

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Caracterización de la interacción entre K-Ras y el dominio RBD de Raf-1 humanos

Colabora:



TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO/A:

Miriam Valera Alberni

TUTOR/A:

Lynne Paula Yenush

COTUTOR/A COLABORADOR/A:

Jerónimo Bravo Sicilia

Leticia Domínguez Berrocal

Curso Académico 2013-2014

VALENCIA, junio de 2014



RESUMEN

Characterization of human K-Ras binding to human RBD Raf-1 domain

MAPK activation cascade in mammals is a signal transduction pathway which permits cell response to a variety of stimuli. It regulates fundamental processes such as proliferation, differentiation, apoptosis and cell survival. Impairing this cascade could give rise to different pathologies, which makes MAPK pathway a promising therapeutic target. ERK cascade is one of the most known MAPK pathways, in which Ras/Raf signaling proteins participate. Ras is a small GTPase which functions as a nucleotide-dependent switch between GDP and GTP. Its binding to GTP gives rise to conformational changes which increase its affinity to Raf. Raf is a protein - serine/threonine kinase whose structure is formed by three conserved regions involved in the activation and deactivation of the protein and regulating signal transmission. Most studies of the interaction of Ras and Raf are based on H-Ras and Raf-1. However, mutated K-Ras results in a great incidence in cancer. Characterization of the manner in which K-Ras and Raf-1 interact could provide some insights in the development of new treatments against cancer. Cloning strategy by using recombinant vectors provided the correct tag for purification protocols. The expression system used for these fusion proteins was based on BL21 or BL21 codon plus strains of *E.coli*. K-Ras and Raf-1 purification by using both affinity chromatography and molecular size exclusion chromatography yielded significant protein levels for the experimental procedure described. Ras binding domain (RBD) involving residues 51 to 131 of Raf-1 was enough to interact with Ras. Binding characterization by using techniques such as *pull down* or *isothermal titration calorimetry* (ITC) verified the interaction between K-Ras and Raf-1. Future strategies will include crystallization series in order to structurally define the binding complex between these two proteins.

Key words: K-Ras, Raf-1, GTPase, MAPK, protein, purification, binding, ITC, *pull-down*

La vía de activación de las MAPK en mamíferos es una ruta de transducción de señales que permite a la célula responder frente a un amplio rango de estímulos y dirigir procesos como la proliferación, diferenciación, apoptosis y supervivencia celular. La desregulación de esta ruta está implicada en diferentes patologías, lo que la convierte en una diana terapéutica de gran interés. Una de las vías MAPKs más conocidas es la mediada por ERK, que se caracteriza por la intervención de dos proteínas señalizadoras, Ras y Raf. Ras es una GTPasa pequeña cuya función biológica queda regulada a través de su unión a un nucleótido guanina GDP o GTP, de forma que su unión a GTP favorece que se produzca un cambio conformacional que incrementa su afinidad por Raf. Raf es una serina/treonina quinasa formada por tres dominios conservados, los cuales intervienen tanto en los procesos de activación e inactivación de la proteína como de transmisión de la señal. La mayoría de los estudios de interacción entre Ras y Raf descritos hasta el momento se basan en H-Ras y Raf-1. Sin embargo, la incidencia de cáncer cuando K-Ras se encuentra mutada es mayor, por lo que el estudio de su modo de unión con Raf-1 resulta de gran relevancia en el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento. El clonaje en vectores recombinantes permitió la adquisición de etiquetas que facilitarían la purificación posterior. El sistema de expresión utilizado para las proteínas de fusión fueron las cepas BL21 o BL21 codon plus de *E.coli*. La purificación de K-Ras y Raf-1 por cromatografía líquida de afinidad empleando columnas de níquel y, posteriormente, por exclusión molecular mostró unos niveles significativos de proteína para el sistema experimental descrito. El dominio de unión a Ras (RBD) comprendido por los residuos 51 al 131 de Raf-1 fue suficiente para mediar su interacción con Ras. La caracterización del modo de unión mediante técnicas como *pull-down* o *isothermal titration calorimetry* (ITC) verificaron la interacción entre K-Ras y Raf-1. Las estrategias futuras comprenderán la disposición de series de cristalización que permitirán definir la estructura del complejo de interacción.

Palabras clave: K-Ras, Raf-1, GTPasa, MAPK, proteína, purificación, interacción, ITC, *pull-down*

Autor/a: Miriam Valera Alberni Valencia, junio de 2014

Tutor Académico: Lynne Paula Yennush

Cotutor/a colaborador/a: Jerónimo Bravo Sicilia, Leticia Dominguez Berrocal

AGRADECIMIENTOS

No podía acabar este trabajo sin manifestar mi más profunda gratitud a todas aquellas personas que lo han hecho posible. Son muchas las muestras de apoyo que he recibido, no sólo para este proyecto, sino a lo largo de toda mi carrera profesional, y comentar a todas estas personas me llevaría mucho más de una hoja.

En primer lugar quisiera agradecer a mi tutora Leti, por su infinita paciencia a mis innumerables preguntas, a mis compañeras de trabajo durante estos meses, Nada, Sara, Yolanda, María. A Marcin, por cederme esos vectores que tanto me han ayudado en este proyecto. Mi más sincero agradecimiento a Jero, por permitirme realizar este trabajo en una línea de investigación que siempre he considerado de gran interés.

También quería agradecer el apoyo de María José Aliaga, Juan Antonio López y Paco Estévez, tres de los grandes representantes de un elenco de profesores sin los cuales no habría logrado estar donde me encuentro ahora.

Finalmente, quisiera manifestar mi especial gratitud a mi familia. Por la paciencia. Por la comprensión. Por los consejos. Por todo. Gracias por hacer realidad mi sueño y guiarme en este camino que a veces ha resultado tan duro. Sin embargo, este proyecto final de grado va dedicado a ti, querida amiga. Me enseñaste a ser fuerte, a no rendirme por difícil que fueran las circunstancias. Me hiciste comprender que el Milagro no sólo hacía referencia a tu nombre, sino a algo que también se consigue con esfuerzo y dedicación.

*Es precisamente
la posibilidad de realizar un sueño
lo que hace la vida interesante*

Paulo Coelho

ÍNDICE

1. Índice temático

1. Introducción.....	1
1.1 Ruta de señalización Ras/Raf/MEK/ERK.....	1
1.2 GTPasas Ras.....	3
1.2.1 Estructura de Ras.....	4
1.2.2 Activación de Ras.....	5
1.2.3 Papel de Ras en el desarrollo de cáncer.....	6
1.3 Proteínas serina/treonina quinasas Raf.....	7
1.3.1 Estructura y sitios de fosforilación de Raf.....	7
1.3.2 Papel de Raf en el desarrollo de cáncer.....	9
1.4 Estudios previos de interacción Ras-Raf.....	9
2. Objetivos.....	11
3. Material y métodos.....	12
3.1. K-Ras.....	12
3.1.1 Clonaje.....	12
3.1.2 Estudios de expresión a pequeña escala.....	15
3.1.3 Sobreexpresión a gran escala en procariontas.....	16
3.1.4 Purificación por FPLC con columna quelante de níquel.....	18
3.1.5 Purificación por cromatografía de exclusión molecular.....	19
3.2. Raf-1.....	20
3.2.1. Clonaje.....	20
3.2.2. Estudios de expresión a pequeña escala.....	21
3.2.3. Sobreexpresión a gran escala en procariontas.....	21
3.2.4. Purificación por FPLC con columna quelante de níquel.....	22
3.2.5. Purificación por cromatografía de exclusión molecular.....	22
3.3. Estudio de la interacción entre K-Ras y Raf-1 por <i>Isothermal Titration Calorimetry</i> (ITC).....	23
4. Resultados y discusión de los resultados.....	24
4.1. Purificación a pequeña escala con <i>beads</i> de agarosa.....	24
4.1.1 <i>Beads</i> de K-Ras y Raf-1.....	24
4.1.2 <i>Beads</i> para el seguimiento de la optimización de la sobreexpresión de K-Ras y Raf-1.....	25
4.2. Purificación a gran escala de K-Ras.....	27
4.3. Purificación a gran escala de Raf-1.....	30
4.4. Caracterización de la interacción entre K-Ras y Raf-1.....	32
4.4.1 Medida a pequeña escala: <i>pull-down</i>	32
4.4.2 Medida a gran escala: <i>Isothermal Titration Calorimetry</i> (ITC).....	34
4.5. Perspectiva del estudio de K-Ras.....	36
5. Conclusiones.....	37
6. Bibliografía.....	38
7. Anexos.....	41

2. Índice de tablas

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Tabla 1. Parámetros termodinámicos de la asociación entre K-Ras WT y su efector Raf-1.....	35
--	----

ANEXOS

Tabla 2. Condiciones y mezcla de la PCR realizada a partir del vector pBabe inicial de K-Ras.....	41
Tabla 3. Condiciones y mezcla de la PCR de colonia a partir de las placas de resiembra de K-Ras WT y K-Ras V12 en vectores pNKI, pNSI y pMBKI.....	41
Tabla 4. Condiciones y mezcla de la PCR realizada a partir del vector pFAST-BAC de Raf-1.....	42
Tabla 5. Condiciones y mezcla de la PCR de colonia a partir de las placas de resiembra de Raf-1 en vector pNSI.....	42
Tabla 6. Cebadores directos y reversos empleados para las mezclas de las PCR realizadas.....	43

3. Índice de figuras

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Rutas MAPKs en mamíferos.....	1
Figura 2. Ruta Ras/Raf/MEK/ERK.....	2
Figura 3. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas correspondientes a K-Ras, H-Ras y N-Ras humanas.....	4
Figura 4. Estructura de Ras.....	4
Figura 5. Esquema del dominio catalítico de las proteínas GTPasas pequeñas.....	5
Figura 6. Proceso de activación y desactivación de Ras.....	6
Figura 7. Organización de las quininas Raf.....	8
Figura 8. Estructura de b-Raf humana unida al inhibidor sorafenib (PDB 1UWH).....	8
Figura 9. Dominio de unión a Ras (RBD) de c-Raf-1 (PDB 1RFA).....	9
Figura 10. Interacciones Ras-Raf.....	10
Figura 11. Modelo de activación de Raf-1.....	11

MATERIAL Y MÉTODOS

Figura 12. <i>Ligation independent cloning</i> (LIC).....	13
Figura 13. Esquema de los vectores pMBKI y pETNKI.....	13
Figura 14. Esquema del sitio de clonaje del vector pETNKI-his3C-LIC-kan.....	14

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Figura 15. Gel de poliacrilamida del 15% de los controles de expresión de K-Ras humana tipo silvestre (K-Ras WT H).....	24
Figura 16. Geles de poliacrilamida del 15% de los controles de expresión para las diferentes construcciones de Raf-1.....	25
Figura 17. Geles de poliacrilamida del 15% obtenidos para las diferentes condiciones de expresión de K-Ras WT H.....	26
Figura 18. Geles de poliacrilamida del 15% obtenidos para las diferentes condiciones de expresión de c-Raf [1-131].....	27
Figura 19. Cromatograma de FPLC correspondiente a la purificación de K-Ras WT H con columna de níquel.....	28
Figura 20. Gel de poliacrilamida del 15% mostrando las fracciones iniciales de la purificación de K-Ras WT H con columna de níquel.....	28
Figura 21. Gel de poliacrilamida del 15% mostrando el resto de fracciones de la purificación con columna de níquel.....	29
Figura 22. Cromatograma de exclusión molecular de K-Ras WT H.....	29
Figura 23. Gel de poliacrilamida del 15% de las fracciones de proteína obtenidas por cromatografía de exclusión molecular.....	30
Figura 24. Cromatograma de FPLC correspondiente a la purificación de Raf-1, aminoácidos 51 al 131, con columna de níquel.....	30
Figura 25. Geles de poliacrilamida del 15% de las fracciones de proteína obtenidas por FPLC de la construcción 51-131 de Raf-1.....	31
Figura 26. Cromatograma de exclusión molecular de Raf-1, construcción 51-131.....	31
Figura 27. Gel de poliacrilamida del 15% de las fracciones de proteína obtenidas por cromatografía de exclusión molecular.....	32
Figura 28. Medida de la interacción entre K-Ras WT en pMBKI y c-Raf [51-131] en pNSI mediante ensayo por pull-down.....	33
Figura 29. Medida de la interacción entre K-Ras G12V en pMBKI y c-Raf [51-131] en pNSI mediante ensayo por pull-down.....	33

Figura 30. ITC para K-Ras WT H y la construcción c-Raf [51-131] humana.....	34
Figura 31. Estequiometría de interacción entre K-Ras WT H y c-Raf [51-131].....	35
Figura 32. ITC para K-Ras V12 H y la construcción c-Raf [51-131] humana.....	35

ABREVIATURAS

- CRD: Cysteine Rich Domain
- ERKs: Extracellular Signal-Regulated Kinases.
- GAPS: Guanine triphosphate- Activating Proteins
- GDP: Guanosine Diphosphate
- GNEFS: Guanine Nucleotide Exchange Factors
- GppCp: guanosine-5'-[(β,γ)-methylene]triphosphate
- GRB2: Growth Factor Receptor Bound Protein-2.
- GTP: Guanosine Triphosphate
- H-Ras: Harvey-Ras.
- IPTG: isopropil - β - D - tiogalactopiranosido
- ITC: isothermal titration calorimetry
- K- Ras V12 H: K-Ras mutada. Cambio glicina por valina en el residuo 12.
- K-Ras WT H: K-Ras tipo silvestre humana.
- K-Ras: Kirsten-Ras.
- LB: Luria Broth (medio)
- MAPK: Mitogen- Activated Protein Kinase.
- N-Ras: Neuroblastoma - Ras.
- RBD: Ras Binding Domain
- SOS: Son of Sevenless.
- Tm: temperatura de fusión

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Ruta de señalización Ras/Raf/MEK/ERK

Las principales vías de comunicación entre el exterior y el interior celular se fundamentan en cascadas de transducción de señales. Una de las rutas más estudiadas es la cascada de las MAPK (*mitogen- activated protein kinase*), donde proteínas señalizadoras serina/treonina quinasa median procesos como la expresión de genes, metabolismo, división celular, morfología celular y supervivencia. Su actividad puede modificar el estado de fosforilación de un amplio rango de proteínas, como factores de transcripción, proteínas del citoesqueleto u otras quinastas. Además, los cambios epigenéticos de estas enzimas o de las rutas de señalización que regulan pueden resultar en el desarrollo de una variedad de enfermedades humanas incluyendo cáncer, inflamación o enfermedades cardiovasculares (QIAGEN[®], 2014).

Se han descrito cuatro grupos de MAPKs en mamíferos (Figura 1): ERKs (*extracellular signal-regulated kinases*), p38 MAPKs, JNKs (*c-Jun NH₂- terminal kinases*) y, menos estudiada, la vía por ERK5 (*extracellular signal-regulated kinase-5*) (Wang y Tournier, 2006). Estas rutas tienen en común la intervención de tres componentes básicos, una MAPKKK/MAP3K/MEKK (*MAP Kinase Kinase Kinase*), una MAPKK/MAP2K/MEK (*MAP Kinase Kinase*) y la MAPK. En mamíferos, existen 14 MAPKKKs, 7 MAPKKs y 12 MAPKs (Zhang y Liu, 2002).

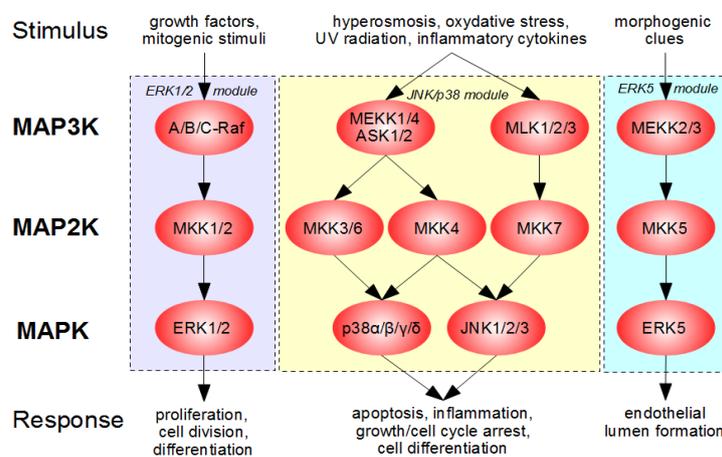


Figura 1. Rutas MAPKs en mamíferos. Clasificación de las cuatro vías de señalización promovidas por MAPKs en tres grupos, dependiendo de la respuesta ante estímulos. Factores de crecimiento y estímulos mitogénicos activan la vía de ERK, mientras que la hiperosmolaridad o el estrés oxidativo y la morfogénesis pueden activar la ruta de p38/JNK o ERK5, respectivamente. Esto resulta en una amplia variedad de respuestas que comprenden proliferación, inflamación o formación del lumen endotelial (CELL SIGNALING TECHNOLOGY[®], 2014).

Una gran variedad de receptores intervienen en la activación de las MAPKs en respuesta a diferentes factores, como son los GPCRs (*G- Protein Coupled Receptors*), RTKs (*Receptor Tyrosine Kinases*), integrinas o canales iónicos.

El modo de activación de la ruta comienza con la unión de ligandos, como el EGF (*Epidermal Growth Factor*) a los RTKs, resultando en su dimerización y posterior autofosforilación de los residuos tirosina de sus colas citoplásmicas (Figura 2). Estos residuos son reconocidos por proteínas adaptadoras como GRB2 (*Growth Factor Receptor Bound Protein-2*). GRB2 presenta un dominio SH2, que se une a las tirosinas fosforiladas del receptor, y dos dominios SH3 que interaccionan con motivos ricos en prolina de otras proteínas. La unión de GRB2 a los residuos fosforilados del receptor promueve su asociación con el factor intercambiador de guanina, SOS (*Son of Sevenless*), proteína citosólica que se recluta a la membrana y favorece la disociación de Ras del GDP. Entonces, Ras se activa uniéndose a GTP y esto contribuye a que Raf, su efector, se transloque a la membrana celular.

Mientras que Raf reconoce de forma específica a sus sustratos, MEK1 y MEK2 son proteínas quinasa de función dual que fosforilan ERK1/ERK2 tanto en residuos treonina como tirosina (Roskoski, 2010). Las MAPKs se activan a través de la doble fosforilación del motivo Thr- Xaa- Tyr, diferente para cada clase de MAPKs y que, en el caso de las ERKs, se compone de los residuos Thr- Glu - Tyr (motivo TEY), treonina 183 y tirosina 185.

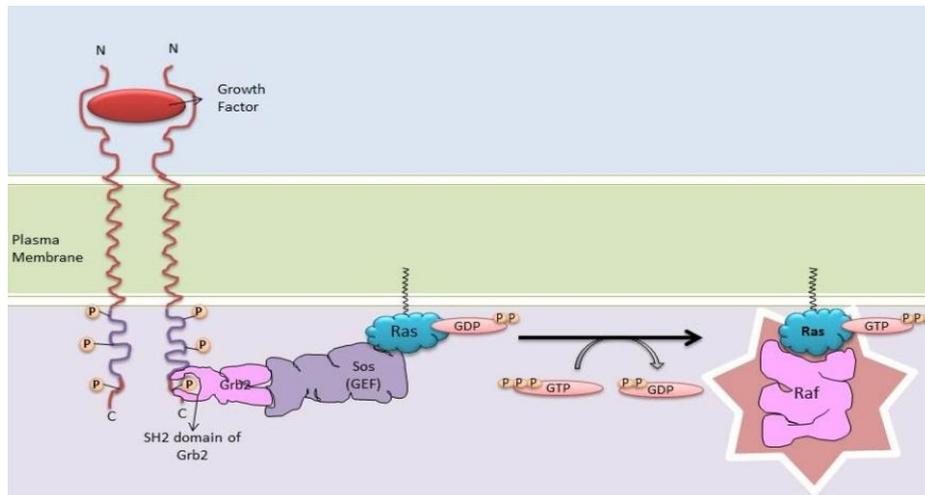


Figura 2. Ruta Ras/Raf/MEK/ERK. Se representa la ruta desde el reconocimiento del ligando por el receptor tirosina quinasa hasta la activación de Ras mediante la intervención de SOS. La unión de Ras a GTP y el cambio conformacional asociado favorece la interacción con sus proteínas efectoras, como Raf (NAMRATA HETA, 2013).

Una vez activados, ERK1/ERK2 se translocan al núcleo para fosforilar una serie de factores de transcripción, como por ejemplo Elk1 (Serina383 y Serina389) o NF-KappaB. Sin embargo, la principal diana de las proteínas ERK es RSK (proteína ribosomal de 90 kDa, quinasa S6), que contribuye a la fosforilación de c-Fos en la Serina362, de SRF (*Serum Response Factor*) en la Serina103 y de CREB (*Cyclic AMP Response Element- Binding Protein*) en el residuo Serina133.

