

Tesis Doctoral

Una nueva función para un factor intercambiador de GDP/GTP

Hochbaum, Daniel

2004

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Hochbaum, Daniel. (2004). Una nueva función para un factor intercambiador de GDP/GTP. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3732_Hochbaum

Cita tipo Chicago:

Hochbaum, Daniel. "Una nueva función para un factor intercambiador de GDP/GTP". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2004.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3732_Hochbaum

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR



Tesis de Doctorado

Una nueva función para un factor intercambiador de GDP/GTP

Daniel Hochbaum

03732

Director:

Dr. Omar A. Coso

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular - IFIBYNE - FCEyN - UBA

Julio 2004

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

Tesis de Doctorado

**Una nueva función para un factor
intercambiador de GDP/GTP**

Daniel Hochbaum

Director:

Dr. Omar A. Coso

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular - IFIBYNE - FCEyN - UBA

Julio 2004

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

Tesis de Doctorado

A novel function for a Guanosine nucleotide exchange factor

Daniel Hochbaum

Director:

Dr. Omar A. Coso

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular - IFIBYNE - FCEyN - UBA

Julio 2004

Palabras claves

GEF

MAPK

GTPasa

Segundo mensajero

Factor de transcripción

Keywords

GEF

MAPK

GTPase

Second messenger

Transcription factor

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
1. MAPKs	4
1.1 Señalización a través de cascadas de MAPKs	4
1.2 MAPKs activadas por stress	6
1.3 El grupo JNK de MAPK	8
1.3.1 JNK es activada por dos proteínas quinasas duales específicas	9
1.3.2 La vía de JNK es activada por un grupo grande de MAPKKK	10
1.3.3 Mecanismo de activación de MAPKKK	10
1.3.4 Proteínas scaffold ensamblan módulos de señalización de JNK	11
1.3.5 Rol de JNK en supervivencia o muerte celular	13
2. Historia de las proteínas G	14
2.1 Proteínas G heterotriméricas	14
2.2 La primera pequeña proteína G (Ras)	19
2.2.1 Oncogenes virales	19
2.2.2 Oncogenes humanos	20
2.2.3 Relación entre oncogenes humanos y virales	20
2.2.4 Mecanismo de activación	20
2.2.5 Estructura de Ras	24

3. La familia Rho de pequeñas proteínas G	27
3.1 Características generales	27
3.2 Intercambio de nucleótidos y factores intercambiadores	28
3.3 Mecanismos inhibitorios: proteínas GAPs y GDIs	30
3.4 Señalización desde factores de crecimiento a proteínas Rho	30
3.5 Señalización desde receptores de adhesión a proteínas Rho	31
3.6 Proteínas de la familia Rho re-arreglan el citoesqueleto	32
3.7 Efectores río abajo: Rho, fibras de stress y tensión	33
3.8 Efectores río abajo: Rac y protrusiones de membrana	34
 4. Rap	 35
 5. Epac	 38
5.1 Características generales	38
5.2 Caracterización de la activación de Epac por AMPc	39
5.3 Epac como mediador en respuestas biológicas	44

MATERIALES Y MÉTODOS	46
 1. Células	 46
 2. Transformación de bacterias	 46
 3. Preparación de ADN plasmídico	 47
3.1 Minipreparación	47
3.2 Preparaciones a gran escala	47

3.3 Geles de agarosa nativos	48
3.4 Cuantificación de ADN	48
3.5 Digestión de ADN con enzimas de restricción	48
3.6 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	49
3.7 Reacciones de ligación y transformación	49
4. Purificación de GST-ATF2 (96)	49
5. Transfecciones transientes	51
5.1 Transfección con fosfato de calcio	51
5.2 Transfección con FuGene	51
6. Ensayos de medición de actividad quinasa	53
6.1 Actividad de c-JUN quinasa (JNK)	54
6.2 Actividad de p38 MAPK	54
7. Westerns Blot	55
8. Análisis de expresión de genes reporteros	56
8.1 Transfección y cosecha de las células	56
8.2 Medición de la actividad CAT	57
9. Activación de Rap <i>in vivo</i>	58
9.1 Purificación de GST-RaIGDS (RBD)	59
9.2 Verificación de la proteína GST-RaIGDS (RBD)	59
9.3 Ensayo con células transfectadas	60
10. Activación de Rac/Cdc42 <i>in vivo</i>	61

11. Co-Imunoprecipitación RacN17 - N-Epac	62
12. Interacción Rac N-Epac <i>in vitro</i>	63
12.1 Obtención de proteínas GST y carga de nucleótidos	63
12.2 Traducción in Vitro de N-Epac	63
12.3 Ensayo de interacción	63
13. Activación de Rac/Cdc42 <i>in vitro</i>	65
13.1 Purificación GST-Rac y GST-Cdc42	66
13.1.1 Digestión con trombina	66
13.2 Carga de nucleótido mant-GDP	67
13.3 Obtención de inmunoprecipitados	68
13.3.1 Inmunoprecipitación de myc N-Epac	68
13.3.2 Elusión del inmunoprecipitado	69
10.4 Ensayo de intercambio in Vitro	69
10.4.1 Ensayo pilotos con EDTA	69
10.4.2 Ensayo con inmunoprecipitado de N-Epac	70

RESULTADOS	71
-------------------	-----------

1. Epac activa caminos de transducción de señales a JNK, independiente de Rap	72
1.1 Rap1 G12V, una forma activa de Rap1, es incapaz de activar a JNK	72
1.2 El factor intercambiador Epac activa JNK	74
1.3 Epac FL y ΔEpac activan a JNK al mismo nivel	78
1.4 La región N-terminal de Epac, es responsable de la activación a JNK	79
1.5 RapGAP y RapN17: dos proteínas inhibitorias sobre la activación de Rap	80
1.5.1 RapN17, pero no RapGAP, bloquea la activación de Epac a JNK	81

1.5.2 RapN17 y RapGAP no bloquean la activación de N-Epac a JNK	83
1.6 Activación de Rap: Experimentos de carga de GTP	84
2. Epac presenta dos dominios efectores claramente diferenciados	89
2.1 El dominio REM de Epac como posible responsable de la activación de JNK	89
3. Especificidad de la señalización de Epac	91
3.1 Epac es incapaz de activar a p38 MAPK	91
4. La activación de JNK por Epac no es suficiente para promover la actividad transcripcional	93
4.1 La activación de JNK mediada por Epac no es capaz de señalar hacia factores de transcripción como c-Jun o ATF-2	93
5. Epac envía señales a la cascada de JNK a niveles río arriba al intercambio de GTP sobre Rac/Cdc42	95
5.1 SEK1 KR, una forma dominante negativa de SEK, bloquea Epac-JNK	95
5.2 PAK-N, el dominio N-terminal de PAK, bloquea la activación de Epac a JNK	98
5.3 Formas dominantes negativas de Rac y Cdc42 inhiben la activación Epac-JNK	101
6. Epac promueve, de modo indirecto, la carga de GTP sobre Rac/Cdc42	104
6.1 Epac aumenta los niveles de Rac/Cdc42-GTP	104
6.2 RacN17 forma un complejo con N-Epac	107
6.2.1 N-Epac y Rac no interaccionan in vitro	109
6.3 Medición de actividad intercambiadora en inmunoprecipitados de N-Epac	112
6.3.1 Preparación de proteína Rac/Cdc42	113
6.3.2 Obtención de inmunoprecipitado de N-Epac	115
6.3.3 El inmunoprecipitado de N-Epac tiene asociado actividad intercambiadora	116

DISCUSIÓN	118
------------------	-----

BIBLIOGRAFÍA	129
---------------------	-----

ABREVIATURAS	144
---------------------	-----

RESUMEN

Factores intercambiadores de GDP/GTP (GEFs), y sus proteínas G asociadas son piezas fundamentales en la maquinaria que transduce información desde el medio extracelular hacia respuestas específicas intracelulares. Entre ellas, la cascada de MAPKs, representa una vía efectora ampliamente representada.

De forma análoga a la activación de la vía ERK-1/2 dependiente de Ras, miembros de la familia Rho de proteínas G son capaces de activar la cascada de JNK, al ser cargado GTP, por sus correspondientes GEFs.

En la búsqueda de nuevos reguladores de la actividad de JNK, hemos identificado a EPAC como un fuerte activador de JNK-1. EPAC (Exchange Protein Activated by cAMP) es un miembro de la creciente familia de GEFs que intercambian nucleótidos sobre la subfamilia Rap de proteínas G de la familia Ras.

En la presente tesis, reportamos que mientras EPAC activa a JNK varias veces, una mutante constitutivamente activa de Rap1b (G12V), no es capaz, sugiriendo que Rap-GTP no es suficiente para transducir señales dependientes de EPAC hacia la activación de JNK. Es más, la señalización de EPAC a JNK no es bloqueada por la inactivación de Rap endógena, sugiriendo que la activación de Rap no es necesaria para esta respuesta.

Consistentemente con estas observaciones, la utilización de mutantes que tienen delecionados dominios proteicos, muestran que el dominio catalítico GEF no es necesario para la activación de JNK mediada por EPAC. Estos estudios identificaron una región que se superpone con el dominio REM de EPAC, como crítico para la activación de JNK. De hecho, el dominio REM aislado es suficiente para activar JNK.

Mediante a utilización de mutantes dominantes negativas de la cascada de JNK, hemos identificado a la familia Rho de pequeñas proteínas G como blanco de EPAC, en la activación de JNK. Incluso, una actividad intercambiadora de nucleótido para Rac y Cdc42, se encuentra presente en inmunoprecipitados de EPAC, sugiriendo la formación de un complejo entre EPAC y un putativo GEF para estas proteínas G.

Concluimos que EPAC señala a la cascada de JNK a través de un nuevo mecanismo que no involucra su canónica acción catalítica, ej: intercambio de GDP/GTP sobre proteínas Rap. Esto representa no solo una nueva vía de activación de JNK, sino un mecanismo aún no descrito de señalización río abajo de EPAC.

ABSTRACT

Guanine Nucleotide Exchange Factors (GEFs) and their associated GTP binding proteins (G-proteins) are key regulatory elements in the signal transduction machinery that relays information from the extracellular environment into specific intracellular responses. Among them, the MAPK cascades represent ubiquitous downstream effector pathways. We have previously described that, analogous to the Ras-dependent activation of the Erk-1/2 pathway, members of the Rho family of small G-proteins activate the JNK cascade when GTP is loaded by their corresponding GEFs. Searching for novel regulators of JNK activity we have identified EPAC as a strong activator of JNK-1. EPAC (Exchange Protein Activated by cAMP) is a member of a growing family of GEFs that specifically display exchange activity on the Rap subfamily, of Ras small G-proteins. We report here that while EPAC activates the JNK several fold, a constitutively active (G12V) mutant of Rap1b does not, suggesting that Rap-GTP is not sufficient to transduce EPAC-dependent JNK activation. Moreover, EPAC signaling to the JNKs was not blocked by inactivation of endogenous Rap suggesting that Rap activation is not necessary for this response. Consistent with these observations, domain deletion mutant analysis shows that the catalytic GEF domain is dispensable for EPAC-mediated activation of JNK. These studies identified a region overlapping the REM domain as critical for JNK activation. Consistent with this, an isolated REM domain from EPAC is sufficient to activate JNK. Using dominant negative mutants of the JNK cascade, we identified the Rho family of small G proteins as a target for Epac mediated JNK activation. Indeed, an exchange activity towards Rac and Cdc42, is present in Epac immunoprecipitates, suggesting the formation of a complex between Epac and a putative GEF for these G proteins. We conclude that EPAC signals to the JNK cascade through a new mechanism that does not involve its canonical catalytic action, i.e. Rap-specific GDP/GTP exchange. This represents not only a novel way to activate the JNKs but also a yet undescribed mechanism of downstream signaling by EPAC.

Introducción

Las células son capaces de responder frente a diversos estímulos que reciben del medio exterior. Son capaces de percibir señales a través de receptores, que se activan por unión de ligandos específicos. Esto desencadena una señal que por lo general llega hasta el núcleo, donde la actividad de factores de transcripción es modificada, en general aumentando o disminuyendo el nivel de transcripción de diversos genes blanco.

Un mecanismo bastante conservado para la transmisión de señales, es el que involucra cascadas de proteínas quinasas. Estas proteínas son activadas río arriba por pequeñas proteínas G, y río abajo son capaces de fosforilar factores de transcripción. Las diferentes señales extracelulares que pueda censar una célula, pueden integrarse para dar una respuesta, como proliferación, diferenciación o apoptosis.

Las proteínas G son capaces de unir e hidrolizar nucleótidos de guanina (actividad GTPasa), permaneciendo de forma activa al tener unido GTP, y de forma inactiva al tener unido GDP. Existen dos clases de proteínas G, unas formando un complejo de tres subunidades, llamadas "proteínas G heterotriméricas", y otras de bajo peso molecular, llamadas "pequeñas proteínas G", que son activadas por factores intercambiadores de GDP/GTP (GEFs). Ambos tipos de proteínas G (GTPasas) son sensores celulares frente a estímulos externos: las proteínas G heterotriméricas, en general responden a hormonas, las cuales inducen la carga de GTP y posterior activación. En el caso de las proteínas G de bajo peso molecular, el cargado de GTP (activación) por GEFs, se evidencia frente a estímulos tales como factores de crecimiento, citoquinas o stress ambiental.

Al ser activadas proteínas G heterotriméricas, estas son capaces de aumentar los niveles intracelulares de AMPc, un segundo mensajero, el cual es capaz de unirse a la PKA (proteína quinasa dependiente de AMPc), de esta forma aumentando su actividad quinasa. El AMPc ha encontrado un nuevo blanco en los últimos años con el descubrimiento de proteínas como Epac (exchange factor directly activated by cyclic AMP), un GEF específico para la familia Rap de pequeñas proteínas G. La unión de AMPc a Epac, induce un cambio conformacional, favoreciendo la interacción y actividad intercambiadora sobre Rap. De esta manera, Epac sería capaz de brindar un nexo entre proteínas G heterotriméricas y pequeñas.

1. MAPKs

1.1 Señalización a través de cascadas de MAPKs

La búsqueda inicial de moléculas candidatas para mediar la respuesta mitogénica de factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), que estimulan receptores del tipo tirosina quinasa, llevaron a la identificación de una proteína fosforilada en tirosina de 42 Kd (33, 34), que exhibía similares propiedades electroforéticas que moléculas conteniendo fosfo-tirosinas detectadas luego de la activación de PKC mediada por esteres de forbol (93) o en células transformadas por virus (34). Luego, esta molécula fue identificada como p42MAPK y fue visto que requería de una fosforilación dual en treonina y tirosina para su completa activación (160, 174). El clonado de esta molécula y una altamente relacionada, p44MAPK, reveló que pertenecían a una gran familia de serinas-treoninas quinasas relacionadas a las quinasas Fus3 (una MAPK de levadura relacionada a respuesta de feromonas) y Kss1 (quinasa supresora de SST2, una MAPK de levadura involucrada en el crecimiento filamentoso) de la levadura *Sacchromyces cerevisiae* (14, 15), que actúa en el último paso de una cascada de quinasas que participan en la respuesta de maduración inducida por feromonas (77). En mamíferos p44MAPK y p42MAPK, también conocidas como ERK1 (extracellular regulated Kinase 1) y ERK2 respectivamente, referidas como MAPKs, son los componentes centrales de los caminos de proliferación:

- 1) Su actividad enzimática crece con la estimulación de mitógenos.
- 2) El impedimento de su función previene la proliferación celular en respuesta a diversos factores de crecimiento (150).
- 3) La activación constitutiva de moléculas que actúan río arriba de estas es suficiente para producir tumorigénesis (124, 181).

Los receptores de factores de crecimiento de la clase tirosina quinasa, en respuesta a sus respectivos ligandos, son capaces de activar MAPKs. Un ejemplo es la unión de EGF a su receptor, que produce la fosforilación de diversas moléculas, incluidas el mismo receptor (EGFR). Esta auto-fosforilación, sirve entonces como sitio

de “docking” para proteínas adaptadoras, que contienen motivos estructurales involucrados en la interacción proteína-proteína. Estas proteínas adaptadoras incluyen, entre otras, a Grb2 y SEM5 (181), las cuales contienen un dominio SH2 (Src homology 2) y dos dominios SH3. Otro ejemplo es Shc (una proteína adaptadora en la vía de Ras), que contiene un dominio de unión a fosfo-tirosinas (PTB), un dominio SH2 y uno SH3 (221). Ambos, PTB y SH2 se unen a polipéptidos conteniendo tirosinas fosforiladas (152, 222). Shc también es un sustrato para EGFR, y luego de su fosforilación se une a el dominio SH2 de Grb2 (179). Por lo tanto, la activación del EGFR, resulta en la unión a él de Grb2, lo que resulta en el reclutamiento de SOS, que se une al dominio SH3 de Grb2 (52). SOS estimula el intercambio de GDP por GTP en la pequeña proteína Ras (52), y esta inicia una cascada de proteínas quinasas que incluyen, secuencialmente, una MAPK quinasa quinasa (MAPKKK), que fosforila y activa una MAPK quinasa (MAPKK), que a su vez fosforila y activa una MAPK. La MAPK luego fosforila y regula la actividad de enzimas claves y proteínas nucleares, que finalmente regulan la expresión de genes esenciales para la proliferación celular (40). A-Raf, B-Raf y Raf-1 son ejemplos de MAPKKKs, MEK1 y MEK2 son ejemplos de MAPKKs.

La especificidad de la vía de las MAPKs esta dada también por proteínas que logran reunir las diferentes MAPKKK-MAPKK-MAPK. Reciben el nombre de proteínas “scaffold” o de andamiaje y fueron descritas por primera vez en levaduras: En *Saccharomyces cerevisiae*, los factores de mating (α o a) activan un receptor de tipo GPCR, cuyo agonista es alguna de estas feromonas, que al unirse producen la disociación de una proteína G en la subunidad α (GPA1) y las subunidades $\beta\gamma$ (Ste4 y Ste18) (77). $\beta\gamma$ libres luego pueden activar una serina-treonina quinasa, Ste20, un proceso que involucra a Cdc42 y su GEF Cdc24 (195, 239), así activando una cascada lineal de proteínas quinasas, que incluye secuencialmente a Ste11 (una MAPKKK de levadura) y Ste7 (una MAPKK de levadura), que fosforila y activa a las MAPKs homólogas de levadura Fus3 y Kss1. Ste5, que se une a $\beta\gamma$ de levaduras, juega un rol de plataforma o andamio para el reclutaje de Ste11, Ste7 y Kss1 y Fus3 (2, 227). El complejo Ste5, $\beta\gamma$, Ste11, Ste7, Kss1, Fus3 representa un prototipo de módulo de MAPKKK-MAPKK-MAPK (Ste11-Ste7-Fus3,Kss1).

En la figura 1, se esquematizan las vías de MAPKs mas conocidas en mamíferos.

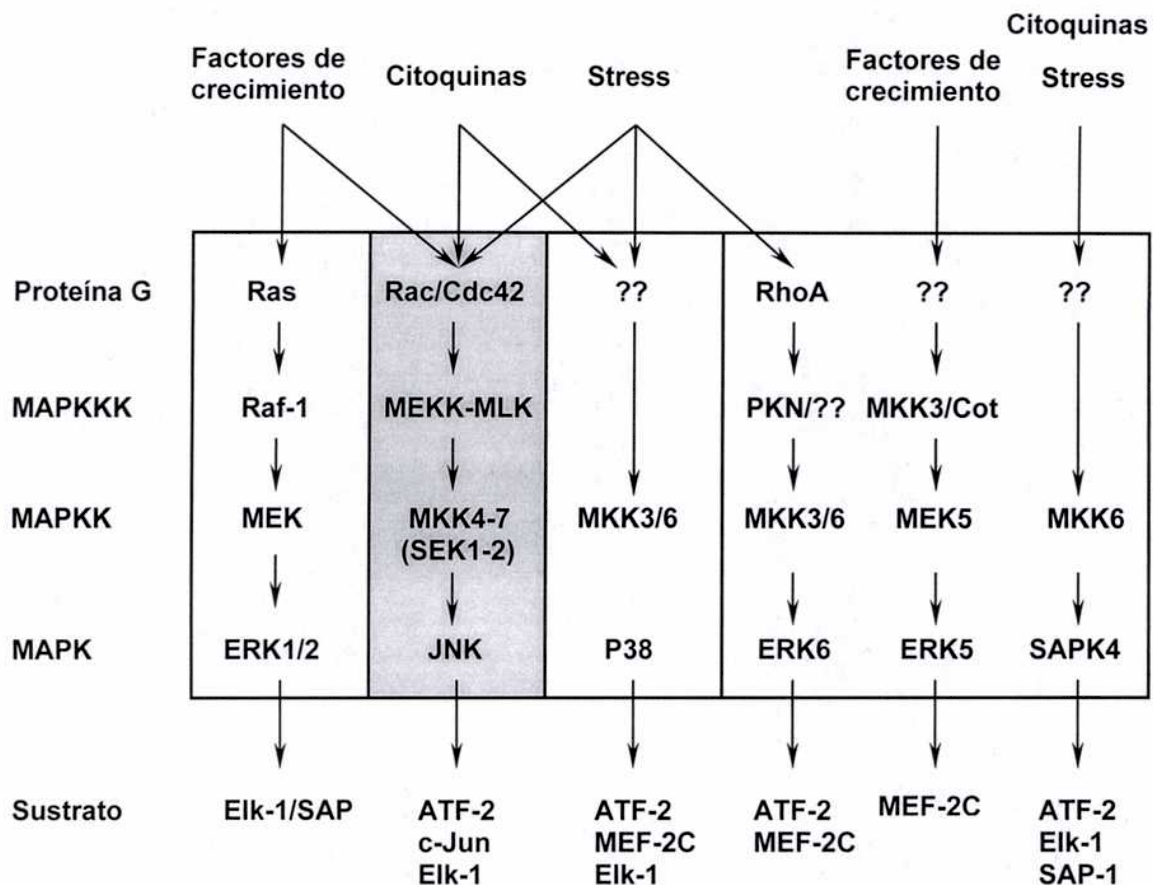


Figura 1. Vías conocidas de MAPKs. Diversos estímulos activan factores intercambiadores (GEFs), los cuales cargan GTP sobre pequeñas proteínas G (activación). Estas a su vez, son capaces de activar una cascada de fosforilación, finalizando en la fosforilación y activación de MAPKs. Las MAPKs activas, son capaces de fosforilar diversos sustratos, en su mayoría factores de transcripción.

1.2 MAPKs activadas por stress

En mamíferos, tres grupos de MAPKs han sido identificados (180). Cada uno de estos grupos es activado por una cascada de proteínas quinasas. El primer grupo incluye a ERK1/2, y están relacionadas a enzimas encontradas en levaduras con gemaciones y contienen el motivo dual de fosforilación Thr-Glu-Tyr, en este grupo también está incluida ERK5. El grupo c-Jun NH2-terminal kinase (JNK), también llamado stress-activated MAPK kinase o SAPK, por Stress Activated Protein Kinase, representa un segundo grupo de MAPKs que fueron identificados en mamíferos. JNK

contiene el motivo dual de fosforilación Thr-Pro-Tyr. Existe un tercer grupo de MAPKs denominado familia p38, que incluye a p38 α , SAPK4 (p38 β) y ERK6 (p38 γ). Este grupo contiene el motivo de fosforilación dual Thr-Gly-Tyr. En la figura 2 se indican los aminoácidos presentes dentro de los sitios consenso de fosforilación, pertenecientes a cada familia de MAPKs.

Cascada ERK	ERK1/2	Thr-Glu-Tyr	T-E-Y
Cascada JNK	JNK1	Thr-Pro-Tyr	T-P-Y
Cascada p38	p38 α	Thr-Gly-Tyr	T-G-Y

Figura 2. Sitios consenso de fosforilación en MAPKs por MAPKKs (quinasas de fosforilación dual). Se indican las tres cascadas conocidas de MAPKs, junto con los miembros mas representativos de cada una. Las MAPKs son reguladas por la fosforilación dual de residuos treonina y tirosina. La pertenencia a una dada familia de MAPKs es determinado por el residuo que se encuentra por medio del sitio de fosforilación.

Estudios bioquímicos identificaron una "proteína quinasa p54 asociada a microtúbulos" que era activada por cicloheximida, un agente causante de stress (108). En el año 1991, se demostró que el factor de transcripción c-jun es fosforilado por MAPKs en las serinas 63 y 73 en respuesta al estímulo con esteres de forbol (TPA)(157). Como ambas serinas de c-jun, tenían una prolina en su aminoácido c-terminal inmediato, se buscaron 2 proteínas quinasas, cuya fosforilación fuese dirigida por prolinas: las candidatas eran la proteína p54 recientemente aislada (108) y p42/p44 (ERK2/ERK1). Estas MAPKs fueron capaces de fosforilar a c-jun, pero fue p54 la MAPK que mayormente fosforilaba a este factor de transcripción. Por ser esta fosforilación en la región N- terminal (dominio de trans-activación), la fosforilación inducía la activación de c-jun (157).

Esta proteína p54, era entonces capaz de fosforilar y activar a c-jun, en respuesta a factores de stress como cicloheximida. Mas tarde se la denominó JNK (1, 78).

Posteriormente, JNK fue clonada (49) (107). En el año 1994, se descubre la proteína SEK1 (SAPK/ERK kinase-1), una MAPKK que resultó ser específica para SAPK/JNK p54, y que mas tarde se demostró también era capaz de fosforilar a p38 (41). Junto al descubrimiento de que SEK1 es una quinasa que fosforila JNK, se demuestra que MEKK1 es una MAPKKK que fosforila SEK1, constituyendo MEKK, SEK1 y JNK una cascada de fosforilación similar a la de Raf, MEK y ERK1/2.

Estaba ampliamente demostrado que Ras al activarse, señalizaba a ERK1/2 en respuesta a factores de crecimiento y a través de la cascada Ras-Raf-MEK-ERK. Lo que no quedaba totalmente claro era si Ras también señalizaba a JNK. Varias evidencias mostraban dependencia de esta proteína G :

- 1) Ras oncogénico activaba a JNK, fosforilando Ser 63 y 73 de c-jun e independiente de la activación de ERK1/2 (225).
- 2) EGF y NGF activaban JNK mediados por H-Ras, ya que una mutante inactiva de Ras (Ras N17) bloqueaba esta activación (137).

Otras evidencias mostraban independencia de Ras:

- 1) TNF- α no era capaz de cargar GTP sobre Ras, pero era un gran activador de JNK (137, 138).
- 2) IL-1 activaba a SAPK p54, pero IL-1 no activa ni Ras ni Raf.

Surgía entonces la idea de que la activación de JNK, tenía componentes dependientes e independientes de Ras. Esto motivó la búsqueda de intermediarios específicos para la vía de JNK.

1.3 El grupo JNK de MAPK

Para fines de 1994, se estaba evaluando la hipótesis de que la vía clásica Ras-ERK era una vía independiente de la vía de JNK (137), pero quedaba por encontrar cual era la pequeña proteína G que señalizaba a JNK, de forma similar a Ras. En el año 1995, dos trabajos en el mismo volumen de la revista *Cell*, demuestran que Rac1 y Cdc42 son las responsables de activar la vía de JNK (36, 136). Estas, a su vez, eran

activadas por diversos factores intercambiadores, como es el caso de Dbl, Ost o Vav (36, 39).

JNK es activada por tratamiento de células con citoquinas inflamatorias, como TNF- α (226) e IL-1 (10) y por la exposición de células a diversas formas de stress ambiental (Ej.: stress osmótico, stress redox y radiación) (84). Además, esta SAPK es activada por la unión del ligandos a receptores acoplados a proteínas G (35), proceso mediado por las subunidades $\beta\gamma$ de proteínas G heterotriméricas (37).

La fosforilación de c-Jun en los sitios que son fosforilados por JNK (Serinas 63 y 73) causa un incremento en la actividad transcripcional (157, 196). Además, se encontró que JNK es capaz de fosforilar a otras proteínas de la familia AP1, incluidas JunB, JunD y ATF2 (84). En cada caso la fosforilación corresponde a motivos Ser/Thr-Pro presentes en los dominios de activación de los factores de transcripción.

Las proteínas quinasas JNK son codificadas por tres genes. Los genes *Jnk1* y *Jnk2* son expresados en todos los tejidos. En contraste, el gen *Jnk3*, tiene un patrón de expresión muy restringido a cerebro, corazón y testículos. Estos genes pueden sufrir "splicing" alternativo para generar las 10 isoformas conocidas de JNK (69). Los transcritos derivados de estos tres genes codifican proteínas que incluyen o no una extensión en el COOH-terminal para crear isoformas que van de 46 a 55 Kd. Una segunda forma de "splicing" es restringido a los genes *Jnk1* y *Jnk2* e involucra la selección de uno de dos exones alternativos que codifican parte del dominio quinasa. Este "splicing" alternativo influencia en el reconocimiento del sustrato de las isoformas de JNK por alterar la habilidad de JNK de interactuar con sitios de "docking" en sustratos (69).

1.3.1 JNK es activada por dos proteínas quinasas duales específicas

Las proteínas quinasas JNKs, son activadas por la fosforilación dual en treonina y tirosina de MKK4 (también conocida por SEK1) y MKK7 (SEK2) (tabla 1). Estas proteínas quinasas también son expresadas como un grupo de isoformas de "splicing" alternativo. Tres isoformas de MKK4s con regiones NH2 terminales distintas han sido identificadas, y seis isoformas de MKK7s con diferentes NH2 y COOH terminales, han sido descritas (215).

La proteína quinasa MKK7 es principalmente activada por citoquinas (Ej.: TNF e

IL-1) y MKK4 es principalmente activada por stress ambiental. La comparación de las propiedades bioquímicas de MKK4 y MKK7 demuestran que mientras ambas pueden activar a JNK por fosforilación dual en Treonina y Serina, hay diferencias en la especificidad del sustrato. Primero, MKK4 pero no MKK7, puede también activar la MAPK p38 (41). Segundo, a pesar de que MKK4 y MKK7 son quinasas duales y fosforilan a JNK en ambos residuos (treonina y tirosina), MKK4 fosforilaría preferentemente a JNK en tirosina y MKK7 preferencialmente en treonina (112). Esta última diferencia, sugiere que MKK4 y MKK7 podrían cooperar para activar a JNK bajo algunas circunstancias, evidenciando una forma de complementación (112).

Análisis de inmunofluorescencia demuestran que ambas MKK4 y MKK7 están presentes en el citoplasma y en el núcleo (215). Es mas, MKK7 se acumularía en el núcleo luego de la exposición de las células al stress (132). La localización nuclear de MKK4 y MKK7 contrasta con la localización citoplasmática de los activadores de ERKs, MEK1 y MEK2. JNK entonces, podría ser activada tanto en citoplasma como en el núcleo.

1.3.2 La vía de JNK es activada por un grupo grande de MAPKKK

Diversas MAPKKKs que activan a JNK han sido reportadas. Estas incluyen miembros del grupo de MEKK (MEKK1 a MEKK4), el grupo de proteínas quinasa mixed-lineage (MLK1, MLK2, MLK3, DLK y LZK) (210), el grupo ASK (ASK1 y ASK2), TAK1 y TPL2 (tabla 1). Estas MAPKKKs han sido caracterizadas en su mayoría por transfección y sobre-expresión de estas proteínas, donde se evidencia la activación de MKK4 y/o MKK7. Si bien se han descrito muchas MAPKKKs para JNK, no se puede determinar todavía cuales son los reguladores fisiológicos de cada una de ellas (59).

