

UCH-FC
Biotecnología
M 827
C. 1



FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE PREGRADO

"Efecto de la fosforilación de FAK sobre la activación de la GTPasa Rab5 y la migración celular".

Entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al título de **Ingeniera en Biotecnología Molecular**.

CAROLINA FRANCISCA MORAGA PONCE

Marzo – 2016

Director del Seminario de Título: Dr. Vicente Torres Gómez



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile que el Seminario de Título presentado por la Srta. Carolina Moraga Ponce, "Efecto de la fosforilación de FAK sobre la activación de la GTPasa Rab5 y la migración celular" ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de **Ingeniera en Biotecnología Molecular**.

Dr. Vicente Torres Gómez

Director Seminario de Título

Comisión de Evaluación

Dra. Verónica Palma

Presidente Comisión

Dr. Alejandro Roth

Evaluador



Una firma manuscrita en azul sobre una línea horizontal.

Santiago, Marzo de 2016

i) Índice de Contenidos

1.- RESUMEN.....	1
2.- INTRODUCCIÓN	3
Migración celular.....	3
La quinasa FAK es un regulador clave del recambio de adhesiones focales.	5
La GTPasa Rab5 es un regulador de la migración celular.	8
3.- HIPÓTESIS.....	11
4.- OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS	11
4.1.- Objetivo General.....	11
4.2.- Objetivos Específicos.....	11
5.- DISEÑO EXPERIMENTAL.....	12
5.1.- Evaluar el efecto de la pérdida y ganancia de función de FAK sobre la actividad relativa de Rab5.....	12
5.2.- Determinar el efecto de la fosforilación de FAK, inducida durante la migración celular, sobre la activación de Rab5.	14
5.3.- Evaluar si la migración celular dependiente de la fosforilación de FAK requiere la participación de Rab5.....	16
6.- MATERIALES Y MÉTODOS	17
6.1.-Materiales	17
6.1.1.- Material biológico.....	17
6.1.2.- Reactivos.....	17

6.1.2.1.- Anticuerpos	17
6.1.2.2.- Vectores de expresión de plámidios	17
6.1.2.3.- Reactivos comerciales.....	18
6.2.- Métodos	20
6.2.1.- Cultivo de líneas celulares	20
6.2.2.- Biología molecular	20
6.2.2.1.- Generación de bacterias quimio-competentes.....	20
6.2.2.2.- Transformación de bacterias quimio-competentes.....	21
6.2.2.3.- Purificación de DNA plasmidial.....	21
6.2.3.4.- Purificación de proteína de fusión GST-R5BD.....	22
6.2.2.5.- Transfección de células A549.....	23
6.2.3.- Bioquímica.....	23
6.2.3.1.- Extracción proteínas citoplasmáticas.....	23
6.2.3.2.- Cuantificación de proteínas con BCA	23
6.2.3.3.- Pull-down de Rab5-GTP	24
6.2.3.4.- Western Blot.....	24
6.2.4.- Tratamiento con inhibidor de p-Y397-FAK	25
6.2.5.- Ensayos de migración.....	26
6.2.5.1.- Ensayo de migración por multihérida.....	26
6.2.5.2.- Ensayo de migración por expansión celular.....	26

6.2.5.3.- Ensayo de migración por trans-migración.....	26
6.2.6.- Análisis estadístico	27
7.- RESULTADOS.....	28
7.1.- La fosforilación de FAK en Tyr397 modula la activación de Rab5 en células A549.	28
7.2.- La fosforilación de FAK en Tyr397 no modifica la activación de Rab5 en células MEF.	32
7.3.- La inhibición de FAK disminuye la activación de Rab5 en estado estacionario.	34
7.4.- Ensayo de trans-migración de células A549	38
8.- DISCUSIÓN	41
8.1.- La fosforilación de FAK en Tyr397 modula la activación de Rab5 en células A549.	41
8.2.- En células MEF, la fosforilación de FAK en Tyr397 no modifica la activación de Rab5.	45
8.3.- La inhibición de FAK disminuye la activación de Rab5 en estado estacionario.	46
8.4.- Ensayo de trans-migración de células A549	48
9.- CONCLUSIONES	49
10.- BIBLIOGRAFIA	50

ii) Índice de Figuras

Figura 1.- Esquema de una célula migratoria, polarizada y sus FAs..... 4

Figura 2.- Activación de FAK..... 6

Figura 3.- El inhibidor PF-271 disminuye la fosforilación de FAK en Tyr397..... 29

Figura 4.- La inhibición de la fosforilación de FAK en Try397 disminuye la activación de Rab5..... 30

Figura 5.- La sobre-expresión de FAK/wt aumenta la activación de Rab5-..... 32

Figura 6.- La fosforilación de FAK en Tyr397 no modifica la activación de Rab5 en células MEF..... 34

Figura 7.- La inhibición de FAK disminuye la activación de Rab5 en estado estacionario..... 36

Figura 8.- Ensayo de expansión celular..... 38

Figura 9.- Ensayo de trans-migración de células A549..... 40

Figura 10.- Modelo Propuesto..... 48

iii) Listado de Abreviaturas

DMEM: Medio Esencial Modificado por Dulbecco.

DMSO: dimetilsulfóxido.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

DTT: ditioneitol.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

FBS: suero fetal bovino.

GAP: proteína activadora de GTPasas

GDP: difosfato de guanosina.

GEF: factor intercambiador de nucleótidos de guanina.

GFP: proteína fluorescente verde

GST: glutatión-S-transferasa.

GTP: trifosfato de guanosina.

GTPasa: hidrolasa de GTP.

HRP: Peroxidasa de rábano.

IgG: Inmunoglobulina G.

LB: Caldo lisogénico (*Lysogeny broth*).

PBS: Tampón fosfato salino.

PF-271: PF-562,271.

PI3K: fosfatidil inositol 3 quinasa.

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

RNA: ácido ribonucleico.

SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil-sulfato de sodio.

TBS: tampón Tris Salino.

Temed: tetrametiletilenediamina.

wt: silvestre (*wild type*)

iv) Convención de Unidades y Símbolos

<u>Concentración</u>	Moles/Litro	M, mM, μ M,
	Peso/Volumen	%(p/v)
	Peso/Peso	%(p/p)
<u>Frecuencia</u>	Revoluciones/Minuto	rpm
<u>Intensidad de corriente</u>	Amperio	A (mA)
<u>Longitud</u>	Metro	m (mm, μ m, nm)
<u>Masa</u>	Kilogramo	kg (g, mg, μ g)
<u>Masa molecular</u>	Daltons	Da (kDa)
<u>Potencial eléctrico</u>	Voltio	V (mV)
<u>Temperatura</u>	Grados Celsius	$^{\circ}$ C
<u>Tiempo</u>	Hora, Minuto y Segundo	h, min, s
<u>Volumen</u>	Litro	L (mL, μ L)

1.- RESUMEN

Las adhesiones focales son complejos multiproteicos enriquecidos en dímeros de integrina, que constituyen puntos de contacto entre las células y la matriz extracelular, y tienen un rol relevante en la integración de estímulos migratorios externos y la generación de respuestas migratorias, a través de vías de señalización específicas.

La quinasa FAK, en su conformación activa, ejerce roles regulatorios sobre la migración e invasión celular, al modular la formación y desensamblaje de las adhesiones focales, la formación de procesos de membrana y la expresión y secreción de metaloproteinasas de matriz. La activación de FAK requiere su auto-fosforilación en tirosina 397, que promueve la fosforilación de otros residuos tirosina de FAK, necesarios para su activación máxima. En células tumorales, tanto la expresión de FAK como su fosforilación en Tyr397 se encuentran exacerbadas, estableciéndose como blancos prometedores para el tratamiento del cáncer.

Por otro lado, la GTPasa Rab5 también se ha visto involucrada en la regulación del fenotipo migratorio de células tumorales; en donde, la forma activa de Rab5 (unida a GTP) induce un aumento de la migración e invasión celular. Rab5 regula la dinámica de adhesiones focales, al dirigir la internalización y reciclaje de integrinas, además, promueve su desensamblaje. Adicionalmente, Rab5-GTP induce un aumento en la activación de Rac, y en consecuencia, regula la formación de procesos de membrana. Finalmente, Rab5 promueve la invasión de células tumorales al estimular la secreción y activación de metaloproteinasas de matriz.

A pesar de que FAK y Rab5 participan en eventos similares de la migración e invasión de células tumorales, como el desensamblaje de adhesiones focales, la reorganización

de filamentos de actina mediada por Rac y la secreción de metaloproteinasas de matriz, aún no se ha establecido si existe alguna relación entre estas dos proteínas.

El objetivo de este Seminario de Título fue establecer si la fosforilación de FAK en Tyr397 promueve la activación de Rab5, y consecuentemente, favorece la migración celular. En primer lugar, se determinó que el tratamiento con el inhibidor farmacológico de FAK, PF-271, a una concentración 1 μ M, disminuye la fosforilación de FAK en Tyr397 en células de carcinoma de pulmón, A549. Luego, se determinó que la inhibición de la fosforilación de FAK en Tyr397, debido al tratamiento con PF-271 (1 μ M), promueve una disminución en la fracción activa de Rab5 en células A549 en estado estacionario. Adicionalmente, la sobre-expresión transitoria de FAK/wt aumentó los niveles de Rab5-GTP en células A549. Para establecer si la interacción funcional entre estas dos proteínas promueve la migración de células A549, se expresó de forma conjunta los plásmidos FAK/KD y Rab5/wt y se midió la capacidad migratoria en cámara de Boyden, sin embargo, no se evidenciaron cambios en la capacidad migratoria de estas células. Tomados en su conjunto, estos resultados sugieren que la fosforilación activadora de FAK regula la activación de Rab5.

2.- INTRODUCCIÓN

Migración celular

La migración celular, entendida como el movimiento de una o más células dentro de un tejido u organismo, es un fenómeno relevante en distintos procesos biológicos de los mamíferos, tales como la morfogénesis embrionaria, la regeneración de tejidos y la fisiología del sistema inmune. Consistentemente, su desregulación está vinculada a la etiología de eventos patológicos, como la tumorigénesis y la metástasis (Friedl col, 2009).

La migración celular requiere que las células se polaricen, es decir, que redistribuyan sus organelos de manera asimétrica; además, que extiendan estructuras derivadas del citoesqueleto y la membrana plasmática (lamelipodios) en la dirección del desplazamiento; y que establezcan múltiples contactos de anclaje con la matriz extracelular (ECM, por su acrónimo en inglés) en el frente de avance, los cuales deben desensamblarse en la región posterior de la célula, a medida que ésta se traslada (Ridley y col., 2003) (Fig 1A). La extensión de lamelipodios en el frente de avance y la retracción del citoplasma en la retaguardia de las células migratorias están fuertemente reguladas por GTPasas pequeñas involucradas en la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina, y por reguladores del tráfico intracelular y endosomal, como la proteína **Rab5** (Machesky y col., 2008). Por otro lado, las adhesiones focales (FA, por su acrónimo en inglés) actúan como estructuras que anclan las células a la ECM, constituyendo una conexión física entre ésta y los filamentos de actina polimerizada (Wrighton, 2013).

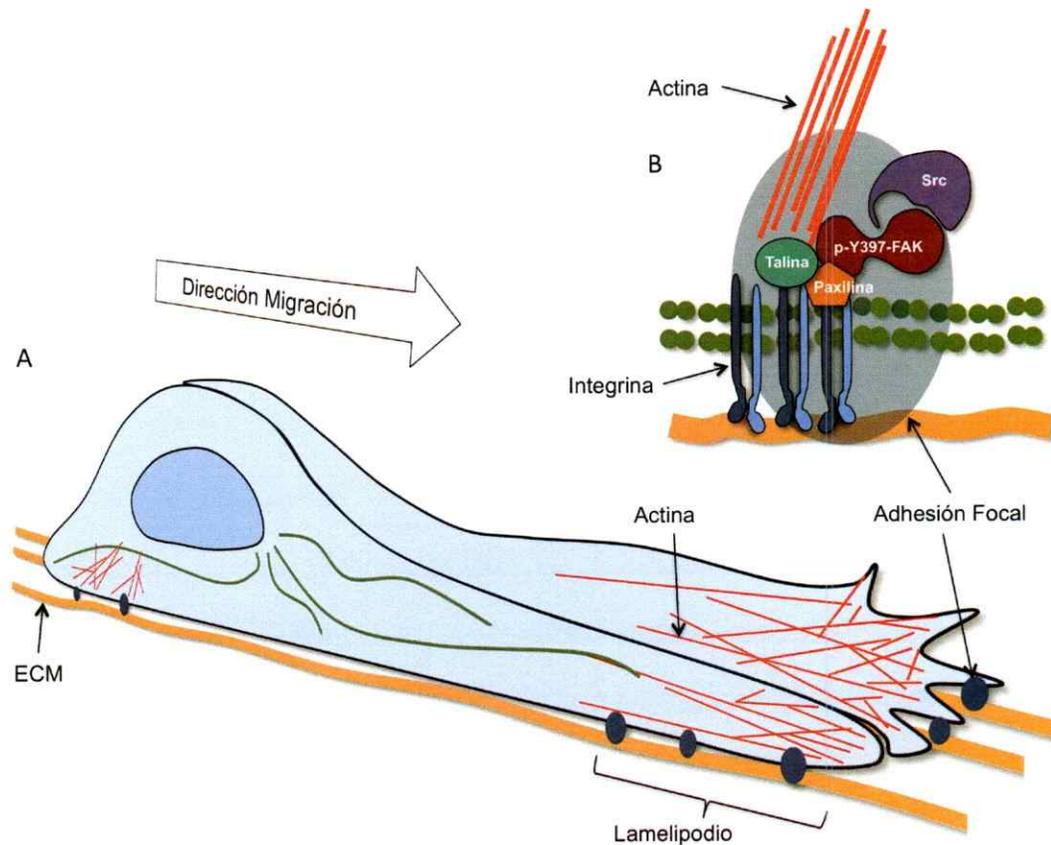


Figura 1. **Esquema de una célula migratoria, polarizada y sus FAs.** (A) En una célula polarizada las FAs constituyen puntos de anclaje a la ECM. (B) Representación simplificada de proteínas que participan en la maduración de FAs. *Fuente: Elaboración propia.*

Las FAs son complejos multiproteicos cuyo principal componente estructural son las integrinas, glicoproteínas heterodiméricas de transmembrana, cuyo dominio extracelular interactúa con la ECM (Wehrle-Haller, 2012). Las integrinas sensan estímulos bioquímicos, mecánicos y topográficos del entorno extracelular, los cuales son integrados por efectores que interactúan con sus dominios intracelulares y que forman parte de las FAs. Estos efectores pueden emitir los estímulos de la ECM a través de la activación de rutas intracelulares de señalización (Wrighton, 2013). En este

contexto, un regulador de la señalización de integrinas asociado a las FAs, la quinasa de adhesión focal (FAK, por su acrónimo en inglés), desempeña roles prominentes en la modulación de la polarización celular, la extensión de protrusiones en el frente de avance y en la retracción de la retaguardia de la célula durante la migración (Schaller, 2010).