La cascada de MAPK no es una simple ruta lineal, sino una compleja red de interacciones donde cada tipo de proteína señalizadora puede estar a su vez formado por varios subtipos; además, participan un número variable de adaptadores y proteínas *scaffold*. Esta ruta puede interactuar con otras cascadas de señalización mediante la intervención de moléculas moduladoras como el cAMP. El cAMP inhibe el crecimiento de fibroblastos, células del músculo liso o adipocitos a través del bloqueo de la interacción de Ras con Raf y, por tanto, inhibiendo la ruta por MAPKs (Yehia, 2001).

Un amplio rango de factores de crecimiento y mitógenos utilizan la señalización Ras/Raf/MEK/ERK para modular la expresión génica y la actividad de las proteínas implicadas en apoptosis. Las mutaciones en los receptores o en las proteínas Ras/Raf pueden dar lugar a la activación constitutiva de la ruta y, por tanto, al desarrollo de cáncer. Ras se encuentra mutada en aproximadamente el 30% de las tumorigénesis en humanos, mientras que mutaciones en b-Raf se han descrito para el 7% de las mismas, siendo prevalentes en melanomas (70%) o cáncer de tiroides (53%) (Davies et al., 2002). Por ello, se considera esta ruta como una posible diana terapéutica para el tratamiento de tumores (Bos, 1989) y, de hecho, se han desarrollado inhibidores de Ras, Raf y MEK, algunos de los cuales se encuentran en fase clínica (McCubrey, 2007).

1.2 GTPasas Ras. Activadores *aguas arriba* de la ruta de señalización Ras/Raf/MEK/ERK

Ras (*rat sarcoma*) es una proteína de unión a nucleótidos de guanina que pertenece a la superfamilia de GTPasas pequeñas, un grupo que comprende más de 150 proteínas y a la que también pertenecen otras cuatro subfamilias como son Rho, Rab, Arf y Ran, con las que comparte un 30% de identidad en sus secuencias (Wittinghofer y Hermann, 1995).

El producto de la expresión del gen Ras es una proteína monomérica localizada en membrana de 21 kDa que funciona como un interruptor molecular, garantizando una respuesta celular rápida mediante rutas de señalización, entre las que se incluye no sólo la vía Raf/MEK/ERK, sino también PI3K/Akt o RalEGF/Ral. Las GTPasas de pequeño peso molecular intervienen en procesos celulares como la diferenciación, división celular, transporte de vesículas, ensamblaje nuclear y control de la estabilidad del citoesqueleto (Lundquist, 2006).

Cada célula de mamífero contiene al menos tres tipos de proteínas Ras, conocidas como H-Ras (Harvey-Ras), N-Ras (Neuroblastoma - Ras) y K-Ras (Kirsten-Ras), codificadas por los genes HRAS, NRAS y KRAS, respectivamente. A su vez, K-Ras presenta dos isoformas producidas por procesamiento (*splicing*) alternativo del mismo gen, K-Ras isoforma A y K-Ras isoforma B. Las tres clases de Ras difieren en su potencial de activación de la cascada ERK, siendo K-Ras un mayor inductor de esta ruta que H-Ras (Moretó et al., 2009).

Las proteínas Ras se producen como precursores citoplásmicos que requieren de una serie de modificaciones post-traduccionales para unirse establemente a la membrana. Mientras que H-Ras, K-Ras4A y N-Ras son palmitoiladas, K-Ras4B posee una región rica en lisinas (KKKKKK), que une directamente la proteína a la membrana (Kato et al., 1992).

Estas proteínas están constituidas por aproximadamente 190 aminoácidos altamente conservados. Sin embargo, la mayoría de las diferencias en las secuencias de H-Ras, K-Ras y N-Ras se producen en el dominio hipervariable C-terminal, en torno a los últimos 25 aminoácidos, como se puede comprobar en la Figura 3. Se considera que estas variaciones pueden estar implicadas en las distintas funciones biológicas de cada proteína (Adjei, 2001).

```

Hu K-Ras 1 MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHFVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDITAG 60
Hu H-Ras 1 MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHFVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDITAG 60
Hu N-Ras 1 MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHFVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDITAG 60

Hu K-Ras 61 QEEYSAMRDQYMRITGEGFLCVFAINMKSFEDIHHYREQIKRWKDSEDVEMVLVGNKCDL 120
Hu H-Ras 61 QEEYSAMRDQYMRITGEGFLCVFAINMKSFEDIHQYREQIKRWKDSDDVEMVLVGNKCDL 120
Hu N-Ras 61 QEEYSAMRDQYMRITGEGFLCVFAINMKSFADINLYREQIKRWKDSDDVEMVLVGNKCDL 120

Hu K-Ras 121 PSRTVDTKQAQDLARSYGIPFIETSAKTRQGVDDAFYTLVREIRKHK-ERMSKDGKKKK 179
Hu H-Ras 121 AARTVESRQAQDLARSYGIPYIETSAKTRQGVEDAFYTLVREIRCHKLRKLNPFDESGPG 180
Hu N-Ras 121 PTRTVDTKQAHELAKSYGIPFIETSAKTRQGVEDAFYTLVREIRQYRMKKLNSSDDGTQG 180

Hu K-Ras 180 KSKTKCVIM 188
Hu H-Ras 181 CMSCKCVLS 189
Hu N-Ras 181 CMGLPCVVM 189

```

Figura 3. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas correspondientes a K-Ras, H-Ras y N-Ras humanas. Se muestra el alineamiento de secuencia completa de Ras, aminoácidos 1 al 188-189. Se puede observar identidad en los residuos del extremo N- terminal, mientras que esta similitud se pierde para el extremo C-terminal.

1.2.1 Estructura de Ras

Los análisis cristalográficos de varias GTPasas pequeñas muestran la presencia de un dominio catalítico conservado de 20 kDa. Este dominio se compone de 5 hélices α (A1-A5), 6 hojas β (B1-B6) y 5 lazos (*loops*) polipeptídicos (G1-G5), como se muestra en las Figuras 4A y 5A. Estos *loops* o lazos contienen la mayoría de los residuos que coordinan la interacción, no sólo a GDP/GTP, sino también a las proteínas efectoras de Ras.

El lazo G1 (*P-loop*) se encarga de la unión a grupos fosfato, mientras que el lazo G3 une iones Mg^{2+} . Los iones Mg^{2+} coordinan la interacción con el fosfato γ y β del GTP además de con los residuos Ser17 y Thr35 a través de enlaces hidrógeno (Brünger et al., 1990). Thr35 se encuentra conservado en todas las GTPasas pequeñas y está presente en el lazo G2. El lazo G4 contiene una secuencia consenso (NKXD) con residuos Lys y Asp que interaccionan directamente con el nucleótido, mientras que parte del lazo G5 reconoce a la base guanina (Paduch et al., 2001).

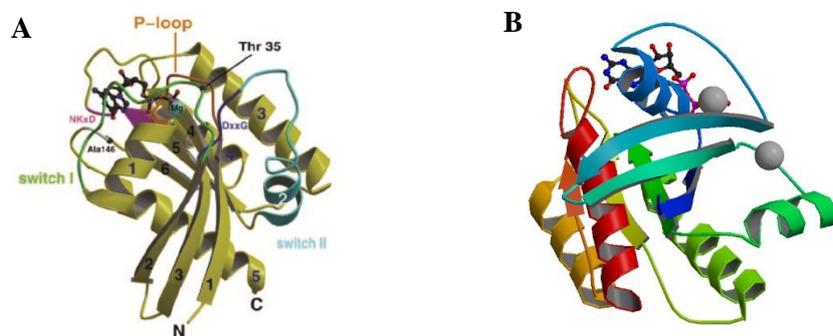


Figura 4. Estructura de Ras. (A) Dominio G de Ras. Se indican los dominios conservados, así como la unión al nucleótido y al ion Mg^{2+} (Vetter y Wittinghofer, 2001). (B) K-Ras humana formando un complejo con GTP (PDB 3GFT). Se muestra la disposición en forma de hélices α y hojas β descrita para K-Ras. (Tong et al., enviado para su publicación).

Existen dos estados conformacionales de Ras (Figura 5): uno activo, unido a GTP, que facilita la interacción con otras proteínas, y otro inactivo, unido a GDP. La comparación entre la estructura descrita para Ras^{GTP} y la de Ras^{GDP} muestra un elevado grado de similitud a excepción de dos regiones de aproximadamente 10 aminoácidos cada una: una primera región de reconocimiento y contacto directo en la interacción, *switch I* (residuos 32-38) definida por el lazo G2/B2, y una segunda región próxima a la unión con el efector, *switch II* (residuos 60-75) en la región B3/A2 (Herrmann, 2003). Estas regiones son responsables de los cambios conformacionales producidos en el intercambio de nucleótidos y, por consiguiente, de la afinidad a sus efectores y proteínas reguladoras.

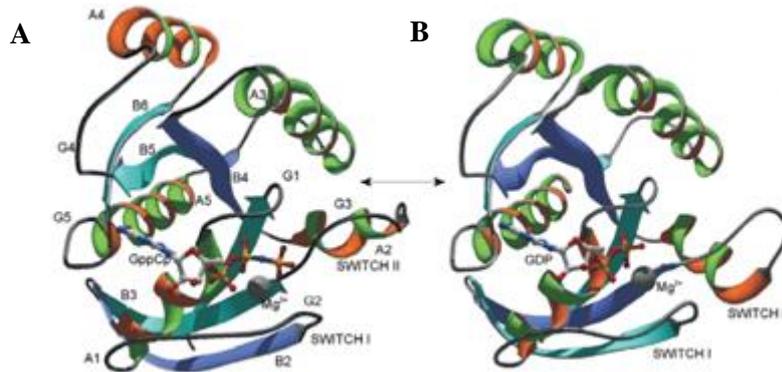


Figura 5. Esquema del dominio catalítico de las proteínas GTPasas pequeñas. (A) Complejo Ras- GppCp - Mg²⁺ (PDB 5P21). Conformación activa de Ras unida a GppCp, un análogo no hidrolizable del GTP. Se indican las cinco hélices α (A1-A5), seis hebras β (B1-B6) y cinco lazos polipeptídicos (G1-G5). (B) Complejo Ras- GDP - Mg²⁺ (PDB 4Q21). Conformación inactiva unida a GDP. Los cambios conformacionales se manifiestan en las regiones del *switch I* y *switch II* (Paduch et al., 2001).

Las estructuras obtenidas a través de RMN y rayos X muestran un incremento en la movilidad del *switch I* y *switch II* para el estado inactivo unido a GDP respecto a Ras^{GTP}. De acuerdo con el mecanismo propuesto por Filchinski et al. (2010), los átomos de oxígeno pertenecientes al grupo fosfato γ del GTP forman dos puentes de hidrógeno con los grupos NH de los residuos Thr35 y Gly60 de Ras. Al liberarse del grupo fosfato, estos enlaces se rompen, resultando en el estado relajado y en el aumento de la movilidad del *switch I* y *switch II*. Por tanto, la rigidez de esta región, adoptada ante su unión a un nucleótido guanosina concreto, se relaciona con su capacidad para interactuar con sus efectores.

1.2.2 Activación de Ras: *the molecular switch*

El proceso de activación y desactivación de Ras consiste en una variación entre su conformación activa unida a GTP y su conformación inactiva unida a GDP (Figura 6).

El mecanismo de activación y desactivación de las GTPasas pequeñas como Ras se fundamenta en la intervención de dos proteínas: GEFs (*Guanine- Exchange Factor*) y GAPs (*GTPase- Activating Proteins*). Las GEFs como SOS se insertan en regiones próximas al *P-loop* y al sitio de unión del Mg²⁺, inhibiéndose la interacción con el GDP a través de un cambio en la disposición del *switch II*. Sucesivamente, esto provoca que el *switch I* se aleje de la guanina. Así, queda eliminado cualquier contacto con el GDP, que se libera al citoplasma.

El GEF se disocia rápidamente de Ras y, como la concentración de GTP es mayor que la de GDP en el citoplasma, Ras puede volver a cargarse con un grupo GTP (Der, 2006).

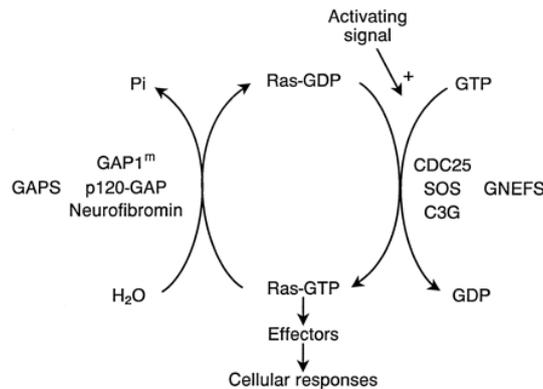


Figura 6. Proceso de activación y desactivación de Ras. GNEFS = *Guanine Nucleotide Exchange Factors*; GAPS = *Guanine triphosphate- Activating Proteins*; GDP = *Guanosine Diphosphate*; GTP = *Guanosine Triphosphate*; SOS = *Son of Sevenless*. Se muestra un balance entre la acción de GAPs y GNEFs. El ataque nucleofílico de una molécula de agua y la liberación de un grupo fosfato inorgánico se lleva a cabo por GAPs como GAP1, p120-GAP o neurofibromina. Por otra parte, las GNEFs como CDC25, SOS o C3G favorecen la entrada de un nuevo GTP a partir de la salida del GDP anterior (Adjei, 2001).

Cabe mencionar que la actividad intrínseca de Ras como GTPasa es baja y, por ello, requiere de otras proteínas que potencien su acción. Las GAPs estimulan la hidrólisis del GTP al que se encuentra unido y la inactivación de su función señalizadora. Las proteínas GAPs aportan residuos catalíticos adicionales (dominio arginina) que promueven la liberación de un fosfato inorgánico mediante ataque nucleofílico de una molécula de agua (Resat et al., 2001). El balance entre la actividad de las GEFs y GAPs determinará el estado de Ras.

Ras debe encontrarse en la membrana plasmática no sólo para su activación mediada por SOS, sino también para proseguir con la ruta de transducción y transmitir la señal a sus efectores, entre los que se encuentra la serina/treonina quinasa Raf-1.

1.2.3 Papel de Ras en el desarrollo de cáncer

El desarrollo de tumores se asocia normalmente a mutaciones puntuales que afectan a los codones 12, 13 o 61 del proto-oncogén Ras (Prior et al., 2012). Las mutaciones en estos sitios conservados resultan en una ganancia de función de la proteína, que permanece constitutivamente activada y unida a GTP, dando lugar al 15 - 20% de los tumores malignos en humanos.

A pesar de que una mutación en cualquiera de los tres genes que codifican las distintas variantes de Ras puede dar lugar a la aparición de carcinoma, la incidencia de cáncer cuando KRAS se encuentra mutada es mayor. De hecho, las mutaciones activadoras en KRAS se detectan con mayor frecuencia en tejidos derivados del endodermo, como el del pulmón (35%), páncreas (95%) y colon (30%), indicando con esto la posibilidad de que dicha mutación afecte a un precursor endodérmico o célula madre (Quinlan et al., 2008).

Las mutaciones en HRAS están relacionadas con carcinomas de riñón o páncreas, mientras que los melanomas, carcinomas hepatocelulares o enfermedades hemolíticas se asocian con mutaciones en NRAS.

Una de las mutaciones más prevalentes consiste en el intercambio de una glicina por una valina en el codón 12 (G12V). Esta mutación no sólo ocasiona que Ras reduzca su actividad GTPasa intrínseca, sino que también pierda afinidad por las GAPs, lo que da lugar a que permanezca unida a GTP. Así, la ruta permanece constitutivamente activa y la célula procesa continuamente las señales que favorecen su proliferación e inhiben su apoptosis. La mutación G12V en KRAS se emplea actualmente como biomarcador de cáncer colorrectal (30%) (Liu et al., 2011) o adenocarcinoma de pulmón (15-25%) (Carpeño y Belda-Iniesta, 2013).

1.3 Proteínas serina/treonina quinasas Raf

La familia de las proteínas quinasas desarrolla un papel fundamental en prácticamente todos los procesos biológicos del organismo. Esta familia consiste en 518 genes, siendo por tanto una de las familias de genes más extensa. Dependiendo del residuo fosforilado, estas enzimas se clasifican en proteínas serina/treonina quinasa (385 miembros), proteínas tirosina quinasa (90 miembros) y proteínas estructuralmente similares a tirosina quinasa (43 miembros) (Roskoski, 2010).

Raf es una proteína serina/treonina quinasa con 648 pares de bases y peso molecular de 75 kDa que fue descubierta en relación con los estudios realizados en los oncogenes retrovirales *v-raf* y *v-mil*, de ahí la denominación 'Raf' (*rapidly accelerated fibrosarcoma*) (Leicht et al., 2007). En este ensayo se trabajará con Raf-1, también conocida como c-Raf-1 o c-Raf. Raf-1 fue descubierta en 1985 y su función se relaciona con el metabolismo celular, la regulación de la función neurológica o la activación de caspasas en respuesta a estímulos concretos, como la apoptosis mediada por macrófagos o la diferenciación eritroide (Baccarini, 2005).

Mientras que Raf-1 se expresa constitutivamente, las otras dos formas de Raf (a-Raf y b-Raf) son específicas de tejido. La expresión de a-Raf es abundante en tejidos reproductivos, al contrario que b-Raf, que se detecta predominantemente en el cerebro. También se han descrito homólogos de Raf en organismos como *Caenorhabditis elegans* o *Drosophila melanogaster* (Pumiglia et al., 1995).

1.3.1 Estructura y sitios de fosforilación de Raf

La estructura de las proteínas Raf quinasas está formada por tres dominios conservados (CR), como se indica en la Figura 7: CR1, CR2 y CR3. CR1 se localiza en la región N-terminal y se compone del dominio de unión a Ras (RBD) y del dominio rico en cisteínas (CRD). También posee un motivo capaz de unirse a dos iones zinc (*zinc finger*). CR2 es un dominio rico en residuos serina/treonina que contiene sitios de fosforilación que median interacciones con otras proteínas, como por ejemplo, con la proteína reguladora 14-3-3. Sin embargo, 14-3-3 también puede unirse a la región C-terminal tras el dominio proteína quinasa (CR3) (Roskoski, 2010).

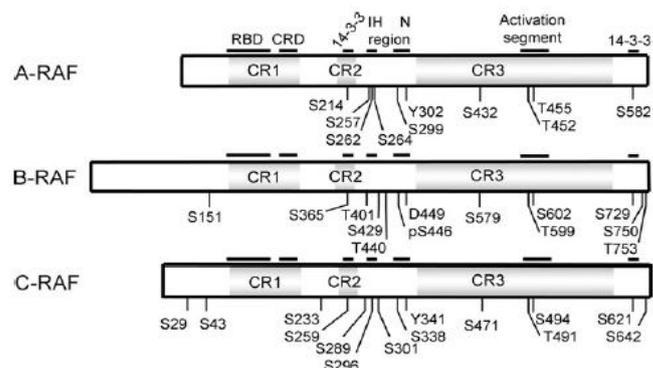


Figura 7. Organización de las quinasas Raf. CR1, CR2 y CR3 indican la localización de las tres regiones conservadas, siendo CR3 la región encargada de la activación. Se muestra la numeración de los distintos sitios de fosforilación serina (S), treonina (T) y tirosina (Y), así como el sitio de unión de la proteína 14-3-3 en la región C-terminal (Roskoski, 2010).

Raf-1 permanece en una conformación inactiva por medio de la interacción de la proteína 14-3-3 con los residuos fosforilados Ser259 y Ser621. Al producirse el estímulo mitogénico, Ras y PPP2R1A actúan cooperativamente en la activación de la quinasa a través de la fosforilación en los residuos Ser338, Tyr341, Thr491 y Ser494.

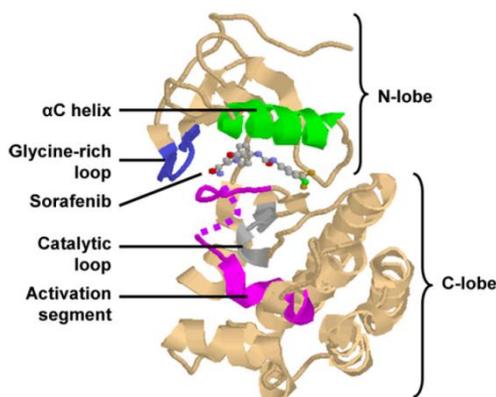


Figura 8. Estructura de b-Raf humana unida al inhibidor sorafenib (PDB 1UWH). Se muestra parte del segmento de activación que enlaza el dominio N-terminal (superior) y el C-terminal (inferior). El lazo rico en glicina, responsable de la unión a ATP, se muestra en el dominio N-terminal. El sitio catalítico permanece unido a sorafenib, un inhibidor competitivo del ATP, aprobado por la FDA para el tratamiento de cáncer avanzado de riñón e hígado. La conformación de determinados segmentos de la hélice α puede variar, como es el caso de la hélice α C en el lóbulo pequeño (Roskoski, 2010).