1.3.3 Mecanismo de activación de MAPKKK

Diversas líneas de evidencias indican que la familia Rho de GTPasas median la activación de JNK por diversos estímulos (36, 136). Estas GTPasas son mediadoras de receptores de tipo tirosina quinasa, pero no de citoquinas inflamatorias (136). Dependiendo del tipo celular, Rac y Cdc42 pueden señalizar a JNK (36), pero en otros

tipos celulares, RhoA también es capaz de activar esta cascada (211). Moléculas efectoras de Rac y Cdc42 activas incluyen diversos miembros del grupo de proteínas quinasa MLK (mixed-lineages) (210), PAK (p21 activated protein kinase) (136) y el grupo MEKK de MAPKKK (59), conteniendo todas estas proteínas un dominio llamado CRIB (Cdc42/Rac interactive binding domain). Por lo tanto, la familia Rho mediaría la señalización a JNK producida por la activación de receptores tirosina quinasa.

La activación de JNK por receptores de citoquinas aparentemente sería mediado por el grupo de proteínas adaptadoras TRAF (116). La activación del receptor de TNF lleva al reclutamiento de TRAF2, la cual es requerida para la activación de JNK (234).

1.3.4 Proteínas scaffold ensamblan módulos de señalización de JNK

Diversas vías de transducción de señales mantienen especificidad de sustratos gracias a proteínas de andamiaje o "scaffold", que logran unir módulos de MAPKKK-MAPKK-MAPK. La primera de estas proteínas, Ste5, fue hallada en levaduras, pero más tarde fueron halladas en mamíferos: Por ejemplo, MP1 es capaz de reunir a MKK1(MAPKK) y ERK1 (180).

Proteínas de andamiaje para la señalización de JNK también han sido identificadas. Estas incluyen el grupo de "JNK interacting proteins" (JIP) (tabla 1), conteniendo las proteínas JIP1, JIP2 y JIP3. Las proteínas JIP1 y JIP2 son proteínas con gran homología entre ellas que logran reunir a JNK, MKK7 y a proteínas quinasas del grupo de mixed-lineage (228, 233). La proteína JIP3 no es estructuralmente relacionada a JIP1 y JIP2, aunque también ensambla el módulo JNK, MKK7, y miembros del grupo de mixed-lineage (94). Una variante de "splicing" de JIP3 ha sido encontrada (JSAP), que también funcionaría como una proteína de andamiaje de la vía de JNK (85).

El grupo de JIP podría representar solo un grupo de proteínas de andamiaje para JNK. Por ejemplo, estudios recientes indican que la filamina, una proteína de unión a actina, podría funcionar como una proteína de andamiaje para el ensamblaje de un módulo de receptor de citoquinas que activa a JNK (113, 126). Estudios de "binding" demuestran que la filamina interactúa con MKK4 y TRAF2. Otra proteína de andamiaje encontrada es la β -arrestina que ensambla el módulo ASK1-MKK4 -JNK3 (128).

MAPKKK	Nombre alternativo
ASK1	MAPKKK5
ASK2	MAPKKK6
DLK	
LZK	
MEKK1	
MEKK2	
MEKK3	
MEKK4	MTK1
MLK1	
MLK2	MST
MLK3	SPRK,PTK1
TAK1	
Tpl-2	Cot
MAPKK	
MKK4	SEK1, SERK1, SKK1, JNKK1
MKK7	SEK2, SKK4, JNKK2
MAPK	
JNK1	SAPK γ , SAPK1c
JNK2	SAPK α , SAPK1a
JNK3	SAPK β , SAPK1b, p49F12
Scaffolds	
JIP1	IB1
JIP2	IB2
JIP3	JSAP

Tabla 1. Componentes de la vía de transducción de señales de JNK en mamíferos. En color azul se destacan proteínas utilizadas en esta tesis.

1.3.5 Rol de JNK en supervivencia o muerte celular

No es claro el mecanismo de activación de JNK frente al stress. Es posible que JNK pueda mediar algunos efectos que causa el stress en la célula. Alternativamente, la activación de JNK podría representar una respuesta protectora que es iniciada frente a la exposición al stress. De hecho, la vía de JNK ha sido implicada tanto en vías de apoptosis como de salvataje celular (84).

Los estudios iniciales del rol de la señalización de JNK en apoptosis/supervivencia fueron investigados por muerte de células neuronales en respuesta a la abstinencia de factores neurotróficos (232). Usando componentes de la vía de JNK dominantes negativos y constitutivamente activos en transfecciones, fue demostrado que la vía de JNK contribuye a la respuesta apoptótica y que esta era suprimida por la activación de vías de salvataje (Ej.: ERK MAPK y Akt/PKB).

Diversos estímulos que activan a JNK no causan apoptosis. Por ejemplo, la mayoría de los tipos de stress ambiental no causan apoptosis en condiciones en que son suficientes para la activación de JNK. Esto es en parte porque la vía de apoptosis dependiente de JNK puede ser bloqueada por vías de señalización de supervivencia (232). Ejemplos de estas vías de supervivencia incluyen NF- κ B, Akt/PKB y ERK. Por lo tanto, la vía de JNK funcionaría dentro del contexto del estado de activación de otras vías de señalización. La ausencia de una respuesta apoptótica ante una activación de JNK también correlaciona con la curva de tiempo de activación de JNK: una sostenida activación de JNK, pero no transiente, es asociada a la apoptosis (27). Muchas citoquinas (Ej.: TNF) causan solo una activación transiente de JNK, que no contribuye a la respuesta apoptótica (116).

También ha sido involucrada JNK en la formación de tumores. Está establecido que la transformación inducida por Ras requiere la activación del factor de transcripción c-Jun (86) y que Ras induce la fosforilación de c-Jun en sitios que son fosforilados por JNK (157, 196). Es más, la tumorigénesis que induce Ras es revertida por la mutagénesis de c-Jun en los sitios de fosforilación por JNK (8). De hecho, ha sido reportado que JNK está constitutivamente activa en varias líneas tumorales y que las acciones transformantes de varios oncogenes han sido dependientes de la activación de JNK (84).

2. Historia de las proteínas G

2.1 Proteínas G heterotriméricas

Uno de los principales aportes al descubrimiento de las proteínas que unen nucleótidos de guanina, fue dado por el Dr. Earl W. Sutherland, becario del Dr. Carl Cori. Él demostró por primera vez que la acción de las hormonas podía ser estudiada fuera del contexto celular.

En la década del 50', el laboratorio del Dr. Cori estaba estudiando el metabolismo del Glucógeno, y como a partir de este se sintetizaba glucosa. En la figura 3 se esquematiza las enzimas conocidas en la actualidad, involucradas en este proceso:

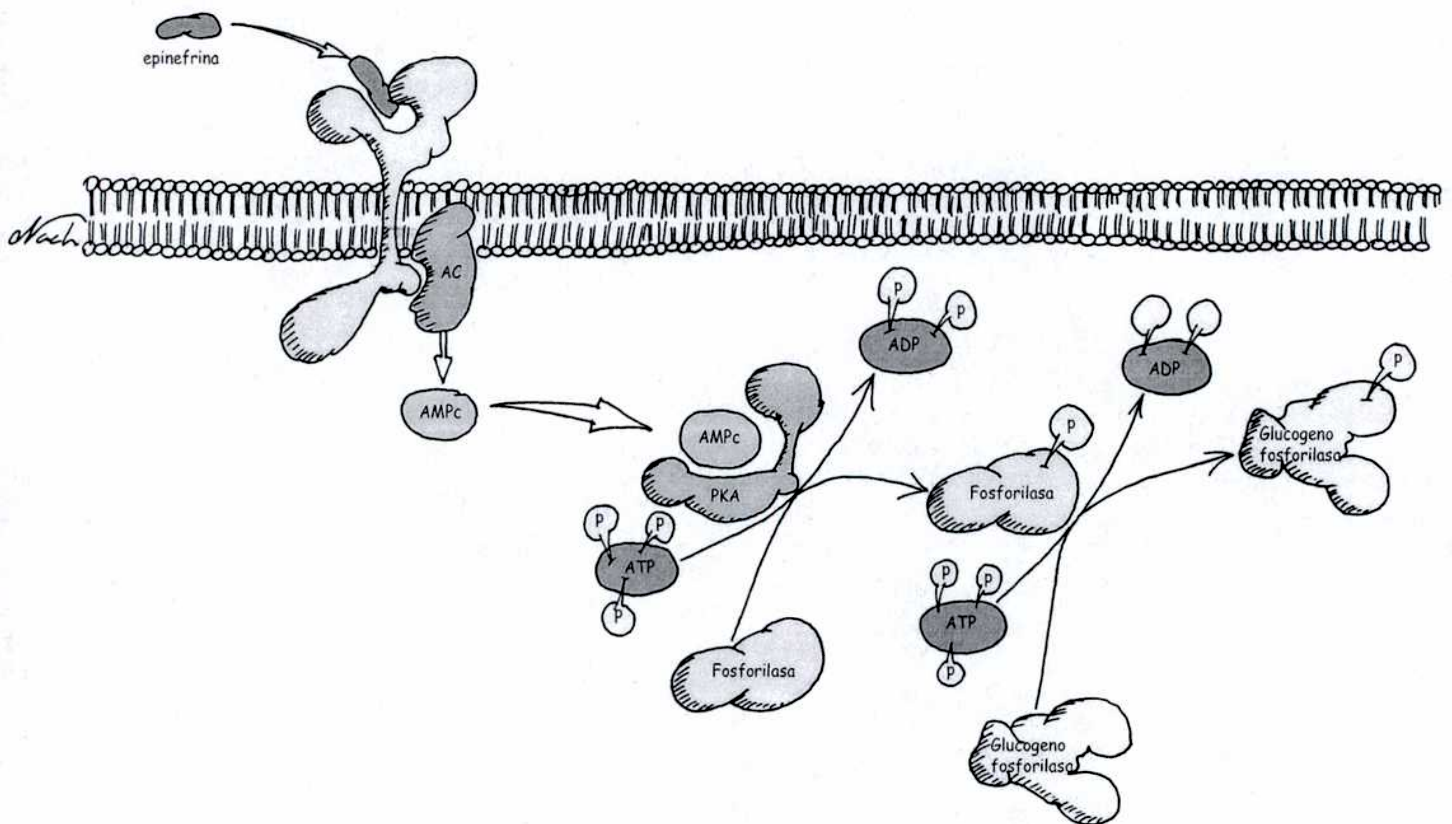


Figura 3. Regulación de la ruptura del glucógeno por la hormona epinefrina. La unión de epinefrina a su receptor, induce la activación de la enzima adenilato ciclasa, capaz de generar AMPc a partir de ATP. El AMPc activa la PKA, que fosforila y activa la enzima fosforilasa. Esta a su vez, fosforila y activa a la enzima glucógeno fosforilasa, que finalmente genera la ruptura de glucosa a partir de glucógeno

Había sido descrito que hormonas tales como epinefrina y glucagon eran capaces de activar la enzima fosforilasa, limitante en este proceso. Además, la incorporación del fosfato a la fosforilasa, requería que la membrana celular estuviese intacta. Por otro lado, una enzima llamada fosfatasa, había sido encontrada, y su función era regular a la fosforilasa, removiendo el grupo fosfato.

Un problema mayor con el que se contaba, era que había que inhibir la acción de enzimas fosfatasas, ya que si no, era muy difícil evidenciar la acción de las hormonas. Para inhibir esta enzima se utilizaba NaF, pero no era posible ver actividad de glucagon o epinefrina en presencia de buffers con NaF. En ese momento, Ted Rall, un post-doc del Dr. Cori, prueba un buffer sin NaF, obteniendo una gran activación de la fosforilasa (9).

La respuesta hormonal se perdía si se centrifugaban los homogenatos, sugiriendo que en las membranas existía un componente necesario que era restituido al volver a combinar el sobrenadante (citósol) con la fracción particulada (membranas). Si se incubaba con hormonas la fracción particulada, se liberaba un factor estable, resistente al calor, que lograba activar a la fosforilasa en el sobrenadante (9, 42). Este factor fue identificado como AMPc, y era producido a partir de ATP (204). La actividad de convertir ATP en AMPc, fue llamada adenilato ciclasa. En paralelo, Bill Butcher descubría que la enzima fosfodiesterasa era la responsable de romper el AMPc (22), pero estaba claro que el glucagon y la epinefrina actuaban incrementando la actividad adenilato ciclasa, y no inhibiendo la actividad fosfodiesterasa.

Otras hormonas fueron vistas que actuaban vía el sistema de adenilato ciclasa-AMPc: ACTH activaba adenilato ciclasa en preparaciones de adrenales (76), y lo mismo sucedía con TSH en preparaciones de tiroides (99). Teniendo estas evidencias experimentales, y el hecho que no se encontrara actividad adenilato ciclasa en membranas nucleares (42), nació el concepto de que el AMPc era un segundo mensajero, ya que era capaz de transmitir la señal intracelularmente a partir de que una hormona podía activar un receptor de membrana. En este modelo, la hormona actuaba como un primer mensajero (203, 205). En la figura 4, se ilustra esta idea.

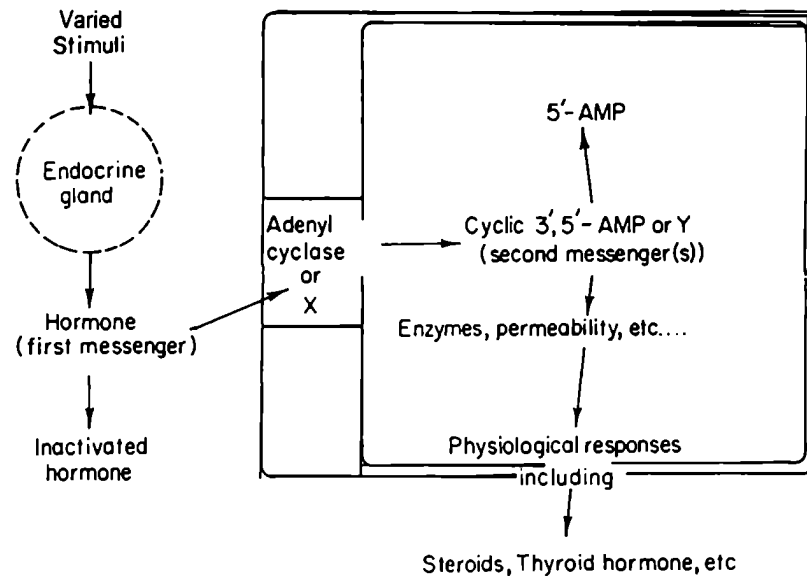


Figura 4. Representación esquemática del concepto de segundo mensajero. Diversas hormonas (primer mensajero) son capaces de estimular el sistema de adenilato ciclasa, generando AMPc (segundo mensajero). Figura tomada de (205)

En el año 1968, el grupo del Dr. Ed Krebs purifica de músculo esquelético de conejo una proteína quinasa, que dependía de la unión de AMPc (223), más tarde llamada PKA. Esta proteína quinasa proporcionaba un nexo entre la estimulación con hormonas tales como glucagon o epinefrina y la activación de la enzima fosforilasa, ya que al aumentar los niveles intracelulares de AMPc por estimulación con hormonas, este nucleótido se unía y activaba a la PKA. La PKA era capaz de fosforilar y activar a la enzima fosforilasa y además inhibía la enzima glucógeno sintetasa (67). Es decir, el AMPc que se producía frente al estímulo con glucagon o epinefrina, tenía como blanco esta novedosa enzima (figura 3).

El descubrimiento de proteínas que unen GTP surge en el año 1971, en el laboratorio del Dr. Martin Rodbell, trabajando con membranas purificadas de hígado de ratas ("ghosts"). El objetivo era estudiar la naturaleza del receptor de glucógeno, y la relación entre la unión de la hormona y la activación de la adenilato ciclasa, midiendo los niveles de AMPc (11, 156, 168-170).

Para el estudio de unión agonista-receptor, marcaban con 125 I el glucagon y medían unión. Este ensayo era realizado en un buffer que contenía solo sales (20mM Tris/Cl pH=7.6, 2.5% albúmina, 1mM EDTA), llamado buffer Standard. Como además

de la unión del glucagon a su receptor, querían medir actividad adenilato ciclasa, se agregaba a este buffer:

- a) El sustrato de la enzima: ATP junto a Mg^{++}
- b) Fosfocreatinina + creatinina fosfoquinasa, llamado "sistema regenerador de ATP".

Al medio Standard, cuando se le agregaban estos componentes, se lo denominaba medio completo.

La gran sorpresa, fue que la unión del glucagon a su receptor bajaba a la mitad al trabajar con el medio completo, comparando con el medio Standard, indicando que alguno de los factores agregados, modificaba la unión del glucagon a su receptor. Una posible explicación, era que el sistema de adenilato ciclasa se estuviera activando en presencia de medio completo. Al estar activándose, era inhibida la unión del glucagon al receptor.

Sacando de a uno los componentes agregados al medio completo, se evidenció que el ATP era el culpable de la bajada en la unión del glucagon a su receptor.

Martin Rodbell sabía que era difícil obtener ATP, sin que tuviese contaminación de otros nucleótidos trifosfatos. De hecho, la compañía *Sigma* (el proveedor de ATP en el laboratorio), vendía el ATP contaminado con otros nucleótidos. Es por eso, que se realizaron los mismos experimentos, pero en lugar de agregar ATP, se probaron con otros nucleótidos.

Los nucleótidos GDP y GTP eran los únicos que mimificaban el efecto del ATP, y de hecho actuaban disociando la unión del ^{125}I -glucagon a su receptor, en concentraciones de dos o tres ordenes de magnitud menores al ATP.

El ATP y el ion Mg^{++} , eran agregados al medio Standard, ya que eran sustratos de la adenilato ciclasa. La medición de la actividad adenilato ciclasa se realizaba en presencia de ATP- α ^{32}P , ya que se medía la aparición del producto AMPc ^{32}P .

Para descartar la contaminación de GTP en el ATP, sintetizaron ^{32}P -App(NH)p, un análogo de ATP, resistente a la hidrólisis por las ATPasas de membrana, que era capaz de ser utilizado como sustrato de la adenilato ciclasa. En presencia de este análogo, no se observó actividad adenilato ciclasa al estimular con glucagon, a menos que GTP estuviese presente, demostrando que el GTP es estrictamente necesario para la actividad de la adenilato ciclasa en respuesta a hormonas.

Un análogo no hidrolizable de GTP, Gpp(NH)p, mantenía activa a la adenilato ciclasa por tres días a temperatura ambiente, dando la noción que el transductor de la señal, entre el receptor y la adenilato ciclasa, debería hidrolizar GTP.

En el año 1977, se demuestra finalmente que las hormonas estimulan la hidrólisis de GTP a GDP + Pi (24). En ese mismo año, Thomas Pfeuffer purifica una proteína de 42Kd que se une a una columna agarosa-GTP (153, 154), siendo la primera evidencia tangible de la existencia de proteínas Gs, el transductor estimulador de la adenilato ciclasa.

Más tarde fue demostrado, que el F^- , en contacto con el silicio de los tubos de ensayo de entonces (de vidrio), formaba un complejo (AlF_4^-) capaz de imitar la estructura trifosfato del nucleótido de GTP, activando la respuesta hormonal, en ausencia de hormonas. Esto explicaba la razón por la cual, no era posible observar la acción de las hormonas en presencia de buffers que tuvieran NaF (no era posible observar la activación de un sistema hormonal que ya se encontraba activo por AlF_4^-).

Las primeras evidencias de que las proteínas G estaban compuestas por tres subunidades (α , β y γ) surgen con la proteína G transducina (G_t) (65), capaz de disminuir los niveles intracelulares de GMPc al ser estimulada por luz.

Hoy sabemos que la subunidad α es capaz de unir e hidrolizar GTP. Hasta la actualidad, han sido descubiertas 17, divididas en cuatro grupos: G_s , G_i , G_q y G_{12} , mientras que se conocen 6 diferentes subunidades β y 11 diferentes subunidades γ (142).

La teoría aceptada en la actualidad, llamada teoría "disociativa" (23), surge de observar que los análogos no hidrolizables de GTP, Gpp(NH)p y $GTP\gamma S$, son capaces de disociar la subunidad α y $\beta\gamma$. La hormona al estimular a su receptor, disocia la subunidad α unida a GTP de las subunidades $\beta\gamma$. $G\alpha$ unida a GTP es capaz de activar a la enzima adenilato ciclasa, la cual produce el AMPc. Además, $\beta\gamma$ también son capaces de transmitir señales, como es el ejemplo de la activación de Ras (37).

2.2 La primera pequeña proteína G (Ras)

2.2.1 Oncogenes virales

Los bases que dieron el origen de Ras, se remontan a 1964, cuando Jennifer Harvey demostraba que la preparación del virus de Leucemia murino, MSV (Murine Sarcoma Virus), sacado de una rata leucémica, era capaz de inducir sarcomas en ratones recién nacidos (74). En 1967 es obtenido el sarcoma de Kirstein, por el pasaje del virus de leucemia murino en ratas Wister-Furth (97). La existencia de genes que inducían estos sarcomas, no habían sido identificados, y se los denominaba Ha-MSV (para el sarcoma de Harvey) y Ki-MSV (para el sarcoma de Kirstein), siendo MSV, murine sarcoma virus.

En la década del 70', todos los oncogenes retrovirales eran denominados genéricamente como *v-src* (viral sarcome). Es decir, los retrovirus conocidos contenían distintos oncogenes virales, que codificaban para diferentes proteínas, pero se los denominaba a todos como *v-src*.

En el año 1978, R.L. Erikson encuentra una proteína de 60Kd al aislar ARN viral del virus de sarcoma de ave (ASV) (158), y posteriormente traducida en presencia de Metionina ³⁵S con un sistema de traducción *in vitro*. Esta proteína llamada Src, fue la primera proteína obtenida a partir de un oncogen viral.

En 1979 se identifica una fosfo-proteína de 21Kd a partir de células transformadas con los virus de Sarcoma de Harvey y Kirstein (192), traduciendo *in vitro* el ARN viral. Mas tarde, este mismo grupo demostró que esta proteína p21, era el producto del oncogen ras (193). Al ser esta proteína claramente diferente a Src hallada en el ASV, se la debía denominar con un acronismo de tres letras: se la llamó Ras (Rat Sarcoma), denominándose H-Ras y K-Ras.

p21 tenía la propiedad de ser termo-sensible. Se encontró que el pasaje de esta proteína de 34°C a 39°C lograba desestabilizarla. A fines de ese año, encuentran que p21 proveniente de células NIH infectadas con los virus de sarcoma de Kirstein y Harvey, podía ser estabilizada al agregar a la incubación GDP o GTP antes de pasar de la temperatura permisiva a la sensible. Esto fue la primera demostración de la unión de nucleótidos de guanina a Ras (186).

2.2.2 Oncogenes humanos

La existencia de oncogenes fue demostrado por primera vez en 1979, cuando el grupo de Robert Weinberg, describe la transformación de fibroblastos de ratón NIH 3T3 con ADN genómico de células de ratón transformadas mediante métodos de mutagénesis química (190). El mismo grupo en 1981 demuestra que regiones humanas repetitivas Alu estaban presentes en células NIH 3T3 (la cual carece de regiones Alu) transformadas con ADN aislado de líneas tumorales humanas (189). En 1982 el grupo de Robert Weinberg, Michel Wigler y Mariano Barbacid, reportan el clonado de un gen transformante de las líneas de carcinoma de vejiga T24 y EJ (68, 191), sin dejar dudas de la existencia de oncogenes humanos.

2.2.3 Relación entre oncogenes humanos y virales

Por un lado se conocía la existencia de virus inductores de tumores y por otro lado se había confirmado la existencia de oncogenes humanos, quedando por demostrar si había relación entre ambos. Channing Der, un post-doc en el laboratorio de Geoffrey Cooper, aisló ADN de carcinoma de vejiga y carcinoma de pulmón humano, utilizándolo para transformar células NIH 3T3. Al sacar ADN de estas células transformadas, comprobaron que había inserciones de K-ras y H-ras, donde se sobre-expresaban 2-4 veces mas que en las NIH sin transformar. Esta fue la primera evidencia de que oncogenes humanos y virales estaban relacionados (48). Finalmente, se descubrió que el homólogo humano de v-ras en ratones leucémicos BALB/c, era el mismo v-ras que se encontraba en virus.

En 1983, se descubre un tercer miembro de la familia Ras, designado N-ras, ya que fue hallado en una línea de neuroblastoma (194).

2.2.4 Mecanismo de activación

El clonado de gen normal H-ras, y su alelo oncogénico, mostraba que la única diferencia era una mutación puntual, que cambiaba una glicina en la posición 12, por una valina (161, 207, 209) .

En el año 1983, se demuestra que individuos normales, poseen los dos alelos de Ras normales, pero en un paciente con tumor de vejiga, se encuentran dos alelos: uno normal, y el otro que poseía la mutación G12V (144). En tejido de vejiga normal, ambos alelos se encontraban de forma WT. Aparentemente, esta mutación era dominante por sobre el alelo WT, dando a este tejido una ganancia de función por sobre el tejido que contiene el gen normal.

En el año 1984, tres grupos reportan que las proteínas Ras eran GTPasas, y que esta actividad enzimática estaba notablemente reducida en la proteína codificada por el alelo transformante (66, 129, 206). Estos hallazgos, en conjunto con la observación de la homología estructural entre Ras y la subunidad α de las proteínas G (81), daba una idea de que las proteínas Ras podrían estar cumpliendo un rol de transducción de señales a través de la membrana plasmática.

La primera evidencia concreta del rol de la proteína Ras como un transductor de señales, aparece en el año 1984, donde Tohrú Kamata y James Feramisco demuestran que el factor de crecimiento epidérmico (EGF), estimula la unión de nucleótidos de guanina a Ras (88). En posteriores años, esta hipótesis fue confirmada, cuando Dennis Stacey demuestra que la microinyección de anticuerpos monoclonales anti Ras, bloqueaba la síntesis de ADN inducida por suero (141). En otro trabajo del mismo grupo, microinyectando anticuerpos contra Ras, muestran que este oncogen es necesario para la transformación inducida por oncogenes derivados de receptores de factores de crecimiento y tirosinas quinasas asociadas a membrana plasmática (Ej.: Src) (197).

Algo que no quedaba claro, era como una mutación puntual, como era el caso de la mutación de glicina por valina en la posición 12 de Ras, lograba mostrar un fenotipo transformante. Ensayo *in-vitro*, mostraban que la actividad GTPasa (hidrólisis de GTP) de la proteína WT era solo 3-4 veces mayor que la mutante G12V. Para poder estudiar realmente las propiedades bioquímicas de Ras WT y la mutante G12V, en el año 1987 el grupo de Frank Mc Cormick, emplea oocitos de *Xenopus*. El ensayo utilizado, consistía en microinyectar Ras WT o G12V, y medir la maduración del oocito, observándose un gran porcentaje de oocitos maduros con la mutante, en comparación con la proteína WT. *In vivo*, la proporción de Ras unido a GTP era mucho mayor en la mutante que no hidrolizaba GTP, pero *in vitro* la diferencia era mucho mas pequeña. Si el experimento se realizaba *in vitro*, pero en presencia de lisado de oocito, los resultados eran como los de *in vivo*. Si el lisado era pre-tratado con tripsina o calentado

a 50°C, se perdía este efecto, evidenciándose que era un factor proteico el que promovía la actividad GTPasa sobre Ras. A este factor lo llaman GAP (GTPase activating protein), y dado que la mutante G12V es insensible a proteínas GAPs, explicaría su capacidad transformante (*in vivo*, Ras WT tiene 300 veces mayor actividad GTPasa que Ras G12V) (216). El clonado de dos proteínas GAPs fue hecho por el mismo grupo en 1988, a partir de placenta humana (217). Las proteínas GAPs eran efectoras de Ras activo (unido a GTP), pero faltaba encontrar moléculas reguladoras río arriba de Ras. Aunque estas proteínas se unían a Ras para inhibir la señalización, eran llamadas efectoras por unirse a Ras solo cuando esta tenía cargado GTP, y por ser la unión en el "loop" efector de Ras (residuos 32-40).

Las primeras evidencias de proteínas reguladoras de Ras fueron descubiertas en 1987, en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En estas levaduras, a diferencia de mamíferos, Ras activa la adenilato ciclasa, incrementando los niveles de AMPc.

Una cepa mutante, llamada *cdc25*, tenía tres características muy particulares:

- a) Bajos niveles intracelulares de AMPc.
- b) Baja actividad adenilato ciclasa
- c) No crecían a 35°C por presentar a esta temperatura arresto celular en la fase G1 del ciclo celular

Dado que Ras controlaba la actividad de la enzima adenilato ciclasa, y los niveles de AMPc y que levaduras y células mamíferas al carecer de Ras, se arrestan en G1 (141, 213), daba una pauta de que esta cepa poseía una deficiencia en la vía de activación de Ras.

Al realizar un "screening" de bibliotecas de ADN de levaduras, que complementaran esta cepa, se pudo aislar el gen que codifica a CDC25. Esta proteína resultó ser un regulador de Ras. El fenotipo sensible a temperatura era suprimido con una mutante activa de Ras (RasV19), al igual que los niveles de AMPc.

En el año 1990 Alan Wolfman y Ian Macara, encontraron que en el citosol de cerebros de ratones, existía una actividad que aumentaba el intercambio de nucleótido sobre Ras (229). Al mes siguiente el grupo de Robert Weinberg, también publicaba el descubrimiento de un factor intercambiador de Ras (53). Estos intercambiadores, aceleraban la disociación de Ras-GDP, así un nucleótido de GTP, que se encuentra por

exceso en el citoplasma, podía unirse a Ras y de esta forma activarla. Recién en el año 1992 fueron aislados RasGEFs de mamíferos (mSos1, mSos2 y RasGRF).

El nombre Sos deriva de estudios en *Drosophila*: La neurona R7 en la retina no se desarrolla al producirse mutaciones en el gen *sevenless*. Este gen, codifica para un receptor tipo tirosina quinasa. Otros dos genes, *Son of sevenless* (*Sos*) y *Dras1*, participan también en el camino de transducción de señales desde la proteína *Sevenless* hasta el desarrollo de la neurona R7.

Sos funciona río abajo de *Sevenless* y del receptor EGF de *Drosophila*, y es el homólogo a CDC25 de *Saccharomyces cerevisiae*. En base a esto, Sos sería un activador de Ras en *Drosophila* (172).

¿Cual era el mecanismo de activación entre receptores de tipo tirosina quinasa y Ras? Estudios genéticos en *C. elegans*, revelaron que *sem-5*, era necesario para la inducción de la vulva, al igual que *let-60* (Ras) y *let-23* (Receptor EGF), dando un indicio que estos tres genes participaban de la misma vía de señalización (31). En mamíferos, la misma proteína fue descubierta y designada como GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2) (118) o ASH (abundant src homology) (127). Esta proteína, contiene dos dominios SH3, involucrados en unión a proteínas con regiones ricas en prolinas, y un dominio SH2, involucrado en la unión a fosfo-tirosinas.

GRB2, al unirse al receptor de EGF activado, era el nexo que faltaba para explicar la activación de Ras por receptores tipo tirosina quinasa, ya que adaptaba el receptor con el factor intercambiador Sos.

