in initially transformed cells to form a tumour.

From the pioneer data of ras-mediated oncogenic transformation, summarized for instance by M. Malumbres and M. Barbacid [36], the activation by mutation in several elements of the mitogen-activated protein (MAP)-kinase pathway have been described [37]. Similarly, mutations in the phosphoinositide3-kinase (PI3K)-Akt pathway have been detected in many arrays of tumour types [38,39]. Both pathways represent the molecular bases of survival and proliferation in almost all cell types.

The PI3K-Akt pathway is considered to be one of the most relevant pathways that is involved in survival and proliferation, both activated in cancer cells. The involvement of the PI3K-Akt pathway in the development and progression of cancer has been studied extensively [40], establishing Akt1 as an oncogene [41]. Some elements in this pathway may control tumour cell proliferation [42,43],

and/or the maintenance of the tumour phenotype [44]. Indeed, Akt is frequently activated in human cancers (reviewed in [45] and its hyper-activation (directly by over-expression or mutation, or indirectly through alterations to PTEN) offers protection against apoptosis and at least in part promotes cell-cycle progression [46], which are two major hallmarks of cancer [35,47].

#### 4. Akt in Cancer

Akt (also known as protein kinase B, PKB) is a widely studied protein that was initially described as the human homolog of a viral oncogene [48], and it belongs to the family of proteins related with protein kinase A, G, and C (AGC family of kinases) [49]. Akt is involved in many biological processes and pathologies, such as metabolism regulation, cell growth, survival, proliferation, cancer, and neurodegenerative disorders [40,50]. In mammals, there are no fewer than three Akt isoforms encoded by three different genes (Akt1/PKB $\alpha$ , Akt2/PKB $\beta$ , and Akt3/PKB $\gamma$ ). In addition Akt3 may encode two variants, even though the physiological relevance of such variants is not clear [40,51,52]. These paralogs are closely related and share a high homology at the protein level [50]. A plethora of extracellular signals induce Akt activation through class I PI3K [40]. In this path, the production of phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PIP3) by the lipid kinase leads Akt to translocate to the plasma membrane, where it is activated by phosphorylation through two kinases: phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) and mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) of two amino acids residues, threonine 308 and serine 473, respectively (amino acid numbers corresponding to the Akt1 isoform) [53]. Furthermore, more putative kinases have been described to phosphorylate, at least threonine 308, such as integrin-linked kinase (ILK) [54]. Finally, active Akt exerts its function through the phosphorylation of a wide range of substrates.

Akt isoforms are differentially expressed and have been related to distinct functions. Akt1 and Akt2 are widely expressed, with especially high levels of Akt2 being present in the heart, skeletal muscle, adipose tissue, and testes, whereas Akt3 expression is mainly restricted to the brain and testes [50]. The generation and analysis of knockout mice for each Akt isoform has also revealed distinct physiological functions: Deletion of Akt1 reduces body and cell size [55,56] Akt2-knockouts show diabetes mellitus-like syndrome [55,57], and Akt3 deletion causes smaller brain size and corpus callosum disorganization [58,59]. Hyper-activation of the PI3K-Akt pathway is involved with progression in the majority of tumour types [60,61]. Moreover, the role of each Akt isoform in tumour development remains unclear despite the fact that each isoform may appear amplified or mutated in different cancer types. For instance, a specific activating mutation of Akt 1 (E17K) is associated with some tumour types [41,62]. In breast cancer, Akt1 appears to play a fundamental role in the propagation of such tumours [60,63–66], whereas ablation of Akt2 inhibits apoptosis and delays tumour involution [67].

In contrast to Akt1, which accelerates the induction of mammary tumours in transgenic mice, Akt2 can promote the metastasis of tumour cells without affecting the latency of tumour development in certain systems [68,69]. We recently analysed the role of Akt isoforms in survival and self-renewal of TICs as well as the correlation between Akt activity and CSC/EMT phenotype. Indeed, we found that Akt plays an important role in cancer and is frequently activated in human tumours (for review see, i.e., [45]).

Our first approach used TICs from breast cancer cell lines in an attachment-independent tumour cell growth system with serum-free medium. We demonstrated that the PI3K-Akt pathway includes elements that are essential to maintain the CSC-like phenotype, survival, and EMT characteristics in breast cancer cells and gliomas [70,71]. When we blocked PI3K activity, or when we knocked down Akt (mainly the Akt1 isoform), the survival and population size of TICs (measured as CD44High/CD24Low population) were severely reduced. Unexpectedly, the loss of cell viability provoked a modification of the CSC phenotype, whereby cells expressing stem/mesenchymal characteristics, like CD44High/CD24Low, high Vimentin, and low E-cadherin, were replaced by those with an epithelial-like phenotype (low Vimentin, high E-cadherin). Our data supported the

hypothesis that adoption of a CSC phenotype correlated with the EMT phenotype. This strongly suggested that the EMT programme not only may permit cancer cells to disseminate but also might confer on them a self-renewal capacity [26,27]. In addition, we observed that when Akt activity was interfered with or reduced, CSCs appeared to undergo a MET transition before they die.

This strongly suggests that some Akt-dependent elements are essential in the maintenance of CSC proliferation and phenotype. Next, we wanted to establish whether either Akt1 or Akt2 contributes to a specific aspect of the CSC-like phenotype. Our data showed a prominent role of Akt1, and to a lesser extent, Akt2, in such processes in TICs derived from breast cancer cells. Indeed, shRNA-Akt1 provoked a drastic reduction in the CD44<sup>High</sup>/CD24<sup>Low</sup> phenotype, growth capacity, and EMT markers. The reduction of Akt1 in these breast cancer cells induced cell death in which a MET transition preceded apoptosis [71]. In conjunction, these data indicated that the expression of CD44<sup>High</sup>/CD24<sup>Low</sup> and other mesenchymal markers in CSC-like cells is tightly linked to TIC survival and that Akt1 may control both.

Our data are in agreement with some reports using the cell line MCF10A expressing Insulin-like growth factor receptor (IGFR), showing that the down-regulation of Akt1, but not of Akt2, dramatically increased cell migration [68,72,73], which may correlate with Akt1's role in maintaining the EMT phenotype.

From these initial data, we cannot rule out the possibility that Akt2 or Akt3 may be more relevant in controlling the CSC phenotype in models from different tumour lineages. Certainly, in our breast cancer model, impairment of Akt1 or Akt2 does not produce identical biochemical profiles, as indicated by the effect on important proteins, such as Survivin or  $\beta$ -catenin [71].

At present, the specific role of Akt3 in tumours is not fully understood. In triple-negative breast cancer (TNBC), downregulation of Akt3 significantly inhibits growth in three-dimensional (3D) spheroid cultures and in mouse xenograft models [74]. In glioma, expression of Akt3 mRNA and protein decreases as the malignancy grade increases, in parallel with increased Akt2 mRNA and protein [75]. That study showed that the down-regulation of Akt2 or Akt3, but not Akt1, reduced the phosphorylated form of Bad, resulting in induction of caspase-dependent apoptosis. Similarly, a direct relationship has been reported between human GBM patient outcome and mRNA levels of both Akt1 and Akt2, but an inverse relationship with Akt3 mRNA. Accordingly, Akt3 mRNA levels were higher in less aggressive GBM subtypes, and the overexpression of Akt3 improved survival in a rodent model of GBM [76]. Our data confirm that the U87-MG and U373-MG gliomas express almost negligible amounts of Akt3 when maintained in CSC culture medium. These results open questions about the specific role of each Akt isoform in different tumour types that must be carefully studied.

More recently, we generated TICs from glioma cell lines or human glioblastomas, which were characterized by the presence of mutant p53 (mp53), and in serum-free medium the cells were enriched with markers, such as CD133 or CD44. The biochemical analysis of mp53 gliomas, growing as CSCs, showed good correlation between high levels of WIP and high levels of pAkt and pErk, and also between expression of the stem markers Yes-associated protein 1 (YAP) and Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ) [77]. We demonstrated that the knockdown of WIP and mp53 both reduced cellular growth and expression of stem markers (CD133, CD44 and YAP/TAZ) in a similar fashion. Next, we checked the capacity of different inhibitors to reduce the levels of these stem markers, and we observed that the PI3K class I inhibitor, GDC-0941, reduced CSC markers, strongly suggesting that elements downstream of PI3K are responsible for maintenance of the TIC phenotype. In order to identify these PI3K-downstream elements, we analysed the different Akt isoforms, among other candidates.

We demonstrated in these TICs that a deficiency of Akt2 strongly reduced CSC-like markers (CD133, CD44, or YAP/TAZ) [71,78], as well as EMT markers, when compared with similar Akt1 knockdown. More interestingly, these Akt2-deficient gliomas were not able to generate brain tumours upon implantation in immunodeficient mice, unlike glioma-derived controls. Moreover, our data demonstrated that this Akt2 function, regulating CSCs and EMT markers, is under the control of mp53,

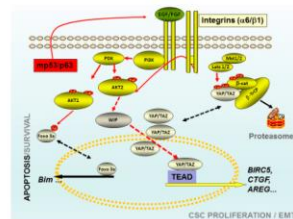
regulating a new pathway of oncogenesis in which WASP-interacting protein (WIP) and YAP/TAZ are downstream elements, which are essential in stemness control. In support of this, when we overexpressed mp53 in human astrocytes in attachment-independent conditions, we obtained CSC-like cells expressing CD133 and EMT markers. These transformed astrocytes used the Akt-WIP-YAP/TAZ path to sustain these TIC properties [78].

This new oncogenic pathway was not specific to cell lineage because similar results were obtained using some breast cancer cell lines with mp53.

The pathway that is described in these TIC tumour cells was different from those that were described for Akt1 (initially only in some breast cancer cells). In those from Akt1-dependent proliferation, we showed that Foxo and Bim are essential downstream to maintain proliferation and phenotype. In fact, Bim has been associated with apoptosis induced by a lack of adhesion, called “anoikis”, which is very relevant to breast cancer development [79,80]. In the case of Akt2, after experimentally discarding Foxo/Bim, we showed that YAP/TAZ are the main players in maintaining the proliferation and TIC capabilities.

It is important to remember the putative role of  $\beta$ -catenin in the regulation of CSCs and EMT transition. It is generally accepted that this protein plays an essential role in the development and in cancer as a Wnt or Hippo element [77,81]. Furthermore, some authors have described that  $\beta$ -catenin is essential to promote tumorigenic capacity downstream of Akt [24,42,82], as it is a partner of the YAP/TAZ proteins [83]. All these data strongly suggest that  $\beta$ -catenin, directly or indirectly, is a common element of both Akt1 and Akt2 oncogenic signalling.

Thus, we can conclude that in the case of Akt1-dependent CSCs, Foxo, and Bim play an important role in cell survival and proliferation [70], whereas in the case of Akt2, the main player is YAP/TAZ signalling [71], directly or indirectly associated with Wnt signalling. Some of the elements that are discussed in this review were schematically represented in the Figure 1. We cannot determine whether  $\beta$ -catenin is a common player interacting with Foxo [84] and the YAP/TAZ element [77].



**Figure 1.** Schematic representation of some elements that play a key role in the tumour-initiating cells (TICs). The Akt 1 isoform may control the viability versus apoptosis in CSCs derived from breast cancer cell lines through the control of FoxO phosphorylation. The knockdown of Akt 1 in these TICs triggered apoptosis through a mechanism FoxO3a-Bim dependent. TICs derived from gliomas, mutations of p53, correlated with high levels of WASP-interacting protein (WIP) protein and Yes-associated protein 1 (YAP)/Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ). In these TICs the presence of high levels of WIP are essential to maintain the proliferation and CSC-phenotype through an mp53 and Akt2. Whereas, high levels of WIP control the high levels of YAP/TAZ, preventing its degradation through proteasome. Red arrows indicated the pro-oncogenic pathways, black discontinued arrows indicated two potential stages of the same protein; red discontinued arrows indicated not necessarily direct links. Abbreviations: CSC: Cancer Stem cells; PI3K: Phosphoinositide 3-kinase Class I; Akt: viral oncogene protein kinase; Foxo 3a: Forkhead box O3; EGF: Epidermal Growth Factor; FGF: fibroblast growth factor; TEAD: Transcription factor TEA domain member 1; CTGF: Connective tissue growth factor; AREG: Amphiregulin; BIRC5: Baculoviral IAP repeat-containing protein 5; Mst 1/2: Serine/threonine-protein kinase3/4; Lats 1/2: Large tumor suppressor kinase 1/2;  $\beta$ -Trcp: beta-transducin repeat containing protein.

## 5. Conclusions

In the present work, we have summarized some elements of the PI3K-AKT pathway that are necessary to maintain the CSC-like phenotype as well as their survival, in TICs. Our data and other laboratory data support the working hypothesis that each Akt isoform plays an important and specific role in TIC growth, self-renewal, survival, and EMT phenotype. We cannot discriminate the effects of each Akt isoform on survival, proliferation, and stem-marker generation and maintenance in CSCs. Obviously, the possibility that each isoform may play some specific role in one of these tumour capabilities cannot be ruled out.

A more complete analysis of how hierarchical signalling is built into oncogenic generation must be done in order to propose/generate new therapeutic approaches (alone or in combination with previous ones) to use against cancer. We still have several open questions, such as how some protein isoforms play specific roles to ensure CSC survival and avoid apoptotic pathways, and how CSC and EMT phenotype and tumour growth are interconnected.

