



**VII Premi PRBB al millor treball de recerca en
Ciències de la Salut i de la Vida**

2012

Treball guanyador del 3r premi

**Proteïnes quinases i càncer: desenvolupament
d'un assaig bioquímic per a detectar inhibidors
del receptor del factor epidèrmic del creixement**

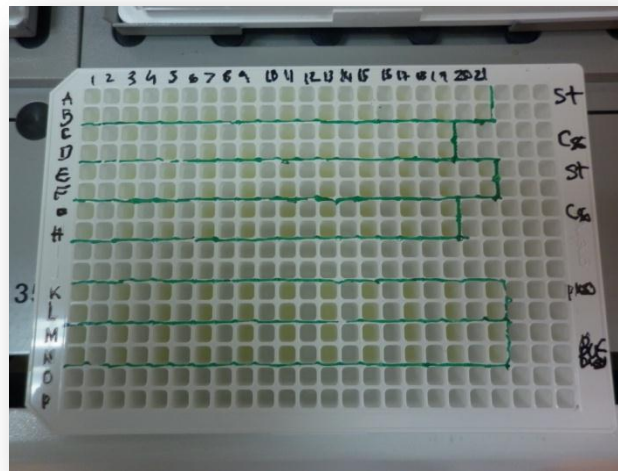
Laia Vidal Brime

Tutora: M. Teresa Pla-Giribert

Institut Pere Calders (Cerdanyola del Vallès)

Proteïnes quinases i càncer:

Desenvolupament d'un assaig bioquímic per a detectar inhibidors del receptor del factor epidèrmic de creixement



“Discovery consist in seeing what everyone else has seen and thinking
what no one else has thought”

Albert Szent-Györgyi de Nagyrápolt (1893-1986), Bioquímico,
Premi Nobel del 1937

ÍNDEX

Introducció	1
-------------------	---

Capítol 1: Conceptes teòrics

1.1 El càncer

1.1.1 Què és el càncer?	3
1.1.2 Característiques de les cèl·lules canceroses	4
1.1.3 Tipus de càncer	7
1.1.4 Causes del càncer	7

1.2 Les proteïnes quinases

1.2.1 Que és una quinasa?	9
1.2.2 Tipus de proteïnes quinases	10
1.2.3 La gran família de receptors tirosina quinasa (RTKs).....	10

1.3 El Receptor del Factor Epidèrmic de Creixement (EGFR)

1.3.1 Descripció química	11
1.3.2 Procés de dimerització i lligands naturals	13
1.3.3 Procés de fosforilació.....	13
1.3.4 Vies de transducció de senyal més importants	13

1.4 Teràpia anticancerosa amb l'EGFR com a diana

1.3.1 Descripció química	17
1.3.2 Procés de dimerització i lligands naturals	18
1.3.3 Procés de fosforilació.....	18
1.3.4 Vies de transducció de senyal més importants	19

Capítol 2: Part pràctica

2.1 Introducció i Objectius	20
--	-----------

2.2 Material i mètodes

2.2.1 Equipament

2.2.1.1 Tecan ULTRA ₃₈₄	21
2.2.1.1 Thermo Fisher Scientific iEMS Incubator	21

2.2.2 Reactius	
2.2.2.1 Human Recombinant EGFR, C-terminal fragment	23
2.2.2.2 ATP	23
2.2.2.3 Poly (Glu-Tyr) 4:1.....	23
2.2.2.4 Kinase Buffer	23
2.2.2.5 Kinase-Glo Plus Luminiscent Assay	23
2.3 Metodologia experimental	
2.3.1 Reacció enzimàtica	25
2.3.2 Reacció luminescent	25
2.3.3 Lectura de luminescència.....	25
2.4 Tècniques manuals	
2.4.1 Utilització de micropipetes	26
2.4.2 Dilucions seriades	27
2.5 Desenvolupament de l'assaig.....	29
2.6 Linealitat del senyal lumínic	29
2.7 Experiments realitzats per a la determinació dels paràmetres òptims per la cinètica enzimàtica	
2.7.1 EC ₅₀ de l'enzim (EGFR	31
2.7.2 Temps d'incubació per la reacció enzimàtica	32
2.7.3 Km del Substrat (Poly (Glu-Tyr) 4:1).....	33
2.7.4 Km del Cofactor (ATP)	34
2.7.5 Determinació del IC ₅₀ de dos inhibidors coneguts	34
2.8 Resultats de l'assaig	
2.8.1 Concentració optima d'ATP per assegurar la linearitat del senyal	36
2.8.2 Paràmetres cinètics òptims	
2.8.2.1 EC ₅₀ de l'enzim (EGFR)	37
2.8.2.2 Km del Substrat (Poly (Glu-Tyr) 4:1).....	38
2.8.2.3 Km del Cofactor (ATP)	39
2.8.2.4 Determinació del IC ₅₀ de la Staurosporine	40
2.8.2.5 Determinació del IC ₅₀ del Compound56	41

Capítol 3: Discussió de resultats

3.1 Conclusions	42
Agraïments	44
Referències bibliogràfiques	46
Annex:	
Recull de Premsa	50
Article Programa Joves i Ciència	52
Imatges addicionals	64

Introducció

Aquest treball de recerca s'origina en un article científic que vaig escriure durant el curs passat en el marc del Programa Joves i Ciència de CatalunyaCaixa.

El Programa Joves i Ciència de CatalunyaCaixa és una beca que cada any selecciona estudiants catalans motivats per la ciència per oferir-los la possibilitat de viure experiències relacionades amb la recerca. Cada curs, una nova promoció d'alumnes inicia un cicle de tres anys d'aprenentatge, en el quals hauran de realitzar diverses tasques per poder tenir continuïtat en el programa. Tot i que durant el curs es realitzen conferències i trobades, el gruix de les activitats es duen a terme durant l'estiu.

La meva primera experiència va ser durant l'estiu després d'haver finalitzat l'ESO: vaig realitzar un projecte de fotònica amb altres companys al CentreNatura de Planes de Son. Després de l'estada al CentreNatura de Planes de Son, ens van comunicar que si volíem seguir formant part del Programa, havíem de realitzar un article científic que seria avaluat per tenir l'oportunitat de treballar durant l'estiu següent en un altre projecte d'investigació.

Jo tenia moltes ganes de fer un article de biologia experimental, però que també tingués algun tipus d'aplicació mèdica, així que em vaig posar en contacte amb una científica del Centre d'Investigació i Desenvolupament Farmacèutic de Ferrer Internacional, la Dra. Eva Mendez, cap del *High Throughput Screening Department*.

Vaig tenir moltes conversacions amb ella i va tenir l'amabilitat d'explicar-me en què consistia la seva feina com a investigadora i orientar-me molt. Finalment (i gràcies a l'ajuda del meu centre per tramitar tota la documentació necessària), vaig tenir l'oportunitat d'anar al mateix centre a realitzar unes pràctiques per poder escriure el meu article, que vaig dirigir cap a l'àrea del departament de la Dra. Eva Mendez, dedicat bàsicament a buscar substàncies químiques per desenvolupar fàrmacs contra diversos tipus de patologies.

Les pràctiques van ser realitzades entre el desembre del 2010 i el gener del 2011, majoritàriament durant les vacances de Nadal. Concretament, el meu treball es centrava en el desenvolupament d'un assaig que permetés detectar inhibidors d'una proteïna involucrada en el càncer: el receptor del factor epidèrmic de creixement (EGFR).

El receptor del factor epidèrmic de creixement és una proteïna de membrana essencial per al desenvolupament i el correcte funcionament del cicle cel·lular. S'estima que en cèl·lules normals la seva expressió és de 40.000 a 100.000 receptors per cèl·lula, mentre que en les cèl·lules canceroses s'ha pogut observar una presència significativament major.

La sobreexpressió de l'EGFR o la desregulació del mateix receptor ha estat associada en nombrosos estudis científics amb la supervivència de les cèl·lules canceroses, una mala evolució d'aquesta malaltia i la resistència als tractaments convencionals com ara la radioteràpia o la quimioteràpia. Per aquest motiu, l'EGFR és una bona diana terapèutica¹ contra el càncer i, de fet, una de les més estudiades en l'actualitat.

La temàtica de les pràctiques, centrada en un receptor que es veia implicat en tants tipus de tumors, va fascinar-me tant que vaig decidir que aquest havia de ser el meu treball de recerca.

En aquest treball, he intentat en la mesura del possible, simplificar i explicar clarament tots els conceptes exposats per fer més fàcil al lector la seva comprensió.

Tot i que he inclòs un capítol especialment per aquest motiu, he intentat que tampoc la profundització teòrica fos massa feixuga, ja que considero que l'interès principal d'aquest treball és la seva part experimental. De totes maneres, espero que els conceptes teòrics ajudin a entendre plenament els experiments que es descriuran més endavant.

¹ Substància localitzada en qualsevol part de la cèl·lula capaç de reconèixer un fàrmac i produir una resposta cel·lular.

Capítol 1: Conceptes teòrics

1.1 El càncer

1.1.1 Què és el càncer?

El terme càncer (cranc en llatí) va ser utilitzat per primera vegada pel metge grec Hipòcrates de Cos en el segle V a.C. Ell va descriure el càncer com un conjunt de malalties en que s'observava un creixement i una proliferació de teixits incontrolada per tot l'organisme.

Actualment, els coneixements obtinguts gràcies a dècades d'investigació en la biologia del càncer ens permeten entendre'n millor el desenvolupament, que constitueix la segona causa de mort mundial només darrere de les malalties cardiovasculars. La taxa de mortalitat del càncer es xifra al voltant de 7 milions de persones anuals (més que les taxes de mortalitat de la sida, la malària i la tuberculosi sumades).L'any 2015, l'Organització Mundial de la Salut preveu que aquest nombre arribi fins els 9 milions i que augmenti fins a superar els 11,5 milions en el 2030.

Des que Hipòcrates va descriure clínicament el càncer s'han fet enormes progressos. Ara ja podem definir-lo com un conjunt de patologies originades a partir de alteracions al DNA, i a més s'han descobert diversos elements que faciliten la expansió de la malaltia en l'organisme.

Qualsevol persona que estigui mínimament familiaritzada amb els processos cel·lulars és conscient de l'enorme complexitat que comporta el funcionament correcte de la cèl·lula. Així doncs, no és gaire sorprenent que algunes vegades, ja sigui per factors externs o interns, es produeixin errors en el material genètic. L'acumulació de determinades mutacions en gens específics de les cèl·lules somàtiques donen lloc al que anomenem cèl·lules canceroses.

Aquest gens específics, els podem agrupar en quatre classes principals:

- Protooncogens, que són els gens responsables de la producció de proteïnes que estimulen la proliferació cel·lular com ara factors de creixement o receptors. Quan els protooncogens muten, es transformen en oncogens, els quals són capaços de fer que la cèl·lula sintetitzi massivament proteïnes que estimulen la multiplicació desregulada de cèl·lules.
- Gens supressors de tumors, que són reguladors negatius del creixement, és a dir, controlen la proliferació cel·lular en els organismes sans. A causa de les mutacions, aquests gens es troben inactius i permeten que la cèl·lula adquireixi propietats proliferatives anormals.
- Gens de reparació de l'ADN, que s'encarreguen de reparar petits errors (alteracions puntuals) sobretot en el procés de replicació. La seva mutació fa que es produeixi una acumulació d'errors en l'ADN i per tant la possibilitat que una cèl·lula esdevingui cancerosa augmenti.
- Gens del Sistema Immunitari, que quan funcionen normalment poden aturar la proliferació de tumors menors. Si estan alterats, no poden dur a terme la seva funció correctament i aquests tumors menors poden desenvolupar-se.

Per tant, l'alteració d'aquests gens de les cèl·lules normals són l'origen de les cèl·lules canceroses, que es caracteritzen per tenir un procés de divisió incontrolat que origina un augment progressiu de cèl·lules en divisió.

1.1.2 Característiques de les cèl·lules canceroses

Existeix sovint la percepció errònia que quan es diu que les cèl·lules canceroses es troben en una proliferació descontrolada vol dir que aquestes es divideixen més ràpidament que qualsevol altre cèl·lula normal. Això no és sempre així.

De fet, la velocitat de divisió no és un factor determinant en la proliferació, sinó la desregulació de l'equilibri dels processos de divisió cel·lular i diferenciació cel·lular².

Per exemple, en una cèl·lula mare epitelial normal les divisions cel·lulars per mitosis produeixen dues cèl·lules: una diferenciada que perdrà la capacitat de dividir-se i substituirà les cèl·lules envellides que s'estan eliminant contínuament, i una altra cèl·lula no diferenciada que retindrà la capacitat de dividir-se en el cas que sigui necessari i originar dues noves cèl·lules (una diferenciada i una no diferenciada). Gràcies aquest mecanisme equilibrat, el cos s'assegura que no hi ha una acumulació de cèl·lules no diferenciades en divisió.

En canvi, el cas de la reproducció de les cèl·lules canceroses, algunes divisions cel·lulars originen dues cèl·lules no diferenciades que continuen dividint-se i a la seva vegada donen lloc a dues cèl·lules que poden ser totes dues no diferenciades o bé una diferenciada i l'altra no. D'aquesta manera, l'equilibri en el procés de reproducció de les cèl·lules canceroses es trenca i es produeix una acumulació de cèl·lules no diferenciades en divisió [Becker W.M, Lewis K.J, Hardin J, p.834].

Aquestes cèl·lules acaben originant, en la gran majoria de casos, una lesió sòlida que s'anomena tumor. Cal saber distingir, segons el seu patró de creixement, dos tipus de tumors:

- El tumor benigne, que creix en una àrea delimitada, localitzada i que normalment no és perillós.
- El tumor maligne o neoplasma, que és capaç d'envair teixits adjacents, entrar en el torrent circulatori i així iniciar la metàstasi, un procés de proliferació de cèl·lules canceroses des de la seva localització original cap a altres parts distants de l'organisme.

El terme càncer només es refereix als neoplasmes i no inclou els tumors benignes.

² Entenem com diferenciació cel·lular l'adquisició de caràcters per part de les cèl·lules gràcies a l'expressió de gens determinats

Segons les característiques del neoplasma, el càncer es considera més o menys agressiu. Un tumor maligne és més greu com més diferències estructurals amb el teixit original presenti, i com més diferents siguin entre si les cèl·lules que el formen, ja que degut a les alteracions en la proliferació que hem esmentat, les cèl·lules tumorals presenten una gran quantitat de mutacions.

La dispersió de les cèl·lules canceroses de dispersar-se per tot el cos és possible gràcies a l'angiogènesi, és a dir, el creixement dels vasos sanguinis. Aquestes cèl·lules, com qualsevol altra, necessiten nutrients i oxigen. Des de fa molts anys, els científics sabien que els tumors s'abastien gràcies a una xarxa de vasos sanguinis, però pensaven que aquests vasos ja existien abans de la formació del tumor o que eren una resposta inflamatòria provocada pel mateix.

L'any 1971, Judah Folkman va proposar la teoria que les cèl·lules tumorals alliberen unes determinades substàncies químiques (molècules de senyalització) que incrementarien l'angiogènesi i permetrien l'extensió del tumor o metàstasi, ja que les cèl·lules canceroses podrien accedir al torrent sanguini (o altres fluids orgànics) i formar altres tumors en llocs distants a l'original.

Cal saber diferenciar la metàstasi d'un altre mecanisme de proliferació cel·lular anomenat invasió que fa que les cèl·lules canceroses no utilitzin el torrent sanguini, sinó que únicament envaeixin els teixits veïns. En aquest cas es tracta d'una migració directa i no pas una de llarga distància.

Una altra característica diferencial de les cèl·lules canceroses és que són "immortals", es poden dividir indefinidament mentre que una cèl·lula normal, com ara un fibroblast humà, es divideix al voltant d'unes 50 o 60 vegades abans de patir canvis degeneratius i morir.

Això és degut als telòmers, uns fragments de material genètic repetitiu que es troben als extrems dels cromosomes.

Els telòmers realitzen la mateixa funció que els caps d'uns cordons de sabates: protegeixen i subjecten els extrems d'unió de tots els fils perquè no es desfaci la peça (en aquest símil, la peça seria un cromosoma). En les cèl·lules normals, cada cop que es

produeix una divisió cel·lular, els telòmers dels cromosomes s'escurcen. Quan els telòmers són massa curts, les cèl·lules perden la capacitat de seguir dividint-se i moren.

En el cas de les cèl·lules canceroses, això no succeeix gràcies a un augment de telomerasa, un enzim que regenera els telòmers. Aquest fet juntament a d'altres processos cel·lulars complexos, eviten que els telòmers s'escurcin i faciliten que les cèl·lules canceroses es puguin dividir eternament.

1.1.3 Tipus de càncer

Malgrat que el càncer es pot desenvolupar en pràcticament qualsevol teixit, podem distingir-los segons el tipus de cèl·lules en les quals s'originen.

S'anomenen carcinomes els càncers originats a partir de cèl·lules epitelials que podem trobar cobrint externament o internament diverses superfícies corporals. Representen el 90% de tots els casos de càncer i els més freqüents són els de pulmó, pit i el de colorectal.

Existeixen altres tipus de càncers generats en teixits de suport (com ara ossos, cartílags, músculs, teixit conjuntiu, greix, etc), que són anomenats sarcomes. També hi ha els limfomes i les leucèmies, uns càncers que provenen de cèl·lules sanguines o del sistema limfàtic

1.1.4 Causes del càncer

El càncer és una malaltia molt complexa que pot ser provocada per multitud de factors diferents. Els factors que s'ha demostrat que poden originar aquesta malaltia són:

- l'herència: el factor genètic és de gran importància en el càncer, ja que aquest s'origina per un conjunt d'alteracions en l'ADN. Existeix la possibilitat que aquestes alteracions, si afecten les cèl·lules gàmetes, passin a la descendència i constitueixin la causa del càncer, és a dir, que s'heretin gens mutats. Tot i això, cal remarcar que l'herència és el factor causal en només el 5-10% dels càncers.

De totes maneres, hi ha persones que degut a la seva dotació genètica hereditària poden ser més susceptibles que les alteracions genètiques que rebin durant la vida acabin ocasionant un càncer.

A més a més, existeixen malalties hereditàries que comporten un alt risc de desenvolupar càncer, com ara el trastorn dels cromosomes fràgils.

També poden originar aquesta malaltia factors externs, que provocaran alteracions a l'ADN que no es transmetran als descendents (si els gàmetes no resulten afectats) com ara:

- Infeccions o virus: moltes vegades és diu que el càncer no és una malaltia infecciosa, tot i que diverses infeccions bacterianes o víriques en poden ser l'origen. En els animals diversos virus són agents que habitualment causen aquesta malaltia i en cas dels éssers humans s'ha demostrat que en alguns tipus de càncers també és així. Alguns càncers que són causats per virus tipus ADN són: el carcinoma de cèrvix, el limfoma de Burkitt, els limfoepitelomes o l'hepatocarcinoma. La leucèmia, en canvi, és provocada per un retrovirus (virus tipus ARN), que indueix la cèl·lula infectada a realitzar còpies dels seus gens, transcrivint-los a ADN per després incorporar-los a l'ADN cel·lular. Gràcies a uns gens poden convertir la cèl·lula somàtica en maligna. A part dels virus, també s'ha pogut relacionar el bacteri *Helicobacter pylori* amb el càncer d'estómac.
- L'exposició a productes químics: un exemple habitual quan es parla d'aquest aspecte són els cigarrets (que contenen substàncies com la nicotina, àcids i òxids de carboni i quitrà). Fumar incrementa espectacularment el risc de patir càncer de pulmó i els que acaben desenvolupant aquesta malaltia tenen menys possibilitats de sobreviure que els pacients no fumadors. Una altra substància també associada amb el càncer de pulmó és l'arsènic, ja que s'ha pogut detectar un gran nombre de pacients que van estar exposats a aquest producte, majoritàriament en l'àmbit laboral (fàbriques d'insecticides, mines de cobalt o coure...). També s'ha pogut provar que aquest càncer té una incidència molt alta

en treballadors en contacte amb el asbest, que es pot trobar en diverses indústries. Altres tipus de càncers com el de pell han estat relacionats amb el benzopiré, una substància química que es pot trobar en el carbó .A més a més, també cal remarcar que el consum excessiu d'alcohol incrementa el risc d'incidència d'altres factors cancerígens.

- Radiacions: és un dels agents cancerígens millor coneguts. Les radiacions indueixen mutacions a l'ADN que progressen en el temps fins a convertir-se en càncer. Aquestes alteracions consisteixen en trencaments o transposicions cromosòmiques, és a dir, poden arribar a produir-se intercanvis de fragments entre cromosomes. Les radiacions ionitzants són molt perilloses. L'exposició a la llum solar, que conté radiació ultraviolada, pot acabar causant càncer de pell, així com també els rajos X.
- Traumes: la irritació mecànica i la fricció sobre la pell, especialment sobre pigues, pot arribar a causar càncer.