El dominio proteína quinasa está formado por un primer lóbulo N-terminal pequeño, constituido por una lámina β antiparalela y cuya función consiste en la orientación y disposición del ATP por medio de un lazo rico en residuos de glicina. Por otro lado, este dominio conservado posee un segundo lóbulo C-terminal grande, que dirige la interacción con MEK1/2.

El sitio catalítico se encuentra localizado entre ambos lóbulos. El grado de apertura y disponibilidad del sitio catalítico viene determinado por la disposición de estos lóbulos. La forma abierta permite la entrada de ATP y la liberación de ADP del sitio activo. La forma cerrada aproxima espacialmente residuos responsables de la catálisis.

1.3.2 Papel de Raf en el desarrollo de cáncer

Las proteínas Raf también se relacionan con procesos oncogénicos. En concreto, c-Raf es la forma predominante en mediar la proliferación en cáncer de ovario, metástasis en cáncer de próstata, además de lograr la desregulación en la expresión de genes supresores como p53 (Leicht et al., 2007). A su vez, la sobreexpresión de c-Raf en un entorno determinado puede inducir su potencial oncogénico. Esta proteína se encuentra sobreexpresada en las tumorigénesis de pulmón, hígado o próstata.

Sin embargo, es b-Raf la que se encuentra desregulada en la mayor parte de los cánceres humanos, resultando en el 66% de los melanomas (Davies et al, 2002). También se asocia a carcinomas de colon, glándula tiroide y tracto biliar. La mayoría de las mutaciones afectan al dominio quinasa de Raf, localizado en los exones 11 y 15, y modifican los residuos que estabilizan a la quinasa en la forma inactiva. Se han descrito más de 100 mutaciones en Raf, siendo V600E la de mayor prevalencia, responsable de hasta el 44% de los casos de melanoma (Matallanas et al., 2011). La mutación D594V es la más asociada a la prevalencia de cáncer y da lugar a la alteración de la actividad quinasa de la proteína (Wan et al., 2004). En el caso de a-Raf, los niveles elevados de proteína están asociados a carcinomas escamosos de cabeza y cuello, así como carcinomas de colon.

Actualmente, Raf es considerada una importante diana terapéutica en el tratamiento del cáncer, a través del desarrollo de inhibidores de su actividad quinasa, oligonucleótidos que reduzcan su nivel de expresión o péptidos que eviten su interacción con Ras.

1.4 Estudios previos de interacción Ras-Raf

La interacción con Raf-1 requiere de la conversión de Ras de su estado inactivo unido a GDP a uno activo unido a GTP, lo que contribuye a que la quinasa pueda ser reclutada hasta la membrana plasmática y ser posicionada de forma óptima para su activación. Esta interacción resulta bastante compleja y el mecanismo de activación de Raf-1 puede implicar también a una colección de proteínas adicionales independiente de Ras.

Esta unión se produce a través del dominio de unión a Ras (RBD) contenido en los residuos 51-131 de Raf-1. La estructura de RBD de Raf-1 se ha elucidado por RMN y se muestra en la Figura 9. Consiste en una lámina β de 5 hojas, una hélice α de 12 residuos y un codo o giro adicional (Emerson, 1996). Actualmente, se han catalogado más de 90 proteínas humanas que contienen el RBD (Patel y Côte, 2013), incluyendo las quinasas PI3K y los reguladores de la señalización por proteínas G (RGS).



Figura 9. Dominio de unión a Ras (RBD) de c-Raf-1 (PDB 1RFA). Estructura del RBD de c-Raf-1 humano en solución, descrito mediante resonancia magnética nuclear (RMN). El RBD comprende la secuencia de aminoácidos del CR1 de c- Raf [51-131] (Emerson, 1996).

La asociación del RBD con Ras es una interacción de elevada afinidad ($K_D = 20$ nM) mediada inicialmente por los residuos Gln66, Lys84 y Arg89 de Raf-1 (Morrison y Cutler, 1997) (Block et al., 1996). Raf-1 interactúa de manera diferencial con los distintos componentes de la subfamilia Ras a través del residuo Lys84. Los RBDs de todas las proteínas efectoras de Ras comparten un plegamiento común y se unen al mismo epítipo en Ras. Además, los complejos Ras-RBD se forman a través de una hoja β antiparalela entre $\beta 1$ y $\beta 2$ del RBD y $\beta 2$ y $\beta 3$ de Ras, como se puede observar en la Figura 10.

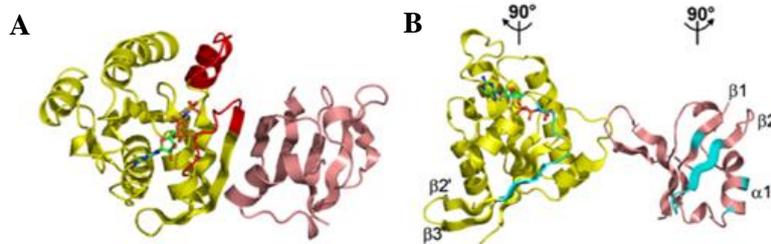


Figura 10. Interacciones Ras-Raf. (A) Complejo formado entre Raps, un análogo de Ras (amarillo), unido a GTP, y Raf (rosa) a partir de la estructura cristalina (PDB 1GUA), mostrándose las regiones de *switch I* y *switch II* en rojo. (B) Raps^{GTP} y Raf se han girado 90° para exponer las interfaces de unión entre ambas proteínas (azul) (Filchtinski et al., 2010).

Drugan et al (1996) realizaron un estudio *in vitro* que demostró cómo los residuos 51 al 131 de Raf-1, correspondientes al RBD, interactúan con los residuos 33 al 41 de la región efectora de Ras. Además, mutaciones alejadas del RBD dan como resultado una interacción débil y una interrupción en la señalización mediada por Ras, sugiriendo que otros elementos de reconocimiento podrían estar involucrados. Esto se corresponde con el dominio rico en cisteínas de Raf-1 (residuos 139-184) que interactúa con Ras tanto *in vitro* como *in vivo*. Mutaciones en esta región reducen la interacción Ras-Raf-1 hasta en un 55% y la actividad quinasa de Raf-1 en un 60-90% (Chow, 1995).

El modelo de activación de Raf descrito por Morrison y Cutler (1997) y estudiado posteriormente por Baccharini (2005) postula que, inicialmente, el estado inactivado de esta proteína viene determinado por la interacción entre su dominio N-terminal y el dominio quinasa, anulando así la actividad catalítica de la enzima. Esta autoinhibición intramolecular viene favorecida por 14-3-3, que se une al residuo fosforilado Ser459 y oculta al dominio rico en cisteínas (CRD), además de por la chaperona hsp90 y p50.

Al activarse Ras mediante su unión a GTP, se produce un cambio conformacional en las regiones *switch I* y *switch II*, hecho de vital importancia en la interacción con sus efectores (Patel y Côté, 2013). La fosfatasa PP2A también contribuye en la activación de la quinasa a través de la defosforilación del sitio inhibidor Ser259, que permite el reclutamiento de Raf en la membrana y su unión a Ras^{GTP}. Así pues, el dominio RBD de Raf-1 se une a Ras, lo que desplaza a 14-3-3 y hace accesible al CRD.

La unión del RBD y del CRD a Ras resulta en la fosforilación de los residuos activadores en el dominio quinasa (CR3), favoreciendo un cambio de conformación de Raf-1 que expone el dominio CR3. En esta condición, 14-3-3, que también posee función activadora, podría interactuar con el sitio Ser621 para estabilizar la conformación abierta de Raf-1. La inactivación de Raf-1 se basa en la actividad de ERK y PKB.

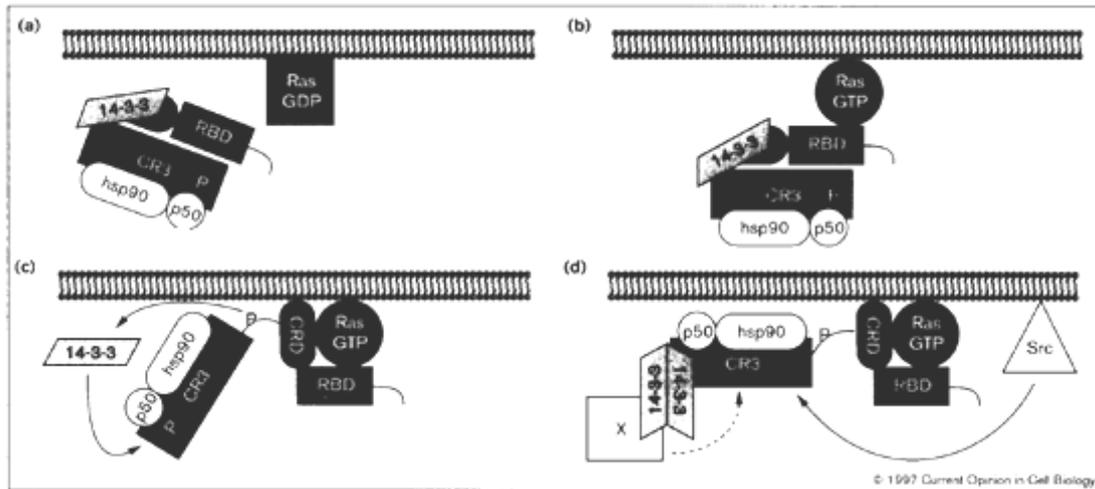


Figura 11. Modelo de activación de Raf-1. (a) Raf en estado inactivo. (b) Interacción inicial a través del RBD. (c) Unión del CRD y posterior apertura de la conformación de Raf para permitir el acceso del CR3. (d) Fosforilación del dominio CR3 (Morrison y Cutler, 1997).

Probablemente el estudio más relevante sea el de Filchtinski et al (2010) que señala, por una parte, que la especificidad en la interacción y la afinidad de unión de Ras^{GTP} y Raf-1 viene determinada por la flexibilidad de la región del *switch I*, y no por el tipo de nucleótido unido. La interacción previa entre SOS y Ras induciría un movimiento de esta región que dejaría disponible el sitio de unión a nucleótidos. Por otra parte, los resultados de este trabajo muestran cómo la flexibilidad de la región del *switch I* es mayor en la forma Ras unida a GDP. En la forma unida a GTP, Ras puede interactuar con varios RBD con constantes de disociación alrededor de 0,1-3 μM . Sin embargo, en el estado unido a GDP, la afinidad entre estas dos proteínas se ve reducida hasta 1000 veces.

En conclusión, el estudio de la ruta de señalización Ras/Raf/MEK/ERK resulta de vital importancia, no sólo en la comprensión de la activación de las diferentes proteínas implicadas, sino también en el establecimiento de nuevas dianas moleculares para el tratamiento del cáncer. Mientras que la estructura cristalográfica del complejo ya ha sido descrita para H-Ras y Raf-1 (PDB 4G0N), así como para diferentes análogos, poco se conoce acerca de K-Ras. La descripción estructural y biofísica del modo de unión entre K-Ras y Raf-1 supondría un avance innovador en el desarrollo de inhibidores de su interacción en los casos en que Ras fuera oncogénica.

2. OBJETIVOS

Dada la importancia de la ruta de señalización por MAP kinasas en la proliferación y diferenciación celular, y el papel de su desregulación en el desarrollo de procesos carcinogénicos, resulta de especial interés conocer a fondo cómo ocurre la interacción entre Ras y su efector, Raf, con tal de poder desarrollar nuevas estrategias terapéuticas, como el diseño de péptidos que podrían utilizarse como fármacos anticancerígenos, actuando en la diana de esta interacción.

Por ello, la finalidad de este trabajo será estudiar el modo de interacción entre K-Ras y Raf-1, para lo cual se recurrirá a técnicas de clonaje mediante el empleo de etiquetas, sobreexpresión en procariontes y purificación por cromatografía líquida.

La caracterización y el estudio de la unión se llevarán a cabo mediante pruebas de afinidad como el *pull-down* o a través de técnicas biofísicas como la calorimetría isotérmica de titulación (ITC).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Para realizar el estudio del modo de interacción entre las proteínas K-Ras y Raf-1, se emplearon diversas técnicas de ingeniería genética, microbiológicas, bioquímicas, cromatográficas y biofísicas que se describen a continuación.

3.1 K-Ras

3.1.1 Clonaje

La finalidad de la síntesis de K-Ras como proteína recombinante será obtener una proteína que facilite los análisis de sobreexpresión, purificación y posterior interacción con Raf-1. Para ello, se trabajó con la isoforma B de K-Ras. La secuencia codificante del gen KRAS tiene una longitud de 564 pb, que se traduce en una proteína de 188 aminoácidos, con peso molecular de 21 kDa y punto isoelectrico aproximado de 8,24.

En este trabajo se partió de los insertos codificantes tanto para el tipo silvestre humano (WT) de K-Ras isoforma B como para el mutante (V12), ligados en vectores pBabe y procedentes del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) de Madrid.

Inicialmente, se amplificaron las regiones correspondientes a dichos insertos por PCR, partiendo de las condiciones mostradas en la Tabla 2 del Anexo I. La secuencia de pares de bases de los oligonucleótidos empleados (Sigma- Aldrich[®]) se representa en el Anexo II. Dichos oligonucleótidos se diseñaron para llevar a cabo la estrategia de clonación LIC (*ligation independent cloning*).

El principio de ligación por LIC consiste en un sistema de clonaje en el cual no se emplean enzimas de restricción ni ligasas y que confía en la actividad de la T4 DNA polimerasa, la cual cataliza la síntesis de DNA de 5' → 3', mientras que tiene actividad exonucleasa de 3' → 5'. De esta forma, se generan extremos cohesivos que favorecen la ligación de vector e inserto (Figura 12).

Se preparó un gel de agarosa (Pronadisa[®]) al 1%, utilizando tampón TAE 1X y añadiéndole 2,5 µL de GelRed (Biotium[®]). Se tomaron 5 µL de producto de PCR, además de 2 µL de Blue 6X Loading Dye. El marcador de pesos moleculares fue DNA Ladder 1 kb (Nippon[®]) y se cargaron 3 µL. El gel se sometió a 100V en una cubeta de electroforesis Biostep[®] durante al menos 20 minutos. Tras verificar la amplificación correcta del DNA, se purificaron los productos de PCR con el kit E.Z.N.A[®] Cycle-Pure Kit (Omega Bio-Tek, Inc.).

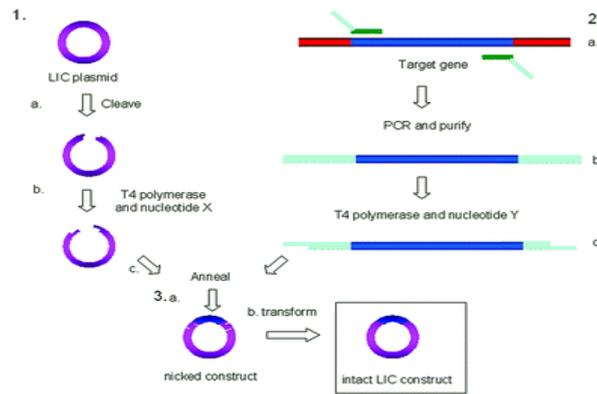


Figura 12. Ligation independent cloning (LIC). La estrategia de ligación por el método LIC comienza con la digestión del vector recombinante con una enzima de restricción (1a) y su tratamiento posterior con la T4 polimerasa, añadiendo el nucleótido dTTP (1b) para generar los extremos cohesivos que ligarán con el inserto. El inserto, resultado de la amplificación con cebadores diseñados para llevar a cabo la estrategia por LIC (2a), es purificado (2b) y tratado con la T4 polimerasa y con el nucleótido dATP (2c). Se produce la ligación de vector e inserto (3a), y este vector recombinante es transformado en el sistema correspondiente (3b) (Bonsor et al., 2006).

Posteriormente, los vectores recombinantes empleados en este estudio se linealizaron mediante la digestión con la enzima de restricción KpnI (New England Biolabs®), incubando durante 2 horas en termobloque Thermomixer comfort (Eppendorf®) a 37°C en la siguiente mezcla de digestión: 27 µL de vector, 2 µL KpnI (New England Biolabs®); 3,5 µL buffer 1 (New England Biolabs®); 0,35 µL BSA y 2,15 µL H₂O.

Los vectores utilizados en este trabajo se conocen como pNKI, pNSI y pMBKI, cuyos productos proteicos presentan una etiqueta escindible con la proteasa 3C. El vector pNKI procede del *Netherlands Cancer Institute*, mientras que los vectores pNSI y pMBKI fueron generados en laboratorio. El esquema de estos vectores se muestra en la Figura 13.

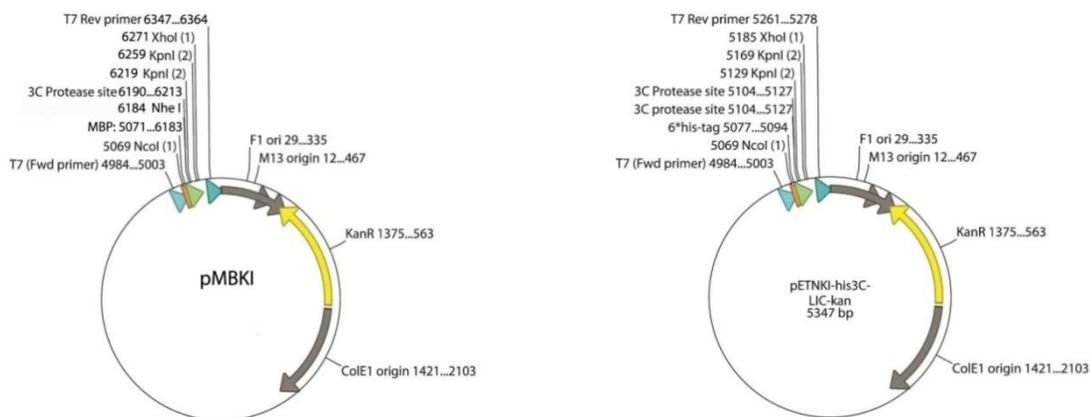


Figura 13. Esquema de los vectores pMBKI y pETNKI. Se muestran los sitios de unión de los cebadores, así como el sitio de corte de la proteasa 3C y los sitios de corte de las enzimas de restricción XhoI, KpnI y NcoI.

El vector pMBKI, empleado en los ensayos de clonaje, posee resistencia a kanamicina y codifica para la etiqueta MBP (*Maltose Binding Protein*). El vector pETNKI (NKI) tiene resistencia a kanamicina y, al igual que el vector pNSI, codifica para la etiqueta N-terminal de 6 histidinas (Figura 14). Sin embargo, la resistencia de pNSI es a espectinomomicina.

Los productos de PCR se visualizaron mediante un gel de agarosa al 1%. Se inocularon cultivos de 5 mL de caldo LB con 5 μ L de kanamicina 33 μ g/mL o espectinomicina 100 μ g/mL para las colonias que resultaron positivas: K-Ras WT H en pNSI y pMBKI, y V12 en pMBKI.

A partir de estos cultivos, se extrajeron los plásmidos mediante el kit de minipreps (Epoch Life Science, Inc.), se midieron los valores de concentración en ng/ μ L mediante Nanodrop y se mandaron 5 μ L de cada muestra a secuenciar al Servicio de Secuenciación del Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC).

Las secuencias obtenidas se analizaron mediante el programa informático ApE v.2.0.36 y se comprobó qué plásmidos presentaban el inserto deseado. Para esto, el programa permite identificar los ORF de la secuencia y seleccionar aquel correspondiente con el inserto de K-Ras. Una vez definido este ORF, se comparó la secuencia de pares de bases de la muestra con la secuencia del Uniprot de K-Ras (P01116), confirmando así el alineamiento completo y la mutación de cambio de glicina por valina en el residuo 12 para el fenotipo mutado.