**Acknowledgments:** We are grateful to all members of Lab 16 at the Centro Nacional de Biotecnología (CNB) and of Lab 206 at the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO) for thoughtful discussions during the preparation of this review. This work was supported in part by grants from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO/FEDER SAF2015-70368-R), CIBERNED (an initiative of ISCIII) and the Fundación Ramón Areces to IMA and FW. In addition, Institutional grants from the Fundación Ramón Areces and Banco de Santander to the CBMSO are also acknowledged from FW (CBMSO).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Louis, D.N.; Perry, A.; Reifenberger, G.; von Deimling, A.; Figarella-Branger, D.; Cavenee, W.K.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Kleihues, P.; Ellison, D.W. The 2016 world health organization classification of tumors of the central nervous system: A summary. *Acta Neuropathol.* **2016**, *131*, 803–820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lapidot, T.; Sirard, C.; Vormoor, J.; Murdoch, B.; Hoang, T.; Caceres-Cortes, J.; Minden, M.; Paterson, B.; Caligiuri, M.A.; Dick, J.E. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **1994**, *367*, 645–648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bonnet, D.; Dick, J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* **1997**, *3*, 730–737. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Reya, T.; Morrison, S.J.; Clarke, M.F.; Weissman, I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **2001**, *414*, 105–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Singh, S.K.; Clarke, I.D.; Terasaki, M.; Bonn, V.E.; Hawkins, C.; Squire, J.; Dirks, P.B. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 5821–5828. [[PubMed](#)]
- Singh, S.K.; Hawkins, C.; Clarke, I.D.; Squire, J.A.; Bayani, J.; Hide, T.; Henkelman, R.M.; Cusimano, M.D.; Dirks, P.B. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **2004**, *432*, 396–401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bachoo, R.M.; Maher, E.A.; Ligon, K.L.; Sharpless, N.E.; Chan, S.S.; You, M.J.; Tang, Y.; DeFrances, J.; Stover, E.; Weissleder, R.; et al. Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: Convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. *Cancer Cell* **2002**, *1*, 269–277. [[CrossRef](#)]
- Friedmann-Morvinski, D.; Bushong, E.A.; Ke, E.; Soda, Y.; Marumoto, T.; Singer, O.; Ellisman, M.H.; Verma, I.M. Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. *Science* **2012**, *338*, 1080–1084. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Friedmann-Morvinski, D.; Verma, I.M. Dedifferentiation and reprogramming: Origins of cancer stem cells. *EMBO Rep.* **2014**, *15*, 244–253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Soda, Y.; Marumoto, T.; Friedmann-Morvinski, D.; Soda, M.; Liu, F.; Michiue, H.; Pastorino, S.; Yang, M.; Hoffman, R.M.; Kesari, S.; et al. Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 4274–4280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cho, R.W.; Clarke, M.F. Recent advances in cancer stem cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2008**, *18*, 48–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



12. Lobo, N.A.; Shimono, Y.; Qian, D.; Clarke, M.F. The biology of cancer stem cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2007**, *23*, 675–699. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Dontu, G.; Al-Hajj, M.; Abdallah, W.M.; Clarke, M.F.; Wicha, M.S. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif.* **2003**, *36* (Suppl. S1), 59–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Schwartz, P.H.; Bryant, P.J.; Fuja, T.J.; Su, H.; O'Dowd, D.K.; Klassen, H. Isolation and characterization of neural progenitor cells from post-mortem human cortex. *J. Neurosci. Res.* **2003**, *74*, 838–851. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Brescia, P.; Richichi, C.; Pelicci, G. Current strategies for identification of glioma stem cells: Adequate or unsatisfactory? *J. Oncol.* **2012**, *2012*, 376894. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Miraglia, S.; Godfrey, W.; Yin, A.H.; Atkins, K.; Warnke, R.; Holden, J.T.; Bray, R.A.; Waller, E.K.; Buck, D.W. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: Isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* **1997**, *90*, 5013–5021. [[PubMed](#)]
17. Uchida, N.; Buck, D.W.; He, D.; Reitsma, M.J.; Masek, M.; Phan, T.V.; Tsukamoto, A.S.; Gage, F.H.; Weissman, I.L. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 14720–14725. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Tamaki, S.; Eckert, K.; He, D.; Sutton, R.; Doshe, M.; Jain, G.; Tushinski, R.; Reitsma, M.; Harris, B.; Tsukamoto, A.; et al. Engraftment of sorted/expanded human central nervous system stem cells from fetal brain. *J. Neurosci. Res.* **2002**, *69*, 976–986. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Galli, R.; Binda, E.; Orfanelli, U.; Cipelletti, B.; Gritti, A.; De Vitis, S.; Fiocco, R.; Foroni, C.; Dimeco, F.; Vescovi, A. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 7011–7021. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Hemmati, H.D.; Nakano, I.; Lazareff, J.A.; Masterman-Smith, M.; Geschwind, D.H.; Bronner-Fraser, M.; Kornblum, H.I. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 15178–15183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Clarke, M.F.; Dick, J.E.; Dirks, P.B.; Eaves, C.J.; Jamieson, C.H.; Jones, D.L.; Visvader, J.; Weissman, I.L.; Wahl, G.M. Cancer stem cells—Perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 9339–9344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Beier, D.; Hau, P.; Proescholdt, M.; Lohmeier, A.; Wischhusen, J.; Oefner, P.J.; Aigner, L.; Brawanski, A.; Bogdahn, U.; Beier, C.P. CD133(+) and CD133(−) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 4010–4015. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Joo, K.M.; Kim, S.Y.; Jin, X.; Song, S.Y.; Kong, D.S.; Lee, J.I.; Jeon, J.W.; Kim, M.H.; Kang, B.G.; Jung, Y.; et al. Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastomas. *Lab. Invest.* **2008**, *88*, 808–815. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Wei, Y.; Jiang, Y.; Zou, F.; Liu, Y.; Wang, S.; Xu, N.; Xu, W.; Cui, C.; Xing, Y.; Liu, Y.; et al. Activation of PI3K/Akt pathway by CD133-p85 interaction promotes tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 6829–6834. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Singh, A.; Settleman, J. Emt, cancer stem cells and drug resistance: An emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* **2010**, *29*, 4741–4751. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Mani, S.A.; Guo, W.; Liao, M.J.; Eaton, E.N.; Ayyanan, A.; Zhou, A.Y.; Brooks, M.; Reinhard, F.; Zhang, C.C.; Shipitsin, M.; et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **2008**, *133*, 704–715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Morel, A.P.; Lievre, M.; Thomas, C.; Hinkal, G.; Ansieau, S.; Puisieux, A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e2888. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Brabletz, T.; Hlubek, F.; Spaderna, S.; Schmalhofer, O.; Hiendlmeyer, E.; Jung, A.; Kirchner, T. Invasion and metastasis in colorectal cancer: Epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and  $\beta$ -catenin. *Cells Tissues Organs* **2005**, *179*, 56–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Thiery, J.P.; Sleeman, J.P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 131–142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Borriello, L.; Nakata, R.; Sheard, M.A.; Fernandez, G.E.; Sposto, R.; Malvar, J.; Blavier, L.; Shimada, H.; Asgharzadeh, S.; Seeger, R.C.; et al. Cancer-associated fibroblasts share characteristics and protumorigenic activity with mesenchymal stromal cells. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 5142–5157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

31. Valenti, G.; Quinn, H.M.; Heynen, G.; Lan, L.; Holland, J.D.; Vogel, R.; Wulf-Goldenberg, A.; Birchmeier, W. Cancer stem cells regulate cancer-associated fibroblasts via activation of hedgehog signaling in mammary gland tumors. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 2134–2147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Ricci-Vitiani, L.; Pallini, R.; Biffoni, M.; Todaro, M.; IVERNICI, G.; Cenci, T.; Maira, G.; Parati, E.A.; Stassi, G.; Larocca, L.M.; et al. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* **2010**, *468*, 824–828. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Creighton, C.J.; Li, X.; Landis, M.; Dixon, J.M.; Neumeister, V.M.; Sjolund, A.; Rimm, D.L.; Wong, H.; Rodriguez, A.; Herschkowitz, J.I.; et al. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 13820–13825. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Chen, Y.L.; Wang, S.Y.; Liu, R.S.; Wang, H.E.; Chen, J.C.; Chiou, S.H.; Chang, C.A.; Lin, L.T.; Tan, D.T.; Lee, Y.J. Remnant living cells that escape cell loss in late-stage tumors exhibit cancer stem cell-like characteristics. *Cell Death Dis.* **2012**, *3*, e399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Malumbres, M.; Barbacid, M. RAS oncogenes: The first 30 years. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 459–465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Davies, M.A.; Samuels, Y. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene* **2010**, *29*, 5545–5555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Jiang, B.H.; Liu, L.Z. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv. Cancer Res.* **2009**, *102*, 19–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Yuan, T.L.; Cantley, L.C. PI3K pathway alterations in cancer: Variations on a theme. *Oncogene* **2008**, *27*, 5497–5510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Manning, B.D.; Cantley, L.C. Akt/PKB signaling: Navigating downstream. *Cell* **2007**, *129*, 1261–1274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Carpten, J.D.; Faber, A.L.; Horn, C.; Donoho, G.P.; Briggs, S.L.; Robbins, C.M.; Hostetter, G.; Boguslawski, S.; Moses, T.Y.; Savage, S.; et al. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of Akt1 in cancer. *Nature* **2007**, *448*, 439–444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Korkaya, H.; Paulson, A.; Charafe-Jauffret, E.; Ginestier, C.; Brown, M.; Dutcher, J.; Clouthier, S.G.; Wicha, M.S. Regulation of mammary stem/progenitor cells by PTEN/Akt/ $\beta$ -catenin signaling. *PLoS Biol.* **2009**, *7*, e1000121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Skeen, J.E.; Bhaskar, P.T.; Chen, C.C.; Chen, W.S.; Peng, X.D.; Nogueira, V.; Hahn-Windgassen, A.; Kiyokawa, H.; Hay, N. Akt deficiency impairs normal cell proliferation and suppresses oncogenesis in a p53-independent and mTORC1-dependent manner. *Cancer Cell* **2006**, *10*, 269–280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Nogueira, V.; Park, Y.; Chen, C.C.; Xu, P.Z.; Chen, M.L.; Tonic, I.; Unterman, T.; Hay, N. Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis. *Cancer Cell* **2008**, *14*, 458–470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Bhaskar, P.T.; Hay, N. The two TORCs and Akt. *Dev. Cell* **2007**, *12*, 487–502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Kandel, E.S.; Skeen, J.; Majewski, N.; Di Cristofano, A.; Pandolfi, P.P.; Feliciano, C.S.; Gartel, A.; Hay, N. Activation of Akt/protein kinase B overcomes a G(2)/m cell cycle checkpoint induced by DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 7831–7841. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Hambardzumyan, D.; Becher, O.J.; Rosenblum, M.K.; Pandolfi, P.P.; Manova-Todorova, K.; Holland, E.C. PI3K pathway regulates survival of cancer stem cells residing in the perivascular niche following radiation in medulloblastoma in vivo. *Genes Dev.* **2008**, *22*, 436–448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Staal, S.P. Molecular cloning of the Akt oncogene and its human homologues Akt1 and Akt2: Amplification of Akt1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 5034–5037. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Pearce, L.R.; Komander, D.; Alessi, D.R. The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 9–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Dummler, B.; Hemmings, B.A. Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease. *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35*, 231–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Vanhaesebroeck, B.; Stephens, L.; Hawkins, P. PI3K signalling: The path to discovery and understanding. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 195–203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