1.2 Les proteïnes quinases

1.2.1 Què és una quinasa?

Una quinasa o fosfotransferasa és un enzim que realitza la reacció química de fosforilació, que consisteix en la transferència de grups fosfats que provenen habitualment de molècules molt energètiques, com l'ATP, a substrats específics.

Existeixen moltes classes de fosfotransferases, però una de les més comunes són les proteïnes quinases, la funció principal de les quals és controlar processos químics intracel·lulars com ara les vies de transducció de senyal, que seran explicades amb detall més endavant.

Com la majoria d'enzims, les proteïnes quinases necessiten un lligand i un substrat. En el cas que nosaltres estudiarem més endavant, el substrat (tirosina) es troba

integrat en la mateixa proteïna. També és essencial la presència d'un cofactor, l'ATP, que aporta grups fosfats que en fan possible el funcionament correcte.

1.2.2 Tipus de proteïnes quinases

Actualment, es coneixen més de 500 proteïnes quinases diferents. Normalment es classifiquen segons els seus substrats. Concretament, nosaltres estudiarem les proteïnes quinasa que tenen substrats de tirosina o les tirosina quinases.

1.2.3 La gran família de receptors tirosina quinasa (RTKs)

Dins de l'extens grup de tirosina quinases, són de gran importància els receptors cel·lulars, és a dir, les proteïnes localitzades a la membrana cel·lular, que reben molècules externes a la cèl·lula i que són les precursoras de reaccions cel·lulars intrínseques que donen lloc a processos de gran importància per a un ésser viu, com per exemple el desenvolupament d'òrgans o morfogènesis i la diferenciació cel·lular.

Aquest treball està centrat en l'estudi d'un receptor tirosina quinasa, el receptor del factor epidèrmic de creixement (EGFR). Aquest receptor tirosina quinasa actua com un enzim: la molècula externa que rep fa la funció de lligand. El nom del receptor es a causa que un dels lligands que més habitualment interacciona amb ell és el factor epidèrmic de creixement, un polipèptid de baix pes molecular que regula el cicle cel·lular i n'estimula la proliferació.

1.3 El Receptor del Factor Epidèrmic de Creixement (EGFR)

1.3.1 Descripció química

El Receptor del Factor Epidèrmic de Creixement o l'EGFR³ és una glicoproteïna transmembrana que conté una cadena polipeptídica de 1186 aminoàcids. El gen que codifica el receptor es troba localitzat en el braç curt del cromosoma 7, a la regió 7p11.2. Estructuralment, el receptor posseïx tres dominis o regions:

- Un domini extracel·lular en què s'uneix el lligand al receptor. En aquest cas, quan això es produeix es desencadena un canvi conformacional de la regió extracel·lular que permet la interacció amb un altre receptor de factor epidèrmic, promovent així la unió de dos receptors o dimerització.
- Un domini transmembrana hidrofòbic
- Un domini localitzat al citoplasma (intracel·lular) que presenta una "cua" amb extrem C-terminal que conté residus de tirosina, els quals reaccionen amb l'ATP intrínsec de la cèl·lula quan el receptor s'activa.

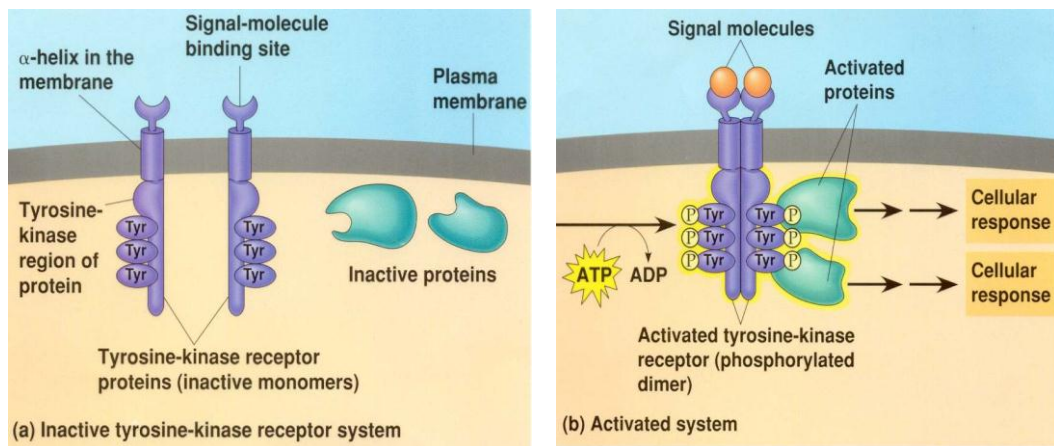


Figura 1. Esquema del procés d'activació d'un receptor tirosina quinasa. (Imatges extretes del web University of Illinois at Chicago: <http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/mike/spring2003/lect07.htm>)

³EGFR: sigles en anglès del Receptor del Factor Epidèrmic de Creixement (Epidermal Grow Factor Receptor) habitualment utilitzades en textos científics per fer-ne referència.

La família de l'EGFR està formada per 4 membres coneguts fins al moment, que s'anomenen:

- EGFR o ErbB1
- HER2 o ErbB2
- HER3 o ErbB3
- HER4 o ErbB4

1.3.2 Procés de dimerització i lligands naturals

Quan un EGFR es dimeritza ho pot fer amb un altre EGFR (homodimerització) o amb un altre membre de la família (heterodimerització). El membre que normalment és la parella de l'EGFR en l'heterodimerització és el HER2. Cal destacar que aquest procés permet diversificar i expandir el tipus de senyal generat per un receptor.

Les substàncies que actuen com a lligands de la família de l'EGFR ho fan segons la seva afinitat química amb els diversos receptors. Els lligands coneguts es classifiquen segons la seva afinitat química amb els receptor/s:

- EGFR: com per exemple el factor epidèrmic de creixement (EGF), el factor de creixement transformant o la amfirregulina (AR)
- EGFR i ErbB4: com ara l'epirregulina (ER), la betacelulina (BTC) o el factor de creixement epidèrmic d'unió a heparina (HB-EGF)
- ErbB4 i ocasionalment ErbB3: com el tomoregulins i el heregulins.

Pel que fa al receptor HER2, no s'ha trobat fins al moment cap lligand afí. Es pensa que s'activa simplement amb el procés de l'heterodimerització o bé que ja es troba en estat actiu per si mateix.

1.3.3 Procés de fosforilació

Com s'ha explicat abans, l'activació del EGFR mitjançant la unió d'un lligand provoca la dimerització. Quan això succeeix, els dominis intracel·lulars d'ambdós receptors es troben pròxims i es poden autofosforilar. El procés de fosforilació consisteix en l'addició d'un grup fosfat que prové d'una molècula d'ATP als residus de tirosina i la conseqüent conversió d'ATP a ADP.

La fosforilització de la tirosina permet l'activació de proteïnes adaptadores (molècules intracel·lulars) que s'uneixen gràcies al fet que posseeixen regions químiques afins a la tirosina fosforilitzada com ara el domini d'homologia Src-2 (SH2) o bé el domini d'unió a fosfotirosines (PTB). Aquest procés desencadena diverses reaccions químiques en el citoplasma cel·lular anomenades vies de transducció de senyal.

1.3.4 Vies de transducció de senyal més importants

Un cop el receptor EGFR està activat, s'inicien moltes vies de transducció de senyal. Per entendre aquest fenomen ens podem imaginar diverses fitxes de dòmino que cauen una darrera de l'altra al tombar la primera [veure Annex, Recull de premsa 2].

Les vies de transducció de senyal són reaccions químiques cel·lulars intrínseques en què intervenen un gran nombre d'enzims i proteïnes.

Al final del camí, tal i com podem apreciar en la figura 2, en cada via s'obté una substància química específica que entra dins el nucli i actua com a promotora d'un gen determinat: activa el factor de transcripció que iniciarà el procés de fabricació d'una cadena d'ARNm d'aquest gen o bé la substància química resultant de la via de transducció actua directament sobre l'ADN com a factor de transcripció.

Depenent del gen que es transcriu, la cèl·lula durà a terme un o altre procés. En el cas de les vies de transducció de l'EGFR, els gens transcrits són majoritàriament protooncogenes i gens supressors de tumors [veure apartat 1.1.1, Què és el càncer?].

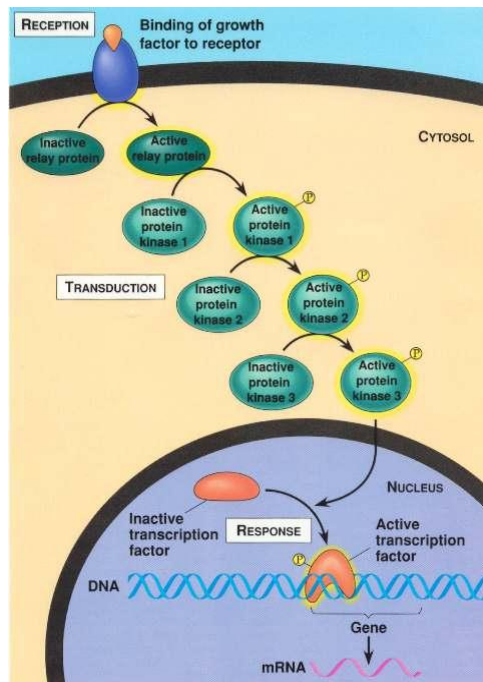


Figura 2. Esquema simple del procés de transducció de senyal de l'EGFR i la resposta del factor de transcripció al activar-se, iniciant la transcripció d'un gen determinat formant l'ARNm.
 (Imatge extreta del web University of Illinois at Chicago:
<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/mike/spring2003/lect07.htm>)

Evidentment, la complexitat d'aquest sistema de regulació és enorme, però ens ajuda a entendre com elements exteriors a la cèl·lula poden arribar a determinar que s'activi un gen o un altre. De fet, es creu que és molt probable que, tot i que actualment l'EGFR és un dels elements més estudiats per la seva relació amb el càncer, no es coneixin totes les vies de transducció, el seu funcionament i com s'influeixen entre elles.

Normalment, per conèixer l'efecte que comporta l'activació d'una via de transducció de senyal, els científics utilitzen l'estratègia de bloquejar-la per poder veure com reacciona la cèl·lula quan deixa de funcionar. Tot i això, es tracta d'un aspecte realment complicat ja que al bloquejar una via no saps mai si estàs afectant d'alguna manera una altra que desconeixes i també duu a terme una funció important.

En la figura 3, podem veure un petit resum de les quatre vies de senyal de transducció potser millor estudiades. Aquestes no seran descrites químicament ja que l'objectiu del treball no està centrat en les reaccions que aquí es desenvolupen, però sí que m'agradaria destacar els processos cel·lulars que en resulten:

1. Via de transducció JAK/SRC: la molècula STAT (activador de transcripció) es transloca al nucli i indueix directament la transcripció de gens que permeten la supervivència, la proliferació i l'oncogènesi.
2. Via de transducció del fosfatidil-inositol 3-quinasa (PI3K): via que s'activa preferentment com a resultat d'una heterodimerització de l'EGFR amb el HER3, és responsable de l'angiogènesi, la inhibició de l'apoptosis, la sensibilitat a l'estrès i la formació de tumors.
3. Via de transducció MAPK (proteïna quinasa activada per mitògens⁴): via en què les proteïnes quan estan actives es transloquen al nucli, on fosforilen factors de transcripció implicats en la motilitat, l'expressió gènica i la progressió del cicle cel·lular.
4. Via de transducció de la proteïna quinasa C (PKC): via implicada en la transformació, la diferenciació i l'apoptosi.

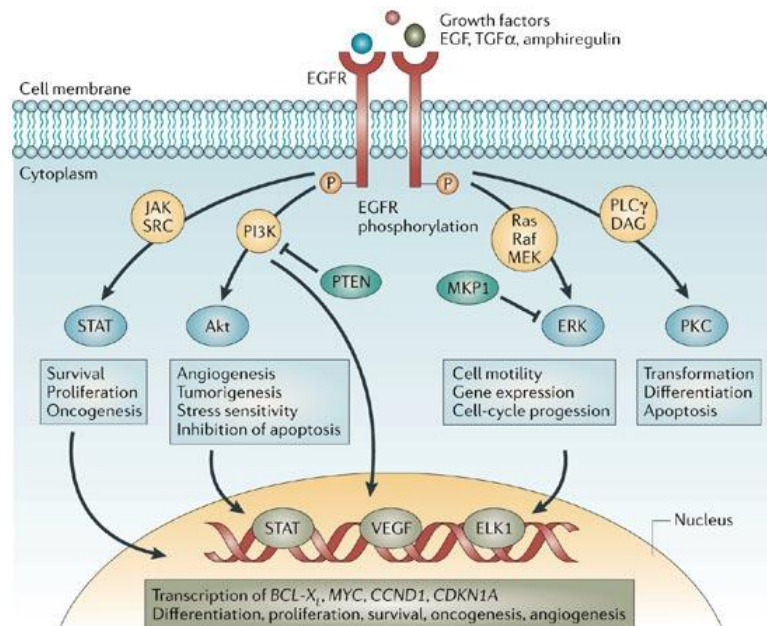


Figura 3. Esquema de les principals vies de transducció de senyal de l'EGFR i els processos cel·lulars que desencadenen. (Imatge extreta de: NYATI M.K et al, "Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy", Nature Reviews Cancer, Vol.6, pp.876-885, November 2006)

⁴ Substància química que indueix la divisió cel·lular (mitosi)

Aquestes vies estan normalment molt ben regulades, però sovint poden presentar problemes de regulació com a conseqüència de mutacions genètiques pròpies del càncer. Per exemple, és habitual que a causa d'un increment de lligands provocat per oncogens, el receptor EGFR es trobi quasi sempre activat o que, per causa també d'oncogens, es produeixi una sobreexpressió del mateix receptor, la qual cosa provoca una intensificació de la transcripció de determinats gens que afavoreixen les cèl·lules canceroses com ara gens que indueixen la proliferació cel·lular, la inhibició de l'apoptosi o l'augment de l'angiogènesi.

També cal destacar que l'EGFR normal necessita estar activat per un lligand per iniciar una via de transducció de senyal, però en les cèl·lules malignes no sempre és necessari. Les cèl·lules canceroses tenen diversos mecanismes per eliminar la necessitat d'un lligand. Alguns d'aquests són:

- El desenvolupament d'EGFR amb activació independent de lligand (normalment com a resposta a una situació d'estrès causat per l'exposició a agents genotòxics o radiació ionitzant)
- Mutacions en l'EGFR que en produeixen una activació inapropiada d'aquest, com ara delecions en el domini d'activació en la tirosina quinasa.
- Transactivació: algunes proteïnes són capaces de fosforilar residus de tirosina de la regió intracel·lular del receptor, com ara l'hormona de creixement o la prolactina.

1.4 Teràpia anticancerosa amb l'EGFR com a diana

Les aplicacions en teràpia anticancerosa són un camp a tenir en compte. L'EGFR s'ha perfilat des de la dècada dels 90 com una diana interessant per aquests objectius.

L'EGFR es troba altament expressat en una àmplia varietat de tumors humans, incloent els de pulmó de cèl·lula no petita (non-small cell lung càncer, NSCLC), els de pit, els de cap i coll⁵, els gàstrics, els colorectals, els d'ossos, els de pròstata, els de bufeta, els renals, els pancreàtics i els d'ovari.

Tipus de tumor	Tumors que expressen EGFR (%)
Colorectal	25–77
Pàncrees	30–50
Bufeta	31–48
Pròstata	39–47
Ovari	35–70
Glioma	40–63
Pit	14–91
Pulmó	40–80
Renal	50–90
Cap i coll	80–100

Taula 1. % de tumors que sobreexpressen EGFR. Adaptat de: Dutta P.R, Maity A, *Cellular responses to EGFR inhibitors and their relevance to cancer therapy*, Cancer Lett. (2007)

1.4.1 Teràpies clàssiques

Un fet rellevant és que l'expressió en alts nivells d'EGFR ha estat associada en diversos estudis amb tumors en estat avançat, amb més risc de recurrència o metàstasi, menor supervivència i major resistència a la quimioteràpia i radioteràpia.

Aquests dos últims tractaments, juntament amb la cirurgia que s'aplica normalment en casos de tumors molt ben localitzats, constitueixen els tractaments més tradicionals contra el càncer. El problema és que moltes vegades no són efectius i necessiten innovar, buscant noves tècniques per obtenir millors resultats [veure annex, Recull de premsa 1]

⁵Els tumors de cap i coll inclouen el càncer de boca, llavi, glàndules salivals, nas i gangli limfàtic

Per exemple, la quimioteràpia és un tractament efectuat amb medicació molt agressiva normalment útil per tractar els tumors més inaccessibles, però tot i això, té molt poca especificitat i pot crear resistències.

Pel que fa als altres tractaments com la radioteràpia (cremar amb radiacions les cèl·lules tumorals) també comporten el risc de resultar perjudicials per cèl·lules no canceroses del malalt.

1.4.2 Anticossos monoclonals

Els anticossos monoclonals són una eina molt útil en el camp de la medicina i la biologia. Un anticòs produït pel propi cos humà es tracta d'una proteïna segregada per limfòcits B per tal de contrarestar la invasió de l'organisme per proteïnes entranyes anomenades antígens (components de virus, toxines bacterianes, etc.). A cada antigen li correspon un anticòs concret.

Tot i que tradicionalment els anticossos eren utilitzats en laboratoris per realitzar molts experiments, en els últims anys les aplicacions en medicina d'aquestes proteïnes cada cop són més grans. Els anticossos són capaços de curar diferents infeccions i fins i tot arribar a destruir cèl·lules tumorals. Aquest tractament també és conegut com immunoteràpia i és reconegut per la seva especificitat.

1.4.3 Teràpies en desenvolupament

Actualment, un dels objectius actuals de l'oncologia és millorar les teràpies ja existents per fer-les més específiques i per tant més efectives i menys perjudicials per les cèl·lules.

Els recents avenços en immunoteràpia i quimioteràpia selectiva posicionen aquests tractaments com a principal àrea d'interès en la recerca.

Les teràpies en desenvolupament que tenen com a diana l'EGFR inclouen aquelles que interactuen amb el domini extracel·lular d'unió del lligand i aquelles que actuen intercel·lularment, com ara petites molècules inhibidores de la tirosina quinasa (EGFR-TKIs) que competeixen amb l'ATP per unir-se al seu lloc d'unió del receptor.

En ambdós casos, la inhibició provoca el bloqueig de les vies de transducció de la senyal de l'EGFR.

Dos exemples d'inhibidors de l'EGFR aprovats són el Gefitinib (Iressa, ZD1839) i el Cetuximab (Erbix, C225). El Cetuximab és un anticòs monoclonal que s'uneix al EGFR i impedeix la unió del lligand. Es tracta d'un anticòs molt utilitzat en el tractament del càncer colorectal, amb bons resultats. Pel que fa al Gefitinib és una molècula de baix pes inhibidora de la tirosina quinasa que actua al domini citosòlic d'unió de l'ATP i inhibeix l'autofosforilació.

A més a més de la utilització d'anticòs i molècules per inhibir l'EGFR, també s'utilitzen diversos compostos químics que, ja sigui competint pel lloc d'unió al lligand o de l'ATP, intenten bloquejar el funcionament del receptor.

1.4.4 Detecció de compostos químics inhibidors: *High Throughput Screening*

El *High Throughput Screening* (Cribatge d'Alt Rendiment) és una tècnica utilitzada principalment en laboratoris farmacèutics que tracta de trobar compostos químics que puguin inhibir la diana d'interès. Aquest procediment també s'anomena cribatge, ja que la selecció d'aquests compostos es fa a partir de provar de la llibreria o col·lecció de compostos del laboratori els que puguin tenir un cert grau d'afinitat amb la diana.

En els últims anys, les col·leccions o llibreries de compostos de les companyies farmacèutiques s'han diversificat i augmentat. També cal destacar que la seqüenciació del genoma humà i altres espècies de patògens ha evidenciat l'existència, fins aleshores desconeguda, de milers de dianes interessants per la investigació de nous tractaments.

El *High Throughput Screening* és essencial en el desenvolupament de fàrmacs, i constitueix la etapa inicial d'aquestes investigacions. Les etapes posteriors acostumen a ser assajos amb ratolins i només si s'obtenen bons resultats és possible la realització d'assajos clínics amb humans.

Tot i això, abans de realitzar el *High Throughput Screening*, s'ha de desenvolupar un assaig bioquímic per establir les condicions òptimes en què s'haurà de realitzar la recerca de compostos químics inhibidors.