Una vez comprendida la regulación río arriba de Ras, quedaba por comprender los efectores de este oncogen. Por definición, la interacción de Ras con un efector debía darse solo con Ras unido a GTP, y no a GDP.

Las proteínas serinas/treoninas quinasas, c-Raf-1, MEK y ERK1/2, aumentaban su actividad al ser activada Ras (238). A partir de estas observaciones, surgió el descubrimiento de que c-Raf-1, era una proteína efectora de Ras (238) (140).

Estos descubrimientos, junto con trabajos que mostraban que el oncogen Raf-1 señalizaba a la vía de MAPKs, evidenciaba por primera vez como señales mitogénicas, generadas fuera de la célula, alcanzaban el núcleo y como este proceso podía ser aberrante en células tumorales.

Otras moléculas efectoras fueron descubriéndose posteriormente, como la quinasa PI3K (171) y el factor intercambiador de Ral, RalGDS (79, 95, 198).

2.2.5 Estructura de Ras

Las primeras estructuras cristalográficas de Ras surgieron a fines de la década del 80', y principios del 90'. La posibilidad de obtener cristales de Ras unida a GDP o análogos no hidrolizables de GTP, permitió entender las diferencias estructurales del estado GDP inactivo y del estado GTP activo (45, 105, 135, 151, 182).

Dado que la estructura de Ras no difiere mucho con respecto a la de otras pequeñas proteínas G (Ej.: Rap o familia Rho), la idea general es utilizar las estructuras generadas de Ras para explicar diferentes comportamientos de diversas mutantes conocidas, algunas de las cuales serán utilizadas en la presente tesis doctoral.

Ras es una proteína constituida por dominios α -hélices y láminas- β , unidos por conectores llamados "loops" (figura 5). El loop1 (L1) contiene una glicina en la posición 12 muy conservada, y se encuentra formando una especie de anillo sobre el fosfato β del GDP/GTP. Este "loop" tiene una gran cantidad de glicinas, el aminoácido mas pequeño, y esto generaría el espacio necesario para que puedan entrar los grupos fosfatos del nucleótido de guanina.

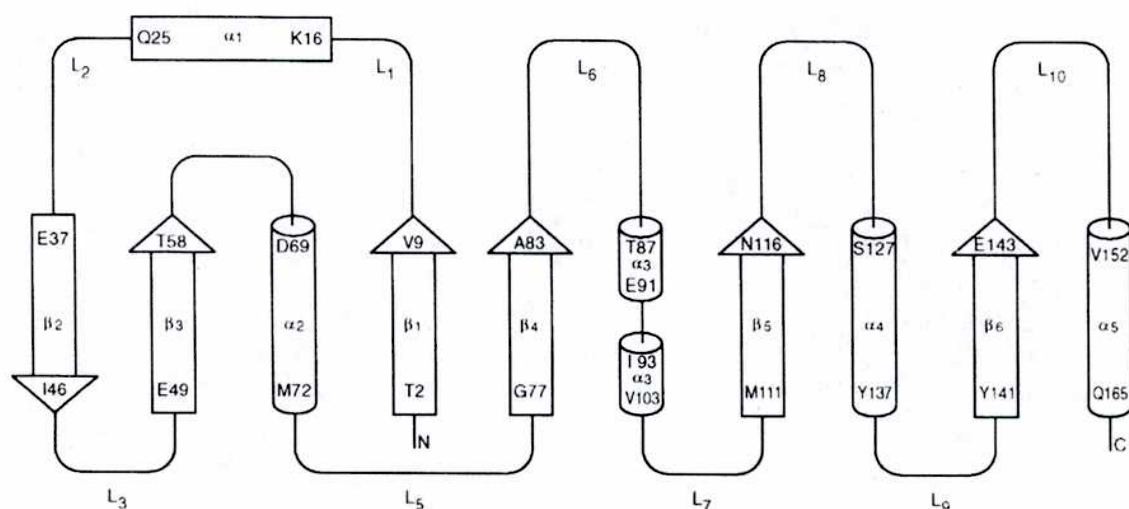


Figura 5. Estructura secundaria de Ras. Topología del dominio G, utilizando los números de los residuos correspondientes a Ras•GppNHp. Las láminas β y sus direcciones están indicadas por las flechas, α hélices por los cilindros y los loops son las secuencias conectoras.

La sustitución de la glicina 12 por una valina, introduce una cadena alifática, que no modifica demasiado la estructura de Ras, pero produce un corrimiento del fosfato γ del GTP. Por este corrimiento, ahora se encuentra inaccesible para que la glutamina 61 catalice la hidrólisis de GTP, con la ayuda de una molécula de agua. De esta manera, la mutación oncogénica G12V, no permite hidrolizar GTP, y la pequeña proteína G permanece en estado GTP activo, a pesar de que la unión de proteínas GAPs es de similar afinidad a la de la proteína WT.

Ras Q61L presenta la mutación propiamente dicha en el aminoácido catalítico. Activando una molécula de agua, es capaz de hidrolizar el fosfato γ . Esta mutación, al igual que G12V, mantiene a la proteína G en estado GTP activo.

En la figura 6, se esquematizan los aminoácidos involucrados en la unión del nucleótido de guanina (en el esquema se encuentra el análogo no hidrolizable de GTP GppNHp). Es de destacar la importancia del ion Mg^{++} , uniéndose a oxígenos de los fosfatos β y γ del nucleótido, y de esta manera neutralizando la alta densidad de carga negativa generada por estos. El ion Mg^{++} es coordinado principalmente por los grupos OH de la treonina 35 y serina 17.

El aminoácido serina posee un grupo hidroxilo con un par de electrones libres. Estos electrones ayudan a neutralizar el ion Mg^{++} (figura 6). La mutación de la serina 17 por otro aminoácido que no posea este hidroxilo (Ej.: mutación Ras S17N), no es capaz de coordinar el Mg^{++} , y este no es estable en la proteína. A la proteína G sin Mg^{++} , no le es posible mantener los nucleótidos GDP o GTP, ya que el Mg^{++} neutraliza la carga negativa de los grupos fosfato (figura 6). La proteína G libre de nucleótido, tiene una alta afinidad por factores intercambiadores, de esta manera impide que estos intercambien GDP/GTP. Esto explica porque al mutar la serina 17, la pequeña proteína G actúa como una forma dominante negativa, secuestrando reguladores río arriba, impidiendo la señalización río abajo.

Es importante destacar la lisina en la posición 16 (K16), invariante en todas las proteínas que unen nucleótidos. Este aminoácido, con el grupo ϵ -NH₂, neutraliza otros dos oxígenos de los fosfatos β y γ . La mutación de esta lisina presente en todas las proteínas que unen nucleótidos, disminuye la afinidad de la proteína por el nucleótido.

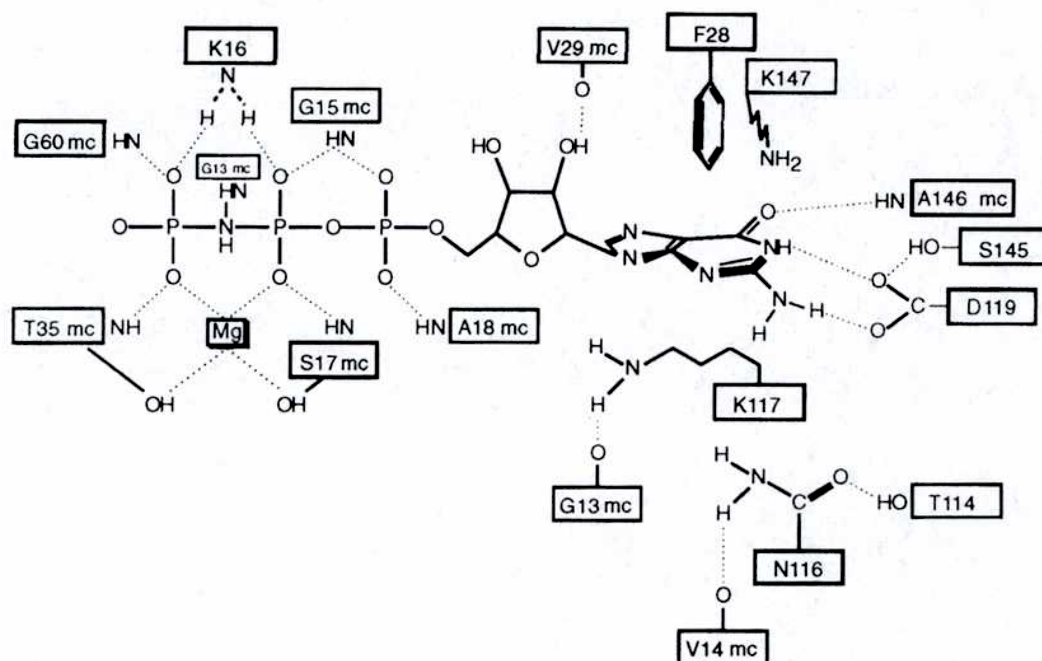


Figura 6. Secuencias conservadas de Ras. En este esquema se indican los residuos que coordinan el nucleótido de GTP, utilizando Ras•GppNHp. Se destacan los aminoácidos que estabilizan los grupos fosfatos: Ser17 y Thr35 utilizan su grupo OH para coordinar el Mg^{++} y la Lys16 que coordina los oxígenos β y γ del fosfato a través de su amino lateral(ϵ -NH₂).

3. La familia Rho de pequeñas proteínas G

3.1 Características generales

Con la importancia creciente que estaba tomando la proteína G Ras, comenzó la búsqueda de nuevas pequeñas proteínas G. Se utilizaron métodos dentro de la biología molecular, al igual que métodos dentro de la genética de levaduras:

- Generación de familias de oligonucleótidos degenerados dentro de áreas conservadas
- Hibridación en condiciones poco rigurosas
- Genética de levaduras

Mientras que la proteína Rho fue inicialmente descubierta en 1985 en *Aplysia*, como un ADN copia (cDNA) codificante para una GTPasa relacionada a Ras (121), el gen que codificaba para Cdc42 fue encontrado en levaduras, por ser importante en el desarrollo de la polaridad celular (199). Su homólogo en humanos, G25K, fue clonado utilizando oligonucleótidos degenerados de secuencias aminoacídicas conocidas de esta proteína (143). A partir de otra búsqueda con oligonucleótidos degenerados, diseñados a partir de una secuencia aminoacídica conservada de G25K, se encontraron dos proteínas, llamadas Rac1 y Rac2, por ser homólogas a Ras y por ser sustrato de la toxina botulínica C3 (ras-related C3 botulinum toxin substrate) (50).

Actualmente, la familia Rho de proteínas G consta principalmente de Rho (A,B,C), Rac (1,2,3) y Cdc42 o G25K. La principal diferencia de esta familia con Ras es que tienen una inserción de 13 aminoácidos (residuos 123-135 de Rac), llamada "insert region".

Al igual que Ras, la familia Rho es prenilada para su posterior ubicación en membrana (el lípido es geranyl geraniol). Entre otras modificaciones post-traduccionales, la proteína RhoA, es junto con las proteínas de la familia Rap, las únicas pequeñas proteínas G que se fosforilan por PKA (110).

Las GTPasas de la familia Rho son modificadas por un gran número de toxinas y exoenzimas. La más estudiada ha sido la transferasa C3, una exoenzima producida por *Clostridium botulinum* que ADP-ribosila Rho en el residuo Asparagina 41, produciendo

su inactivación (120). Por otro lado las toxinas A y B de *Clostridium difficile*, glucosilan e inactivan Rho, Rac y Cdc42 (87). Otras toxinas, como por ejemplo, CNF-1 (cytotoxic necrotizing factor-1) de *E. Coli*, deamidán el Gln63 de Rho (Gln 61 de Rac/Cdc42), transformándolo en Glu. La modificación de este residuo catalítico, produce una versión constitutivamente activa de estas pequeñas proteínas G (54, 61).

3.2 Intercambio de nucleótidos y factores intercambiadores

La tasa de intercambio de nucleótido intrínseca de las proteínas Rho es muy lenta en concentraciones fisiológicas de Mg^{++} (187). Mutaciones que alteran la estabilidad del nucleótido (como Phe28 por Leu en Cdc42, que coordina la base nitrogenada de guanina), activan la proteína al entrar GTP, que se encuentra por exceso en la célula (115). Este intercambio de nucleótidos se da con la ayuda de factores intercambiadores de GDP/GTP o GEFs.

En general los GEFs de la familia Rho poseen un dominio intercambiador característico, llamado DH (Dbl homology) y un dominio PH (pleckstrin homology) adyacente. Fueron referidos como la familia "Dbl", luego de la identificación del primer intercambiador hallado (justamente llamado Dbl). Este poseía la capacidad de transformar células NIH 3T3 (58). El dominio DH es esencial para la transformación celular, y es el mínimo dominio capaz de intercambiar nucleótido sobre Rho, Rac y Cdc42 (72).

El dominio PH sería requerido para la correcta localización y orientación del dominio DH en la membrana plasmática (26, 240, 241), donde se encontrarían las proteínas G blanco.

La mayoría de los GEFs pertenecientes a la familia Dbl, son capaces de intercambiar nucleótido sobre todas las GTPasas de la familia Rho *in vitro*, aunque parecería que *in vivo* habría preferencias de GEFs sobre diferentes proteínas G.

Dicha preferencia es evidenciada al sobre-expresar diferentes GEFs, que resultan en una distinta morfología celular. Dado que rearreglos de la actina son mediados por la activación de diferentes proteínas G de la familia Rho, es posible evidenciar cual proteína G en particular es activada por un determinado GEF (ver mas adelante en "Rearreglo del citoesqueleto").

La presencia de una mayor cantidad de GEFs que de GTPasas de la familia Rho, presenta una aparente contradicción, aunque esto tiene una explicación al encontrar que GEFs de la familia Dbl muestran distintos patrones de expresión: Por ejemplo Vav, se expresa solo en células hematopoyéticas. Tiam-1 se expresa en gran cantidad en cerebro, aunque se encuentra en todos los tejidos (70, 220). También es posible que diferentes GEFs actúen ante diferentes estímulos extracelulares. Otra posibilidad es que cada GEF pueda ensamblar diferentes GTPasas de la familia Rho, con distintas moléculas efectoras. Esta última posibilidad, podría explicar por qué diferentes GEFs activan PAK1, pero no JNK, aunque formas constitutivamente activas de Rac y Cdc42 pueden activar ambas quinasa (243).

Versiones oncogénicas de la familia Dbl de GEFs no poseen la región amino terminal (25), sugiriendo que esta región regula negativamente su función y que un cambio conformacional es requerido para su actividad.

Recientemente, una nueva familia de GEFs para la familia Rho ha sido descubierta, cuya característica es que carece del dominio DH-PH. El miembro fundador de esta familia fue DOCK180, y aproximadamente diez miembros han sido descubiertos (38, 131). DOCK180, necesita una proteína cofactor (ELMO) para intercambiar nucleótidos sobre Rac (20), pero otros miembros de esta familia parecerían no necesitar un cofactor (38).

Otro ejemplo de regulación de GEFs a GTPasas de la familia Rho, es la localización diferencial: Tiam-1 migra desde el citoplasma a la membrana plasmática en respuesta a estimulación con factores de crecimiento, requeridos para la actividad de Rac (134).

Con el objeto de analizar la función específica de cada GTPasa, formas dominantes negativas de proteínas Rho (S17N en Rac y Cdc42 y S19N en Rho) han sido muy utilizadas. Estas mutantes promueven la inhibición de sus respectivas GTPasas endógenas, compitiendo por la unión de GEFs (60). Asimismo, mutantes por delección de proteínas efectoras como PAK, son capaces de secuestrar formas activas de Rac y Cdc42, pero no de Rho (100), brindando una herramienta para evidenciar la activación diferencial de distintas proteínas G.

3.3 Mecanismos inhibitorios: proteínas GAPs y GDIs

Al igual que las proteínas G de la familia Ras, la familia Rho presenta una baja actividad de hidrólisis de GTP, siendo las proteínas GAPs las que incrementan la tasa de hidrólisis de GTP.

Proteínas GAP de la familia Rho comparten un dominio de 140 aminoácidos llamado "RhoGAP domain". Este dominio es el mínimo necesario que presenta actividad GAP.

Las proteínas Rho preniladas, son mantenidas en un estado GDP inactivo en el citoplasma al unirse proteínas GDIs (guanine nucleotide dissociation inhibitors), hasta que un estímulo produce la disociación del complejo y la unión de Rho a la membrana (208). *In vitro*, la unión de proteínas GDI, previene el intercambio de nucleótido, impidiendo su activación. También la unión de GDIs inhibe la actividad GTP intrínseca, al igual que la resultante de la estimulación por proteínas GAPs, impidiendo su desactivación.

La sobre-expresión de proteínas GDI, generalmente inhibe la señalización por proteínas Rho, incluyendo la reorganización de la actina y la activación de JNK (146, 208), consistentemente con la idea de ser proteínas regulatorias negativas de la señalización de proteínas Rho. No se conoce un análogo de GDI para otras pequeñas proteínas G.

Además de la prenilación de Rho para ser reconocida por proteínas GDI, otras regiones serían necesarias. La "insert region" de Cdc42 no es necesaria para la unión de GDIs, pero es necesaria para la inhibición de la disociación del GDP y para la hidrólisis de GTP (231), sugiriendo que esta región, no presente en proteínas de la familia Ras, podría interaccionar con RhoGDI.

Además de mantener inactivas en el citoplasma a las proteínas Rho, GDIs podrían estar regulando la translocación de las proteínas a la membrana plasmática

3.4 Señalización desde factores de crecimiento a proteínas Rho

Los trabajos publicados en la revista *Cell* por Anne Ridley y Alan Hall en el año 1992 (166, 167), describen por primera vez la señalización desde la superficie celular hasta las proteínas Rho. LPA fue establecido como un activador de Rho, e

independientemente bombesina demostró ser un activador de Rho y Rac. Factores de crecimiento, como PDGF, EGF e insulina estimulan Rac, llevando subsecuentemente a la activación de Rho, y agonistas de PKC, como PMA, fueron descritos como capaces de activar a Rac, sin activar Rho. LPA activa un receptor acoplado a proteína G (GPCR), que disocia las subunidades $G_{\alpha12/13}$. Estas subunidades se unen al dominio RGS de GEFs para Rho, llevándolos a la membrana y activándolos (73, 102). GEFs para Rho que contienen un dominio RGS, como p115RhoGEF, PDZ-RhoGEF y LARG, son capaces de ser activados por proteínas G heterotriméricas (64). PMA estimula PKC y PKC activado es capaz de aumentar el intercambio sobre Rac mediado por Tiam-1 (133). PMA no es capaz de activar Rho, de hecho, PKC es capaz de activar p190RhoGAP (una proteína GAP para Rho) a través de la actividad de c-Src (19). Esto lleva a pensar que distintos estímulos activan diferencialmente a diferentes miembros de la familia Rho.

Diversos GEFs para Rac son activados por PIP2 o PIP3 (133, 183). Por ejemplo, la unión de PIP3 al dominio PH de Tiam-1, es capaz de reclutarlo a la membrana y activarlo. Otro mecanismo de activación de Rac, involucra un complejo que contiene el GEF para Ras Sos1, junto con Eps8 y Abi1/E3B1 (145, 185). Sos1, unido a Eps8 y Abi1/E3B1, tiene la capacidad de intercambiar nucleótido sobre Rac. Este complejo se localiza en la membrana al unirse a la subunidad regulatoria de PI3K p85 (83).

La activación de Tiam independiente de PI3K también ha sido descrita. Tiam posee un sitio de unión a Ras-GTP, al igual que Raf. Ras-GTP incrementa la actividad GEF para Rac de Tiam al unirse a dicho dominio (109). La estimulación de PDGF en fibroblastos Swiss 3T3, provoca una activación de Tiam dependiente de fosfolipasa C y de la proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina. Esta última fosforila a Tiam, localizándola en membranas y activándola (133).

3.5 Señalización desde receptores de adhesión a proteínas Rho

Diversas clases de moléculas de adhesión se han descrito capaces de afectar la actividad de Rho, Rac o Cdc42, incluyendo integrinas (46), caderinas (18) y miembros de la superfamilia de Ig (212).

Al formar uniones célula-célula las caderinas, son capaces de activar a Rac y Cdc42. La activación de estas proteínas G, ayudaría a las funciones de las caderinas,

mostrando un "feed-back" positivo. Por otro lado, la interacción entre caderinas, sería inhibitorio de la función de Rho, al incrementar la actividad de p190RhoGAP (148).

3.6 Proteínas de la familia Rho re-arreglan el citoesqueleto

Como se mencionó con anterioridad, la función mas estudiada de la familia Rho de GTPasas ha sido la modificación del citoesqueleto. Las estructuras del citoesqueleto predominantes en células en cultivo son las fibras de stress o "stress fibers" y unas estructuras protruyentes llamadas "membrane ruffling".

Dos trabajos de Alan Hall en el año 1992, del mismo volumen de la revista *Cell* (166, 167), mostraban que Rho era capaz de inducir la formación de fibras de stress y contactos focales y que Rac era capaz de regular la formación de "membrane ruffling" y lamelopodia, otro tipo de estructura del citoesqueleto, en respuesta a la estimulación con factores de crecimiento. Además, en otro trabajo de Alan Hall del año 1995, se demuestra que Rho, Rac y Cdc42 pueden activarse de manera jerárquica para la remodelación del citoesqueleto (147).

Las fibras de stress, consisten en paquetes contráctiles de filamentos de actina asociados a filamentos de miosina y otras proteínas. La contractilidad de estas fibras está dado por la polimerización de las fibras de actina, o por la actividad de la miosina, que es capaz de unir las fibras de actina.

La presencia de fibras de stress es modulada por el tipo de proteínas presentes en la matriz extracelular y en el medio en el que las células son cultivadas. Las fibras de stress se encuentran conectadas a la membrana plasmática a través de complejos multi-proteicos, conocidos como contactos focales, donde las integrinas trans-membrana se asocian directa o indirectamente a un gran número de proteínas estructurales y de señalización (21).

Lamelopodia y "membrane ruffling" están muy relacionados y usualmente se pueden usar ambos términos para la misma estructura. Lamelopodia son estructuras finas protruyentes de la célula, generadas en la parte que lidera la movilidad de células móviles. Frecuentemente, lamelopodia se convierte en "ruffles" , cuando estas protrusiones de membrana no logran adherirse y son dirigidas a la superficie dorsal.

La formación de filopodios por Cdc42, otro tipo de estructura del citoesqueleto, importante para células con movilidad, fue vista por primera vez en el año 1995 (103, 147).

La importancia de estos hallazgos reside en que una célula en cultivo al dividirse, debe despegarse del sustrato (en este caso la placa de cultivo), siendo la estructura predominante la de "membrane ruffling". Las células ya divididas, ahora deben adherirse al sustrato para su crecimiento. Esto se consigue al aumentar el número de contactos focales y estructuras como fibras de stress.

Entender como factores de crecimiento afectan la estructura del citoesqueleto y cuales son las vías de señalización involucradas, resulta importante para el entendimiento de los mecanismos de división celular.

3.7 Efectores río abajo: Rho, fibras de stress y tensión

El ensamblaje de fibras de stress mediado por Rho, es el resultado de la contractilidad de fibras de miosina. Rho activa es capaz de fosforilar la cadena liviana de miosina (MLC) y de esta manera aumenta su actividad contráctil (30). Por otro lado, fue demostrado que un efector de Rho, Rho-kinase (ROCK o ROK), también eleva los niveles de MLC fosforilado al inhibir la fosfatasa de MLC (96). Además, ROK es capaz de tomar el lugar de la quinasa de MLC (MLCK), fosforilando directamente la subunidad regulatoria de MLC, incrementando la actividad contráctil de miosina (5). Todos estos datos indicarían que Rho promueve la contractilidad de la miosina y la tensión resultante converge en la formación de fibras de stress y adhesiones focales.

Otra proteína efectora de Rho es mDia (mammalian homolog of diaphanous) (224). La sobre-expresión de esta proteína en su forma activa induce el ensamblado de finas fibras de stress, menos empaquetadas que las formadas por la expresión de Rho activo o ROK. La densidad y apariencia de las fibras de stress pueden modificarse experimentalmente expresando diferentes niveles de ROK y mDia (224). A diferencia de ROK que actuaría sobre las cadenas livianas de la miosina, mDia actuaría en la polimerización de la actina (114).

3.8 Efectores río abajo: Rac y protrusiones de membrana

El mecanismo básico de formación de “membrane ruffles” por Rac es la polimerización de la actina. Rac activa es capaz de disociar la proteína WAVE de un complejo. WAVE disociada, es capaz de promover la polimerización de actina por Arp2/3 (56). Otro efector de Rac (también de Cdc42) es la proteína PAK (p21 activated kinase). La expresión de esta quinasa es capaz de formar lamelopodia (188) e inhibir la formación de fibras de stress y contactos focales (123).

La activación de Rac mediada por factores de crecimiento, antagoniza la formación de fibras de stress y contactos focales inducidos por Rho (178). Una explicación es que PAK, al ser activada por Rac, fosforila e inhibe la actividad quinasa de la cadena liviana de miosina (MLCK), inhibiendo la fosforilación de MLC (177).

4. Rap

Rap1 fue inicialmente descrita como una proteína que lograba revertir el fenotipo transformante de células NIH/3T3 transformadas con el oncogén K-Ras, de ahí que su primer nombre fue K-rev1 (por K-ras revertant) (98), pero también fue identificada en trabajos donde se buscaban proteínas homólogas a Ras (92, 155).

A pesar de que Rap1 muestra un 50% de homología con Ras, sus dominios efectores son indistinguibles (219), pudiéndose pensar en funciones similares o antagónicas de estas dos proteínas.

El hecho de poseer un dominio idéntico, y lograr revertir células transformadas por K-Ras, dio indicios que Rap podría ser un antimitogénico, funcionando como antagonista de Ras (237). Esta idea fue apoyada por el hecho de que la interacción de Rap1 con moduladores (75) y efectores (82) de Ras, no resultaba en su activación (218).

Surgió un simple modelo en el que se postulaba a Rap1 como antimitogénico por su habilidad de formar complejos no productivos con efectores de Ras. Varios ejemplos ilustran esta hipótesis:

- a) Una sobre-expresión de Rap1 en su forma constitutivamente activa (G12V) es capaz de inhibir la activación de ERK1/2 en células Rat-1 (32).
- b) En experimentos de transfecciones transientes, la activación del promotor de c-Fos por K-Ras, pero no por c-Raf-1, es bloqueada por Rap1 activa (176).
- c) En células Jurkat, la transcripción de IL-2 dependiente de Ras, es inhibida por la expresión de Rap1 activa (16).

Rap es activada en presencia de AMPc (adenosina mono fosfato cíclico) (3). Este segundo mensajero ha sido descrito como un inhibidor de la cascada de ERK1/2 en células como Rat-1 o NIH3T3, ya que agentes que suben los niveles intracelulares de AMPc, como FK (forskolina) e IBMX (metil isobutil xantina), son capaces de bloquear la fosforilación de ERK1/2 mediada por EGF (epidermal growth factor).

Los mecanismos de inhibición de la proliferación mediados por altos niveles de AMPc, involucran el bloqueo de ERK1/2, uno dependiente (32) y otro independiente de Rap (230). Dos evidencias indican la participación de la MAPKKK Raf-1:

- a) La formación de un complejo no productivo entre Rap y Raf-1 (32).
- b) La PKA (proteína quinasa A), al ser estimulada por AMPc, es capaz de fosforilar a Raf-1 en la Ser 43 y de esta forma pierde la afinidad por Ras *in vitro* (230).

El AMPc no ha sido reportado solamente como un antimitogénico: en células como WRT o CI-3 (células de Tiroides), la TSH, hormona que actúa elevando los niveles de AMPc, promueve la proliferación celular (165). Además en células corticotrófas, como AtT-20, CRH al subir los niveles de AMPc, también activa Rap y aumenta los niveles de ERK1/2 fosforilados (101).

Surge entonces, la idea de que Rap podría desempeñar un rol proliferativo en sistemas donde el AMPc es mitogénico. Tres evidencias avalan esta teoría: a) La microinyección de Rap1b en fibroblastos Swiss 3T3 (células donde el AMPc es mitogénico), promueve, en presencia de Insulina, una transición G1/S dependiente de Rap-GTP (236), b) En estas mismas células Rap1b, es mitogénica y oncogénica, pudiendo formar tumores en ratones *nude* (4) c) En células PC-12, el AMPc induce diferenciación celular, y este proceso es mediado por Rap1. Incluso se ve que el EGF induce una activación transiente de MAPKs (ERK1/2), mediada por Ras, promoviendo la proliferación celular, mientras que una activación sostenida de MAPKs mediada por Rap1, por estimulación con NGF, es capaz de provocar diferenciación celular (235).

Aun no están del todo claro, que características debería presentar un tipo celular para que Rap actúe como un mitogénico o como un anti-mitogénico, pero una clave podría ser la presencia de una MAPKKK análoga a Raf-1 llamada B-Raf. A diferencia de Raf-1, B-Raf puede ser activada por Rap, y esto lleva a la activación de MAPKs (201).

El AMPc no es la única molécula que estaría modulando la activación de Rap1, también el DAG y el Ca⁺⁺ son mediadores, por unión de estas moléculas a GEFs (CalDAG-GEF I y II) (62, 119, 244).

Además de segundos mensajeros, como AMPc, Ca⁺⁺ y DAG, Rap es capaz de ser activada por receptores de tipo tirosina quinasa. Un ejemplo de esto se vio en células HEK293, donde el HGF (hepatocyte growth factor/scatter factor), es capaz de activar a C3G, un GEF de Rap (175) o en células Swiss 3T3, donde PDGF activa a Rap (4).

Rap, junto con Rho, son las únicas pequeñas proteínas G fosforiladas por PKA. En el caso de Rap, la fosforilación se da en una serina adyacente al dominio CAAX (Ser 180 en Rap1A y Ser 179 en Rap1B) (3). Esta fosforilación podría afectar el procesamiento y/o localización de Rap1.

Estudios realizados en células Cos-7 muestran que la unión de Rap1a a Raf-1 es inhibitoria al unirse a la región rica en cisteínas de Raf-1 (CRR). Rap1a al ser fosforilada, pierde esta habilidad, no exhibiendo una inhibición sobre Raf-1 (80).

Recientes evidencias en células de tiroides Cl-3 al ser estimuladas con TSH, dan a la fosforilación en Rap, un rol fundamental en la respuesta mitogénica inducida por ésta hormona (165). Por otro lado, la inhibición de Akt por AMPc, involucra también la activación y fosforilación de Rap1 (117).

5. *Epac*

5.1 *Características generales*

EPAC (exchange factor directly activated by cyclic AMP) es un intercambiador de GDP/GTP exclusivo para proteínas Rap. Fue descubierta por dos grupos independientes en forma simultánea:

- a) El primero, lo hizo buscando en bases de datos secuencias que tuvieran homología a GEFs para Ras y Rap, además de secuencias de unión al AMPc (44), ya que se habían encontrado GEFs de Ras que podían unir directamente Ca^{++} y diacilglicerol (55).
- b) El segundo grupo, lo hizo buscando genes relacionados a transducción de señales en cerebro y enfocados en clones que tuviesen motivos proteicos conocidos de segundos mensajeros. Este grupo encuentra dos genes, que los llama cAMP-GEFI (o Epac1) y cAMP-GEFII (o Epac2) (91).