52. Diez, H.; Garrido, J.J.; Wandosell, F. Specific roles of Akt iso forms in apoptosis and axon growth regulation in neurons. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e32715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Yang, Z.Z.; Tschopp, O.; Baudry, A.; Dummler, B.; Hynx, D.; Hemmings, B.A. Physiological functions of protein kinase B/Akt. *Biochem. Soc. Trans.* **2004**, *32*, 350–354. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Persad, S.; Dedhar, S. The role of integrin-linked kinase (ILK) in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* **2003**, *22*, 375–384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Cho, H.; Thorvaldsen, J.L.; Chu, Q.; Feng, F.; Birnbaum, M.J. Akt1/PKB $\alpha$  is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 38349–38352. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Yang, L.; Dan, H.C.; Sun, M.; Liu, Q.; Sun, X.M.; Feldman, R.I.; Hamilton, A.D.; Polokoff, M.; Nicosia, S.V.; Herlyn, M.; et al. Akt/protein kinase b signaling inhibitor-2, a selective small molecule inhibitor of Akt signaling with antitumor activity in cancer cells overexpressing Akt. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 4394–4399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Garofalo, R.S.; Orena, S.J.; Rafidi, K.; Torchia, A.J.; Stock, J.L.; Hildebrandt, A.L.; Coskran, T.; Black, S.C.; Brees, D.J.; Wicks, J.R.; et al. Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB $\beta$ . *J. Clin. Investig.* **2003**, *112*, 197–208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Easton, R.M.; Cho, H.; Roovers, K.; Shineman, D.W.; Mizrahi, M.; Forman, M.S.; Lee, V.M.; Szabolcs, M.; de Jong, R.; Oltersdorf, T.; et al. Role for Akt3/protein kinase B $\gamma$  in attainment of normal brain size. *Mol. Cell. Biol.* **2005**, *25*, 1869–1878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Tschopp, O.; Yang, Z.Z.; Brodbeck, D.; Dummler, B.A.; Hemmings-Mieszczak, M.; Watanabe, T.; Michaelis, T.; Frahm, J.; Hemmings, B.A. Essential role of protein kinase B $\gamma$  (PKB $\gamma$ /Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* **2005**, *132*, 2943–2954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Liu, P.; Cheng, H.; Roberts, T.M.; Zhao, J.J. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 627–644. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Baselga, J. Targeting the phosphoinositide-3 (PI3) kinase pathway in breast cancer. *Oncologist* **2011**, *16* (Suppl. S1), 12–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Gonzalez, E.; McGraw, T.E. The Akt kinases: Isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle* **2009**, *8*, 2502–2508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Maroulakou, I.G.; Oemler, W.; Naber, S.P.; Tschlis, P.N. Akt1 ablation inhibits, whereas Akt2 ablation accelerates, the development of mammary adenocarcinomas in mouse mammary tumor virus (mmtv)-*erbB2/neu* and mmtv-polyoma middle t transgenic mice. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 167–177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Ju, X.; Katiyar, S.; Wang, C.; Liu, M.; Jiao, X.; Li, S.; Zhou, J.; Turner, J.; Lisanti, M.P.; Russell, R.G.; et al. Akt1 governs breast cancer progression in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 7438–7443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Chen, J.; Tang, H.; Hay, N.; Xu, J.; Ye, R.D. Akt isoforms differentially regulate neutrophil functions. *Blood* **2010**, *115*, 4237–4246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Chen, C.C.; Jeon, S.M.; Bhaskar, P.T.; Nogueira, V.; Sundararajan, D.; Tonic, I.; Park, Y.; Hay, N. FoxOs inhibit mTORC1 and activate Akt by inducing the expression of Sestrin3 and Rictor. *Dev. Cell* **2010**, *18*, 592–604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Maroulakou, I.G.; Oemler, W.; Naber, S.P.; Klebba, I.; Kuperwasser, C.; Tschlis, P.N. Distinct roles of the three Akt isoforms in lactogenic differentiation and involution. *J. Cell. Physiol.* **2008**, *217*, 468–477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Dillon, R.L.; Muller, W.J. Distinct biological roles for the Akt family in mammary tumor progression. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 4260–4264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Chen, J.; Li, Y.; Yu, T.S.; McKay, R.M.; Burns, D.K.; Kernie, S.G.; Parada, L.F. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature* **2012**, *488*, 522–526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Gargini, R.; Cerliani, J.P.; Escoll, M.; Anton, I.M.; Wandosell, F. Cancer stem cell-like phenotype and survival are coordinately regulated by Akt/FoxO/Bim pathway. *Stem Cells* **2015**, *33*, 646–660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Gargini, R.; Escoll, M.; Garcia, E.; Garcia-Escudero, R.; Wandosell, F.; Anton, I.M. WIP drives tumor progression through YAP/TAZ-dependent autonomous cell growth. *Cell Rep.* **2016**, *17*, 1962–1977. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

72. Irie, H.Y.; Pearline, R.V.; Grueneberg, D.; Hsia, M.; Ravichandran, P.; Kothari, N.; Natesan, S.; Brugge, J.S. Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Biol.* **2005**, *171*, 1023–1034. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Dillon, R.L.; Marcotte, R.; Hennessy, B.T.; Woodgett, J.R.; Mills, G.B.; Muller, W.J. Akt1 and Akt2 play distinct roles in the initiation and metastatic phases of mammary tumor progression. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 5057–5064. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Chin, Y.R.; Yoshida, T.; Marusyk, A.; Beck, A.H.; Polyak, K.; Toker, A. Targeting Akt3 signaling in triple-negative breast cancer. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 964–973. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Mure, H.; Matsuzaki, K.; Kitazato, K.T.; Mizobuchi, Y.; Kuwayama, K.; Kageji, T.; Nagahiro, S. Akt2 and Akt3 play a pivotal role in malignant gliomas. *Neuro Oncol.* **2010**, *12*, 221–232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Joy, A.; Kapoor, M.; Georges, J.; Butler, L.; Chang, Y.; Li, C.; Crouch, A.; Smirnov, I.; Nakada, M.; Hepler, J.; et al. The role of Akt isoforms in glioblastoma: Akt3 delays tumor progression. *J. Neurooncol.* **2016**, *130*, 43–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Cordenonsi, M.; Zanconato, F.; Azzolin, L.; Forcato, M.; Rosato, A.; Frasson, C.; Inui, M.; Montagner, M.; Parenti, A.R.; Poletti, A.; et al. The hippo transducer taz confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell* **2011**, *147*, 759–772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Escoll, M.; Gargini, R.; Cuadrado, A.; Anton, I.M.; Wandosell, F. Mutant p53 oncogenic functions in cancer stem cells are regulated by WIP through YAP/TAZ. *Oncogene* **2017**, *36*, 3515–3527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Schmelzle, T.; Maillieux, A.A.; Overholtzer, M.; Carroll, J.S.; Solimini, N.L.; Lightcap, E.S.; Veiby, O.P.; Brugge, J.S. Functional role and oncogene-regulated expression of the BH3-only factor Bmf in mammary epithelial anoikis and morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 3787–3792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Maillieux, A.A.; Overholtzer, M.; Schmelzle, T.; Bouillet, P.; Strasser, A.; Brugge, J.S. BIM regulates apoptosis during mammary ductal morphogenesis, and its absence reveals alternative cell death mechanisms. *Dev. Cell* **2007**, *12*, 221–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Corbo, C.; Orru, S.; Gemei, M.; Noto, R.D.; Mirabelli, P.; Imperlini, E.; Ruoppolo, M.; Vecchio, L.D.; Salvatore, F. Protein cross-talk in CD133+ colon cancer cells indicates activation of the Wnt pathway and upregulation of SRp20 that is potentially involved in tumorigenicity. *Proteomics* **2012**, *12*, 2045–2059. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Mak, A.B.; Nixon, A.M.; Kittanakom, S.; Stewart, J.M.; Chen, G.I.; Curak, J.; Gingras, A.C.; Mazitschek, R.; Neel, B.G.; Stagljar, I.; et al. Regulation of cd133 by hdac6 promotes  $\beta$ -catenin signaling to suppress cancer cell differentiation. *Cell Rep.* **2012**, *2*, 951–963. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Azzolin, L.; Panciera, T.; Soligo, S.; Enzo, E.; Bicciato, S.; Dupont, S.; Bresolin, S.; Frasson, C.; Basso, G.; Guzzardo, V.; et al. YAP/TAZ incorporation in the  $\beta$ -catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell* **2014**, *158*, 157–170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Liu, H.; Fergusson, M.M.; Wu, J.J.; Rovira, I.I.; Liu, J.; Gavrilova, O.; Lu, T.; Bao, J.; Han, D.; Sack, M.N.; et al. Wnt signaling regulates hepatic metabolism. *Sci. Signal.* **2011**, *4*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).





Commentary

## WIP-YAP/TAZ as A New Pro-Oncogenic Pathway in Glioma

Sergio Rivas <sup>1,2,3,4</sup> , Inés M. Antón <sup>1,2,4,\*</sup> and Francisco Wandosell <sup>3,4,\*</sup>

<sup>1</sup> Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), Darwin 3, 28049 Madrid, Spain; srivas@cnb.csic.es

<sup>2</sup> Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), 28031 Madrid, Spain

<sup>3</sup> Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Nicolás Cabrera 1, 28049 Madrid, Spain

<sup>4</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Valderrebollo 5, 28031 Madrid, Spain

\* Correspondence: ianton@cnb.csic.es (I.M.A.); fwandosell@cbm.csic.es (F.W.)

Received: 24 April 2018; Accepted: 7 June 2018; Published: 9 June 2018



**Abstract:** Wild-type p53 (wtp53) is described as a tumour suppressor gene, and mutations in p53 occur in many human cancers. Indeed, in high-grade malignant glioma, numerous molecular genetics studies have established central roles of RTK-PI3K-PTEN and ARF-MDM2-p53 INK4a-RB pathways in promoting oncogenic capacity. Deregulation of these signalling pathways, among others, drives changes in the glial/stem cell state and environment that permit autonomous growth. The initially transformed cell may undergo subsequent modifications, acquiring a more complete tumour-initiating phenotype responsible for disease advancement to stages that are more aggressive. We recently established that the oncogenic activity of mutant p53 (mtp53) is driven by the actin cytoskeleton-associated protein WIP (WASP-interacting protein), correlated with tumour growth, and more importantly that both proteins are responsible for the tumour-initiating cell phenotype. We reported that WIP knockdown in mtp53-expressing glioblastoma greatly reduced proliferation and growth capacity of cancer stem cell (CSC)-like cells and decreased CSC-like markers, such as hyaluronic acid receptor (CD44), prominin-1 (CD133), yes-associated protein (YAP) and transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ). We thus propose a new CSC signalling pathway downstream of mtp53 in which Akt regulates WIP and controls YAP/TAZ stability. WIP drives a mechanism that stimulates growth signals, promoting YAP/TAZ and  $\beta$ -catenin stability in a Hippo-independent fashion, which allows cells to coordinate processes such as proliferation, stemness and invasiveness, which are key factors in cancer progression. Based on this multistep tumourigenic model, it is tantalizing to propose that WIP inhibitors may be applied as an effective anti-cancer therapy.

**Keywords:** signalling in cancer; glioma; CSCs; TICs; proliferation; survival; YAP/TAZ; Akt; WIP

### 1. Role of Actin in Cell Migration and Proliferation

Tumour transformation involves not only genetic reprogramming but also a change in cell morphology associated with epithelial–mesenchymal transition (EMT). It is clear that the actin cytoskeleton contributes to several cellular properties that are altered in tumour cells, where the oncogenic programme boosts proliferation, migration and/or differential adhesion. Thus, the increase in migratory capacity, or possible lack of substrate adhesion (anchorage independence) and the capacity to colonize other tissues depend largely on the actin cytoskeleton [1,2]. Cellular migration and invasion require integration of several processes that include local modulation of the cytoskeleton, contractile forces, recycling of substrate-adhesion structures and, finally, generation of specialized domains that mediate focal degradation of the extracellular matrix (ECM). At a cytoskeletal level, actin filaments

(known as F-actin or microfilaments), composed of actin and a plethora of actin-regulating proteins, play an essential role in physiological and pathological migration.

“Podosomes” and “invadopodia” are actin-rich protrusions that drive invasion in normal and cancer cells [3–5]. They are associated with secretion and/or activation of matrix metalloproteases (MMP) and the subsequent degradation of the ECM, allowing cell invasion which is key to many oncogenic transformation; for review see [6].

## 2. WIP Structure and Function

The proteins that make up podosomes and invadopodia include actin, the actin-related protein (Arp)2/3 complex, (neural)-Wiskott–Aldrich Syndrome protein (N-WASP) [7,8], and WASP-interacting protein (WIP), among others [6,9]. The central core of actin polymerization is the nucleating Arp2/3 complex and a group of proteins that regulates the polymerization. Indeed, WASP was identified as a member of a family of proteins involved in microfilament organization which includes N-WASP and Wiskott–Aldrich syndrome protein family member 1 (WAVE1/Scar) [7,10–13]. WASP homologues have been identified in many eukaryotes from yeast to mammals, playing a critical role in the linkage of Cdc42-activation signals to actin microfilaments. Almost all members of Rho family of GTPases, belonging to the Ras superfamily, have been shown to regulate intracellular actin dynamics, but only two elements have been associated with (N-)WASP. Indeed, several data indicated that Cdc42 and Rac, bind directly to a protein implicated in the immunodeficiency disorder Wiskott–Aldrich syndrome [14,15]. Though structurally and functionally very similar, WASP is expressed only in hematopoietic cells [1,16] whereas N-WASP is ubiquitously expressed [13]. Both can form complexes with proteins that interact with actin, and with other proteins that participate in the formation of podosomes or invadopodia such as cortactin, myosin II, Nck, and Tks5/FISH [17,18].

The human WIP protein (503 aa in length) is proline rich, showing high sequence similarity to the yeast protein verprolin [17–19], and 95% identity with murine WIP. Two additional members of the protein family have been described: corticosteroid responsive (CR16) and WIP-related/WIP CR16 homologous (WIRE/WICH) [20,21]. WIP is ubiquitously expressed, but at higher levels in lymphoid cells [17]. Many reports have indicated that WIP is a multifunctional protein [19]; however, details of many of its biological functions are far from being understood.

Different structural and functional motifs have been described in WIP [22,23]. WIP binds WASP via its C-terminus (aa 461–485), and could bind actin via a KLKK motif within its WH2 domain [22,24,25]. WIP also has three ABM2 (actin-based mobility 2) profilin-binding motifs, in addition binding the adapter proteins Nck [26] and Crk L [27].

The interaction of (N-)WASP and WIP is essential to many cellular functions; (N-)WASP functions are regulated by WIP, inhibiting actin nucleation in vitro by Arp2/3 mediated by the activation of (N-)WASP through the GTPase Cdc42 [8]. In the absence of WASP, cells do not form podosomes and their chemotactic responses are deficient [28]. Similarly, in dendritic cells (DC) derived from WIP-deficient mice (WIP<sup>−/−</sup>) [18], the stability and localization of WASP was compromised, and therefore the formation of podosomes, migration and degradation of the ECM was reduced [9,29]. Indeed, we reported that WIP contributes to both amoeboid and mesenchymal migration [29,30]. Data from ours and other groups support the participation of WIP in prototypical cellular activities such as proliferation, migration, EMT transition and differentiation, as well as a role in the regulation of actin polymerization essential for formation/function of invadopodia [18,19,31,32].