La quinasa FAK es un regulador clave del recambio de adhesiones focales.

FAK es una proteína de 125 kDa, cuya estructura contiene tres dominios funcionales, separados por segmentos ricos en residuos prolina: un dominio FERM en el extremo amino-terminal (N-terminal), un dominio catalítico en el segmento central, con actividad quinasa sobre residuos tirosina; y un dominio FAT en el extremo carboxilo-terminal (C-terminal), necesario para la asociación a FAs (Parsons, 2003). Los dominios N- y C-terminal regulan tanto la fosforilación activadora de FAK, como su función catalítica. En su extremo N-terminal, FAK presenta un dominio auto-inhibitorio FERM que bloquea estéricamente el dominio central catalítico, enmascarando al residuo Tyr397; y consecuentemente, limitando su auto-fosforilación (Lietha y col., 2007) (Fig 2A y 2B). Por su parte, el extremo C-terminal presenta un dominio de reconocimiento de proteínas de adhesión (FAT, por sus siglas en inglés) que participa en el reclutamiento de FAK hacia las FAs; donde interactúa indirectamente con las colas citoplasmáticas de integrinas, a través de la unión con las proteínas paxilina y talina (Schlaepfer y col., 2004).

FAK posee seis residuos tirosina, cuya fosforilación regula su actividad en respuesta a diferentes estímulos: Tyr397 y Tyr407, entre la región N-terminal y el dominio catalítico;

Tyr576 y Tyr577, en el dominio quinasa; y Tyr861 y Tyr925, en la región C-terminal (Cornillon y col., 2003; Mitra y col., 2005). Se ha demostrado que la auto-fosforilación en Tyr397 es un evento que promueve el reclutamiento de otras quinasas capaces de fosforilar a FAK en sus otros residuos regulatorios y, por este motivo, se le denomina fosforilación activadora (Mitra y col., 2005). Particularmente, en respuesta a la adhesión, la auto-fosforilación de FAK genera un sitio de unión a proteínas con dominios SH2, como la quinasa Src, la que promueve la fosforilación de FAK en los residuos Tyr576 y Tyr577, confiriendo su activación máxima (Calalb y col., 1995; Owen y col., 1999) (Fig 2C).

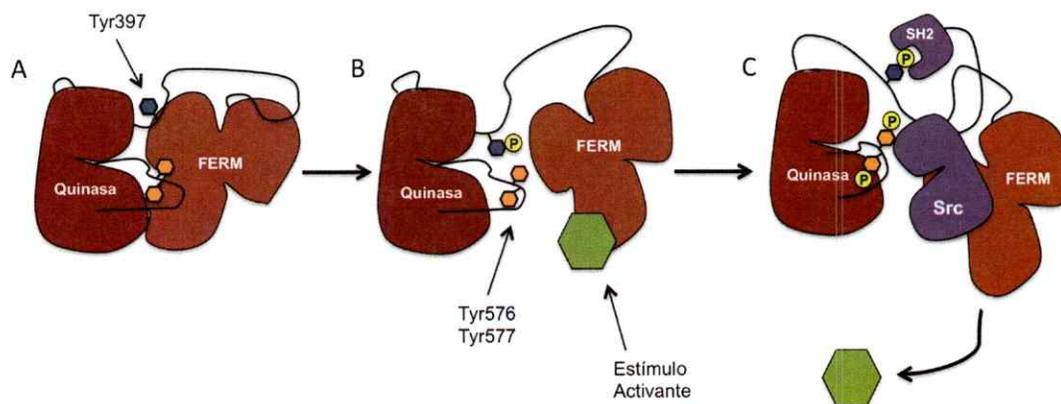


Figura 2. **Activación de FAK.** Con fines de simplificación sólo se muestran los dominios FERM y quinasa de FAK. (A) Conformación cerrada o auto-inhibida de FAK. (B) En presencia de un estímulo activador, el dominio FERM libera el dominio quinasa, permitiendo la auto-fosforilación de FAK en Tyr397. (C) p-Y397-FAK recluta a Src, la que promueve la fosforilación de Tyr576 y Tyr577. *Modificado de Lietha y col., 2007.*

Cuando una célula epitelial entra en contacto con componentes de la ECM (por ejemplo, fibronectina) se promueve la activación y agrupamiento de integrina, su

asociación con proteínas intracelulares como paxilina, talina y el reclutamiento de FAK en las FAs nacientes (Mitra y Schlaepfer, 2006). Durante la maduración de las FAs nacientes, el dominio FERM de FAK recluta al complejo Arp2/3. La tensión del citoesqueleto de actina, la interacción con proteínas y fosfolípidos (PI(4,5)P₂), y la dimerización de FAK (Tomar y Schlaepfer, 2009; Brami-Cherrier y col., 2014; Goñi y col., 2014), promueven la liberación del dominio quinasa y, en consecuencia, la autofosforilación de Tyr397 (Fig 2B). La activación de FAK inhibe la interacción del dominio FERM con el complejo Arp2/3, favoreciendo la nucleación de filamentos de actina en la proximidad de la FA y, así la formación de lameliopodios, la polarización celular y la migración direccional (Tomar y Schlaepfer, 2009). Curiosamente, se ha reportado que la fosforilación de FAK en Tyr397 también promueve un aumento de la activación de integrina $\alpha 5\beta 1$, incrementando la adhesión celular a la ECM (Michael y col., 2009); lo que sugiere que existe una activación sinérgica entre FAK y dímeros de integrina.

En fibroblastos FAK^{-/-} se reportó una disminución de la migración y un aumento del número de FAs *in vitro* (Ilic y col., 1995), sugiriendo que FAK es necesaria para el desensamblaje de las FAs (Webb y col., 2004). Complementario a esto, se observó que la fosforilación en Tyr397 induce el desensamblaje de las FAs en el extremo posterior de las células, promoviendo un aumento de la migración celular (Hamadi y col., 2005). De este modo, FAK no solo participa en la maduración de las FAs, sino que también en su desensamblaje, por lo que ha sido considerada como un regulador maestro del recambio de las FAs (Tomar y Schlaepfer, 2009).

Por otro lado, se ha descrito que FAK no solo participa en la migración celular, sino que promueve la invasión y metástasis de células tumorales (Sulzmaier y col., 2014). El reclutamiento y fosforilación activadora de FAK en las FAs nacientes promueve la

invasión local de células de carcinoma de colon (Yu y col., 2011). Otros estudios indican que la activación de FAK modula la expresión y localización de las metaloproteinasas de matriz MMP-2, MMP-9 y MMP-14 (Lu y col., 2014; Mitra y col., 2006), promoviendo la degradación de la ECM y, en consecuencia, la invasión y metástasis de células tumorales. En tejidos tumorales se ha observado una correlación entre la progresión tumoral y el grado de fosforilación de FAK en Tyr397, sugiriendo que la actividad de FAK es relevante en la promoción del cáncer (Zhao y Guan, 2009).

La GTPasa Rab5 es un regulador de la migración celular.

Rab5 es una proteína monomérica (24kDa) con actividad GTP hidrolasa (GTPasa), perteneciente a la superfamilia de proteínas Ras. Rab5 participa en la regulación del tráfico de vesículas (Stenmark, 2009). Específicamente, se ha reportado que Rab5 es necesario para la fusión homotípica de endosomas tempranos (Rubino y col., 2000), y que promueve la formación de fosfatidil-inositol 3-fosfato en regiones determinadas de la membrana de los endosomas tempranos (Christoforidis y col., 1999). Rab5 puede ser encontrada en dos conformaciones: unida a GTP o a GDP, las que se asocian a diferentes funciones biológicas. Debido a que Rab5 es reconocida por la mayoría de sus efectores cuando se encuentra unida a GTP, es que a esta conformación se le denomina "activa", mientras que la hidrólisis de GTP a GDP, redundando en su inactivación (Pfeffer y Aivazian, 2004). En las células existe un equilibrio dinámico entre las configuraciones activa e inactiva de Rab5, las cuales son promovidas por proteínas GEFs (factor intercambiador de nucleótidos de guanina, por sus siglas en inglés) y GAPs (proteína activadora de GTPasas, por sus siglas en inglés), respectivamente (Barr y Lambright, 2010).

En los últimos años, diversas proteínas Rab han sido involucradas en la promoción de la migración e invasión de células tumorales (Tang y Ng, 2009), sugiriendo que el tráfico de vesículas podría ser un factor relevante en la regulación de la motilidad celular. En este contexto, Rab5 también ha sido correlacionada con la migración e invasión celular (Torres y Stupack, 2011).

La regulación de la migración ejercida por Rab5 ha sido evidenciada en modelos *in vitro* e *in vivo* en los que se observó que Rab5 promueve el reclutamiento de Tiam 1 (GEF de la proteína Rac) en los endosomas tempranos, fenómeno que activa localmente a Rac, promueve la reorganización del citoesqueleto de actina e inicia la formación de lamelipodios y *ruffles* de membrana (Palamidessi y col., 2008; Diaz y col., 2014). Sin embargo, Rab5 también ha sido involucrado en la formación de lamelipodios, a través de mecanismos que no dependen de Rac (Spaargaren y Bos, 1999). Esto evidencia la versatilidad de rutas que podrían estar involucradas en la promoción de la migración celular mediada por Rab5. Interesantemente, FAK también regula la activación de Rac y su localización a las FAs, mediante la fosforilación y activación de otra GEF de Rac1, β PIX (Chang y col., 2007).

Como se mencionó anteriormente, la interacción entre la ECM y heterodímeros de integrina gatilla señales intracelulares que median la generación de respuestas específicas como la migración celular. Un mecanismo de regulación de estas señales está dado por el remodelamiento de FAs a través del tráfico endocítico de integrinas, ya sea su reciclaje hacia la membrana plasmática o su degradación (De Franceschi y col., 2015). Modelos *in vivo* e *in vitro* indican que Rab5 regula la internalización de integrina β 1 y su tráfico a través de endosomas tempranos (Pellinen y col., 2006; Yuan y col., 2010); y específicamente, se ha observado que la activación de Rab5 promueve

su interacción con integrina $\beta 1$ (Torres y col., 2010). Adicionalmente, se ha reportado que Rab5-GTP aumenta la migración y metástasis de células de neuroblastoma, mediante un aumento en la tasa de la internalización y reciclaje de integrina $\beta 1$ (Torres y col., 2010).

Estudios recientes de nuestro laboratorio han demostrado que la activación de Rab5 promueve el desensamblaje de FAs y la actividad de metaloproteinasas de matriz (MMP-2 y MMP-9) y, en consecuencia, la migración e invasión de células tumorales, respectivamente (Mendoza y col., 2013). Adicionalmente, se observó que la activación de Rab5 promueve su re-localización hacia el frente de avance de células polarizadas, donde interactúa con proteínas que componen las FAs, como integrina $\beta 1$, paxilina, vinculina y FAK (Mendoza y col., 2013; Mendoza y col., 2014). Estos antecedentes sugieren que FAK estaría involucrada en el fomento de la invasión celular por Rab5-GTP, pues la inhibición de la fosforilación de FAK en Tyr397 limita la invasión promovida por Rab5.

Debido a que FAK y Rab5 participan en eventos similares de la migración e invasión de células tumorales –desensamblaje de FAs, reorganización de filamentos de actina mediada por Rac y secreción de metaloproteinasas de matriz, entre otros–, cabe preguntarse si ambas proteínas podrían estar participando de una vía de señalización en común, que promueva la migración e invasión celular. En este contexto, este Seminario de Título explora la posibilidad de que FAK regule la actividad de la GTPasa Rab5 durante la migración celular.

3.- HIPÓTESIS

La quinasa de adhesión focal FAK promueve la activación de la GTPasa Rab5 y, consecuentemente, favorece la migración celular.

4.- OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS

4.1.- Objetivo General

Evaluar si FAK estimula la activación de la GTPasa Rab5 y, en consecuencia, la migración celular en las líneas celulares A549 y MEF.

4.2.- Objetivos Específicos

- 1.- Evaluar el efecto de la pérdida y ganancia de función de FAK sobre la actividad relativa de Rab5.
- 2.- Determinar el efecto de la fosforilación de FAK, durante la migración celular, sobre la activación de Rab5.
- 3.- Evaluar si la migración celular dependiente de la fosforilación de FAK requiere la participación de Rab5.

5.- DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1.- Evaluar el efecto de la pérdida y ganancia de función de FAK sobre la actividad relativa de Rab5.

Se empleó como modelo células A549 de adenocarcinoma de pulmón humano, pues éstas presentan un fenotipo altamente migratorio en relación a otras células tumorales; y han sido utilizadas en el estudio de la migración celular mediada por FAK (Meng y col., 2009) y Rab5 (Mendoza y col., 2013).

Para evaluar si la fosforilación activadora de FAK regula la activación de Rab5 en células A549, se utilizaron dos estrategias: (1) tratamiento con un inhibidor farmacológico selectivo de FAK, PF-562,271; y (2) modelos genéticos de pérdida y ganancia de función de FAK. En ambos casos, se determinó la abundancia de Rab5-GTP y se comparó contra una condición control.

El compuesto PF-562,271 (PF-271) es un inhibidor competitivo del sitio de unión a ATP de la proteína FAK frecuentemente utilizado en estudios terapéuticos de cáncer que analizan el rol de FAK (Crompton y col., 2013; Wendt y col., 2009).

Con el fin de determinar la concentración de PF-271 necesaria para producir una inhibición de FAK igual o mayor al 50% *in vitro*, células A549 fueron tratadas con PF-271 a concentraciones finales de 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM , 2 μM y 5 μM , o con DMSO (un volumen equivalente a la concentración 1 μM) durante 2 horas; y luego se analizó los niveles de fosforilación de FAK en Tyr397 en los homogeneizados mediante *Western blot*, usando anticuerpos específicos para FAK y p-Y397-FAK. Para cada condición, los niveles de fosforilación de FAK fueron determinados como el cociente entre las densitometrías de p-Y397-FAK y FAK total. Se estableció que una concentración de 1



μM es suficiente para producir una inhibición mayor al 50% en células A549. Debido que esta concentración coincide con lo reportado en la literatura (Weis y col., 2008), se utilizó en los experimentos posteriores.