El desenvolupament correcte d'aquest assaig és essencial per assegurar-se que qualsevol compost químic que potencialment inhibeixi la diana pugui ser detectat, i és el que jo realitzaré en aquest treball de recerca: un assaig bioquímic per trobar inhibidors de la meva diana, l'EGFR.

Capítol 2: Part Pràctica

2.1 Introducció i Objectius

En aquesta part del treball s'exposarà amb detall les pràctiques realitzades durant els mesos de desembre del 2010 i gener del 2011 al Centre d'Investigació i Desenvolupament Farmacèutic Ferrer Internacional en el Departament de *High Throughput Screening* dirigit per la Dra. Eva Mendez.

La part pràctica consta de tres grans blocs:

- Un primer bloc tècnic on s'expliquen tots els procediments i mètodes seguits, així com tot el material i equipament utilitzat (apartats 2.2, 2.3 i 2.4).
- Un segon bloc on s'explica el desenvolupament de l'assaig per a detectar els inhibidors, així com diversos conceptes senzills de cinètica enzimàtica necessaris per realitzar l'assaig correctament (apartats 2.5, 2.6, 2.7)
- Un tercer bloc on s'exposen i interpreten els resultats de l'assaig (apartats 2.8 i 3.1)

Per la part experimental d'aquest treball s'han fixat els següents objectius:

- aprendre a realitzar un assaig bioquímic en què puguem detectar si una substància química determinada pot inhibir l'EGFR.
- conèixer i saber establir les condicions òptimes perquè l'assaig funcioni correctament i sigui fiable. Caracteritzar químicament l'EGFR.
- ser capaços de desenvolupar un assaig que pugui detectar dos tipus de compostos químics inhibidors: competidors del lloc d'unió del lligand i competidors del domini tirosina-quinasa (lloc d'unió de l'ATP)

2.2 Materials i mètodes

En aquest capítol, es descriurà l'equipament utilitzat pel desenvolupament de l'assaig, així com les tècniques emprades.

2.2.1 Equipament

2.2.1.1 Tecan ULTRA₃₈₄

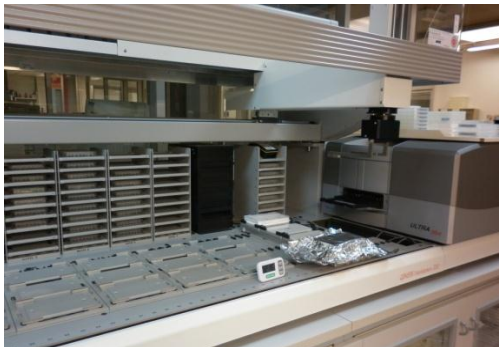
Com ja s'ha comentat en el Capítol 1, podem interpretar els resultats d'aquest assaig mitjançant l'addició d'un producte que produeix luminescència en contacte amb l'ATP residual (la reacció que provoca aquest efecte serà descrita més endavant).

Poder quantificar la luminescència vol dir que també podem quantificar quant ATP queda després que s'intenti bloquejar l'EGFR amb un inhibidor i, sabent que el consum d'ATP és senyal inequívoc del funcionament de l'enzim, poder determinar si s'ha pogut inhibir el receptor.

Evidentment, nosaltres som incapaços de mesurar la intensitat lumínica (el terme científic que normalment s'utilitza és *llegir l'assaig*), per la qual cosa va ser utilitzat un aparell especial per a poder determinar la luminescència.

L'equipament que va ser elegit per llegir el assaig va ser el lector multifuncional Tecan Microplate Reader ULTRA₃₈₄, que és un instrument controlat

mitjançant un ordinador que gràcies a diversos sensors interns ens permet mesurar la luminescència i altres radiacions com ara la intensitat fluorescent (FI), la fluorescència polaritzada (FP), l'absorbància (A) i la Time Resolved Fluorescence (TRF).



Imatge 1. Tecan Microplate Reader ULTRA₃₈₄ integrat en una plataforma robòtica (Genesis Workstation 200) que pot automatitzar el procés de lectura.

En el nostre cas, però només estàvem interessats en mesurar la luminescència. La unitat de mesura elegida van ser els RLUs. Per a poder realitzar la lectura, s'introdueix en una ranura especial de l'instrument una microplaca que no és res més que una estructura de plàstic que consta de diferents forats o wells⁶.

Normalment, en cada well es varia algun paràmetre del experiment per així, un cop obtinguda la lectura, poder comprovar com varia la luminescència en funció d'aquest paràmetre.

Per tal de poder controlar la lectura i processar les dades, l'ULTRA₃₈₄ va ser controlat amb el software XFluor4. Aquest software es basa en el Microsoft Excel®, i té una interface que permet la manipulació bàsica de l'instrument i mostrar en pantalla les dades crues en fulles Excel®. D'aquesta manera, s'obtenen taules de valors en què s'indica la luminescència en RLUs per cada well.

Tot i això, les taules de valors són difícils d'interpretar i per aquest motiu es busquen altres formes de presentar els resultats obtinguts per l'ULTRA₃₈₄. En aquest treball, va ser utilitzat el Sigma Plot (10.0 version) un programa gràfic molt acurat que ofereix nombroses eines científiques que és molt habitual en els laboratoris.

⁶ well, *n*: pou. En textos científics és més habitual el terme en anglès

2.2.1.1 Thermo Fisher Scientific iEMS Incubator

El iEMS Incubator Shaker és un equipament d'alta temperatura que permet incubar i sacsejar 6 microplaques simultàniament. Entre les seves característiques cal destacar l'excel·lent uniformitat de temperatura en la placa i l'eficient barreja del seu contingut. Aquests processos desenvolupats per aquest equipament són molt importants per assegurar uns bons resultats i l'escurçament del temps de l'experiment.



Imatge 2. iEMS incubator (Thermo LabSystem)

2.2.2 Reactius

Els reactius utilitzats durant l'assaig van ser:

2.2.2.1 Human Recombinant EGFR, C-terminal fragment: enzim sobre el qual es realitzaran les experimentacions

2.2.2.2 ATP: cofactor, és imprescindible per el desenvolupament de l'assaig, aporta l'energia necessària per el funcionament de l'enzim.

2.2.2.3 Poly (Glu-Tyr) 4:1: substrat de l'enzim constituent en una cadena llarga dels aminoàcids Glu i Tyr.

2.2.2.4 Kinase Buffer: Es tracta d'una solució tampó de PH 7,5 que assegura que l'EGFR es trobi en condicions adequades per a l'experimentació. És especial per al tipus d'enzim quinasa (família a la qual pertany el receptor).

A més a més, també es van utilitzar diversos productes químics per produir la luminescència per detectar l'activitat de l'enzim:

2.2.2.5 Kinase-Glo Plus Luminiscent Assay

La reacció de la quinasa va ser detectada amb un kit luminescent anomenat Kinase-Glo Plus Luminiscent Assay . Aquest assaig ens permet quantificar la quantitat d'ATP que continua en la solució després de la reacció de l'EGFR [vegeu figura 4]. L'ATP residual és inversament proporcional a la reacció de la quinasa. Per tant, com més activa és aquesta, major consum d'ATP es produeix.



Figura 4. Procés de fosforilació catalitzat per una quinasa, l'enzim utilitza un substrat hidrolitzat i ATP per obtenir un producte amb un grup fosfat i ADP. En el nostre assaig, la quinasa és l'EGFR i el substrat és el Poly (Glu-Tyr). Adaptat de: Promega Technical Bulletin

Per a poder detectar el consum d'ATP, es va portar a terme una reacció luminescent. El kit Kinase-Glo Plus Luminiscent Assay conté Ultra-Glo Luciferase (un enzim oxidativa) i beetle luciferin (luciferina d'escarabat que actua com a substrat). En presència d'oxigen i de Mg²⁺, la luciferasa utilitza el ATP residual de la reacció de la quinasa per convertir la luciferina en oxyluciferin.

Aquesta reacció produeix un fotó de llum i altres productes secundaris com AMP, PPi and CO₂ [veure figura 5]. El senyal luminescent originat és inversament proporcional a l'activitat quinasa. Com més activitat quinasa (i per tant menys ATP residual per utilitzar en aquesta reacció), senyal luminescent més dèbil

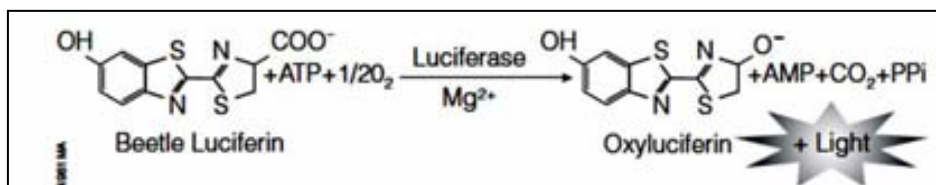


Figura5.Reacció del Kinase-Glo Plus Assay. Adaptat de: Promega Technical Bulletin

Tots els assaigs van ser fets en microplaques blanques de 384-wells (MTP-384). Les plaques blanques van ser seleccionades degut al seu *low background* (wells de poca profunditat), i sobretot perquè eviten la contaminació creuada de luminescència entre wells. D'aquesta manera ens assegurem que la intensitat lumínica que mesurem en cada well no es veu afectada per la luminescència dels wells del costat. De totes maneres, i com a precaució, en tots els assajos es va deixar un well buit entre cada dos wells que formaven part de l'experiment.

2.3 Metodologia experimental

Per a poder establir les condicions òptimes de l'assaig es van seguir les següents etapes:

2.3.1 Reacció enzimàtica

- a) Afegir enzim, cofactor i substrat (EGFR + ATP + Poly(E:Y))
- b) Sacsejar 30-60 segons
- c) Incubació a RT

2.3.2 Reacció luminescent

- a) Afegir Kinase-Glo Plus Reagent
- b) Sacsejar 30-60 segons
- c) Incubació a RT⁷

2.3.3 Lectura de luminescència

Va ser realitzada amb Tecan ULTRA₃₈₄(veure 2.2.1)

Cal puntualitzar que tots els experiments es van fer triplicats (és va repetir com a mínim tres cops la mateixa reacció).

⁷ RT: room temperature, (temperatura ambient, aproximadament 25°C)

2.4 Tècniques manuals

Fins ara s'ha explicat detalladament el conjunt d'aparells utilitzats per realitzar l'experiment, però cal remarcar que la preparació dels assajos ha estat manual. Per realitzar tots els experiments s'han dut a terme dilucions entre els diversos reactius en microplaques. Alguns d'aquests procediments, quan es treballa en un laboratori professional com Ferrer Internacional, són realitzats per robots prèviament programats amb l'objectiu d'optimitzar el temps, ja que normalment s'han de cribar centenars o milers de compostos.

En el meu cas, però, vaig optar per fer tots els experiments jo mateixa sense l'ajuda de robots per adquirir experiència amb una eina fonamental per la investigació biològica: les micropipetes.

2.4.1 Utilització de micropipetes

La majoria de persones coneixen el funcionament d'una pipeta convencional, que no és res més que un tub de vidre estret i allargat acabat en punta que s'utilitza per traslladar volums de líquids d'un recipient a un altre.

L'objectiu de les micropipetes és el mateix, tot i que es treballa amb volums molt més petits i l'eina és més sofisticada.

La micropipeta ha de ser calibrada amb regularitat i és molt específica: cada micropipeta permet treballar en un rang concret de volum. Fora d'aquest rang no es pot agafar el volum amb precisió. Per tant, es necessari disposar de diverses pipetes per a poder traslladar qualsevol volum. Durant aquest projecte, he treballat amb tres micropipetes amb rangs de volum diferents: (1-2 μ l), (5-10 μ l) i (20-100 μ l).

Per seleccionar el volum de líquid que es vol agafar, es fa girar la rodeta situada damunt de la micropipeta. Aquesta es pot baixar, accionant el mecanisme que un cop es deixa anar succiona el líquid. La succió es realitza amb puntes de plàstic estèrils d'un sol ús especials per cada tipus de micropipeta.



Imatge 3- Micropipetes utilitzades: Gilson P2 (1-2 µl), Gilson P10 (5-10 µl) i Gilson P100 (20-100µl)

Per als casos en que es vol dipositar el mateix volum d'un reactiu en diferents wells va ser utilitzada una micropipeta multifuncional que permet transportar fins a 12 mostres de volum igual.



Imatge 4- Micropipeta Multifuncional

2.4.2 Dilucions seriades

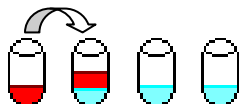
Aquest procediment, bastant simple, ens permet observar com la variació d'un paràmetre afecta a l'experiment. En el nostre cas les dilucions seriades són realitzades en les mateixes plaques mitjançant les micropipetes.

Posem per exemple una dilució seriada 1:2 realitzada en 4 wells.

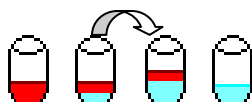
En un primer well, es posa una quantitat X de solut a concentració [X], en els altres 3 wells restants, s'afegeix X/2 de dissolvent.



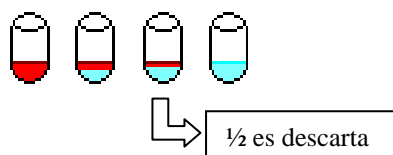
A continuació, amb la pipeta s'extreu la meitat del solut del primer well ($X/2$) i es posa al segon well on es barreja bé la mescla i després s'extreu la mateixa quantitat ($X/2$). D'aquesta manera, la concentració de solut en el segon well serà $[X/2]$.



El procediment es repeteix per al well 3: s'extreu un altre cop la quantitat ($X/2$) del segon well i es posa al tercer per aconseguir una concentració $[X/4]$.



Per a poder tenir el quart well amb una concentració de solut $[0]$, s'extreu ($X/2$) del tercer well i en comptes de posar aquesta quantitat al well 4 es descartarà.



Per tant, el resultat final són quatre wells amb la mateixa quantitat de substància $X/2$, però amb concentracions que disminueixen progressivament: $[X]$, $[X/2]$, $[X/4]$ i $[0]$. En altres paraules la concentració de solut és 100%, 50%, 25% i 0%.

En aquest cas, es diu que és una dilució seriada 1:2 perquè la concentració de solut es redueix a la meitat en cada well (exceptuant l'últim well, que s'estableix que no contingui solut per a tenir un control negatiu).

Altres dissolucions seriades habitualment utilitzades en assajos bioquímics són les 1:10. Aquestes tècniques són molt importants per analitzar com afecta la presència d'un reactiu en l'assaig: s'estudia com evoluciona l'experiment a diferents concentracions d'aquest reactiu concret.

Per al nostre objectiu principal, desenvolupar un assaig bioquímic per detectar inhibidors del Receptor del Factor Epidèrmic de Creixement, és de vital importància saber com afecten diferents concentracions de reactius a l'EGFR.

2.5 Desenvolupament de l'assaig

En aquest apartat, es detallaran els procediments dels experiments que van ser realitzats per preparar l'assaig de detecció d'inhibidors del Receptor del Factor Epidèrmic de Creixement. Més endavant, en el punt 6, els resultats obtinguts d'aquests seran exposats i analitzats.

A continuació, es descriuran els paràmetres que s'han ajustat per poder configurar un assaig eficaç tant experimentalment com econòmicament: establir la quantitat justa i necessària dels reactius en l'assaig és fonamental per poder-lo repetir en el futur minimitzant-ne el cost.

2.6 Linealitat del senyal lumínic

Com que la quantificació de totes les dades es realitza a partir del senyal lumínic obtingut al afegir el reactiu Kinase-Glo Plus Luminiscent Assay, que reacciona amb l'ATP residual de l'experiment, és de vital importància assegurar-nos que el senyal luminescent pot detectar amb exactitud qualsevol variació de l'ATP que es pugui produir a l'assaig.

L'objectiu d'aquest experiment serà conèixer la linealitat del senyal lumínic, o dit d'una altra manera, conèixer fins quin concentració d'ATP el senyal continua seguint un patró lineal, en què qualsevol augment d'ATP és directament proporcional a un augment de la luminescència (RLUs, Relative Luminescence Units).

Fora d'aquest rang, un augment del contingut d'ATP no serà reflectit com un augment de luminescència, el senyal es trobarà saturat. Com que l'objectiu final del nostre assaig és detectar potencials inhibidors per al nostre receptor, necessitem estar

segurs que podem detectar qualsevol augment de concentració d'ATP. Per tant hem de conèixer la concentració màxima d'ATP que podem utilitzar.

Per aquest experiment, van ser preparades dilucions seriades (1:2) d'ATP en aigua Milli-Q en una placa blanca de 384 wells.

									Placa de 384 wells blanca				
Placa manual	1	2	3	4	5	6	7	8	.	.	.	24	
A	0	10	10	10	10	10	10	10	vol AD				
	20	10	10	10	10	10	10	0	vol ATP (µl)				
B	0	10	10	10	10	10	10	10					
	20	10	10	10	10	10	10	0					
C	0	10	10	10	10	10	10	10					
	20	10	10	10	10	10	10	0					
Volumfinal en cada well: 10 µl									del well 7 treure 10 µl				

Esquema 1- Volum dels reactius de l'experiment de linealitat del senyal lumínic

Tots els wells contenen el mateix volum final (10µl), però cada un representa una concentració diferent d'ATP (500 µM, 250 µM, 125 µM, 62,5 µM, 31,25 µM, 15,63 µM, 7,81 µM i 0 µM).

A continuació, per detectar el contingut d'ATP, el mateix volum de Kinase-Glo Plus Reagent (10µl) va ser afegit dins dels wells.

Abans de llegir el senyal luminescent, la MTP-384 va ser sacsejada durant 45 segons perquè els diferents reactius es barregessin.

La placa va ser coberta amb un full d'alumini per evitar que la llum pogués perjudicar l'experiment, i incubada a temperatura ambient durant 10 minuts.

Els resultats obtinguts van ser representats amb el Sigma Plot i tots els punts van ser ajustats a una regressió lineal.

2.7 Experiments realitzats per a la determinació dels paràmetres òptims per a la cinètica enzimàtica

En les cèl·lules i els organismes, la majoria de reaccions són catalitzades per enzims, que són regenerats durant el curs de la reacció. Aquests catalitzadors biològics

són fisiològicament importants perquè acceleren reaccions que d'una altra manera serien massa lentes.

Degut a la funció dels enzims de mantenir aquests processos químics, l'assaig i la regulació farmacològica d'aquests han esdevingut elements clau en la diagnosi i la teràpia.

La cinètica enzimàtica és l'estudi de la velocitat de reaccions químiques catalitzades per enzims. En la cinètica enzimàtica, la reacció és mesurada i s'hi investiga l'efecte de diferents factors (temps, PH, temperatura, concentració dels diferents reactius...).

En el nostre assaig van ser establerts diversos paràmetres que asseguraven un bon funcionament de l'enzim (EGFR), que més endavant ens permetien poder detectar qualsevol tipus d'inhibidor del receptor amb exactitud. A més a més, conèixer aquests paràmetres ens ajuda a reduir el cost econòmic de l'assaig, un factor d'alta importància en la recerca.

Els paràmetres que van ser mesurats són:

2.7.1 EC₅₀ de l'enzim (EGFR)

L'EC₅₀ (half maximal effective concentration) és un paràmetre molt important que estableix la concentració d'enzim que representa el 50% de l'activitat màxima

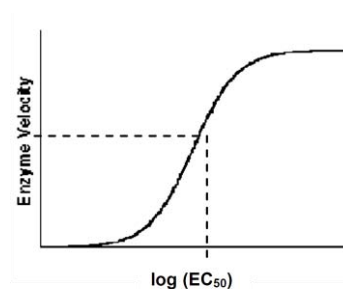


Figura 7. Corba sigmoïdal que representa l'EC₅₀. Font: www.curvefit.com

Treballar a l'EC₅₀ ens assegura suficient quantitat d'enzim per una realització òptima del assaig i la reducció del seu cost.

Per al càlcul de l'EC₅₀ va ser preparada una corba⁸ amb diferents concentracions d'enzim en una MTP-384. El Poly (Glu-Tyr) 4:1 es va utilitzar com a substrat (amb una concentració final de 20µM) i l'ATP (amb una concentració de 10 µM) va ser utilitzat com a cofactor.

Una dilució seriada d'EGFR va ser realitzada a les concentracions de: 300 nM, 200 nM, 133,33 nM, 88,89 nM, 59,26 nM, 39,51 nM, 26,34 nM, 17,56 nM, 5,85 nM i 0 nM. L'enzim va ser diluït en Kinase Buffer.

2.7.2 Temps d'incubació per la reacció enzimàtica

Per tal d'assegurar que l'enzim funciona en les millors condicions i que podem determinar l'EC₅₀ amb exactitud, es van fer diverses rèpliques dels experiments per detectar aquest valor a diversos temps d'incubació.