More recently, we demonstrated that WIP is not only highly expressed in some tumour types, but is also essential for maintenance of tumour subpopulations denoted as “cancer stem cells” (CSCs) or “tumour-initiating cells” (TICs) [33], a phenotype frequently responsible for advancement to more aggressive stages of disease, at least in some tumour types [34].

### 3. Tumour Proliferation and CSCs: Glioma as a Tumour Model

The expression of stem-like markers, such as hyaluronic acid receptor (CD44), prominin-1 (CD133), nestin, or sex-determining region Y (SRY)-box 2 (Sox2) in several tumour types led to proposal of the CSC/TIC hypothesis some years ago. These tumour subpopulations, either designated as CSC or TIC depending on authors, were operationally defined not only by the presence of stem-like makers but for some functional characteristics [33,34]. For instance, these stem-like tumour populations possess the ability to self-renew and produce differentiating progeny, much like their normal counterpart. The origin of this tumoural subpopulation is still a matter of debate, perhaps not generated from “normal” stem cells or from a “unique” cell type. They are most likely generated by anomalous combinations of mutations (oncogenic and tumour-suppressor mutations) that cause the stem-like phenotype and subsequent accumulation of mutations that boost oncogenic progression, maintaining self-renewal capabilities and proliferation. An updated framework for understanding the significant diversity of neoplastic diseases, with ten hallmark capabilities acquired by normal cells evolving to a neoplastic state, was proposed by Hanahan and Weinberg [35,36]. Among them, sustained cell survival and proliferation in combination with evading apoptotic checkpoints are early capabilities enhanced in initially transformed cells to form a tumour [35]. In this proposal, CSC proliferation plays a key role in the generation and maintenance of this oncogenic progression enhancing proliferative signalling, improving migratory capabilities, and evading tumour suppressor genes bypassing cell death checkpoints.

Glioblastoma (GB) is the most common and aggressive subtype of the malignant gliomas, and is characterized by intense proliferation, invasion, and intratumoural heterogeneity. Although the CSC hypothesis was initially supported in human leukaemia [37,38], similar populations of cells with stem-like properties have been described in many solid tumours (for a review see: [39]). Indeed, a CD133+ cell subpopulation isolated from brain tumours exhibited CSC properties *in vitro* and *in vivo* [40–42]. Additionally, in high-grade malignant gliomas, several molecular genetic studies have established mutations in diverse pathways promoting oncogenic capacity, such as RTK-PI3K-PTEN and ARF-MDM2-p53 INK4a-RB [43]. The working hypothesis is that deregulation of these signalling pathways permits autonomous growth, and these initially transformed cells may acquire a tumour-initiating “stemness” phenotype responsible for advancement to more aggressive stages of disease (World Health Organization grade I to grade IV) [44]. In grade IV gliomas, mutations in the gene coding for phosphatase and tensin homolog (PTEN) and in the gene of tumour suppressor protein p53 (TP53) are the most common.

Indeed, in tumour cells obtained from human glioma explants, we demonstrated that the majority (3 of 5) had previously-described mutations in p53, and most had the capacity for anchor-independent growth and expressed stem markers such as CD133, as reported for similar CSCs [45]. Though also present in gliomas grown in serum-rich medium, the CD133+ subpopulation was significantly increased after growth in stem-like defined medium. We confirmed that the mutant versions of p53 were essential to maintain the oncogenic phenotype, while reduction of p53 expression by specific shRNA strongly reduced proliferation of the gliomas assayed, with a clear correlation to the reduction of CD133+ cells [45].

### 4. WIP Controls YAP/TAZ Stability in Mutant p53 Gliomas

The aim of our work was to identify new participating proteins within the mechanisms through which mtp53 generates and maintains the CSC phenotype in glioma. In addition, several studies have described that mtp53 may act through several tyrosine kinase receptors (RTK) and integrin signalling [46–49], linking the mutation with several pro-oncogenic hallmarks [35].

The first data we observed was a significant, direct correlation between the proliferation capacity of numerous mtp53 gliomas and the presence of high levels of WIP [33,45]. This correlation was initially described in human samples [33], with Yes-associated protein (YAP) and transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ) directly implicated in tumour development and CSCs [50].



Indeed, YAP and TAZ bind Axin, which allows the YAP/TAZ/ $\beta$ -catenin complex to interact with its ubiquitin ligase  $\beta$ TrCP, facilitating ubiquitination of the complex and its subsequent degradation [51,52]. This mechanism may coordinate the regulation of these co-transcription factors by degradation. Alternatively, the degradation complex with YAP/TAZ/ $\beta$ -catenin can be sequestered in multivesicular bodies (MVB) of the endosomal compartment, which blocks degradation at a key step in Wnt signalling induction [53].

As mentioned above, YAP/TAZ regulate several processes in development, tissue homeostasis and cancer [2,50,54]. In addition, some data indicated that YAP enhances the proliferative transcriptional activity of mutant p53 proteins [55]. It has also been reported that actin polymerization regulates this pathway, affecting YAP/TAZ-mediated transcription [56]. It is also known that WIP can promote nuclear transit of myocardin-related transcription factor-serum response factor (MRTF-SRF), which is regulated by actin polymerization [57]. As both transcription factors depend on actin polymerization to reach the nucleus, we considered the possibility that WIP regulates YAP/TAZ.

We showed that the reduction of YAP/TAZ mediated by WIP knockdown is not compensated by either Jasplakinolide (F-actin stabilizer) or by latrunculin A1 (F-actin-depolymerizing agent). This finding strongly supports that the WIP-mediated stability of YAP/TAZ is not dependent on actin polymerization [33].

The way actin controls YAP/TAZ distribution and whether the cellular effects of WIP expression are exclusively due to a consequent increase of YAP/TAZ remain open questions. The identification of nuclear N-WASP and WIP support the option of a secondary effect, possibly unrelated to actin.

#### 5. Akt Plays an Essential Role in the mtp53/WIP Pathway in Gliomas

As previously mentioned, one of the most commonly-modified pathways in gliomas is PI3K-PTEN-Akt, which is activated in normal and cancer cells [58] and controls tumour cell proliferation [59,60] and/or maintenance of the tumour phenotype [61]. Akt was initially described as the human homolog of a viral oncogene [62,63], and belongs to the AGC family of serine/threonine kinases [64]. Akt is involved in many biological processes and pathologies, such as metabolism regulation, cell growth, survival, proliferation, cancer, and neurodegenerative disorders [58,65]. Three Akt isoforms have been described in mammals, sharing high homology at the protein level, and they are encoded by three different closely-related genes (Akt1, Akt2 and Akt3) [58,66,67]. Many extracellular signals induce Akt activation through PI3K, which is based on phosphorylation of two residues, threonine 308 and serine 473, by phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) and mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2), respectively [68]. Additionally, integrin-linked kinase (ILK) has been described to activate Akt [69].

It is largely recognized that hyper-activation of Akt plays an important role in cancer [70–74]. Akt is frequently activated in human cancers (for a review see [58]), either directly by over-expression/mutation or indirectly through alterations to PTEN. This over-activation promotes protection against apoptosis and “proliferation enhancement”, among others, two major prerequisites for cancer progression [74,75]. However, the exact role of each Akt isoform in tumour development is not completely clear. For instance, Akt1 is essential for the propagation of breast cancer, whereas ablation of Akt2 inhibits apoptosis and delays tumour involution [76,77]. In contrast to Akt1, which accelerates the induction of mammary tumours in transgenic mice, Akt2 can promote metastasis of tumour cells without affecting the latency of tumour development in certain systems [78]. We recently analysed the role of Akt isoforms in survival and self-renewal of TICs, as well as the correlation between Akt activity and the CSC/EMT phenotype in breast cancer cells [33,79]. In different breast cancer models, Akt1 appears to play a fundamental role in the propagation of such tumours [70–74] by enhancing not only proliferation and survival, but also cell migration. An increase in mobility and loss of polarity is a general characteristic of many tumours, and it may determine their aggressiveness and metastatic potential [80,81]. Thus, hyper-activation of some elements downstream of Akt may aggravate the migratory/invasive capacity of tumour cells (for a review see [65]). In an attempt to identify the signalling downstream of mtp53 that may link

Akt-mediated survival and proliferation with WIP in glioma CSCs, we compared WIP levels with Akt activity. We found a good correlation between high WIP levels and the level of active Akt and Erks in human glioma samples. In addition, astrocytes transformed with mtp53 resulted in a remarkable activation of Akt and Erk [33,45]. In support of initial observations, anchor-independent growth was severely hampered after treating glioma CSCs with PI3K inhibitors, showing reduced WIP and nestin in clear correlation with low levels of Akt activity [33,45]. This prompted us to propose that Akt or other downstream elements are linked with the mtp53 oncogenic pathway.

## 6. Rac and PAK among Others Control the Pro-Oncogenic Signaling of WIP

To identify proteins that can modulate pro-oncogenic signalling of WIP, or may be just downstream elements, we used two complementary approaches, first using the WIP-tumoral capacity as a reporter and second, following the presence of nuclear YAP/TAZ.

Thus, we used specific shRNA or specific inhibitors to block tumour growth taking into account some of the data already published. For instance, signalling by Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac) and serine/threonine p21-activated kinase (PAK) is essential for ErbB2-mediated transformation of human breast epithelial cancer cells [82]. Besides PI3K, Rac and PAK were recently implicated in a newly-reported clathrin-independent system of endophilin-mediated endocytosis (FEME) of receptors [83]. Indeed, Akt may phosphorylate PAK at serine 21, modulating its interaction with Nck [84], a partner of the WIP-(N)-WASP complex. In our cellular model of YAP/TAZ stabilization mediated by WIP overexpression, we showed that either a Rac inhibitor (NSC23766), or an allosteric inhibitor of Pak1 (IPA-3), or formin inhibitor (SMIFH2), among others, reversed WIP's ability to stabilize YAP/TAZ. In conclusion the stability of YAP/TAZ WIP-mediated required the activity of RAC, or PAK or formin.

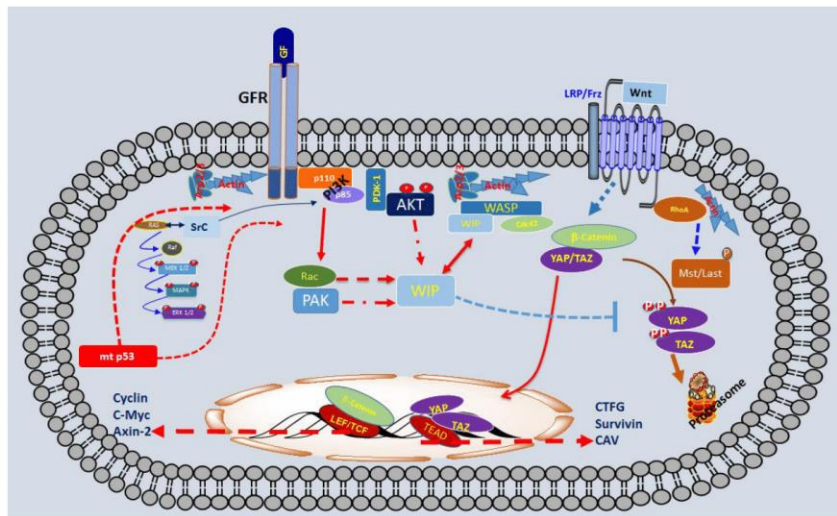
Thus, we reported that Rac, PAK, and formin are essential for WIP to boost cell proliferation and promote tumours. This was supported by the observation that overexpression of Rac-V12 or constitutively active PAK (CA-PAK) or Protein diaphanous homolog 2 (mDia2) rescues the phenotype caused by the lack of WIP [33]. All these data strongly support the hypothesis that WIP exerts powerful control on receptor/integrin signalling to regulate YAP/TAZ and  $\beta$ -catenin stability through MVB dynamics, which may allow efficient sequestration of the APC/Axin/GSK3 destruction complex and promote YAP/TAZ/ $\beta$ -catenin stability. In a second step, this increase of YAP/TAZ and/or  $\beta$ -catenin would preserve the phenotype and enhanced proliferation of CSC/TICs. To summarize our working hypothesis, we have described some of the components of this new oncogenic pathway (Scheme 1).

In conclusion, we have demonstrated that WIP drives a new mechanism that stimulates growth signals, promoting YAP/TAZ stability in a Hippo-independent fashion, which allows cells to coordinate key factors in cancer progression, such as proliferation, stemness and invasiveness.

The lack of WIP impedes proliferation in mp53 positive gliomas, whereas the over-expression increases proliferation and CSC markers in astrocytes. In both cases, the presence/expression of YAP/TAZ is essential to maintain proliferation and stemness. With all these data we propose that WIP-YAP/TAZ represent a new pathway that connects mtp53-growth factor receptor signals via Akt with oncogenesis. Based on this multistep tumorigenic model, at least in gliomas, it is tantalizing to propose that WIP inhibitors may be applied as an effective anti-cancer therapy.

The pathway regulated by WIP and Akt isoform may control cell viability and proliferation through the control of YAP/TAZ stability in gliomas. Oncogenic mutations in p53 enhances the proliferation and survival signalling throughout, among others, growth factor receptor with tyrosine kinase activity (GFRs), increasing the activity of several pathways such as PI3K-Akt and Ras/Raf/Erk.

TICs derived from gliomas with mutations in p53 correlated with high levels of WIP protein and YAP/TAZ. In these TICs, the presence of high levels of WIP was essential to the proliferation and CSC phenotype via mtp53 and Akt2, maintaining high levels of YAP/TAZ by preventing its degradation in the proteasome.