A continuación, se evaluó los niveles de Rab5-GTP en células A549 que fueron tratadas con DMSO o PF-271 $1 \mu\text{M}$ durante 2 h. La activación de Rab5 fue determinada mediante ensayos de precipitación por afinidad de Rab5-GTP (*pull-down*), comparando la cantidad de Rab5 activo con el total de Rab5 presente en los extractos proteicos, mediante *Western blot*. Brevemente, el ensayo de *pull-down* permite enriquecer la concentración de Rab5-GTP desde un extracto proteico. Para ello se incubó el homogeneizado con la proteína de fusión GST-R5BD (dominio de unión de Rabaptin5 a Rab5-GTP; Mendoza y col., 2013) inmovilizada en perlas de sefarosa-glutatin; y se procede a precipitar las perlas, proceso que arrastra Rab5-GTP.

Como estrategia complementaria a la inhibición farmacológica de la fosforilación de FAK, se sobre-expresaron mutantes de pérdida y ganancia de función de FAK mediante transfección. Como modelo de pérdida de función se ocupó el plásmido pEGFP-C1-FAK/K454R (GFP-FAK/KD) que codifica para una proteína FAK que es incapaz de auto-fosforilarse en Tyr397 (Lim y col., 2010). Por el contrario, el plásmido pEGFP-C1-FAK/Y180AM183A (GFP-FAK/CA) fue utilizado como modelo de ganancia de función, pues codifica para una proteína FAK que presenta una conformación abierta que favorece su fosforilación en Tyr397 (Chen y col., 2012). Por último, se utilizó el plásmido pEGFP-C1-FAK/wt para sobre-expresar FAK, y como condición control se ocupó el plásmido pEGFP-C1. De este modo se establecieron las siguientes condiciones experimentales: GFP, GFP-FAK/wt, GFP-FAK/KD y GFP-FAK/CA; a las que se les realizó ensayos de *pull-down*, 18 horas post-transfección. La expresión de

FAK exógena y los niveles de Rab5 unido a GTP fueron analizados mediante *western blot*.

Finalmente, y con el propósito de ampliar las conclusiones obtenidas anteriormente, se estudió posibles variaciones de la fracción activa de Rab5 debido a diferencias en la fosforilación de FAK en células no tumorales. Por esto, se utilizó cuatro sublíneas celulares de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF): **FAK^{+/+}** (cepa silvestre), **FAK^{-/-}** (FAK *knockout*), **FAK^{-/-}/GFP-FAK/wt** (FAK *knockout* reconstituida establemente con GFP-FAK/wt) y **FAK^{-/-}/GFP-FAK/KD** (FAK *knockout* reconstituida establemente con GFP-FAK/K454R), las que han sido utilizadas previamente en ensayos de migración celular (Tomar y col., 2009).

En primer lugar se evaluó los niveles de fosforilación de FAK en Tyr397 en cada una de las sublíneas mencionadas de las condiciones y, posteriormente se determinó los niveles de Rab5-GTP mediante ensayos de *pull-down*. Los niveles de p-Y397-FAK y Rab5 activo fueron analizados mediante *Western blot*.

5.2.- Determinar el efecto de la fosforilación de FAK, inducida durante la migración celular, sobre la activación de Rab5.

De manera complementaria a los estudios realizados en el Objetivo Específico 1, se evaluó las variaciones en la fracción activa de Rab5 en células A549 que fueron expuestas a un estímulo migratorio. Dicho estímulo fue provocado con el fin de aumentar la fosforilación de FAK y fue realizado mediante dos ensayos de migración complementarios: (1) multihierida y (2) expansión celular.

El ensayo de migración por multihierida (MH) corresponde a la remoción parcial de células adheridas de una monocapa, generando espacios vacíos en la ECM donde las

células adyacentes pueden formar nuevas FA y, consecuentemente, migrar. Células A549 fueron incubadas por 1 h con DMEM HG 2% FBS en presencia (**MH/PF-271 1 μ M**) o ausencia (**MH/DMSO**) del inhibidor y fueron mantenidas a 37° C con humedad controlada del 95% y un 5% de CO₂. Luego, se realizó una multiherida y se incubó nuevamente por 1 h manteniendo las condiciones mencionadas anteriormente. Como condición control (no-multiherida) las células fueron mantenidas en estado estacionario (EE). Para ello, células A549 fueron incubadas por 2 h con DMEM HG 2% FBS en presencia (**EE/PF-271 1 μ M**) o ausencia (**EE/DMSO**) del inhibidor a 37° C con humedad controlada del 95% y un 5% de CO₂. A continuación, se realizó ensayos de *pull-down* a las cuatro condiciones experimentales antes mencionadas. Los niveles de fosforilación de FAK en Tyr397 y Rab5-GTP fueron analizados mediante *Western blot*.

De forma análoga, se estimuló la fosforilación de FAK mediante un ensayo de migración por expansión celular. El ensayo de expansión celular (Exp) permite simular las primeras etapas de la migración en dos dimensiones: la formación de procesos de membrana y de FAs con la matriz extracelular. Metodológicamente, se siembran células A549 sobre placas recubiertas con fibronectina (2 μ g/ μ L) e incuban con DMEM HG 10% FBS en presencia (**Exp/PF-271 1 μ M**) o ausencia del inhibidor (**Exp/DMSO**). Las células fueron mantenidas a 37° C con humedad controlada del 95% y un 5% de CO₂. Como condición control (no-expansión celular) las células resuspendidas fueron mantenidas en suspensión (Susp) a 4° C en DMEM HG en presencia (**Susp/PF-271 1 μ M**) o ausencia del inhibidor (**Susp/DMSO**). Luego de 2 h se realizó ensayos de *pull-down* a las cuatro condiciones experimentales antes mencionadas. Los niveles de fosforilación de FAK en Tyr397 y la activación de Rab5 fueron analizados mediante *Western blot*.

5.3.- Evaluar si la migración celular dependiente de la fosforilación de FAK requiere la participación de Rab5.

Para evaluar si la activación de Rab5 es requerida durante la migración celular inducida por FAK, se comparó la migración de células A549 co-transfectadas con pEGFP-C1-FAK/KD y pEGFP-C1-Rab5/wt. La expresión de FAK/KD promueve una disminución de la migración celular (Tomar y col., 2009); mientras que la expresión del Rab5/wt, aumenta la capacidad migratoria de células A459 (Mendoza y col., 2013). Por lo tanto, en células A549 se sobre-expresó **GFP-FAK/KD** y **GFP-Rab5/wt**. Adicionalmente, se establecieron otras tres condiciones: control de transfección (**GFP**), control de sobre-expresión de Rab5 (**GFP-Rab5/wt**) y control de dominancia negativa de FAK (**GFP-FAK/KD**). Como ambos plásmidos se encuentran asociados a GFP, las dos últimas condiciones mencionadas, fueron adicionalmente co-transfectadas con GFP. La capacidad migratoria fue determinada mediante ensayos de trans-migración a las 24 horas post transfección. La trans-migración fue realizada por 2 h a 37° C con humedad controlada del 95% y un 5% de CO₂; se utilizó como estímulo FBS al 10%. La expresión de los plásmidos fue corroborada mediante *Western blot*, utilizando anticuerpos contra GFP y FAK.

6.- MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.-Materiales

6.1.1.- Material biológico

Se utilizaron células A549 (*American Type Culture Cell: CCL-185*), derivadas de adenocarcinoma de epitelio pulmonar humano, y MEF (fibroblastos embrionarios de ratón, por su acrónimo en inglés). Adicionalmente, se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* DH5 α para la purificación de DNA y BL21 para la purificación de la proteína de fusión GST-R5BD, contenida en el plásmido pGEX-6P4.

6.1.2.- Reactivos

6.1.2.1.- Anticuerpos

Se utilizaron los anticuerpos primarios IgG monoclonales: Rab5 (D-11) (Santa Cruz®, sc-46692) y FAK (H-1) (Santa Cruz®, sc-1688) producidos en ratón; y policlonales: FAK fosforilada en tirosina 397 (Cell Signaling Technology®, #3283), Actina (20-33) (Sigma-Aldrich®, A5060) y GFP (Santa Cruz®, sc-8334), producidos en conejo. Adicionalmente, se utilizaron los anticuerpos secundarios IgG policlonales (H+L) acoplados a HRP contra ratón (KPL®, 074-1806) y conejo (KPL®, 074-1516) producidos en cabra.

6.1.2.2.- Vectores de expresión de plámidos

Se utilizaron los plásmidos pEGFP-C1-Rab5/wt y pEGFP-C1-Rab5/S34N para estudiar los efectos de la sobre-expresión de Rab5; como control se utilizó el plásmido vacío pEGFP-C1 (Mendoza y col., 2013). Para evaluar la participación de la fosforilación de

la proteína FAK en la activación de Rab5, se utilizaron los siguientes plásmidos: pEGFP-C1-FAK/wt, pEGFP-C1-FAK/K454R y pEGFP-C1-FAK/Y180AM183A, para los que se usó pEGFP-C1 como control (Lim y col., 2010; Chen y col., 2012). Adicionalmente, se transformaron bacterias con el plásmido pGEX-6P14-GST-R5BD para la purificación de proteína de fusión utilizada en los ensayos de *pull-down* (Torres y col., 2008)

6.1.2.3.- Reactivos comerciales

Los medios utilizados para la mantención y propagación de células A549 y MEF fueron: DMEM *high glucose* (HG, por sus siglas en inglés) (4,5 g/L glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio), tripsina al 0,25% EDTA 2,21 mM, suero fetal bovino, tampón fosfato salino y antibióticos penicilina (10 U/mL) y estreptomina (10 ug/mL) (Corning®). Adicionalmente, se utilizó lipofectamina 'Lipofectamine 2000' (Invitrogen®) para la transfección y fibronectina (Sigma-Aldrich®). El inhibidor farmacológico PF-562,271 se obtuvo de Pfizer Inc. y fue reconstituido en DMSO (Merck®).

Para la propagación de cultivos bacterianos se utilizó triptona, extracto de levadura, agar (Becton, Dickinson & Co.), ampicilina y kanamicina (US Biological).

En los experimentos bioquímicos se utilizó bisacrilamida (BioRad), Temed (Merck®), persulfato de amonio (APS) (Sigma-Aldrich®), estándar de peso molecular de proteínas (BioRad), membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm (GE Healthcare), reactivos de quimioluminiscencia EZ-ECL (Biological Industries LTD) y sefaroza-glutación (GE Healthcare).

Para las siguientes soluciones se utilizaron ácidos, bases, sales, alcoholes y detergentes de calidad analítica:

- Tampón de carga de proteínas 5X: Tris Base 156 mM; glicerol 25% (v/v); SDS 7.5% (p/v); β -mercaptoetanol 14,4 mM y azul de bromofenol pH 6,8 0,1%(p/v).
- Tampón de electroforesis: Tris Base 25 mM; glicina 232 mM pH 8;3 y SDS 0,1% (p/v).
- Tampón de gel de resolución: Tris Base pH 6,8 125 mM; SDS 0,1% (p/v); APS 0,06% (v/v) y Temed 0,3% (v/v).
- Tampón de gel concentrador: Tris Base pH 8,8 375 mM; SDS 0,1% (p/v); APS 0,045% (p/v) y Temed 0,15% (v/v).
- Tampón de lavado: HEPES pH 7,4 25mM; NaCl 100mM; $MgCl_2$ 5 mM; NP-40 0,01%; glicerol 10%; DTT 1mM; Na_3VO_4 1 mM; PMSF 1 mM, benzamidina 10 ug/mL, antipaina 2 ug/mL y leupeptina 1 ug/mL.
- Tampón de lisis (*pull-down*): HEPES pH 7,4 25 mM; NaCl 100 mM; $MgCl_2$ 5 mM; NP-40 1%; glicerol 10%; DTT 1 mM; Na_3VO_4 1 mM; PMSF 1 mM, benzamidina 10 ug/mL, antipaina 2 ug/mL y leupeptina 1 ug/mL.
- Tampón de lisis (purificación proteínas): HEPES pH 7,4 20 mM; NaCl 120 mM; glicerol 10%; EDTA 2 mM; PMSF 1 mM, benzamidina 10 ug/mL, antipaina 2 ug/mL y leupeptina 1 ug/mL.
- Tampón de transferencia: Tris Base 25 mM; glicina 200 mM; SDS 0,1% (p/v) y metanol 20% (v/v).
- Tampón fosfato salino 1X: NaCl 1,37 M; KCl 27 mM; Na_2HPO_4 100 mM y KH_2PO_4 18 mM.
- Tampón tris salino-Tween (TBST): Tris Base pH 7,4 200 mM; 132 mM NaCl y Tween 20 al 0,1%.

6.2.- Métodos

6.2.1.- Cultivo de líneas celulares

Las líneas celulares A549 y MEF fueron cultivadas utilizando el mismo protocolo: se descongeló un vial de células en baño termostático a 37° C y la suspensión de células fue lavada en 3 mL de DMEM HG 10% FBS. Se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. El *pellet* fue resuspendido con 1 mL de DMEM HG 10% FBS y sembrado en una placa 60 mm con 3 mL del mismo medio de resuspensión. Las células A549 fueron mantenidas a 37° C con humedad controlada del 95% y un 5% de CO₂; y fueron sub-cultivadas cada 3 - 4 días (evitando que alcanzaran una confluencia mayor al 90%) realizando el siguiente procedimiento: se desechó el medio de cultivo y las células fueron lavadas con PBS 1X. A continuación se les agregó 500-200 µL de tripsina-EDTA (dependiendo del tamaño de la placa) y se incubaron por 1 min a 37° C; se centrifugó la suspensión de células a 1500 rpm durante 5 min y se desechó el sobrenadante. Luego, el *pellet* fue resuspendido en 1 mL DMEM HG 10% FBS mediante pipeteo.

Antes de sembrar las células MEF, las placas fueron pre-tratadas con PBS 1X / 0,01% gelatina durante 1 h a 37° C y fueron lavadas con PBS 1X.

6.2.2.- Biología molecular

6.2.2.1.- Generación de bacterias quimio-competentes

Se incubó una asada de bacterias de *E. coli* DH5α en un tubo cilíndrico de 50 mL con 20 mL de medio LB estéril a 37° C en agitación por 5 - 6 h. Luego, se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. El *pellet* fue resuspendido en 10 mL de CaCl₂ 50 mM estéril y se centrifugó por 5 min a 5000 rpm, desechando el

sobrenadante. Nuevamente, se resuspendió el *pellet* en 10 mL de CaCl₂ 50mM estéril y se incubó por 30 min a 4° C. Estas bacterias, denominadas competentes, fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. Finalmente, el *pellet* se resuspendió en 1 mL de CaCl₂ 50 mM estéril frío. Alícuotas de 500 µL fueron mantenidas a 4° C para su posterior utilización.

6.2.2.2.- Transformación de bacterias quimio-competentes

Se incubó 500 µL de bacterias DH5α quimio-competentes con 200 - 1000 ng de DNA plasmidial por 30 min a 4° C. Luego, se incubó a 42° C durante 45 s y se agregó 2 mL de medio LB estéril y se incubó por 90 min a 37° C con agitación. A continuación, se sembró 500 µL del cultivo bacteriano en una placa con medio LB estéril agar suplementado con antibiótico (ampicilina o kanamicina según corresponda) y se incubó durante toda la noche a 37° C.