Per determinar el millor temps d'incubació per la reacció enzimàtica, es van incubar 3 plaques a 25°C durant diferent temps utilitzant l'iEMS Incubator:

- *Placa 1:* 120 minuts d'incubació enzimàtica i a continuació 10 minuts d'incubació de kinase glo-plus

- *Placa 2:* 180 minuts d'incubació enzimàtica i a continuació 10 minuts d'incubació de kinase glo-plus

- *Placa 3:* 240 minuts d'incubació enzimàtica i a continuació 10 minuts d'incubació de kinase glo-plus

Després van ser analitzats els resultats per veure per quin temps d'incubació s'aconseguia el paràmetre EC₅₀ més acurat.

⁸Preparar una corba: experiment en el que es varia la concentració d'un dels reactius mitjançant la tècnica de la dilució seriada

2.7.3 Km del Substrat (Poly (Glu-Tyr) 4:1)

La K_m (Michaelis-Menten constant) és un paràmetre que estableix la concentració de substrat amb la qual s'obté la meitat de la màxima velocitat de la reacció enzimàtica.

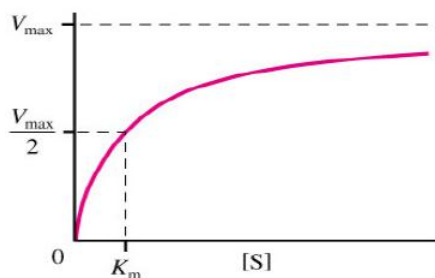


Figura 8. Corba que representa el paràmetre K_m . Font: www.iftsa.org (Cinètica Enzimàtica)

En qualsevol reacció enzimàtica amb una concentració d'enzim constant, si s'augmenta la concentració de substrat es produeix un augment de la velocitat de reacció, ja que com hi ha més molècules de substrat per unitat de volum, és més probable que l'enzim trobi un substrat més ràpidament, fins que no es satura.

Treballar al valor de K_m ens permet detectar aquests inhibidors que s'uneixen al mateix lloc que el substrat. En aquest cas, els inhibidors competeixen amb el substrat per al mateix lloc d'unió. Per calcular la K_m del substrat l'experiment va ser realitzat a $10 \mu\text{M}$ d'ATP i 100nM d'EGFR, i van ser preparades dilucions seriades 1:2 de Poly (Glu-Tyr) a les següents concentracions: $400 \mu\text{M}$, $200 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$, $25 \mu\text{M}$, $12,5 \mu\text{M}$, $6,25 \mu\text{M}$, $3,13 \mu\text{M}$ i $0 \mu\text{M}$.



Figura 9. Preparació de la dilució seriada del substrat

2.7.4 Km del Cofactor (ATP)

Com ja s'ha explicat abans, la Km és la concentració, en aquest cas de cofactor (ATP), que dóna la meitat de la màxima velocitat de reacció enzimàtica. Treballar al valor de Km ens permet detectar aquets inhibidors que s'uneixen al mateix lloc que el cofactor. En aquest cas, els inhibidors competeixen l'ATP per el mateix lloc de unió.

Per calcular la Km del cofactor l'experiment es va realitzar a 2000 μM de substrat i 100nM d'EGFR, i es van preparar dilucions seriadades 1:2 d'ATP a les següents concentracions: 100 μM , 50 μM , 25 μM , 12,5 μM , 6,25 μM , 3,13 μM , 1,56 μM i 0 μM .

2.7.5 Determinació del IC_{50} de dos inhibidors coneguts

Un cop hem pogut establir tots els paràmetres abans explicats per desenvolupar l'assaig, cal provar que aquest sigui capaç de detectar qualsevol tipus d'inhibidors.

Per a validar l'assaig, es van utilitzar dos inhibidors coneguts de l'EGFR: la Staurosporine i el Compound56. La Staurosporine s'uneix al lloc de unió de l'ATP (competeix amb l'ATP), i el Compound56 inhibeix l'activitat tirosina-quinasa del receptor.

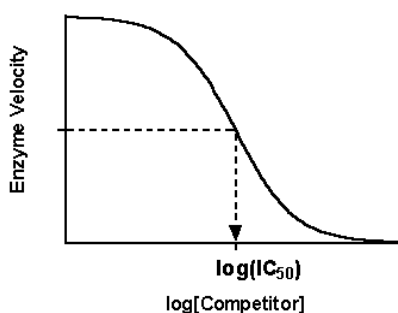


Figura 10. Representació del valor IC_{50} d'un inhibidor. Font: www.curvefit.com

Per determinar la potencia del inhibidors va ser calculat l' IC_{50} , que és la concentració d'inhibidor que inhibeix el 50% de l'activitat enzimàtica.

L' IC_{50} d'un medicament es determina preparant concentracions creixents del inhibidor i provant el seu efecte en l'activitat de l'EGFR.

Les condicions fixades per determinar l'IC₅₀ dels inhibidors van ser calculades prèviament :

$$[EGFR]= EC_{50}$$

$$[ATP]= K_m \text{ cofactor}$$

$$[\text{Poly}(\text{Glu:Tyr})]= K_m \text{ substrat}$$

Temps d'incubació= temps d'incubació enzimàtica i d'incubació de kinase plus de la placa de l'experiment de l'EC₅₀ amb millor resultats.

Per a trobar el paràmetre IC₅₀ es van realitzar dilucions seriades 1:2 de Staurosporine a les següents concentracions: 125000nM, 62500nM, 31250nM, 15625nM, 7813nM, 39609nM, 1953nM, 976 nM, 488nM i 81,38nM.

Pel que fa a les dilucions seriades del Compound 56 van ser 1:2: 2400nM, 600nM, 300nM, 150nM, 75nM, 37,5nM, 18,75nM, 9,375nM, 4,687nM i 1,171875nM.

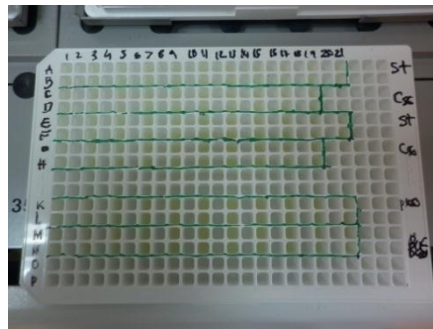


Figura 11.Placa MTP-384 amb les dilucions seriades dels dos inhibidors

Els resultats es representaren amb el Sigma Plot i els valors s'ajustaren a una corba Sigmoidal amb el mateix programa.

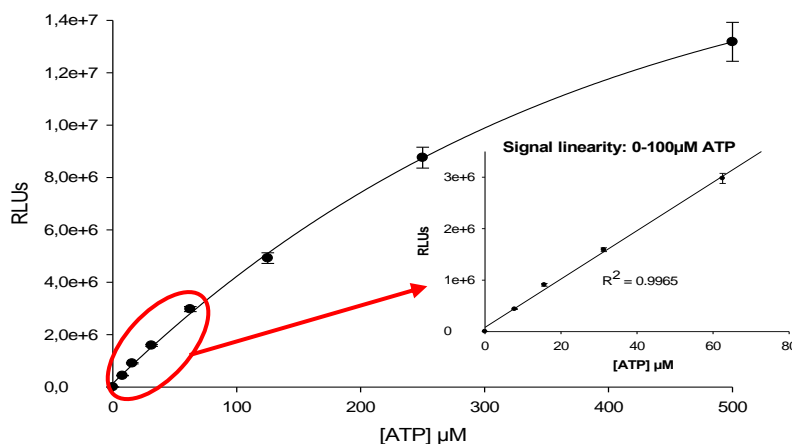
2.8 Resultats de l'assaig

2.8.1 Concentració òptima d'ATP per assegurar la linearitat del senyal

L'objectiu d'aquest experiment era obtenir el rang de linearitat entre la concentració d'ATP i el senyal luminescent. Per poder determinar el rang de linearitat, o dit d'una altra manera, fins a quina concentració d'ATP un increment d'aquest reactiu és directament proporcional a un increment de luminescència, es va realitzar un càlcul del Coeficient de Correlació de Pearson de la recta:

$$r = \frac{\sigma_{xy}}{\sigma_x \cdot \sigma_y}$$

El coeficient de correlació (r) d'una recta és un valor estadístic que es calcula dividint la covariància per les desviacions típiques de les dues funcions i que ens indica la relació existent entre elles. Si $r=1$ o s'aproxima a $r=1$, aleshores les dues funcions són directament proporcionals. En canvi, si $r=-1$ o s'aproxima a $r=-1$, les funcions serien inversament proporcionals.



Gràfic 1. Linearitat del senyal des de 0 fins 500 µM d'ATP. En la imatge a la dreta, el detall de la regressió lineal des de 0-100 µM ATP. Cada punt representa la mitja de tres rèpliques ± SD.

Com es mostra en el gràfic, hem pogut comprovar que existeix una bona correlació ($r= 0,996$) entre 0 i 100µM d'ATP, però a un nivell superior de concentració d'ATP perdem la linearitat i els valors augmenten, perdent-se la relació de proporcionalitat. Això vol dir que no podem excedir la concentració de 100µM d'ATP,

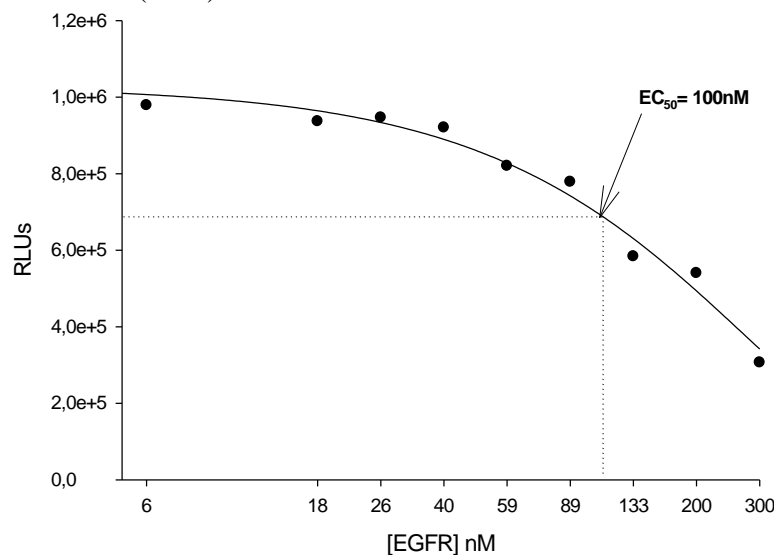
perquè des de aquest punt l'augment de l'ATP no correspondrà a un augment de luminescència (el senyal està saturat).

Com s'explica al punt 2.2 Materials i Mètodes, l'assaig es basa en la quantificació d'ATP residual després de la reacció enzimàtica. Quan és actiu, l'EGFR consumeix ATP, però en presència d'un inhibidor, l'EGFR no és troba actiu i no consumeix ATP. En el nostre projecte preveiem treballar a altes concentracions d'ATP, així que s'ha d'estar segur que els experiments es realitzen en el rang lineal de l'ATP.

2.8.2 Paràmetres cinètics òptims

2.8.2.1 EC_{50} de l'enzim (EGFR)

Un cop establert el rang lineal de l'ATP, es va realitzar una corba de dosis-resposta per a determinar l' EC_{50} de l'EGFR, que es va preparar mitjançant dilucions seriades d'enzim desde 0 fins a 300nM, en presència de 20 μ M de substrat (Poly (Glu-Tyr)) i 10 μ M de cofactor (ATP).



Gràfic 2. Representació dels valors de luminescència amb concentracions d'enzim creixents (de 0 fins a 300 nM). En el gràfic s'indica el càlcul de l' EC_{50} de l'enzim. L'experiment es va fer en presència de 20 μ M de Poly (Glu-Tyr) i 10 μ d'ATP.

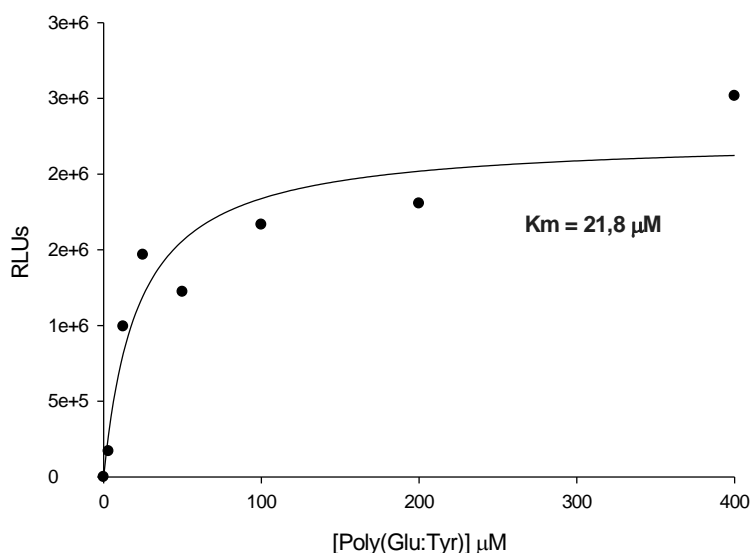
Com podem observar en el gràfic 2 l'enzim estava actiu. Concentracions creixents d'EGFR van consumir creixent concentracions d'ATP, disminuint el senyal detectat. En

el nostre experiment, la concentració d'EGFR que representa el 50% de la seva màxima activitat és 100nM. Cal remarcar que el gràfic obtingut de l'EC₅₀ de l'enzim és diferent al gràfic model que es pot observar en el punt 2.7.1 perquè allà la variable dependent és la velocitat de l'enzim, i no pas la luminescència (que és directament proporcional a l'ATP residual de la reacció i per tant, inversament proporcional a l'activitat enzimàtica) i també perquè la variable independent està calculada amb logaritme.

Pel que fa al temps d'incubació de la reacció, el vam establir mitjançant la realització de l'experiment de l'EC₅₀ de l'EGFR en diversos temps (veure punt 2.7.2), i vam obtenir els millors resultats en el cas de la placa 2 (180 minuts d'incubació enzimàtica)

2.8.2.2 Km del Substrat (Poly (Glu-Tyr) 4:1)

L'objectiu d'aquest experiment va ser determinar la Km del substrat, un paràmetre que ens indica l'afinitat d'unió de l'enzim pel seu substrat (com més baix sigui el valor de Km, major afinitat). Per determinar el valor de Km, va ser realitzada una corba dosis-resposta del substrat (de 0 a 400 µM), utilitzant el valor de la concentració òptima de l'EGFR prèviament obtingut (EC₅₀=100 nM) i 10 µM d'ATP

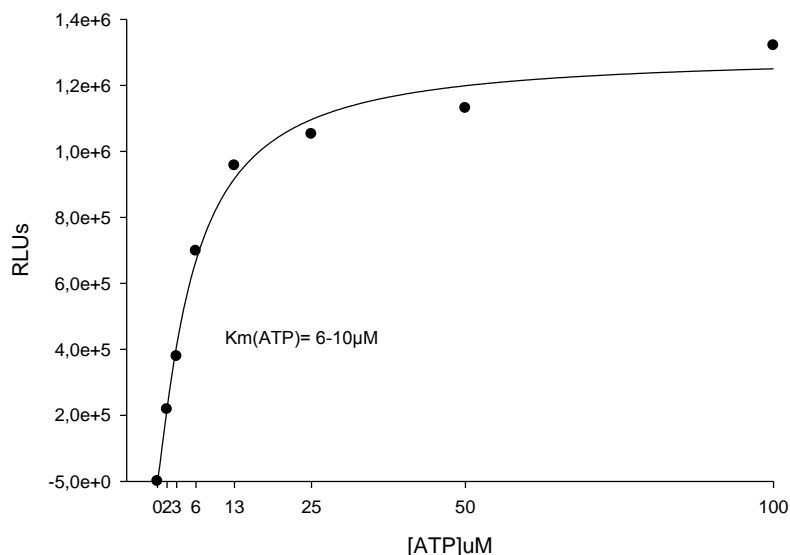


Gràfic 3. Corba de dosis-resposta del substrat (des de 0 fins a 400 µM) realitzada en presència 10 µM ATP i 100 nM EGFR. En el gràfic es mostra el valo obtingut de Km.

Els nostres resultats mostren que a concentracions creixents de substrat la intensitat del senyal també ho fa, suggerint una activitat enzimàtica superior. El valor de K_m obtingut va ser $21,8 \mu\text{M}$, indicant que aquesta concentració de substrat dóna la meitat de la màxima activitat de l'EGFR. Treballant a aquesta concentració del substrat podem detectar inhibidors que s'uneixin al lloc del substrat.

2.8.2.3 K_m del Cofactor (ATP)

L'objectiu d'aquest experiment era determinar la concentració d'ATP que dóna el 50% de la màxima activitat de l'EGF



Gràfic 4. Corba d'ATP (de 0 a $100 \mu\text{M}$) duta a terme a 100 nM d'EGFR i $200 \mu\text{M}$ de Poly (Glu-Tyr). En el gràfic es mostra el valor de K_m obtingut.

Els resultats es veuen en la gràfica 4, on podem observar que el valor de K_M per l'ATP és aproximadament $6-10 \mu\text{M}$.

Aquest valor de K_m ($10 \mu\text{M}$) es van establir com la concentració d'ATP en els següents experiments per trobar compostos inhibidors. Aquesta concentració d'ATP (K_m) ens permet detectar inhibidors que competeixen pel lloc d'unió de l'ATP.

Si comparem el valor de K_m del substrat ($21,8 \mu\text{M}$) amb el valor obtingut de K_m del cofactor ($10 \mu\text{M}$) podem veure que aquest és major com era previsible, ja que té una major incidència en la reacció enzimàtica actuant com a iniciador d'aquesta.

2.8.2.4 Determinació del IC₅₀ de la Staurosporine

El nostre assaig va ser validat amb un inhibidor de l'EGFR conegut (Staurosporine) que competeix pel lloc d'unió de l'ATP. L'objectiu era comprovar que l'assaig realitzat era capaç de detectar inhibidors del receptor que s'unissin al lloc d'unió del cofactor.

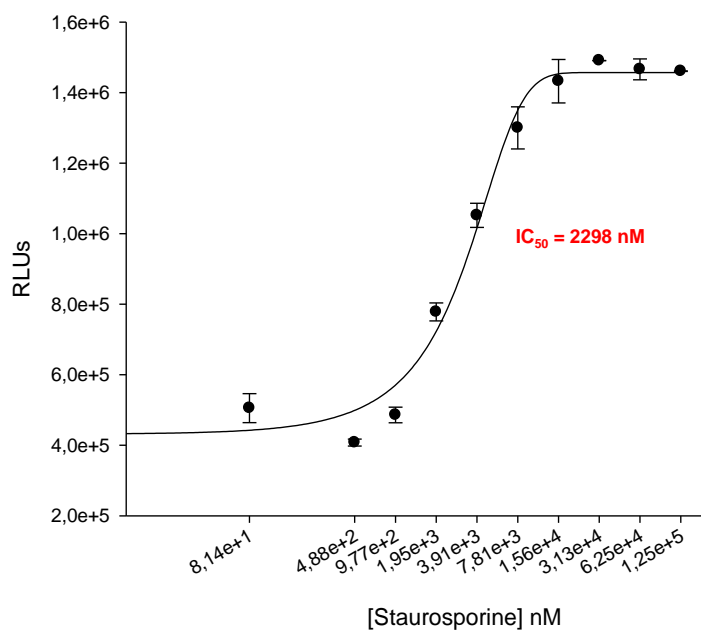
Les condicions òptimes per a l'assaig van ser les fixades durant el desenvolupament del mateix:

[EGFR]= 100nM

[ATP]= 10μM

[Poly(Glu:Tyr)]= 20μM

Temps d'incubació= 180 minuts d'incubació enzimàtica i a continuació 10 minuts d'incubació de kinase glo-plus



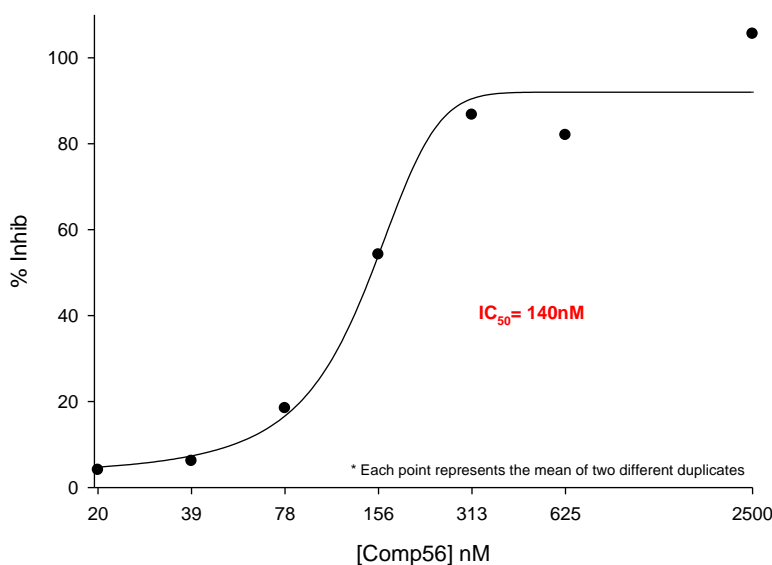
Gràfic 5. Corba d'inhibició de l'EGFR des de 0 fins a 1,25e+5 nM en presència de la Staurosporine 56.