3.1.2 Estudios de expresión a pequeña escala

El vector recombinante con el inserto K-Ras WT o V12 se transformó por choque térmico en células competentes químicamente de la cepa BL21 (para el vector pNSI) o BL21 codon plus (para los vectores pMBKI o pNKI), ambas cepas de *E.coli* (Stratagene[®]). El protocolo de dicha transformación es similar al anteriormente mostrado, a excepción de que el tiempo de incubación para el choque térmico es de 30 segundos para BL21 y 45 segundos para BL21 codon plus, añadiendo inicialmente 0,5- 1 μ L de DNA plasmídico de la miniprep. Tras la hora de incubación a 37°C en agitación, se sembró en una placa Petri con agar LB (Pronadisa[®]) y espectinomicina 100 μ g/mL (BL21) o kanamicina y cloranfenicol (BL21C⁺) a una concentración de 16,5 μ g/mL cada antibiótico (Sigma- Aldrich[®]). Se incubó a 37°C durante 24 horas.

A partir de una colonia crecida en cada placa, se inocularon cultivos de 10 mL de caldo LB (Pronadisa[®]) con 10 μ L de espectinomicina (pNSI) a 100 μ g/mL o kanamicina y cloranfenicol (pMBKI, pNKI) a 33 μ g/mL cada uno. Estos precultivos se incubaron a 37°C en agitación a 180 rpm hasta que se alcanzó una OD₆₀₀ de 0,6. Se añadió 1 mM de IPTG (isopropil - β - D - tiogalactopiranosido, CalBiochem[®]) para inducir la sobreexpresión y se incubó a 20 °C en agitación a 180 rpm durante toda la noche. El IPTG es un análogo de la alolactosa que induce la transcripción del operón *lac* en bacterias y, por consiguiente, la expresión de la proteína recombinante de interés. Posteriormente, se centrifugaron los cultivos en la centrífuga Sorvall ST16R, con el rotor 75003629 a 4000 rpm durante al menos 10 minutos.

Los ensayos por *beads* de agarosa permiten la purificación de proteínas recombinantes solubles, en donde interviene una matriz formada por partículas covalentemente ligadas bien a iones níquel (Ni-NTA) y a las que se unen los residuos de la etiqueta de polihistidinas, bien a amilosa, las cuales permiten el aislamiento de proteínas de fusión conjugadas a MBP.

El protocolo seguido comenzó resuspendiendo cada uno de los precipitados de los cultivos en 300 μ L de tampón de lisis (Hepes 20 mM, glicerol 10%, tritón 0,5%, NaCl 300 mM, Imidazol 20 mM, PMSF 1 mM). Tras esto se añadieron 90 μ L de reactivo Fast Break Cell Lysis (Promega[®]), incubándose en termobloque Thermomixer comfort (Eppendorf[®]) con agitación a

450 rpm a 20°C durante 30 minutos. Puesto que este reactivo disminuyó su eficacia en usos posteriores, también se recurrió a la disgregación de las membranas celulares empleando el bioruptor Standard B01010005 (Diagenode®) a 4°C durante 30 minutos, 5 ciclos a modo 30 segundos ON - 30 segundos OFF.

Pasado este periodo, se centrifugó 30 minutos a 14800g a 4°C con centrífuga Sorvall Legend micro 21R (Thermo Scientific®). Las partículas de agarosa se lavaron con 1 mL de agua MilliQ y con el mismo volumen de tampón A (Tris 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, MgCl₂ 5 mM). El sobrenadante de la centrifugación se mezcló con estas partículas, incubándose durante al menos 15 minutos en agitación en cámara fría. Los precipitados se emplearon como control del ensayo, por lo que se resuspendieron en 300 µL de agua MilliQ y se incubaron en termobloque a 95°C para facilitar su disgregación. Se centrifugaron los tubos de 1,5 mL con la proteína de fusión unida a las *beads* a 3000g durante 1 minuto en la centrífuga Sorvall 21R y se retiró el sobrenadante, que se empleó como control. A continuación, se realizaron tres lavados de 1 mL de tampón A, los cuales se centrifugaron bajo las mismas condiciones. Por último, se añadieron 100 µL de tampón B (Tris 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, MgCl₂ 5 mM, Imidazol 200 mM), lo que permitió la separación de la proteína recombinante de las partículas y su elución en el sobrenadante.

Los ensayos mediante *pull-down* que se realizaron también en este trabajo tenían un protocolo prácticamente idéntico al seguido para el de *beads* con una única proteína. Se emplearon partículas unidas a níquel, de forma que se añadió en primer lugar Raf-1 con la etiqueta de 6 histidinas, seguido de un lavado con tampón A y la adición de K-Ras en con el *tag* MBP. Las etiquetas de ambas proteínas debían ser diferentes para comprobar su interacción física, garantizando que sólo una de ellas se uniese a las partículas. Los controles, en este caso, se tomaron del precipitado descartado, del sobrenadante previa adición de la segunda proteína, del segundo sobrenadante tras añadirse y de la elución del complejo.

Tras la adición de tampón B, se prepararon como controles las muestras correspondientes al precipitado, el sobrenadante, los tres lavados con tampón A y la elución de la proteína. Para ello, se tomaron 30 µL de cada una y se añadieron 10 µL de tinción SDS-PAGE 6X, hirviéndolas en termobloque a 95°C durante 15 minutos. Se cargaron 10 µL de cada una de estas preparaciones en un gel de poliacrilamida al 15%, junto con 2 µL de marcador de pesos moleculares Blue Star Prestained Protein Marker (Nippon®). El gel se sometió a 200V en una cubeta Mini-Protean tetra electrophoresis cell (Biorad®) durante 40 minutos. Una vez finalizado, el gel se tiñó con solución de tinción de azul de Coomassie con metanol (1g Azul de Coomassie, 400 mL metanol, 100 mL ácido acético glacial y enrasada a 1 L con H₂O destilada). Posteriormente se destiñó con solución de destinción de azul de Coomassie (10% metanol, 10% ácido acético glacial, 80% de H₂O) hasta que se distinguió el patrón de bandas. La confirmación de la presencia de proteína purificada en el gel permitió continuar con los experimentos de expresión en procariontes a gran escala.

3.1.3 Sobreexpresión a gran escala en procariontes

Debido a la eficiencia y calidad de la purificación mostrada en otros experimentos llevados a cabo en el laboratorio utilizando el vector pNSI, se decidió continuar con la construcción cuyo inserto era la secuencia completa de K-Ras tipo silvestre humana (K-Ras WT H en pNSI).

Inicialmente se optó por sobreexpresar la proteína mediante el método de autoinducción en medio ZY, el cual proporciona elevada densidad celular y rendimiento de expresión de proteínas recombinantes. Este método de expresión se optimizó a partir del protocolo propuesto por Studier (2005), quien describe la composición de un medio de crecimiento formado por una mezcla de fuentes de carbono: glucosa y lactosa. No es necesario añadir compuestos inductores, pues este sistema viene regulado por el balance entre ambos metabolitos.

Así pues, se prepararon 20 mL de precultivo a partir de 18,54 mL ZY, 20 μ L 1M $MgSO_4$, 400 μ L glucosa 40%, 1 mL NPS 20X y 20 μ L antibiótico (espectinomina, concentración final de 100 μ g/mL) y se inoculó a partir de un glicerinado de esta construcción. Se incubó a 37°C durante 16 horas en agitación a 180 rpm. Posteriormente, se inocularon 10 mL de este precultivo en 480 mL de caldo ZY con 1 mL de $MgSO_4$, 20 mL de 5052, 50 mL de NPS 20X y 1 mL de espectinomina (concentración final de 100 μ g/mL) y se dejó incubando a 37°C en agitación a 180 rpm durante 3 horas, hasta que se alcanzó una OD_{600} aproximada de 1.

La absorbancia se midió con un densitómetro celular Ultrospec 10 (Amersham Biosciences®). Tras esto, se incubó el cultivo a 20°C y en agitación a 180 rpm hasta el día siguiente, favoreciendo así la sobreexpresión de la proteína recombinante.

Como se comprobó más adelante, el nivel de expresión de K-Ras no era suficiente en medio ZY, por lo que se optó por sobreexpresarla en medio LB. En este caso, el precultivo se preparó a partir de 50 mL de medio LB al que se añadieron 50 μ L de antibiótico (espectinomina, concentración final de 100 μ g/mL) y el inóculo a partir del glicerinado. Se dejó incubando 16 horas a 37°C y en agitación a 180 rpm. Al día siguiente se inoculó este precultivo en 950 mL de caldo LB con 1 mL de espectinomina (concentración final de 100 μ g/mL) y se incubó a 37°C en agitación a 180 rpm durante 1 hora 45 minutos. Se midió la OD_{600} mediante el densitómetro celular Ultrospec 10, obteniendo valores en torno a 0,6. Entonces, se indujo la sobreexpresión de K-Ras añadiendo 1 mM de IPTG y se incubó el cultivo a 20°C en agitación a 180 rpm durante toda la noche.

La manera de recogida de los precipitados de células es idéntica tanto para células cultivadas en medio ZY como en medio LB. Los cultivos se centrifugaron en una centrífuga Beckman coulter J6-HC, con el rotor JS-4.2A a 4°C, a 3600 rpm durante 1 hora.

Tras esto, se desecharon los sobrenadantes y se resuspendió el precipitado en 40 mL de PBS 1X ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 80 mM, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 20 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4). La suspensión se transfirió a un tubo de 50 mL y se centrifugó en un equipo Sorvall ST16R con el rotor 75003629 a 4°C, 4000 rpm durante 20 minutos. Se eliminaron los sobrenadantes y se congelaron los precipitados a -20°C. Estos precipitados se utilizaron posteriormente en el protocolo de purificación de proteínas.

La purificación debe tratar de aislar la proteína recombinante de interés del resto de moléculas presentes en la suspensión bacteriana de partida. Para ello, la estrategia adoptada en este trabajo fue emplear en primer lugar la cromatografía líquida de afinidad en metal inmovilizado (IMAC) con tal de lograr mayores niveles de especificidad, purificación y concentración de K-Ras, seguida de una segunda purificación a través de la cromatografía de exclusión molecular, separándola de otros contaminantes por diferencia de peso molecular.

3.1.4 Purificación por FPLC con columna quelante de níquel

La cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC) se fundamenta en las interacciones específicas que se producen entre un ligando químicamente inmovilizado en un soporte sólido y una etiqueta presente en la proteína recombinante que se desea purificar. La etiqueta de 6 histidinas se ha convertido en uno de los *tags* más empleados en cromatografía líquida de afinidad, gracias a su pequeño tamaño y fuerte unión al níquel de la columna sin alterar la conformación de la estructura proteica.

La purificación de K-Ras WT H se realizó a partir del precipitado o *pellet* obtenido tras la sobreexpresión en medio LB y congelado a -20°C. Como se ha descrito previamente, esta sobreexpresión se realizó primero en medio ZY pero, al comprobar que el nivel de proteína purificada era mínimo, se llevó a cabo una nueva sobreexpresión en medio LB.

Se descongeló el precipitado en hielo y se resuspendió en 50 mL de tampón A (Tris 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, MgCl₂ 5 mM) (Maurer et al., 2012) con 500 µL de Tritón X100 y media pastilla de inhibidores de proteasas *complete EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets* (Roche®). El precipitado disuelto se sonicó durante 15 minutos, con el sonicador Bioblock scientific Vibra Cell 75042 a modo 1 segundo ON - 1 segundo OFF. El sonicado se depositó en tubos y se centrifugó a 17000 rpm a 4°C durante 40 min con un equipo Sorvall RC6 (Thermo Scientific®), empleando el rotor SS-34.

El sobrenadante obtenido se pasó a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm de diámetro a un tubo de 50 mL, cargándose posteriormente en una columna Nickel Affinity Cartridge de 5 mL (ABT Agarose Beads Technologies®) con la ayuda de una bomba peristáltica Gilson Minipuls 3. La columna fue previamente acondicionada con un primer lavado con agua MilliQ y un segundo con tampón A, pasando a través de ella 5 volúmenes de columna en cada lavado.

Tras pasar toda la solución proteica por la columna, ésta se colocó en el equipo Äkta Purifier, el cual se acondicionó previamente para el análisis mediante el lavado de las bombas y el sistema con agua MilliQ, en primer lugar, y con las soluciones tampón A y B, en segundo lugar.

Inicialmente se lavó la columna con solución tampón A, recogiendo aproximadamente 50 mL de flujo saliente del lavado. Tras esto, se eluyó el contenido de la columna con un gradiente de la solución tampón B (Tris 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, MgCl₂ 5 mM e Imidazol 200 mM), a 3 mL/min durante 20 minutos, obteniendo el eluido en fracciones de 5 mL.

Se tomaron como controles una muestra del *pellet* descartado, otra de la fracción no retenida (*flow-through*) al cargar la muestra en la columna empleando la bomba peristáltica, además del lavado de la columna con tampón A. Estos tres controles se analizaron posteriormente en un gel de electroforesis. En el caso de la muestra del precipitado, se tomó en primer lugar una pequeña cantidad del mismo y se eluyó en 100 µL de agua MilliQ, dejándolo más tiempo en el termobloque a 95°C para garantizar su disgregación.

Se seleccionaron las fracciones para las cuales se obtuvo un pico en el cromatograma, y se cargaron en un gel de poliacrilamida del 15%, junto con los controles recogidos durante el proceso de purificación. El tampón de electroforesis fue NuPAGE® MES 1X (Invitrogen®).

Las muestras cargadas en el gel se prepararon tomando 30 μL de cada control o fracción, añadiéndole 10 μL de tinción SDS-PAGE 6X e hirviendo las muestras en termobloque a 95°C durante 10 minutos.

En el gel se cargaron 10 μL de estos preparados. El marcador de pesos moleculares utilizado fue Blue Star Prestained Protein Marker (Nippon®) y se añadieron 2 μL . El gel se sometió a 200V en la cubeta Mini-Protean tetra electrophoresis cell (Biorad®) durante 40 minutos. Una vez finalizado, el gel se tiñó durante 5 minutos con solución de tinción de azul de Coomassie con metanol (1g Azul de Coomassie, 400 mL metanol, 100 mL ácido acético glacial y enrasada a 1 L con H₂O destilada) seguido de la destinción (10% metanol, 10% ácido acético glacial, 80% de H₂O), hasta que se distinguió el patrón de bandas, tanto del marcador como de las fracciones, de forma nítida.

A partir de los resultados del gel de electroforesis, se concentraron las fracciones que indicaban la presencia de proteína purificada, depositándolas en un concentrador Amicon® Ultracel 3K, el cual se centrifugó en la centrífuga Eppendorf Sorvall ST16R a 4000 rpm y 4°C hasta obtener un volumen de concentrado de aproximadamente 2 mL.

3.1.5 Purificación por cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular (*gel filtration*) emplea una resina porosa para separar las moléculas basadas en su tamaño. Se consigue descartar cualquier contaminante de peso molecular diferente mantenido en la primera purificación, obteniendo como resultado una proteína totalmente pura para estudios de interacción y cristalización.

Esta segunda purificación partió del concentrado anterior, llevándose a cabo con el sistema Äkta Prime, utilizando una columna Superdex 200 16/60 (Pharmacia biotech®). La solución tampón de exclusión molecular empleada estaba compuesta por Tris 25 mM pH 8, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM y TCEP 1 mM (tris (2- carboxietil) fosfina).

El sistema se lavó previamente con el tampón de exclusión, aplicando el programa de lavado. También se lavó el *loop* de entrada de la muestra con 10 mL de tampón. Así pues, se inyectaron en el sistema 2 mL del concentrado de la proteína purificada en columna de níquel y se aplicó un programa de separación de fracciones de 5 mL, con un flujo de 0,5 mL/min. La elución se realizó en 1,5 volúmenes de columna (180 mL). Se tomaron las fracciones para las cuales se observó un pico en el cromatograma correspondiente al volumen de elución de K-Ras, en torno a 90 mL, y se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida del 15%, previa preparación de las muestras tomando 30 μL de cada fracción, añadiendo 10 μL de tinción SDS-PAGE 6X e hirviendo las muestras en termobloque a 95°C durante 10 minutos.

Las fracciones que presentaban una banda correspondiente al peso molecular de K-Ras (aproximadamente 24 kDa, considerando el peso molecular de la proteína, los 6 residuos histidina de la etiqueta y el sitio de corte de la proteasa 3C) en el gel de poliacrilamida se concentraron en otro concentrador Amicon® Ultracel 3K, hasta obtener un volumen inferior a 250 μL . Se calculó la concentración de proteína pura utilizando un reactivo basado en el método de Bradford (Biorad® *Protein assay dye reagent concentrate*) e interpolando el valor de concentración obtenido del valor de absorbancia de la muestra en la recta de calibrado realizada a partir de las medidas de absorbancia de valores conocidos de BSA.

Finalmente, se distribuyó el volumen de proteína pura y concentrada en alícuotas de 50 μL , se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C .

3.2. Raf-1

Los protocolos empleados en los estudios de clonaje, expresión y purificación de Raf-1 son prácticamente idénticos a los de K-Ras. Por tanto, en los siguientes apartados se destacarán diferencias significativas, así como algunas puntualizaciones relevantes.

3.2.1 Clonaje

El material de partida cedido por el CNIO (Madrid) consistía en el vector recombinante pFAST-BAC con resistencia a ampicilina y el inserto que codificaba para la secuencia completa de Raf-1. Puesto que en este vector no alcanza niveles significativos de expresión, la estrategia adoptada fue la de amplificar únicamente la región del inserto codificante para Raf-1, con el objetivo de introducirla en otros vectores de expresión.

Se diseñaron diferentes construcciones de Raf-1 mediante el uso combinado de pares de cebadores en la PCR, partiendo del molde de DNA presente en el vector recombinante pFAST-BAC. Los cuatro fragmentos que se deseaban obtener eran c-Raf [1-131], c-Raf [51-131], c-Raf [1-140] y c-Raf [51-140], que delimitaban regiones concretas de la estructura aminoacídica de Raf-1. c-Raf [51-131] se corresponde con el dominio de unión a Ras (RBD), mientras que las otras construcciones incluían aminoácidos añadidos en el extremo N- o C- terminal que podrían colaborar en la interacción con K-Ras.

Las condiciones de la PCR, así como la mezcla de la reacción se muestran en la Tabla 4 del Anexo I. Las secuencias de pares de bases de los oligonucleótidos diseñados para Raf-1 aparecen en el Anexo II.

Posteriormente, se preparó un gel de agarosa al 1% para verificar la correcta amplificación del inserto de Raf-1 para cada una de las construcciones, y los productos de la PCR se purificaron mediante el Kit E.Z.N.A.[®] Cycle-Pure (Omega Bio-Tek, Inc.), como ya se describió para la construcción original de K-Ras WT H.

El protocolo de tratamiento de vectores e insertos, así como el de ligación, es idéntico al seguido para K-Ras. Sin embargo, en este caso cabe destacar que se decidió emplear únicamente el vector pNSI con resistencia a espectinomicina, debido a la eficiencia mostrada en la sobreexpresión y purificación de K-Ras. La proteína recombinante producto de este vector presentaba la etiqueta de 6 histidinas, además del sitio de corte de la proteasa 3C, de acuerdo al esquema mostrado en la Figura 14.

El protocolo de transformación en DH5 α fue el mismo que el empleado para K-Ras, manteniendo el choque térmico a 42°C durante 1 minuto 30 segundos. La siembra se realizó en placa Petri con agar LB (Pronadisa[®]) y espectinomicina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sigma- Aldrich[®]).

La mezcla y condiciones de la PCR de colonia vienen recogidas en la Tabla 5 del Anexo I. Se esperaba obtener una banda de aproximadamente 489 pb para c-Raf [1-140], 462 pb para c-Raf [1-131], 336 pb para c-Raf [51-140] y 306 pb para c-Raf [51-131]. El patrón de bandas obtenido en el gel confirmó la presencia de DNA amplificado para todas las construcciones de Raf-1. Por tanto, se prepararon precultivos con 5 mL de LB y 5 μ L de antibiótico (espectinomicina 100 μ g/mL) empleando el inóculo de la placa de resiembra, e incubando a 37°C durante 24h.

En esta ocasión, para realizar las minipreps se siguió el protocolo del kit comercial E.Z.N.A™ Plasmid Miniprep Kit I (Omega®), para incrementar la eficiencia y lograr mayores niveles de obtención de DNA plasmídico.

Se mandaron 5 μ L de cada muestra a secuenciar al Servicio de Secuenciación del Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC), previa medición de los valores de concentración de DNA en ng/ μ L mediante Nanodrop y confirmación en gel de agarosa. Las secuencias obtenidas se analizaron mediante el programa bioinformático ApE v. 2.0.36 como se describió para K-Ras.

3.2.2 Estudios de expresión a pequeña escala

El protocolo de transformación bacteriana por choque térmico en células competentes químicamente de la cepa BL21 de *E.coli* es el mismo que el empleado para K-Ras WT H, con 30 segundos de choque térmico a 42°C para permitir la introducción del vector recombinante en la cepa y posterior siembra en placa Petri con agar LB (Pronadisa®) y espectinomicina 100 μ g/mL.