6.2.2.3.- Purificación de DNA plasmidial

Se picó una colonia de bacterias DH5α transformadas y se inoculó en un tubo cilíndrico de 15 mL con 6 mL de medio LB estéril suplementado con antibiótico, el que se mantuvo en agitación por 5 - 6 h a 37° C. En un matraz Erlenmeyer con 200 mL de medio LB estéril suplementado con antibiótico se inoculó 20 mL del pre-inóculo y se dejó toda la noche en agitación a 37° C. El cultivo bacteriano fue transferido a tubos cilíndricos de 50 mL, los que fueron centrifugados a 4000 g por 10 min. Para la purificación de DNA plasmidial se utilizó el *kit* "HiPure Plasmid Filter Midiprep" (Invitrogen™).

6.2.3.4.- Purificación de proteína de fusión GST-R5BD

Se picó una colonia de bacterias BL21 transformadas con el plásmido pGEX GST-R5BD y se inoculó en un tubo cilíndrico de 15 mL con 6 mL de medio LB estéril suplementado con ampicilina 50 µg/mL (LB ampicilina), el que se mantuvo en agitación por 5 - 6 h a 37 °C. En un matraz Erlenmeyer con 200 mL de medio LB ampicilina se inoculó 200 µL del pre-inóculo y se dejó toda la noche en agitación a 37° C. Se agregó 200 mL medio LB ampicilina con IPTG 0,3 mM y se incubó en agitación a 37° C por 2,5 h. Luego, el cultivo bacteriano fue transferido a tubos cilíndricos de 50 mL, los que fueron centrifugados a 4000 rpm por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron la bacterias en 4 mL tampón lisis (purificación proteínas). Luego, se sonicó dos veces durante 15 s a 25 Watts, con un descanso de 1 min en hielo. Se agregó NP-40 0,5% con tal que el volumen final fuera de 6 mL y se incubó durante 1 h a 4° C en rotación. A continuación, se centrifugó a 11000 rpm durante 40 min a 4° C y se recuperó el sobrenadante en un tubo cilíndrico de 15 mL. Se agregó 600 µL de sefarsa-glutación y se incubó por 1 h a 4° C en agitación. Luego, se realizaron cinco lavados los que consistían se centrifugar por 1 min a 1200 rpm, desechar el sobrenadante y resuspender la resina en 800 µL de tampón lisis (purificación proteínas) NP-40 0,5%. Siguiendo las condiciones antes descritas se realizaron tres lavados con 800 µL de tampón lisis (purificación proteínas) sin NP-40. Finalmente, la resina se resuspendió en un volumen de glicerol y se generaron alícuotas de 50 µL, las que fueron enfriadas rápidamente en una solución de metanol con hielo seco y almacenadas a -80° C hasta su utilización.

6.2.2.5.- Transfección de células A549

Se utilizaron cultivos celulares con un 60-80% de confluencia y que fueron sembrados el día anterior. Se agregó 1,5 - 4 µg de DNA a tubos de 1,5 mL con 250 µL de DMEM HG; y, en otro tubo, 2,5 µL de lipofectamina por cada µg de DNA utilizado. A continuación, ambas soluciones fueron mezcladas y se dejaron incubar por 20 min a temperatura ambiente. Se vertió el complejo DNA-lipofectamina en cada placa con medio de cultivo por DMEM HG, las que se incubaron por 4 h a 37° C con 5% CO₂ y humedad controlada del 95%; al cabo de ese tiempo, se cambió el medio por DMEM HG 10% FBS. Mediante inspección visual en microscopio de epifluorescencia, se verificó la expresión de GFP en un porcentaje de células consistente con la eficiencia del método utilizado (30-40%).

6.2.3.- Bioquímica

6.2.3.1.- Extracción proteínas citoplasmáticas

Se dispuso las placas de cultivo sobre hielo, se desechó el medio de cultivo y se lavó el medio residual con PBS 1X frío. Se eliminó todo el excedente de PBS y se agregó tampón de lisis (*pull-down*) 100-700 uL, removiendo las células adheridas con una espátula. La solución de células fue transferida a un tubo de microcentrifuga de 1,5 mL y se incubó en hielo por máximo 5 min. Luego, se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min a 4° C y se recuperó el sobrenadante.

6.2.3.2.- Cuantificación de proteínas con BCA

La concentración de proteínas en µg/mL fue determinada mediante el método del ácido bicinonínico (BCA). Se prepararon muestras con 1,25 µL de extractos de proteína citoplasmática frescos, 11,25 µL de agua destilada, 100 µL de solución BCA 'A' y 2 µL

de solución BCA 'B', y se incubaron a 37° C por 30 min. A continuación, las muestras se dejaron en hielo y se procedió a cuantificar en espectrofotómetro BioPhotometer Plus (Eppendorf) a una absorbancia de 562 nm.

6.2.3.3.- Pull-down de Rab5-GTP

Placas de cultivo de 100 mm con un 90% de confluencia fueron dispuestas sobre hielo. Se desechó el medio de cultivo y se lavó con PBS 1X frío. Se eliminó todo el excedente de PBS y se agregó 450-700 µL de tampón de lisis (*pull-down*) y se removió las células adheridas con una espátula. La suspensión de células fue transferida a un tubo de 1,5 mL; inmediatamente se centrifugó durante 45 s a 10000 rpm a 4° C y se recuperó el sobrenadante. Se incubó 400-600 µL de extracto de proteínas con 30 µg de proteína de fusión GST-R5BD durante 15 min a 4° C en agitador rotatorio. Luego, se centrifugó durante 45 s a 3000 rpm a 4° C y se eliminó el sobrenadante. A continuación, se realizó dos lavados, para los que se realizó el siguiente procedimiento: se resuspendió el *pellet* en 500 µL de tampón de lavado, se procedió a centrifugar a 3000 rpm durante 45 s a 4° C y se desechó el sobrenadante. Finalmente, se agregó 10 µL de tampón de carga.

El extracto de proteínas restante (que no fue incubado con la proteína de fusión) fue utilizado como control de carga. Para cada condición se utilizó 10 µL del extracto de proteínas, 6 µL agua destilada y 4 µL de tampón de carga; realizándose en triplicado para cada condición.

6.2.3.4.- Western Blot

Se prepararon geles de resolución de bisacrilamida de 8 - 12% dependiendo del tamaño de las proteínas analizadas y gel concentrador al 4% de bisacrilamida.

Los geles fueron sumergidos en tampón de electroforesis y se cargó 30 - 100 µg de proteína en cada pocillo. Luego, se efectuó la electroforesis manteniendo un voltaje de 50 - 100 V. A continuación, se transfirieron las proteínas desde los geles de bisacrilamida hacia membranas de nitrocelulosa aplicando una voltaje constante de 30 V durante toda la noche; para ello, cada *sandwich* fue sumergido en tampón de transferencia.

Cada membrana se bloqueó con TBST 5% gelatina por 1 - 4 h y se incubó con anticuerpo primario durante toda la noche a 4° C en agitación; utilizando las diluciones recomendadas por el fabricante. Luego, se realizaron tres lavados de 5 min con TBST y se incubó con anticuerpo secundario por 1 h en agitación. Las membranas fueron reveladas utilizando los reactivos de quimio-luminiscencia ECL, en un fotodocumentador Amersham Imager 600 (GE Healthcare). Se realizó una cuantificación densitométrica de las imágenes digitales entregadas por el equipo con el programa de distribución abierta del software ImageJ, FIJI.

6.2.4.- Tratamiento con inhibidor de p-Y397-FAK

El inhibidor PF-562,271 fue reconstituido en DMSO generándose stocks con una concentración de 1 mM. Acorde a las recomendaciones del fabricante, las alícuotas fueron mantenidas a -20° C en oscuridad y no fueron reutilizadas después de su descongelamiento. Para la realización de los tratamientos, se incubaron las células con concentraciones variables (0,1 - 5 µM) del inhibidor a 37° C, 5% CO₂ y humedad controlada del 95% durante 2 h. Como control se utilizó 2 µL de DMSO.

6.2.5.- Ensayos de migración

6.2.5.1.- Ensayo de migración por multiterida

Se utilizaron placas de 100 mm con células en monocapa (100% de confluencia) sembradas el día anterior. Con la ayuda de una peineta metálica se rayaron las placas varias veces, con la fuerza suficiente para desprender las células adheridas. A continuación, se procedió a lavar las placas con PBS 1X procurando desechar las células desprendidas. A cada placa se le agregó 10 mL de DMEM HG 2% FBS y se incubaron por 1 h a 37° C, 5% CO₂ y humedad controlada al 95%.

6.2.5.2.- Ensayo de migración por expansión celular

6.2.5.2.1.- Recubrimiento de placas con fibronectina

Se incubó placas de 100 mm con 4 mL de PBS 1X 2 µg/mL de fibronectina (FN) durante toda la noche a 4° C. Antes de su utilización, las placas fueron lavadas con 5 mL de PBS 1X y se agregó 10 mL DMEM HG 10% FBS.

6.2.5.2.2.- Expansión

Se utilizaron placas de 100 mm con una confluencia celular de 70% a 90%, sembradas el día anterior. Para cada tratamiento, se consideró dos condiciones: (1) expansión y (2) no-expansión. Rápidamente las células fueron tripsinizadas y sembradas en placas recubiertas con FN. Se dejó que las células se adhirieran y expandieran durante 2 h a 37° C, 5% CO₂ y humedad controlada del 95%.

6.2.5.3.- Ensayo de migración por trans-migración

6.2.5.3.1.- Recubrimiento de soportes con fibronectina

Se usaron soportes permeables para *Transwell*® (Corning®; 6,5 mm de diámetro, 8 µm tamaño de poro) en una placa de 24 pocillos. Cada inserto fue orientado boca-abajo y se le agregó 100 µL de PBS 1X / 2 µg/mL FN. Se incubó la placa a 4° C por 12 - 15 h. Antes de su utilización, los soportes fueron lavados dos veces con 550 µL de PBS 1X.

6.2.5.3.2.- Trans-migración

Se agregó 550 µL de DMEM HG 10% FBS a cada pocillo. En cada soporte se sembró $3 \cdot 10^4$ - $5 \cdot 10^4$ de células resuspendidas en DMEM HG y se permitió que éstas trans-migraran por la membrana recubierta con FN durante 2 h a 37° C, 5% CO₂ y humedad controlada del 95%. Luego, los soportes fueron incubados por 30 min con 550 µL de solución salina con 0,1% cristal violeta en 2% metanol. Posteriormente, cada soporte fue lavado con 2 L de agua y se procedió al conteo de células teñidas. Utilizando un microscopio invertido, se contabilizaron 10 campos por soporte, utilizando un microscopio invertido en el aumento 40X.

6.2.6.- Análisis estadístico

Se realizó la Prueba Q de Dixon para identificar datos inconsistentes o que se escapan de la tendencia (*outliers*). Adicionalmente, se analizaron los datos de al menos tres experimentos independientes utilizando la Prueba t de *Student* (no-pareada) en el programa GraphPad Prism 5 (San Diego, CA). Para establecer si una variación es significativa se consideró un valor $p < 0,05$.

7.- RESULTADOS

7.1.- La fosforilación de FAK en Tyr397 modula la activación de Rab5 en células A549.

Para establecer si el inhibidor PF-271 efectivamente disminuye la fosforilación activadora de FAK se comparó los niveles de p-Y397-FAK normalizados contra la proteína FAK total, de células A549 tratadas con DMSO o concentraciones variables de PF-271. El análisis mediante *Western blot* de cuatro experimentos independientes arrojó que el tratamiento durante 2 h con el inhibidor a concentraciones finales 1 μM y 5 μM disminuyó significativamente ($p = 0,0466$ y $p = 0,0452$) la fosforilación de FAK en Tyr397 en un 61,5% y 66,8%, respectivamente, en relación al tratamiento con DMSO (Fig. 3A). De los valores obtenidos se puede concluir que el tratamiento por 2 h con PF-271 efectivamente inhibe la fosforilación de FAK en Tyr397. Es interesante destacar que la curva de inhibición obtenida (Fig. 3A) coincide con valores reportados en la literatura (Weis y col., 2008). Debido a esto, se decidió ocupar la concentración de PF-271 1 μM para realizar los experimentos posteriores. Como muestra la Fig 3B, no se observaron cambios morfológicos en las células A549 tratadas con PF-271 1 μM durante 2 h, en comparación al tratamiento con DMSO.

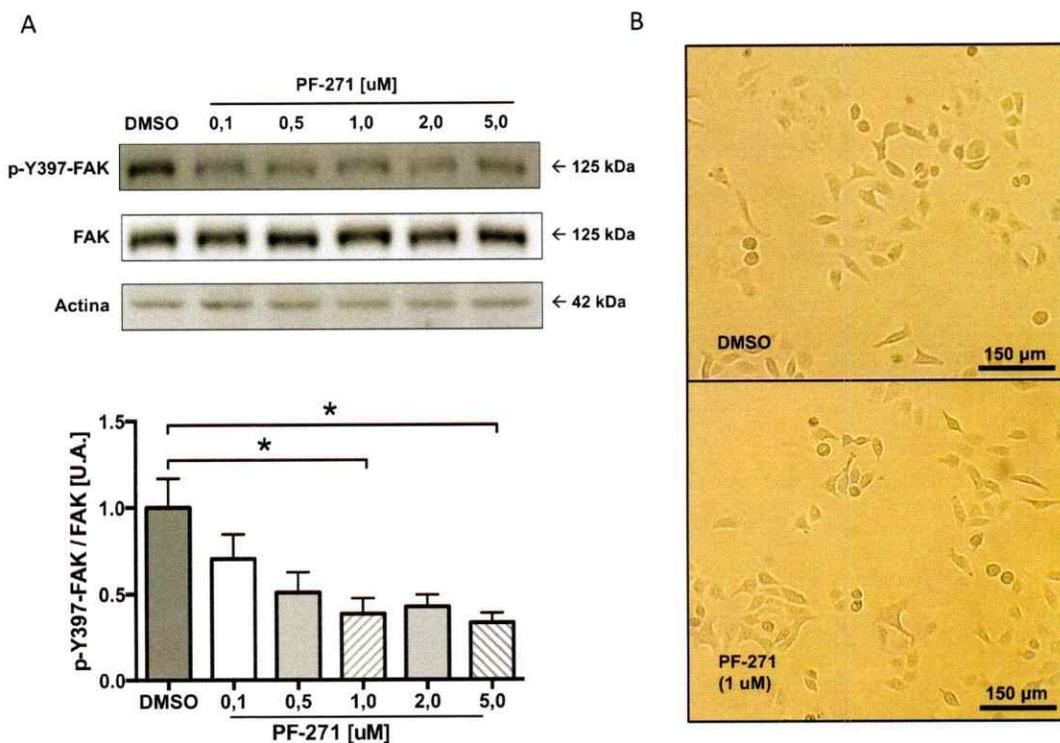


Figura 3. El inhibidor PF-271 disminuye la fosforilación de FAK en Tyr397. (A) Células A549 fueron tratadas con DMSO o concentraciones variables (0,1 – 5,0 uM) de PF-271 durante 2 h. Se analizó mediante Western blot los niveles de fosforilación de FAK en Tyr397. Resultados expresados como promedio \pm SEM (n = 4). *P < 0,05 (t test no pareado). (B) Imágenes representativas de células A549 tratadas durante 2 h con DMSO (panel superior) o PF-271 1 μ M (panel inferior).