El valor IC₅₀ de l'inhibidor Staurosporine és de 2,3μM (2298 nM), o en altres paraules, es necessita 2,3μM de Staurosporine per inhibir el 50% de l'activitat enzimàtica, mesurada en RLUs.

Podem observar que els gràfics 5 i 6 són diferents al gràfic model de l'IC₅₀ (punt 2.7.5). Tal com ha succeït també amb el gràfic del paràmetre EC₅₀, en el gràfic model de l'IC₅₀ la variable dependent és la velocitat de l'enzim, i no pas la luminescència.

2.8.2.5 Determinació del IC₅₀ del Compound56

Per validar l'assaig es va utilitzar un altre tipus d'inhibidor que bloquejava l'activitat tirosina quinasa, evitant la fosforilació i el consum d'ATP: el Compound56.



Gràfic 6. Corba d'inhibició de l'EGFR des de 0 fins a 1,25e+5 nM en presència del Compound 56. 100 nM d'EGFR, 20 µM de Poly (Glu-Tyr) i 10 µM d'ATP

El Gràfic 6 representa el tant per cent d'inhibició de l'activitat enzimàtica en presència de diferents concentracions de Compound 56. El percentatge d'inhibició ha estat calculat a partir dels valors obtinguts en RLUs.

Tal i com es pot veure, el paràmetre IC₅₀ pel Compound 56 va ser de 140 nM, bastant inferior a l'IC₅₀ de la Staurosporine: Tot i aquests resultats, no podem entrar a valorar quin inhibidor és més efectiu ja que en cada experiment la dilució de l'inhibidor va ser realitzada a concentracions diferents. És a dir, la dilució seriada de cada inhibidor va ser establerta adequant-se a l'estoc disponible de cada inhibidor a Ferrer Internacional

Capítol 3: Discussió de resultats

3.1 Conclusions

En aquest treball hem pogut constatar que el càncer és una malaltia originada a partir de l'acumulació d'alteracions en l'ADN, concretament en determinats gens (protoncògens, gens supressors de tumors, gens reparadors d'ADN i gens del sistema immunitari) que a causa del seu estat sintetitzen proteïnes alterades que provoquen que una cèl·lula normal esdevingui cancerígena.

L'objectiu principal d'aquest projecte era desenvolupar un assaig bioquímic capaç d'identificar nous compostos inhibidors que poguessin bloquejar potencialment l'activitat d'una d'aquestes proteïnes, l'EGFR, i conseqüentment, la progressió del càncer.

Després d'analitzar les dades obtingudes de l'experimentació, puc concloure que l'assaig ha complert el seu objectiu: l'EGFR va poder ser inhibit amb dos tipus de compostos inhibidors coneguts: la Staurosporine, que és un compost que s'uneix al receptor en el lloc d'unió de l'ATP, i el Compound56, que inhibeix l'activitat tirosina quinasa del receptor.

Per tant, la configuració realitzada de l'assaig general *in vitro* basat en el consum de l'ATP ens permet identificar tant inhibidors que competeixin amb el lligand com inhibidors que actuen a nivell del domini tirosina-quinasa, és a dir, que l'assaig ens permet determinar si una substància química concreta pot bloquejar l'activitat de la diana establerta, l'EGFR, independentment del domini on es pugui unir.

A més a més, també podem calcular l'IC₅₀, que ens permet saber la potència dels inhibidors i ens ajuda a l'abaratiment de costos en els processos d'investigació posteriors. En aquest cas, va ser de 140 nM per a el Compound56 i 2298 nM per la Staurosporine.

Un experiment que resultaria interessant realitzar de cara al futur seria una comparació d'aquests dos valors (que no hem pogut fer en aquest projecte perquè per limitacions en l'estoc les dilucions seriades dels inhibidors les vam fer a concentracions diferents) per a poder establir quin dels dos compostos resulta més efectiu contra l'EGFR.

Pel que fa a l'establiment dels paràmetres òptims per a la cinètica enzimàtica, un dels punts crítics en qualsevol assaig bioquímic, podem dir que ha estat correctament realitzada, ja que hem demostrat que el nostre assaig és prou sensible per detectar qualsevol tipus d'inhibidor en les condicions establertes i les gràfiques resultants tenen un alt grau de correlació.

En el futur, aquest assaig que he realitzat serà utilitzat per detectar potencials inhibidors de l'EGFR amb les diferents llibreries de compostos químics que Ferrer Internacional utilitza per cribar.

Tot i això, aquest assaig és només el primer pas que es realitza per a iniciar el desenvolupament d'un fàrmac i s'haurien d'ampliar els estudis realitzats per a poder assegurar un bon funcionament dels inhibidors trobats en models *in vivo*. Cal remarcar que mentre que aquest assaig ha estat realitzat en una placa de laboratori, proporcionant un substrat artificial, en organismes vius el substrat és diferent i també hi ha altres molècules que podrien interferir en l'efectivitat d'un possible tractament. Totes aquestes variables haurien de ser considerades alhora de iniciar un nou projecte d'investigació.

El camí per arribar a desenvolupar un fàrmac és altament complex i requereix diversos anys d'experimentació, dedicació i entrega.

Agraïments

La realització d'aquest treball no hauria estat possible sense l'ajuda de moltes persones.

Abans que res, cal dir que tot aquest treball va ser íntegrament realitzat en el High Throughput Screening Department del R&D Center of Ferrer Internacional S.A, així que m'agradaria poder agrair al R&D Center of Ferrer Internacional S.A, i especialment al seu director, el Dr. Antonio Guglietta, haver-me donat l'oportunitat de fer aquesta estada en un laboratori professional.

També voldria agrair a la Dra. Eva Mendez (Head of the High Throughput Screening Department) el temps dedicat al disseny, desenvolupament i discussió d'aquest projecte i també la seva amabilitat, explicacions i tantes conversacions interessants. Del High Throughput Screening Department també vull donar les gràcies a la Núria Lluch per ensenyar-me tantes coses (especialment al laboratori), així com a la Dra. Willmar Castillo i la Dra. Gemma Pueyo per respondre les meves infinites preguntes, relacionades o no amb l'article. Aquests dies amb vosaltres han estat increïbles, realment penso que el meu desig de dedicar-me a l' investigació en el futur s'ha vist reforçat després d'aquesta experiència.

Moltes gràcies al meu institut, l'INS Pere Calders, per ajudar-me amb els tràmits i tota la burocràcia necessària per realitzar aquest treball a Ferrer Internacional. M'agradaria agrair molt especialment a la meva professora de biologia M^aTeresa Pla-Giribert totes les atencions, consells i hores del pati invertides a escoltar-me parlar de proteïnes quinases, inhibidors i cinètica enzimàtica. Ha estat una tutora excel·lent.

També voldria donar les gràcies a la Jelena Raspopovic, estudiant de doctorat al Centre de Regulació Genòmica, totes les seves explicacions sobre vies de transducció de senyal durant aquest estiu, que m'han resultat molt útils per completar aquest treball.

Finalment, m'agradaria agrair a CatalunyaCaixa aquest estimulant i alhora exigent Programa Joves i Ciència, especialment a l'Eva Calvès i la Maria Calsamiglia,

per fer la ciència tant emocionant i permetre a estudiants viure aquestes meravelloses experiències en el món de la recerca capdavantera.

Moltes gràcies a tots, moltes gràcies per confiar en mi i donar-me l'oportunitat de comprovar per mi mateixa el que es treballar en un laboratori!

Referències bibliogràfiques

Articles científics

- ADAMS R, MAUGHAN T, “Predicting response to epidermal growth factor receptor-targeted therapy in colorectal cancer”, *Expert Rev. Anticancer Ther.* 7 (4), (2007)
- ARSLAN M.A, KUTUK O, BASAGA H, “Protein Kinases as Drug Targets in Cancer”, *Current Cancer Drugs Targets*, Vol.6, pp.623-634, (2006)
- ARTEAGA C.L, “Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression?”, *The Oncologist*, Vol.7(suppl4), pp. 31-39, (2007)
- D’ANDREA M.R, GASPARINI G, “The future of anti-EGFR therapy”, *The International Journal of Biological Markers*, Vol.22 no.1 (suppl 4), pp. 588-593 (2007)
- DASSONVILLE O, BOZEC A, FISCHER J.L, MILANO G, “EGFR targeting therapies: monoclonal antibodies versus tyrosine kinase inhibitors. Similarities and differences”, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, Vol.62, pp. 53-61, (2007)
- DUTTA P.R, MAITY A, “Cellular responses to EGFR inhibitors and their relevance to cancer therapy”, *Cancer Lett.* (2007), doi:10.1018/j.canlet.2007.02.006
- FÉRNANDEZ J.C, PÉREZ V, “EL Receptor de EGF (EGFR): una diana terapéutica para el tratamiento del cancer y sus inhibidores”, *BioCancer Research Journal*, No.3 Fármacos Antitumorales, ISSN 1697-6452 (January 2006)
- HOBDAI T.J, PEREZ E.A., “Molecularly Target Therapies for Breast Cancer”, *Cancer Control*, Vol.12, No.2 (April 2005)
- JOHNSTON J.B, NAVARATNAM S, PITZ M.W, MANIATE J.M, WIECHEC E, BAUST HEINRICH, GINGERICH JOEL, SKLIRIS G.P, MURPHY L.C, LOS M, “Targeting the EGFR Pathway for Cancer Therapy”, *Current Medicinal Chemistry*, Vol. 13, No. 25, (2006)

- KORC M, MELTZER P, TRENT J, “Enhanced expression of epidermal growth factor receptor correlates with alterations of chromosome 7 in human pancreatic cancer”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 83, pp. 5141-5144, (July 1986)
- MALINOWSKY K, WOLFF C, GÜNDISCH S, BERG D, BECKER K.F, “Targeted therapies in cancer-challenges offered by newly developed techniques for protein analysis in clinical tissues”, *Journal of Cancer*, (2011)
- MARTIN P, KELLY M.B, CARNEY D, “Epidermal growth factor receptor-targeted agents for Lung Cancer”, *Cancer Control*, Vol.13, No.2 (April 2006)
- MENDELSON J, “EGF receptors as a target for cancer therapy”, *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, Vol. 1, (2004)
- NYATI M.K, MORGAN M.A, FENG F.Y, LAWRENCE T.S, “Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy”, *Nature Reviews Cancer*, Vol.6, pp.876-885, (November 2006)
- ORTIZ J.M, “Proteína quinasas como dianas farmacológicas”
- PORTER A.C, VAILLANCOURT R.R, “Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis”, *Oncogene*, Vol. 16, pp.1343-1352, (1998)
- PRENZEL N, FISCHER O.M, STREIT S, HART S, ULLRICH A, “The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification”, *Endocrine-Related Cancer*, (2001), Vol.8, pp.11-31, (2001)
- SHCHEMELININ I, ŠEFC L, NEČAS E, “Protein kinase inhibitors”, *Folia Biologica (Praha)* Vol.52, pp.137-148, (2006)
- VAN DER GEER et al., “Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways”, PMID: 7888178 [PubMed - indexed for Medline],(1994)

Llibres consultats

- BECKER W.M, LEWIS K.J, HARDIN J, *El mundo de la célula*, 6a. edició, ed. Pearson Addison Wesley (Madrid, 2007)

- JIMENO A, BALLESTEROS M, Biologia 2 Batxillerat, ed. Grup Promotor, Santillana, Projecte la Casa del Saber

Butlletins tècnics, manuals i altres

- *The World Health Organization's Fight Against Cancer: Strategies That Prevent, Cure and Care* (2007). ISBN 978 92 4 159543 8
- *Promega Technical Bulletin* (part # TB343): *Kinase-Glo® Plus (Luminescent Kinase Assay)*.
- *Sigma Plot User's Guide*
- Cancer, Monografias, disponible a:
<http://www.monografias.com/trabajos12/cance/cance.shtml>. Última consulta: 23-10-2011
- University of Illinois at Chicago, biology lectures, disponible a:
<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/mike/spring2003/lect07.htm>. Última consulta: 6-12-2011

Annex

Recull de premsa

1- MACPHERSON, ANA, "El Clínic extrae un tumor de recto a través del ano", *La Vanguardia*, (1 de diciembre de 2009)

El Clínic extrae un tumor de recto a través del ano

La paciente, de 76 años, fue dada de alta a los cinco días

ANA MACPHERSON
Barcelona

El ano se ha convertido en una nueva vía de acceso prometedor en el futuro de la cirugía que intenta provocar las mínimas heridas. Un equipo del Clínic, junto a una cirujana del hospital General de Massachusetts, de Boston, llevó a cabo la extracción de un tumor maligno de recto que padecía una mujer de 76 años hace tres semanas. La paciente, que se había sometido previamente a quimioterapia y radioterapia, fue seleccionada para esta primera operación realizada en el mundo vía anal.

La principal razón para usar los orificios naturales –ya se han llevado a cabo varias intervenciones a través de la boca, la vagina y el ombligo para sacar un riñón, la vesícula biliar o practicar una intervención en el estómago– es evitar al máximo las heridas y favorecer así la recuperación. En este caso, la paciente fue dada de alta a los cinco días "y poco a poco me estoy recuperando. Me encuentro muy bien", explicó ayer en la presentación del hito quirúrgico que protagonizó por su cáncer. "No sentí ningún miedo ante esta operación. Me lo explicaron perfectamente", aclaró. Para el ciru-

La intervención, en colaboración con cirujanos de Boston, es la primera que se realiza en el mundo

jano que ha dirigido esta intervención pionera, Antonio María de Lacy, la información y la selección del paciente ideal son esenciales cuando se empieza con una técnica nueva. "A una persona obesa no se lo podríamos haber hecho".

La tecnología para este tipo de intervención no está de momento al alcance de la sanidad española, pero la larga experiencia en cirugía laparoscópica, (que a diferencia de esta que emplea los orificios naturales, necesita un par de pequeñas incisiones para acceder a la zona a operar) favoreció la asociación del hospital bostoniano con el barcelonés. En el Clínic llevan más de 700 laparoscopias de recto y 3.000 colorrectales, lo que le convierte en el hospital probablemente más experto del mundo en esa cirugía y le hacía especialmente atractivo para el consorcio norteamericano que está desarrollando esta tecnología.

La operación la dirigieron el doctor Lacy y su colega norteamericana Patricia Sylla. Y esperan repetir en cuanto la cirujana de Boston se recupere de su próximo parto. "Otros cánceres colorrectales, divertículos y otras enfermedades de colon y recto serán las primeras beneficiadas de esta técnica", detalló la doctora Sylla. "De momento no hay razones que justifiquen

perforar el intestino para llegar a otras zonas, como la vesícula biliar", explicó Lacy.

Las ventajas que ofrece el ano frente a la boca como vía de acceso es que pueden sacar por él piezas de mayor tamaño que no pasan por el esófago. Y con respecto a la vagina, el hecho de que a través del ano se beneficiaría el cien por cien de la población y no sólo la femenina.

La extracción del tumor de recto se realiza a través del ano

1. Se introduce el proctoscopio que dilata las paredes del recto...

... y permite el paso de los instrumentos quirúrgicos

2. Se sutura el final del recto a tres o cuatro centímetros del ano...

3. Se disecciona el recto y el colon sigmoide de los tejidos abdominales...

4. Se corta la parte afectada

5. Se cose el colon al ano



FUENTE: Hospital Clínic

LA VANGUARDIA

LA CIRUGÍA CADA VEZ MENOS INVASIVA

Un paso más para evitar heridas

■ Nada ha cambiado tanto los quirófanos como la posibilidad de operar las partes más escondidas del cuerpo a través de dos agujeritos abdominales: uno para meter el instrumental y otro para ver. Pocos puntos de sutura y una recuperación más breve. Pero si en los últimos 25 años, las laparoscopias han evitado grandes cicatrices internas y externas, la cirugía por orificios naturales da un paso más. No hay que agujerear, por-

que ya hay orificio (boca, vagina, ano), por lo que se minimiza aún más el daño. En Catalunya se practican desde hace unos años. A través de la vagina por ejemplo, se operó un cáncer de colon, se practicó una reducción de estómago y se extrajo un riñón con un cáncer. Con una laparoscopia normal, esta última operación hubiera supuesto una cicatriz mayor junto al ombligo y otras dos incisiones.

Tendencias

LOS CÁNCERES MÁS FRECUENTES EN CATALUNYA
Número de casos diagnosticados en el 2010
Fuente: Departament de Salut

La medicina en la era del genoma

Un DNI genético para cada tumor

Los análisis de ADN ya empiezan a mejorar los tratamientos del cáncer

JOSEP CORBELLA
Barcelona

El hospital Vall d'Hebron ha puesto en marcha un laboratorio de análisis de genomas exclusivamente dedicado al cáncer para optimizar el tratamiento que reciben los pacientes.

En el laboratorio se analizan en una hora 625 mutaciones genéticas posibles en 70 genes distintos en las células tumorales obtenidas en biopsias. En función de las mutaciones que se identifican, los médicos pueden predecir si un paciente responderá o no a determinado fármaco.

DIAGNÓSTICO MÁS PRECISO
Dedicar más recursos a hacer un buen diagnóstico reducirá el coste de las terapias

LIDERAZGO DE VALL D'HEBRON
Ha creado un laboratorio de análisis de genomas dedicado únicamente al cáncer

Por ahora, estos análisis genéticos masivos se aplican a un reducido número de tumores para predecir la eficacia de un reducido número de fármacos. Pero en los próximos años, a medida que lleguen nuevos fármacos que actuarán sobre alteraciones genéticas específicas de las células tumorales, este tipo de análisis se extenderá. "Es el futuro", predice Josep Tabernero, jefe del servicio de oncología de Vall d'Hebron.

El cáncer colorrectal -el que afecta a más personas en Catalunya, con más de 6.000 diagnósticos al año- ofrece el mejor ejemplo de cómo se han empezado a utilizar estos análisis. Una nueva familia de fármacos que inhibe el receptor EGFR en la membrana de las células ha mejorado en los últimos años el tratamiento de este tipo de cáncer. La mejora se explica porque el receptor EGFR envía al núcleo de la célula la orden de dividirse. Por ello, si se bloquea el receptor, debe frenarse la proliferación celular característica del cáncer (véase gráfico).

Sin embargo, los oncólogos han observado que, mientras los nuevos fármacos son muy útiles en algunos pacientes, no tienen ninguna utilidad en otros. No es que en algunos sea más útil y en otros no lo sea tanto. Es una cuestión de todo o nada. La explicación está en la genética.

Según un estudio de pacientes de Vall d'Hebron publicado en la revista *Journal of Clinical Oncology*, los inhibidores de EGFR son ineficaces en los casos en que el gen KRAS está mutado. Esto se explica porque las mutaciones del KRAS pueden inducir a las células a proliferar incluso cuando se bloquea el receptor EGFR.

Dado que un 40% de las personas con cáncer colorrectal metastático tienen mutaciones del gen KRAS, esto reduce los candidatos a recibir inhibidores de EGFR a un 60% de los pacientes. Por lo tanto, "es necesario analizar si un paciente tiene mutaciones del gen KRAS antes de decidir si se le trata con este tipo de fármaco", afirma Tabernero.

Según datos facilitados por la compañía Merck, que comercializa el inhibidor de EGFR cetuximab, desde julio del 2008 se ha analizado el gen KRAS de unos

Un efecto dominó lleva a la multiplicación sin control de las células cancerosas

MULTIPLICACIÓN CELULAR
La correcta multiplicación de las células está regulada por un efecto dominó de reacciones bioquímicas...

... que se inician en la membrana...



... y transmiten al núcleo la orden de dividirse



Multiplicación correcta
Uno de los efectos dominó más importantes empieza con el receptor EGFR...