Epac1 es expresado en todos los órganos, pero es particularmente abundante en riñón y corazón (44), también es expresado en varias partes del cerebro del neonato. Epac2 es expresado principalmente en cerebro adulto (91).

Este novedoso GEF es una proteína de 881 aa, que contiene varios dominios característicos:

- a) El dominio GEF contiene una alta homología a C3G, un GEF específico para Rap y R-Ras (44 , 91), y es el encargado del intercambio de nucleótido propiamente dicho.
- b) El dominio REM (Ras exchange motif) fue hallado en todos los GEFs de la superfamilia Ras y le conferiría estabilidad a la proteína.
- c) El dominio DEP (Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin) que estaría involucrado en el anclaje a la membrana.
- d) El dominio CBD, el cual une AMPc, homólogo al encontrado en las

subunidades regulatorias de la PKA y el canal olfatorio (olf), regulado también por la unión de AMPc.

Un esquema de los dominios presentes en Epac1 y Epac2 es representado en la figura 7.

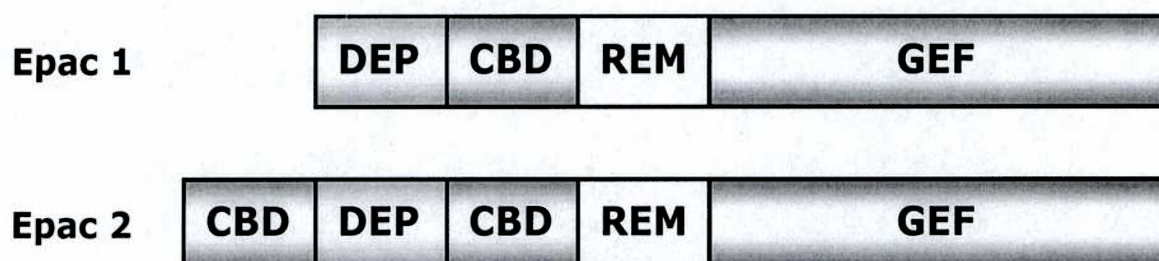


Figura 7. Factores intercambiadores Epac. Se destacan los dominios GEF (guanosine nucleotide exchange factor), REM (ras exchange motif), CBD (cyclic AMP binding domain) y DEP (Dishelved Egl-10 Pleckstrin). En Epac 2 se encuentra un segundo sitio de unión a AMP (CBD) de baja afinidad, en su extremo N-terminal.

La actividad intercambiadora de este GEF es regulada por el AMPc, siendo posible activarlo por análogos no hidrolizables de esta molécula o por FK, un conocido activador de la adenilato ciclasa.

Se puede obtener un GEF constitutivamente activo delecionando el dominio de unión del AMPc (Epac Δ cAMP o Δ Epac), lo cual deja expuesto el dominio intercambiador (44).

5.2 Caracterización de la activación de Epac por AMPc

Dado el importante descubrimiento de otra proteína diferente a PKA que une AMPc, y que diversos procesos biológicos en respuesta a AMPc podrían ser mediados por Epac, es importante caracterizar su sitio de unión del AMPc, principalmente para encontrar análogos de AMPc que permitan diferenciar distintas respuestas biológicas mediadas por este GEF o por PKA.

La familia de Epac (Epac1 y Epac2) es capaz de activar tanto a Rap1 como a Rap2. Epac2 tiene dos sitios de unión de AMPc, uno de baja afinidad (70 μ M Kd, sitio A)

situado en su extremo amino terminal y otro de alta afinidad ($1\mu\text{M}$ Kd, sitio B). A diferencia de la unión del AMPc en la PKA, no hay cooperatividad de estos sitios. Aparentemente, la unión del AMPc al sitio de alta afinidad es suficiente para intercambiar sobre Rap y este, al igual que el sitio único presente en Epac1, son inhibitorios en ausencia de AMPc (43).

El dominio de unión a AMPc aislado de Epac1 tiene una constante de equilibrio (Kd) de $4\mu\text{M}$, medido por competencia con un análogo fluorescente de AMPc (8-MABA-cAMP), y este equilibrio es muy dinámico. A pesar de que el AMPc activa la región catalítica de Epac, la presencia de esta región no modifica la unión del segundo mensajero, sugiriendo que no posee un rol inhibitorio en la unión de AMPc. Epac, al estar unido a Rap1b, baja su afinidad por AMPc cinco veces, sugiriendo que la unión al sustrato (Rap1b), estabiliza el nucleótido (104). En este mismo trabajo, utilizan nucleótidos fluorescentes desarrollados por los autores para medir unión del AMPc a Epac. Estos nucleótidos son incapaces de activar a Epac, de este resultado concluyen que la unión de AMPc y la activación de Epac son procesos desacoplados. De hecho, estos análogos podrían ser utilizados como moléculas inhibitorias (104).

El sitio de unión de AMP (CBD), se encuentra muy conservado en proteínas que unen este nucleótido cíclico. El glutamato (E), muy conservado, que en Epac1 se debería encontrar en la posición 405, no se encuentra presente ni Epac1 (Q), ni en el sitio B de Epac2 (K) (figura 8).

Epac1	F G Q L A L V N D A - - - - - P R A A T I I
Epac2-B	F G K L A L V N D A - - - - - P R A A S I V
PKAR1a-A	F G E L A L I Y G T - - - - - P R A A T V K
Olfatorio	F G E I S I L N I K G S K M G N - R R T A N I R
Marcapasos	F G E M V H L Y A K P G K S N A D V R A L T Y C
CAP	I G E L G L F E E G Q E R S - A W V R A K T A C

Figura 8. Alineación de los sitios de unión de AMPc de Epac, PKA, Canal olfatorio, canal marcapasos y la proteína bacteriana CAP. El sitio de unión de AMPc tiene un residuo ácido glutámico (E) muy conservado, que no está presente en proteínas Epac. Esta observación permitió diseñar el análogo de AMPc específico para proteínas Epac, 8CPT-2Me-cAMP

A partir de esta observación, se desarrolló un análogo de AMPc con una sustitución en la posición 8 de la base de adenina, 8-(4-cloro-feniltio)-2'-O-metiladenosin-3',5' monofosfato cíclico (8CPT-2-Me-cAMP). Este análogo, activa a Epac y no a PKA *in vivo* e *in vitro*. La activación media de Rap por Epac, utilizando este análogo fue de 2.2μM, en comparación con 30μM utilizando AMPc. Este análogo permitió por primera vez descubrir cuales efectos del AMPc son debidos a Epac y cuales a PKA (57).

En enero del año 2003, el grupo de Alfred Wittinghofer publica la estructura cristalográfica de la región regulatoria de Epac2, con una resolución de 2.5Å. Esta región consta de los dos sitios de unión al AMPc y del dominio de unión a membrana DEP. A diferencia de la estructura cristalográfica de la subunidad regulatoria de PKA (202), esta es la primera vez que se cristaliza el sitio de unión al AMPc en ausencia de nucleótido, permitiendo la comparación de esa estructura con y sin nucleótido. Dicha comparación permitió dilucidar cual es el cambio conformacional inducido por la unión de AMPc (figura 9) (162). Las mayores diferencias se presentan en el sitio de unión del nucleótido (PBC, phosphate ribose binding cAMP). Esta región, forma un especie de bolsillo donde se inserta el AMPc (162).

Al unirse el AMPc, una región bisagra, llamada "Hinge", permite que otra región llamada "Lid" (tapa), que es una α-hélice, proteja al nucleótido dentro del PBC. Es decir, que la unión del AMPc induce que la región "Lid" proteja al nucleótido del solvente en el PBC. Este cambio conformacional reorienta la Leu408 del PBC y la Phe435 de la región bisagra, invariantes en todas las proteínas que unen nucleótidos cíclicos (162) (figura 9).

El cambio conformacional producto de la unión del AMPc y la posterior protección de este nucleótido, empuja la región c-terminal catalítica, exponiéndola y permitiendo su interacción con proteínas blanco, como Rap (162) (figura 9).

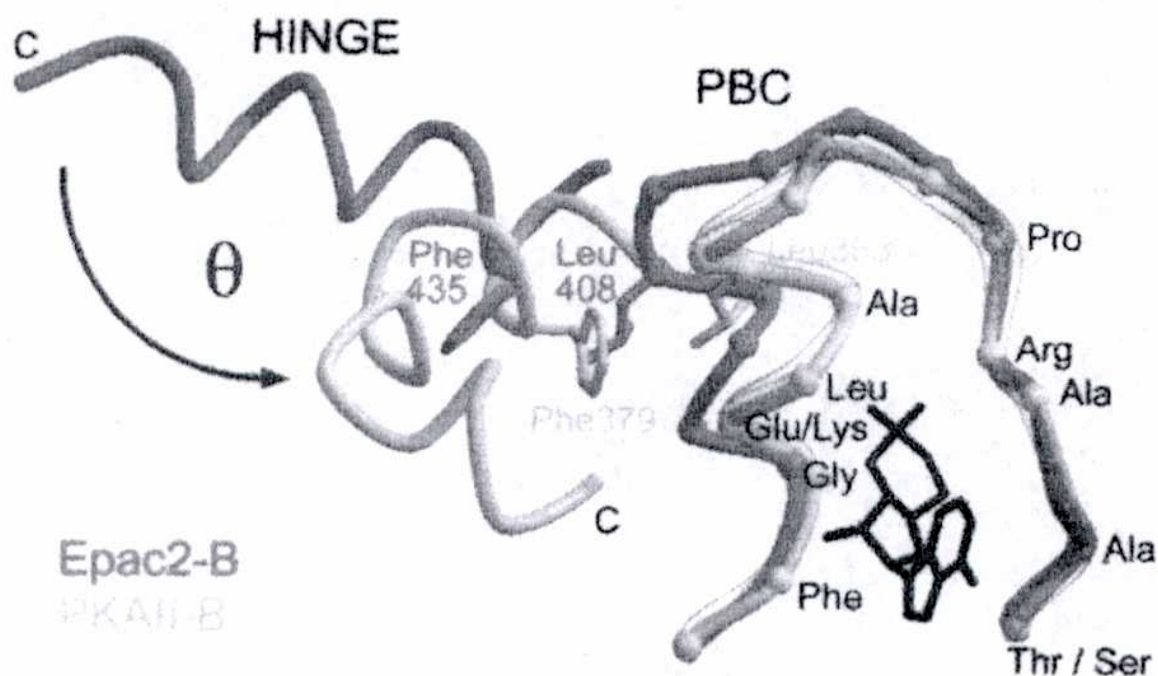


Figura 9. Comparación de los sitios de unión al AMPc de la subunidad reguladora de PKAII-B (en presencia de AMPc) y de Epac2 (en ausencia de AMPc). La comparación de ambas estructuras permite comprender el cambio conformacional producido por la unión del AMPc: 1) La región "Hinge" de Epac se acerca al PBC. 2) La región "Lid", no observada en la figura, y que se encuentra hacia la parte c-terminal de la región "Hinge" protege al nucleótido que se encuentra dentro de la región PBC 3) El dominio GEF, que se encuentra en el extremo c-terminal de Epac, queda ahora expuesto al solvente, capaz de intercambiar nucleótidos sobre proteínas Rap.

En un trabajo publicado por el mismo grupo que cristalizó la región regulatoria de Epac2, se demuestra que la α -hélice "Lid", juega un rol fundamental en la comunicación entre la región regulatoria N-terminal y la región catalítica C-terminal. La estructura de la región "Lid", contiene una secuencia muy conservada VLVLE y se ubica inmediatamente hacia el extremo C-terminal del dominio CBD, donde se une el AMPc. Si bien mutaciones en esta estructura no afectan la unión del nucleótido, una mutante Ala5, donde los cinco residuos son mutados por alaninas, confiere a Epac1 un fenotipo constitutivamente activo en el intercambio de nucleótido. Esto se da, porque el dominio GEF catalítico, se encuentra unido a la secuencia VLVLE, de esta manera manteniéndolo inactivo. Al unirse el AMPc, esta región ahora interacciona con el nucleótido, dejando libre el dominio GEF para el intercambio (figura 10) (163).

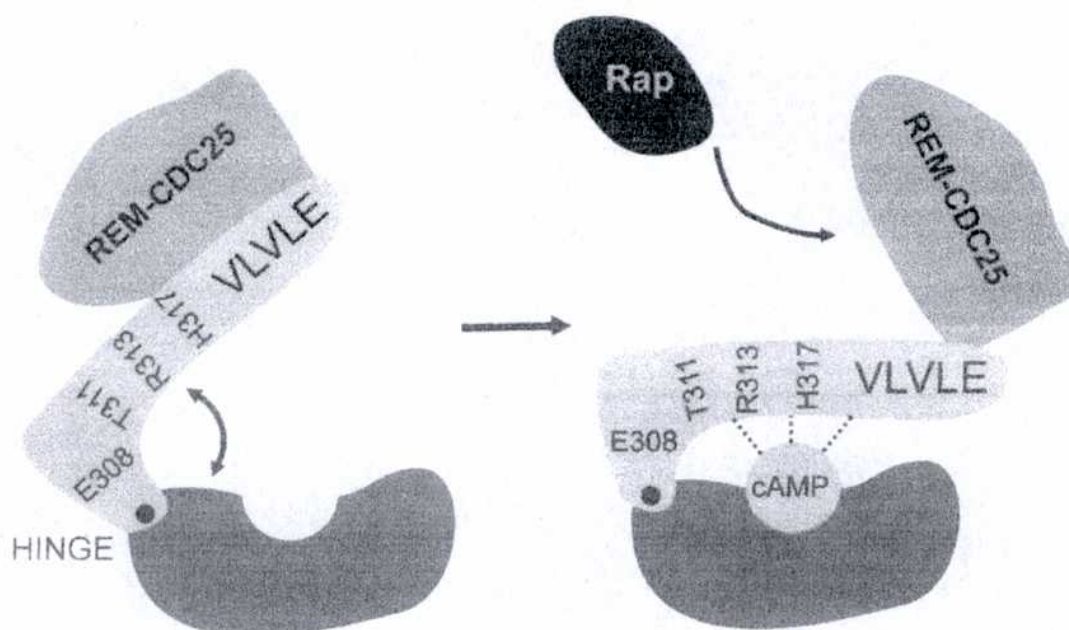


Figura 10. Regulación por la región "Lid" de la actividad GEF de Epac. Modelo esquemático de la participación de la región "Lid" y su secuencia VLVLE en la comunicación entre la región regulatoria y catalítica de Epac. En ausencia de AMPc, la secuencia VLVLE de la región "Lid" interactúa con el dominio GEF (CDC25). Al unirse el AMPc, la región "Hinge" empuja a "Lid" hacia el PBC, protegiendo al nucleótido del solvente y permitiendo que se libere la región catalítica (REM-CDC25), para que pueda intercambiar nucleótidos sobre Rap

En la búsqueda de análogos de AMPc, se observa que los clásicos análogos de AMPc permeables a la membrana, tales como 8-Br-AMPc u 8-CPT-AMPc, activan a PKA y Epac, de forma similar al AMPc. Cambios en la posición 6 de la base nitrogenada, tales como N⁶-benzoyl-AMPc, son buenos activadores de la PKA, pero muy pobres activadores de Epac. Modificaciones en el 2'OH de la ribosa, dan un análogo capaz de activar mas fuertemente a Epac que el mismo AMPc, pero son solo agonistas parciales de PKA. La sustitución del 2'OH por un grupo alquilo, aumenta de 10 a 100 veces la selectividad por Epac. Sustituciones en la posición 8 de la adenina por MeO o Cl, dan una mayor selectividad por Epac. La combinación de 8-pCPT- y 2'-O-metil aumentan la selectividad por Epac en tres órdenes de magnitud (29).

La utilización de estos análogos, ha demostrado que la estimulación con NGF (neuronal growth factor) de células PC-12, desencadena un sinergismo entre la PKA y Epac, promoviendo su diferenciación a neuronas (29).

Estudiando la especificidad de AMPc, se demostró que otros nucleótidos cíclicos son capaces de unirse a Epac con ordenes de magnitud similares (AMPc= 3.3μM; GMPc= 14μM; IMPc= 6.4μM; XMPc= 20μM), pero solo el AMPc es capaz de inducir la activación de su función como GEF (164).

5.3 Epac como mediador en respuestas biológicas

Epac podría mediar diversas respuestas biológicas frente al estímulo de hormonas que aumentan los niveles intracelulares de AMPc. Un ejemplo, es la señalización hacia integrinas, al estimular con isoprotenerol el receptor β₂-adrenérgico, proceso que involucra la activación de Epac-Rap (159).

La activación por adrenalina del receptor β₂-adrenérgico, transfectado en células HEK 293, o del receptor endógeno de prostaglandina E1 en células de neuroblastoma N1E-115, inducen la movilización de calcio y la estimulación de la PLC (fosfolipasa C). Este proceso estaría dado por la formación de AMPc, pero es independiente de PKA y dependiente de la vía Epac-Rap (184).

En el año 2002, se demuestra que el AMPc es capaz de activar a la proteína quinasa B (PKB), vía la activación de Epac. Por otro lado, el AMPc es capaz de inhibir a PKB vía PKA, mostrando un rol dual del AMPc. El efecto neto, dependerá de la concentración intracelular de Epac y/o PKA (130). Además en este trabajo, mutando

una arginina (R279E) muy conservada para la unión del nucleótido, construyen una forma dominante negativa de Epac, incapaz de unir AMPc e intercambiar nucleótido.

En el ducto colector renal de rata, la bomba H,K-ATPasa es estimulada en respuesta a calcitonina e isoprotenerol. Esta activación es mimificada con agentes que aumentan los niveles de AMPc. Anticuerpos anti Epac1, anti Rap1 o anti B-Raf, son capaces de bloquear la señalización de calcitonina a la bomba H,K-ATPasa, demostrando que la calcitonina señala a partir de esta vía (111).

El AMPc es capaz de inducir secreción en diversos tejidos. Epac2 (o cAMP-GEFII), posee un rol fundamental en procesos de exocitosis. Este es capaz de formar un complejo con la pequeña proteína Rab3, y con Rim2 (una proteína efectora de Rab3). Si bien Epac2 no es capaz de intercambiar nucleótido sobre Rab3, la unión de AMPc es necesaria para la secreción de hormonas tales como GH (growth hormone) o insulina, ya que mutantes de Epac2, incapaces de unir este nucleótido (G114E, G422D), no inducen secreción (149). De hecho, este complejo Epac2-Rim2, participa también en la potenciación de la secreción de insulina en condiciones de alta glucosa en sangre, y además se encuentra en la vía de dos hormonas que participan en la secreción de insulina: GLP-1 y GIP (90).

Epac2-Rim2 es capaz de formar un complejo con la proteína Piccolo, un censor de Ca^{++} . El proceso de exocitosis necesita de este ion divalente. El AMPc, al unirse a Epac2, y Ca^{++} al unirse a Piccolo, participan en este proceso de exocitosis (63).

Kang y Holz, trabajando con el análogo específico de Epac, 8-pCPT-2'-O-Me-AMPc, demuestran que este intercambiador está involucrado en la liberación del Ca^{++} intracelular, proceso necesario por las células β del páncreas para la secreción de insulina (89).

Materialles y Métodos

1. Células

Todos los ensayos presentes en esta tesis fueron realizados en células HEK 293T (human embryonic kidney immortalizadas con el antígeno T). Estas células fueron mantenidas en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) de alta glucosa (*GIBCO BRL*), con 10% FBS (suero fetal bovino), 10% penicilina-estreptomicina y 1% gentamicina (*GIBCO BRL*).

Las células fueron repicadas cada 48/72hs según su confluencia, con una solución de tripsina al 0.5% (*GIBCO BRL*). Previo a este paso, las células fueron lavadas con una solución de PBS 1X.

SOLUCIONES UTILIZADAS

- PBS 10X: NaCl 1.37M , KCl 26.8mM, KH_2PO_4 14.7mM, NaH_2PO_4 43mM. Llevar a pH=7.4

2. Transformación de bacterias

Se transformaron bacterias competentes con diferentes plásmidos, con el fin de amplificarlos.

A 100 μ l de bacterias competentes (DH5 α) se les añade 50-100ng de ADN plasmídico y se agita suavemente para mezclar

Se incuba 10' en hielo

Se incuba 1.5' a 42°C

Se deja 5' en hielo

Se agrega 0.9ml de LB y se deja 1 hora a 37°C

Se plaquea en LB/ampicilina toda la noche a 37°C, y se pican las colonias para la preparación plasmídica.

SOLUCIONES UTILIZADAS

- LB (1 litro): 0.5% p/v extracto levadura, 1% p/v bacto-triptona, 1% p/v NaCl

- LB agar: LB + 1.5% p/v bactoagar
- LB/ampicilina: 100mg/ml (tanto en medio sólido como líquido)

3. Preparación de ADN plasmídico.

3.1 Minipreparación

En la mayoría de los casos se utilizó el método alcalino descrito en "*Current protocols in Molecular Biology*" (7).

3.2 Preparaciones a gran escala

En algunos casos se utilizaron columnas de intercambio iónico "Tip 500" del kit "Plasmid Maxi" de QIAGEN, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Este protocolo está basado en un procedimiento de lisis alcalina modificado, seguido de una purificación del DNA plasmídico por medio de una columna de intercambio iónico. El DNA se une a la columna, y luego se remueve el RNA, proteínas, solventes e impurezas de bajo peso molecular con una concentración media de sal. Finalmente el DNA es eluido con un buffer de alta salinidad, concentrado y desalado por precipitación con 0.7 volúmenes de isopropanol y posterior lavado con etanol 70%. El rendimiento de estas maxi preparaciones es aproximadamente de 500µg de ADN plasmídico.

SOLUCIONES UTILIZADAS

- buffer P1: 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 50-100 mg/ml RNasa A (SIGMA, bajo grado de pureza)
- buffer P2: 0,2 N NaOH, 1 % SDS
- buffer P3: 3 M KAcO, pH 5,2
- TE: 10mM Tris-HCl PH=8, 1mM EDTA pH=8

3.3 Geles de agarosa nativos.

Los geles de agarosa utilizados se prepararon con buffer TBE 1X o TAE 1X al 0.7-1.5 % con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. Las corridas electroforéticas se realizaron a 5-10 V/cm. Antes de sembrar, las muestras se resuspendieron con el correspondiente volumen de buffer de siembra 6x. Los geles fueron visualizados y fotografiados con luz ultravioleta (UV), utilizando un equipo *FOTODYNE*. Se utilizaron distintos marcadores de peso molecular según el tamaño del fragmento corrido. Estos son: 1Kb Ladder y 100 bp, ambos de *New England Biolabs*, o la combinación de estos.

SOLUCIONES UTILIZADAS

- TBE 10X: (1 litro) 108g Tris base, 55g ácido bórico, 40ml 0.5M EDTA pH=8
- TAE 50X: (1 litro) 242g Tris base, 57.1ml acético glacial, 100ml 0.5M EDTA pH=8

3.4 Cuantificación de ADN.

Las muestras de ADN, se cuantificaron por medición de la absorbancia a 260 nm (A_{260}). Las concentraciones se calcularon conociendo la A_{260} y teniendo en cuenta que 1 unidad A_{260} es equivalente a 50ng/µg de ADN. También se cuantificaron muestras de ADN por electroforesis en gel de agarosa, comparando las intensidades observadas bajo luz UV con las intensidades dadas por cantidades conocidas de ADN del fago Lambda digerido con la enzima Hind III (*Lambda Hind III, GIBCO BRL*).

3.5 Digestión de ADN con enzimas de restricción.

El análisis de ADN por digestión con enzimas de restricción se realizó en las condiciones de temperatura y salinidad indicadas por el manual del fabricante (*Promega*). Se utilizaron las unidades enzimáticas y los buffers allí recomendados para cada enzima.

3.6 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.

Los fragmentos de ADN se purificaron utilizando el kit *Geneclean II* (*Bio101*). Los fragmentos de ADN a purificar se separaron por electroforesis en geles de agarosa en buffer TAE 1X. La banda correspondiente al fragmento de interés se cortó bajo luz UV, y se siguieron las instrucciones del fabricante.

3.7 Reacciones de ligación y transformación.

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo, intentando respetar una relación inserto:vector de 3:1. A modo de ejemplificar una reacción típica, se utilizaron 50 ng de vector y 25 ng de inserto. La reacción se llevó a cabo en 20 µl de volumen final. Se utilizó 1 U de la enzima ADN ligasa del fago T4 (*Promega*). La incubación fue a 16°C durante toda la noche. Como control se incubó el vector con enzima y buffer, pero sin agregar inserto. Se transformaron bacterias competentes con 5 µl de la reacción de ligación (con y sin ligasa), como ya fue descrito en 2. Se plaquearon 200 µl de cada transformación y se dejó durante una noche en una estufa a 37°C.

4. Purificación de GST-ATF2 (96)

Se inoculó un cultivo de 20ml de LB/Amp de bacterias transformadas con un plásmido que codifica para la proteína de fusión GST-ATF2 (96). Una vez saturado el cultivo, se pasó a un matraz erlenmeyer conteniendo 500ml de LB/Amp. Se dejó por una hora hasta que el cultivo estuviese en crecimiento exponencial y se agregó IPTG (0.2mM). Luego de 3 horas de crecimiento, se colectaron las bacterias a 6000g por 15'. Se procedió a la purificación de la proteína de fusión:

- Resuspender el pellet en 10ml de 1% Triton X-100, 1mM EDTA, 1mM PMSF/PBS
- Congelar y descongelar en nitrógeno líquido y en baño a 37°C dos veces
- Sonicar las muestras 3 veces por 10seg.
- Centrifugar por 15' a 14.000RPM
- Agregar al sobrenadante 500µl de glutatión-agarosa.

- Dejar incubando en agitación por 1 hora a 4°C
- Centrifugar a 3000RPM por 5'
- Descartar el sobrenadante y diluir con 1ml 1% Triton-X, 1mM PMSF en PBS y pasar a tubo limpio.
- Lavar las bolitas 3 veces con 1% Triton-X, 100mM PMSF en PBS
- Lavar las bolitas 2 veces con 1mM PMSF en PBS
- Resuspender las bolitas en una solución de 0.03g de glutathione en 10ml de Tris 0.25M, pH=7.5-8. Se resuspende por 5' a 4°C
- Centrifugar y colectar el sobrenadante
- Repetir 2 veces los pasos 11 y 12, combinando los sobrenadantes.
- Agregar 2X freezing solution (1mM EDTA, 1mM DTT, 20% glicerol). Se cuantifica en gel de poliacrilamida con standards de BSA.
- Guardar la proteína a -20°C.

La proteína purificada se mezcla con Laemmli buffer (llamado también "cracking" buffer) para ser corrida en un gel de poliacrilamida. La cuantificación se realiza con estándares de BSA y posterior tinción con el colorante Coomassie Blue. Las proteínas se evidencian al someter el gel teñido a la solución decolorante.

SOLUCIONES UTILIZADAS

- 5X de Laemmli buffer: 0.3125M Tris pH=6.8; 10% SDS; 25% glicerol; 0.05% bromo fenol blue; 10% β -mercaptoetanol
- 5X Buffer Tris-glicina-SDS (corrida): para 1litro: 15.1g Tris base; 94g glicina; 50ml de una solución 10% SDS
- Solución Coomassie blue: 0.05p/v Coomassie Blue en 30% metanol; 10% ácido acético glacial.
- Solución decolorante: 30% metanol; 10% ácido acético glacial.

5. Transfecciones transientes

5.1 Transfección con fosfato de calcio

Células HEK 293T sobre-confluentes en placa de 10cm, fueron separadas 1/6 el día anterior a la transfección, con Tripsina 0.25% (GIBCO BRL) en placas de 10cm, obteniéndose placas con un 50-70% de confluencia.

Luego de aproximadamente 24hs, se transfectaron con la técnica de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$:

Solución 1 (por placa a transfectar)

- 0.86ml H_2O
- 12 μl DNA carrier (50mg/16.2 ml)
- 125 μl de CaCl_2
- Plásmido a transfectar (se agrega el plásmido de expresión que contiene la quinasa cuya actividad se pretende medir, la cual va en todas las placas)

Solución 2 (por placa a transfectar)

- 1ml HN
- 22.5 μl PO_4^{3-}

En tubos tipo *Falcon* de 15ml estériles se agregan luego los plásmido que expresan las proteínas que se desean ensayar (activadoras o dominantes negativas) y se vuelca 1ml de la solución 1.

Esta solución (conteniendo la quinasa a medir y el plásmido a ensayar), se homogeniza. Luego, se toma con una pipeta y se vuelca gota a gota sobre 1ml de solución 2 que se encuentra en agitación constante por burbujeo, en otro tubo tipo *Falcon*. Se deja 20'-30' para que se forme el precipitado que contiene fosfato de calcio y el ADN. Una vez formados estos complejos se agrega sobre la placa gota a gota y se agita suavemente hasta que se observe una solución homogénea .

Luego de 12-16hs se aspira el medio, se lava con PBS y se agrega medio completo para que las células continúen dividiéndose.

Al día siguiente se aspira el medio, se agrega medio sin suero y se deja por dos horas (esto permite bajar la activación de quinasas mediada por factores de crecimiento que se encuentran en el suero fetal bovino, pero no baja la activación por el plásmido transfectado, con lo cual se consigue reducir los niveles de activación basales). Esto se conoce en la jerga del laboratorio por el nombre de "hambrear". Por último, se lava con PBS y se agrega 1ml de buffer de lisis para quinasas y se deja en hielo. Se colecta y se comienza el ensayo de actividad quinasa o se congela a -20°C para comenzar el ensayo otro día.

SOLUCIONES UTILIZADAS

- HN: 50mM Hepes pH=7.1, 280mM NaCl
- CaCl₂ 2M
- NaH₂PO₄ 70mM pH=7.1
- DNA carrier: 30µg/µl (*Boehringer*)

5.2 Transfección con *FuGene*

FuGene es un reactivo comercial, siendo un producto modificado a partir de lípidos catiónicos. Este tiene la capacidad de formar micelas conteniendo el plásmido dentro de ellas y de densidad de carga positiva, las cuales son capaces de penetrar la membrana plasmática.

Las transfecciones transientes con *FuGene* fueron realizadas en placas de 6 pocillos, con 350.000 células/pocillo. Se utilizaron entre 500ng y 1µg de ADN plasmídico por pocillo. El protocolo de transfección utilizado, fue el recomendado por el fabricante (*Roche*).

6. Ensayos de medición de actividad quinasa

Un esquema básico del ensayo de medición de la actividad quinasa, se representa en la figura 11.