A continuación, se determinó la abundancia de Rab5-GTP en células A549 que fueron incubadas por 2 h con PF-271 1 μ M y se comparó contra una condición control (DMSO). El promedio de cuatro experimentos independientes mostró una disminución significativa ($p = 0,0069$) de un 30% en la fracción activa de Rab5 en las células tratadas con el inhibidor (Fig. 4B). Adicionalmente, y en concordancia a lo expuesto anteriormente, se observó una reducción significativa ($p = 0,0021$) del 69% en la fosforilación de FAK en Tyr397 en las células que fueron incubadas con PF-271 1 μ M (Fig. 2A). No se observaron diferencias significativas en la abundancia de FAK ($1,00 \pm$

0,22; $1,31 \pm 0,26$) y Rab5 total ($1,00 \pm 0,26$; $1,07 \pm 0,45$) (ambos normalizados respecto a actina) entre la condición control y el tratamiento con el inhibidor de FAK. De los resultados obtenidos se puede concluir que la inhibición de la fosforilación de FAK en Tyr397 causa una disminución de la fracción activa de Rab5, la que no se debe a variaciones en la abundancia de Rab5 ni de FAK.

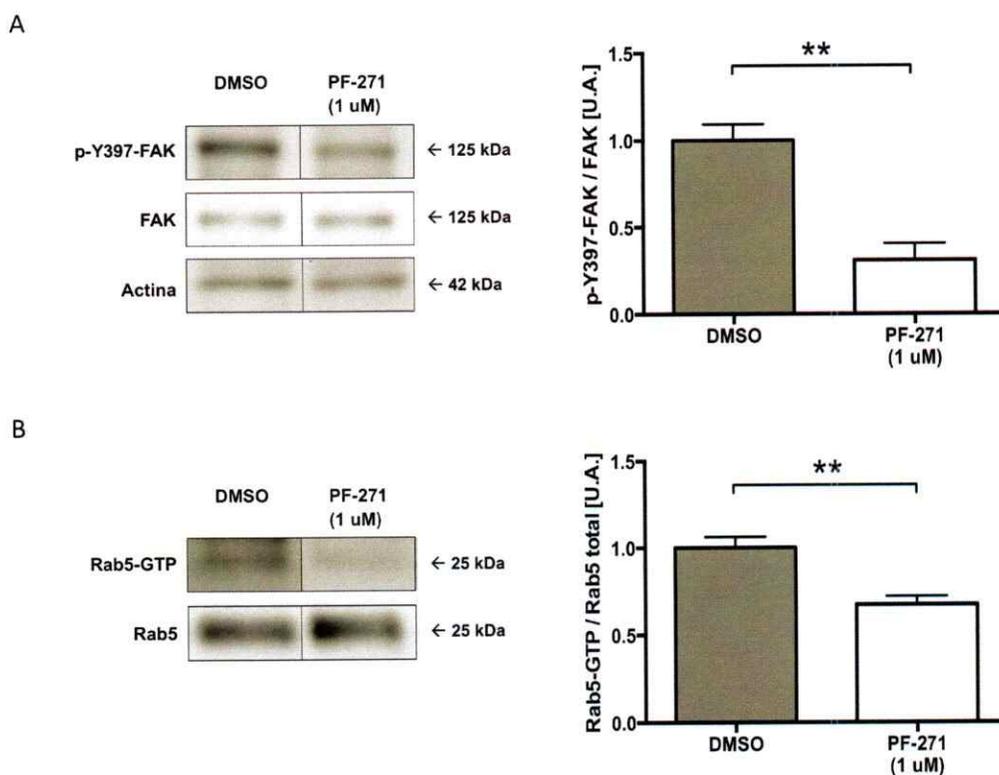


Figura 4. La inhibición de la fosforilación de FAK en Try397 disminuye la activación de Rab5. *Western blots* de (A) FAK fosforilado en Tyr397 y (B) Rab5-GTP de células A549 tratadas con DMSO o PF-271 1 μ M durante 2 h. Resultados expresados como promedio \pm SEM (n = 4). **P < 0,01 (t test no pareado).

Para complementar los resultados anteriores, en células A549 se realizó ensayos de sobre-expresión de mutantes de pérdida y ganancia de función de FAK y se determinó los niveles de Rab5 activo. En la Fig. 3A se observa que en las cuatro condiciones

experimentales las proteínas de fusión fueron eficientemente expresadas y presentaron la migración electroforética esperada, correspondientes a 150 kDa para los tres mutantes de la proteína FAK acopladas a GFP, y 37 kDa para GFP.

El análisis de cinco experimentos independientes mostró que en las condiciones experimentales GFP-FAK/wt, GFP-FAK/KD y GFP-FAK/CA, existen diferencias significativas entre los niveles de fosforilación de la proteína FAK exógena concordantes a lo reportado en la literatura (Lim y col., 2010; Chen y col., 2012). A este respecto, se encontró que la fosforilación en Tyr397 de la mutante inactiva de FAK (GFP-FAK/KD) es un 70% menor que la condición GFP-FAK/wt ($p = 0,0077$). Por otro lado, la mutante constitutivamente activa (GFP-FAK/CA) presenta una fosforilación en Tyr397 7,7 veces mayor ($p = 0,0013$) que la condición GFP-FAK/wt (Fig. 5A). Cabe mencionar que no se observaron variaciones significativas en la fosforilación en Tyr397 de la proteína FAK endógena que pudieran deberse a la transfección, obteniéndose los siguientes valores: $1,00 \pm 0,11$; $0,88 \pm 0,12$; $0,83 \pm 0,07$; $0,87 \pm 0,16$. De estos datos se puede concluir que las construcciones transfectadas fueron expresados correctamente y presentan los niveles de fosforilación de FAK en Tyr397 correspondientes.

De esta forma, se analizó la activación de Rab5 en las cuatro condiciones antes mencionas. Como se muestra en la Fig. 5B, se observó un aumento significativo ($p = 0,0499$) de Rab5-GTP de un 37% cuando las células fueron transfectadas con GFP-FAK/wt, respecto a la condición control (plásmido vacío); mientras que, y como era de esperar, la expresión de FAK/KD no modificó los niveles de Rab5 activo (Fig. 5B). A partir de estos datos, se puede concluir que la sobre-expresión de FAK/wt aumenta la activación de Rab5.

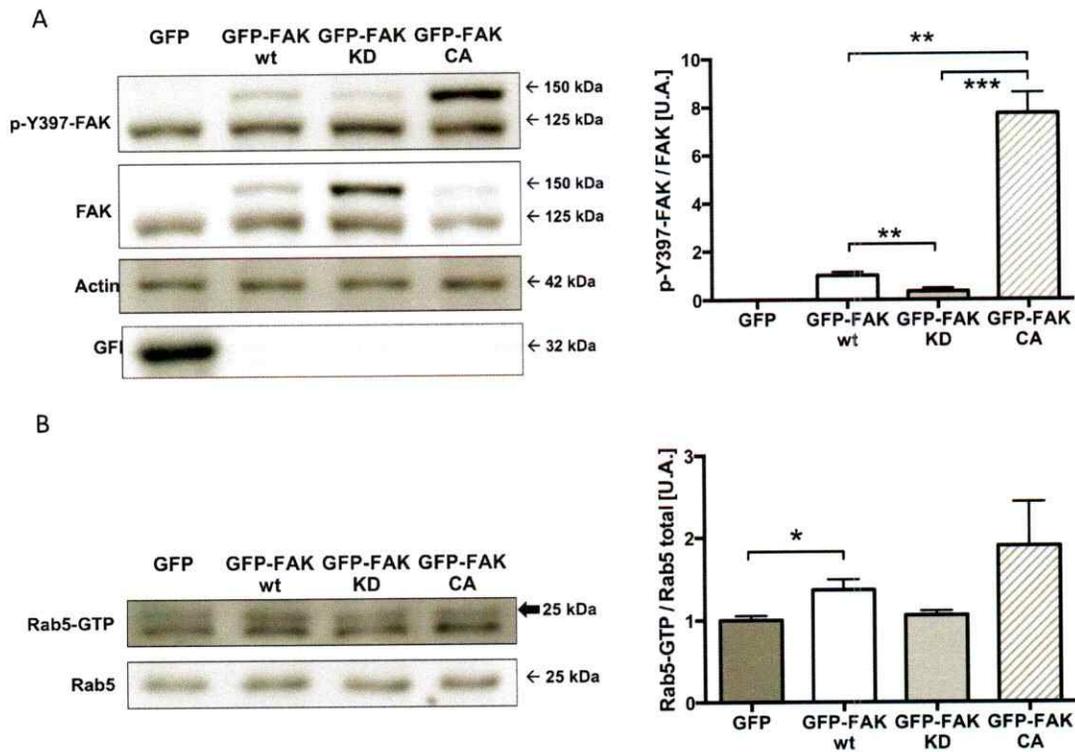


Figura 5. La sobre-expresión de FAK/wt aumenta la activación de Rab5. Células A549 fueron transfectadas con distintos constructos de GFP-FAK y se determinó mediante *Western blots* (A) la fosforilación de FAK en Tyr397 y (B) la activación de Rab5. Resultados expresados como promedio \pm SEM (n = 5). *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,0001 (t test no pareado).

7.2.- La fosforilación de FAK en Tyr397 no modifica la activación de Rab5 en células MEF.

Alternativamente, se quiso evaluar el efecto de variaciones del nivel de fosforilación de FAK sobre la activación de Rab5 en un modelo celular no tumoral, por lo que se utilizó células MEF. Como muestra la Fig. 6A, y según lo indicado en estudios previos (Tomar y col., 2009), no se detectó proteína FAK endógena (125 kDa) en los homogeneizados de células MEF FAK^{-/-}, FAK^{-/-}/GFP-FAK/wt y FAK^{-/-}/GFP-FAK/KD; sin embargo, se

observó expresión de la proteína FAK exógena (150 kDa) en estas dos últimas. Al comparar los niveles de fosforilación de FAK en Tyr397 se observó que la sublínea FAK^{-/-}/GFP-FAK/KD presenta una fosforilación 16,6 veces menor ($p = 0,0011$; $N = 4$) que la condición FAK^{+/+}. De los valores obtenidos, se puede concluir que las sublíneas celulares estudiadas efectivamente presentan diferentes niveles de fosforilación de FAK en Tyr397, los que son acordes a los reportado en la literatura (Tomar y col., 2009).

Una vez estandarizadas estas líneas celulares, se procedió a determinar los niveles de Rab5-GTP. El análisis mediante *Western blot* de los *pull-down* realizados a las cuatro condiciones experimentales estudiadas, no mostró diferencias significativas entre la activación de Rab5 de las cuatro sublíneas estudiadas. Por lo que se puede concluir, que en la línea celular no tumoral MEF, variaciones en la fosforilación de FAK en Tyr397 no redundan en cambios de la activación de Rab5.

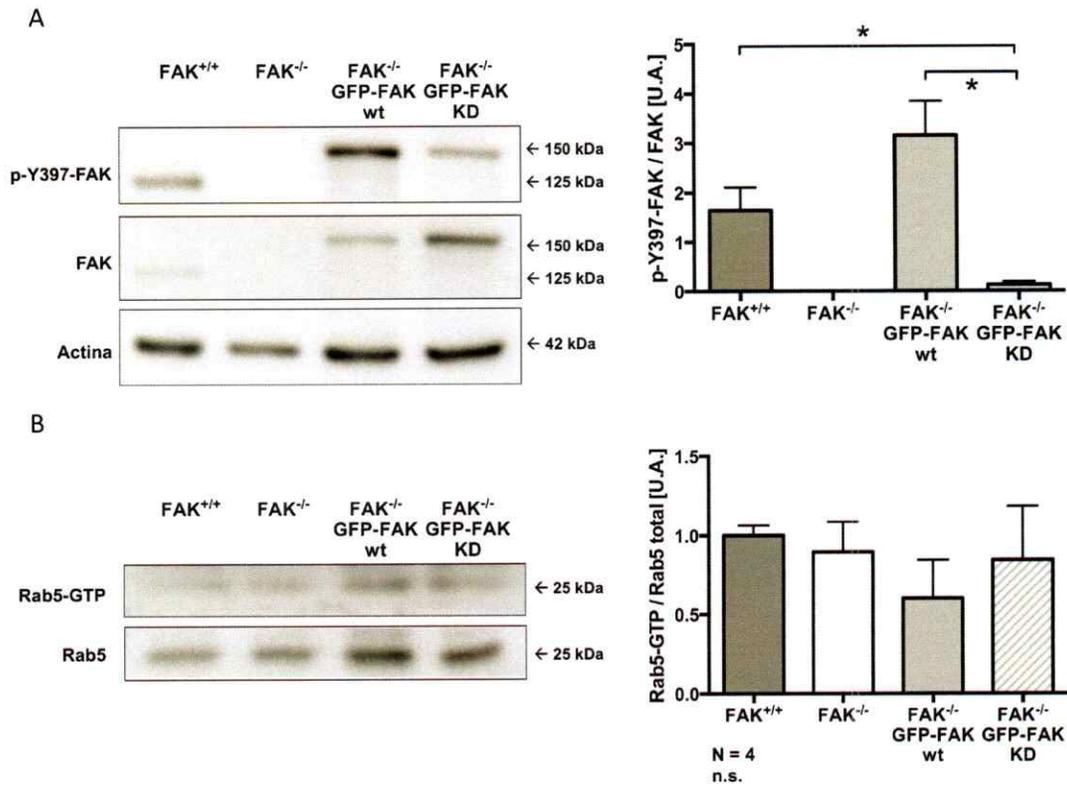


Figura 6. La fosforilación de FAK en Tyr397 no modifica la activación de Rab5 en células MEF. Western blots de (A) fosforilación de FAK en Tyr397 y (B) Rab5-GTP en sublíneas celulares MEF. Resultados expresados como promedio \pm SEM (n = 4). *P < 0,05 (t test no pareado).

7.3.- La inhibición de FAK disminuye la activación de Rab5 en estado estacionario.