**Scheme 1.** Schematic representation of some elements that play a key role in the Tumour-initiating cells (TICs) derived from gliomas.

**Funding:** This work was supported in part by grants from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO/FEDER SAF2015-70368-R), CIBERNED (an initiative of ISCIII) and the Fundación Ramón Areces to IMA and FW. In addition, Institutional grants from the Fundación Ramón Areces and Banco de Santander to the CBMSO are also acknowledged from FW (CBMSO).

**Acknowledgments:** We are grateful to all members of Lab 16 at the Centro Nacional de Biotecnología and of Lab 206 at the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO) for thoughtful discussions during the preparation of this review.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Li, A.; Dawson, J.C.; Forero-Vargas, M.; Spence, H.J.; Yu, X.; Konig, I.; Anderson, K.; Machesky, L.M. The actin-bundling protein fascin stabilizes actin in invadopodia and potentiates protrusive invasion. *Curr. Biol.* **2010**, *20*, 339–345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Piccolo, S.; Cordenonsi, M.; Dupont, S. Molecular pathways: YAP and TAZ take center stage in organ growth and tumorigenesis. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 4925–4930. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gimona, M.; Buccione, R.; Courtneidge, S.A.; Linder, S. Assembly and biological role of podosomes and invadopodia. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2008**, *20*, 235–241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Linder, S. The matrix corroded: Podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends Cell Biol.* **2007**, *17*, 107–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Eddy, R.J.; Weidmann, M.D.; Sharma, V.P.; Condeelis, J.S. Tumor cell invadopodia: Invasive protrusions that orchestrate metastasis. *Trends Cell Biol.* **2017**, *27*, 595–607. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- García, E.; Jones, G.E.; Machesky, L.M.; Anton, I.M. WIP: WASP-interacting proteins at invadopodia and podosomes. *Eur. J. Cell Biol.* **2012**, *91*, 869–877. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Derry, J.M.; Ochs, H.D.; Francke, U. Isolation of a novel gene mutated in wiskott-aldrich syndrome. *Cell* **1994**, *78*, 635–644. [[CrossRef](#)]
- Miki, H.; Suetsugu, S.; Takenawa, T. Wave, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO J.* **1998**, *17*, 6932–6941. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

9. Chou, H.C.; Anton, I.M.; Holt, M.R.; Curcio, C.; Lanzardo, S.; Worth, A.; Burns, S.; Thrasher, A.J.; Jones, G.E.; Calle, Y. WIP regulates the stability and localization of WASP to podosomes in migrating dendritic cells. *Curr. Biol.* **2006**, *16*, 2337–2344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Machesky, L.M.; Insall, R.H. Scar1 and the related wiskott-aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the arp2/3 complex. *Curr. Biol.* **1998**, *8*, 1347–1356. [[CrossRef](#)]
11. Bear, J.E.; Rawls, J.F.; Saxe, C.L., 3rd. Scar, a WASP-related protein, isolated as a suppressor of receptor defects in late dictyostelium development. *J. Cell Biol.* **1998**, *142*, 1325–1335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Ma, L.; Rohatgi, R.; Kirschner, M.W. The arp2/3 complex mediates actin polymerization induced by the small gtp-binding protein cdc42. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 15362–15367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Miki, H.; Miura, K.; Takenawa, T. N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a pip2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *EMBO J.* **1996**, *15*, 5326–5335. [[PubMed](#)]
14. Aspenstrom, P.; Lindberg, U.; Hall, A. Two GTPases, Cdc42 and Rac, bind directly to a protein implicated in the immunodeficiency disorder Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr. Biol.* **1996**, *6*, 70–75. [[CrossRef](#)]
15. Symons, M.; Derry, J.M.; Karlak, B.; Jiang, S.; Lemahieu, V.; McCormick, F.; Francke, U.; Abo, A. Wiskott-aldrich syndrome protein, a novel effector for the gtpase Cdc42hs, is implicated in actin polymerization. *Cell* **1996**, *84*, 723–734. [[CrossRef](#)]
16. Derry, J.M.; Kerns, J.A.; Weinberg, K.L.; Ochs, H.D.; Volpini, V.; Estivill, X.; Walker, A.P.; Francke, U. WASP gene mutations in wiskott-aldrich syndrome and x-linked thrombocytopenia. *Hum. Mol. Genet.* **1995**, *4*, 1127–1135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Ramesh, N.; Anton, I.M.; Hartwig, J.H.; Geha, R.S. WIP, a protein associated with Wiskott-Aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 14671–14676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Anton, I.M.; de la Fuente, M.A.; Sims, T.N.; Freeman, S.; Ramesh, N.; Hartwig, J.H.; Dustin, M.L.; Geha, R.S. WIP deficiency reveals a differential role for WIP and the actin cytoskeleton in t and b cell activation. *Immunity* **2002**, *16*, 193–204. [[CrossRef](#)]
19. Anton, I.M.; Jones, G.E.; Wandosell, F.; Geha, R.; Ramesh, N. WASP-interacting protein (WIP): Working in polymerisation and much more. *Trends Cell Biol.* **2007**, *17*, 555–562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Aspenstrom, P. The mammalian verprolin homologue wire participates in receptor-mediated endocytosis and regulation of the actin filament system by distinct mechanisms. *Exp. Cell Res.* **2004**, *298*, 485–498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Aspenstrom, P. The verprolin family of proteins: Regulators of cell morphogenesis and endocytosis. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 5253–5259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Vaduva, G.; Martinez-Quiles, N.; Anton, I.M.; Martin, N.C.; Geha, R.S.; Hopper, A.K.; Ramesh, N. The human WASP-interacting protein, WIP, activates the cell polarity pathway in yeast. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 17103–17108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Ramesh, N.; Geha, R. Recent advances in the biology of WASP and WIP. *Immunol. Res.* **2009**, *44*, 99–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Peterson, F.C.; Deng, Q.; Zettl, M.; Prehoda, K.E.; Lim, W.A.; Way, M.; Volkman, B.F. Multiple WASP-interacting protein recognition motifs are required for a functional interaction with N-WASP. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 8446–8453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Volkman, B.F.; Prehoda, K.E.; Scott, J.A.; Peterson, F.C.; Lim, W.A. Structure of the n-WASP evh1 domain-WIP complex: Insight into the molecular basis of Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* **2002**, *111*, 565–576. [[CrossRef](#)]
26. Anton, I.M.; Lu, W.; Mayer, B.J.; Ramesh, N.; Geha, R.S. The Wiskott-Aldrich syndrome protein-interacting protein (WIP) binds to the adaptor protein nck. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 20992–20995. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Sasahara, Y.; Rachid, R.; Byrne, M.J.; de la Fuente, M.A.; Abraham, R.T.; Ramesh, N.; Geha, R.S. Mechanism of recruitment of WASP to the immunological synapse and of its activation following TCR ligation. *Mol. Cell* **2002**, *10*, 1269–1281. [[CrossRef](#)]
28. Burns, S.; Cory, G.O.; Vainchenker, W.; Thrasher, A.J. Mechanisms of WASEP-mediated hematologic and immunologic disease. *Blood* **2004**, *104*, 3454–3462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Banon-Rodriguez, I.; Saez de Guinoa, J.; Bernardini, A.; Ragazzini, C.; Fernandez, E.; Carrasco, Y.R.; Jones, G.E.; Wandosell, F.; Anton, I.M. WIP regulates persistence of cell migration and ruffle formation in both mesenchymal and amoeboid modes of motility. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e70364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

30. Banon-Rodriguez, I.; Monypenny, J.; Ragazzini, C.; Franco, A.; Calle, Y.; Jones, G.E.; Anton, I.M. The cortactin-binding domain of WIP is essential for podosome formation and extracellular matrix degradation by murine dendritic cells. *Eur. J. Cell Biol.* **2011**, *90*, 213–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Yu, X.; Zech, T.; McDonald, L.; Gonzalez, E.G.; Li, A.; Macpherson, I.; Schwarz, J.P.; Spence, H.; Futo, K.; Timpson, P.; et al. N-WASP coordinates the delivery and F-actin-mediated capture of MT1-MMP at invasive pseudopods. *J. Cell Biol.* **2012**, *199*, 527–544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Franco, A.; Knafo, S.; Banon-Rodriguez, I.; Merino-Serrais, P.; Feraud-Espinosa, I.; Nieto, M.; Garrido, J.J.; Esteban, J.A.; Wandosell, F.; Anton, I.M. WIP is a negative regulator of neuronal maturation and synaptic activity. *Cereb. Cortex* **2012**, *22*, 1191–1202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Gargini, R.; Escoll, M.; Garcia, E.; Garcia-Escudero, R.; Wandosell, F.; Anton, I.M. WIP drives tumor progression through YAP/TAZ-dependent autonomous cell growth. *Cell Rep.* **2016**, *17*, 1962–1977. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Clevers, H. The cancer stem cell: Premises, promises and challenges. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 313–319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57–70. [[CrossRef](#)]
37. Bonnet, D.; Dick, J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* **1997**, *3*, 730–737. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Lapidot, T.; Sirard, C.; Vormoor, J.; Murdoch, B.; Hoang, T.; Caceres-Cortes, J.; Minden, M.; Paterson, B.; Caligiuri, M.A.; Dick, J.E. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into scid mice. *Nature* **1994**, *367*, 645–648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Visvader, J.E.; Lindeman, G.J. Cancer stem cells in solid tumours: Accumulating evidence and unresolved questions. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 755–768. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Reya, T.; Morrison, S.J.; Clarke, M.F.; Weissman, I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **2001**, *414*, 105–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Singh, S.K.; Clarke, I.D.; Terasaki, M.; Bonn, V.E.; Hawkins, C.; Squire, J.; Dirks, P.B. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 5821–5828. [[PubMed](#)]
42. Singh, S.K.; Hawkins, C.; Clarke, I.D.; Squire, J.A.; Bayani, J.; Hide, T.; Henkelman, R.M.; Cusimano, M.D.; Dirks, P.B. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **2004**, *432*, 396–401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Zheng, H.; Ying, H.; Yan, H.; Kimmelman, A.C.; Hiller, D.J.; Chen, A.J.; Perry, S.R.; Tonon, G.; Chu, G.C.; Ding, Z.; et al. P53 and pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation. *Nature* **2008**, *455*, 1129–1133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Louis, D.N.; Perry, A.; Reifenberger, G.; von Deimling, A.; Figarella-Branger, D.; Cavenee, W.K.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Kleihues, P.; Ellison, D.W. The 2016 world health organization classification of tumors of the central nervous system: A summary. *Acta Neuropathol.* **2016**, *131*, 803–820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Escoll, M.; Gargini, R.; Cuadrado, A.; Anton, I.M.; Wandosell, F. Mutant p53 oncogenic functions in cancer stem cells are regulated by WIP through YAP/TAZ. *Oncogene* **2017**, *36*, 3515–3527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Adorno, M.; Cordenonsi, M.; Montagner, M.; Dupont, S.; Wong, C.; Hann, B.; Solari, A.; Bobisse, S.; Rondina, M.B.; Guzzardo, V.; et al. A Mutant-p53/Smad complex opposes p63 to empower TGFbeta-induced metastasis. *Cell* **2009**, *137*, 87–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Muller, P.A.; Caswell, P.T.; Doyle, B.; Iwanicki, M.P.; Tan, E.H.; Karim, S.; Lukashchuk, N.; Gillespie, D.A.; Ludwig, R.L.; Gosselin, P.; et al. Mutant p53 drives invasion by promoting integrin recycling. *Cell* **2009**, *139*, 1327–1341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Sauer, L.; Gitenay, D.; Vo, C.; Baron, V.T. Mutant p53 initiates a feedback loop that involves EGR-1/EGF receptor/ERK in prostate cancer cells. *Oncogene* **2010**, *29*, 2628–2637. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Wang, L.; Shi, S.; Guo, Z.; Zhang, X.; Han, S.; Yang, A.; Wen, W.; Zhu, Q. Overexpression of YAP and TAZ is an independent predictor of prognosis in colorectal cancer and related to the proliferation and metastasis of colon cancer cells. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e65539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Cordenonsi, M.; Zanconato, F.; Azzolin, L.; Forcato, M.; Rosato, A.; Frasson, C.; Inui, M.; Montagner, M.; Parenti, A.R.; Poletti, A.; et al. The hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell* **2011**, *147*, 759–772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