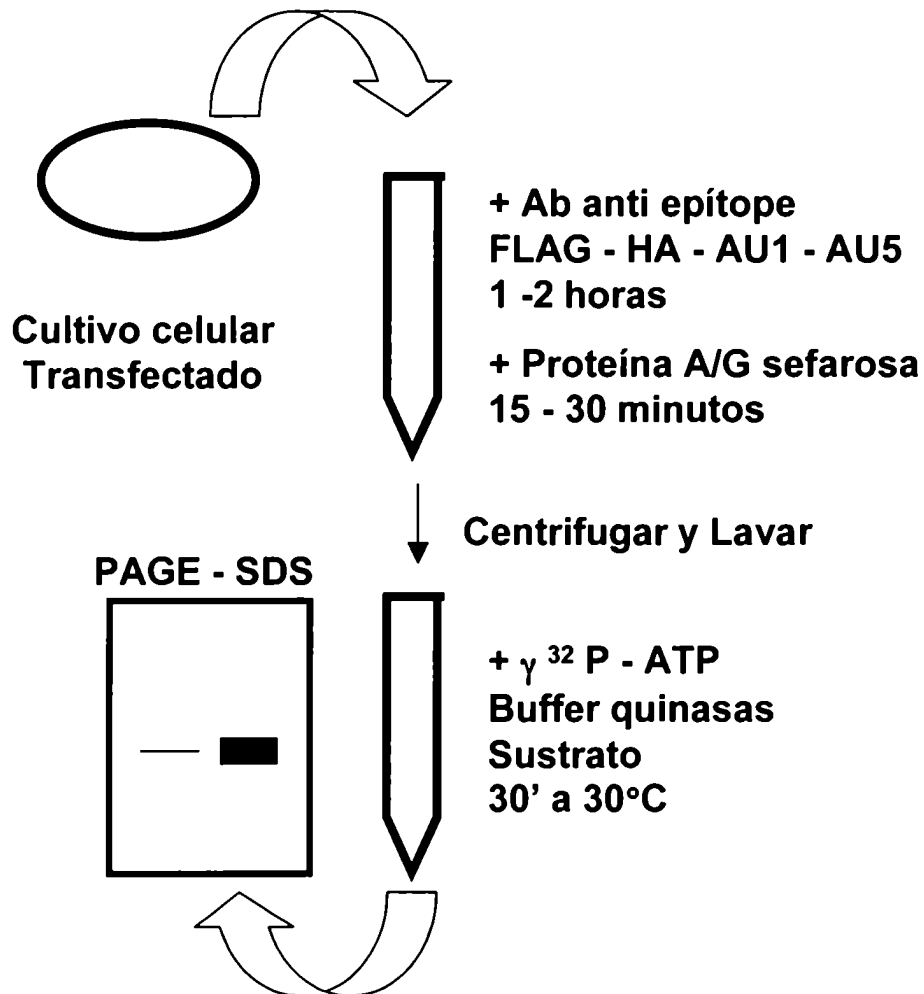


Figura 11: Esquema de un ensayo de medición de actividad quinasa. Células HEK son transfectadas con la quinasa a medir, fusionada a un epítoto HA o AU5. Al cabo de 48hs, las células son lisadas y se inmunoprecipita la quinasa con el anticuerpo anti epítoto por 1-2 horas, y se precipita el inmunocomplejo con proteína A/G sefarosa por 15-30'. Luego de lavar las bolitas, se incuban en presencia de sustrato (GST-ATF2) y γ ³²P-ATP. Terminada la reacción, se corren en gel PAGE-SDS las muestras y se cuantifica la banda correspondiente a GST-ATF2 fosforilado.

6.1 Actividad de c-JUN quinasa (JNK)

Una vez transfectadas las células con pCEFL AU5-JNK o pCEFL HA-JNK y los demás plásmidos, se dejan por 48hs y se las "hambrea" por 2 horas con medio DMEM de alta glucosa (*GIBCO BRL*), se las lava con PBS y se las lisa con 1ml de buffer de lisis para ensayos de quinasa.

Una vez colectadas las células, se centrifugan 15' a 10.000 RPM a 4°C y se pasa el sobrenadante a tubos tipo *ependorf* conteniendo 1µl del anticuerpo anti AU5 (*Babco*) o anti HA (*Babco*). Se deja incubando por 90' en hielo.

Los inmunocomplejos son recobrados con la ayuda de bolitas de "gammabind" sefarosa (*Santa Cruz*), los cuales se dejan por 30' a 4°C en agitación.

Una vez precipitado los complejos por centrifugación (30'', 14.000 RPM) se procede a los lavados con las siguientes soluciones:

- 3X Buffer 1 de quinasa
- 1X Buffer 2 de quinasa
- 1X Buffer 3 de quinasa

Las muestras son luego incubadas 30' a 30°C en 30µl de buffer 3 de quinasa conteniendo 10µCi [γ -³²P]ATP, 1µg de GST-ATF2, 1mM DTT y 20µM rATP.

La reacción es terminada por el agregado de 10µl de 5X de Laemmli buffer. Las muestras son calentadas a 95°C por 5' y analizadas por corrida electroforética en un gel de poliacrilamida al 12%, ya que el sustrato GST-ATF2 (96) tiene un peso molecular de 38Kd, permitiendo una buena separación de éste, y el radioactivo libre. Se analiza la intensidad de la banda correspondiente a 38Kd con placa autoradiográfica (*Agfa*).

6.2 Actividad de p38 MAPK

El plásmido utilizado para medir la actividad de la MAPK p38 es pCEFL HA-p38. El ensayo es realizado en idénticas condiciones que el de medición de la actividad de JNK, descrito en **6.1**.

SOLUCIONES UTILIZADAS

- Buffer de lisis para quinasa: 25mM HEPES pH=7.5, 0.3M NaCl, 1.5M MgCl₂, 0.2mM EDTA, 1% Triton X-100, 20mM β-glicerofosfato, 1mM NaVO₄ y en el momento se agrega 1mM DTT y 1mM fenilmetilsulfonilfloruro (PMSF) todo a 4°C.
- Buffer 1 de quinasa: 1%NP-40, 2mM NaVO₄ en PBS
- Buffer 2 de quinasa: 100mM Tris pH=7.5, 0.5M LiCl
- Buffer 3 de quinasa: 12.5mM MOPS pH=7.5, 12.5mM β-glicerofosfato, 7.5mM MgCl₂, 0.5M EGTA, 0.5mM NaF, 0.5mM NaVO₄

7. Westerns Blot

De un volumen total de 1ml de lisado de células, se toman 100μl para el ensayo de Western Blot (WB). Se agregan 20μl de 5X Laemmli buffer y se hierve por 5'. Se deja en hielo hasta sembrar.

La corrida se hace en minigeles al 10% acrilamida con un marcador de peso molecular "Rainbow Marker" (Amersham) como referencia, a un voltaje de entre 60V y 100V. La transferencia se hace por una hora a 100V en frío, sobre membrana de nitrocelulosa (GIBCO BRL). Se procede al tratamiento de la membrana :

- Se bloquea por 2 horas con 5% leche descremada. Esto tiene como objeto que no haya pegado en toda la membrana del primer anticuerpo. Las proteínas de la leche se pegarán a toda la membrana en donde no haya proteína pegada.
- Se hacen 3 lavados con TTBS de 5' cada uno. Esto es para sacar el exceso de proteínas de la leche.
- Se agrega el primer anticuerpo 1:1000 y se deja por 1 hora.
- Se hacen 3 lavados con TTBS de 5' cada uno (se saca el primer anticuerpo en exceso)
- Se agrega el segundo anticuerpo 1:25000 anti "mouse" y se deja por 30'. Este anticuerpo reconoce la Fc (fracción constante) del primer anticuerpo por estar hecho en ratón y tiene acoplado la proteína HRP (horse-radish peroxidase) que reacciona con ECL para dar quimioluminiscencia.

- Se hacen 3 lavados con TTBS de 5' cada uno, para sacar exceso de segundo anticuerpo.
- Se agrega reactivo de quimioluminiscencia (*ECL, Amersham*), y se deja 1'.
- Se expone con placa radiográfica hasta ver la proteína.

SOLUCIONES UTILIZADAS

- 5X de Laemmli buffer: 0.3125M Tris pH=6.8; 10% SDS; 25% glicerol; 0.05% bromo fenol blue; 10% β -mercaptoetanol
- 5X Buffer Tris-glicina-SDS (corrida): para 1 litro: 15.1g Tris base; 94g glicina; 50ml de una solución 10% SDS
- 10X Buffer Tris-glicina (transferencia, para Westerns Blot): para 1 litro; 29g glicina; 58g Tris base; 3.7g SDS; en el momento la solución 1X se prepara con 20% metanol
- TTBS: Tris 20mM pH=7.5, NaCl 9g/litro, 0.05% Tween 20

8. Análisis de expresión de genes reporteros

8.1 Transfección y cosecha de las células

Células HEK 293T fueron transfectadas con un plásmido que expresa el gen reportero CAT bajo el promotor de c-Jun (pJUN-CAT). Otras células fueron transfectadas con un plásmido que expresa el sitio de trans-activación de ATF2 unido al sitio de unión al ADN del gen de GAL4 (GAL4-ATF2), junto a otro plásmido que contiene la secuencia de ADN que une GAL4 y el gen reportero CAT (GAL4-CAT).

Las células fueron lavadas con PBS y lisadas a las 48hs de transfectadas con un buffer comercial *Reporter Lysis Buffer (Promega)*. Se dejó actuar al buffer por 15' y se pasó a tubo tipo *ependorf*. Se centrifugó por 5' a 10.000 RPM para sacar restos celulares y se tomó el sobrenadante.

8.2 Medición de la actividad CAT

De 200 μ l de lisado, correspondiente a un pocillo de placa de 6 pocillos, se toman 25 μ l y se le agregan 75 μ l de una mezcla que contiene:

- 1 μ l de cloranfenicol marcado con ^{14}C
- 5 μ l de n-butil CoA (sustrato)
- 69 μ l de Tris/Cl 250mM pH=7.5

Se incuba toda la noche a 37°C para que la enzima CAT transfiera el n-butil al cloranfenicol marcado radioactivamente.

Al día siguiente se mezcla la reacción con 200 μ l de un mix de dos solventes orgánicos, en relación 2:1 (xilenos). Se mezcla en vortex por 2', y se centrifuga por 2' a máxima velocidad en microcentrifuga.

Se toman 150 μ l de la fase orgánica y se agregan 3ml de líquido de centelleo. Se mide el número de CPM (cuentas por minuto) del ^{14}C , en un contador de centelleo (*Beckman instruments, inc*)

9. Activación de Rap *in vivo*

Un esquema básico del ensayo empleado para medir la activación de Rap1 (unida a GTP), se representa en la figura 12.

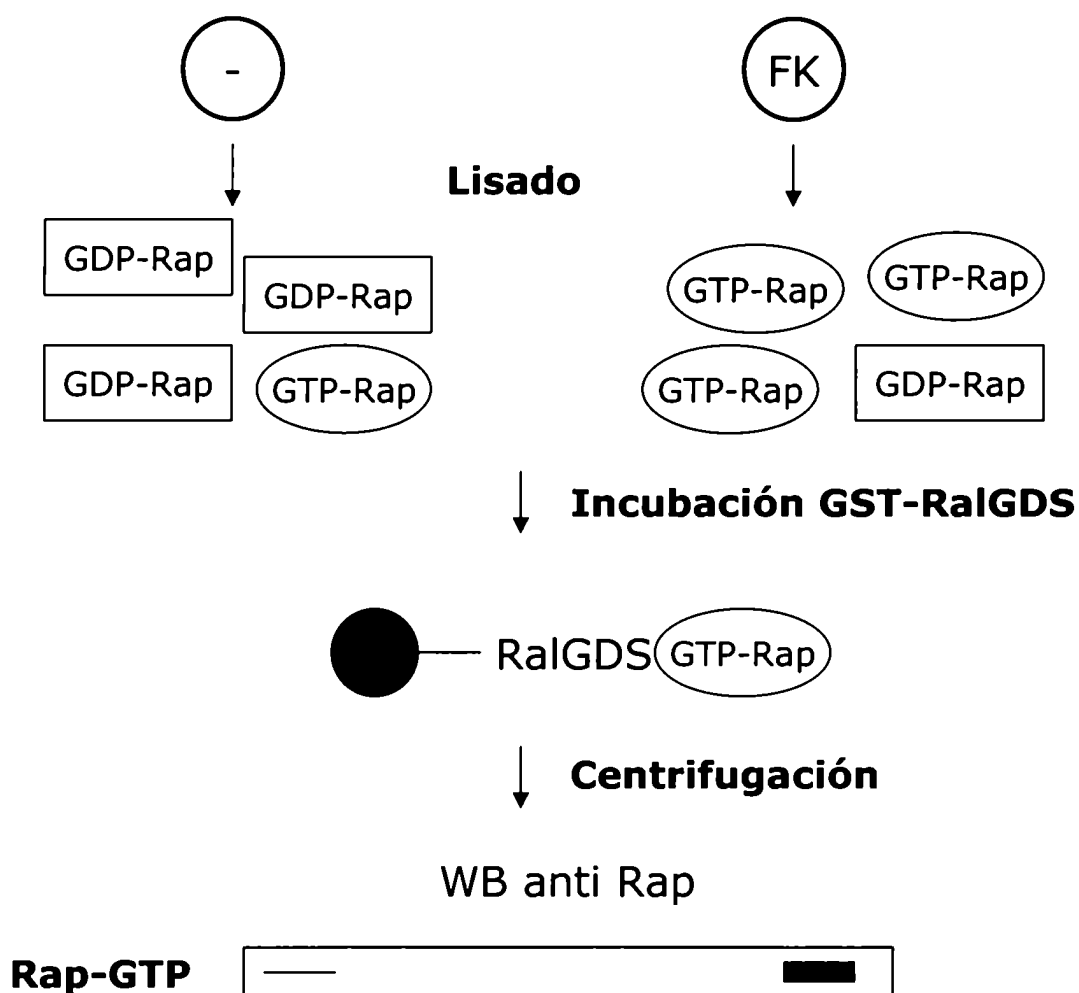


Figura 12: Esquema de un ensayo para la medición de Rap-GTP (activa). Células HEK son transfectadas con HA-Rap WT. Al cabo de 48hs, las células son lisadas. 10% de lisado se utiliza para normalizar la expresión de HA-Rap, y el resto se incuba por 1 hora con GST-RalGDS unido a una matriz de sefarosa. Terminada la incubación, se lavan los complejos, y se corren en gel PAGE-SDS. Ambos, lisados totales y complejos, son revelados con anticuerpo anti HA, en un ensayo de Western Blot. La presencia de una mayor cantidad de HA-Rap en los complejos, indica una mayor cantidad de Rap-GTP. En este ejemplo, se utiliza FK como activador de Rap.

9.1 Purificación de GST-RalGDS (RBD)

Bacterias *E. Coli* transformadas con un plásmido que expresa la proteína de fusión GST-RalGDS (RBD) fueron crecidas toda la noche a 37°C hasta saturación en medio LB/Amp (20ml). Al día siguiente, fueron pasadas a LB/Amp diluyendo aproximadamente 1/10 del original (250ml). Se crecieron en agitación a 37°C hasta una OD₆₀₀=0.6-0.8. Una vez llegada a esa OD, fueron incubadas por tres horas con IPTG 0.2mM. Se centrifugaron y se congeló el pellet de bacterias para la purificación de la proteína GST:

- Se resuspende en 5ml de PBS con inhibidores de proteasas (*Chalbiochem*)
- Se agrega 100µl de una solución de lisozima 10mg/ml preparada en el momento. Se deja 15' en hielo.
- Se pone 700µl de sarkosyl 10%p/v en PBS
- Se sonica 4 veces de 15", dejando en hielo cada vez 15"
- Se centrifuga a 20.000RPM por 20' a 4°C
- Se toma el sobrenadante y se agrega glicerol 100%, para dejar 10% final
- Se alicuota de a 500µl y se congela a -80°C

Con el fin de contar con proteína GST fresca para cada ensayo, 100µl del lisado congelado se descongela para cada ensayo. Se completan con 400µl de "buffer de fishing", y se incuba con glutatión reducido unido a una matriz de sefarosa (GSH-sefarosa) (*Amersham*) por 1 hora a 4°C. Luego de 4 lavados con "buffer de fishing", la proteína purificada se combina con los lisados celulares provenientes de la transfección.

9.2 Verificación de la proteína GST-RalGDS (RBD)

Una vez purificada la proteína GST-RalGDS (RBD), debíamos comprobar que era capaz de discriminar a la proteína Rap en su estado unido a GDP, de su estado unido a GTP. Para tal fin, se lisan células y se utiliza la proteína Rap endógena. La idea era cargar esta proteína con GDP o un análogo no hidrolizable de GTP (GTPγS), y ensayar con estas muestras la proteína de fusión. El lisado celular se realiza

en ausencia de Mg^{++} , ya que el primer paso involucra la salida del nucleótido de la proteína G con EDTA.

- Células HEK 293T fueron lisadas con 1ml de "buffer de fishing" sin $MgCl_2$
- Se agrega 10 μ l de 500mM EDTA pH=8 (10mM final). Se deja 10' en hielo
- Se separa el lisado en 2 X 500 μ l y se agrega 5 μ l de GTP γ S 10mM (0.1mM final) (*Sigma*) y 5 μ l de GDP 100mM (1mM final) (*Sigma*)
- Se incuba 15' a 30°C en agitación
- Se pasa a hielo y se agrega 32 μ l de $MgCl_2$ 1M (60mM final)

El lisado fue incubado por 1 hora con aproximadamente 10 μ g de GST-RalGDS (RBD) pre-acoplado a GSH-sefarosa. Se lava 3X con buffer fishing y un último lavado se realiza con PBS. Se agrega 20-30 μ l de cracking buffer 1X, se hierve y se corre en gel de poliacrilamida. El ensayo de WB se realiza con un anticuerpo anti Rap1 (*Santa Cruz*).

9.3 Ensayo con células transfectadas

Las células transfectadas con un plásmido que expresa HA-Rap1b y demás plásmidos a ensayar, fueron lisadas con "buffer de fishing" a las 48hs de haber sido transfectadas. Una pequeña parte del lisado (10%) fue utilizado para comparar los niveles de expresión (lisados totales) y el 90% fue incubado por 1 hora con aproximadamente 10 μ g de GST-RalGDS (RBD) unido a glutatión-sefarosa. Se lavaron las proteínas unidas a GST-RalGDS 3 veces con "buffer de fishing" y un último lavado fue realizado con PBS. Se agregó 20-30 μ l de cracking buffer 1X. Las muestras fueron hervidas y corridas en gel de poliacrilamida para el WB con anticuerpo anti HA.

SOLUCIONES UTILIZADAS

- Buffer fishing: 50mM Tris/Cl pH=7.5; 1%NP-40; 200mM NaCl; 25mM $MgCl_2$; 10% glicerol; inhibidores proteasas.

10. Activación de Rac/Cdc42 in vivo

Un esquema básico del ensayo empleado para medir la activación de Rac y Cdc42 activas (unidas a GTP), se representa en la figura 13. En esta figura se esquematiza con Rac, pero el mismo ensayo se realiza para Cdc42.

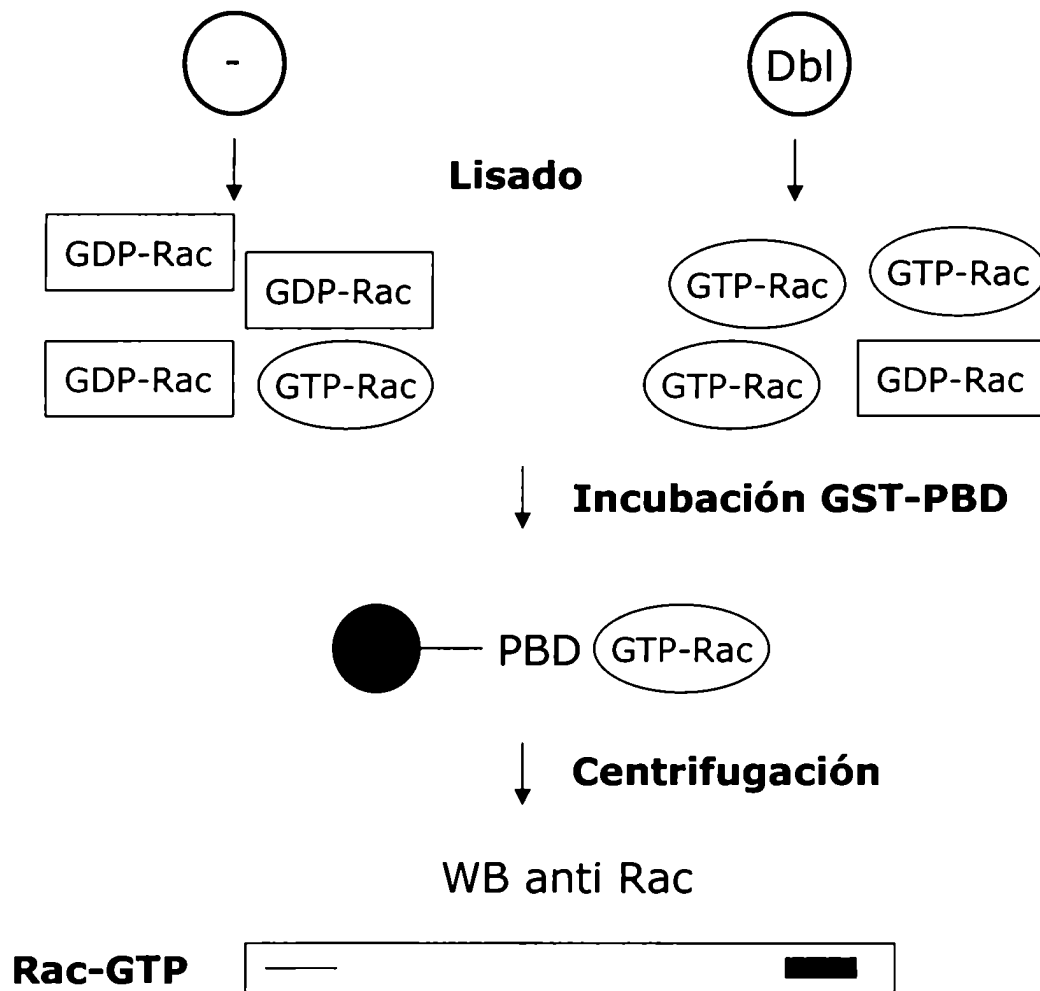


Figura 13: Esquema de un ensayo para la medición de Rac-GTP (activa). Células HEK son transfectadas con HA-Rac WT. Al cabo de 48hs, las células son lisadas. 10% de lisado se utiliza para normalizar la expresión de HA-Rac, y el resto se incuba por 1 hora con GST-PBD unido a una matriz de sefarosa. Terminada la incubación, se lavan los complejos, y se corren en gel PAGE-SDS. Ambos, lisados totales y complejos, son revelados con anticuerpo anti HA, en un ensayo de Western Blot. La presencia de una mayor cantidad de HA-Rac en los complejos, indica una mayor cantidad de Rac-GTP. En este ejemplo, se utiliza la sobre-expresión de Dbl como activador de Rac.

Los ensayos de activación de Rac y Cdc42 *in vivo*, fueron realizados en idénticas condiciones que los de activación *in vivo* de Rap1. La única diferencia fue que se utilizó la proteína GST-PBD(CRIB), que se purificó igual que GST-Ral-GDS(RBD). Se utilizaron aproximadamente 40µg de proteína de fusión GST para cada ensayo.

Los ensayos para verificar que la proteína GST-PBD(CRIB) discriminase a Rac/Cdc42 unidas a GDP o GTP, fueron realizados en idénticas condiciones que los de Rap y fueron revelados con Anticuerpos anti Rac1 o anti Cdc42 (*Santa Cruz*).

11. Co-Imunoprecipitación RacN17 - N-Epac

Células transfectadas con plásmidos que expresan proteínas de fusión HA-Rac N17 y myc N-Epac, fueron lisadas con buffer de lisis/EDTA. El EDTA cumple la función de quelar el Mg⁺⁺ de la pequeña proteína G, aumentando su afinidad por GEFs.

Las inmunoprecipitaciones fueron realizadas con aproximadamente 10µl de anticuerpo anti HA, unido covalentemente a una matriz de sefarosa (*Babco*).

Luego de 1 hora de agitación a 4°C, se lavaron los inmunocomplejos 4-5 veces con buffer de lisis. El último lavado se hizo con PBS.

Las muestras se corrieron en gel SDS PAGE y el resultado se obtuvo al revelar el ensayo de WB con un anticuerpo anti Myc.

SOLUCIONES UTILIZADAS

- Buffer de lisis/EDTA: 50mM Tris/Cl pH=7.5; 0.5% NP-40; 150mM NaCl; 5mM EDTA; inhibidores proteasas (Chalbiochem).

12. Interacción Rac N-Epac in vitro

12.1 Obtención de proteínas GST y carga de nucleótidos

Las proteínas de fusión GST-Rac y GST-Cdc42 y la proteína GST, fueron purificadas de forma similar a la descrita para GST-RalGDS(RBD). La única diferencia fue que se lisaron con un buffer conteniendo Tris/Cl pH=7.5; 50mM NaCl; 5mM MgCl₂ en ves de PBS, con el objeto de mantener el nucleótido de GDP asociado a la proteína, y así mantener su integridad. Se congelaron los lisados de las proteínas obtenidas con 10% glicerol, con el fin de obtener proteína fresca en cada ensayo.

Una vez obtenidas las proteínas de fusión unidas a una matriz de glutatión-sefarosa, fueron cargadas con GDP y GTPγS como se indica en la sección 9.2. La proteína libre de nucleótido siguió el mismo protocolo, pero no le fue agregado nucleótido alguno, y fue dejada todo el tiempo en presencia de EDTA. La proteína GST fue sometida al mismo protocolo de carga de nucleótido como control.

12.2 Traducción in vitro de N-Epac

Para la obtención de N-Epac marcado con metionina ³⁵S, se utilizó el kit de Promega "TNT® T7 Quick". Como molde, se utilizaron productos de PCR generados a partir de un plásmido que expresa N-Epac. El protocolo fue el recomendado por el fabricante.

12.3 Ensayo de interacción

Aproximadamente 10μg de GST-vector, GST-Rac y GST-Cdc42, cargados con GDP o GTPγS fueron incubados con N-Epac marcado con metionina ³⁵S. La incubación fue realizada por 1 hora a 4°C en agitación en 500μl de un buffer que contenía 50mM Tris/Cl pH=7.5; 150mM NaCl; 5mM EDTA; 10% glicerol; inhibidores de proteasas. Terminada la incubación, se lavó 4 veces con el mismo buffer de reacción y un último lavado se hizo con PBS.

La separación de las proteínas GST de las bolitas, se realizó con cracking buffer. Las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida 12%. Una vez corrido, el gel fue enjuagado por 20-30' en el reactivo *Amplify* (*Amersham*), según instrucciones del fabricante. Este paso tiene por objeto amplificar la baja señal que da la metionina ^{35}S . Al termino de este paso, el gel fue secado por 2 horas a 80°C en secadora y expuesto con placa radiográfica (*Agfa*) a -80°C, hasta ver la señal.

13. Activación de Rac/Cdc42 in vitro

Un esquema básico del ensayo se muestra en la figura 14. En el ejemplo, se ilustra con Rac, pero el protocolo para la medición con Cdc42 es el mismo

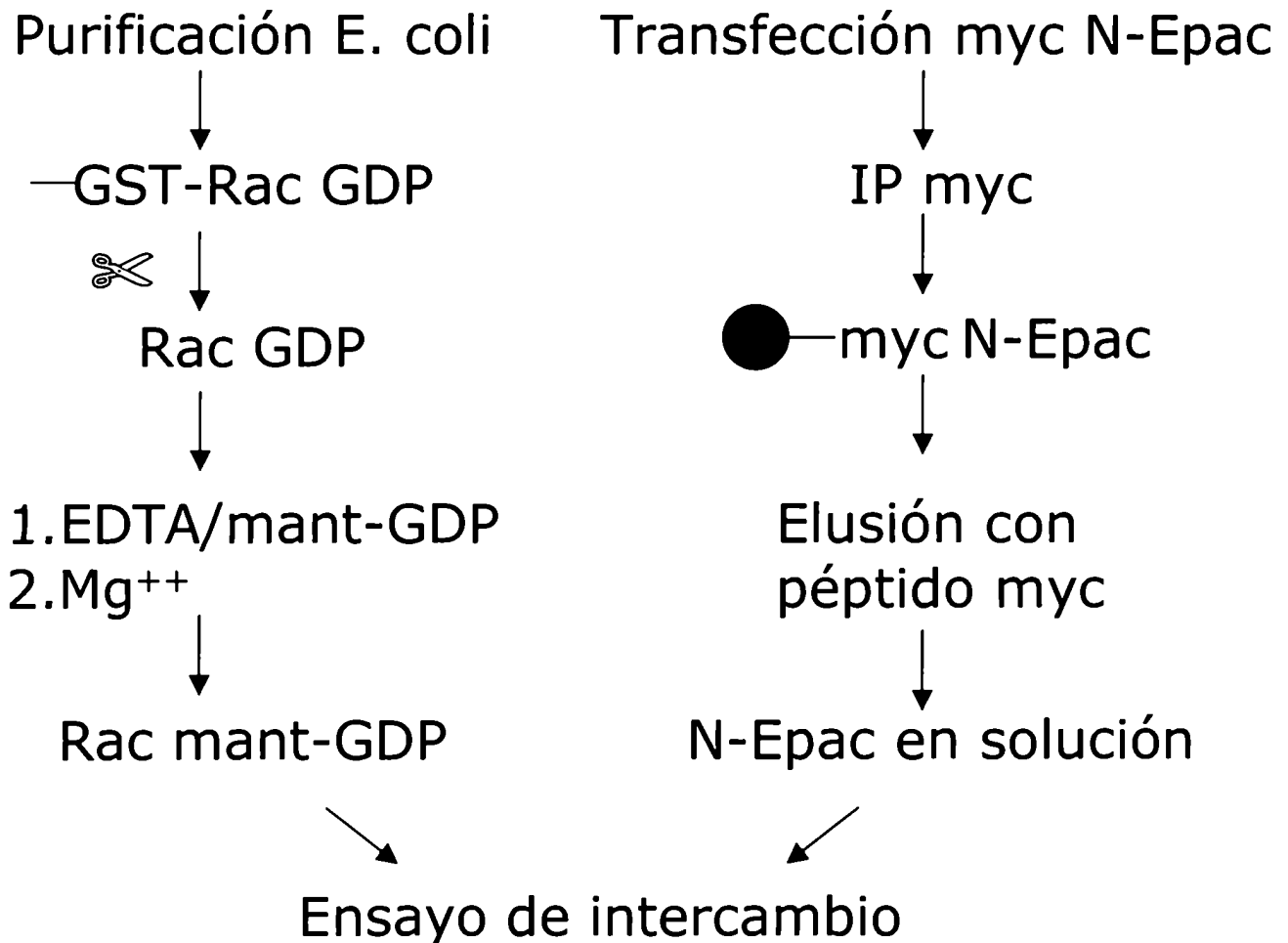


Figura 14: Esquema de un ensayo para la medición actividad GEF en inmunoprecipitados de N-Epac. Por un lado, proteína Rac es purificada de bacterias en presencia de GDP frío. La proteína de fusión es cortada con trombina para obtener proteína sin GST. Esta proteína es cargada con el nucleótido fluorescente mant-GDP. Por otro lado, se inmunoprecipita myc N-Epac de células transfectadas. Luego de lavar los inmunocomplejos, se eluyen con exceso de péptido myc (9E10). N-Epac y proteínas asociadas, ahora en solución, son ensayadas con Rac mant-GDP, con el objeto de encontrar actividad GEF presente en los inmunocomplejos.

Con el objeto de estudiar si N-Epac era capaz de interactuar con algún GEF de la familia Rho, se realizaron ensayos de intercambio de GDP/GTP sobre Rac/Cdc42 *in vitro* mediante técnicas fluorimétricas (173). La idea del ensayo es ver si era posible observar una actividad GEF asociada a inmunoprecipitados de N-Epac.