EL EFECTO DOMINÓ
Receptor EGFR Proteína KRAS Proteína BRAF



FUENTE: Instituto de Oncología de Vall d'Hebron (VHIO)

3.000 pacientes en Catalunya. Dos tercios de los análisis se han hecho en Vall d'Hebron, a quien Merck ha elegido como centro de referencia en Catalunya y que recibe muestras de otros hospitales. Estos 3.000 análisis en un período en el que se han diagnosticado 15.000 cánceres colorrectales refleja que, aunque esta nueva tecnología se está extendiendo, la mayoría de los pacientes aún no tiene acceso a ella.

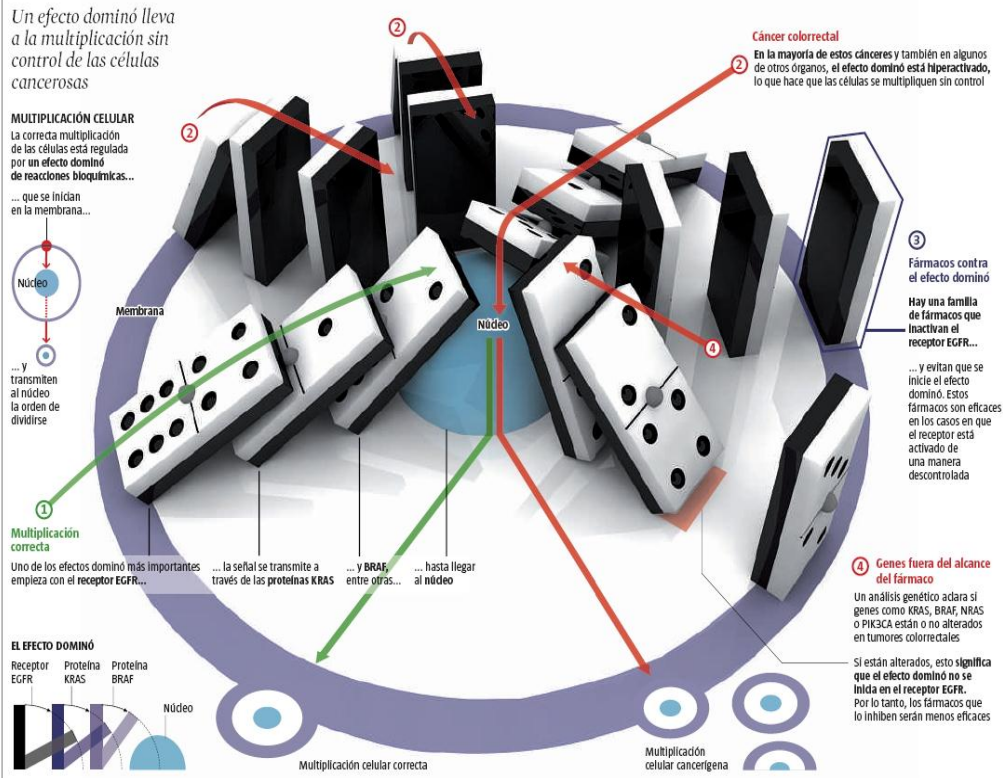
Pese a la utilidad de analizar el gen KRAS, los oncólogos han observado que no todos los pacientes candidatos a recibir inhibidores de EGFR responden al tratamiento. De nuevo, es una cuestión de todo o nada.

Un segundo estudio en el que ha participado Vall d'Hebron, publicado en agosto en *The Lancet Oncology*, ha detectado que otros tres genes condicionan la eficacia de

los inhibidores de EGFR. Cuando hay mutaciones en alguno de los tres (llamados BRAF, NRAS y PIK3CA, aunque no se preocupen por recordar los nombres), los fármacos tampoco funcionan. Analizar estos genes, por lo tanto, permitirá seleccionar mejor a los pacientes en los que el tratamiento será eficaz. Pero es algo que aún no se hace de manera rutinaria en los hospitales.

Con el creciente número de genes que va a ser interesante analizar, "los médicos necesitarán orientación sobre qué mirar y qué consecuencias tendrán los resultados de cara a las decisiones terapéuticas", escribieron Thomas Winder y Heinz-Josef Lenz, de la Universidad de California del Sur, en *The Lancet Oncology* tras conocer los resultados de este último estudio.

Para prepararse para este futuro en que los análisis masivos de genes cambiarán la manera de tratar el cáncer, el Institut d'Oncologia de Vall d'Hebron (VHIO), dirigido por Josep Baselga, ha creado la Plataforma de Genómica del Cáncer. Para coordinarla, ha fichado a Ana Vivancos, procedente del Centre de Regulació Genómica (CRG), pionera en España en el empleo de técnicas de secuenciación



Ana Vivancos y Josep Tabernero, en el instituto VHIO

masiva de genes. "Me atrajo la idea de aplicar estas técnicas más allá de la investigación básica y extender su uso a mejorar la atención a los pacientes en un hospital", explica Vivancos.

La Plataforma de Genómica del Cáncer cuenta con dos máquinas complementarias para hacer el análisis. Una permite analizar genes ya conocidos, como el gen KRAS en pacientes con cáncer colorrectal. La otra, más potente, permite analizar la secuencia completa del genoma de una célula. "La primera nos sirve para buscar cosas que sabemos que pueden estar ahí", explica Vivancos. "La segunda nos sirve para descubrir cosas nuevas".

Una de las prioridades de la investigación será mejorar el tratamiento del glioblastoma, la forma más frecuente y grave de tumor cerebral. Según la estrategia de Joan Seoane, investigador del VHIO que tuvo un papel clave en la puesta en marcha de la Plataforma de Secuenciación Genómica, secuenciar células de glioblastoma permitirá comprender mejor este tipo de tumores cerebrales y evaluar si es posible tratarlos con fármacos inhibidores de la hormona TGF beta.

La creación de la plataforma ha sido posible gracias a la Fundación Cellex, líder en mecenazgo científico en Catalunya, que ha donado más de un millón de euros para la adquisición de los instrumentos del laboratorio.

"Realizar estos análisis supondrá un ahorro para la sanidad", destaca Tabernero. "Hemos empezado a hacer análisis específicos para cada tipo de tumor. Por ejemplo, miramos unos genes concretos en cánceres de mama, otros genes en cánceres colorrectales...". Cada uno de estos análisis cuesta unos 180 euros, mientras que un mes de tratamiento con un inhibidor de EGFR asciende a 4.000 euros. Así, hacer análisis genéticos para no dar fármacos a aquellos pacientes a los que no beneficiarían ayudará a ahorrar. "Tendremos que invertir más en diagnóstico para ahorrar en tratamientos innecesarios", sostiene Tabernero.

Article Programa Joves i Ciència

Assay development for screening inhibitors of EGFR

Vidal L.^{1,2}

1, IES Pere Calders. Campus U.A.B. s/n . Cerdanyola del Vallès . Barcelona 08193. Spain

2, Dpt. of HTS. R&D Center of Ferrer Internacional SA. Juan de Sada, 32. Barcelona 08028. Spain

✉ Corresponding author email: laia.vidal.b@gmail.com

Abstract Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) is a member of a protein kinase family located in the cell membrane. EGFR is overexpressed and/or upregulated in a large variety of solid tumours such as lung, breast, colon and head and neck. This overexpression is associated with aberrant survival, resistance to radiotherapy and chemotherapy, and poor prognosis in many cancers, and therefore represents a potential target for cancer therapy.

Ligand binding leads to receptor dimerization and the subsequent internal autophosphorylation on specific tyrosine residues. This phosphorylation process consists on the addition of a phosphate group coming from the ATP molecule to the tyrosine residues and the consequent conversion of ATP to ADP. EGFR-targeted therapies in development include those that interact with the extracellular ligand-binding domain, and those that compete with ATP to bind to the intracellular ATP site. In both cases, the inhibition results in a blockade of the signal transduction pathways.

The main objective of this project is to set up a biochemical assay that allows us to identify new inhibitor compounds that potentially block EGFR activity. In order to achieve this, we have used a luminescence method based on ATP quantification, where the luminescence signal is inversely proportional to the enzymatic activity. That is, in the presence of an inhibitor compound, the kinase activity is blocked and the luminescent signal increases.

During the assay set up, we have established the optimal parameters for the enzyme kinetics, the linearity of the detection method and the final volume of the reaction. The assay has been validated with two known inhibitor compounds.

Introduction

Cancer is the world's second biggest killer after cardiovascular disease. combined. In 2005, cancer killed 7.6 million people, three quarters of whom were in low- and middle- income countries. By 2015, that number is expected to rise to 9 million and increase further to 11.5 million in 2030 [20].

apoptosis. This abnormal proliferation of cells forms a solid lesion known as malign tumour or neoplasm. Several lines of evidence indicate that the tumour formation, or tumorigenesis, is a

Every year, at least 7 million people die from cancer, more than HIV/AIDS, malaria and tuberculosis. Cancer can be defined as a set of pathologies resulting from DNA alterations. Those alterations lead to enhanced cancer cell growth, proliferation, survival, invasion, and metastasis or reduced

multistep process that drives the progressive transformation of normal human cells into highly malignant derivatives.

The factors that can provoke DNA alterations are genetic inheritance, some chemical products, exposition to radiations, some infections or virus and traumas^[24].

Despite the fact that cancer can be developed in almost any tissue, the cancers differ from the type of cells that are the origin of them. Carcinomas are the cancers originated in the epithelial cells that cover external or internal corporal surfaces. They represent 90% of cancers, and the most frequent carcinomas are lung cancer, breast cancer and colorectal cancer. There are other types of cancers generated on supporter tissues (bones, cartilages, muscles, conjunctive tissue, fat), called Sarcomas and the ones originated from blood or lymphatic system cells, are the Lymphomas and Leucemias^[19].

The classical approaches for anticancer therapy are surgery and radio- and chemotherapy. In recent years, new forms of treatment focus on the inhibition of specific molecular targets that are usually altered or deregulated. Kinases are of special interest within these systems, either as receptor molecules or downstream regulators of signaling cascades^[16].

The genes that contribute to the production of a cancer are called oncogenes. They are generally mutated forms of normal cellular genes that are capable, when activated, of transforming a normal cell into a malign cell.

The subset of oncogenes whose inhibition can lead to tumor cell death, differentiation, arrest, or senescence is of great clinical interest as targets for cancer therapeutics. This strategy has proven successful for the protein kinase oncogenes such as Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), while targeting non-kinase oncogenes, has proven more difficult^[15].

EGFR is highly expressed in a wide variety of human tumours, including non-small cell lung cancer (NSCLC)^[12], breast^[8], head and neck, gastric, colorectal^[1], oesophageal, prostate, bladder, renal, pancreatic^[10].and ovarian cancers [see table 1].

Tumor type	Tumors expressing EGFR (%)
Colorectal	25–77
Pancreatic	30–50
Bladder	31–48
Prostate	39–47
Ovarian	35–70
Glioma	40–63
Breast	14–91
Lung	40–80
Renal	50–90
Head and neck	80–100

Table 1. % of tumors that overexpress EGFR. Extracted from: Dutta P.R, Maity A, *Cellular responses to EGFR inhibitors and their relevance to cancer therapy*, Cancer Lett. (2007)

Another important fact is that high level of EGFR expression has been associated with advanced tumour stage, higher risk of recurrence or metastasis, poorer survival, and resistance to chemotherapy and radiotherapy^[3,6].

As a result, EGFR was proposed as a rational target for antitumour strategies, and both monoclonal antibodies against EGFR and/or tyrosine kinase inhibitors are now in use clinically for treatment of advanced cancer^[5,13].

EGFR belongs to a large family of receptor tyrosine kinases (RTKs) that mediates many important physiological processes in both normal and cancerous cells^[14].

RTKs are a subgroup of transmembrane proteins with an intrinsic tyrosine kinase activity which determines various cellular functions as diverse as

growth, differentiation, cell motility or survival [18]. The EGFR family consists of four members: EGFR/ErbB1, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3 and HER4/ErbB4 [7,9].

All EGFR family members are characterised by a modular structure consisting of an extracellular ligand-binding domain, a single hydrophobic transmembrane region, and the intracellular part harbouring the highly conserved tyrosine kinase (TK) domain. Ligand binding induces the formation of homo- or heterodimers, which leads to autophosphorylation of the RTK as well as the phosphorylation of other signaling molecules on specific tyrosine residues (see Fig. 1). As a result of these phosphorylation events, a number of intracellular signal transduction cascades are initiated that will lead to tumour cell proliferation, angiogenesis and metastasis [1, 24].

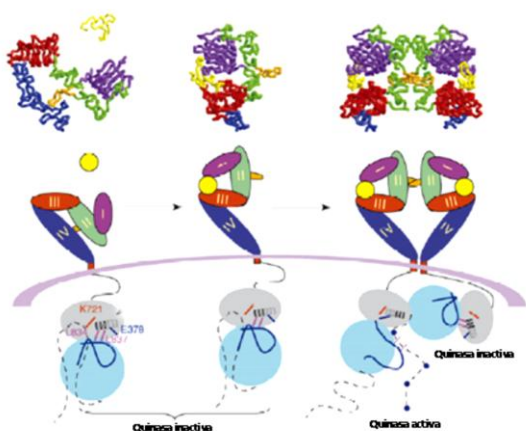


Figure 1. Structural representation of EGFR and its activation process. When the ligand - yellow - is not bound to the receptor, EGFR remains inactive and it is no able to dimerize (Left). Ligand binding to the extracellular region induces a conformational change (Center) that provokes the dimerization of the receptor and the consequent autophosphorylation on the tyrosine residues. Extract from Bublil, 2007.

Deregulation of this tightly controlled system of hormone-receptor and receptor-receptor interactions by

overexpression, amplification or mutations is frequently linked to hyperproliferative diseases such as cancer [23].

EGFR-targeted therapies in development include those that interact with the extracellular ligand-binding domain, and those that act intracellularly, such as the small-molecule EGFR tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs) that compete with ATP to bind to the receptor's ATP site. In both cases, the inhibition results in a blockade of EGFR signal transduction pathways [4,17].

Two examples of approved EGFR inhibitors are: Gefitinib (Iressa, ZD1839) and Cetuximab (Erbix, C225). Cetuximab is a monoclonal antibody that binds to EGFR and prevents ligand binding. Gefitinib is a low-molecular-weight inhibitor of EGFR-TK that acts at the cytosolic ATP binding domain and inhibits autophosphorylation [11] (Fig. 2).

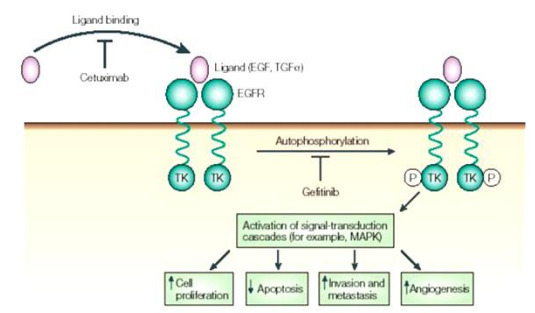


Figure 2. EGFR activation and inhibition points (T) of Cetuximab and Gefitinib. The activation of signal-transduction cascades induce cell proliferation, invasion, metastasis and angiogenesis and decrease apoptosis.

The present study was undertaken to set up a general assay, based on ATP consumption, to allow us to identify potential EGFR inhibitors as new cancer treatment. As the final readout of the assay is ATP consumption, both types of inhibitors (the ones that

compete with the ligand or the ones acting at TK domain level) can be detected.

Materials and Methods

EQUIPMENT

Tecan ULTRA₃₈₄

The equipment used for the readout of the assay was the multifunctional Tecan Microplate Reader ULTRA₃₈₄, which is a computer controlled instrument that allows us to measure luminescence, fluorescence intensity (FI), polarized fluorescence (FP), absorbance (A) and Time Resolved Fluorescence (TRF).



Figure 3. Tecan Microplate Reader ULTRA₃₈₄ integrated in a robotic platform (Genesis Workstation 200) that can automate the reading process.

The ULTRA₃₈₄ was controlled by the software XFluor4. This software is based on Microsoft Excel®, and has an interface that allows basic instrument handling and displays raw data in Excel® spread sheets. In order to represent the values obtained by the ULTRA₃₈₄ it was used Sigma Plot (10.0 version), a very accurate graphing program that offers numerous scientific tools^[22].

Thermo Fisher Scientific iEMS Incubator

The iEMS incubator shaker is a high temperature equipment with the capacity of incubating and shaking 6 Microtiter plates simultaneously. Features include excellent temperature uniformity within the plate, and efficient mixing of plate contents.



Figure 4. iEMS incubator (Thermo LabSystem)

REAGENTS

Reagents

ATP (Sigma, Ref# A7699)

Poly (Glu-Tyr) 4:1 (Sigma, Ref# P0275-25MG)

Human Recombinant EGFR, C-terminal fragment (Prokinase, Ref# 0102-0000-1)

Kinase Buffer: 60 mM HEPES-NaOH, 3 mM MgCl₂, 3 mM MnCl₂, 3 uM Na₃VO₄, 1,2 mM DTT and 2,5 ug/50 ul PEG20000 (pH 7,5).

Kinase-Glo Plus Luminescent Assay

The kinase reaction was detected with a luminescent kit called Kinase-Glo Plus Luminescent Assay (Promega, Ref# V3774). This assay allowed us to quantify the amount of ATP remaining in solution following the kinase reaction (see Figure 5). The remaining ATP is inversely proportional to the kinase reaction, so the more active the kinase is the more ATP consumption.



Figure 5. Phosphorylation process catalyzed by a kinase. The enzyme uses a hydrolyzed substrate and ATP to produce a product with one phosphate group and ADP. In our assay, the kinase is the EGFR and the substrate is the Poly

(Glu-Tyr). Adapted from: Promega Technical Bulletin (part # TB343): Kinase-Glo® Plus (Luminescent Kinase Assay).

The Kinase-Glo Plus contains the Ultra-Glo Luciferase (oxidative enzyme) and the beetle luciferin (substrate). In the presence of oxygen and Mg²⁺, the luciferase uses the remaining ATP from the kinase reaction to convert the luciferin into oxyluciferin [21].

The reaction produces one photon of light and some secondary products as AMP, PPi and CO₂ (see Figure 6). The luminescent signal originated is inversely proportional to the kinase activity, so the more kinase activity, the lower luminescent signal.

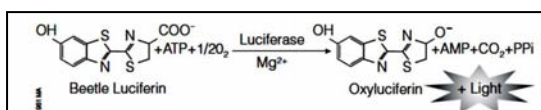


Figure 6. Kinase-Glo Plus Assay reaction. Adapted from: Promega Technical Bulletin (part # TB343): Kinase-Glo® Plus (Luminescent Kinase Assay).

All the assays were performed in white 384-well microtiter plates (MTP-384). White plates were selected due to the low background, and because they avoid cross-contamination among the wells.

In all experiments, the assay was performed as follows:

1) *Enzymatic reaction*

- a) Add Enzyme+ Cofactor+ Substrate (EGFR + ATP + Poly(E:Y))
- b) Shake 30-60 seconds
- c) Incubation at RT

2) *Luminiscence reaction*

- a) Add Kinase-Glo Plus Reagent
- b) Shake 30-60 seconds
- c) Incubation at RT

3) *Read Luminescence*

All the experiments were performed in triplicates (three copies of the same reaction).

Assay development

The following experiments were performed in order to set-up the assay:

Signal linearity (concentration of ATP vs RLUs)

The objective of this experiment was to establish the linearity range between the concentration of ATP and the luminescence signal (RLUs, Relative Luminescence Units). We have determined the maximum ATP concentration that responds to this linear pattern. This value is really important because in the linear range, an increase in luminescence is proportional to an increase in the ATP content. Outside this range, an increase in the ATP content will not be reflected as an increase in luminescence (signal is saturated). As the final objective of this assay is to detect potential inhibitors of our receptor, we need to be sure that we can detect any increase in the ATP content.

For this experiment, serial dilutions (1:2) of ATP in Milli-Q water were prepared in the MTP-384. All wells contained the same final volume but each one presents different concentrations of ATP (500 μM, 250 μM, 125 μM, 62,5 μM, 31,25 μM, 15,63 μM, 7,81 μM and 0 μM). To detect the ATP content, the same volume of Kinase-Glo Plus Reagent was added into the wells. Before reading the luminescent signal, the MTP-384 was agitated for 45 seconds to allow all the components to mix. The plate was covered with Aluminum foil to prevent light damaging, and incubated at room temperature for 10 minutes.

The results obtained were plotted into the Sigma Plot software and all the points were adjusted to a linear regression.

Determination of the optimum parameters of the enzyme kinetics

In cells and organisms most reactions are catalyzed by enzymes, which are regenerated during the course of a reaction. These biological catalysts are physiologically important because they speed up the rates of reactions that would otherwise be too slow to support life. Because of their role in maintaining life processes, the assay and pharmacological regulation of enzymes have become key elements in clinical diagnosis and therapeutics.