51. Azzolin, L.; Zanconato, F.; Bresolin, S.; Forcato, M.; Basso, G.; Bicciato, S.; Cordenonsi, M.; Piccolo, S. Role of TAZ as mediator of wnt signaling. *Cell* **2012**, *151*, 1443–1456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Azzolin, L.; Panciera, T.; Soligo, S.; Enzo, E.; Bicciato, S.; Dupont, S.; Bresolin, S.; Frasson, C.; Basso, G.; Guzzardo, V.; et al. YAP/TAZ incorporation in the beta-catenin destruction complex orchestrates the WNT response. *Cell* **2014**, *158*, 157–170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Taelman, V.F.; Dobrowolski, R.; Plouhinec, J.L.; Fuentealba, L.C.; Vorwald, P.P.; Gumper, I.; Sabatini, D.D.; De Robertis, E.M. Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell* **2010**, *143*, 1136–1148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Varelas, X. The hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease. *Development* **2014**, *141*, 1614–1626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Di Agostino, S.; Sorrentino, G.; Ingallina, E.; Valenti, F.; Ferraiuolo, M.; Bicciato, S.; Piazza, S.; Strano, S.; Del Sal, G.; Blandino, G. YAP enhances the pro-proliferative transcriptional activity of mutant p53 proteins. *EMBO Rep.* **2016**, *17*, 188–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Piccolo, S.; Dupont, S.; Cordenonsi, M. The biology of YAP/TAZ: Hippo signaling and beyond. *Physiol. Rev.* **2014**, *94*, 1287–1312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Ramesh, N.; Massaad, M.J.; Kumar, L.; Koduru, S.; Sasahara, Y.; Anton, I.; Bhasin, M.; Libermann, T.; Geha, R. Binding of the WASP/n-WASP-interacting protein WIP to actin regulates focal adhesion assembly and adhesion. *Mol. Cell. Biol.* **2014**, *34*, 2600–2610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Manning, B.D.; Cantley, L.C. Akt/Pkb signaling: Navigating downstream. *Cell* **2007**, *129*, 1261–1274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Korkaya, H.; Paulson, A.; Charafe-Jauffret, E.; Ginestier, C.; Brown, M.; Dutcher, J.; Clouthier, S.G.; Wicha, M.S. Regulation of mammary stem/progenitor cells by PTEN/Akt/beta-catenin signaling. *PLoS Biol.* **2009**, *7*, e1000121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Skeen, J.E.; Bhaskar, P.T.; Chen, C.C.; Chen, W.S.; Peng, X.D.; Nogueira, V.; Hahn-Windgassen, A.; Kiyokawa, H.; Hay, N. Akt deficiency impairs normal cell proliferation and suppresses oncogenesis in a p53-independent and mtorc1-dependent manner. *Cancer Cell* **2006**, *10*, 269–280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Nogueira, V.; Park, Y.; Chen, C.C.; Xu, P.Z.; Chen, M.L.; Tonic, I.; Unterman, T.; Hay, N. Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis. *Cancer Cell* **2008**, *14*, 458–470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Staal, S.P. Molecular cloning of the Akt oncogene and its human homologues Akt1 and Akt2: Amplification of Akt1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 5034–5037. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Carpten, J.D.; Faber, A.L.; Horn, C.; Donoho, G.P.; Briggs, S.L.; Robbins, C.M.; Hostetter, G.; Boguslawski, S.; Moses, T.Y.; Savage, S.; et al. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of Akt1 in cancer. *Nature* **2007**, *448*, 439–444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Pearce, L.R.; Komander, D.; Alessi, D.R. The nuts and bolts of agc protein kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 9–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Bhaskar, P.T.; Hay, N. The two torcs and Akt. *Dev. Cell* **2007**, *12*, 487–502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Vanhaesebroeck, B.; Stephens, L.; Hawkins, P. Pi3k signalling: The path to discovery and understanding. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 195–203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Diez, H.; Garrido, J.J.; Wandosell, F. Specific roles of Akt iso forms in apoptosis and axon growth regulation in neurons. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e32715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Yang, L.; Dan, H.C.; Sun, M.; Liu, Q.; Sun, X.M.; Feldman, R.I.; Hamilton, A.D.; Polokoff, M.; Nicosia, S.V.; Herlyn, M.; et al. Akt/protein kinase B signaling inhibitor-2, a selective small molecule inhibitor of Akt signaling with antitumor activity in cancer cells overexpressing Akt. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 4394–4399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Persad, S.; Dedhar, S. The role of integrin-linked kinase (ilK) in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* **2003**, *22*, 375–384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Maroulakou, I.G.; Oemler, W.; Naber, S.P.; Tschlis, P.N. Akt1 ablation inhibits, whereas Akt2 ablation accelerates, the development of mammary adenocarcinomas in mouse mammary tumor virus (MMTV)-ErbB2/neu and MMTV-polyoma middle T transgenic mice. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 167–177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

71. Ju, X.; Katiyar, S.; Wang, C.; Liu, M.; Jiao, X.; Li, S.; Zhou, J.; Turner, J.; Lisanti, M.P.; Russell, R.G.; et al. Akt1 governs breast cancer progression in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 7438–7443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Chen, J.; Tang, H.; Hay, N.; Xu, J.; Ye, R.D. Akt isoforms differentially regulate neutrophil functions. *Blood* **2010**, *115*, 4237–4246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Chen, C.C.; Jeon, S.M.; Bhaskar, P.T.; Nogueira, V.; Sundararajan, D.; Tonic, I.; Park, Y.; Hay, N. Foxos inhibit mtorc1 and activate Akt by inducing the expression of sestrin3 and rictor. *Dev. Cell* **2010**, *18*, 592–604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Liu, P.; Cheng, H.; Roberts, T.M.; Zhao, J.J. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 627–644. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Baselga, J. Targeting the phosphoinositide-3 (pi3) kinase pathway in breast cancer. *Oncologist* **2011**, *16* (Suppl. 1), 12–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Dillon, R.L.; Muller, W.J. Distinct biological roles for the Akt family in mammary tumor progression. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 4260–4264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Chen, J.; Li, Y.; Yu, T.S.; McKay, R.M.; Burns, D.K.; Kernie, S.G.; Parada, L.F. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature* **2012**, *488*, 522–526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Maroulakou, I.G.; Oemler, W.; Naber, S.P.; Klebba, I.; Kuperwasser, C.; Tschlis, P.N. Distinct roles of the three Akt isoforms in lactogenic differentiation and involution. *J. Cell. Physiol.* **2008**, *217*, 468–477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Gargini, R.; Cerliani, J.P.; Escoll, M.; Anton, I.M.; Wandosell, F. Cancer stem cell-like phenotype and survival are coordinately regulated by Akt/FoxO/Bim pathway. *Stem Cells* **2015**, *33*, 646–660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Mani, S.A.; Guo, W.; Liao, M.J.; Eaton, E.N.; Ayyanan, A.; Zhou, A.Y.; Brooks, M.; Reinhard, F.; Zhang, C.C.; Shipitsin, M.; et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **2008**, *133*, 704–715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Morel, A.P.; Lievre, M.; Thomas, C.; Hinkal, G.; Ansieau, S.; Puisieux, A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e2888. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Arias-Romero, L.E.; Villamar-Cruz, O.; Pacheco, A.; Kosoff, R.; Huang, M.; Muthuswamy, S.K.; Chernoff, J. A Rac-Pak signaling pathway is essential for ErbB2-mediated transformation of human breast epithelial cancer cells. *Oncogene* **2010**, *29*, 5839–5849. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Boucrot, E.; Ferreira, A.P.; Almeida-Souza, L.; Debard, S.; Vallis, Y.; Howard, G.; Bertot, L.; Sauvonnnet, N.; McMahon, H.T. Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway. *Nature* **2015**, *517*, 460–465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Zhou, G.L.; Zhuo, Y.; King, C.C.; Fryer, B.H.; Bokoch, G.M.; Field, J. Akt phosphorylation of serine 21 on Pak1 modulates Nck binding and cell migration. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 8058–8069. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## Crosstalk between WIP and Rho family GTPases

Inés M. Antón<sup>a,c</sup>, Carla Gómez-Oro<sup>a</sup>, Sergio Rivas<sup>a,b,c</sup> and Francisco Wandosell<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup>Departamento de biología molecular y celular, Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), Madrid, Spain; <sup>b</sup>Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Madrid, Spain; <sup>c</sup>Departamento de neuropatología molecular, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain

### ABSTRACT

Through actin-binding proteins such as the neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) and WASP-interacting protein (WIP), the Rho family GTPases RhoA, Rac1 and Cdc42 are major modulators of the cytoskeleton. (N-)WASP and WIP control Rho GTPase activity in various cell types, either by direct WIP/(N-)WASP/Cdc42 or potential WIP/RhoA binding, or through secondary links that regulate GTPase distribution and/or transcription levels. WIP helps to regulate filopodium generation and participates in the Rac1-mediated ruffle formation that determines cell motility. In neurons, lack of WIP increases dendritic spine size and filamentous actin content in a RhoA-dependent manner. In contrast, WIP deficiency in an adenocarcinoma cell line significantly reduces RhoA levels. These data support a role for WIP in the GTPase-mediated regulation of numerous actin-related cell functions; we discuss the possibility that this WIP effect is linked to cell proliferative status.

### ARTICLE HISTORY

Received 31 May 2017  
Revised 4 October 2017  
Accepted 5 October 2017

### KEYWORDS

RhoA; filamentous actin/  
invasiveness; proliferation;  
differentiation

### Introduction

In this review, we will summarize some of the most recent data that describe the link between WIP (WASP-interacting protein) and some classical GTPases and how they regulate several general cell processes such as migration, proliferation and differentiation.

### Rho GTPase family members

From the pioneer report by Ridley and Hall, who demonstrated that active Rho stimulates stress fiber formation<sup>1</sup>, the Rho GTPase family has expanded to 20 members. They are usually classified in two major groups, the canonical (Rho, Rac, Cdc42, RhoD/F) and the atypical (Rnd, RhoU/V, RhoH, RhoBTB). Many reports describe the activation of canonical Rho-family members through membrane receptors and cell adhesion molecules which leads to activation of the Arp2/3 (actin-related protein) complex and actin assembly. Studies on less well characterized atypical members of the Rho-family support new levels of complexity and inter-connectivity in Rho-family GTPase signaling during cell migration.<sup>2,3</sup> In response to extra- and intracellular stimuli that modulate their many roles, including regulation of the actin cytoskeleton and cell signaling, most Rho family canonical GTPases and some atypical members cycle between an active GTP-bound

form and an inactive GDP-bound form. This itinerant status is governed by three sets of proteins, the activating guanine nucleotide-exchange factors (GEF), the inhibitory GTPase-activating proteins (GAP), and the inhibitory guanine nucleotide-dissociation inhibitors (GDI).<sup>4</sup> When bound to GTP, the GTPases can interact with and activate downstream effector proteins, and thus stimulate a plethora of cell processes (migration, division and adhesion, neuron development, final organ morphogenesis). This capacity can affect cytoskeletal structures, modifying not only actin-based activities but also microtubule dynamics, in almost all cell lineages. An essential set of information arose from analysis of the canonical elements Rho, Rac, Cdc42, and their direct control of filamentous actin (F-actin) regulation.<sup>5</sup> Cdc42 has a conserved role in regulating cell polarity and stimulating filopodium induction, whereas Rac proteins generate lamellipodia that regulate membrane ruffle formation and induce membrane extension. In contrast, the three homologous Rho isoforms — RhoA, RhoB and RhoC — all induce stress fiber formation when overexpressed in fibroblasts.

The atypical GTPases Rnd1, Rnd2 and Rnd3 are always bound to GTP and, therefore, are not regulated by the same kind of effectors than the canonical ones. Some reports have provided important insights into the mechanisms that control the function of Rnd proteins; rather



than by the GDP/GTP switch, their activity is regulated by their expression, localization and phosphorylation. Interestingly, there are common players between canonical and atypical forms as Rnd1 and Rnd3 antagonize RhoA-mediated actin remodeling during cell migration through localized recruitment of p190RhoGAP.<sup>6</sup>

The generation of GTPase-regulated cytoskeletal structures usually requires the action of several actin-related proteins that provide the final link between the GTPases and the regulation of F-actin formation. The active/inactive status of each GTPase can control some central elements of polymerization, such as the Arp2/3 complex, as well as a broader group of proteins that transduce overall signals into specific actions or territories; some of these are GTPase-specific, such as cofilin, rhotekin, NADPH oxidase, citron kinase, profilin, and Par3/Par6. Alternatively they can trigger both actin polymerization and force generation through activation of the formin mDia.<sup>2</sup>

#### **Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) family proteins**

Among the best-characterized GTPase effectors, two of the six mammalian WASP family members stand out; these are WASP and neural WASP (N-WASP), whose main function is to act as nucleation-promoting factors (NPF) for actin polymerization.<sup>7</sup> (N-)WASP-mediated activation of the Arp2/3 complex allows 70° angle nucleation over an existing “mother” actin filament. This generates a branched cytoskeletal mesh that supports cell protrusions such as the lamellipodium, which is involved in processes such as cell adhesion or migration.