13.1 Purificación GST-Rac y GST-Cdc42

Bacterias transformadas con plásmidos que expresaban GST-Rac1 o GST-Cdc42 fueron inducidas con IPTG de manera similar a la realizada para la obtención de GST-RalGDS(RBD). Posteriormente fueron centrifugadas y congeladas a -80°C . Las bacterias fueron lisadas para la obtención de la proteína de fusión:

- Se resuspende el pellet en 5ml de 50mM Tris/Cl pH=7.5; 50mM NaCl; 5mM MgCl_2 ; 0.1mM GDP; inhibidores de proteasas (buffers de lisis con PBS, pueden quelar el Mg^{++} de la proteína G y desnaturalizarla)
- Se agrega 100 μl de una solución de lisozima 10mg/ml preparada en el momento. Se deja 15' en hielo
- Se agrega 700 μl de sarkosyl 10%p/v en PBS
- Se sonica 4 veces de 15'', dejando en hielo cada vez 15''
- Se centrifuga a 20.000RPM por 20' a 4°C
- El sobrenadante se incuba por 2 horas a 4°C en agitación con 250 μl de 50% glutation-sefarosa/buffer lisis. Estas bolitas fueron lavadas 4-5 veces con PBS y un último lavado se realiza con el mismo buffer de lisis.
- Se precipitan las bolitas GST-sefarosa y se lavan 5 veces con el mismo buffer de lisis
- Se lava 2X PBS y se dejan en PBS hasta la digestión con trombina

13.1.1 Digestión con trombina

Dado que el epítipo GST es muy voluminoso e interfiere en los ensayos de activación *in vitro*, fue digerido de la proteína de fusión. Las bolitas de glutación-sefarosa que contienen la proteína de fusión, fueron incubadas con 0.5ml de buffer para

digestión con trombina y 5 unidades de trombina (*Amersham*). La digestión fue realizada en agitación a 4°C, toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó por 1' a temperatura ambiente y se colectó el sobrenadante. Como a veces luego de la digestión, la proteína digerida quedaba unida inespecíficamente a las bolitas, se las incubó por 2' a 4°C con buffer de alta sal/DTT. Se centrifugó igual que antes y se juntaron ambos sobrenadantes.

Con el objeto de remover la trombina, el sobrenadante fue incubado con 10µl de una solución al 50% de *p*-amino-benzamidina-agarosa (*Sigma*) por 30' a 4°C en agitación. Se centrifugó y tomó el sobrenadante.

Las proteínas Rac y Cdc42 fueron concentradas utilizando una columna *Amicon-4* (*Millipore*) de 10Kda de MWCO (molecular weight cut off), según instrucciones del fabricante. Usualmente, obteníamos 50-100µl de proteína concentrada.

La proteína concentrada fue cuantificada corriéndola en gel de poliacrilamida, con estándares conocidos de BSA, y posterior tinción con el colorante Coomassie Blue.

La proteína fue cargada con GDP o GTP γ S, y ensayada con GST-PBD(CRIB), con el objeto de medir su capacidad para cargar nucleótidos de guanina, de una forma similar a los ensayos de puesta a punto de "Activación de Rac/Cdc42 *in vivo*".

SOLUCIONES UTILIZADAS

- Buffer digestión trombina: 50mM Tris/Cl pH=8; 150mM NaCl; 2.5mM CaCl₂; 5mM MgCl₂; 1mM DTT
- Buffer de alta sal/DTT: 50mM Tris/Cl pH=7.5; 150mM NaCl; 5mM MgCl₂; 1mM DTT

13.2 Carga de nucleótido mant-GDP

- Aproximadamente 100µM de proteína Rac o Cdc42 fue incubada con 1mM de mantGDP (en exceso 10 veces con respecto al GDP presente en la proteína, que se encuentra en relación 1:1 proteína:GDP) con buffer de cargado, en hielo.
- Al cabo de 90', el mantGDP (*Molecular Probes*) unido a la proteína G se estabilizo con el agregado de 10mM final de MgCl₂. Se dejó 30' en hielo.

- El exceso de nucleótido se eliminó al pasarlo por una columna de filtrado *Micro spin-6* (*Biorad*), previamente equilibrada con 50mM Tris/Cl pH=7.5; 50mM NaCl; 20mM MgCl₂.
- La proteína cargada con mantGDP se alicuotó y congeló rápidamente al tirarla dentro de un recipiente con N₂ líquido. Se guardó a -80°C hasta su uso.

SOLUCIONES UTILIZADAS

- Buffer de cargado 4X: 80mM Tris/Cl pH=7.5; 200mM NaCl; 16mM EDTA; 4mM DTT

13.3 Obtención de inmunoprecipitados

13.3.1 Inmunoprecipitación de myc N-Epac

Células HEK293T crecidas en placa de 10cm fueron transfectadas con *FuGene* con un plásmido que expresa la proteína de fusión myc N-Epac. Además, otra placa de 10cm sin transfectar fue inmunoprecipitada en similares condiciones como control (mock). Al cabo de 48Hs, se lavaron con PBS y se lisaron con 1ml de buffer de lisis Tritón. Se centrifugaron por 15' a 13.000 RPM a 4°C y se tomaron los sobrenadantes.

- Los sobrenadantes fueron incubados con 20μl de anticuerpo anti myc (9E10) unido covalentemente a bolitas de sefarosa (*Babco*).
- Se dejaron incubando por 1-2 horas a 4°C en agitación
- Se lavaron 4 veces con buffer de lavado

SOLUCIONES UTILIZADAS

- Buffer de lisis Tritón: 50mM Tris/Cl pH=7.5; 1% Tritón X-100; 150mM NaCl; 10mM NaPP; 10mM NaF; 10mM ortovanadato Na; inhibidores proteasas

- Buffer de lavado: 20mM Tris/Cl pH=7.5; 0.1% Tritón X-100; 150mM NaCl; 10% glicerol; 10mM NaF; 10mM ortovanadato Na; inhibidores proteasas

13.3.2 Elusión del inmunoprecipitado

Una vez obtenidos los inmunoprecipitados, se procedió a la elusión de N-Epac y las proteínas asociadas a esta mutante, para ensayar la presencia de una actividad intercambiadora para Rac/Cdc42. Por experimentos realizados a diferentes temperaturas, se decidió realizar la elusión a temperatura ambiente. Dos incubaciones de 20' con 50µl de una solución de péptido 9E10 (*Babco*) 1µg/µl en PBS fueron realizadas y los sobrenadantes fueron mezclados. Estos 100µl, producto de la elusión de células transfectadas con myc N-Epac y células controles (mock), fueron utilizados en los ensayos de intercambio *in vitro*.

13.4 Ensayo de intercambio *in vitro*

13.4.1 Ensayo pilotos con EDTA

Los primeros ensayos fueron ensayos de puesta a punto del experimento. Para tal fin, fue utilizado EDTA, que esperabamos que actuase de la siguiente manera:

- 1) El EDTA titula el Mg^{++} de la proteína G
- 2) Al no haber Mg^{++} , el mantGDP es desestabilizado (al no estar unido a la proteína G, no emite fluorescencia)
- 3) El GDP frío, que se encuentra por exceso en la reacción, es capaz de entrar a la proteína G, de esta forma disminuyendo la fluorescencia.

El ensayo fue realizado en placas de 96 pocillos, en un fluorímetro modelo VICTOR³ V 1420 Multilabel Counter (*Perkin Elmer*). El volumen final que se utilizó para los ensayos fue de entre 50 y 200µl. Los experimentos de puesta a punto con EDTA fueron realizados de la siguiente manera:

- 25 μ l de buffer reacción (MgCl₂ final queda 10mM)
- 2.5 μ l de proteína Rac o Cdc42 (aproximadamente 1 μ M)
- 1 μ l de GDP 100mM (2mM final)
- 20.5 μ l de H₂O

La fluorescencia fue medida 250 veces con intervalos de 5" a 25°C. El tiempo total del ensayo fue de 1250". La longitud de onda de excitación fue de λ_{ex} =360nm y la longitud de onda de emisión fue de λ_{em} =440nm, según lo indica el espectro de emisión del mantGDP.

Una vez medidas las proteínas en estado basal, fue agregado a los pocillos correspondientes 2 μ l de EDTA 500mM pH=8, quedando una concentración final de 20mM (queda el doble de concentración que el MgCl₂ para asegurarse que se titule este ion). Se realizaron otra vez las mediciones, con el objeto de evaluar el intercambio en presencia de EDTA.

13.4.2 Ensayo con inmunoprecipitado de N-Epac

La reacción de intercambio fue realizada de manera similar a los ensayos con EDTA, pero en un volumen final de 200 μ l:

- 50 μ l de buffer reacción (MgCl₂ final queda 10mM)
- 2 μ l de proteína Rac o Cdc42 (aproximadamente 1 μ M)
- 1 μ l de GDP 100mM (2mM final)
- 47 μ l de H₂O

Una vez medido, y verificado que la fluorescencia se mantiene constante, se introdujo en los pocillos los eluidos correspondientes a los inmunoprecipitados de N-Epac y de las células no transfectadas (mock). Se volvieron a medir las muestras.

Resultados

El conjunto de resultados presentes en esta tesis fueron obtenidos a partir de la hipótesis de que Rap1b, una pequeña proteína G de la familia de Ras, pudiese de alguna manera señalizar hacia JNK, una MAPK que responde frente a stress celular, entre otras cosas.

Esta hipótesis surge de la observación de que células Swiss 3T3, que sobre-expresaban establemente Rap1b, poseen un fenotipo diferente al de las mismas células que no sobre-expresan Rap1b, mostrando una mayor adherencia a la placa de cultivo.

Las células en cultivo, son capaces de adherirse a la placa de cultivo vía integrinas. Los puntos de contacto no aparecen en toda la superficie celular, sino que hay sitios específicos de anclaje, llamados contactos focales. La tinción de vinculina (una proteína marcadora de contactos focales) de las células transfectadas con Rap1b, muestra que las células que sobre-expresan Rap1b, poseen una mayor cantidad de contactos focales (figura 15).

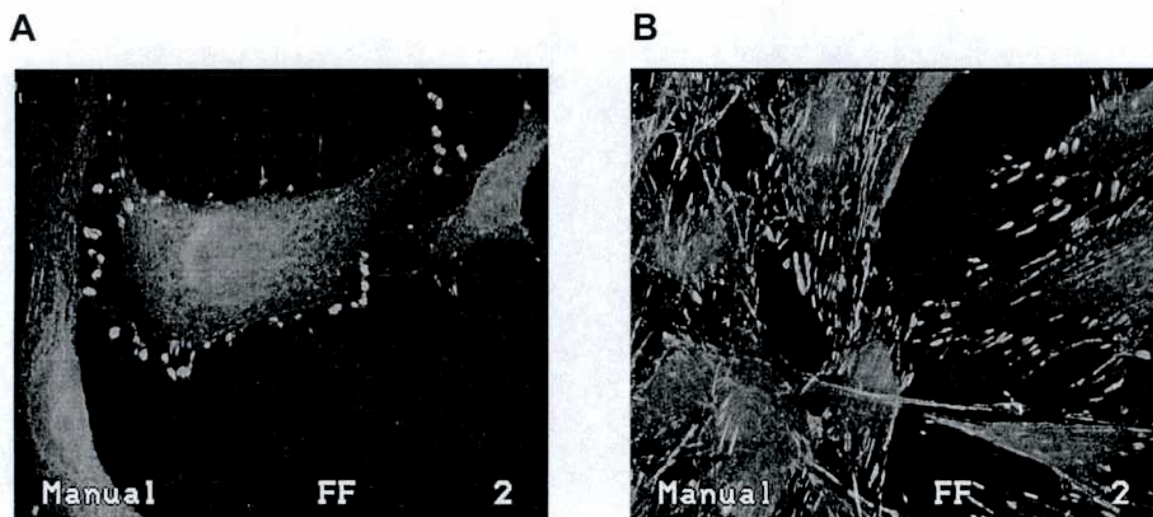


Figura 15: Formación de fibras de stress y contactos focales en células Swiss 3T3. Inmunohistoquímica, revelando la presencia de vinculina, un marcador de contactos focales. **A)** Células transfectadas establemente con un plásmido control. **B)** Células transfectadas establemente con la proteínas Rap1b

¿Cómo es entonces que surge la hipótesis de activación de Rap a JNK ? Dos son las evidencias experimentales con las que contábamos:

- a) Las células Swiss transfectadas establemente con Rap1, muestran una morfología similar a la que se observa al sobre-expresar Rho/Rac/Cdc42 en las mismas células (166, 167).
- b) La activación de la familia Rho de pequeñas proteínas G (Rho, Rac y Cdc42) es capaz de activar a JNK (36).
- c) La familia Rho de proteínas G, al ser activada, induce un re-arreglo del citoesqueleto como el observado en las células Swiss 3T3 (147).

La hipótesis de activación de Rap1 a JNK, a partir de observaciones en Swiss 3T3, no podría ser abordada en esta línea celular, ya que son células muy refractarias a incorporar ADN en ensayos de transfecciones transientes. Con el objeto de practicar ensayos bioquímicos, en los cuales podamos comprobar la hipótesis planteada, decidimos trabajar con células HEK 293T como modelo, un tipo celular fácilmente transfectable y extensamente utilizado para caracterizar relaciones entre moléculas transductoras de señales.

1. *Epac activa caminos de transducción de señales a JNK, independiente de Rap*

1.1 *Rap1 G12V, una forma activa de Rap1, es incapaz de activar a JNK*

El método utilizado en el laboratorio para estudiar la pertenencia de una molécula a un camino de transducción de señales es la transfección transiente. De esta manera, la sobre-expresión de proteínas en la célula, nos informa si hay alguna relación entre proteínas transfectadas o entre proteínas transfectadas y proteínas celulares.

El primer ensayo que realizamos para observar si Rap era capaz de señalizar a JNK, fue sobre-expresar transientemente en células HEK una mutante activa de Rap. Si esta mutante era capaz de activar a esta MAPK, deberíamos ver al cabo de 48hs de transfección, que JNK se encuentra mas activa en comparación con células transfectadas con igual cantidad de plásmido vacío (control negativo).

Las proteínas G ciclan entre un estado unido a GDP, inactivo y un estado GTP, activo. La baja actividad GTPasa intrínseca de las pequeñas proteínas G, es estimulada por la acción de proteínas GAPs, que vuelven a llevar a la proteína G a un estado unido a GDP, para un posterior ciclo de activación.

La mutación G12V no es capaz de hidrolizar GTP, ni es sensible a la acción de proteínas GAPs. La pequeña proteína G permanece en un estado activo, aumentando el estado estacionario unido a GTP. Decidimos utilizar esta mutante para verificar si Rap activa (Rap-GTP) era capaz de activar a JNK. Como muestra la figura 16, la sobreexpresión de HA-RapG12V en células HEK, es incapaz de promover la activación de JNK.

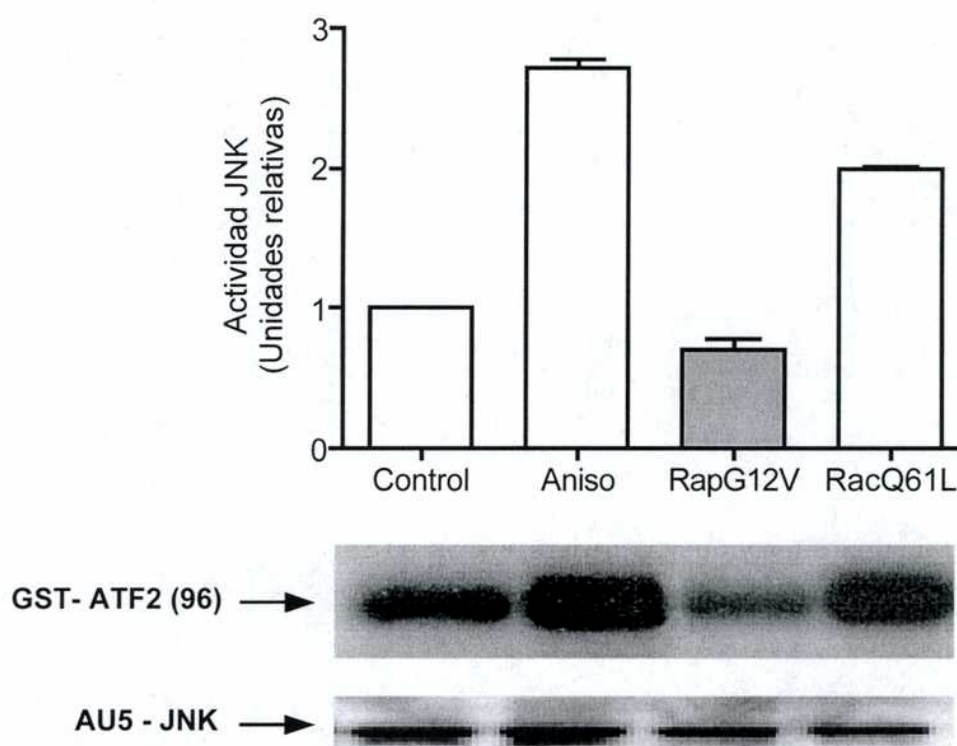


Figura 16: Una forma constitutivamente activa de Rap no es capaz de activar JNK. Se co-transfectó AU5 JNK con HA RapG12V o Rac Q61L. Al cabo de 48hs, las células HEK 293T fueron estimuladas con Anisomicina 10µg/ml por 20', como control positivo, y lisadas. Posteriormente se midió actividad JNK en los inmunoprecipitados con un anticuerpo anti AU5. Se muestra un gel representativo de un resultado que fue obtenido tres veces independientemente. **Gel superior.** Las barras corresponden al promedio de los valores obtenidos de estos experimentos. **Gel inferior.** Western blot contra AU5 muestra que las diferencias de actividad no son debidas a diferencias en la expresión de AU5 JNK

La falta de activación puede deberse a la no-pertenencia a la cascada que señala hacia JNK o a que el constructo utilizado no expresa Rap, sin embargo el WB de la figura 17 muestra que la proteína HA-RapG12V se expresa correctamente.

Control HA-RapG12V

Figura 17: Expresión de HA-RapG12V. Lisado total de las células transfectadas en el ensayo de la figura 16. El ensayo de Western Blot con un anticuerpo anti HA, muestra la expresión de HA Rap1 G12V

La activación de JNK fue medida por su capacidad de fosforilar un sustrato (GST-ATF2) en presencia del nucleótido ATP, marcado con el isótopo ^{32}P en el fosfato γ . La idea básica del ensayo, es que si JNK se encuentra activa, tiene una mayor capacidad de fosforilar un sustrato *in vitro*: por esto, una mayor marca radioactiva en la banda de GST-ATF2, es indicativo de mayor actividad JNK.

Rac1 Q61L es una mutante de Rac1, que al igual que la mutación G12V, le confiere una deficiente actividad GTPasa, aumentando los niveles de Rac1 en estado activo. Dado que Rac unido a GTP es capaz de señalizar a JNK, la transfección de esta proteína mutante fue utilizada como control positivo, mostrando una activación de mas del doble con respecto al control.

En el panel inferior, un Western Blot contra AU5-JNK, muestra que la diferencia de actividad no se debe a diferencias de expresión de JNK, sino a la presencia de un factor activador.

Dada la incapacidad de la mutante Rap G12V de activar a JNK, este resultado es sugerente de la independencia de la señalización de Rap hacia esta MAPK.

1.2 El factor intercambiador Epac activa JNK

Un modo alternativo de estudiar la pertenencia de una pequeña proteína G a un camino de transducción de señales, es sobre-expresando un GEF correspondiente, el cual debería activar la proteína G endógena.

Decidimos transfectar a Epac, un factor intercambiador de GDP/GTP (GEF) específico de la familia Rap y cuya actividad GEF se evidencia exclusivamente en presencia de AMPc.

Como control positivo, utilizamos Anisomicina, un inhibidor de la síntesis proteica. Además Dbl, un GEF conocido de Rac/Cdc42, fue utilizado como un

intercambiador capaz de activar a JNK, a través de promover la carga de GTP sobre estas pequeñas proteínas G endógenas.

La figura 18, muestra que la sobre-expresión de Epac, es capaz de activar a JNK al mismo nivel que Dbl, indicando la participación de este GEF en la activación de JNK.

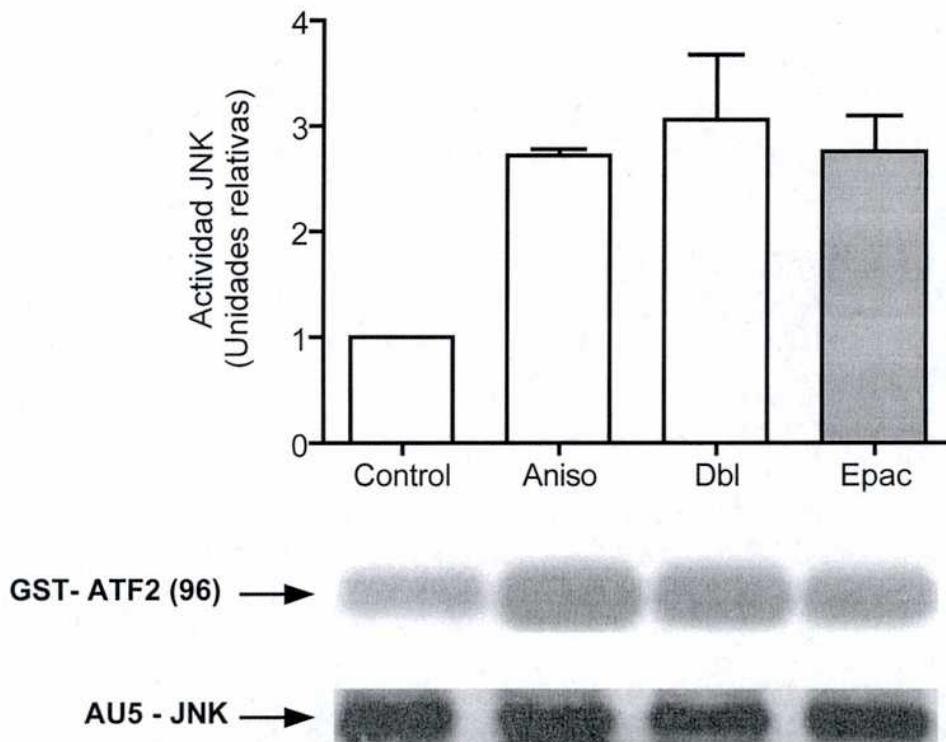


Figura 18. Epac activa JNK. Se co-transfectó AU5 JNK con Epac, Dbl o plásmidos controles. Al cabo de 48hs, las células HEK 293T fueron estimuladas con Anisomicina 10µg/ml por 20' como control positivo y lisadas. Posteriormente se midió actividad JNK en los inmunoprecipitados con un anticuerpo anti AU5. Se muestra un gel representativo de un resultado que fue obtenido tres veces independientemente. **Gel superior.** Las barras corresponden al promedio de los valores obtenidos de estos experimentos. **Gel inferior.** Western blot contra AU5 muestra que las diferencias de actividad no son debidas a diferencias en la expresión de AU5 JNK

Este resultado sugiere que Epac, podría estar señalizando hacia JNK, dado que su sobre-expresión es capaz de aumentar los niveles de JNK activa.

Si tomamos en cuenta los resultados obtenidos por la activación de JNK de las figuras 16 y 18, podemos elaborar dos posibles especulaciones para explicar estos resultados:

- Epac podría estar cargando GTP sobre Rap, y además activando otra vía necesaria para la activación de JNK. En este contexto, Rap sería necesario, pero no suficiente para la activación de JNK
- La activación de JNK debida a la sobre-expresión de Epac es independiente de la activación de Rap y estaría activándose por una vía diferente.

Ambas hipótesis están esquematizadas en la figura 19.

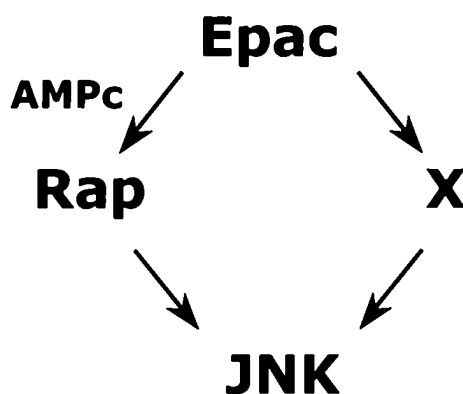


Figura 19: Posibles mecanismos de activación de Epac a JNK. La sobre-expresión de Epac podría estar activando a Rap, y esta señalizando hacia JNK. Alternativamente, la activación de JNK, podría ser independiente de la activación de Rap, por un mecanismo aun no descrito.

Dos evidencias experimentales adicionales, nos indicaban que la hipótesis mas probable, era la que sugería la independencia de la vía de Rap, en la activación Epac-JNK:

- Los ensayos en los cuales Epac activa JNK, no fueron realizados en presencia de agonistas que incrementasen los niveles intracelulares de AMPc. Dada la necesidad AMPc por Epac para el intercambio sobre Rap (como será observado en la figura 27), concluimos que los niveles de Rap-GTP eran bajos al sobre-expresar Epac.

- b) En ensayos realizados por nosotros y por otros grupos de investigación (51, 71), la presencia de factores que incrementan AMPc, como es el caso de FK, bajan los niveles de JNK activa. Esto evidencia que en condiciones en las cuales Epac/FK activa a Rap, JNK es inhibida (como se observa en la figura 20).

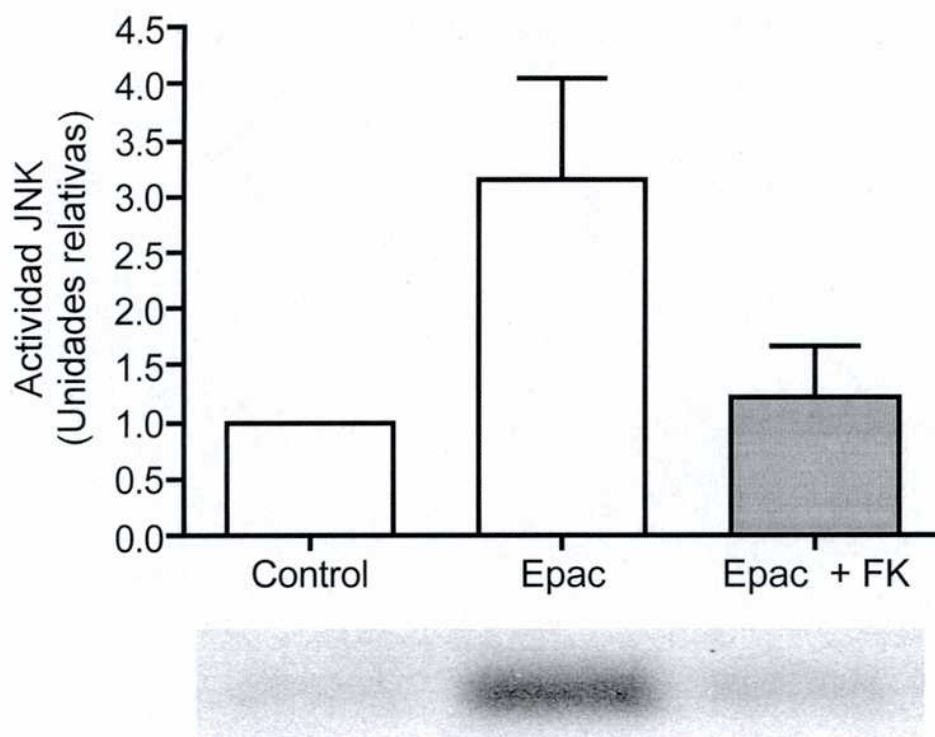


Figura 20: El incremento de los niveles de AMPc inhibe la activación de JNK. Células HEK 293T, fueron transfectadas con Epac o con un plásmido control. Al cabo de 48hs, fueron estimuladas con FK 20 μ M por 20'. Terminada la inducción, las células fueron lisadas, y se procedió a medir la actividad de AU5-JNK de similar manera que en los ensayos anteriores. Las barras son indicativas de los promedios de tres experimentos independientes

1.3 Epac FL y Δ Epac activan a JNK al mismo nivel

Epac presenta varios dominios característicos, dentro de los cuales se encuentra el dominio CBD (cAMP binding domain) en su región N-terminal, responsable de la unión del AMPc.

Con la unión de este nucleótido, se induce el cambio conformacional necesario para intercambiar GDP/GTP sobre Rap. Es decir, que en la porción N-terminal se encuentra la región reguladora de Epac. Básicamente, el cambio conformacional inducido, promueve la liberación del dominio GEF, en la región C-terminal.

Δ Epac es una mutante de Epac que carece de la región reguladora N-terminal. Al no tener la región reguladora, no es necesaria la presencia de AMPc para el intercambio sobre Rap, dando como resultado una proteína constitutivamente activa en el intercambio.

Si el intercambio de Epac sobre Rap es necesario para la activación de JNK, deberíamos ver una mayor activación al comparar la sobre-expresión de Δ Epac con respecto a Epac FL ("full length"). Como se ve en la figura 21, no se evidencia una mayor activación de Δ Epac dentro de una curva lineal de activación.