Con el fin de ampliar los resultados obtenidos para la línea celular A549 (sección 7.1), se quiso inducir la fosforilación de FAK en Tyr397 a través de un estímulo migratorio, para luego determinar los niveles de Rab5-GTP. Para ello, células A549 fueron sometidas a ensayos de multiherida en presencia de DMSO o PF-271 1 μ M.

El análisis de cuatro experimentos independientes evidenció que el tratamiento con el inhibidor disminuye significativamente ($p = 0,0129$ y $p = 0,0070$) la fosforilación de FAK en Tyr397, tanto en las células que se mantuvieron en estado estacionario (EE) como las que fueron sometidas al ensayo de multiherida (MH), respecto a su control (tratamiento con DMSO) correspondiente. La fosforilación de FAK de las células en EE fue inhibida en un 35%, mientras que para las células sometidas a MH se observó una inhibición del 38% (Fig. 7A). Es interesante mencionar que los porcentajes de inhibición obtenidos tanto en EE como MH son menores a los observados anteriormente (Fig. 3A y 5A). Curiosamente, al comparar las condiciones EE-DMSO y MH-DMSO, no se observó un aumento de la fosforilación de FAK debido a la multiherida ($1,000 \pm 0,0605$; $1,063 \pm 0,0837$) (Fig. 7A). A partir de estos datos, se pueden concluir que: (1) PF-271 1 μM es capaz de inhibir p-Y397-FAK en células sometidas a un ensayo de multiherida, y que (2) el estímulo migratorio inducido por multiherida no logró promover un aumento de la fosforilación de FAK en Tyr397.

Por otro lado, se observó que la activación de Rab5 de células en EE disminuyó en un 35% debido al tratamiento con PF-271 1 μM , y que esta inhibición es significativa ($p = 0,0104$) (Fig. 7B). Este porcentaje de variación de la fracción activa de Rab5 es similar a la obtenida en experimentos anteriores (Fig. 4B y 5B). Si bien es posible observar una disminución de Rab5-GTP de células en MH tratadas con el inhibidor, esta no fue significativa respecto a las células en MH tratadas con DMSO, pero si al compararlas con las células en EE tratadas con DMSO ($p = 0,0047$) (Fig. 7B). Los datos mostrados, permiten concluir que la inhibición de la fosforilación de FAK en Tyr397 promueve la disminución de Rab5-GTP en células A549 que se encuentran en estado estacionario.

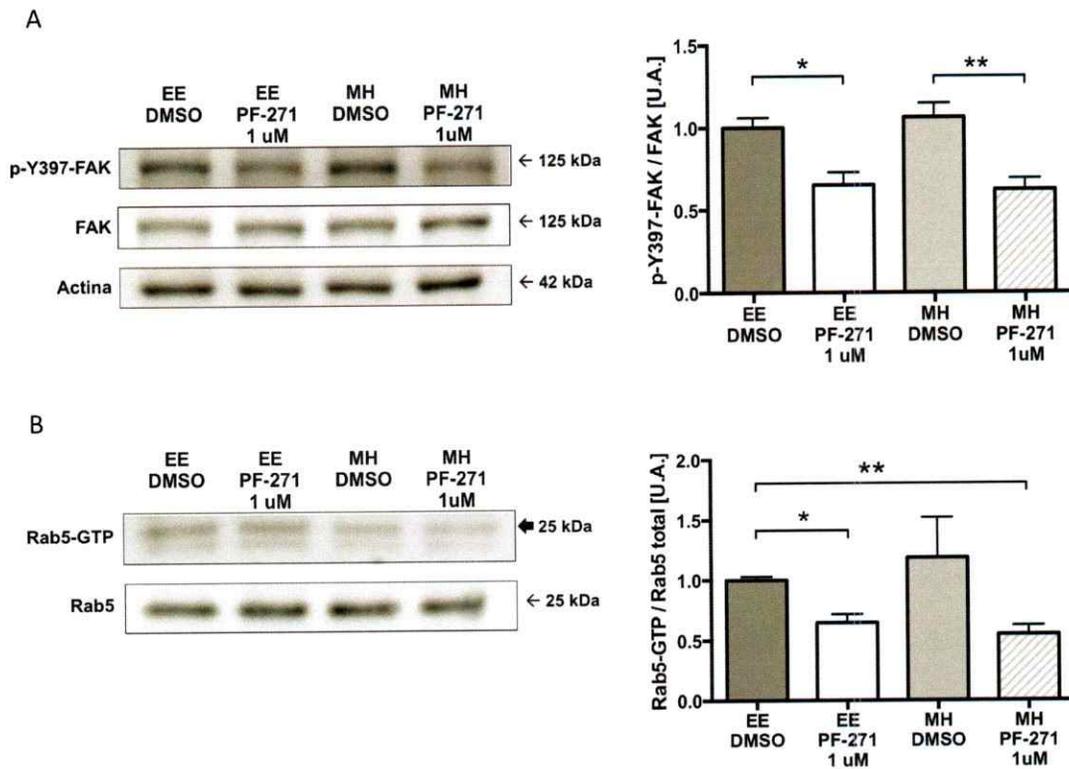


Figura 7. La inhibición de FAK disminuye la activación de Rab5 en estado estacionario. Células A549 fueron mantenidas en estado estacionario (EE) o sometidas a un ensayo de multiherida (MH) durante 2 h en presencia de DMSO o PF-271 1 μ M. Se analizó mediante *Western Blot* (A) la fosforilación de FAK en Tyr397 y (B) la abundancia relativa de Rab5-GTP. Resultados expresados como promedio \pm SEM (n = 4). *P < 0,05; **P < 0,01 (t test no pareado).

De forma complementaria se quiso estudiar los niveles de Rab5-GTP en células A549 sometidas a un ensayo de migración por expansión celular en presencia de DMSO o PF-271 1 μ M.

El análisis de cuatro experimentos independientes indicó que en las células tratadas con DMSO, la expansión celular induce un aumento de cuatro veces en la fosforilación de FAK en Tyr397 ($p = 0,0472$). Además, se observó una disminución significativa ($p =$

0,0256) del 62% en la fosforilación activadora de FAK cuando las células sometidas a ensayos de expansión fueron tratadas con PF-271 1 μ M, en comparación a las células tratadas con DMSO (Fig. 8A). Este nivel de inhibición coincide con los porcentajes mostrados en la Fig. 3A y 4A. Por el contrario, no se observaron cambios en la fosforilación de FAK debido al tratamiento con el inhibidor en las células mantenidas en suspensión ($1,000 \pm 0,649$; $0,547 \pm 0,451$) (Fig. 8A). De estos datos se puede concluir que el ensayo de expansión celular promueve un aumento de la fosforilación activadora de FAK, la que se ve inhibida al tratar las células con PF-271 1 μ M.

Como muestra la Fig. 8B el análisis de los ensayos de *pull-down* indicó que no existen diferencias significativas en la fracción activa de Rab5 entre las cuatro condiciones experimentales estudiadas, sin embargo, es posible advertir algunas tendencias. En este contexto, se observa que el ensayo de expansión celular aumentó la activación de Rab5, independientemente de si las células fueron tratadas con DMSO o PF-271 1 μ M. Lo anterior sugiere que la inhibición de FAK en Tyr397 no es suficiente para disminuir la activación de Rab5 promovida durante la expansión celular; lo que podría deberse a que hay otros factores involucrados en la promoción del aumento de Rab5-GTP durante este proceso. Adicionalmente, el tratamiento con el inhibidor no disminuyó la activación de Rab5 de células mantenidas en suspensión (respecto a la condición DMSO) (Fig. 7B). A pesar de que, a partir de los datos mostrados por la Fig. 8B no es posible concluir que existan variaciones de Rab5-GTP debido al ensayo de expansión celular, es interesante mencionar que estas tendencias contrastan con los resultados obtenidos en el ensayo de multiherida y en los experimentos anteriores. Por último, cabe mencionar que no se observaron diferencias significativas en la abundancia de

Rab5 (normalizadas respecto a actina) en las cuatro condiciones experimentales ($1,000 \pm 0,0413$; $1,047 \pm 0,0489$; $1,182 \pm 0,146$ y $1,018 \pm 0,0713$).

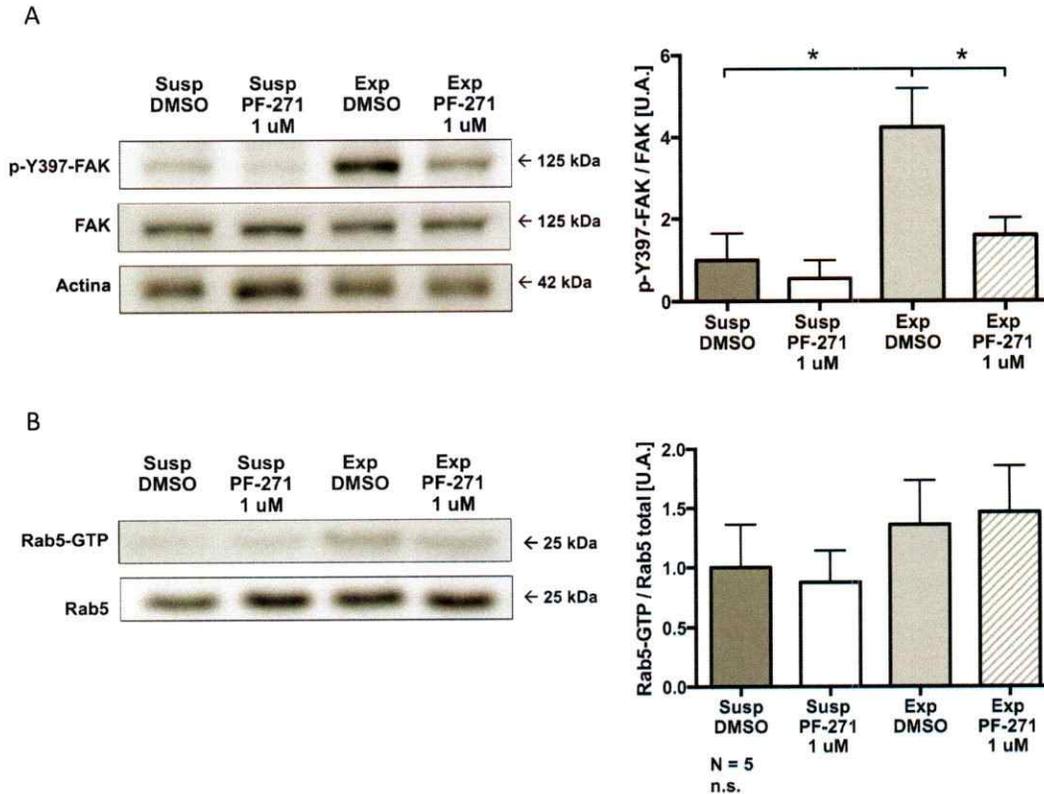


Figura 8. **Ensayo de expansión celular.** Células A549 fueron incubadas sobre una superficie cubierta con FN (2ug/uL) (Exp) o mantenidas en suspensión (Susp) sometidas a un ensayo de expansión durante 2 h en presencia de DMSO o PF-271 1 μ M. Se analizó mediante *Western blot* (A) la fosforilación de FAK en Tyr397 y (B) la activación de Rab5. Resultados expresados como promedio \pm SEM (n = 4). *P < 0,05 (t test no pareado).

7.4.- Ensayo de trans-migración de células A549

Por último, se quiso correlacionar los resultados observados anteriormente con efectos en la migración de células A549. Para esto, se comparó la migración celular, mediante ensayos de trans-migración de células A549 co-transfectadas con FAK/KD y Rab5/wt.

En la Fig. 9A se observa que en las cuatro condiciones experimentales las proteínas de fusión fueron expresadas y presentaron la migración electroforética esperada: 150 kDa para GFP-FAK/KD, 62 kDa para GFP-Rab5/wt y 37 kDa para GFP.

El promedio de cuatro experimentos independientes mostró que no hay diferencias significativas en la migración de las células A549 co-transfectadas (Fig. 9B y 9C). Los resultados obtenidos para las condiciones GFP-Rab5/wt y GFP-FAK/KD discrepan de lo que se ha reportado en la literatura (Tomar y col., 2009; Mendoza y col., 2013), pues se espera que la sobre-expresión de Rab5/wt promoviera un aumento en la migración celular, mientras que la sobre-expresión de FAK/KD debería disminuirla. Por este motivo, los resultados obtenidos no permiten establecer una conclusión satisfactoria, pues los controles Rab5/wt y FAK/KD no presentan los fenotipos migratorios esperados.

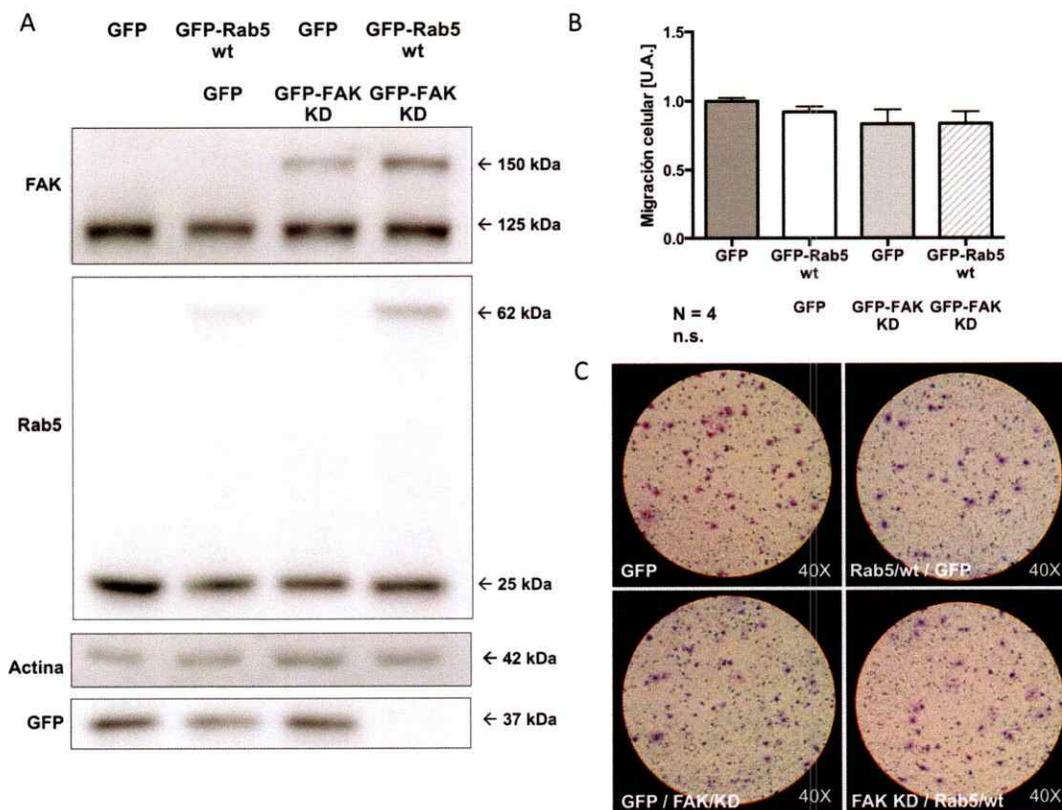


Figura 9. **Ensayo de trans-migración de células A549.** Células A549 fueron co-transfectadas con GFP-Rab5/wt y GFP-FAK/KD y se dejaron migrar durante 2 h en cámara de Boyden. (A) Se analizó mediante *Western blot* la expresión de los constructos transfectados y (B) se contabilizaron las células que transmigraron. (C) Imágenes representativas de células A549 contabilizadas en B, correspondientes a las condiciones GFP, Rab5/wt / GFP, GFP / FAK/KD y FAK/KD / Rab5/wt. Resultados expresados como promedio \pm SEM (n = 4).