Enzyme kinetics is the study of the velocity of chemical reactions catalyzed by enzymes. In enzyme kinetics, the reaction rate is measured and the effect of different factors (time, pH, temperature...) investigated.

The parameters that we have measured are:

Optimum incubation time for the enzymatic reaction

To determine the best incubation time for the enzymatic reaction, three Microtiter Plates were incubated at 25 °C during different incubation times using the iEMS Incubator:

- Plate 1: 120 minutes enzyme incubation +10 minutes kinase glo-plus incubation
- Plate 2: 180 minutes enzyme incubation +10 minutes kinase glo-plus incubation
- Plate 3: 240 minutes enzyme incubation +10 minutes kinase glo-plus incubation

EC₅₀ of the enzyme

EC₅₀ (half maximal effective concentration) is the enzyme concentration that exhibits 50% of the maximum activity.

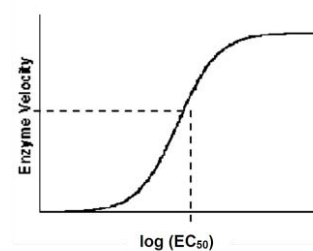


Figure 7. Sigmoidal curve that represents EC₅₀. Source: www.curvefit.com

Working at EC₅₀ ensures us enough quantity of enzyme for an optimum performance of the assay and a reduction of cost.

For EC₅₀ calculation, a curve with different concentrations of the enzyme was prepared in MTP-384. Poly (Glu-Tyr) 4:1 was used as substrate (final concentration 20µM) and 10 µM ATP was used as cofactor.

The serial dilutions of EGFR prepared were: 300 nM, 200 nM, 133,33 nM, 88,89 nM, 59,26 nM, 39,51 nM, 26,34 nM, 17,56 nM, 5,85 nM and 0 nM. The enzyme was diluted in the Kinase Buffer

Substrate Km

The Km (Michaelis-Menten constant) is the substrate concentration that gives half maximal velocity of an enzymatic reaction.

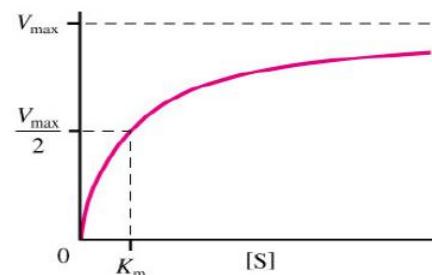


Figure 8. Curve that represents Km parameter. Source: www.iftsa.org (Enzyme kinetics)

Working at K_m value allows us to detect those inhibitors that bind to the same site as the substrate. In this case, the inhibitors compete with the substrate for the same binding site.

To calculate the K_m of the substrate we worked at 10 μM of ATP and 100nM of EGFR, and serial dilutions of Poly (Glu-Tyr) were prepared: 400 μM , 200 μM , 100 μM , 50 μM , 25 μM , 12,5 μM , 6,25 μM , 3,13 μM and 0 μM .



Figure 9. Substrate Serial Dilution preparation

Cofactor K_m

As explained before, The K_m is the ATP concentration that gives half maximal activity.

Working at K_m value allows us to detect those inhibitors that bind to the same site as the ATP. In this case, the inhibitors compete with the ATP for the same binding site.

To calculate the K_m of the ATP we worked at 200 μM of substrate and 100nM of EGFR, and serial dilutions of ATP were prepared: 100 μM , 50 μM , 25 μM , 12,5 μM , 6,25 μM , 3,13 μM , 1,56 μM and 0 μM .

Determination of the IC_{50} of two known inhibitors

To validate the assay, two known inhibitors of EGFR were used: Staurosporine and Compound56. Staurosporine binds to the ATP binding

site (competes with ATP), and Compound56 inhibits the tyrosine kinase activity of the receptor.

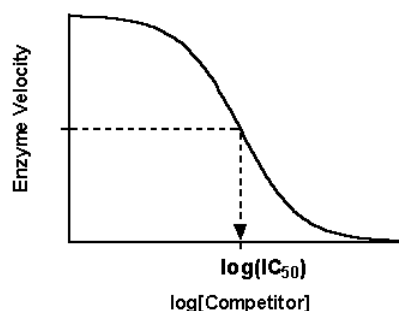


Figure 10. Representation of the IC_{50} of an inhibitor. Source: www.curvefit.com

The assay conditions were the optimal conditions established during the assay set-up:

[EGFR]= 100nM

[ATP]= 10 μM

[Poly(Glu:Tyr)]= 20 μM

Incubation time= 180min

To determine the potency of the inhibitors we have calculated the IC_{50} , which is the concentration of inhibitor that inhibits 50% of the enzyme activity.

The IC_{50} of a drug is determined by preparing increasing concentrations of the inhibitor and testing the effect of the on EGFR activity.

The serial dilutions of Staurosporine were the followings: 125000nM, 62500nM, 31250nM, 15625nM, 7813nM, 39609nM, 1953nM, 976 nM, 488nM and 81,38nM.

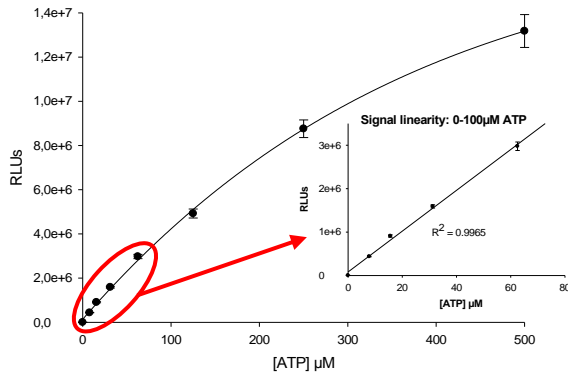
The serial dilutions of Compound 56 were: 2400nM, 600nM, 300nM, 150nM, 75nM, 37,5nM, 18,75nM, 9,375nM, 4,687nM and 1,171875nM.

Results were represented into SigmaPlot, and the values were fitted into a Sigmoidal curve.

Results

Signal linearity

The objective of this experiment was to obtain the linearity range between the concentration of ATP and the luminescence signal.



Graph 1. Signal linearity from 0 to 500 μM of ATP. In the insert, detail of the linear regression obtained from 0-100 μM ATP. Each point represents the mean of three replicates \pm SD.

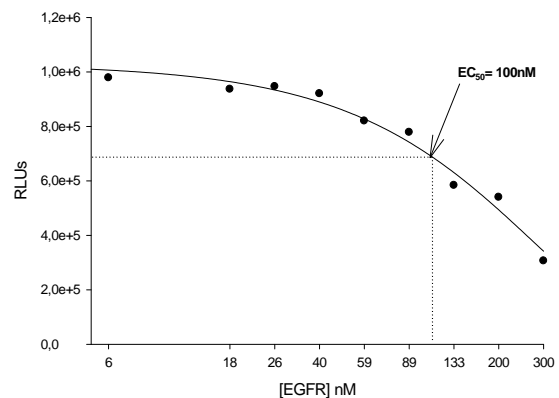
As shown in the graph, there is a good correlation ($r^2 = 0.996$) between 0 and 100 μM of ATP, but at higher ATP concentration we lost the linearity and the values fitted into an exponential rise to max curve. This means that we shouldn't exceed the concentration of 100 μM of ATP, because from this point the increase in the ATP content will not be corresponded with an increase in luminescence (signal is saturated).

As explained in Materials and Methods, our experiment is based on the quantification of the remaining ATP of our kinase reaction. When active, EGFR consumes ATP, but in the presence of an inhibitor, EGFR is not active and does not consume ATP. In our aim to search for EGFR inhibitors, we expect to work at high ATP concentrations, so we need to be sure that we work on the linear range of ATP.

Determination of the EC_{50} of the enzyme

Once established the linear range of ATP, a dose-response curve was performed in order to determine the EC_{50} of EGFR. It was prepared using serial dilutions of the enzyme: from 0 up to 300 nM, in the presence of 20 μM of substrate Poly (Glu-Tyr) and 10 μM of cofactor ATP.

As we can observe in Graph 2, the enzyme was active. Increasing concentrations of EGFR consumed increasing concentrations of ATP, decreasing the signal detected. In our experiment, the concentration of EGFR which represented 50% of its maximal activity was 100 nM.



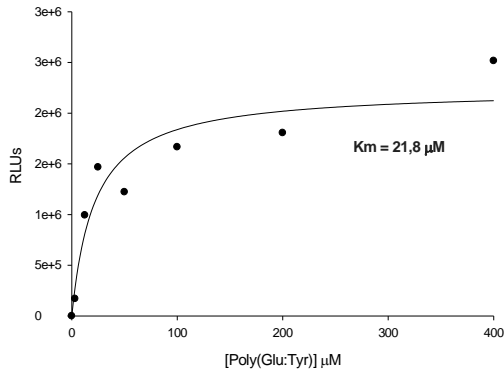
Graph 2. Representation of the luminescence values with increasing concentrations of enzyme (from 0 to 300 nM). In the graph is shown the calculation of the EC_{50} of the enzyme. The experiment was performed in presence of 20 μM Poly (Glu-Tyr) and 10 μM ATP.

Determination of the K_m of the substrate

The objective of this experiment was to determine the K_m of the substrate, a parameter that is indicative of the binding affinity of the enzyme for its substrate (the lower the K_m value, the higher the affinity).

To determine the K_m value, a dose-response curve of the substrate (0 to 400

μM) was performed, using the previously determined EGFR optimal concentration ($EC_{50}=100$ nM) and 10 μM of ATP.



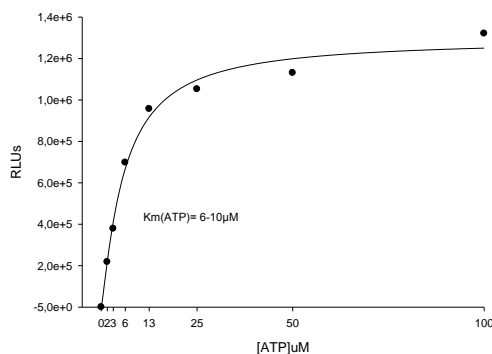
Graph 3. Dose-response curve of substrate (from 0 to 400 μM) performed in presence of 10 μM ATP and 100 nM EGFR.

In the graph is shown the K_m value obtained from our results

Our results show that increasing the concentration of the substrate results in an increase in signal intensity, suggesting a higher EGFR activity (Graph 3). The K_m obtained was 21,8 μM, indicating that this concentration of substrate gives half-maximal enzyme activity. Working at this substrate concentration (K_m) allows us to detect inhibitors that bind to the same site as the substrate.

Determination of the K_m of the cofactor (ATP)

The objective of this experiment was to determine the ATP concentration that gives the 50% of the maximal activity of EGFR.



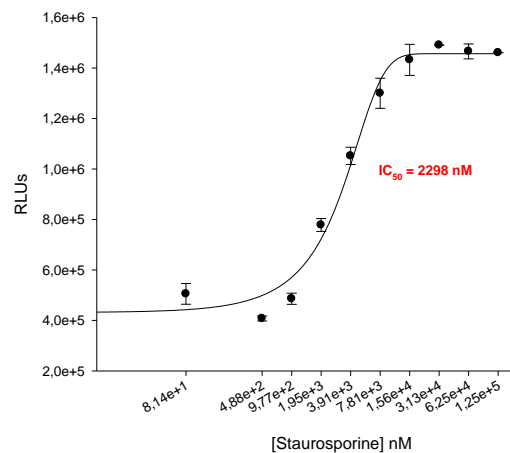
Graph 4. Curve of ATP (from 0 to 100 μM) performed at 100 nM EGFR and 200 μM Poly (Glu-Tyr). In the graph is shown the value of K_m obtained.

The results are shown in graph 4, where we can observe that K_m value for ATP was approximately 6- 10 μM.

This K_m value (10 μM) was established as the ATP concentration for the subsequent experiments to find inhibitor compounds. This ATP concentration (K_m) allows us to detect inhibitors that compete for the ATP binding site.

Determination of the IC_{50} of Staurosporine

Our assay was validated with a known inhibitor (Staurosporine) of EGFR that binds to the ATP binding site.

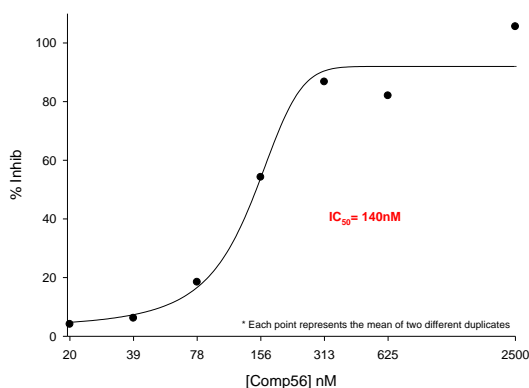


Graph 5. EGFR inhibition curve from 0 to 1,25e+5 nM of Staurosporine in the presence of 100 nM of EGFR, 20 μM of Poly (Glu-Tyr) and 10 μM of ATP

As shown in Graph 5, the IC_{50} was determined, giving us a value of 2,3μM (2298 nM). This value is in agreement with previously reported data.

Determination of the IC_{50} of Compound56

To further validate the assay, another inhibitor was used. Compound 56 blocks the tyrosine kinase activity, avoiding the phosphorylation and the ATP consumption.



Graph 6. EGFR inhibition curve from 0 to 1,25e+5 nM of Compound 56 Staurosporine in the presence of 100 nM of EGFR, 20 μ M of Poly (Glu-Tyr) and 10 μ M of ATP

Graph 6 represents the % of inhibition of the EGFR activity in the presence of different concentrations of Compound 56. The IC₅₀ obtained for Compound 56 was 140 nM.

Discussion

The objective of this work was to set up a biochemical assay to identify new inhibitor compounds that potentially block EGFR activity and consequently the cancer progression.

We have seen that current EGFR-targeted therapies include inhibitor compounds that interact with the extracellular ligand-binding domain, and those compounds that act intracellularly, competing for the tyrosine kinase (TK) domain. Both types of inhibitors result in a blockade of EGFR signal transduction pathways and a decrease in the number or size of solid tumors.

In our aim to detect any kind of inhibitors, we decided to set up a general assay based on ATP consumption that could allow us to identify the inhibitors that compete with the ligand or the inhibitors acting at TK domain level.

In any biochemical assay, one of the critical points for the correct performance of the assay is the determination of the optimal parameters for the enzyme kinetics, so first of all we characterized enzymatically EGFR. All the experiments were performed with a concentration of ATP in the linear range (below 100 μ M), to avoid underestimation of the potential inhibitors. The value obtained for the EC₅₀ of the EGFR was 100nM, and the Km for the substrate and cofactor were 10 and 20 μ M, respectively.

To validate the assay, we used Staurosporine, which is a known inhibitor that binds to the ATP binding site competing with ATP, and Compound56 that inhibits the tyrosine kinase activity of the receptor. In both cases we have demonstrated that our assay was sensitive enough to detect precisely both types of inhibitors.

Summarizing all the results, we can conclude that we have set up a sensitive assay to identify any kind of EGFR inhibitors.

In the future this assay will be used for detecting potential EGFR inhibitors present in different chemical compound libraries that Ferrer International uses for screening.

Acknowledgements

The realization of this article couldn't be possible without the help of many people.

First of all, this work has been done in the High Throughput Screening

Department of the R& D Center of Ferrer Internacional S.A, so I would like to give very special thanks to Ferrer International R&D Center, and especially to its director, Dr. Antonio Guglietta, for giving me the opportunity to do this internship in such professional laboratory. I would also like to thank Dr Eva Mendez (Head of the High Throughput Screening Department), for the time devoted to the design, development and discussion of this project and also for her kindness, explanations and interesting talks.

From the High Throughput Screening Department, I also want to thank Nuria Lluch for teaching me so many things (especially in the laboratory), as well as Dr Wilmar Castillo and Dr Gemma Pueyo because they answered to all my questions, related or not with the article. Those days were incredible. I enjoyed very much staying with you all.

Very special thanks to my high school, IES Pere Calders, to help me with the bureaucracy for join Ferrer International.

Finally, I would like to thank CatalunyaCaixa to sponsor this challenging E²C³ program, specially to Eva Calves and Maria Calsamiglia, to make science so exiting, and allow students to live such wonderful research experiences.

Thank you all very much.

References

Articles

[1]- Adams R, Maughan T, *Predicting response to epidermal growth factor receptor-targeted therapy in colorectal cancer*, Expert Rev. Anticancer Ther.7 (4), (2007)

[2]- Arslan M.A, Kutuk O, Basaga H, *Protein Kinases as Drug Targets in Cancer*, Current Cancer Drugs Targets, (2006), 6-623-634

[3]- Arteaga C.L, *Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression?*, The Oncologist 2002;7(suppl4):31-39

[4]- D'Andrea M.R, Gasparini G, *The future of anti-EGFR therapy*, The international Journal of Biological Markers, Vol.22 no.1 (suppl 4), pp. 588-593 (2007)

[5]- Dassonville O, Bozec A, Fischel J.L, Milano G, *EGFR targeting therapies: monoclonal antibodies versus tyrosine kinase inhibitors. Similarities and differences*, Critical Reviews in Oncology/Hematology 62 (2007) 53-61

[6]- Dutta P.R, Maity A, *Cellular responses to EGFR inhibitors and their relevance to cancer therapy*, Cancer Lett. (2007), doi:10.1018/j.canlet.2007.02.006

[7]- Fernández J.C, Pérez V, *EL Receptor de EGF (EGFR): Una Diana terapéutica para el tratamiento del cancer y sus inhibidores*, BioCancer Research Journal, n°3 Fármacos Antitumorales, January 2006, ISSN 1697-6452

[8]- Hobday T.J, Perez E.A., *Molecularly Target Therapies for Breast Cancer*, Cancer Control, Vol.12, No.2 (April 2005)

[9]- Johnston J.B, Navaratnam S, Pitz M.W, Maniate J.M, Wiechec E, Baust Heinrich, Gingerich Joel, Skliris G.P, Murphy L.C, Los M, *Targeting the EGFR Pathway for Cancer Therapy*, Current Medicinal Chemistry, 2006, Vol. 13, No. 25

[10]- Korc M, Meltzer P, Trent J, *Enhanced expression of epidermal growth factor receptor correlates with alterations of chromosome 7 in human pancreatic cancer*, Proc. Natl. Acad.

Sci. USA, Vol. 83, pp. 5141-5144, July 1986

[11]- Malinowsky K, Wolff C, Gündisch S, Berg D, Becker K.F, *Targeted therapies in cancer-challenges offered by newly developed techniques for protein analysis in clinical tissues*, Journal of Cancer (2011)

[12]- Martin P, Kelly M.B, Carney D, *Epidermal growth factor receptor-targeted agents for Lung Cancer*, Cancer Control, Vol.13, No.2 (April 2006)

[13]- Mendelsohn J, *EGF receptors as a target for cancer therapy*, Transactions of the American Clinical and Climatological Association, vol 1, (2004)

[14]- Ortiz J.M, *Proteína quinasas como dianas farmacológicas*

[15]- Porter A.C, Vaillancourt R.R, *Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis*, Oncogene (1998) 16, 1343-1352

[16]- Prenzel N, Fischer O.M, Streit S, Hart S, Ullrich A, *The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification*, Endocrine-Related Cancer, (2001), 8 11-31

[17]- Shchemelinin I, Šefc L, Nečas E, *Protein kinase inhibitors*, Folia Biologica (Praha) 52, 137-148 (2006)

[18]- Van der Geer et al. 1994, *Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways*, PMID: 7888178 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Books

[19]- Becker W.M, Lewis K.J, Hardin J, *El mundo de la célula*. (Authorized translation from the English language edition, entitled World of the Cell, 6th Edition, published by Pearson

Education Inc, publishing as Benjamin Cummings, Copyright © 2006)

Others

[20]- The World Health Organization's Fight Against Cancer: Strategies That Prevent, Cure and Care (2007). ISBN 978 92 4 159543 8

[21]- Promega Technical Bulletin (part # TB343): Kinase-Glo® Plus (Luminescent Kinase Assay). Instructions for use of products v3771, v3772, v3773 and v3774. Revised 8/05

[22]- Sigma Plot User's Guide

Imatges addicionals: protocols experimentals i imatges dels programes utilitzats

- Més imatges al meu àlbum on-line:

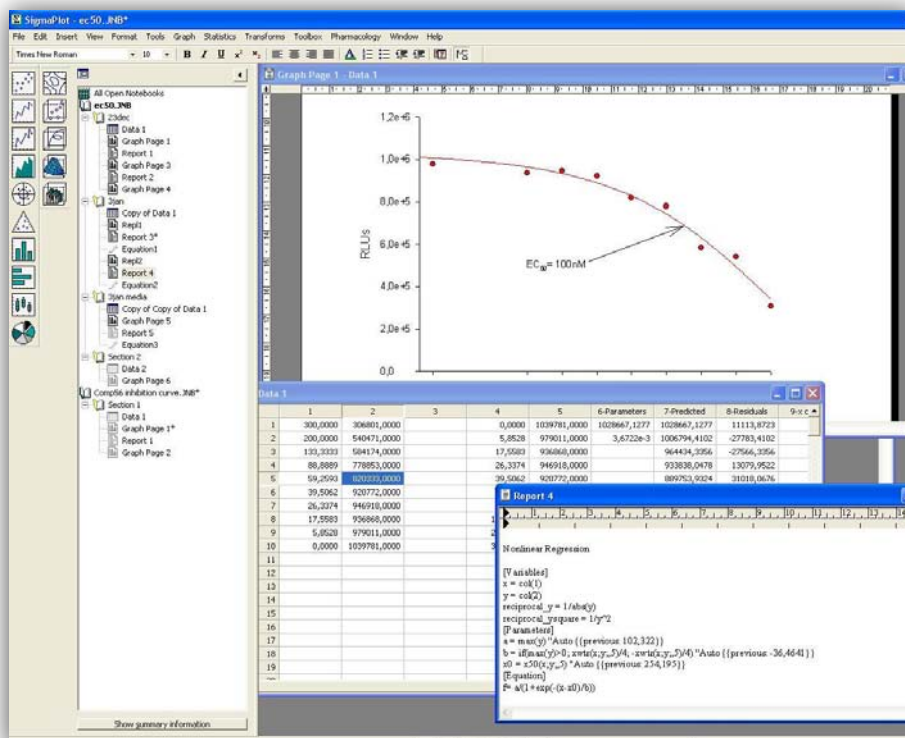
<https://plus.google.com/photos/105539413433833231542/albums/5680180669829106145>

xFluor4: exemple de recollida de dades d'una lectura de luminescència realitzada amb ULTRA₃₈₄.