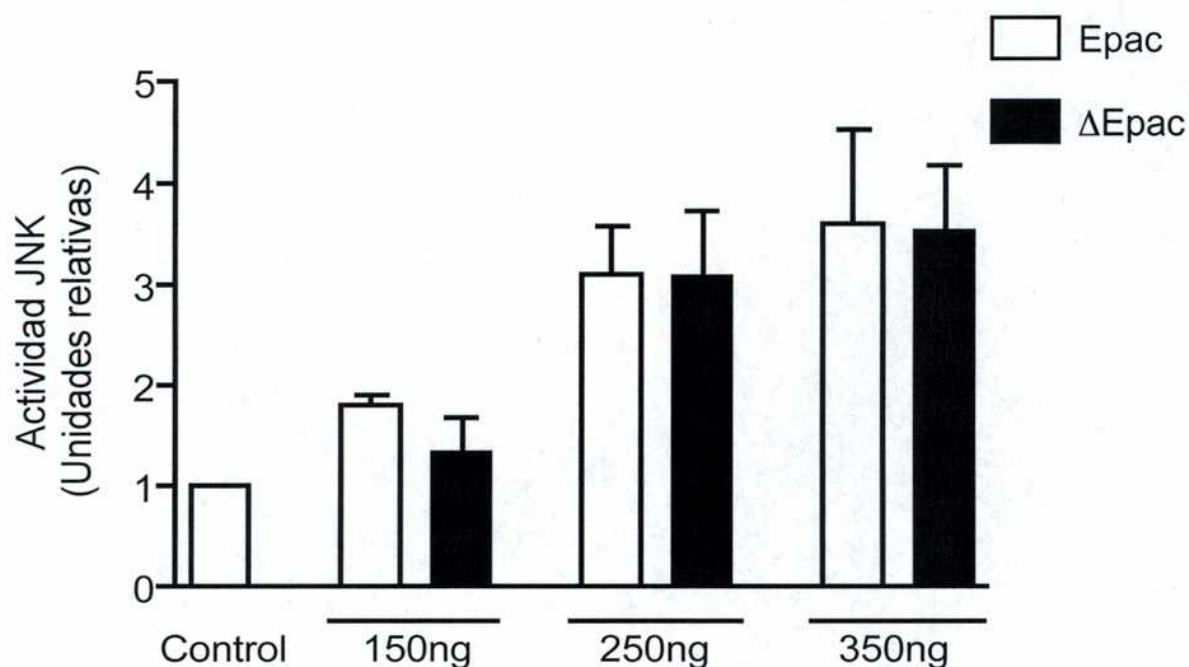


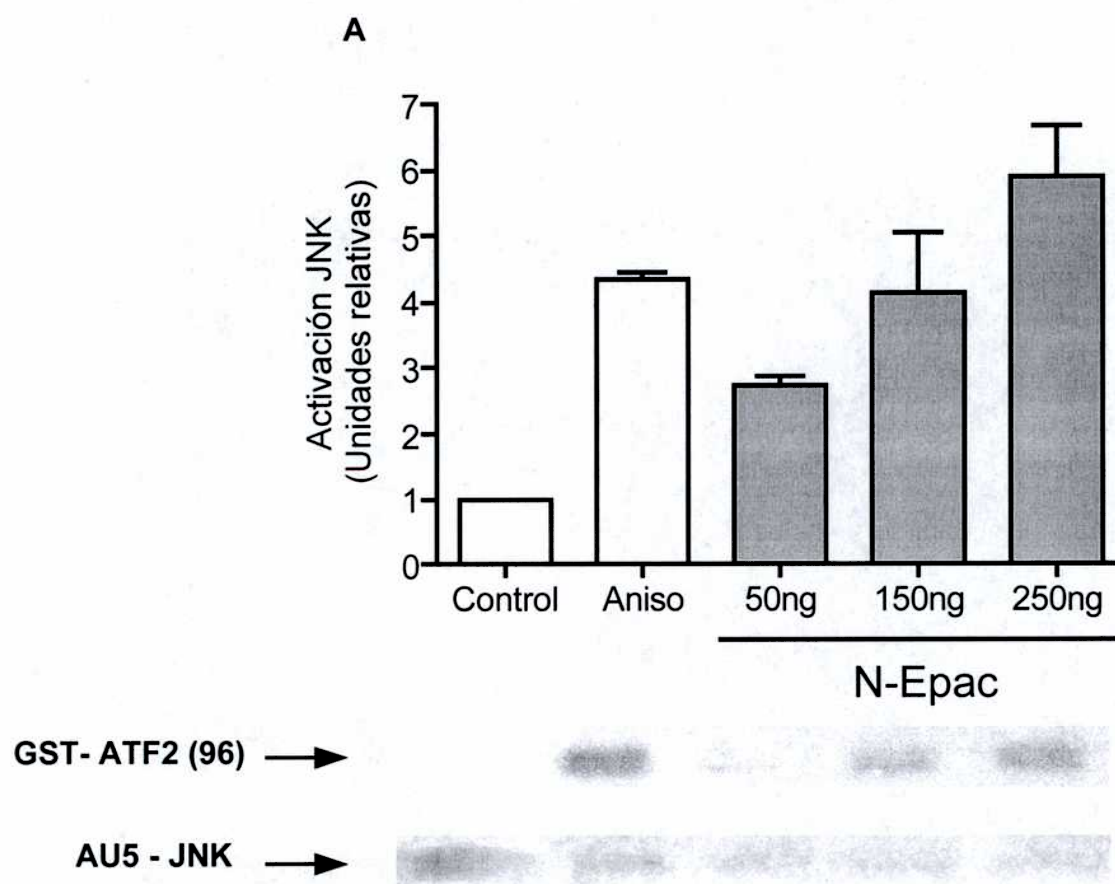
Figura 21: Dosis respuesta de la activación de JNK por Epac y Δ Epac. Células HEK 293T fueron transfectadas transitoriamente con cantidades crecientes de plásmidos que expresan las proteínas Epac y Δ Epac, junto con AU5-JNK. La medición de la actividad JNK fue realizada de similar forma que la descrita con anterioridad. Las barras representan el promedio de tres experimentos realizados en forma independiente

Esto resultado es indicativo de que la actividad intercambiadora de GTP sobre Rap, no estaría involucrada en el proceso de activación de JNK.

1.4 La región N-terminal de Epac, es responsable de la activación a JNK

Si la actividad intercambiadora de Epac sobre Rap no estaba involucrada en la activación de JNK, una mutante de Epac carente del dominio intercambiador, debería también ser capaz de activar a esta MAPK, al igual que Epac FL. Por otro lado, si la actividad GEF sobre Rap fuese necesaria, una mutante de Epac, carente del dominio GEF, no podría señalizar hacia JNK

Construimos una mutante de Epac que no poseía el dominio GEF, pero si la región regulatoria N-terminal. Como se ve en la figura 22, la mutante N-Epac es capaz de activar a JNK de una manera dosis dependiente.



B

Myc N-Epac →



Figura 22: La región N-terminal de Epac es la responsable de la activación de JNK. A) Células HEK 293T fueron transfectadas transientemente con AU5-JNK y cantidades crecientes de un plásmido que expresa la proteína N-Epac. **Panel superior.** Se observa la actividad quinasa en respuesta a cantidades crecientes del plásmido myc N-Epac, medida de forma similar a experimentos anteriores. Las barras muestran el promedio de tres experimentos realizados independientemente. **Panel inferior.** El WB de AU5-JNK muestra similares patrones de expresión en todos los tratamientos. **B)** WB contra myc mostrando la expresión de la mutante N-Epac, correspondiente a las tres cantidades de plásmido utilizadas en A).

Este resultado, es para nosotros, la prueba mas fuerte de que la función intercambiadora sobre Rap, no está involucrada en la señalización hacia JNK, confirmando el resultado obtenido en la figura 21.

1.5 RapGAP y RapN17: dos proteínas inhibitorias sobre la activación de Rap

Una tercera alternativa para estudiar la pertenencia de una pequeña proteína G a un camino de transducción de señales, es usar proteínas inhibitorias.

Si la activación de Rap era necesaria por Epac para activar a JNK, sobre-expresando proteínas que tuviesen una función inhibitoria sobre esta, deberían bloquear dicha activación. Dos proteínas inhibitorias fueron ensayadas:

- a) La proteína RapGAP, cuya unión a Rap produce un incremento de la actividad GTPasa de Rap, y acelera la hidrólisis del GTP, volviendo a Rap a su estado GDP inactivo.
- b) La proteína mutante de Rap, Rap S17N, donde la mutación serina por asparragina produce una menor afinidad por el Mg^{++} . Sin este ion, la pequeña proteína G no puede soportar la densidad electrónica negativa de los grupos fosfatos, y el nucleótido se libera. La proteína libre de nucleótido, posee ahora una gran afinidad por factores intercambiadores, de esta manera titulándolos, impidiendo que puedan activar a Rap.

En la figura 23, se observa que ambas proteínas son expresadas correctamente. El siguiente paso consistía en ensayar estas proteínas inhibitorias en la activación de JNK.

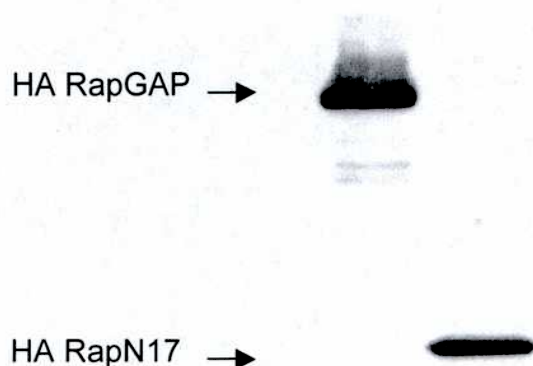


Figura 23: Expresión de HA-RapGAP y HA-RapN17. Lisado total de células transfectadas con HA-RapGAP y HA-RapN17, mostrando que ambas tienen un alto nivel de expresión. El ensayo de WB fue realizado revelado con un anticuerpo anti HA.

1.5.1 RapN17, pero no RapGAP, bloquea la activación de Epac a JNK

Como se observa en la figura 24, la activación de Epac a JNK es insensible a RapGAP, sugiriendo otra vez independencia de esta. Sin embargo, la mutante N17 si es capaz de inhibir la activación de JNK. Este dato, aparentemente contradictorio, podría explicarse dado que RapGAP es una proteína inhibitoria que actúa directamente sobre Rap, mientras que RapN17 bloquea la señalización a Rap al unirse a factores intercambiadores, como sería en este caso, Epac.

Como en general, las mutantes S17N de pequeñas proteína G, se unen a los dominios GEFs de factores intercambiadores, decidimos realizar la misma serie de ensayos, pero en lugar de activar JNK con Epac, lo hicimos con N-Epac: un fuerte activador de JNK, que carece del dominio intercambiador.

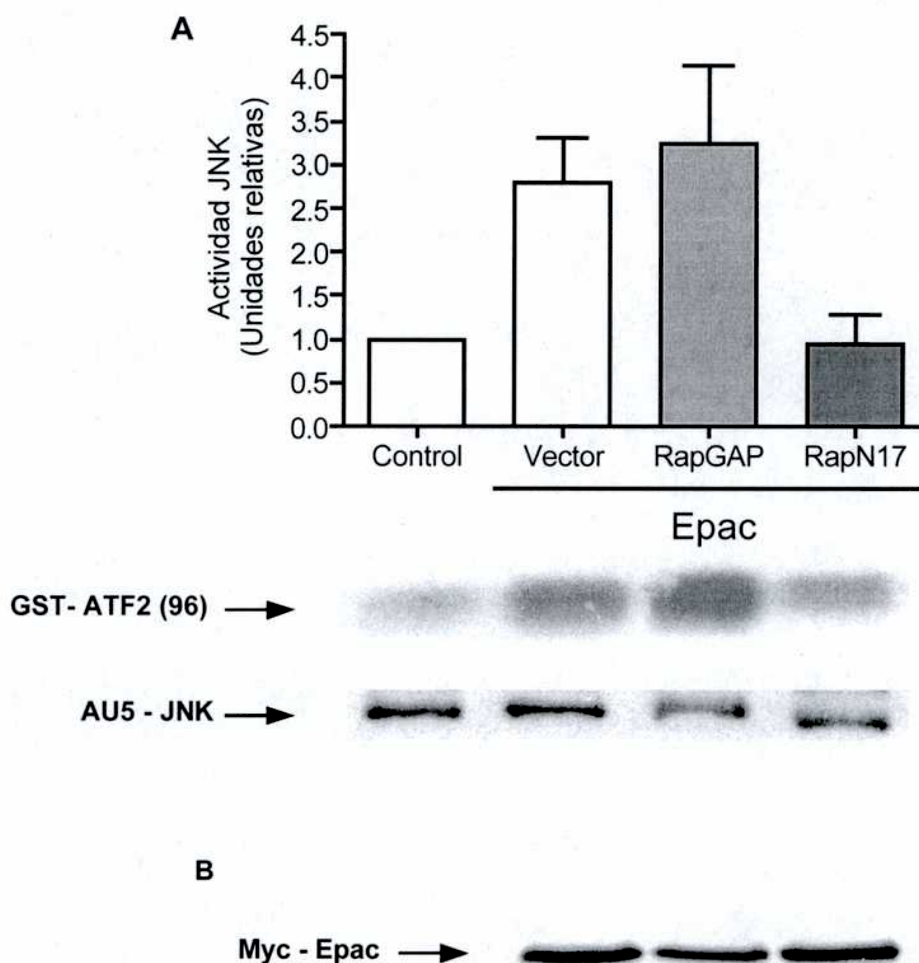


Figura 24: RapN17, pero no RapGAP, es capaz de bloquear la activación de Epac a JNK. A) Células HEK 293T fueron transfectadas transientemente con un plásmido que expresa AU5-JNK, y myc-Epac, además de las proteínas HA-RapGAP y HA-RapN17 según corresponde. **Panel superior.** Las barras corresponden al promedio de tres ensayos realizados en forma independiente. **Panel inferior.** El WB de AU5-JNK muestra similares patrones de expresión en todos los tratamientos. B) WB contra myc, mostrando que la expresión de myc Epac es similar en todos los tratamientos.

El resultado de la sobre-expresión de RapGAP indicaría nuevamente la independencia de la activación de Rap, mientras que el resultado con la mutante RapN17, sería el producto del bloqueo de Epac, a través de su dominio GEF.

1.5.2 RapN17 y RapGAP no bloquean la activación de N-Epac a JNK

La inhibición observada en el punto anterior, podría ser por la unión de RapN17 al dominio intercambiador de Epac, de esta forma impidiendo que Epac interactúe con una potencial molécula activadora en la vía de JNK, sin representar un bloqueo específico de la vía Epac-JNK. Si los mismos experimentos se realizaran con N-Epac, una mutante que carece de dominio intercambiador, deberíamos ver que dicha activación es insensible tanto a RapGAP como a RapN17.

Como se ve en la figura 25, la activación mediada por N-Epac a JNK es insensible a la sobre-expresión tanto de RapGAP como de RapN17, sugiriendo una vez más, que la vía de Epac-Rap no está involucrada en la activación de JNK.

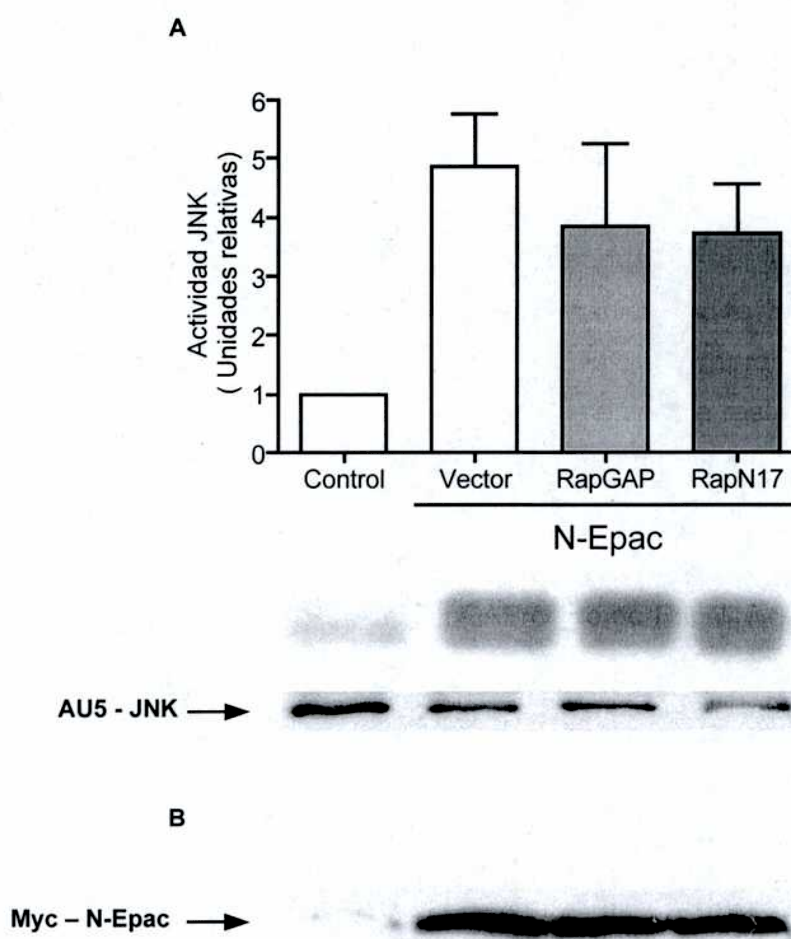


Figura 25: RapN17 y RapGAP, son incapaces de bloquear la activación de N-Epac a JNK. A) Células HEK 293T fueron transfectadas transientemente con un plásmido que expresa AU5-JNK, y myc N-Epac, además de las proteínas HA-RapGAP y HA-RapN17 según corresponde. **Panel superior.** Las barras corresponden al promedio de tres ensayos realizados en forma independiente. **Panel inferior.** El WB de AU5-JNK muestra similares patrones de expresión en todos los tratamientos. B) WB contra myc, mostrando que la expresión de myc N-Epac es similar en todos los tratamientos.

A diferencia del resultado anterior, RapN17 no es capaz de bloquear a la mutante N-Epac, por carecer del dominio GEF. Esto es indicativo de que el dato anterior era específico solo para Epac FL, y no la mutante N-Epac. El presente resultado, sugiere que ambas proteínas inhibitorias (RapGAP y RapN17), mostrarían la independencia de la activación de Rap, en la señalización de Epac a JNK.

1.6 Activación de Rap: Experimentos de carga de GTP

Como se mencionó anteriormente en la sección resultados, el hecho de que la sobre-expresión de Epac activase a JNK, en ausencia de agonistas que aumentaran los niveles de AMPc intracelular, nos daba la idea de que Rap no estaba involucrado. Para comprobar esto, realizamos ensayos de activación de Rap. La idea general es poder comparar la proporción de Rap unida a GTP entre distintos tratamientos, ya sea por agonistas o por sobre-expresión de proteínas y correlacionarlo con los datos obtenidos para la actividad de JNK.

Ral-GDS es una proteína efectora de Rap, que se une solamente a Rap unido a GTP (62). GST-RalGDS es una proteína de fusión que tiene el mínimo dominio de interacción de RalGDS con Rap, llamado RBD (Rap binding domain). Utilizando GST-RalGDS unida a una matriz de glutatión-sefarosa, es posible “pescar” a Rap unida a GTP. Como ejemplo, en figura 26, se muestra un lisado celular el cual fue cargado con GDP o GTP γ S. Esto significa que todas las proteínas G, van a tener unido GTP γ S. Este lisado, fue posteriormente incubado con GST-RalGDS y un western blot con anticuerpo anti-Rap fue realizado, observándose que GST-RalGDS es capaz de discriminar a Rap unido a GDP o GTP, validando el método utilizado.

LISADO GDP GTP γ S



PULL-DOWN RalGDS

Figura 26. Puesta a punto de ensayos de activación de Rap. Lisados celulares fueron cargados con GDP o GTP γ S e incubados con GST-RalGDS. La presencia de Rap unida a RalGDS (activa), fue revelada mediante un ensayo de WB, utilizando un anticuerpo anti Rap. Una alícuota de lisado total fue corrida para verificar la expresión de Rap endógena.

Este resultado valida el método de medición de activación de Rap, ya que la proteína purificada GST-RalGDS es capaz de discriminar a Rap unida a GTP de la unida a GDP.

En nuestro método experimental, no estaba demostrado formalmente que la sobre-expresión de Epac, en ausencia de factores que incrementasen AMPc, era incapaz de activar a Rap.

En la figura 27 se observa que no es suficiente la sobre-expresión de Epac para activar a Rap, sino que este GEF puede activar a Rap solo en presencia de altos niveles de AMPc. Si tomamos en cuenta que los ensayos de activación de JNK (figura 18), fueron realizados en condiciones equivalentes a la calle 2 del presente ensayo, podemos sugerir que Rap se encontraba en estado inactivo, unido a GDP.

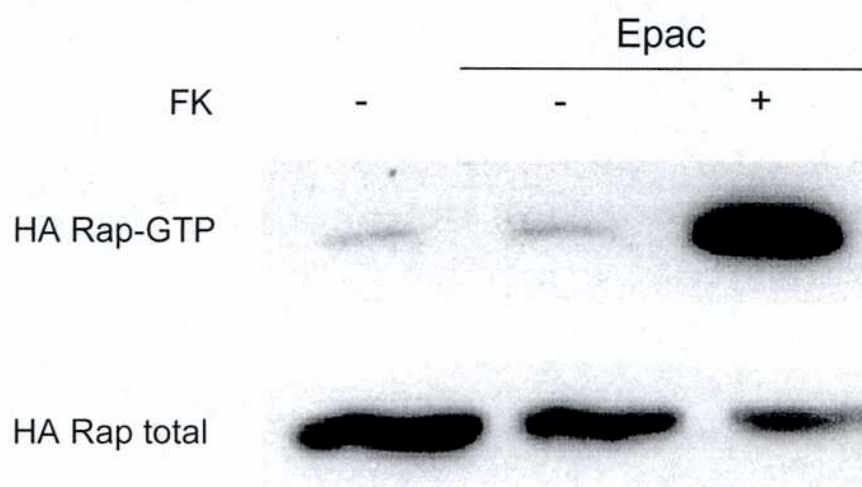


Figura 27: La activación de Rap mediada por Epac es estrictamente dependiente de la presencia de AMPc. Células transfectadas con HA-Rap1 y myc-Epac según corresponda, fueron estimuladas o no con FK 20μM por 20'. **Panel superior.** Ensayo de activación de Rap con proteína GST-RalGDS. **Panel inferior.** WB revelando Rap total, mostrando que los niveles de expresión son similares en todos los tratamientos. El ensayo fue revelado con anticuerpo HA.

El presente resultado refuerza la hipótesis de la independencia de Rap, ya que muestra que en condiciones en las que Epac activa a JNK, Rap permanece en estado inactivo, unido a GDP.

Otra afirmación que debíamos corroborar, era que a diferencia de Epac FL, ΔEpac era una mutante constitutivamente activa en el intercambio de nucleótido para Rap, sin ser necesaria la unión de AMPc. En la figura 28, se compara la activación de Rap al sobre-expresar Epac FL con ΔEpac.

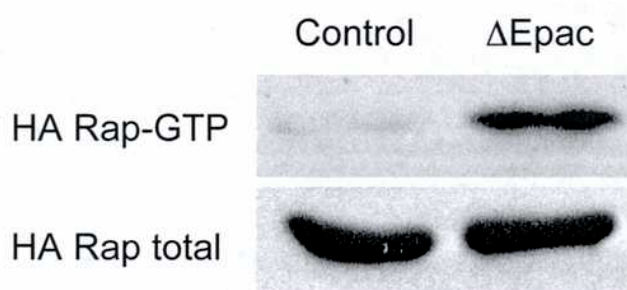


Figura 28. La mutante ΔEpac se comporta constitutivamente activa en el intercambio sobre Rap. Células HEK fueron transfectadas con HA-Rap WT y la mutante ΔEpac o un plásmido control. Al cabo de 48hs, las células fueron lisadas. **Panel superior.** Ensayo de activación de Rap con proteína GST-RalGDS. **Panel inferior.** WB revelando Rap total, mostrando que los niveles de expresión son similares en todos los tratamientos. El ensayo fue revelado con anticuerpo HA.

Este resultado complementa el obtenido en la figura 21, ya que confirma que Δ Epac, es efectivamente, una mutante activa de Epac en el intercambio sobre Rap.

N-Epac, una mutante de Epac que carece del dominio intercambiador, no debería ser capaz de cargar GTP sobre Rap. En la figura 29, se observa que N-Epac no solo no activa Rap, sino que incluso su sobre-expresión es inhibitoria, de una manera dosis-dependiente.

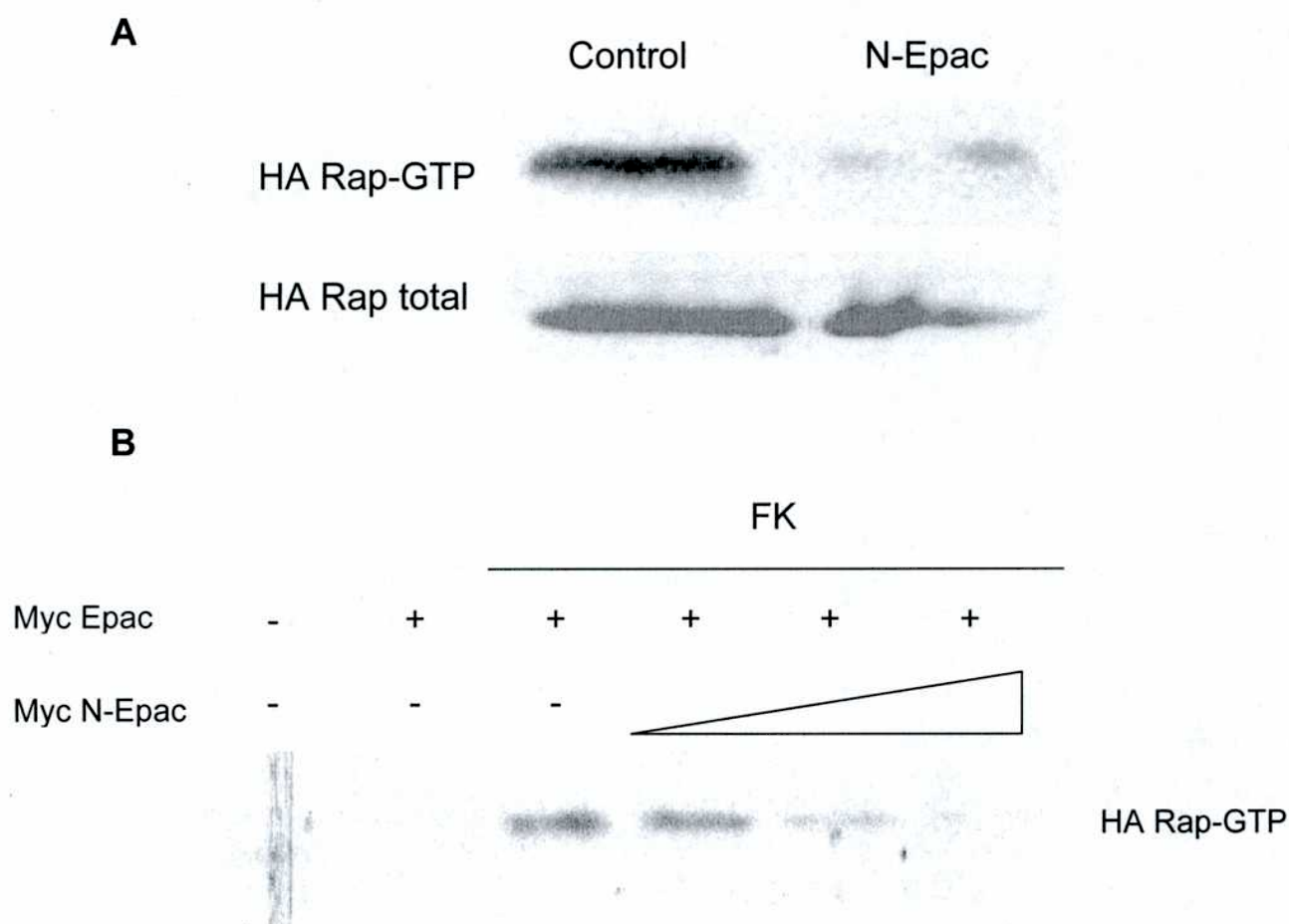


Figura 29. La mutante N-Epac inhibe el intercambio sobre Rap. **A)** Células HEK 293T fueron transfectadas con HA-Rap WT, en conjunto con N-Epac y un plásmido control. **Panel superior.** Ensayo de activación de Rap con proteína GST-RalGDS. **Panel inferior.** WB revelando Rap total, mostrando que los niveles de expresión son similares en todos los tratamientos. **B)** Células HEK 293T fueron transfectadas con HA-Rap WT, en conjunto con Epac y cantidades crecientes de la mutante N-Epac según corresponda. Al cabo de 48hs, las células fueron estimuladas con FK 20 μ M por 20' y lisadas. Se midió activación de Rap con la proteína GST-RalGDS. Ambos ensayos fueron revelados con anticuerpo anti HA.

La incapacidad de la mutante N-Epac de activar a Rap, refuerza la hipótesis de independencia de Rap, dado que N-Epac es capaz de activar a JNK, al mismo nivel que Epac FL.

Como se mencionó con anterioridad, la sobre-expresión de RapGAP debería aumentar la actividad GTPasa de Rap, incrementando la tasa de hidrólisis de GTP. En la figura 30, se observa que la activación de Rap mediada por Δ Epac es inhibida por la expresión de RapGAP.

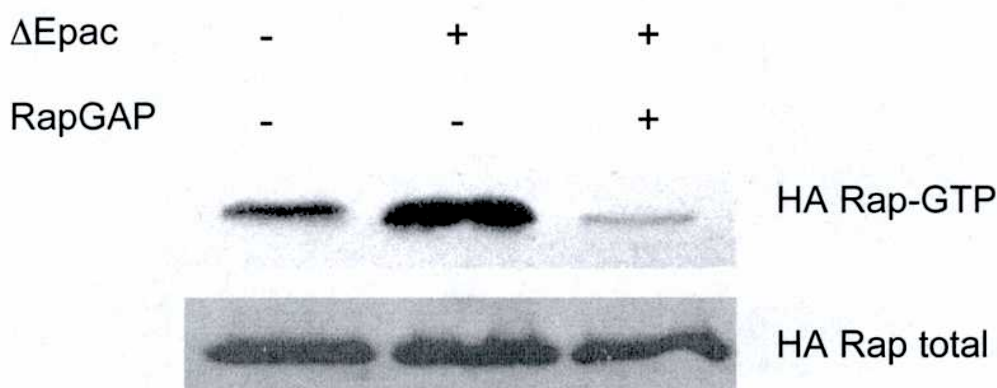


Figura 30. La proteína RapGAP disminuye los niveles de Rap-GTP. Células HEK fueron transfectadas con HA-Rap WT, la mutante Δ Epac y la proteína RapGAP, según corresponda. Al cabo de 48hs, las células fueron lisadas. **Panel superior.** Ensayo de activación de Rap con proteína GST-RalGDS. **Panel inferior.** WB revelando Rap total, mostrando que los niveles de expresión son similares en todos los tratamientos. El ensayo fue revelado con anticuerpo HA.

La capacidad de RapGAP de inhibir el intercambio sobre Rap, en conjunto con el resultado de que la activación de Epac a JNK no es inhibida por RapGAP (figuras 24 y 25), confirmaría que Rap no es activada cuando Epac señala a JNK.

Todos estos ensayos, muestran la independencia de Rap en la activación de Epac a JNK y tienen como objetivo validar los ensayos de activación de JNK realizados con anterioridad.

2. Epac presenta dos dominios efectores claramente diferenciados

2.1 El dominio REM de Epac como posible responsable de la activación de JNK

Una vez confirmada la independencia de Rap y sabiendo que el dominio intercambiador de Epac no era necesario, decidimos buscar que región de Epac estaba involucrada en la activación a JNK. De los ensayos realizados con anterioridad, sabíamos que las mutantes Δ Epac y N-Epac eran capaces de activar a JNK al mismo nivel que Epac FL.

En la figura 31, se muestra que la superposición de ambas mutantes y la forma salvaje da como resultado el dominio REM (Ras exchange motif).

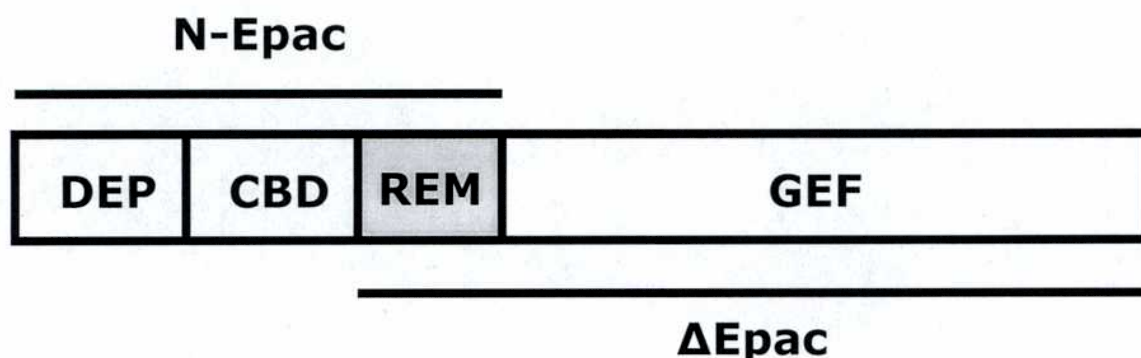


Figura 31. El dominio REM como posible responsable de la activación de Epac a JNK. Esquema de la proteína Epac, resaltando las mutantes N-Epac y Δ Epac, ambas fuertes activadoras de JNK. La superposición de ambas mutantes, da como resultado el dominio REM

Decidimos aislar mediante el uso de PCR el dominio REM. El dominio DEP también fue aislado como control. Ambos fragmentos fueron clonados en un vector de expresión eucariota, río abajo de un epítipo GST.