8.- DISCUSIÓN

8.1.- La fosforilación de FAK en Tyr397 modula la activación de Rab5 en células A549.

Se determinó que en células A549 el tratamiento por 2 h con PF-271 1 μ M redujo la fosforilación de FAK en Tyr397 en un 69%, y que esta inhibición promovió una disminución de Rab5-GTP en un 30%. El tratamiento con el inhibidor no produjo cambios en la abundancia de FAK y Rab5 total, lo que se apoya en que un tratamiento de 2 h no es suficiente para generar cambios en la expresión de proteínas, los que son evidentes a partir de las 6 h. Esto sugiere que la disminución en la fosforilación activadora de FAK reduce los niveles de Rab5-GTP, y que este fenómeno no se debe a variaciones en la abundancia de ambas proteínas.

Es poco probable que el tratamiento con PF-271 pudiese estar inhibiendo directamente a Rab5, pues este compuesto presenta un alto grado de especificidad por FAK ($IC_{50} = 0,0015 \mu$ M). Más aún, análisis comparativos han reportado que PF-271 es cuatro veces más potente en inhibir la fosforilación de FAK que de PYK2, proteína tirosina quinasa con función similar a FAK ($PYK2 IC_{50} = 0,013 \mu$ M). Adicionalmente, PF-271 no afecta la actividad de otras proteínas quinasas como Aurora-A, CDK4 o EGFR ($IC_{50} > 100$) (Roberts y col., 2008).

PYK2 es una proteína tirosina quinasa rica en prolinas que comparte una organización similar a FAK, y cuyo dominio catalítico tienen un 60% de homología de secuencia con FAK, además de presentar cuatro sitios de fosforilación en tirosina análogos a los de FAK (Lipinski y Loftus, 2010). PYK2 participa en diversas rutas de señalización que son importantes en la migración de macrófagos y monocitos (Okigaki y col., 2003; Watson y

col., 2001), mientras que en ratones que carecen de PYK2 el desarrollo de células B de la zona marginal del bazo se ve afectado. (Guinamard y col., 2000). Sin embargo, a diferencia de ratones *knockout* para FAK que presentan inviabilidad fetal y anomalías en el desarrollo (Ilic y col., 1995), ratones *knockout* para PYK2 son viables, fértiles y no presentan aberraciones aparentes en su desarrollo (Okigaki y col., 2003); sugiriendo que, a pesar de las similitudes estructurales y funcionales entre estas proteínas, PYK2 tiene una participación menor en la regulación de la migración de células no inmunes (Lipinski y Loftus, 2010).

Por otro lado, se observó que la sobre-expresión de FAK/wt en células A549 induce un aumento del 37% en los niveles de Rab5-GTP, mientras que la sobre-expresión de FAK/KD (mutante inactivo) no induce variaciones en la actividad de Rab5 con respecto a la condición control (GFP). Curiosamente, la sobre-expresión de la mutante constitutivamente activo de FAK promovió un aumento aparente de la activación de Rab5, pero sin diferencias significativas. Esta diferencia probablemente se debe a que se obtuvieron valores experimentales muy variables que le quitan robustez estadística a los efectos de FAK/CA sobre la activación de Rab5. Estos resultados permiten suponer que el aumento de los niveles de Rab5-GTP inducidos por la sobre-expresión de FAK/wt se deben a un incremento en la disponibilidad total de FAK fosforilado en Tyr397, pues el aumento en la abundancia de FAK total debido a la sobre-expresión de FAK/KD (que es incapaz de auto-fosforilarse) no genera cambios en la fracción activa de Rab5. A través de estas dos estrategias experimentales se demostró que existe una relación entre la fosforilación de FAK en Tyr397 y la activación de Rab5 en células A549. Como experimento adicional a las dos metodologías utilizadas, se podría

estudiar los niveles de Rab5 activo al disminuir la abundancia de FAK mediante un interferente de RNA.

Estudios previos de nuestro grupo indican que FAK y Rab5 interactúan en células tumorales sometidas a un estímulo migratorio (Mendoza y col., 2013), lo que sumando a los resultados de esta tesis, sugiere que p-Y397-FAK podría estar interactuando con Rab5 y, en consecuencia, promoviendo su activación. Sin embargo, aún falta por dilucidar si dicha interacción es directa o indirecta. Lo más probable es que FAK y Rab5 interactúen de forma indirecta, pues a la fecha, sólo se ha evidenciado un mecanismo de fosforilación de Rab5 durante la migración celular de células T, en el que la proteína PKC ϵ fosforila un residuo treonina de Rab5 (Ong et al., 2014). Sin embargo, en este trabajo se determinó que la activación de Rab5 no depende de dicha fosforilación. Por lo tanto, es de suponer que FAK module de forma indirecta la actividad de Rab5 a través de su interacción con proteínas intermediarias, como GEFs y GAPs.

Las proteínas GEF catalizan la liberación del nucleótido GDP, permitiendo que Rab5 capte el GTP presente en el medio y, por lo tanto, se active. Por el contrario, la unión de una proteína GAP a Rab5-GTP promueve su actividad GTP-hidrolasa intrínseca, inactivando la proteína (Barr y Lambright, 2014). En el contexto de la migración celular, varios son los reguladores de Rab5 que se han identificado; entre los que se encuentran RIN, ALS2/Alsin, RN-Tre, p85 α , p120RasGAP y TSC2 (revisado en Mendoza y col., 2014). En este contexto, la proteína GAP p85 α ha sido postulada como un regulador relevante de la actividad de Rab5, pues participa como mediador en

la generación de respuestas migratorias inducidas por las proteínas pro-migratorias Caveolina1 y Caspasa8 (Díaz y col., 2014; Torres y col., 2008).

p85 α corresponde a la subunidad reguladora de la proteína dimérica PI3K (fosfatidilinositol 3 quinasa, por su siglas en inglés). En su extremo amino terminal presenta un dominio SH-3, seguido por una región BH con actividad GAP y tres dominios SH-2 en el extremo carboxilo terminal (Liu y col., 2014). Se ha observado que p85 α es capaz de interactuar con p-Y397-FAK en las FA, la que es reconocida por los sitios SH-2 de p85 α (Chen y col., 1996). Esto sugiere a p85 α como un posible mediador en la interacción funcional entre FAK y Rab5.

Por otro lado, existen antecedentes en la literatura que evidencian que FAK modula la actividad de proteínas GTPasas a través de su interacción con proteínas GEFs y GAPs. Un ejemplo de esto es la regulación cíclica de la GTPasa Rho en el frente de avance de células que experimentan migración direccional. La activación de Rho promueve la polimerización de actina y la contracción celular, a través de la activación de miosina II; factores claves en la polarización celular (Hall, 2005). Se ha observado que en las primeras etapas de la expansión celular, FAK interactúa con las proteínas GAPs p190RhoGAP y p120RasGAP, promoviendo la inactivación de RhoA y, en consecuencia, disminuyendo la contracción celular (Tomar y col., 2009). Sin embargo, en períodos tardíos de la expansión celular, FAK interactúa con Rgnef (GEF de RhoA), promoviendo que la célula se contraiga, estabilizando el frente de avance (Lim y col., 2008). Específicamente, la interacción entre FAK y p120RasGAP es dependiente de la fosforilación activadora de FAK, pues p120RasGAP presenta sitios SH-2 que reconocen Tyr397 fosforilada (Hecker y col., 2004). Por lo tanto, es una posibilidad muy intrigante que la formación de este complejo podría estar secuestrando a p120RasGAP

en las FAs, impidiendo que esta proteína ejerza su actividad GAP sobre Rab5 y, por lo tanto, promoviendo indirectamente su activación. En este contexto, sería interesante estudiar si p120RasGAP constituye un mediador entre FAK y Rab5.

8.2.- En células MEF, la fosforilación de FAK en Tyr397 no modifica la activación de Rab5.

En contraposición a los resultados obtenidos en células A549, los experimentos en células MEF mostraron que variaciones en la fosforilación de FAK de las diferentes sublíneas celulares no correlacionaban con diferencias significativas en los niveles de Rab5 activo.

Esta discrepancia puede deberse a que las células analizadas corresponden a tipos celulares distintos (donde las células A549 corresponden a una línea celular de cáncer, mientras que las células MEF son fibroblastos primarios inmortalizados) o a que las células MEF, a diferencia de las células A549, se encuentran establemente transducidas y/o transfectadas, permitiendo la generación de mecanismos compensatorios. Esto se ha observado en células endoteliales humanas, en las que el silenciamiento de FAK mediante RNA interferente induce un aumento en la expresión de PYK2 a los 7 días post tratamiento (Weis y col., 2008). Además, las células MEF FAK^{-/-} presentan una mayor expresión de PYK2 que células FAK^{+/+} y una mayor actividad de Src (Sieg y col., 1998), evidenciando que ocurre una adaptación de las células debido a la carencia de FAK. En células endoteliales y leucocitos se ha reportado que PYK2 se asocia con PI3K (Melikova y col., 2004), probablemente a través de la interacción del dominio SH-2 de p85 (Cain y col., 2010). En este contexto sería interesante estudiar si PYK2 podría estar compensando la función de FAK en el contexto de la activación de Rab5 de células MEF.

8.3.- La inhibición de FAK disminuye la activación de Rab5 en estado estacionario.

Como se observó en los experimentos anteriores, el tratamiento con PF-271 1 μ M de células A549 en estado estacionario promueve la inhibición de la fosforilación de FAK en Tyr397 y, en consecuencia, la disminución de la activación de Rab5. Sin embargo, las células sometidas al ensayo de multiherida no experimentaron un aumento de la fosforilación de FAK y, por consiguiente, no se observó un incremento de Rab5-GTP. Esto puede deberse a que el porcentaje de células que se encuentra expuesta al área de la herida es de aproximadamente un 20% (Mendoza y col., 2013), por lo que el estímulo de multiherida podría haber sido insuficiente para provocar un aumento en la activación de FAK que sea detectable por *Western blot*. Estos resultados difieren de lo observado en células de adenocarcinoma mamario, MDA-MB-231, en las que el ensayo de multiherida promueve un aumento de la activación de Rab5 (Mendoza y col., 2013), lo que puede deberse a diferencias intrínsecas entre las líneas celulares. En este contexto, sería muy interesante evaluar la fosforilación de FAK en células MDA-MB-231 tratadas con PF-271 y sometidas a una ensayo de multiherida, con el fin de estudiar una posible asociación con la activación de Rab5. Por otro lado, en las células sometidas al ensayo de multiherida el tratamiento con PF-271 redujo los niveles de p-Y397-FAK, sin embargo, no se observó una disminución significativa de Rab5-GTP con respecto a las células tratadas con DMSO en multiherida, pero si con aquellas que se encontraban en estado estacionario. Esto puede deberse a que los datos obtenidos en esta condición experimental fueron muy variables.

Por su parte, el ensayo de expansión celular logró promover un aumento sustantivo (de cuatro veces) de la fosforilación de FAK en Tyr397, el que se vio inhibido por el tratamiento con PF-271 1 μ M. Esta inducción se debería a que en este caso, todas las células se encuentran en contacto con la ECM de forma sincronizada, generando una señal detectable por *Western blot*. Adicionalmente, como se utilizó fibronectina como matriz de adhesión se promovió la activación de integrina β 1 y, en consecuencia, la fosforilación activadora de FAK (Mitra y Schlaepfer, 2006; Michael y col., 2009). En consecuencia, se observó un aumento en la activación de Rab5 debido al ensayo de expansión, sin embargo, los niveles de Rab5-GTP se mantuvieron elevados, aún en presencia del inhibidor PF-271. Esto sugiere que hay otros mecanismos involucrados en la activación de Rab5 que se ven favorecidos por la expansión celular, como por ejemplo, a través de caspasa-8 (Torres y col., 2010).

En conjunto, los resultados expuestos en este trabajo indican que la fosforilación activadora de FAK es necesaria para la activación de Rab5 en células A549, pues (1) la inhibición de p-Y397-FAK al utilizar un inhibidor farmacológico disminuye la fracción activa de Rab5, y (2) la sobre-expresión de FAK/wt promueve un aumento de Rab5-GTP. La Fig. 10 resume el modelo propuesto. Sin embargo, los resultados obtenidos en el ensayo de expansión celular indican que la fosforilación de FAK en Tyr397 no sería suficiente por sí sola, pues existirían otros factores involucrados en el aumento de Rab5-GTP y que serían inducidos por la expansión celular.

8.4.- Ensayo de trans-migración de células A549

La migración de las células A549 co-transfectadas con FAK/KD y Rab5/wt no varió con respecto a los controles respectivos. Más aún, entre las cuatro condiciones estudiadas no se observaron diferencias en la migración. En contraste a lo reportado en la literatura (Tomar y col., 2009; Mendoza y col., 2013), las células que expresaron FAK/KD o Rab5/wt no presentaron variaciones en la migración con respecto a la condición GFP. Probablemente, los resultados obtenidos se deben a que la proteína de fusión no se expresó lo suficiente como para compensar el efecto de sus correspondientes proteínas endógenas (véase Fig. 8B) o la co-expresión de estas construcciones en conjunto con GFP hayan producido efecto secundarios, como pérdida en la viabilidad celular.