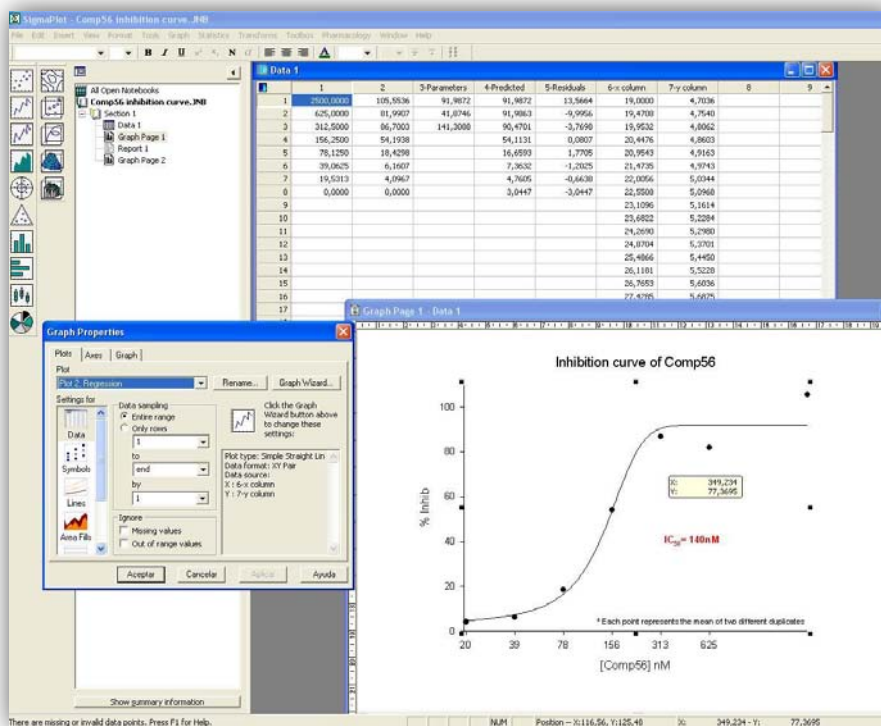
Ultra384; Serial number: 12903100021; Firmware: V 1.00 06/01 ULTRA384; XFLUOR4 Version: V 4.21	
Date:	4/1/11
Time:	16:52
Measurement mode:	Luminescence
Integration time (Manual):	100 ms
Attenuation:	None
Plate definition file:	GRE384fw.pdf
Part of the plate:	A1 - N21
Rawdata	Temperature: 23.3 °C
	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
A	209425 2858 380568 3658 376540 3648 348685 3238 348396 3268 349047 3378 338549 3728 323579 2678 246519 2718
B	354532 3538 378601 3788 365231 3288 360009 3528 354284 3628 336826 3328 319974 2878 297462 3018 293999 2718
C	406460 4148 407062 3868 401519 3808 364724 3478 331691 3068 319531 3168 299281 2958 288359 2948 279305 3168
D	407633 3938 417656 4018 406273 4058 379750 3218 336300 3298 322024 3038 298387 3018 307930 3198 292355 3108
E	397089 3678 415734 3928 414529 4038 403460 3808 403667 3868 403398 3628 402277 3618 407425 3948 402464 3308
F	419475 4208 432610 4128 401841 4148 428022 4058 428261 4028 419808 4068 414560 4188 419319 4118 413500 3928
G	397587 3588 413417 4118 414456 4248 414913 4208 411724 3818 418363 3908 417261 3738 418789 4048 409813 4448
H	402630 3778 456298 4248 426566 4358 444010 4348 460074 4068 457654 4468 420026 3758 439626 4028 434504 3808
I	1968 128 2298 108 2598 198 2348 228 2108 208 2678 168 2038 98 2798 138 2318 128
J	1448 68 1638 78 1608 98 1418 68 1498 38 1828 88 1428 68 1468 88 1658 78
K	275160 2768 294502 2408 289941 2638 286562 2578 292817 2688 294759 2588 290413 2648 288236 2918 285997 2778
L	286640 2448 281932 2398 271960 2988 282589 3058 287096 2718 300237 2848 306726 3008 321004 2828 308424 3488
M	382267 3208 391200 3618 397266 3938 404643 3858 419485 3348 427855 4258 422635 4649 418623 3428 421720 3818
N	448074 3558 441302 4368 441865 4268 455986 4659 446427 4278 448386 3808 457289 4108 417220 3458 406989 3648
O	...
P	...

SigmaPlot: imatges de la construcció de gràfiques a partir de les dades recopilades amb la lectura de luminescència.

- Construcció de la gràfica del EC₅₀



- Construcció de la gràfica del IC₅₀ del Compund56



Protocols: esquemes de disseny dels principals experiments realitzats:

- Linealitat del senyal

Pipeteo: Curva ATP Manual, detecció con Kinase-Glo
Fecha: 22/12/2010

Partimos de ATP 500 μ M

Recta de ATP en placa de 384 pocillos: con micropipetas

PROTOCOLO:
 Curva manual
 1.- **Dispensar AD**
 2.- **Dispensar ATP en el pocillo A1**
 Hacer las diluciones seriadas dentro de la placa (diluciones 1/2)

Micropipetas:
 Gilson P2 Vol: 1 y 2
 Gilson P10 Vol: 5 y 10
 Gilson P100 Vol: 20-100

Placa de 384 pocillos blanca

Placa manual	1	2	3	4	5	6	7	8	...	24
A	0	10	10	10	10	10	10	10	10	vol AD
B	20	10	10	10	10	10	10	0	0	vol ATP (μ l)
C	0	10	10	10	10	10	10	10	10	
	20	10	10	10	10	10	10	0	0	

Volumen final en cada pocillo: 10 μ l del pocillo 7 sacar 10 μ l

3.- **Dispensar Kinase-Glo: 10 μ l a cada pocillo con Micropipeta Multicanal**
 Una vez añadido el Kinase-glo: volumen final de cada pocillo: 20 μ l

Columna	ATP μ M
1	500
2	250
3	125
4	62,5
5	31,25
6	15,63
7	7,81
8	0

4.- **Agitación 45 seg e Incubación 10min**

5.- **Lectura en ULTRA: lectura de RLUs (Unidades Relativas de Luminiscencia)**

- EC₅₀ de l'enzim

EGFR KINASE ASSAY
Enzyme curve at 20 μM substrate and 10 μM ATP
DATE: 21th January, 2008

Recombinant Human EGFR/ C-terminal fragment (-80°C) (No vortex, keep on ice and do aliquotes)
ProGinase: Ref# 0102-0000-1; Lot# 015; 10 μg
Supplied as: 0.083 μg/ul in 50mM HEPES-NaOH pH 7.5, 100mM NaCl, 5mM DTT, 4mM reduced glutathione and 20% glycerol

Poly(Glu:Tyr) 4:1 sodium salt (-20°C) (250 mg); Ref# P0275; Lot# 063K5106

ATP disodium salt (-20°C): (1 g) Ref# A7699; Lot# 086K7003

Kinase Buffer: 60 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 3 mM MgCl₂, 3 mM MnCl₂, 3 uM Na₃VO₄, 1,2 mM DTT, 2,5 ug/50 ul PEG20000

Microtiter Plate	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	
A	300	200	133,33	88,89	59,26	39,51	26,34	17,56	5,85	0	[EGFR] nM
B	3,00E-07	2,00E-07	1,33E-07	8,89E-08	5,93E-08	3,95E-08	2,63E-08	1,76E-08	5,85E-09	0	[EGFR] M

EGFR	MW	ng/ul	M	nM	Vells
	91002	83	9,12068E-07	912,07	19

[EGFR] M	Assay [EGFR] M	Stock (M)	Dilution	EGFR enz.	Buffer	Vol	Vol rest
6,00E-07	3,00E-07	9,12068E-07	1,52	52,6	27,4	80	26,67
4,00E-07	2,00E-07	0,0000006	1,5	53,3	26,7	80	26,67
2,67E-07	1,33E-07	0,0000004	1,5	53,3	26,7	80	26,67
1,78E-07	8,89E-08	2,66667E-07	1,5	53,3	26,7	80	26,67
1,19E-07	5,93E-08	1,77778E-07	1,5	53,3	26,7	80	26,67
7,90E-08	3,95E-08	1,18519E-07	1,5	53,3	26,7	80	26,67
5,27E-08	2,63E-08	7,90123E-08	1,5	53,3	26,7	80	26,67
3,51E-08	1,76E-08	5,26749E-08	1,5	53,3	26,7	80	53,33
1,17E-08	5,85E-09	3,51166E-08	3	26,7	53,3	80	80,00

Plate: Microplate, 384 well, PS, F-bottom, Lumitrac 200, Med. Binding, White (Cat.-Nº: 781075)

Protocol

- 1) Add 10 μl EGFR diluted in assay buffer in all wells (except well 0 enzyme) and 10 μl Assay Buffer in well 0 enzyme.
- 2) Add 10 μL of mix ATP/Substr (20μM ATP/ 6μM Substr) in all wells (multichannel pipette)
- 3) Incubate enzyme reaction in three different plates during 120, 180 and 240 minutes at 25° C
- 4) Add simultaneously 20 μl Kinase-glo plus reagent (multichannel pipette) and shaker 45°
- 5) Incubate detection reaction 10 min at RT and read luminescent signal.
- 7) After the first reading, wait one hour and do another one

Microtiter Plate	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	
A	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	Assay Buffer (ml)
B	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	EGFR diluted on assay buffer (ml)
	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	Mix ATP/Substrate (ml)

- Km del Substrat (Poly(Glu-Tyr) 4:1)

EGFR KINASE ASSAY
ATP curve with 100 nM EGFR and 200 uM substrate
DATE: 20th November, 2007

Placa 1	1	2	3	4	5	6	7	8	
A	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0	ATP uM
B	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0	ATP uM
C	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0	BI (0 enz)
D									
E									
F									
G									
H									

	Enz	ATP	Poly (E:Y)	Buffer
0	5	-	5	5
Curva ATP	5	5	5	-
BI (0 enz)	-	5	5	5
Autofosf.	5	5	-	5

EGFR enz. (450 nM)	Stock (nM)	Dilution	EGFR enzyme	Buffer	Vol
300	912,07	3,0	98,7	201,3	300

Poly(Glu:Tyr) 1 mM	Conc poly(E:Y) (M)	MW	Peso (mg)	Vol Buffer (μl)
	1,00E-03	35000	5,7	162,86

Stock (μM)	Dilución	Conc. Stock	Vol stock	Buffer	Vol preparar
600	1,97	1000	78,0	52,0	130

ATP 1 mM	Conc ATP (M)	MW	Peso (mg)	Vol Buffer (μl)
	1E-03	551,14	43,3	78564,43

Stock (μM)	Dilución	Conc. Stock	Vol stock	Buffer	Vol preparar	Vol restante
300	3,33	1000	15	35	50	25
150	2	300	25	25	50	25
75	2	150	25	25	50	25
38	2	75	25	25	50	25
18,8	2	38	25	25	50	25
9,38	2	18,8	25	25	50	25
4,69	2	9,38	25	25	50	50

Plate: Microplate, 384 well, PS, F-bottom, Lumitrac 200, Med. Binding, White (Cat.-Nº: 781075)
Kinase Glo Plus: Cat Nº V3772, Lot 234250
EGFR: Lot 015

Protocolo

- 1) Add 5 μl EGFR diluted in assay buffer in all wells and 5 μl Assay Buffer in BI wells
- 2) Add 5 μl poly(Glu:Tyr) in all wells except wells autofosf (5 μl buffer)
- 3) Add simultaneously (multichannel pipette) 5 μl ATP in all wells except well 0 (5 μl assay buffer) and shaker 45°
- 4) Incubate for 20 min at room temperature
- 5) Add simultaneously 15 μl Kinase-glo plus reagent (multichannel pipette) and shaker 45°
- 6) Read Luminescent signal at time 10 min

- Km del Cofactor (ATP)

EGFR KINASE ASSAY									
Substrate curve with 100 nM EGFR and 100 uM ATP									
DATE: 4th January 2011									
Placa 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	400	200	100	50,0	25,00	12,50	6,25	3,13	0
B	400	200	100	50	25	12,50	6,25	3,13	0
C	400	200	100	50	25	12,50	6,25	3,13	0
D									
E		Enz	ATP	Poly (E:Y)	Buffer				
F	0	5	5	-	5				Pozos 27
G	Curva S	5	5	5	-				
H	Bl (0 enz)	-	5	5	5				
EGFR enz. (450 nM)	Stock (nM)	Dilution	EGFR enzyme	Buffer	Vol				
300	912,07	3,0	36,2	73,8	110				
ATP 1 mM	Cone ATP (M)	MW	Peso (mg)	ol Buffer (µl)					
	1,E-03	551,14	2,8	5080,3789					
Stock (µM)	Dilución	Cone. Stock	Vol stock	Buffer	Vol preparar	(9 wells: 27ul/well)			
300	3,33	1000	75,0	175,0	250				
Poly(Glu:Tyr) 1,43 mM	Cone poly(E:Y)	MW	Peso (mg)	ol Buffer (µl)					
	1,43E-03	35000	7,5	149,8501					
Stock (µM)	Dilución	Cone. Stock	Vol stock	Buffer	Vol preparar	Vol restante			
1000	1	1000	50	0	50	26			
600	2	1000	24	16	40	20			
300	2	600	20	20	40	20			
150,0	2	300	20	20	40	20			
75,00	2	150,0	20	20	40	20			
37,500	2	75,00	20	20	40	20			
18,75	2	37,500	20,0	20,0	40	20			
9,38	2	18,75	20,0	20,0	40	40			

Plate: Microplate, 384 well, PS, F-bottom, Lumitrac 200, Med. Binding, White (Cat- N°: 781075)

Protocolo

- 1) Add 5 µl EGFR diluted in assay buffer in all wells and 5 µl Assay Buffer in Bl wells
- 2) Add 5 µl poly(Glu:Tyr) in all wells (except well 0) and 5 µl assay buffer in well 0 Substr
- 3) Add simultaneously 5 µl ATP in all wells (multichannel pipette) and shaker 45°
- 4) Incubate for 20min at room temperature
- 5) Add simultaneously 15 µl Kinase-glo plus reagent (multichannel pipette) and shaker 45°
- 6) Read Luminescent signal at time 10 min

- IC₅₀ dels dos inhibidors utilitzats (Staurosporine i Compound56)

EGFR KINASE ASSAY											
Inhibition of EGFR											
Assay conditions: 100 nM EGFR, 20 µM Substr and 10 µM ATP											
DATE: 4th January, 2011											
Placa 1	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21
A	12500nM	6250nM	3125nM		15625nM	7813nM	3906nM	1953nM	976nM	488nM	8138nM
B	12500nM	6250nM	3125nM		15625nM	7813nM	3906nM	1953nM	976nM	488nM	8138nM
C	2400nM	600nM	300nM	150nM	75nM	37,5nM	18,75nM	9,375nM	4,687nM5	1,171875nM	Compound56
D	2400nM	600nM	300nM	150nM	75nM	37,5nM	18,75nM	9,375nM	4,687nM5	1,171875nM	Compound56
E	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)
F	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)
G	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)
H	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)	Bl+comp (0Enz)
I											
J											
K	Bl+Enz (0 comp)	Bl+Enz (0 comp)	Bl+Enz (0 comp)	Bl+Enz (0 comp)	Bl+Enz (0 comp)	Bl+Enz (0 comp)	Bl+Enz (0 comp)	Bl+Enz (0 comp)	Bl+Enz (0 comp)	Bl+Enz (0 comp)	Bl+Enz (0 comp)
L	Bl+Enz (0 comp)	Bl+Enz (0 comp)	Bl+Enz (0 comp)	Bl+Enz (0 comp)	Bl+Enz (0 comp)	Bl+Enz (0 comp)	Bl+Enz (0 comp)	Bl+Enz (0 comp)	Bl+Enz (0 comp)	Bl+Enz (0 comp)	Bl+Enz (0 comp)
M	Bl(0Enz,0 comp)	Bl(0Enz,0 comp)	Bl(0Enz,0 comp)	Bl(0Enz,0 comp)	Bl(0Enz,0 comp)	Bl(0Enz,0 comp)	Bl(0Enz,0 comp)	Bl(0Enz,0 comp)	Bl(0Enz,0 comp)	Bl(0Enz,0 comp)	Bl(0Enz,0 comp)
N	Bl(0Enz,0 comp)	Bl(0Enz,0 comp)	Bl(0Enz,0 comp)	Bl(0Enz,0 comp)	Bl(0Enz,0 comp)	Bl(0Enz,0 comp)	Bl(0Enz,0 comp)	Bl(0Enz,0 comp)	Bl(0Enz,0 comp)	Bl(0Enz,0 comp)	Bl(0Enz,0 comp)
O	Bl(0Enz,0 comp)	Bl(0Enz,0 comp)	Bl(0Enz,0 comp)	Bl(0Enz,0 comp)	Bl(0Enz,0 comp)	Bl(0Enz,0 comp)	Bl(0Enz,0 comp)	Bl(0Enz,0 comp)	Bl(0Enz,0 comp)	Bl(0Enz,0 comp)	Bl(0Enz,0 comp)
P											
Placa 1	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21
A						5 µl Staurosporine + 10 µl Mix (S / ATP) + 5 µl EGFR					
B						5 µl Staurosporine + 10 µl Mix (S / ATP) + 5 µl EGFR					
C						5 µl Compound56 + 10 µl Mix (S / ATP) + 5 µl EGFR					
D						5 µl Compound56 + 10 µl Mix (S / ATP) + 5 µl EGFR					
E						5 µl Staurosporine + 10 µl Mix (S / ATP) + 5 µl Kinase Generic Buffer					
F						5 µl Staurosporine + 10 µl Mix (S / ATP) + 5 µl Kinase Generic Buffer					
G						5 µl Compound56 + 10 µl Mix (S / ATP) + 5 µl Kinase Generic Buffer					
H						5 µl Compound56 + 10 µl Mix (S / ATP) + 5 µl Kinase Generic Buffer					
I											
J											
K						5 µl Kinase Generic Buffer 10% DMSO + 105 µl Mix (S / ATP) + 5 µl EGFR					
L						5 µl Kinase Generic Buffer 10% DMSO + 105 µl Mix (S / ATP) + 5 µl EGFR					
M						5 µl Kinase Generic Buffer 10% DMSO + 105 µl Mix (S / ATP) + 5 µl Kinase Generic Buffer					
N						5 µl Kinase Generic Buffer 10% DMSO + 105 µl Mix (S / ATP) + 5 µl Kinase Generic Buffer					
O											
P											
EGFR nM	Stock (nM)	Dilution	EGFR enzyme	Buffer	Vol						
300	912,07	3,0	217,1	442,9	660						
Mix S / ATP (40 µM S / 20 µM ATP)											