Los cultivos de Raf-1 para las distintas construcciones, preparados con 10 mL de LB y 10 μ L de espectinomicina 100 μ g/mL y el inóculo, se incubaron a 180 rpm y a 37°C al menos durante 8 horas. Se midió la OD₆₀₀ con un densitómetro celular Ultrospec 10 (Amersham Biosciences®), obteniendo valores en torno a 1,2, por lo que se realizaron una serie de diluciones hasta alcanzar un valor aproximado de 0,6. Se indujo la sobreexpresión de Raf-1 añadiendo 1 mM de IPTG (CalBiochem®), y se incubaron los cultivos a 20°C en agitación a 180 rpm durante toda la noche.

La purificación a pequeña escala de Raf-1 fue idéntica al protocolo de *beads* seguido para K-Ras WT H, empleando igual composición de los tampones A y B y partículas con quelante de níquel. Así, se analizó la presencia de proteína para el peso molecular correspondiente a las diferentes construcciones de Raf-1 en el gel de poliacrilamida al 15%, lo que permitió proseguir el estudio con la sobreexpresión a gran escala.

3.2.3 Sobreexpresión a gran escala en procariotas

Se decidió estudiar, en primer lugar, el modo de interacción de K-Ras de secuencia completa con el dominio de unión a Ras (RBD) de Raf-1. Por tanto, la finalidad de este apartado será explicar el protocolo de sobreexpresión centrándose en la construcción 51-131 de Raf-1, siendo idéntico para el resto de construcciones.

El inserto c-Raf [51-131] tiene un total de 306 pares de bases, mientras que la cadena proteica está compuesta por 102 aminoácidos, de peso molecular 11,27 kDa y punto isoeléctrico de 9,26. A la secuencia se le añadió una etiqueta de 6 residuos histidina en el extremo N-terminal, además del sitio de corte de la proteasa 3C, por lo que el peso total de la construcción fue de aproximadamente 15,27 kDa.

El procedimiento comenzó con la inoculación del glicerinado de la cepa de *E.coli* BL21 transformada en pNSI y que contenía la secuencia c-Raf [51-131] en un precultivo de 50 mL de LB con 50 µL de espectinomicina 100 µg/mL. Este cultivo se dejó incubando 37°C durante 16 horas en agitación a 180 rpm.

Posteriormente, se inoculó este precultivo en 950 mL de caldo LB con 1 mL de espectinomicina 100 µg/mL, incubándose a 37°C en agitación a 185 rpm durante 2 horas. Se midió la OD₆₀₀ con un densitómetro celular Ultrospec 10 (Amersham Biosciences®), hasta alcanzar aproximadamente un valor de 0,6, tras lo cual se indujo la sobreexpresión de la proteína recombinante mediante la adición de 1 mM de IPTG (CalBiochem®). Tras esto, se incubó durante 16 horas a 20°C en agitación a 180 rpm. El modo de obtención y lavado del precipitado fue el mismo que el descrito anteriormente.

El siguiente paso consistió en la purificación de la proteína, primero por cromatografía de afinidad, seguida de cromatografía por exclusión molecular, con el objeto de obtener una solución concentrada y pura de Raf-1.

3.2.4 Purificación por FPLC con columna quelante de níquel

El tampón A empleado en la resuspensión del precipitado de c-Raf [51-131] tenía la misma composición (Tris 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, MgCl₂ 5 mM) que el utilizado para K-Ras WT H, y se añadieron 50 mL junto con 500 µL de Tritón X100 y media pastilla de inhibidores de proteasas para la purificación de proteínas *complete EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets* (Roche®).

Se tomaron controles de muestras del precipitado, del sobrenadante cargado en la columna y de la fracción no retenida, además del flujo saliente del lavado de la columna con tampón A en el equipo Äkta Purifier.

c-Raf [51-131] eluyó en gradiente de tampón B (Tris 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, MgCl₂ 5 mM, Imidazol 200 mM) y las fracciones para las cuales se obtuvo banda del peso molecular correcto en el gel de poliacrilamida al 15% se concentraron mediante un concentrador Amicon® Ultracel 3K hasta un volumen de 2 mL.

3.2.5 Purificación por cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular en el equipo Äkta Prime se llevó a cabo utilizando la columna Superdex 200 16/60 (Pharmacia Biotech®). La solución tampón para exclusión molecular estaba compuesta de Tris 25 mM pH 8, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM y TCEP 1 mM, como se describió para K-Ras WT H.

Las fracciones para las cuales se obtuvo pico en el cromatograma se analizaron en el gel de poliacrilamida al 15% y, una vez se visualizó la banda indicando la presencia de c-Raf [51-131] purificada, se concentraron en otro concentrador Amicon® Ultracel 3K, hasta alcanzar un volumen en torno a 200 μL . La concentración de proteína pura se midió utilizando el método de Bradford (Biorad® *Protein assay dye reagent concentrate*) e interpolando valores en la recta de calibrado.

Por último, se distribuyó el volumen de proteína pura y concentrada en alícuotas de 50 μL , congelándose en nitrógeno líquido y almacenándose a -80°C , para ser empleada, junto con K-Ras WT H, en los ensayos de interacción proteína - proteína.

3.3. Estudio de la interacción entre K-Ras y Raf-1 por *Isothermal Titration Calorimetry* (ITC)

La calorimetría isoterma de titulación (en inglés, *Isothermal Titration Calorimetry*, ITC) es uno de los métodos más precisos para medir cuantitativamente las propiedades termodinámicas de la interacción proteína- proteína. De esta forma, en un único experimento se pueden obtener parámetros como la constante de asociación (K_a), estequiometría (n), entalpía de unión (ΔH_b), entropía (ΔS_b), y la constante de disociación (K_d) (Pierce et al., 1999).

Los equipos comerciales disponibles emplean tres diferentes técnicas de medida de los parámetros calorimétricos: (1) cambio de temperatura, (2) equilibrio térmico (*power compensation*) y (3) conducción térmica. El equipo Nano ITC (TA Instruments®) disponible en el laboratorio utiliza el método del equilibrio térmico. Este sistema se basa en el mantenimiento de una temperatura constante (isoterma) de la celda, a través del equilibrio entre su enfriamiento y aumento de temperatura por un controlador térmico. La señal resultante es una medida de la energía (μcal o μJ) aplicada al controlador térmico para mantener la temperatura constante de la celda en función del tiempo (segundos) (Freyer y Lewis, 2008).

El equipo Nano ITC (TA Instruments®) se compone básicamente de una celda, en la que se carga un volumen de 300 μL , y una bureta, que es el sistema de inyección compuesto por una jeringa en la que se cargan hasta 50 μL . Se decidió añadir a K-Ras en la celda, mientras que c-Raf [51-131] se dispuso en la bureta a una concentración de 20 μM y 500 μM , respectivamente.

La celda se lavó, en primer lugar, con 300 μL de Decon90 al 2%, dejándolo actuar durante 1 hora, y después con 2 L de agua MilliQ para asegurar que no quedaban restos del detergente. Se prepararon 100 μL de Raf-1 a 500 μM y 400 μL de K-Ras 20 μM a partir de las muestras obtenidas de la purificación. Además, se rellenó un tubo de 1,5 mL con el tampón utilizado en exclusión molecular, en el que se encontraban disueltas también las soluciones de ambas proteínas. Estas tres muestras se desgasificaron durante 7 minutos en el modelo de estación desgasificadora 6326 (TA Instruments®), tras lo cual se lavó la celda con 300 μL de tampón de exclusión molecular. La muestra desgasificada de K-Ras se dispuso en la celda, mientras que Raf-1 se inyectó en la bureta. Se programó el sistema para una temperatura de 8°C , volumen de 0,95 μL para la primera inyección y 1,96 μL para las 24 restantes. El intervalo de inyección era de 180 s, manteniendo una agitación de 300 rpm. Finalmente, los resultados obtenidos se analizaron mediante el software Nanoanalyze (TA Instruments®).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1 Purificación a pequeña escala con *beads* de agarosa

4.1.1 *Beads* de K-Ras y Raf-1

La purificación de proteínas mediante *beads* es equivalente a una cromatografía líquida de afinidad a pequeña escala. En este trabajo fue empleada para purificar proteínas recombinantes con etiqueta *His6 tag* a partir de precipitados celulares de 10 mL. Esta técnica se fundamenta en cuatro pasos - lisis celular, unión de la proteína, lavado y elución - que permiten la separación de la proteína recombinante de interés del resto de moléculas presentes en el lisado.

En el caso de K-Ras WT H, el vector empleado en la expresión fue pNSI, por lo que la proteína tenía la etiqueta de histidinas, y las partículas que debían utilizarse contenían iones níquel inmovilizados. Se tomaron como controles muestras del precipitado, sobrenadante, lavados y elución de la proteína añadiendo tampón con 200 mM de imidazol. El patrón de bandas obtenido se muestra en la Figura 15.

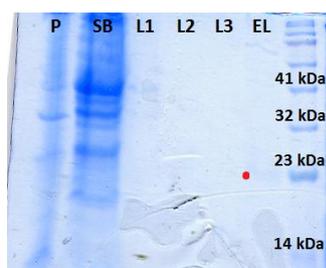


Figura 15. Gel de poliacrilamida del 15% de los controles de expresión de K-Ras humana tipo silvestre (K-Ras WT H). Las cinco primeras calles del gel se corresponden con las muestras del precipitado (P), sobrenadante (SB) y tres lavados con tampón A (L1, L2, L3), respectivamente. Se puede visualizar ligeramente una banda de aproximadamente 24 kDa para el sexto pocillo, correspondiente a la proteína eluida (EL) y marcada con un punto rojo a la izquierda de la banda.

La secuencia aminoacídica de K-Ras se asocia con un peso molecular de la proteína de 21, 425 kDa que, añadidos a los 3-4 kDa correspondientes a la etiqueta de los seis residuos histidina y al sitio de corte de la proteasa 3C, hace un total de aproximadamente 24 kDa. En el gel se puede observar una banda para este peso molecular, aunque su intensidad no es muy elevada. La presencia de esta banda en el control del sobrenadante indica que es soluble. Además, no se visualiza ninguna banda para los lavados, lo que indica que la proteína se ha eluido completamente y no existe exceso de proteína no unida a las partículas. Sin embargo, las condiciones de expresión deberían modificarse para lograr mayores niveles de K-Ras, y es por ello que se llevaron a cabo los experimentos de sobreexpresión en varias condiciones para aumentar el rendimiento de la proteína, como se comentará más adelante.

A su vez, se llevó a cabo el mismo protocolo de *beads* para las diferentes construcciones de Raf-1, cuyo resultado se representa en la Figura 16. Se esperaba obtener una banda de peso molecular 11,27 kDa para la construcción c-Raf [51-131]; 16,84 kDa para c-Raf [1-131]; 17,9 kDa para c-Raf [1-140] y 12,4 kDa para c-Raf [51-140], a los cuales debían añadirse 3-4 kDa de la etiqueta de histidinas y el sitio de corte de la proteasa 3C, al encontrarse clonados en vector pNSI.

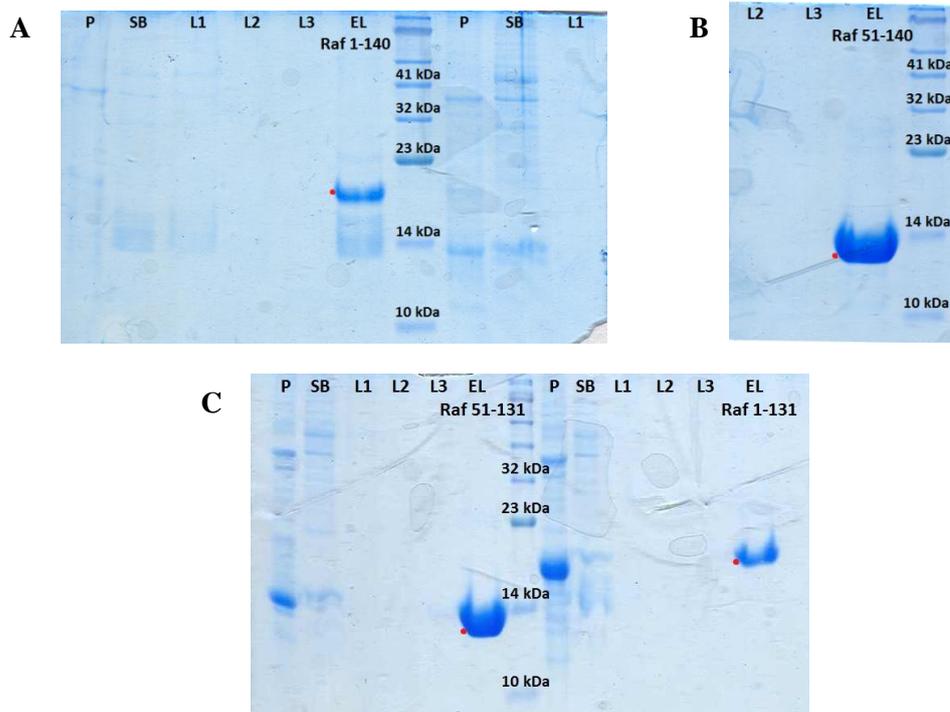


Figura 16. Geles de poliacrilamida del 15% de los controles de expresión para las diferentes construcciones de Raf-1. (A) En el gel se han cargado de izquierda a derecha los controles de precipitado (P), sobrenadante (SB), tres lavados (L1, L2, L3) y la proteína eluida (EL). Tras el pocillo correspondiente al patrón de pesos moleculares, se cargó el precipitado, sobrenadante y lavado 1 del fragmento c-Raf [51-140]. (B) Se cargaron el resto de muestras de c-Raf [51-140], esto es, lavado 2, lavado 3 y elución de la proteína. (C) Patrón de bandas obtenido para las muestras correspondientes a la construcción c-Raf [51-131] y c-Raf [1-131], respectivamente; de izquierda a derecha, precipitado, sobrenadante, tres lavados y elución. Se indica con un punto rojo, a la izquierda de la banda, la proteína eluida para todos los casos.

Los geles de poliacrilamida verificaron la presencia de proteína para las cuatro construcciones de Raf-1. Sin embargo, pueden observarse diferencias significativas en cuanto a los niveles de expresión de la quinasa. Se puede ver como la banda es más intensa para la construcción c-Raf [51-140] o c-Raf [51-131], mientras que los niveles de expresión son menores para los fragmentos más extensos en la región N-terminal, c-Raf [1-131] o c-Raf [1-140].

Chuang et al. (1994) comprobaron en experimentos de expresión y purificación de estas mismas construcciones de Raf-1 como los niveles de síntesis proteica eran menores, efectivamente, para c-Raf [1-140] y c-Raf [1-131]. Sin embargo, la eliminación de los primeros 50 aminoácidos incrementaba su estabilidad y nivel de sobreexpresión, sugiriendo la posible implicación de estos residuos en alteraciones de la estructura tridimensional.

Los análisis mediante *beads* de la expresión, tanto de K-Ras como de Raf-1 humanos, permitieron verificar la presencia de proteína y proseguir con los experimentos de sobreexpresión a gran escala.

4.1.2 *Beads* para el seguimiento de la optimización de la sobreexpresión de K-Ras y Raf-1

La adición de 1 mM de IPTG al medio de cultivo en LB no fue adecuada para lograr una sobreexpresión significativa de K-Ras, como se ha mencionado anteriormente. Por tanto, la finalidad de este apartado será optimizar las condiciones de expresión de la proteína, bien añadiendo menor concentración de IPTG o variando la temperatura y tiempo de incubación.

La estrategia inicial consistió en probar con la mitad de concentración de IPTG de la que se había partido inicialmente, incubando a 20°C durante 24 horas. Se empleó como control la expresión de K-Ras en 1 mM de IPTG. A su vez, se experimentó con 0,5 y 1 mM de este agente inductor para una temperatura de 30°C durante un mínimo de 4 horas de incubación (Figura 17). En todos los casos, se mantuvo una agitación de 180 rpm.

Resulta especialmente interesante destacar el aumento de la síntesis de K-Ras para 0,5 mM de IPTG respecto al control, en el gel A de la Figura 17. La expresión es apenas perceptible para 1 mM de IPTG a 20°C, aunque aumenta a 30°C (gel B, Figura 17). La presencia de producto proteico parece ser la misma para 0,5 mM de IPTG, tanto a 20°C incubando toda la noche como a 30°C durante un periodo de 4 horas. Por tanto, la expresión de K-Ras aumenta al reducir a la mitad la concentración de agente inductor. Con esto, se decidió experimentar a concentraciones menores para analizar si se obtenían mayores o menores cantidades de proteína y se estudió para 0,25 mM de IPTG. Como la expresión de K-Ras aumentaba en términos generales para 30°C, se resolvió emplear esta temperatura y el resultado se muestra en el gel C de la Figura 17.

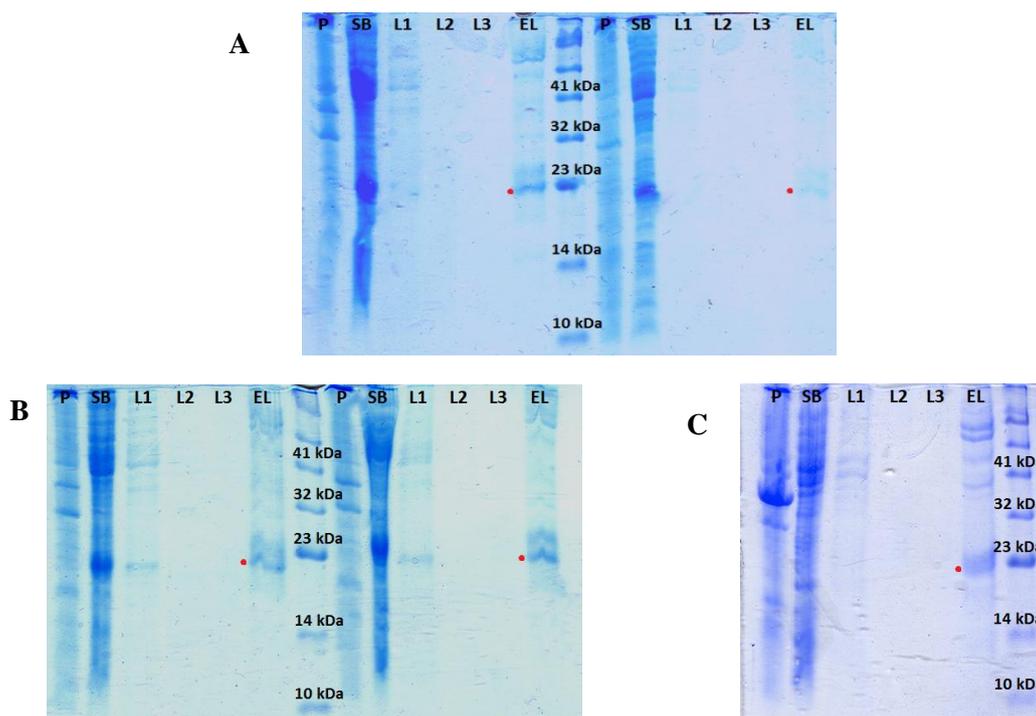


Figura 17. Geles de poliacrilamida del 15% obtenidos para las diferentes condiciones de expresión de K-Ras WT H. (A) Se muestran de izquierda a derecha los controles tomados del precipitado (P), sobrenadante (SB), tres lavados (L1, L2, L3), además de la elución de la proteína (EL), correspondientes a K-Ras expresada con 0,5 mM de IPTG (pocillos 1-6) a 20°C durante toda la noche y con 1 mM de IPTG (pocillos 8-13) bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura. (B) Se prepararon los mismos controles para la expresión de K-Ras con 0,5 mM de IPTG (pocillos 1-6) a 30°C durante 4 horas y con 1 mM de IPTG (pocillos 8-13) bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura. (C) Se representan las muestras correspondientes a los controles con 0,25 mM de IPTG, incubada a 30°C durante 4 horas. Se muestran los valores aproximados de los pesos moleculares, así como un punto rojo lateral en la banda asociada a K-Ras.

Se pudo ver que la concentración de 0,25 mM no era la adecuada, por lo que el valor óptimo de IPTG debería encontrarse en torno a 0,5 mM. La consulta a bibliografía relacionada (Molzan et al., 2010) permitió conocer que una concentración de 0,4 mM de IPTG conseguía lograr un rendimiento proteico satisfactorio. El periodo de incubación óptimo para el sistema experimental descrito en este trabajo era de 4 horas a 30°C. Se emplearon estas condiciones en experimentos de sobreexpresión y purificación posteriores comprobando que, efectivamente, los niveles de sobreexpresión de K-Ras habían aumentado notablemente.