The multidomain protein structure of (N-)WASP is ideal for integrating multiple input signals to coordinate appropriate final changes in the overall actin cytoskeleton.<sup>8</sup> In several cell systems, the interaction of active Cdc42-GTP with the (N-)WASP GTPase binding domain (GBD) promotes ‘opening’ of the (N-)WASP structure and increases its nucleation activity.<sup>9-11</sup> An *in vitro* pyrene-actin polymerization assay using recombinant proteins demonstrated that (N-)WASP activation by Cdc42 is also regulated by WIP binding, which promotes the (N-)WASP inactive conformation.<sup>12</sup> Together with cell membrane-bound Cdc42-GTP, WIP is also involved in (N-)WASP recruitment to specific subcellular locations.<sup>13-15</sup> These interactions recruit (N-)WASP to the cell region at which actin must polymerize, and contribute to the indispensable spatial and temporal control of this process. WIP also mediates actin tail formation for vaccinia virus motility; after its Nck-dependent recruitment, (N-)WASP engages with the Cdc42 GEF intersectin-1 to activate the GTPase and maintain sustained actin polymerization.<sup>16,17</sup> The WIP/(N-)WASP

role is conserved in evolution, as reported for D-WIP (*Drosophila*-WIP); the Arp2/3 WASP/WIP complex, located at the actin caplets during spermatogenesis in flies, is needed to ensure correct spermatid release from the head cyst cell.<sup>18</sup> In addition to Cdc42 and the cortical actin cytoskeleton, (N-)WASP also binds curved anionic membranes in lipid rafts, thought to be induced by glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins.<sup>19</sup>

#### **WASP-interacting protein (WIP)**

WIP was first identified as a partner of the hematopoietic-specific WASP in lymphocytes,<sup>20,21</sup> and then as an N-WASP partner in many other cell types (e.g., fibroblasts, neurons, epithelial cells), as both WIP and N-WASP are expressed ubiquitously.<sup>22</sup> WIP can also exert its activity independently of its (N-)WASP interaction.<sup>23,24</sup>

#### **-WIP relation with Rho GTPases**

Twenty years ago, WIP was shown to bind the WASP N-terminal region at a site distinct from the GBD, which interacts with Cdc42, weakly with Rac, and not with Rho.<sup>9-11,20</sup> From the outset, WIP was therefore linked indirectly to GTPases, and the lack of any detectable GBD in its sequence suggested that direct WIP/GTPase interaction is unlikely. A recent publication reports a pull-down experiment using mixed lysates containing tagged overexpressed proteins (HA-RhoA or WIP-His) and speculate on direct WIP binding to Rho.<sup>25</sup> *In vitro* assays using purified recombinant proteins (full-length and deletion mutants), alone or with (N-)WASP, would nonetheless be needed to determine the precise nature of this WIP-RhoA interaction. Of great interest for GTPase/cytoskeletal studies would also be the confirmation of endogenous WIP and Rho protein interaction in physiological resting and/or stimulation conditions.

WIP and small GTPases are also linked through the direct, WASP-independent binding of GEF DOCK8 (dedicator of cytokinesis 8) to WIP.<sup>24</sup> DOCK8 associates constitutively with the WIP/WASP complex in resting primary T cells and this multi-complex persists after T cell receptor (TCR)-mediated stimulation. The spatial proximity of DOCK8, WASP, and actin in this complex ensures that Cdc42 (activated by DOCK8 following TCR binding) drives WASP-mediated actin polymerization. This control of the subcortical actin cytoskeleton regulates immune synapse formation, mechanotransduction, T cell transendothelial migration, and homing to lymph nodes, all of which also depend on WASP.

There is much less information on the connection between GTPases and other verprolin/WIP family

members such as CR16 (corticosteroids and regional expression 16) or WICH/WIRE (WIP-CR16 homologous/WIP-related).<sup>26</sup> The few available studies on these proteins report that Cdc42 regulates IRSp53-WIRE interaction as well as localization of this complex to the plasma membrane to generate filopodia,<sup>27</sup> whereas Toca-1 (transducer of Cdc42-dependent actin assembly) promotes actin nucleation by activating the (N-)WASP-WIP/CR16 complex.<sup>28</sup>

#### **-WIP as a regulator of actin-rich cellular components**

At the functional level, WIP activity is associated with the generation of specific actin-rich structures such as filopodia, lamellipodia and stress fibers, as a result of actin cytoskeleton reorganization mediated by Cdc42, Rac, and Rho activation, respectively. In 3T3 murine fibroblasts, WIP regulates N-WASP-induced actin nucleation and contributes significantly to the formation of actin-containing microspikes promoted by bradykinin and Cdc42-GTP; WIP microinjection in murine fibroblasts induces Cdc42-GTP/N-WASP-dependent filopodia, whereas anti-WIP microinjection prevents their generation.<sup>12</sup>

In this same cell system, WIP also participates in Rac-mediated actin reorganization and dorsal/circular ruffle formation induced by PDGF (platelet-derived growth factor), a chemotactic factor for fibroblasts.<sup>29</sup> WIP overexpression enhances dorsal/circular ruffle formation in response to PDGF and, conversely, microinjection of anti-WIP antibody (or lack of WIP in knocked-down primary murine fibroblasts) leads to decreased ruffle formation in response to PDGF. In this setting, the WIP effect depends on its ability to interact directly with actin, as overexpression of a shortened WIP form that lacks the actin-binding site prevents PDGF-induced membrane ruffling.

Rac-regulated circular ruffling is commonly associated with macropinocytosis (internalization of solutes and membrane components), a process that takes place prior to cell movement, as transient ruffling contributes to establishment of polarity in motile cells. The reduced ability of WIP-deficient murine fibroblasts to form circular ruffles suggested a role for WIP in fibroblast movement, which was later confirmed by demonstration that both mesenchymal and amoeboid motility depend on WIP levels.<sup>30</sup> The use of lentivirally reconstituted WIP-deficient murine fibroblasts broadened our knowledge of the requirement for WIP interaction with N-WASP and the adaptor Nck for efficient dorsal ruffle formation; it also identified the need for WIP-Nck binding for efficient fibroblast chemotaxis to PDGF-AA but not to stimuli such as lysophosphatidic acid, epidermal growth factor or fibroblast growth factor. In addition, WIP participates in the amoeboid form of B lymphocyte motility

in response to the B cell-specific chemokine CXCL13 (C-X-C motif chemokine 13) by controlling lamellipodium formation and cell polarization. In both types of migration, mesenchymal and amoeboid, WIP regulates the directional persistence of cell movement, whereas cell speed is only affected in amoeboid B lymphocytes.

#### **-WIP participates in invasiveness and oncogenic activities**

A recent functional connection was identified between the oncogenic effect of WIP and Rac activity in astrocytes and glioblastoma (GB) cells.<sup>31</sup> As WIP overexpression in cultured primary human astrocytes increases cell survival by stabilizing the transcriptional co-activators YAP/TAZ (Yes-associated protein/transcriptional coactivator with PDZ-binding motif), screening of molecules that produce cell death in this system allows identification of pathway components able to impair WIP-mediated survival. Incubation of cells with the Rac inhibitor NSC23766 reversed WIP ability to stabilize YAP/TAZ, which was unaffected by Cdc42 (casin) or RhoA (Y16) inhibitors in astrocytes and GB. Conversely, YAP/TAZ stability, which is notably reduced in WIP knocked-down cells, was unaffected by the presence of a constitutive active Rac mutant (Rac-V12), which suggests a downstream GTPase effect. WIP knockdown in GB also reduced phosphorylation of PAK, a Rac substrate in many processes. These findings support strong dependence on Rac/PAK activation for the WIP oncogenic effect in astrocytes, as well as in breast cancer cells.

Several recent reports highlight WIP as an important regulator of cell invasion, proliferation and anchorage-independent growth in various tumor types. WIP expression is upregulated in human GB explants and in invasive breast cancer cell lines,<sup>31</sup> in ameloblastoma,<sup>32</sup> in highly metastatic A5-RT3 cells (Ras-transformed keratinocytes) vs. non-metastatic parental HaCaT cells, in cancerous A549 cells vs. non-cancerous human small airway epithelial cells (H-SAEC),<sup>25</sup> and in human papillary thyroid tumors.<sup>33</sup>

In ameloblastoma, the most commonly diagnosed odontogenic epithelial neoplasm, WIP is upregulated significantly along the tumor invasive front compared to tumor centers; it is the most widely expressed invadopodial protein in this tumor.<sup>32</sup> Invadopodia are F-actin-rich membrane protrusions that concentrate and secrete metalloproteases, which facilitate extracellular matrix (ECM) degradation.<sup>34</sup> Invadopodia attach to the ECM via their ring-shaped adhesion domain, which confines the actin core and contains GTPases. After the adhesion stage and the receptor-mediated signaling event, cytoskeleton activators are recruited to the membrane, which leads to

actin polymerization in invadopodium cores mediated by a Rho-family small GTPase-regulated process.<sup>35</sup> This mainly Cdc42-dependent mechanism can activate the (N-)WASP/WIP complex directly and produce a sustained invasive protuberance and promotes its penetration of the ECM. Rac1 involvement in invadopodium formation was recently identified in melanoma cells; decreased expression of wild-type Rac1 reduces invadopodium-dependent matrix degradation, in contrast to decreased expression of a hyperactive Rac1 mutant that enhances invadopodium function.<sup>35</sup> GTPases have a central role not only in invadopodium generation and maturation, but also in forming functional podosomes, degradative structures closely related to invadopodia, in which Cdc42 and RhoA control actin reorganization.<sup>36</sup>

WIP localizes to the tip of the invadopodium; its expression is necessary for invadopodium formation and ECM degradation by basal breast cancer cells, but is not sufficient to induce invasiveness in luminal cells.<sup>37,38</sup> The identification of WIP as a potential biomarker that correlates directly with tumor aggressiveness in ameloblastoma, GB, breast cancer and thyroid cancer is of considerable clinical relevance. Due to its differential distribution at the invasive front in ameloblastoma, WIP might also be a promising target for the development of patient-tailored treatment strategies.

#### **- WIP exerts opposite roles in neuronal differentiation and glioma proliferation**

The lack of WIP in hippocampal neurons co-cultured with astrocytes leads to increased dendritic spine size and F-actin levels.<sup>39,40</sup> Identification of the molecular mechanism underlying this phenotype showed direct involvement of increasing amounts of the RhoA GTPase but not of Cdc42 or Rac1, whose levels appear to be normal. Absence of WIP produces a three-fold increase in RhoA levels as well as consistently higher RhoA activity and membrane-associated distribution. Levels of the two RhoA downstream effectors ROCK (Rho-associated protein kinase) and profilin IIa are thus increased three-fold in WIP-deficient synaptosomes compared to controls. In this way, WIP deficiency facilitates activation of the RhoA-ROCK-profilin IIa pathway and contributes to increased F-actin levels in dendritic spines that lack WIP. This RhoA increase is the result of the WIP-dependent translational upregulation of neutral sphingomyelinase (NSM), whose activity reduces sphingomyelin (SM) levels at synapses. This alteration in membrane lipid composition enhances RhoA membrane binding, raft partitioning, and activation in steady state, but prevents changes in these RhoA features in response to stimuli. WIP thus has an essential role in connecting actin cytoskeleton and synaptic membrane

lipid composition.<sup>41</sup> The distinct physiological effects should be noted of local RhoA activation, which leads to increased actin filaments in dendritic spines, and general RhoA activation, which can cause dendritic retraction and growth cone collapse.<sup>42,43</sup>

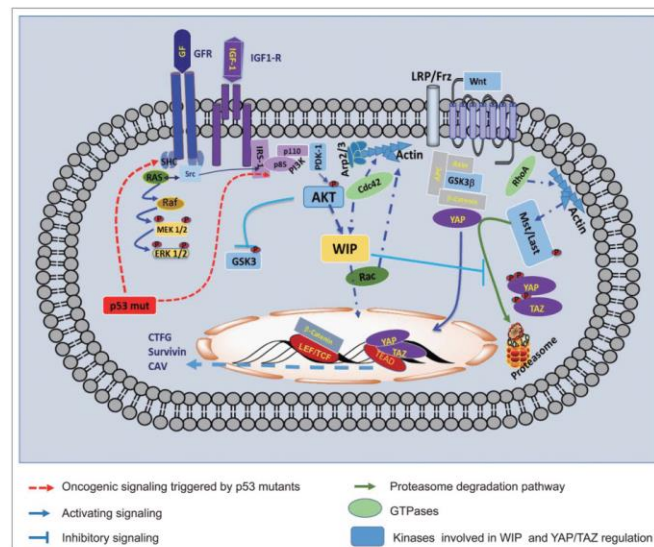
In contrast to the effect in neurons, in which lack of WIP increases RhoA levels, silencing WIP expression reduces RhoA levels and attenuates the tumorigenic and metastatic abilities of A549 lung adenocarcinoma cells. WIP overexpression enhances cell invasion and proliferation as well as their anchorage-dependent growth.<sup>25</sup> In this human epithelial cell system, and at difference from WIP-deficient neurons, WIP reduction does not affect RhoA mRNA expression or RhoA levels downstream of effectors such as ROCK-II and mDia1, or other Rho GTPases such as Cdc42 and Rac1. The overexpression effect is counteracted when cells are treated with the proteasome inhibitor MG132, which produces a time-dependent increase in RhoA expression.<sup>25</sup> This WIP protective capacity against proteasomal degradation is not restricted to RhoA, as WIP levels correlate with those of WASP, Syk,<sup>44</sup> or YAP/TAZ,<sup>31</sup> in a proteasome-dependent manner. We recently reported that loss of proliferation, anchorage-dependent growth and cell invasion in glioma cells are due to decreased WIP expression,<sup>45</sup> which leads to reduced RhoA levels (unpublished data), a result of p53 silencing.

Some GTPases might regulate WIP levels. We observed that expression of constitutive active Rac-V12, by increasing WIP levels, can rescue proliferation of WIP-deficient gliomas.<sup>31</sup> This strongly suggests Rac-WIP crosstalk, and requires further analysis. Data differ with respect to Ras, however; complementary RNA-sequencing analysis identified increased WIP expression in Ras-transformed human keratinocytes compared to controls,<sup>25</sup> whereas we found that direct transformation of an astrocytoma with Ras-V12 increased the proliferation rate, but not WIP levels (our unpublished data).

#### **Future perspectives**

The picture of how WIP participates in GTPase regulation is still far from complete. Nonetheless, research in recent years has begun to show that WIP is not a simple structural bystander, but has relevant roles in GTPase protein stability and subcellular distribution, as well as transcriptional control. As a key component of postsynaptic membranes, WIP modifies some lipid content.