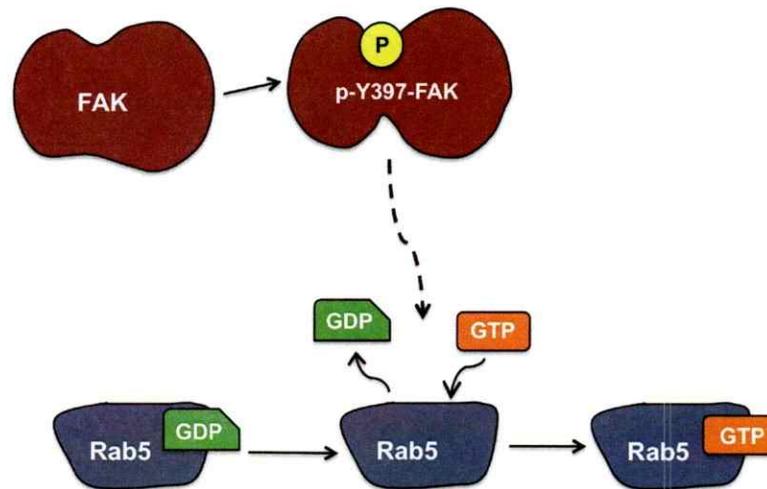


Figura 10. **Modelo Propuesto.** La fosforilación de FAK en tirosina 397 favorece –directamente o a través de algún efector– la disociación de GDP unido a Rab5 y su intercambio por GTP, es decir, promueve un aumento en la activación de Rab5. *Fuente: Elaboración propia.*



9.- CONCLUSIONES

9.1.- El tratamiento con PF-271 a una concentración 1 μ M disminuye en un 60% la fosforilación de FAK en el residuo tirosina 397 en células de adenocarcinoma de pulmón humano (A549).

9.2.- La inhibición farmacológica de la fosforilación de FAK en el residuo tirosina 397 promueve una disminución relativa en la conformación activa de Rab5 en células A549 en estado estacionario.

9.3.- La sobre-expresión de FAK induce un aumento relativo de la abundancia de Rab5-GTP en células A549.

9.4.- En su conjunto, estos resultados sugieren que la fosforilación activadora de FAK regula la activación de Rab5.

10.- BIBLIOGRAFIA

- Barr F, Lambright DG. (2010). Rab GEFs and GAPs. *Curr Opin Cell Biol.* 22(4):461-70.
- Brami-Cherrier K, Gervasi N, Arsenieva D, Walkiewicz K, Boutterin MC, Ortega A, Leonard PG, Seantier B, Gasmi L, Bouceba T, Kadaré G, Girault JA, Arold ST. (2014). FAK dimerization controls its kinase-dependent functions at focal adhesions. *EMBO J.* 33(4):356-70.
- Cain RJ, Vanhaesebroeck B, Ridley AJ. (2010). The PI3K p110alpha isoform regulates endothelial adherens junctions via Pyk2 and Rac1. *J Cell Biol.* 188(6):863-76.
- Calalb MB, Polte TR, Hanks SK. (1995). Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol.* 15(2):954-63.
- Chang F, Lemmon CA, Park D, Romer LH. (2007). FAK Potentiates Rac1 Activation and Localization to Matrix Adhesion Sites: A Role for β PIX. *Molecular Biology of the Cell*, 18(1):253–264.
- Chen HC, Appeddu PA, Isoda H, Guan JL. (1996). Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.* 271(42):26329-34.
- Chen XL, Nam JO, Jean C, Lawson C, Walsh CT, Goka E, Lim ST, Tomar A, Tancioni I, Uryu S, Guan JL, Acevedo LM, Weis SM, Cheresch DA, Schlaepfer DD. (2012). VEGF-induced vascular permeability is mediated by FAK. *Dev Cell.* 22(1):146-57.

- Christoforidis S, Miaczynska M, Ashman K, Wilm M, Zhao L, Yip SC, Waterfield MD, Backer JM, Zerial M. (1999). Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nat Cell Biol.* 1(4):249-52.
- Cornillon J, Campos L, Guyotat D. (2003). Focal adhesion kinase (FAK), a multifunctional protein]. *Med Sci (Paris).* 19(6-7):743-52.
- Crompton BD, Carlton AL, Thorner AR, Christie AL, Du J, Calicchio ML, Rivera MN, Fleming MD, Kohl NE, Kung AL, Stegmaier K. (2013). High-throughput tyrosine kinase activity profiling identifies FAK as a candidate therapeutic target in Ewing sarcoma. *Cancer Res.* 73(9):2873-83.
- De Franceschi N, Hamidi H, Alanko J, Sahgal P, Ivaska J. (2015). Integrin traffic - the update. *J Cell Sci.* 128(5):839-52.
- Díaz J, Mendoza P, Ortiz R, Díaz N, Leyton L, Stupack D, Quest AFG, Torres V A. (2014). Rab5 is required in metastatic cancer cells for Caveolin-1-enhanced Rac1 activation, migration and invasion. *Journal of Cell Science,* 127(11): 2401–2406.
- Friedl P, Gilmour D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(7):445-57.
- Goñi GM, Epifano C, Boskovic J, Camacho-Artacho M, Zhou J, Bronowska A, Martín MT, Eck MJ, Kremer L, Gräter F, Gervasio FL, Perez-Moreno M, Lietha D. (2014). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate triggers activation of focal adhesion kinase by inducing clustering and conformational changes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111(31):E3177-86.

- Guinamard R, Okigaki M, Schlessinger J, Ravetch JV. (2000). Absence of marginal zone B cells in Pyk-2-deficient mice defines their role in the humoral response. *Nat Immunol.* 1(1):31-6.
- Hall A. (2005). Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans.* 33(Pt 5):891-5.
- Hamadi A, Bouali M, Dontenwill M, Stoeckel H, Takeda K, Rondé P. (2005). Regulation of focal adhesion dynamics and disassembly by phosphorylation of FAK at tyrosine 397. *J Cell Sci.* 118(Pt 19):4415-25.
- Hecker TP, Ding Q, Rege TA, Hanks SK, Gladson CL. (2004). Overexpression of FAK promotes Ras activity through the formation of a FAK/p120RasGAP complex in malignant astrocytoma cells. *Oncogene.* 23(22):3962-71.
- Ilić D, Furuta Y, Kanazawa S, Takeda N, Sobue K, Nakatsuji N, Nomura S, Fujimoto J, Okada M, Yamamoto T. (1995). Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature.* 377(6549):539-44.
- Lietha D, Cai X, Ceccarelli DF, Li Y, Schaller MD, Eck MJ. (2007). Structural basis for the autoinhibition of focal adhesion kinase. *Cell.* 129(6):1177-87.
- Lim ST, Chen XL, Tomar A, Miller NL, Yoo J, Schlaepfer DD. (2010). Knock-in mutation reveals an essential role for focal adhesion kinase activity in blood vessel morphogenesis and cell motility-polarity but not cell proliferation. *J Biol Chem.* 285(28):21526-36
- Lim Y, Lim ST, Tomar A, Gardel M, Bernard-Trifilo JA, Chen XL, Uryu SA, Canete-Soler R, Zhai J, Lin H, Schlaepfer WW, Nalbant P, Bokoch G, Ilic D, Waterman-Storer

- C, Schlaepfer DD. (2008). PyK2 and FAK connections to p190Rho guanine nucleotide exchange factor regulate RhoA activity, focal adhesion formation, and cell motility. *J Cell Biol.* 180(1):187-203.
- Lipinski CA, Loftus JC. (2010). Targeting Pyk2 for therapeutic intervention. *Expert Opin Ther Targets.* 14(1):95-108.
- Liu S, Knapp S, Ahmed AA. (2014). The structural basis of PI3K cancer mutations: from mechanism to therapy. *Cancer Res.* 74(3):641-6.
- Lu H, Hu L, Yu L, Wang X, Urvalek AM, Li T, Shen C, Mukherjee D, Lahiri SK, Wason MS, Zhao J. (2014). KLF8 and FAK cooperatively enrich the active MMP14 on the cell surface required for the metastatic progression of breast cancer. *Oncogene.* 33(22):2909-17.
- Machesky LM. (2008). Lamellipodia and filopodia in metastasis and invasion. *FEBS Lett.* 582(14):2102-11.
- Melikova S, Dylla SJ, Verfaillie CM. (2004). Phosphatidylinositol-3-kinase activation mediates proline-rich tyrosine kinase 2 phosphorylation and recruitment to beta1-integrins in human CD34+ cells. *Exp Hematol.* 32(11):1051-6.
- Mendoza P, Díaz J, Torres VA. (2014). On the role of Rab5 in cell migration. *Curr Mol Med.* 14(2):235-45.
- Mendoza P, Ortiz R, Díaz J, Quest AF, Leyton L, Stupack D, Torres VA. (2013). Rab5 activation promotes focal adhesion disassembly, migration and invasiveness in tumor cells. *J Cell Sci.* 126(Pt 17):3835-47.

- Meng XN, Jin Y, Yu Y, Bai J, Liu GY, Zhu J, Zhao YZ, Wang Z, Chen F, Lee KY, Fu SB. (2009). Characterisation of fibronectin-mediated FAK signalling pathways in lung cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer*. 101(2):327-34.
- Michael KE, Dumbauld DW, Burns KL, Hanks SK, Garcia AJ. (2009). Focal adhesion kinase modulates cell adhesion strengthening via integrin activation. *Mol Biol Cell*. 20(9):2508-19.
- Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6(1):56-68.
- Mitra SK, Lim ST, Chi A, Schlaepfer DD. (2006). Intrinsic focal adhesion kinase activity controls orthotopic breast carcinoma metastasis via the regulation of urokinase plasminogen activator expression in a syngeneic tumor model. *Oncogene*. 25(32):4429-40.
- Okigaki M, Davis C, Falasca M, Harroch S, Felsenfeld DP, Sheetz MP, Schlessinger J. (2003). Pyk2 regulates multiple signaling events crucial for macrophage morphology and migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(19):10740-5.
- Ong ST, Freeley M, Skubis-Zegadło J, Fazil MH, Kelleher D, Fresser F, Baier G, Verma NK, Long A. (2014). Phosphorylation of Rab5a protein by protein kinase C ϵ is crucial for T-cell migration. *J Biol Chem*. 289(28):19420-34.
- Owen JD, Ruest PJ, Fry DW, Hanks SK. (1999). Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in FAK-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto- and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Pyk2. *Mol Cell Biol*. 19(7):4806-18.

- Palamidessi A, Frittoli E, Garré M, Faretta M, Mione M, Testa I, Diaspro A, Lanzetti L, Scita G, Di Fiore PP. (2008). Endocytic trafficking of Rac is required for the spatial restriction of signaling in cell migration. *Cell*. 134(1):135-47.
- Parsons JT. (2003). Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci*. 116(Pt 8):1409-16.
- Pellinen T, Ivaska J. (2006). Integrin traffic. *J Cell Sci*. 119(Pt18):3723-31.
- Pfeffer S y Aivazian D. (2004). Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5:886-896.
- Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*. 302(5651):1704-9
- Roberts WG, Ung E, Whalen P, Cooper B, Hulford C, Autry C, Richter D, Emerson E, Lin J, Kath J, Coleman K, Yao L, Martinez-Alsina L, Lorenzen M, Berliner M, Luzzio M, Patel N, Schmitt E, LaGreca S, Jani J, Wessel M, Marr E, Griffor M, Vajdos F. (2008). Antitumor activity and pharmacology of a selective focal adhesion kinase inhibitor, PF-562,271. *Cancer Res*. 68(6):1935-44.
- Rubino M, Miaczynska M, Lippé R, Zerial M. (2000). Selective membrane recruitment of EEA1 suggests a role in directional transport of clathrin-coated vesicles to early endosomes. *J Biol Chem*. 275(6):3745-8.
- Schaller MD. (2010). Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *J Cell Sci*. 123(Pt 7):1007-13.
- Schlaepfer DD, Mitra SK, Ilic D. (2004). Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta*. 1692(2-3):77-102.

- Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, Klingbeil CK, Schaefer E, Damsky CH, Schlaepfer DD. (2000). FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol.* (5):249-56.
- Spaargaren M, Bos JL. (1999). Rab5 induces Rac-independent lamellipodia formation and cell migration. *Mol Biol Cell.* 10(10):3239-50.
- Stenmark H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(8):513-25.
- Sulzmaier FJ, Jean C, Schlaepfer DD. (2014). FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nat Rev Cancer.* 14(9):598-610.
- Tang BL, Ng EL. (2009). Rabs and cancer cell motility. *Cell Motil Cytoskeleton.* 66(7):365-70.
- Tomar A, Lim ST, Lim Y, Schlaepfer DD. (2009). A FAK-p120RasGAP-p190RhoGAP complex regulates polarity in migrating cells. *J Cell Sci.* 122(Pt 11):1852-62.
- Tomar A, Schlaepfer DD. (2009). Focal adhesion kinase: switching between GAPs and GEFs in the regulation of cell motility. *Curr Opin Cell Biol.* 21(5):676-83.
- Torres VA, Mielgo A, Barbero S, Hsiao R, Wilkins JA, Stupack DG. (2010). Rab5 mediates caspase-8-promoted cell motility and metastasis. *Mol Biol Cell.* 21(2):369-76.
- Torres VA, Mielgo A, Barilà D, Anderson DH, Stupack D. (2008). Caspase 8 promotes peripheral localization and activation of Rab5. *J Biol Chem.* 283(52):36280-9.
- Torres VA, Stupack DG. (2011). Rab5 in the regulation of cell motility and invasion. *Curr Protein Pept Sci.* 12(1):43-51.

- Watson JM, Harding TW, Golubovskaya V, Morris JS, Hunter D, Li X, Haskill JS, Earp HS. (2001). Inhibition of the calcium-dependent tyrosine kinase (CADTK) blocks monocyte spreading and motility. *J Biol Chem.* 276(5):3536-42.
- Webb DJ, Donais K, Whitmore LA, Thomas SM, Turner CE, Parsons JT, Horwitz AF. (2004). FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol.* 6(2):154-61.
- Wehrle-Haller B. (2012). Structure and function of focal adhesions. *Curr Opin Cell Biol.* 24(1):116-24.
- Weis SM, Lim ST, Lutu-Fuga KM, Barnes LA, Chen XL, Göthert JR, Shen TL, Schlaepfer DD, Cheresch, D. A. (2008). Compensatory role for Pyk2 during angiogenesis in adult mice lacking endothelial cell FAK. *The Journal of Cell Biology,* 181(1): 43–50.
- Wendt MK, Schiemann WP. (2009). Therapeutic targeting of the focal adhesion complex prevents oncogenic TGF-beta signaling and metastasis. *Breast Cancer Res.*11(5):R68.
- Wrighton KH. (2013). Cell adhesion: the 'ins' and 'outs' of integrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 14(12):752.
- Yu HG, Nam JO, Miller NL, Tanjoni I, Walsh C, Shi L, Kim L, Chen XL, Tomar A, Lim ST, Schlaepfer DD. (2011). p190RhoGEF (Rgnef) promotes colon carcinoma tumor progression via interaction with focal adhesion kinase. *Cancer Res.* 71(2):360-70.
- Yuan L, Fairchild MJ, Perkins AD, Tanentzapf G. (2010). Analysis of integrin turnover in fly myotendinous junctions. *J Cell Sci.* 123(Pt 6):939-46.

Zhao J, Guan JL. (2009). Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer.
Cancer Metastasis Rev. (28)35-49.