De la misma manera, se analizó la influencia de una variación de las condiciones de expresión en la síntesis de Raf-1 para la construcción 1-131, con la que se deseaba comenzar los ensayos de sobreexpresión y purificación. Por ello, se resolvió estudiar cuáles eran sus condiciones de expresión óptimas. Se sobreexpresó la proteína a 0,5 y 1 mM de IPTG tanto a 20°C con periodo de incubación de 12-16 horas, como a 30°C durante 4 horas. El resultado se indica en la Figura 18. La proteína Raf-1 correspondiente a los residuos 1 al 131 tiene un peso molecular de 16,84 kDa y un punto isoeléctrico de 8,75.

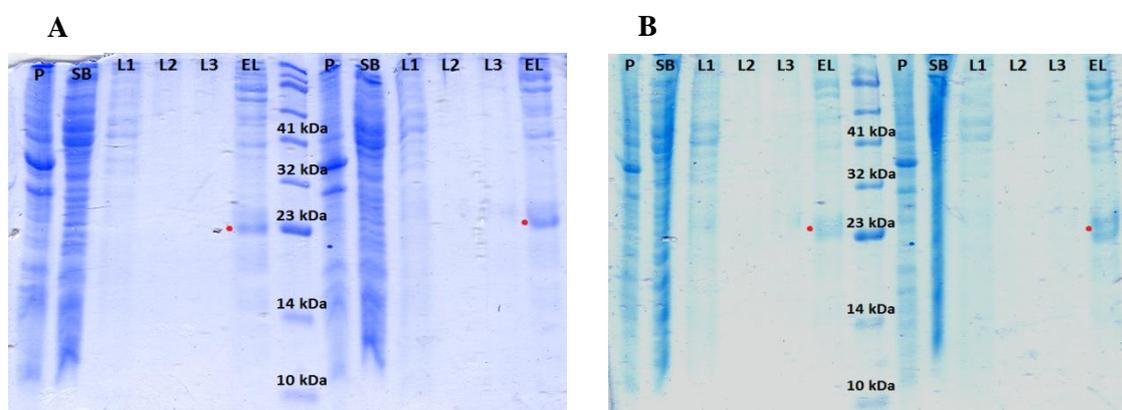


Figura 18. Geles de poliacrilamida del 15% obtenidos para las diferentes condiciones de expresión de c-Raf [1-131]. (A) Se muestran de izquierda a derecha los controles tomados del precipitado (P), sobrenadante (SB), tres lavados con tampón A (L1, L2, L3), además de la elución de la proteína (EL) correspondiente a c-Raf [1-131] expresada con 0,5 mM de IPTG (pocillos 1-6) a 20°C durante toda la noche y con 1 mM de IPTG (pocillos 8-13) bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura. **(B)** Se prepararon los mismos controles para la expresión de c-Raf [1-131] con 0,5 mM de IPTG (pocillos 1-6) a 30°C durante 4 horas y con 1 mM de IPTG (pocillos 8-13) bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura. Se muestran los valores aproximados de los pesos moleculares, así como un punto rojo lateral en la banda asociada a Raf-1.

Como se puede observar en la figura, la banda es más intensa para 1 mM de IPTG. Para este valor de concentración, la cantidad de proteína parece ser mayor para una temperatura de 20°C, aunque la diferencia respecto a 30°C es mínima. Por tanto, c-Raf [1-131] no requiere un cambio en las condiciones de expresión, manteniendo una concentración de 1 mM de IPTG e incubando a 20°C durante toda la noche, para obtener el máximo nivel de producto proteico.

4.2 Purificación a gran escala de K-Ras

La construcción de la secuencia completa de K-Ras WT H isoforma B (ID P01116-2), clonada en el vector pNSI, se expresó en la cepa BL21 de *E.coli* con 1 mM de IPTG a 20°C durante un periodo de incubación de 12-16 horas, pues los ensayos de optimización de la sobreexpresión de K-Ras se realizaron con posterioridad a esta purificación.

Aunque los niveles de proteína no fueron muy elevados, resultaron suficientes para los estudios posteriores de interacción proteína- proteína por calorimetría isoterma de titulación (ITC).

A partir del precipitado de esta sobreexpresión, y una vez permitido el paso de la solución proteica a través de la columna quelante de níquel de acuerdo al apartado 3.1.4 de Material y Métodos, se procedió a la purificación de K-Ras por FPLC.

El cromatograma obtenido en el Äkta Purifier para esta proteína se muestra en la Figura 19. En las primeras fracciones se empleó un gradiente del 3% de tampón B para eliminar contaminantes, representado en el pico asociado a las fracciones A3, A4 y A5. También se observa un pico correspondiente a la elución de K-Ras equivalente a un gradiente de tampón B del 30% y comprendiendo las fracciones B12, B11, B10.

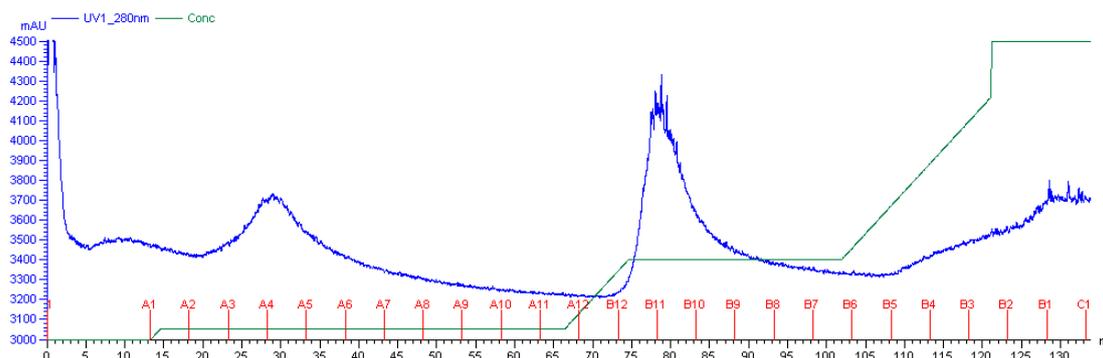


Figura 19. Cromatograma de FPLC correspondiente a la purificación de K-Ras WT H con columna de níquel. Se recogieron fracciones de 5 mL del eluido. Los números en rojo equivalen al número de fracciones. La línea azul muestra la absorbancia a 280 nm. La línea verde indica el gradiente de tampón B empleado en la purificación.

Se cargaron en un gel de poliacrilamida del 15% las fracciones A12, B12, B11, B10 y B9, así como la fracción A4 para verificar que se trataba de contaminante. También se analizaron los controles recogidos durante el proceso de purificación. La proteína se observó en el gel de la Figura 20 como bandas de peso molecular aproximado de 24 kDa.

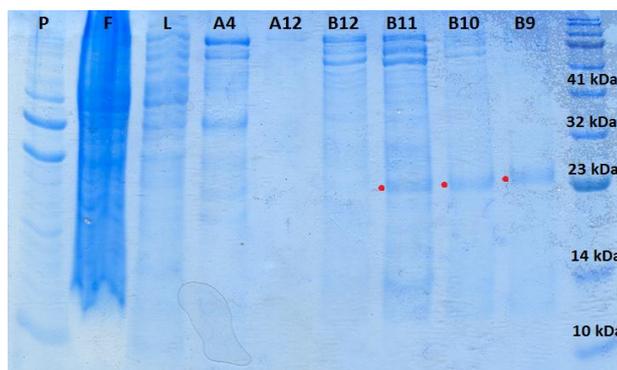


Figura 20. Gel de poliacrilamida del 15% mostrando las fracciones iniciales de la purificación de K-Ras WT H con columna de níquel. En el gel se han cargado de izquierda a derecha los controles de precipitado (P), fracción no retenida (*flow-through*, F), lavado (L), tomados como se han descrito en el apartado de Material y Métodos. A continuación se cargó la fracción A4, para descartar la presencia de la proteína de interés en el pico inicial, seguidas de las fracciones A12 a la B9. Se han indicado con un punto rojo en el lateral izquierdo las bandas correspondientes a K-Ras. En las fracciones B11, B10 y B9 se observa una banda de aproximadamente 24 kDa, que se corresponde con K-Ras.

Efectivamente, la fracción A4 presentaba un patrón de bandas que no se asociaba al peso molecular de K-Ras (contaminante), encontrándose ésta presente en las fracciones B11, B10 y B9. Puesto que incluso la fracción B9, que era la última fracción para la cual se pensaba que habría proteína, presentaba una cantidad de K-Ras considerable, se preparó un segundo gel de proteínas para analizar las fracciones restantes (Figura 21).

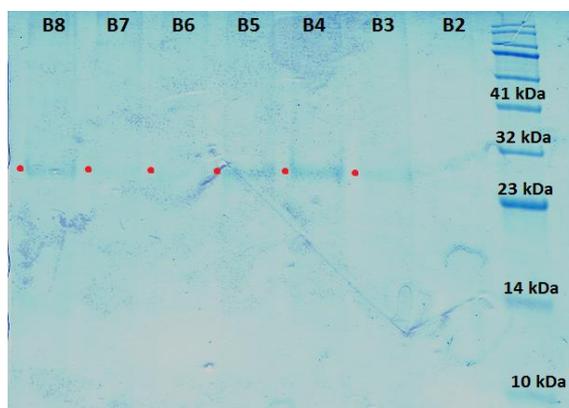


Figura 21. Gel de poliácridamida del 15% mostrando el resto de fracciones de la purificación de K-Ras WT H con columna de níquel. En este segundo gel se muestran el resto de fracciones analizadas, correspondientes a las fracciones B8 a la B2. Se han indicado con un punto rojo en el lateral izquierdo las bandas pertenecientes a K-Ras.

Había proteína para las fracciones B8 a la B3, mientras que la fracción B2 carecía de K-Ras. Se concentraron las fracciones B10 a la B3 empleando un concentrador Amicon® Ultracel 3K durante 2 horas hasta alcanzar un volumen final de 2 mL. El producto concentrado resultante se inyectó en una columna de exclusión molecular Superdex 200 16/60. El cromatograma obtenido del equipo Äkta Prime se muestra en la Figura 22.

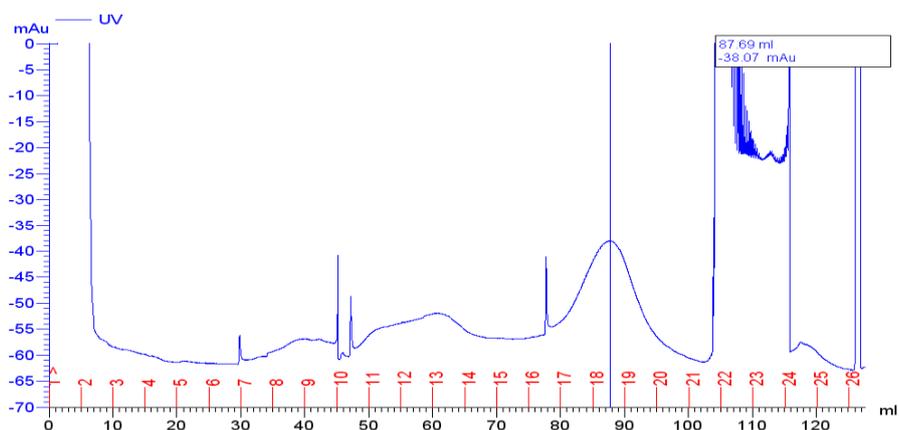


Figura 22. Cromatograma de exclusión molecular de K-Ras WT H. La línea azul representa la absorbancia a 280 nm. Los números que aparecen en rojo indican el número de fracción en el que se ha recogido la proteína purificada.

K-Ras debía eluirse en torno a los 90 mL de volumen de tampón de exclusión, de acuerdo al patrón de calibrado del laboratorio para la columna Superdex 200 16/60. Este volumen de elución se correspondía con el volumen del peso molecular correspondiente a K-Ras, que eluye como monómero. Se cargaron en gel de poliácridamida al 15% las fracciones 10 a la 23 (Figura 23), con objeto de comprobar si se había obtenido proteína purificada.

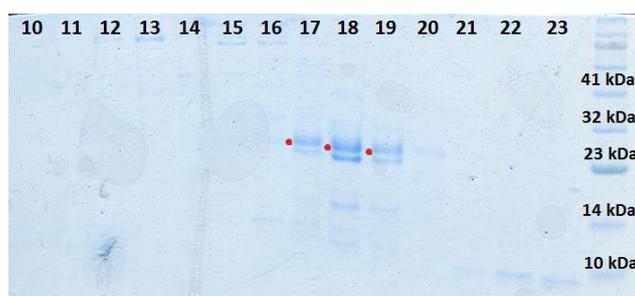


Figura 23. Gel de poliacrilamida del 15% de las fracciones de proteína obtenidas por cromatografía de exclusión molecular. Se puede comprobar la presencia de K-Ras en las fracciones 17, 18 y 19.

Finalmente, se concentraron las fracciones 17, 18 y 19 hasta lograr un volumen aproximado de 200 μ L. Se midió la concentración por el método de Bradford, resultando en 1,68 mg/mL de proteína. Esta proteína pura se dividió en alícuotas de 50 μ L, que se congelaron en nitrógeno líquido y fueron almacenadas a -80°C . Con esto, K-Ras ya podía ser empleada en experimentos de interacción una vez se purificara su efector, Raf-1.

4.3 Purificación a gran escala de Raf-1

De las cuatro construcciones de las que se partía en este trabajo, se decidió analizar en primer lugar c-Raf [51-131], que comprende el dominio de unión a Ras (RBD). Esta construcción, ligada en el vector pNSI, se expresó en la cepa BL21 de *E.coli*, empleando 1 mM de IPTG e induciendo la sobreexpresión a 20°C durante 24 horas. Esta secuencia determina una cadena polipeptídica de 102 aminoácidos y punto isoeléctrico de 9,26. c-Raf [51-131] tiene un peso molecular de 11,27 kDa, al que deben añadirse los 3-4 kDa propios de la etiqueta de 6 residuos histidina y del sitio de corte de la proteasa 3C.

La purificación de Raf-1 por FPLC se llevó a cabo a partir del precipitado obtenido mediante el procedimiento descrito en Material y Métodos. El cromatograma resultante de la purificación en el equipo Äkta Purifier se muestra en la Figura 24.

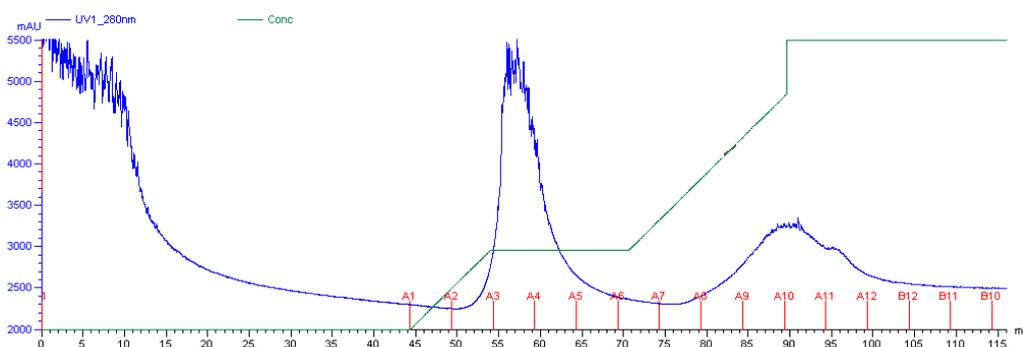


Figura 24. Cromatograma de FPLC correspondiente a la purificación de Raf-1, aminoácidos 51 al 131, con columna de níquel. Se recogieron fracciones de 5 mL del eluido. Los números en rojo equivalen al número de fracciones. La línea azul muestra la absorbancia a 280 nm. La línea verde indica el gradiente de tampón B empleado en la purificación.

Como se puede observar, el cromatograma muestra dos picos, de los cuales el segundo es el que contenía a Raf-1, eluyendo en un gradiente aproximado del 27% de tampón B. El primer pico, más abrupto, se relaciona con la presencia de contaminantes para un gradiente del 3% de tampón B.

Aunque las fracciones para las cuales se pensaba que habría proteína comprendían desde la fracción A8 a la A12, también se cargaron en el gel de poliacrilamida del 15% las fracciones iniciales, junto con los controles de precipitado, sobrenadante, fracción no retenida y lavado obtenidos mediante los procedimientos descritos anteriormente (Figura 25).

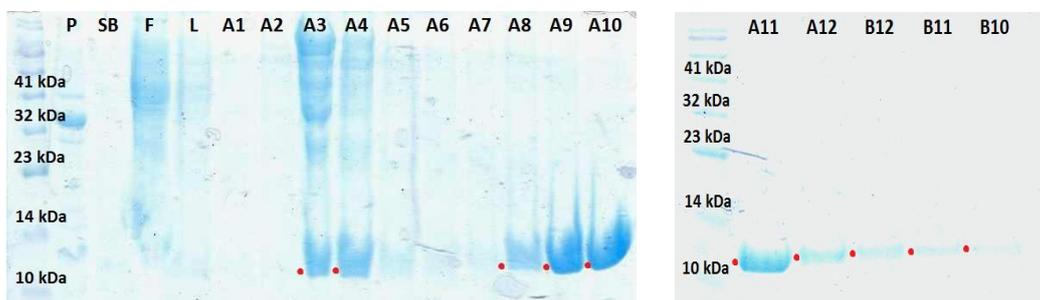


Figura 25. Gels de poliacrilamida del 15% de las fracciones de proteína obtenidas por FPLC de la construcción 51-131 de Raf-1. En el primer gel se cargaron los controles de precipitado (P), sobrenadante (SB), fracción no retenida (F) y lavado (L), seguido de las fracciones A1 a la A10, mientras que en el segundo aparecen las bandas correspondientes a la fracciones A11 a la B10. Las bandas se asocian a un peso molecular aproximado de 14 kDa, indicado con un punto lateral rojo.

El gel indicaba una presencia mínima de Raf-1 en las fracciones B12, B11 y B10, por lo que no toda la proteína se eluyó para un gradiente del 100% de tampón B. La concentración de imidazol empleada, de 200 mM, no fue suficiente como para eluir a c-Raf [51-131] en el volumen de elución que se correspondía con el volumen del peso molecular de la proteína, por lo que debían emplearse concentraciones mayores. En purificaciones posteriores a este ensayo se utilizó una concentración de imidazol de 500 mM.

Así pues, de acuerdo a los resultados observados en los gels de poliacrilamida, se decidió concentrar las fracciones A8 a la B10 utilizando un concentrador Amicon® Ultracel 3K. Las fracciones A3 y A4, aunque contenían un nivel de proteína significativo, también indicaban la presencia de contaminantes y se descartaron. El producto final concentrado en un volumen de 2 mL se inyectó en una columna de exclusión molecular Superdex 200 16/60 a una temperatura de 4°C y con un flujo de 0,5 mL/ min, dando lugar al cromatograma de la Figura 26.

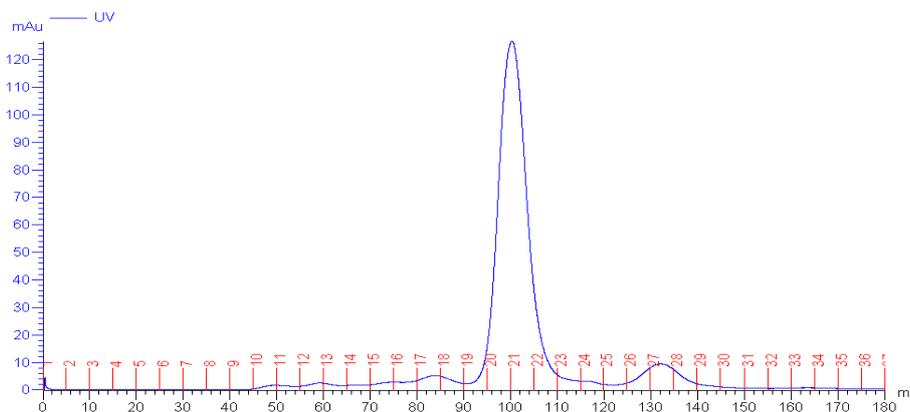


Figura 26. Cromatograma de exclusión molecular de Raf-1, construcción 51-131. El valor de absorbancia a 280 nm se representa por la línea azul. Los números que aparecen en rojo indican el número de fracción en el que se ha recogido la proteína purificada.

En un gel de poliacrilamida del 15% se dispusieron las fracciones 17 a la 28 (Figura 27), además del marcador de pesos moleculares (Nippon®), para verificar la presencia de proteína purificada y concentrada tras la cromatografía de exclusión molecular.