At the neuron level, lack of WIP leads to altered levels of SM and its catabolic enzyme NSM at the synaptic membranes, which might affect trafficking and membrane components. All these lipid and protein arrangements could alter neuron synaptic functions and plasticity. Our data from WIP-deficient murine neurons clarify a role in



**Figure 1.** Scheme summarizing several pathways that control cell proliferation during glioma progression, including the recently identified position of WIP. Representative groups are shown of membrane receptors such as tyrosine kinase receptors (IGFR, GFR) or seven-transmembrane receptors (such as Wnt receptor). Through various mechanisms, these receptors can trigger generic PI3K-Akt signaling, which controls WIP activity. In many tumor cell types, certain proto-oncogenic proteins, such as the mutant versions of p53, enhance these membrane receptor activities. The oncogenic function of WIP operates by controlling YAP/TAZ stability/degradation. In some tumor cell types, YAP/TAZ can work together with beta-catenin; this collaboration enhances the relevance of this regulatory pathway, as an abundance of genes could be upregulated to ensure proliferation and survival. Levels of active GTPases such as RhoA are modified in some WIP-deficient cells, whereas in other cases Rac activity can compensate WIP-deficient function and/or WIP levels.

neuron differentiation for WIP, which, by modulating F-actin levels, has an important regulatory function in dendritic spines. We observed dysfunction of some Akt downstream elements in WIP-deficient neurons, although further work is needed to link mTORC1 dysfunction, F-actin polymerization and RhoA in these cells.<sup>39-41</sup>

Many data support an essential role for WIP and GTPases, not only in tumor cell migration but also in cancer stem cell proliferation. These data allow the proposal of a molecular mechanism involved in cell proliferation, differentiation and actin cytoskeleton dynamics, all instrumental features in cell transformation and invasiveness. Our working hypothesis is that, as seen in gliomas, in other tumors WIP is under the control of mutant p53; through Akt activity, WIP regulates protein stability and subcellular distribution of regulatory proteins such as the co-transcription factors YAP/TAZ (Fig. 1).

These findings highlight WIP versatility, which enables it to modulate GTPase-dependent actin cytoskeleton reorganization in different ways depending on cell type, status and site, as well as the partners with whom it associates.

#### Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

#### Acknowledgments

We are grateful to all members of Lab 16 at the Centro Nacional de Biotecnología and of Lab 206 at the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBM-SO) for thoughtful discussions during the preparation of this review, and C. Mark for editorial assistance.

#### Author contributions

All authors wrote and revised the manuscript.

#### Funding

This work was supported in part by grants from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO/FEDER SAF2015-70368-R), CIBERNED (an initiative of ISCIII) and the Fundación Ramón Areces to IMA and FW.

## References

- Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*. 1992;70:389–399. doi:10.1016/0092-8674(92)90163-7.
- Sadok A, Marshall CJ. Rho GTPases: Masters of cell migration. *Small GTPases*. 2014;5:e29710. doi:10.4161/sgtp.29710.
- Ridley AJ. Rho GTPase signalling in cell migration. *Curr Opin Cell Biol*. 2015;36:103–112. doi:10.1016/j.ccb.2015.08.005.
- Heasman SJ, Ridley AJ. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2008;9:690–701.
- Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: Biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:247–269. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721.
- Chardin P. Function and regulation of Rnd proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7:54–62. doi:10.1038/nrm1788.
- Tyler JJ, Allwood EG, Ayscough KR. WASP family proteins, more than Arp2/3 activators. *Biochem Soc Trans*. 2016;44:1339–1345. doi:10.1042/BST20160176.
- Massaad MJ, Ramesh N, Geha RS. Wiskott-Aldrich syndrome: A comprehensive review. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1285:26–43. doi:10.1111/nyas.12049.
- Aspenstrom P, Lindberg U, Hall A. Two GTPases, Cdc42 and Rac, bind directly to a protein implicated in the immunodeficiency disorder Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr Biol*. 1996;6:70–75. doi:10.1016/S0960-9822(02)00423-2.
- Derry JM, Ochs HD, Francke U. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell*. 1994;78:635–644. doi:10.1016/0092-8674(94)90528-2.
- Kolluri R, Toliás KF, Carpenter CL, Rosen FS, Kirchhausen T. Direct interaction of the Wiskott-Aldrich syndrome protein with the GTPase Cdc42. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:5615–5618. doi:10.1073/pnas.93.11.5615.
- Martinez-Quiles N, Rohatgi R, Anton IM, Medina M, Saville SP, Miki H, Yamaguchi H, Takenawa T, Hartwig JH, Geha RS, Ramesh N. WIP regulates N-WASP-mediated actin polymerization and filopodium formation. *Nat Cell Biol*. 2001;3:484–491. doi:10.1038/35074551.
- Ditlev JA, Michalski PJ, Huber G, Rivera GM, Mohler WA, Loew LM, Mayer BJ. Stoichiometry of Nck-dependent actin polymerization in living cells. *J Cell Biol*. 2012;197:643–658. doi:10.1083/jcb.201111113.
- Chou HC, Anton IM, Holt MR, Curcio C, Lanzardo S, Worth A, Burns S, Thrasher AJ, Jones GE, Calle Y. WIP regulates the stability and localization of WASP to podosomes in migrating dendritic cells. *Curr Biol*. 2006;16:2337–2344. doi:10.1016/j.cub.2006.10.037.
- Sasahara Y, Rachid R, Byrne MJ, de la Fuente MA, Abraham RT, Ramesh N, Geha RS. Mechanism of recruitment of WASP to the immunological synapse and of its activation following TCR ligation. *Mol Cell*. 2002;10:1269–1281. doi:10.1016/S1097-2765(02)00728-1.
- Humphries AC, Donnelly SK, Way M. Cdc42 and the Rho GEF intersectin-1 collaborate with Nck to promote N-WASP-dependent actin polymerisation. *J Cell Sci*. 2014;127:673–685. doi:10.1242/jcs.141366.
- Donnelly SK, Weisswange I, Zettl M, Way M. WIP provides an essential link between Nck and N-WASP during Arp2/3-dependent actin polymerization. *Curr Biol*. 2013;23:999–1006. doi:10.1016/j.cub.2013.04.051.
- Dubey P, Shirolikar S, Ray K. Localized, Reactive F-Actin Dynamics Prevents Abnormal Somatic Cell Penetration by Mature Spermatids. *Dev Cell*. 2016;38:507–521. doi:10.1016/j.devcel.2016.07.001.
- Sharonov GV, Balatskaya MN, Tkachuk VA. Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins as Regulators of Cortical Cytoskeleton. *Biochemistry (Mosc)*. 2016;81:636–650. doi:10.1134/S0006297916060110.
- Ramesh N, Anton IM, Hartwig JH, Geha RS, WIP, a protein associated with wiskott-aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:14671–14676. doi:10.1073/pnas.94.26.14671.
- Ramesh N, Anton IM, Martinez-Quiles N, Geha RS, Waltzing with WASP. *Trends Cell Biol*. 1999;9:15–19. doi:10.1016/S0962-8924(98)01411-1.
- Miki H, Miura K, Takenawa T, N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *EMBO J*. 1996;15:5326–5335.
- Anton IM, Jones GE. WIP: A multifunctional protein involved in actin cytoskeleton regulation. *Eur J Cell Biol*. 2006;85:295–304. doi:10.1016/j.ejcb.2005.08.004.
- Janssen E, Tohme M, Hedayat M, Leick M, Kumari S, Ramesh N, Massaad MJ, Ullas S, Azcutia V, Goodnow CC, et al. A DOCK8-WIP-WASP complex links T cell receptors to the actin cytoskeleton. *J Clin Invest*. 2016;126:3837–3851. doi:10.1172/JCI85774.
- Salvi A, Thanabalu T, WIP promotes in-vitro invasion ability, anchorage independent growth and EMT progression of A549 lung adenocarcinoma cells by regulating RhoA levels. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;482:1353–1359. doi:10.1016/j.bbrc.2016.12.040.
- García E, Jones GE, Machesky LM, Anton IM. WIP: WASP-interacting proteins at invadopodia and podosomes. *Eur J Cell Biol*. 2012;91:869–877. doi:10.1016/j.ejcb.2012.06.002.
- Misra A, Rajmohan R, Lim RP, Bhattacharyya S, Thanabalu T. The mammalian verprolin, WIRE induces filopodia independent of N-WASP through IRSp53. *Exp Cell Res*. 2010;316:2810–2824. doi:10.1016/j.yexcr.2010.07.015.
- Ho HY, Rohatgi R, Lebensohn AM, Le M, Li J, Gygi SP, Kirschner MW. Toca-1 mediates Cdc42-dependent actin nucleation by activating the N-WASP-WIP complex. *Cell*. 2004;118:203–216. doi:10.1016/j.cell.2004.06.027.
- Anton IM, de la Fuente MA, Sims TN, Freeman S, Ramesh N, Hartwig JH, Dustin ML, Geha RS. WIP deficiency reveals a differential role for WIP and the actin cytoskeleton in T and B cell activation. *Immunity*. 2002;16:193–204. doi:10.1016/S1074-7613(02)00268-6.
- Banon-Rodriguez I, Saez de Guinoa J, Bernardini A, Ragazzini C, Fernandez E, Carrasco YR, Jones GE, Wandosell F, Anton IM. WIP regulates persistence of cell migration and ruffle formation in both mesenchymal and amoeboid modes of motility. *PLoS One*. 2013;8:e70364. doi:10.1371/journal.pone.0070364.
- Gargini R, Escoll M, Garcia E, Garcia-Escudero R, Wandosell F, Anton IM. WIP Drives Tumor Progression through YAP/TAZ-Dependent Autonomous Cell Growth. *Cell Rep*. 2016;17:1962–1977. doi:10.1016/j.celrep.2016.10.064.

32. Siar CH, Rahman ZA, Tsujigiwa H, Mohamed Om Alblazi K, Nagatsuka H, Ng KH, Invadopodia proteins, cortactin, N-WASP and WIP differentially promote local invasiveness in ameloblastoma. *J Oral Pathol Med.* 2016;45:591–598. doi:10.1111/jop.12417.
33. Zhang T, Shen X, Liu R, Zhu G, Bishop J, Xing M, Epigenetically upregulated WIPF1 plays a major role in BRAF V600E-promoted papillary thyroid cancer aggressiveness. *Oncotarget.* 2016;8:900–914.
34. Linder S, The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends Cell Biol.* 2007;17:107–117. doi:10.1016/j.tcb.2007.01.002.
35. Revach OY, Winograd-Katz SE, Samuels Y, Geiger B, The involvement of mutant Rac1 in the formation of invadopodia in cultured melanoma cells. *Exp Cell Res.* 2016;343:82–88. doi:10.1016/j.yexcr.2016.02.003.
36. Moreau V, Tatin F, Varon C, Genot E, Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA. *Mol Cell Biol.* 2003;23:6809–6822. doi:10.1128/MCB.23.19.6809-6822.2003.
37. Garcia E, Machesky LM, Jones GE, Anton IM, WIP is necessary for matrix invasion by breast cancer cells. *Eur J Cell Biol.* 2014;93:413–423. doi:10.1016/j.ejcb.2014.07.008.
38. Garcia E, Ragazzini C, Yu X, Cuesta-Garcia E, Bernardino de la Serna J, Zech T, Sarrío D, Machesky LM, Anton IM, WIP and WICH/WIRE co-ordinately control invadopodium formation and maturation in human breast cancer cell invasion. *Sci Rep.* 2016;6:23590. doi:10.1038/srep23590.
39. Franco A, Knafo S, Banon-Rodriguez I, Merino-Serrais P, Fernaud-Espinosa I, Nieto M, Garrido JJ, Esteban JA, Wandosell F, Anton IM, WIP is a negative regulator of neuronal maturation and synaptic activity. *Cereb Cortex.* 2012;22:1191–1202. doi:10.1093/cercor/bhr199.
40. Franco-Villanueva A, Wandosell F, Anton IM, Neuritic complexity of hippocampal neurons depends on WIP-mediated mTORC1 and Abl family kinases activities. *Brain Behav.* 2015;5:e00359. doi:10.1002/brb3.359.
41. Franco-Villanueva A, Fernandez-Lopez E, Gabande-Rodriguez E, Banon-Rodriguez I, Esteban JA, Anton IM, Ledesma MD. WIP modulates dendritic spine actin cytoskeleton by transcriptional control of lipid metabolic enzymes. *Hum Mol Genet.* 2014;23:4383–4395. doi:10.1093/hmg/ddu155.
42. Sayas CL, Avila J, Wandosell F. Glycogen synthase kinase-3 is activated in neuronal cells by Galpha12 and Galpha13 by Rho-independent and Rho-dependent mechanisms. *J Neurosci.* 2002;22:6863–6875.
43. Sayas CL, Avila J, Wandosell F, Regulation of neuronal cytoskeleton by lysophosphatidic acid: Role of GSK-3. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1582:144–153. doi:10.1016/S1388-1981(02)00149-X.
44. Kettner A, Kumar L, Anton IM, Sahahara Y, de la Fuente M, Pivniouk VI, Falet H, Hartwig JH, Geha RS. WIP regulates signaling via the high affinity receptor for immunoglobulin E in mast cells. *J Exp Med.* 2004;199:357–368. doi:10.1084/jem.20030652.
45. Escoll M, Gargini R, Cuadrado A, Anton IM, Wandosell F. Mutant p53 oncogenic functions in cancer stem cells are regulated by WIP through YAP/TAZ. *Oncogene.* 2017;36(25):3515–3527. doi:10.1038/ncr.2016.518.