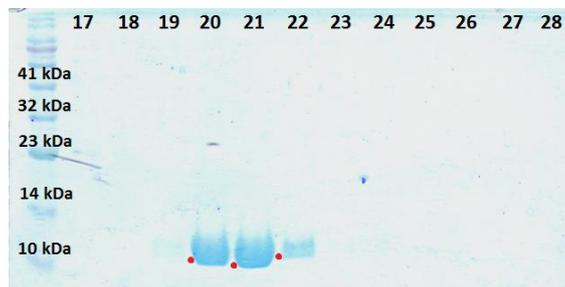


Figura 27. Gel de poliacrilamida del 15% de las fracciones de proteína obtenidas por cromatografía de exclusión molecular. Se muestran de izquierda a derecha las fracciones cargadas, de la 17 a la 28. Las fracciones 20, 21 y 22 indican la presencia de proteína purificada.

El cromatograma mostraba un pequeño pico asociado a las fracciones 27 y 28, aunque su análisis mediante electroforesis SDS-PAGE corroboró que se trataba de contaminante. Las fracciones 20, 21 y 22 se concentraron hasta alcanzar un volumen de 200 μ L. Se midió la concentración de proteína pura por el método de Bradford, resultando en 6 mg/mL. Este volumen de proteína se dividió en alícuotas de 50 μ L, que se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C .

4.4 Caracterización de la interacción entre K-Ras y Raf-1

4.4.1 Medida a pequeña escala: *pull-down*

El ensayo de *pull-down* se emplea para determinar el estado de interacción física entre dos o más proteínas. Esto se realiza a través de la captura selectiva de proteínas mediante el uso de partículas de agarosa recubiertas de ligando, pues sólo se unirá la proteína con la etiqueta correspondiente. De esta forma, se añade la solución con la primera proteína, se elimina el resto de moléculas no unidas, se añade la segunda proteína - que sólo quedará retenida si se une a la primera - y finalmente se eluye el complejo de interacción proteína - proteína a través de un tampón que contenga un analito químicamente competitivo con el ligando inmovilizado.

Se disponía de la proteína K-Ras WT H expresada con la etiqueta de MBP, correspondiente al vector pMBKI. Además, la construcción c-Raf [51-131] se encontraba clonada en el vector pNSI, que codifica para la etiqueta de poli-histidinas. Por tanto, se realizó el ensayo de *pull-down* con las dos proteínas de interés sobreexpresadas con *tags* distintos.

El cultivo para cada una de las proteínas se realizó en 10 mL de LB. Como se describió en Material y Métodos, se tomaron como controles una muestra del precipitado, otra del sobrenadante antes de añadir la segunda proteína, otra del segundo sobrenadante tras incubación con la proteína de unión y una última de la elución del complejo. El complejo Raf- Ras para *beads* de níquel se eluyó con tampón B con 500 mM de imidazol. Así, el resultado del ensayo se muestra en la Figura 28.

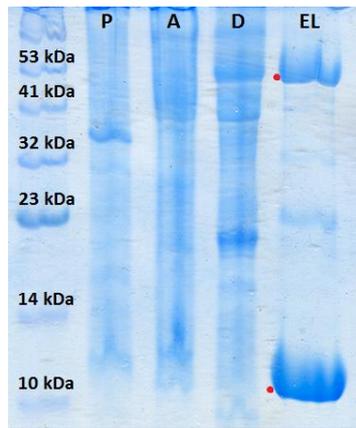


Figura 28. Medida de la interacción entre K-Ras WT en pMBKI y c-Raf [51-131] en pNSI mediante ensayo por *pull-down*. En el gel se indican de izquierda a derecha los controles cargados, respectivamente, del precipitado (P), del sobrenadante antes de la adición de la segunda proteína (A) y después (D), y la muestra correspondiente a la elución del complejo de interacción (EL). Los pocillos 2 al 5 se corresponden con *beads* de níquel, añadiendo en primer lugar Raf-1 y, en segundo, K-Ras WT. Se indican los valores correspondientes a los pesos moleculares. Las bandas asociadas a la presencia de producto proteico se indican con un punto rojo en el lateral izquierdo.

K-Ras tiene un peso molecular de 21 kDa, mientras que su etiqueta MBP tiene 41 kDa. Por tanto, se esperaba obtener una banda de peso molecular aproximado de 62 kDa. De la misma manera, el peso molecular de c-Raf [51-131] es de 11 kDa que, añadidos a los 3-4 kDa de la etiqueta His6 *tag* y del sitio de corte de la proteasa 3C, resultan en una banda de unos 14 kDa. El pocillo 5, que se corresponde con la elución del complejo Raf- Ras para *beads* de níquel, muestra la presencia de estas dos bandas y, por tanto, la interacción de K-Ras y Raf-1 *in vitro*. Los ensayos mediante *pull-down* permiten determinar cualitativamente la interacción proteína - proteína, mientras que el ITC, como se verá posteriormente, permite ampliar la información y obtener datos de parámetros y modelos de unión.

A su vez, se decidió realizar el mismo ensayo con K-Ras mutada, que presenta un cambio de glicina por valina en el residuo 12 (G12V), sobreexpresada en pMBKI. Se analizó también para la misma construcción de Raf-1. Este resultado se muestra en la Figura 29.

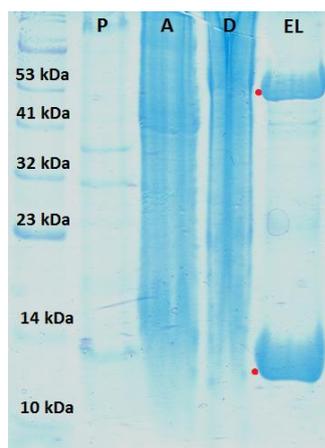


Figura 29. Medida de la interacción entre K-Ras G12V en pMBKI y c-Raf [51-131] en pNSI mediante ensayo por *pull-down*. En el gel se indican de izquierda a derecha los controles cargados del precipitado (P), del sobrenadante antes de la adición de la segunda proteína (A) y después (D), y de la elución de ambas proteínas (EL). Los pocillos 2 al 5 se corresponden con *beads* de níquel, añadiendo en primer lugar Raf-1 y, en segundo, K-Ras V12. Se indican los valores correspondientes a los pesos moleculares. Las bandas asociadas a la presencia de producto proteico se indican con un punto rojo en el lateral izquierdo.

Como indican los estudios realizados por Chuang et al. (1994), la interacción mediada por Ras V12 es prácticamente idéntica a la mostrada para el tipo silvestre, sugiriendo que la región mutada no afecta a su unión con Raf-1. Este hecho se puede comprobar en el pocillo 5 de la Figura 29, donde se verifica la presencia de ambas bandas, la correspondiente a K-Ras V12 con la etiqueta de MBP y la de c-Raf [51-131] con el *tag* de 6 histidinas. Por tanto, K-Ras mutada y c-Raf [51-131] también interaccionan *in vitro*.

4.4.2 Medida a gran escala: *Isothermal Titration Calorimetry* (ITC)

Una vez comprobado que ambas proteínas interaccionaban a pequeña escala mediante el análisis por *pull-down*, el siguiente paso fue verificar dicha interacción a través de la calorimetría isoterma de titulación (ITC), que mide los cambios en la entalpía de la reacción al formarse el complejo de unión.

Se partió de 1 L de caldo de cultivo, tanto para K-Ras como para Raf-1, añadiéndose 1 mM de IPTG para inducir la expresión. Tras purificar ambas proteínas de acuerdo a lo descrito en Material y Métodos, se logró obtener una concentración de proteína de 1,68 mg/mL para K-Ras WT H y de 6 mg/mL para c-Raf [51-131]. Se prepararon las muestras y se ajustaron los parámetros del equipo de acuerdo al apartado 3.3. La gráfica que resultó de este ensayo se muestra en la Figura 30.

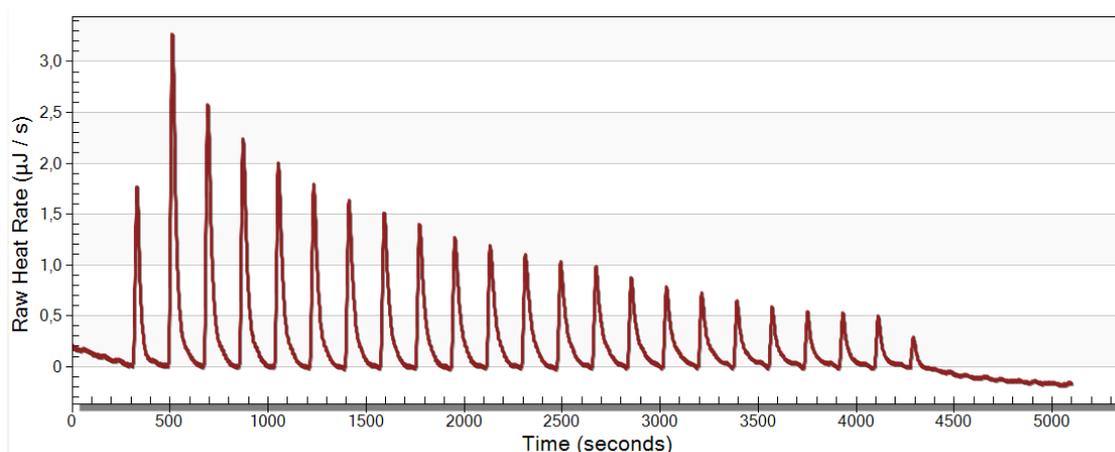


Figura 30. ITC para K-Ras WT H y la construcción c-Raf [51-131] humana. La gráfica representa los valores de ratio de calor liberado ($\mu\text{J} / \text{s}$) frente a tiempo (s). Se efectuaron 25 inyecciones, con un tiempo de espera entre inyecciones de 180 s y agitación de 300 rpm. La temperatura de la celda era de 8°C. La inyección inicial fue de 0,95 μL , mientras que las restantes fueron de 1,96 μL . La línea base de los picos se encuentra corregida.

La interacción entre K-Ras WT y c-Raf [51-131] se trata de una reacción exotérmica en donde el calor que se libera es detectado por el sistema a partir de la modificación del controlador térmico para mantener la temperatura estable. Además, en el caso de producirse la interacción, los primeros picos de la gráfica son elevados, pues existe mayor proteína disponible que permite la asociación de Raf-1 a K-Ras cuando la primera es inyectada sobre la segunda. Sin embargo, a medida que aumenta la concentración de Raf-1 añadido, la proteína que se encuentra en la celda se satura y se desprende menos calor en inyecciones sucesivas, por lo que los picos van reduciendo su altura. Esto es lo que se observa para la Figura 30, por lo que se puede verificar que K-Ras WT y c-Raf [51-131] interaccionan también a gran escala.

Como sugieren Chuang et al. (1994), el segmento que comprende los residuos 51 al 131 de Raf-1 (RBD) es suficiente para su unión con K-Ras, mientras que el resto de residuos se encargan de incrementar la estabilidad de la proteína de fusión o aumentar la efectividad de unión con K-Ras. Además, el análisis de los datos obtenidos mediante el software Nanoanalyze (TA Instruments®) permitió deducir los parámetros de la unión, que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros termodinámicos de la asociación entre K-Ras WT y c-Raf[51-131].

K-Ras WT -Raf-RBD ^a		
Parámetros	Valores	
n	1	
K _a	1,076 · 10 ⁴	1/M
K _d	9,292 · 10 ⁻⁵	M
dH	-659,9	kJ/ mol
dS	-2269	J/mol·K

^aLas medidas se tomaron a 8°C en un tampón con Tris 25 mM pH 8, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, TCEP 1 mM. Se muestran los valores para la estequiometría de la reacción (n), constante de asociación (K_a), constante de disociación (K_d), entalpía de unión (dH) y entropía (dS), con sus correspondientes unidades.

Se trata de una reacción exotérmica, dado por el valor negativo de la entalpía de reacción para la interacción entre ambas proteínas ($\Delta H < 0$) y por los picos ascendentes del gráfico de la Figura 30. Rudolph et al (2001) realizaron ensayos de interacción de Ras con diferentes efectores, entre los que se encontraba el RBD de Raf-1, obteniendo una constante de asociación (K_a) de $12,5 \cdot 10^6$ 1/M y un valor de entalpía de $-5,2$ kcal/mol. Por consiguiente, la interacción entre K-Ras y el RBD de Raf-1 para este sistema experimental tiene un menor valor de constante de asociación, mientras que el valor de entalpía es mayor. Podría deducirse que esto se debe a la propia interacción, sin embargo, las diferencias entre estos valores se deben posiblemente a que el ajuste del software utilizado no era muy preciso. Tratando los datos con otros programas más complejos podrían obtenerse unos resultados más rigurosos. Otro estudio realizado por Kiel et al. (2009) logra obtener una constante de disociación de la interacción entre K-Ras y Raf-1 de 46 μ M, que, aunque menor, es del mismo orden que $9,292 \cdot 10^{-5}$ M, valor conseguido en este ensayo. La estequiometría de la interacción obedecía a un modelo independiente, como se representa en la Figura 31.

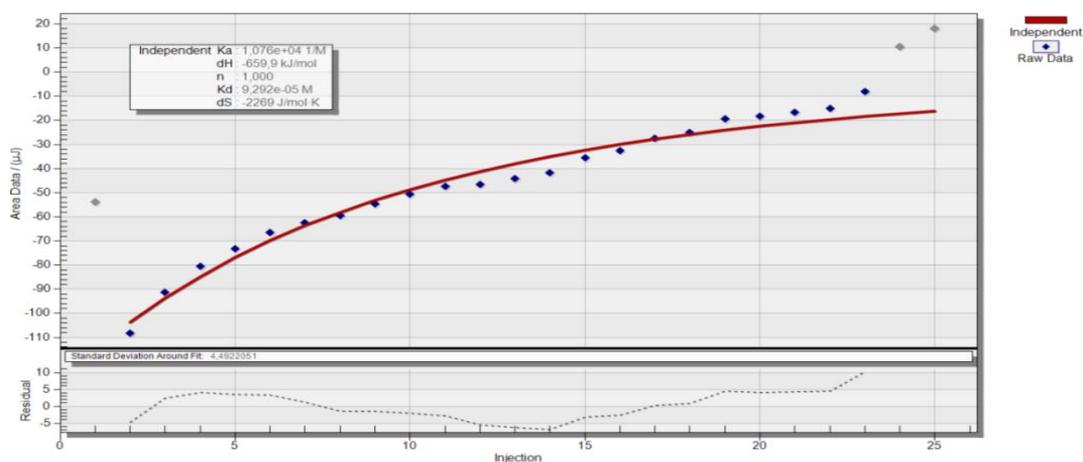


Figura 31. Estequiometría de interacción entre K-Ras WT H y c-Raf [51-131]. Se muestra una representación de los valores del área bajo cada pico para cada una de las inyecciones. El patrón de puntos obedece a un modelo independiente, representado por la línea roja. Se han eliminado los valores de la primera inyección (0,95 μ L), así como los valores finales para ajustar el modelo.

Por último, se realizó el mismo análisis por ITC para K-Ras mutada en el residuo 12 (G12V) con c-Raf [51-131] (Figura 32), con el objetivo de verificar la interacción que se había comprobado en el *pull-down*.

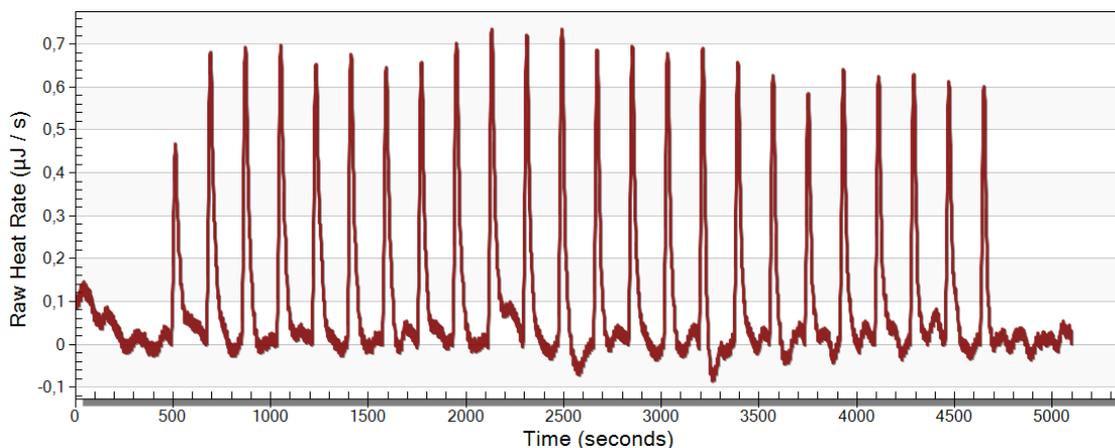


Figura 32. ITC para K-Ras V12 H y la construcción c-Raf [51-131] humana. La gráfica representa los valores de ratio de calor liberado ($\mu\text{J} / \text{s}$) frente a tiempo (s). Se efectuaron 25 inyecciones, con un tiempo de espera entre inyecciones de 180 s y agitación de 300 rpm. La temperatura de la celda era de 8°C . La inyección inicial fue de $0,95 \mu\text{L}$, mientras que las restantes fueron de $1,96 \mu\text{L}$. La línea base de los picos se encuentra corregida.

Al contrario de lo que se esperaba, no se observó interacción para K-Ras V12 y el RBD de Raf-1, hecho que contradecía el resultado logrado en el *pull-down* y los estudios realizados por otros grupos de investigación.

El equipo de ITC es extremadamente sensible, y cualquier pequeña alteración dificulta la medida de la interacción entre moléculas. En efecto, cuando se cargaron las soluciones proteicas en el equipo, se observó como c-Raf [51-131] había precipitado ligeramente. Por tanto, se dedujo que c-Raf [51-131] podría estar dañada y no ser capaz de interactuar con K-Ras, por lo que no se pudo comprobar la interacción entre las dos proteínas. En todos los experimentos realizados en este trabajo, la purificación de c-Raf [51-131] presentaba unos altos niveles de proteína expresada, y tendía a precipitar cuando se concentraba por encima de $0,6 \text{ mM}$. Por consiguiente, se tratará en un futuro de optimizar las condiciones de mantenimiento de la proteína, bien mediante un cambio de la composición de los tampones o a través de la adición de algún compuesto que incremente su estabilidad en solución.

4.5. Perspectiva del estudio de K-Ras

KRAS se descubrió hace más de 30 años y es considerada la forma más comúnmente mutada en los cánceres humanos, estando implicada en las oncogénesis más agresivas. Resulta destacable el gran interés en aumentar los conocimientos sobre K-Ras, y prueba de ello es el gran número de artículos publicados recientemente en relación a las características de K-Ras como precursor tumorigénico (Kiyokawa y Minato, 2014), además de la creación en 2013 del Programa Ras promovido por el *National Cancer Institute* (NATIONAL CANCER INSTITUTE®, 2013) con objeto de crear terapias dirigidas en el diseño de drogas que bloqueen la función de este oncogén. Uno de los proyectos más innovadores fijados para este programa consiste en el estudio de los complejos formados por K-Ras, por lo que resulta de especial relevancia el análisis de la interacción de esta proteína con sus efectores.

Los oncogenes Ras han llegado a ser considerados como imposibles de tratar con drogas ("undruggable"), debido a que la estructura tridimensional disponible proporcionaba pocos datos acerca de los sitios a los que estos medicamentos podrían unirse (Shao et al., 2014). Sin embargo, el desarrollo de técnicas más sofisticadas de imagen molecular (*structural imaging*) de la estructura de la proteína, así como el avance en nuevos campos como la nanotecnología, permitirá elucidar la estructura completa de K-Ras y sus diferentes sitios de unión, lo que contribuirá a la creación de nuevas drogas.

La mayoría de estudios estructurales realizados hasta la fecha sobre la subfamilia Ras están basados en H-Ras y su unión con moléculas como GDP (PDB 4EFL), SOS-1 (PDB 1BKD) o PI3K (PDB 1HE8), por lo que en este trabajo se partió de poca información del modo de interacción entre K-Ras y su efector en la ruta ERK, Raf-1. El único trabajo que aportó alguna referencia de la estructura de K-Ras y la forma en que podría unirse con otras moléculas fue el de Maurer et al. (2012), que mostraba de manera limitada la estructura de la unión de K-Ras con GDP. A pesar de la homología en las secuencias de nucleótidos para H-Ras y K-Ras, resultaría interesante conocer la función que el extremo hipervariable C-terminal desarrolla en la especificidad, tanto en la expresión diferencial como en la estructura e interacción con moléculas concretas, de ambas proteínas (Castellano y Santos, 2011).

Por tanto, la finalidad de este trabajo fue la de iniciar una nueva descripción del modo de unión de K-Ras con Raf-1. Se verificó que, efectivamente, se producía la interacción entre ambas proteínas, obteniendo diversos parámetros de la unión a través de ITC. El análisis de la estructura de K-Ras y la identificación de los sitios que contribuyen a su unión con otras moléculas, así como la descripción del complejo de unión con Raf-1, utilizando series de cristalización u otras herramientas, permitirá el diseño de drogas o compuestos que estén dirigidos bien a K-Ras mutada, o a alterar su interacción con Raf-1, eliminando la señal constitutivamente activada de la ruta y creando un tratamiento efectivo contra el cáncer.

5. CONCLUSIONES

- Las condiciones optimizadas de sobreexpresión de K-Ras consisten en añadir a 1 L de caldo de cultivo en LB 0,4 mM de IPTG e incubar a 30°C durante 4 horas, mientras que 1 mM de IPTG e incubación a 20°C durante 16 horas permiten obtener una cantidad de Raf-1 considerable.
- c-Raf [51-131] y c-Raf [51-140] presentan mayores niveles de expresión que c-Raf [1-131] y c-Raf [1-140] debido, posiblemente, a alteraciones en su conformación y, por tanto, en su estabilidad.
- Tanto K-Ras como Raf-1 se purifican correctamente por cromatografía de afinidad con columna quelante de níquel y por cromatografía de exclusión molecular. Sin embargo, se debería cambiar la composición de los tampones para Raf-1 con objeto de aumentar su estabilidad y evitar su precipitación en solución.
- K-Ras y Raf-1 interaccionan directamente para el sistema experimental descrito. Esta unión se produce tanto a pequeña escala mediante estudios por *pull-down* como a gran escala por calorimetría isoterma de titulación (ITC).

6. BIBLIOGRAFÍA

- ADJEI, A.A. (2001). Blocking Oncogenic Ras Signaling for Cancer Therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 93: 1062-1074.
- B FOR BIOLOGY, NAMRATA HETA, 2013. *Signal Transduction Pathway - MAP Kinase Pathways (Part I)*, visto el 22 de junio de 2014.
<http://namrataheda.blogspot.com.es/2013/03/signal-transduction-pathway.html>
- BACCARINI, M. (2005). Second nature: biological functions of the Raf-1 "nature". *FEBS letters*, 579: 3271-3277.
- BLOCK, C.; JANKNECHT, R.; HERRMANN, C.; NASSAR, N. (1996). Quantitative structure-activity analysis correlating Ras/Raf interaction in vitro to Raf activation in vivo. *Nature structural biology*, 3: 244-251.
- BONSOR, D.; BUTZ, S.F.; SOLOMONS, J.; GRANT, S.; FAIRLAMB, I.J.S.; FOGG, M.J.; GROGAN, G. (2006). Ligation independent cloning (LIC) as a rapid route to families of recombinant biocatalysts from sequenced prokaryotic genomes. *Org. Biomol. Chem.*, 4: 1252-1260.
- BOS, J. L. (1989). Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.*, 49: 4682-4689.
- BRÜNGER, A.T.; MILBUM, M.V.; TONG, L.; DE VOS, A.M.; JANCARIK, J.; YAMAIZUMI, Z.; NISHIMURA, S.; OHTSUKA, E.; KIM, S.H. (1990). Crystal structure of an active form of RAS protein, a complex of a GTP analog and the HRAS p21 catalytic domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 4849-4853.
- CARPEÑO, J.C.; BELDA-INIESTA, C. (2013). KRAS mutant NSCLC, a new opportunity for the synthetic lethality therapeutic approach. *Translational Lung Cancer Research*, 2: 142 -151.
- CASTELLANO, E.; SANTOS, E. (2011). Functional specificity of Ras isoforms: so similar but so different. *Genes & Cancer*, 2: 216-231.
- CELL SIGNALING TECHNOLOGY®, 2014. *MAP Kinase Singaling Resources*, visto el 22 de junio de 2014.
<http://www.cellsignal.com/contents/science-cst-pathways/map-kinase-signaling-resources/science-pathways-mapk?Ntt=mapk+signaling&fromPage=search>
- CHOW, Y.H.; PUMIGLIA, K.; JUN, T.; DENT, P. (1995). Functional mapping of the N-terminal regulatory domain in the human Raf-1 protein kinase. *J Biol Chem.*, 270: 14100-14106.
- DAVIES, H.; BIGNELL, G.R.; COX C.; STEPHENS, P.; EDKINS, S.; CLEGG, S.; TEAGUE, J.; WOFFENDIN, J.; GAMETT, M.J.; BOTTOMLEY, W.; DAVIS, N.; DICKS, E.; EWING, R.; FLOYD, Y.; GRAY, K.; HALL, S.; MOULD, C.; PARKER, A.; STEVENS, C.; WATT, S.; HOOPER, S.; WILSON, R.; JAYATILAKE, H.; GUSTERSON, B.A.; COOPER, C.; SHIPLEY, J.; HARGRAVE, D.; PRICHARD-JONES, K.; MAITLAND, N.; CHENEVIX-TRENCH, G.; COSSU, A.; FLANAGAN, A.; NICOLSON, A.; HO, J.W.C.; LEUNG, S.T.; YUEN, S.T.; WEBER, B.L.; SEIGLER, H.F.; DARROW, T.L.; PATERSON, H.; MARAIS R.; MARSHALL, C.J.; WOOSTER, R.; STRATTON, M.R.; FUTREAL, P.A. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417:949-954.
- DER, C. (2006). *Ras family GTPases*. Editorial Springer. Nueva York. 396 pp.
- DRUGAN, J.K.; KHOSRAVI-FAR, R.; WHITE, M.A., DER, C.J., SUNG, Y.J., HWANG, Y.W.; CAMPBELL, S.L. (1996). Ras interaction with two distinct binding domains in Raf-1 5 be requiered for Ras transformation. *J. Biol. Chem*, 271: 233-237.
- EMERSON, S.D.; MADISON, V.S.; PALERMO, R.E.; WAUGH, D.S.; SCHEFFLER, J.E.; TSAO, K.L.; KIEFER, S.E.; LIU, S.P.; FRY, D.C. (1996). Structure of the Ras-binding domain of c-Raf-1 as determined by NMR spectroscopy and identification of the region that interacts with Ras. *Drug Des Discov.*, 13: 83-93.

- FILCHTINSKI, D.; SHARABI, O.; RÜPPEL, A.; VETTER, I.R.; HERRMANN, C.; SHIFMAN, J.M. (2010). What makes Ras an efficient molecular switch: a computational, biophysical, and structural study of Ras-GDP interactions with mutants of Raf. *J.Mol.Bio.*, 399: 422-435.
- FREYER, M.W.; LEWIS, E.A. (2008). *Biophysical Tools for Biologists, In Vitro Techniques en: Methods in cell biology*. Editorial Elsevier. Madrid, 79–113.
- HERRMANN, C. (2003). Ras- effector interactions: after one decade. *Current Opinion in Structural Biology*, 13: 122-129.
- KATO, K.; COX, A.D.; HISAKA, M.M.; GRAHAM, S.M.; BUSS, J.E.; DER, C.J. (1992). Isoprenoid addition to Ras protein is the critical modification for its membrane association and transforming activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89:6403–6407.
- KIEL, C.; FILCHTINSKI, D.; SPOENER, M.; SCHREIBER, G.; KALBITZER, H.R.; HERRMANN, C. (2009) Improved Binding of Raf to Ras-GDP Is Correlated with Biological Activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 284: 31893 - 31902.
- KIYOKAWA, E.; MINATO, H. (2014) Activated K-Ras and its effects on morphological appearance. *J Biochem*, pendiente de publicación.
- LEICHT, D.T.; BALAN, V.; KAPLUN, A.; SINGH-GUPTA, V.; KAPLUN, L.; DOBSON, M.; TZIVION, G. (2007). Raf kinases: Function, regulation and role in human cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1773: 1196-1212.
- LUNDQUIST, E.A. (2006). Small GTPases. *WormBook*, 17:1-18.
- MATALANAS, D.; BIRTWISTLE, M.; ROMANO, D.; ZEBISCH, A.; RAUCH, J.; VON KRIEGSHEIM, A.; KOLCH, W. (2011). Raf family kinases: Old dogs have learned new tricks. *Genes & Cancer*, 2: 232-260.
- MAURER, T.; GARRENTON, L.S.; OH, A.; PITTS, K.; ANDERSON, D.; SKELTON, N.; FAUBER, B.; PAN, B.; MALEK, S.; STOKOE, D.; LUDLAM, M.J.C.; BOWMAN, K.K.; WU, J.; GIANNETTI, A.; STAROVASNIK, M.A.; MALLMAN, I.; JACKSON, P.K.; RUDOLPH, J.; WANG, W.; FANG, G. (2012) Small-molecule ligands bind to a distinct pocket in Ras and inhibit SOS-mediated nucleotide exchange activity. *PNAS*, 109: 5299-5304.
- McCUBREY, J.M.; STEELMANA, L.S.; CHAPPELLA, W.H.; ABRAMSA, S.L.; WONGA, E.W.T.; CHANGA, F.; LEHMANN, B.; TERRIANB, D.M.; MILELLAD, M.; TAFURIE, A.; STIVALAF, F.; LIBRAF, M.; BASECKEG, J.; EVANGELISTIH, C.; MERTELLIH, A.M.; FRANKLIN, R.A. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1773: 1263-1284.
- MOLZAN, M.; SCHUMACHER, B.; OTTMANN, C.; BALJULS, A.; POLZIEN, L.; WEYAND, M; THIEL, P.; ROSE, R.; ROSE, M.; KUHENNE, P.; KAISER, M.; RAPP, U.R.; KUHLMANN, J.; OTTMANN, C. (2010) Impaired binding of 14-3-3 to CRAF in Noonan Syndrome suggests new approaches in diseases with increased Ras signaling. *Mol Cell Biol*, 30: 4698- 4711.
- MORETÓ, J.; VIDAL-QUADRAS, M.; POL, A.; SANTOS, E.; GREWAL, T.; ENRICH, C.; TEBAR, F. (2009). Differential involvement of H- and K-Ras in Raf-1 activation determines the role of calmodulin in MAPK signaling. *Cellular signaling*, 21: 1827-1836.
- MORRISON, D.K.; CUTLER, R.E.Jr. (1997). The complexity of Raf-1 regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 9: 174-179.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2013. *The Ras Program*, visto el 25 de junio de 2014. <http://www.cancer.gov/researchandfunding/priorities/ras>
- LIU, X.; JAKUBOWSKI, M.; HUNT, J.L. (2011). KRAS gene mutation in colorectal cancer is correlated with increased proliferation and spontaneous apoptosis. *Am J Clin Pathol.*, 135: 245-252.
- PADUCH, M.; JELÉN, F.; OTLEWSKI, J. (2001). Structure of small G proteins and their regulators. *Acta Biochim Pol.*, 48: 829-850.

- PATEL, M.; CÔTE, J.F. (2013) Ras GTPases' interaction with effector domains: Breaking the families' barrier. *Commun Integr Biol.*, 6: e24298.
- PIERCE, M.M.; RAMAN, C.S.; NALL, B.T. (1999) Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods*, 19: 213-221.
- PRIOR, I.A.; LEWIS, P.D.; MATTOS, C. (2012). A comprehensive survey of ras mutations in cancer. *Cancer Res.* 72: 2457–2467.
- PUMIGLIA, K.; CHOW, Y.H.; FABIAN, J.; MORRISON, D.; DECKER, S.; JOVE, R. (1995). Raf-1 N-terminal sequences necessary for Ras-Raf interaction and signal transduction. *Mol Cell Biol.*, 15: 398-406.
- QIAGEN[®], Sample & Assay Technologies, 2014. *GeneGlobe Pathways: MAPK Signaling*, visto el 1 de junio de 2014.
<http://www.qiagen.com/products/genes%20and%20pathways/pathway%20details?pwid=282>
- QUINLAN, M.P.; QUATELA, S.E.; PHILIPS, M.R.; SETTLEMAN, J. (2008) Activated Kras, but not Hras or Nras, may initiate tumors of endodermal origin via stem cell expansion. *Mol. Cell. Biol.*, 8: 2659-2674.
- RESAT, H.; STRAATSMA, T.P.; DIXON, D.A.; MILLER, J.H. (2001). The arginine finger of RasGAP helps Gln-61 align the nucleophilic water in GAP-stimulated hydrolysis of GTP. *PNAS*, 98: 6033-6038.
- ROSKOSKI R. JR. (2010). Raf protein- serine/ threonine kinases: structure and regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 399: 313-317.
- RUDOLPH, M.G.; LINNEMANN, T.; GRÜNEWALD, P.; WITTINGHOFER, A.; VETTER, I.R.; HERMANN, C. (2001) Thermodynamics of Ras/Effector and Cdc42/Effector Interactions probed by Isothermal Titration Calorimetry. *J.Biol. Chem.*, 276: 23914-23921.
- SHAO, D.D.; XUE, W.; KRALL, E.B.; BHUTKAR, A.; PICCIONI, F.; WANG, X.; SCHINZEL, A.C.; SOOD, S.; ROSENBLUH, J.; KIM, J.W.; ZWANG, Y.; ROBERTS, T.M.; ROOT, D.E.; JACKS, T.; HAHN, W.C. (2014). KRAS and YAP1 converge to regulate EMT and tumor survival. *Cell*, pendiente de publicación.
- STUDIER, F.W. (2005) Protein Production by Auto-Induction in High-Density Shaking Cultures. *Protein Expr. Purif.*, 41: 207–234.
- TONG, Y.; TEMPEL, W.; SHEN, L.; ARROWSMITH, C.H.; EDWARDS, A.M.; SUNDSTROM, M., WEIGELT, J.; BOCHKAREV, A.; PARK, H. (enviado para su publicación). Human K-Ras in complex with a GTP analogue.
- VETTER, I.R.; WITTINGHOFER, A. (2001). The guanine nucleotide- binding switch in three dimensions. *Science*, 294: 1299- 1304.
- WAN, P.T.; GARNETT, M.J.; ROE, S.M.; LEE, S.; NICULESCU- DUVEZ, D.; GOOD, V.M.; JONES, C.M.; MARSHALL, C.J.; SPRINGER, C.J.; BARFORD, D.; MARAIS, R. (2004) Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*, 116:855-867
- WANG, X.; TOURNIER C. (2006). Regulation of cellular functions by the ERK5 signalling pathway. *Cell Signal*, 18: 753-760.
- WITTINGHOFER, A.; HERMANN, C. (1995). Ras–effector interactions, the problem of specificity. *FEBS Lett*, 369: 52–56.
- YEHAIA, G.; SCHLOTTER F.; RAZAVI R.; ALESSANDRINI A.; MOLINA CA. (2001) Mitogen-Activated Protein Kinase phosphorylates and targets inducible cAMP early repressor to ubiquitin- mediated destruction. *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 35272-35279.
- ZHANG W.; LIU H.T. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*, 12: 9-18.

7. ANEXOS

ANEXO I

Tabla 2. Condiciones y mezcla de la PCR realizada a partir del vector pBabe inicial de K-Ras. La temperatura de fusión (Tm) es de 65°C de acuerdo al diseño de los cebadores y las especificaciones de la polimerasa.

PCR de K- Ras a partir de vector pBabe	
Condiciones	Mezcla
95 °C – 3’ 35 ciclos: 98°C – 20’’ 65 °C – 15’’ 72°C – 30’’ Ext. Final: 72°C – 5’	5 µL buffer HiFi (Kapa Biosystems®) 0,75µL dNTPs (Kapa Biosystems®) 0,75 µL primer FWD (K-Ras 1 FWD) 0,75 µL primer RV (K-Ras 188 RV) 1,5 µL DMSO 0,5 µL DNA molde 0,5 µL Kapa Hifi DNA polimerasa (Kapa Biosystems®) 15,25 µL H ₂ O

Tabla 3. Condiciones y mezcla de la PCR de colonia a partir de las placas de resiembra de K-Ras WT y K-Ras V12 en vectores pNKI, pNSI y pMBKI. La mezcla para los vectores recombinantes pNKI y pNSI contenían los cebadores T7 directo y T7 reverso, mientras que el vector pMBKI requería de los cebadores MBP directo y T7 reverso. La Tm es de 55°C de acuerdo al diseño de los cebadores y las especificaciones de la polimerasa.

PCR de colonia RAS WT y V12 en vectores pNKI, pNSI, pMBKI	
Condiciones	Mezcla
95 °C – 5’ 35 ciclos: 95°C – 45’’ 55 °C– 45’’ 72°C – 1’ Ext. Final: 72°C – 10’	2 µL buffer B 10X (Solis Biodyne®) 2 µL MgCl ₂ 25 mM (Solis Biodyne®) 0,4 µL dNTPs 10 mM (Kapa Biosystems®) 0,6 µL primer FWD (T7 directo, MBP directo) 0,6 µL primer RV (T7 reverso) → 1 colonia 0,2 µL DNA polimerasa Firepol® 14,2 µL H ₂ O

Tabla 4. Condiciones y mezcla de la PCR realizada a partir del vector pFAST-BAC de Raf-1. La T_m es de 55°C de acuerdo al diseño de los cebadores y las especificaciones de la polimerasa. Se prepararon hasta 4 mezclas de PCR, de acuerdo a la combinación de oligonucleótidos correspondiente a la construcción que se deseaba obtener: por ejemplo, la construcción 51-131 requería del oligonucleótido c-Raf 51 FWD y c-Raf 131 RV.

PCR de Raf-1 a partir del vector pFAST-BAC	
Condiciones	Mezcla
95 °C – 5’ 35 ciclos: 98°C – 20’’ 55 °C – 15’’ 72°C – 45’’ Ext. Final: 72°C – 5’	5 µL buffer HiFi (Kapa Biosystems®) 0,75 µL dNTPs (Kapa Biosystems®) 0,75 µL primer FWD (Sigma-Aldrich®) 0,75 µL primer RV (Sigma-Aldrich®) 1,5 µL DMSO 0,5 µL DNA molde 0,5 µL Kapa Hifi DNAPol (Kapa Biosystems®) 15,25 µL H ₂ O

Tabla 5. Condiciones y mezcla de la PCR de colonia a partir de las placas de resiembra de Raf-1 en vector pNSI. La mezcla de PCR para el vector pNSI requiere de cebador T7 directo y T7 reverso. La T_m es de 55°C de acuerdo al diseño de los cebadores y las especificaciones de la polimerasa. El tiempo de extensión fue de 2 minutos para asegurar la efectividad de la polimerasa.

PCR de colonia de las ligaciones de Raf-1 en pNSI	
Condiciones	Mezcla
95 °C – 5’ 35 ciclos: 95°C – 45’’ 55 °C – 45’’ 72°C – 2’ Ext. Final: 72°C – 10’	2 µL buffer B 10X (Solis Biodyne®) 2 µL MgCl ₂ 25 mM (Solis Biodyne®) 0,4 µL dNTPs 10 mM (Kapa Biosystems®) 0,6 µL primer FWD (T7 directo) 0,6 µL primer RV (T7 reverso) → 1 colonia 0,2 µL DNA polimerasa Firepol® 14,2 µL H ₂ O

ANEXO II

Tabla 6. Cebadores directos y reversos empleados para las mezclas de las PCR realizadas. Se muestra la combinación de pares de bases, así como la Tm, para cada uno de los oligonucleótidos diseñados tanto para K-Ras como para Raf-1. En el caso de esta última, los cebadores se diseñaron para delimitar y obtener las diferentes construcciones.

K-Ras 1 FWD	5' – CAGGGACCCGGTATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAG – 3'; Tm: 66°C
K-Ras 188 RV	5' – CGAGGAGAAGCCCGGTTACATAATTACACACTTTGTCTTTGACTTCTTTT – 3'; Tm: 64,8°C
c-Raf 1 FWD	5' – CAGGGACCCGGTATGGAGCACATACAGGGAGCTTGAAGACGATC – 3' Tm: 75°C
c-Raf 51 FWD	5' –CAGGGACCCGGTCCTTCTAAGACAAGCAACACTATCCGTGTTTTCTTGC – 3' Tm: 74,4°C
c-Raf 131 RV	5' - CGAGGAGAAGCCCGGTTACAGGAAATCTACTTGAGGTTCTTCTCCAATCAAAGACG CAG – 3' Tm: 75,7°C
c-Raf 140 RV	5' – CGAGGAGAAGCCCGGTTAGTTGTGTGTTGTGAGGGGAACATGATCCAGGAAATC – 3' Tm: 75,4°C