La razón por la cual utilizamos este epítipo, es que al ser fragmentos tan pequeños (8-10Kd), no lográbamos expresarlos establemente en células eucariotas. Por ejemplo, ninguno de estos dominios pudo ser expresado como proteína de fusión con el epítipo HA.

En la figura 32, se observa que tanto GST-REM (35Kd), como GST-DEP (38Kd) y GST vacío (27Kd) expresan correctamente y con el peso molecular esperado.

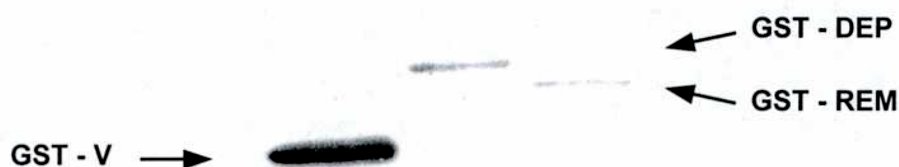


Figura 32. Expresión de los dominios DEP y REM aislados. Células HEK fueron transfectadas con plásmidos que expresan las proteína de fusión GST-DEP y GST-REM, así como la proteína GST sola. Al cabo de 48hs, las células fueron lisadas, y se realizó un ensayo de WB, revelado con anticuerpo anti GST.

En ensayos de transfección transiente, se puede observar en la figura 33, que el dominio REM activa JNK al mismo nivel que N-Epac, confirmando que REM sería el mínimo dominio de Epac involucrado en esta señalización.

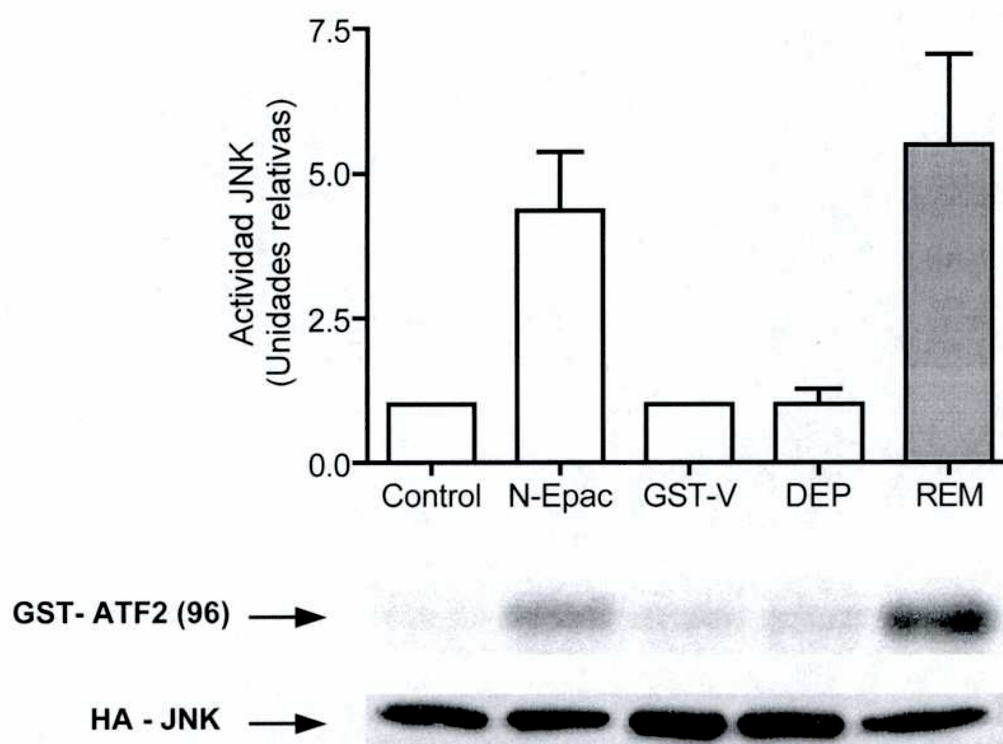


Figura 33. El dominio REM es capaz de activar a JNK. Células HEK fueron transfectadas con HA-JNK y plásmidos que expresan N-Epac, GST, GST-DEP y GST-REM según corresponde. Al cabo de 48hs, las células fueron lisadas y se midió actividad JNK. WB revelando el anticuerpo HA, muestra que las diferencias de actividad no son debidas a diferencias en la expresión de HA-JNK

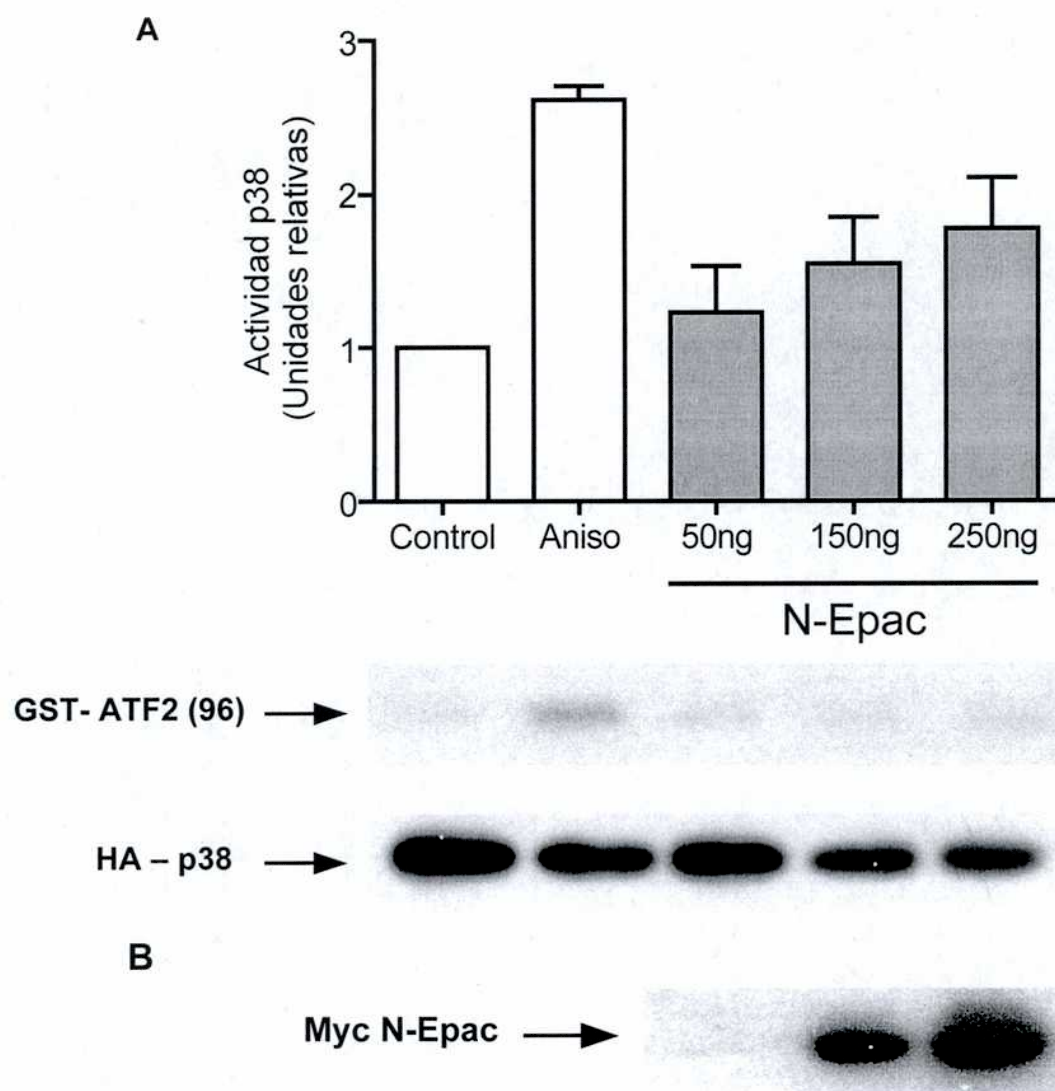
Este resultado demostraría, que además del dominio intercambiador (GEF), específico para el intercambio sobre proteínas Rap, el dominio REM de Epac también es capaz de transmitir señales.

3. Especificidad de la señalización de Epac

3.1 Epac es incapaz de activar a p38 MAPK

JNK es un miembro representativo de la familia de SAPKs (stress activated protein kinases). Otro miembro de esta familia, es p38, una MAPK cuya actividad, también es modulada frente a diversos tipos de stress.

Como un control de especificidad, decidimos ensayar si Epac era capaz de activar a p38 MAPK. Los resultados de la figura 34, muestran que los niveles de p38 MAPK activo no se ven modificados significativamente por la sobre-expresión de N-Epac, y que la expresión de p38 MAPK no varía al sobre-expresar de N-Epac. En paralelo, en la figura 34c, se muestra que bajo las mismas condiciones, N-Epac es capaz de incrementar los niveles de JNK.



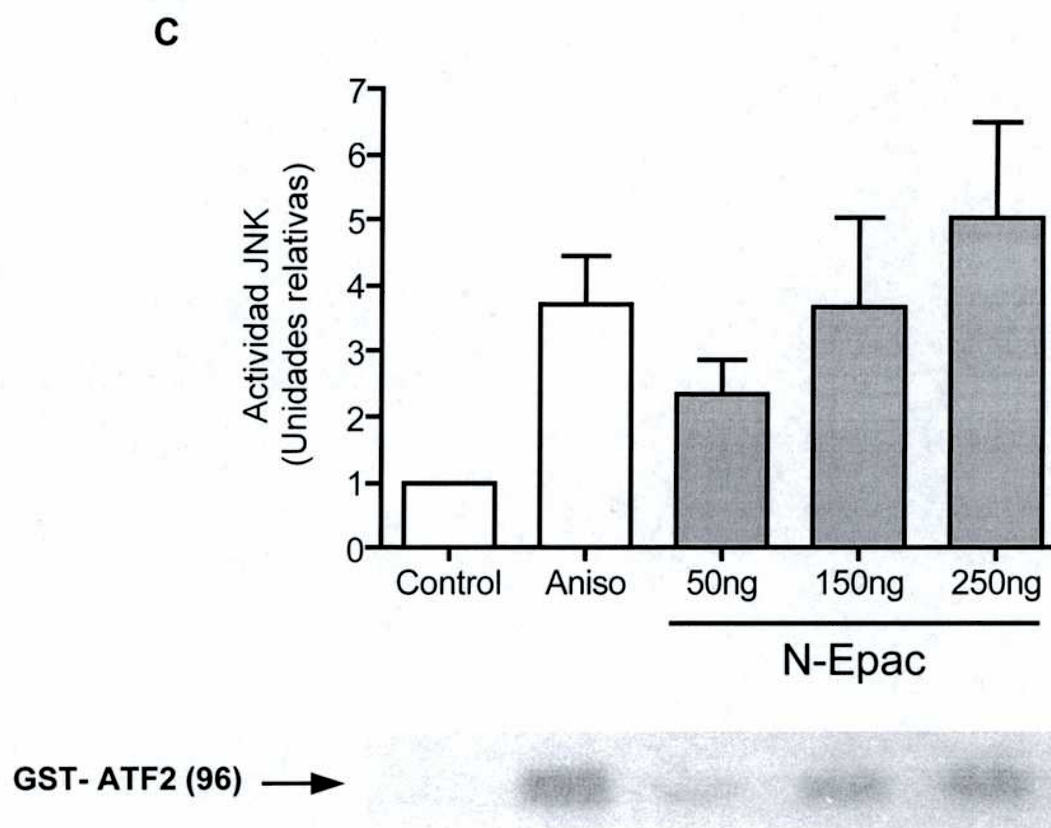


Figura 34. Epac no es capaz de activar a p38 MAPK. A) Células HEK 293T fueron transfectadas con un plásmido que expresa HA-p38 y cantidades crecientes de N-Epac. Al cabo de 48hs, las células fueron lisadas y se midió actividad p38. **Panel superior.** Las barras son el promedio de tres ensayos independientes. **Panel inferior.** WB revelando el anticuerpo HA, muestra que las diferencias de actividad no son debidas a diferencias en la expresión de HA-p38. **B)** Lisado total fue corrido y revelado con anticuerpo anti myc, mostrando la expresión de la mutante N-Epac **C)** En paralelo, el mismo ensayo fue realizado, utilizando HA-JNK en lugar de HA-p38.

Estos resultados sugieren que la activación mediada por Epac a JNK es específica de esta SAPK, y no un fenómeno resultante de stress inespecífico, generado tal vez, por la alta expresión de una proteína celular.

4. La activación de JNK por Epac no es suficiente para promover la actividad transcripcional

4.1 La activación de JNK mediada por Epac no es capaz de señalar hacia factores de transcripción como c-Jun o ATF-2

JNK fue descubierta como una MAPK, capaz de fosforilar al factor de transcripción c-Jun (157). La fosforilación de c-Jun en los residuos 63 y 73 produce la activación de este, aumentando la expresión de diversos genes blanco. Además de c-Jun, JNK es capaz de fosforilar y activar otros factores de transcripción de la familia AP-1, tales como JunB, JunD y ATF2 (84).

Si tenemos en cuenta estos datos, la activación de JNK por Epac, debería aumentar la expresión génica mediada por sustratos de JNK.

Ensayos de trans-activación fueron realizados para observar si la activación de JNK mediada por Epac, también era capaz de incrementar la actividad de los factores de transcripción c-Jun o ATF-2. Para tal fin, se utilizaron genes reporteros:

- a) pJUN-CAT (promotor de c-Jun unido al gen reportero CAT): este reportero permite medir la actividad de c-Jun y ATF2, entre otros miembros de la familia AP-1.
- b) GAL4-ATF2 (dominio de unión al ADN de GAL4 fusionado al dominio de activación de ATF2) + pGAL-CAT (secuencia de unión al ADN de GAL4 unida al gen reportero CAT): estas construcciones permiten medir la actividad de ATF-2

Los ensayos de trans-activación fueron realizados en células HEK 293T, transfectando transientemente las construcciones reporteras, junto con plásmidos que expresaban Epac. MLK-3, una MAPKKK que activa a JNK, fue utilizada como control positivo de trans-activación.

Si bien MLK-3 es capaz de activar los factor de transcripción ATF2 y c-Jun varias veces respecto del control, Epac no logra aumentar la actividad transcripcional de ninguno de los factores de transcripción ensayados (figura 35). Similares resultados fueron obtenidos para el factor de transcripción AP-1 (datos no mostrados).

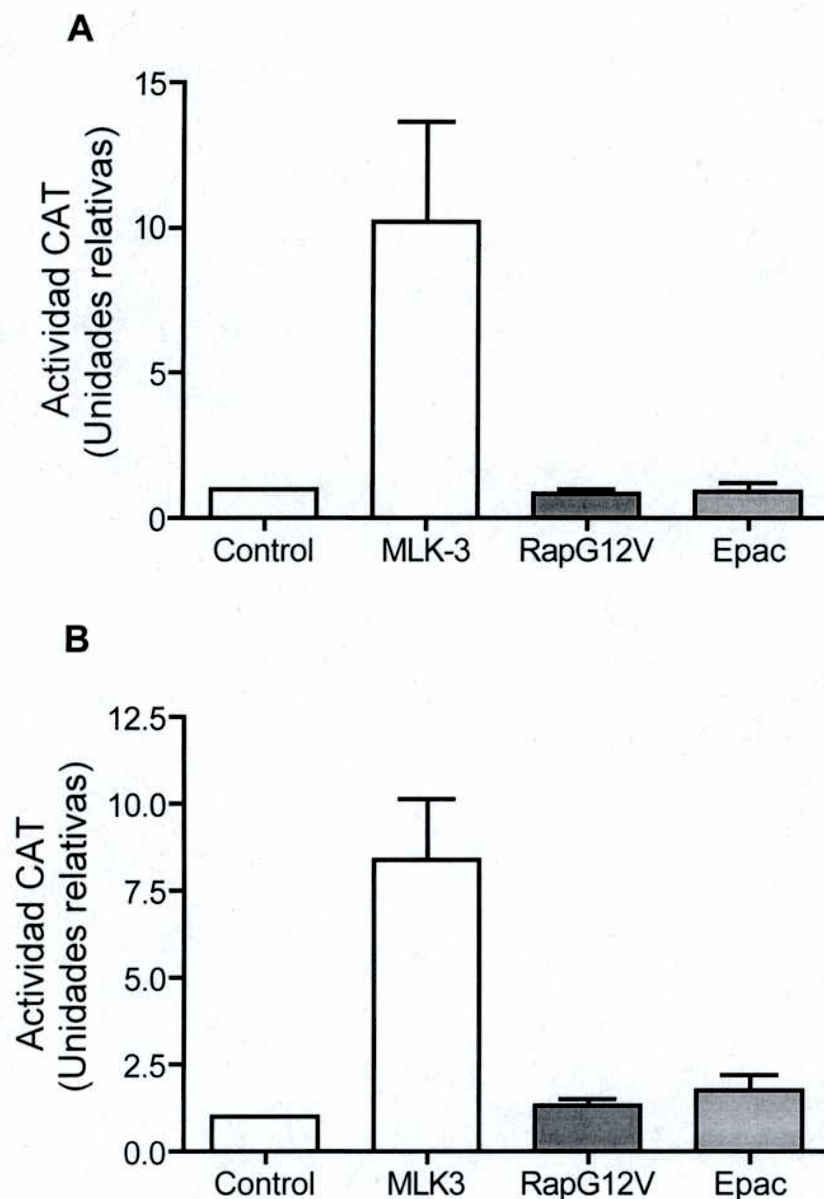


Figura 35. La activación de JNK mediada por Epac, no es capaz de activar los factores de transcripción ATF2 y c-Jun. A) Células HEK 293T fueron transfectadas con los plásmidos GAL4-ATF2 y GAL4-CAT, junto con las proteínas a ensayar. **B)** Células HEK fueron transfectadas con el plásmidos c-Jun-CAT, junto con las proteínas a ensayar. Al cabo de 48hs, las células fueron lisadas y se midió la actividad CAT. Las barras indican los promedios de los resultados obtenidos de tres experimentos independientes.

Estos resultados indicarían que la activación de JNK mediada por Epac no es suficiente para la activación de factores de transcripción. Alternativamente, Epac podría estar señalizando hacia una vía inhibitoria río abajo de JNK, resultando en la incapacidad de esta de activar factores de transcripción.

5. Epac envía señales a la cascada de JNK a niveles río arriba al intercambio de GTP sobre Rac/Cdc42

Las MAPK son proteínas quinasas activadas por una cascada de proteínas quinasas río arriba. Dos son las MAPKK que activan a JNK: SEK1 (o MKK4) y SEK2 (o MKK7), que a su vez son fosforiladas y activadas por una gran variedad de MAPKKKs, como es el ejemplo de MEKK (MEKK1 a MEKK4), el grupo de proteínas quinasas “mixed-lineage” (MLK1, MLK2, MLK3, DLK y LZK), el grupo ASK (ASK1 y ASK2), TAK1 y TPL2 (84). La activación de MAPKKKs ocurre por la unión directa a pequeñas proteínas G. Para el caso de JNK, ha sido demostrado que la familia Rho (Rho/Rac/Cdc42) de pequeñas proteínas G, es la responsable de dicha activación (36). A su vez, estas proteínas G son activadas al ser cargadas con GTP, mediante la actividad de GEFs, como es el ejemplo de Dbl, Ost, Vav, Vav2, etc. Estos intercambiadores son activados al ser reclutados a la membrana por receptores activados mediante proteínas adaptadoras. A esta cascada de activación de JNK, la denominaremos clásica o conocida.

Para entender el mecanismo de activación de Epac a JNK, debíamos encontrar cuales eran las proteínas involucradas. Esto significaba encontrar cuales eran las moléculas intermediarias reguladas al sobre-expresar Epac.

Los ensayos realizados apuntaban a resolver si Epac podía estar activando JNK a través de una novedosa vía, o si este podía estar activando algún intermediario de la vía clásica de activación de JNK

Experimentos transfectando formas dominantes negativas de la cascada clásica de JNK fueron realizados para resolver dos aspectos:

- a) ¿Epac está activando alguna proteína de la cascada conocida de JNK?
- b) ¿Dónde se encuentra dicha interacción?

5.1 SEK1 KR, una forma dominante negativa de SEK, bloquea Epac-JNK

Como se mencionó con anterioridad, SEK1 es una MAPKK que fosforila y activa a JNK. Como toda quinasa, une ATP, para luego transferir el fosfato-γ a un sustrato,

como sería en este caso JNK. La mutación SEK1 Lys 129 Arg (KR), elimina la lisina que coordina el ATP, impidiendo que este nucleótido se una a SEK1. De esta manera, bloqueando la activación de JNK.

Si la cascada de fosforilación se encuentra dentro de vía de activación de Epac, la sobre-expresión de SEK1 KR debería bloquear la activación de JNK mediada por este GEF.

Como un control de especificidad, ensayamos esta mutante activando JNK con Vav, un factor intercambiador de la familia Rho de pequeñas proteínas G, capaz de señalizar hacia esta MAPK. En la figura 36, se observa que SEK1 KR es capaz de bloquear la activación de JNK mediada por Vav.

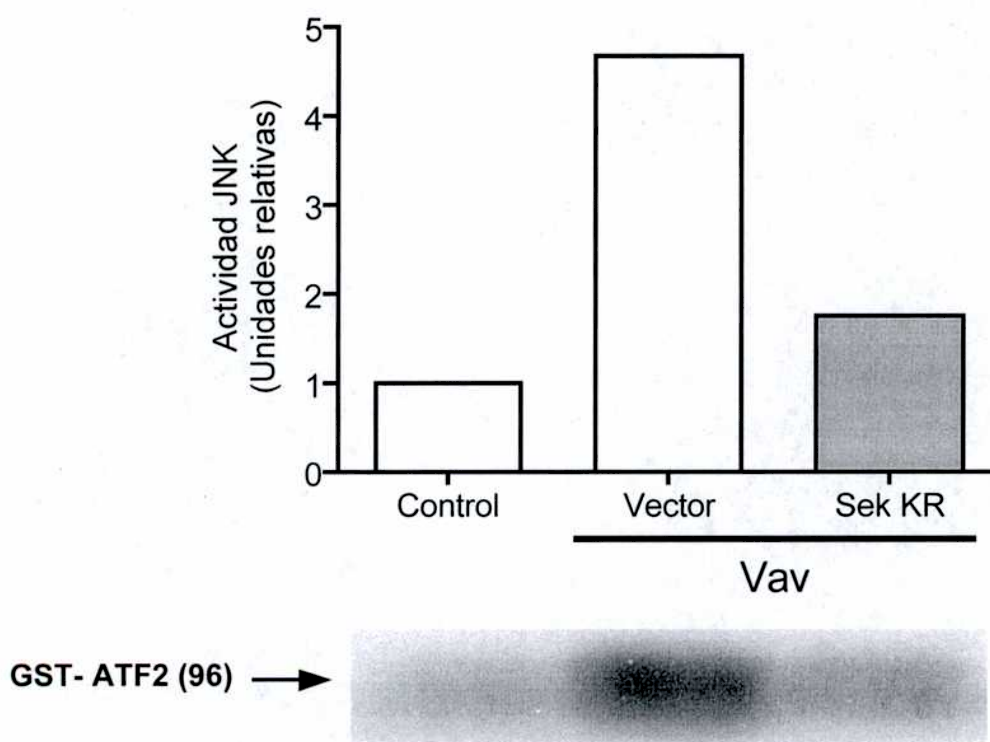


Figura 36. La mutante SEK1 KR bloque la activación de JNK mediada por Vav. Células HEK 293T fueron transfectadas con HA-JNK y plásmidos que expresan Vav y SEK1 KR según corresponde. Al cabo de 48hs, las células fueron lisadas y se midió actividad JNK, en similares condiciones a los experimentos anteriores

El próximo paso era ensayar esta mutante de SEK1 en la activación mediada por Epac o N-Epac. En la figura 37 se observa que ambas formas de Epac son bloqueadas por SEK1 KR, sugiriendo que la cascada de fosforilación conocida de JNK, estaría siendo activada al sobre-expresar Epac.

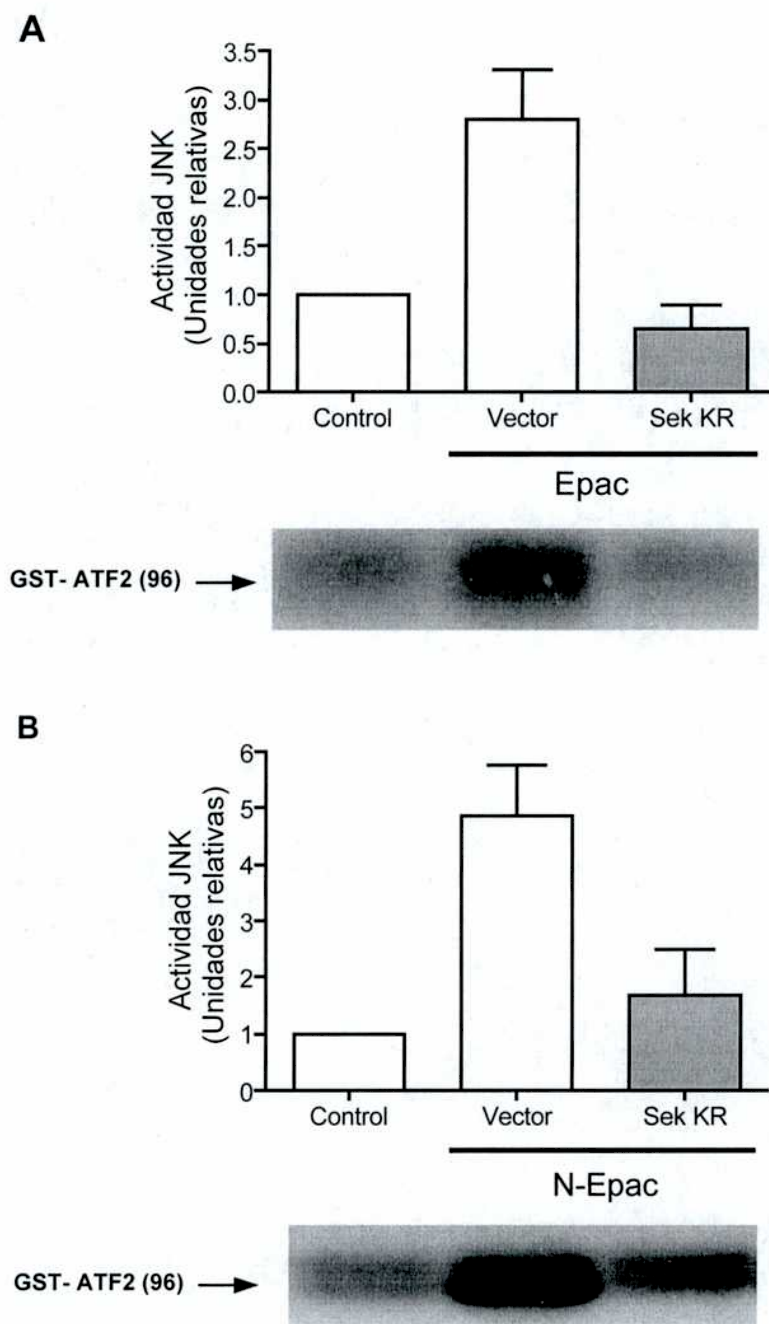


Figura 37. La mutante SEK1 KR bloque la activación de JNK mediada por Epac y N-Epac. A) Células HEK 293T fueron transfectadas con HA-JNK y plásmidos que expresan Epac y SEK1 KR según corresponde. Al cabo de 48hs, las células fueron lisadas y se midió actividad JNK. **B)** El mismo ensayo realizado en A), pero se transfectó con N-Epac en lugar de Epac.

Estos resultados sugieren que Epac estaría activando algún intermediario de la vía clásica de JNK, que se encuentra río arriba de la MAPKK SEK1.

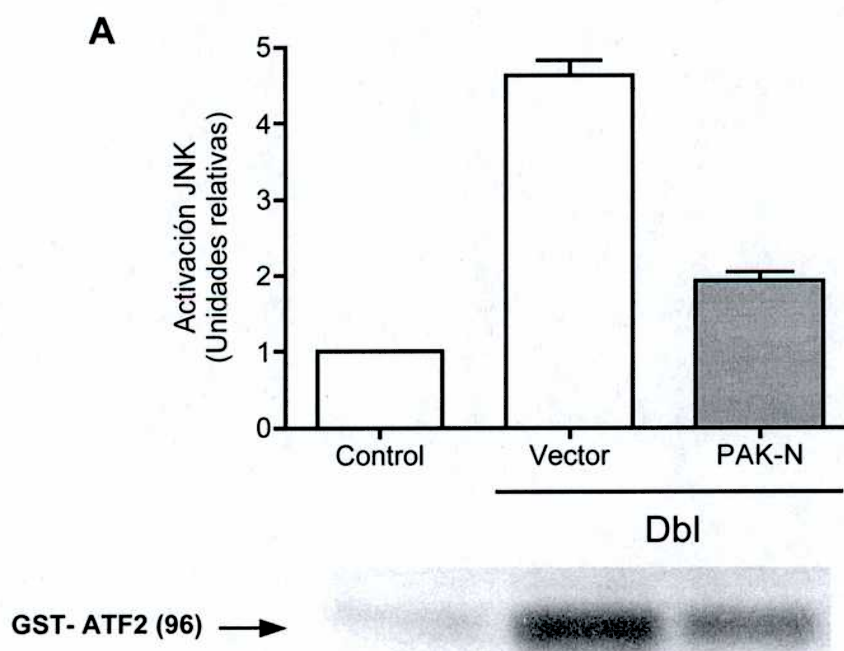
5.2 PAK-N, el dominio N-terminal de PAK, bloquea la activación de Epac a JNK

La familia PAK de proteínas quinasas, fueron las primeras proteínas identificadas que contenían el dominio CRIB (Cdc42/Rac-interactive binding). Este dominio une formas activas de Rac y Cdc42 y su unión induce la actividad quinasas de PAK (100).

PAK-N es una mutante de PAK que contiene solamente su región amino terminal. Esta región es capaz de unir formas activas de Rac y Cdc42, pero al no poseer el dominio quinasas, no es posible la transmisión de la señal, secuestrando Rac y Cdc42 unidos a GTP (136).

La sobre-expresión de esta mutante debería bloquear la activación de Epac a JNK, si Epac está ejerciendo su efecto por medio de la activación de Rac o Cdc42.

En la figura 38, a modo de control, se observa que PAK-N es capaz de bloquear la activación de JNK mediada por el factor intercambiador DbI, pero no es capaz de bloquear la activación mediada por MLK-3. Este último resultado nos indica que no es un bloqueo inespecífico, dado que MLK-3 se encuentra río debajo de Rac/Cdc42 en la cascada de activación de JNK.



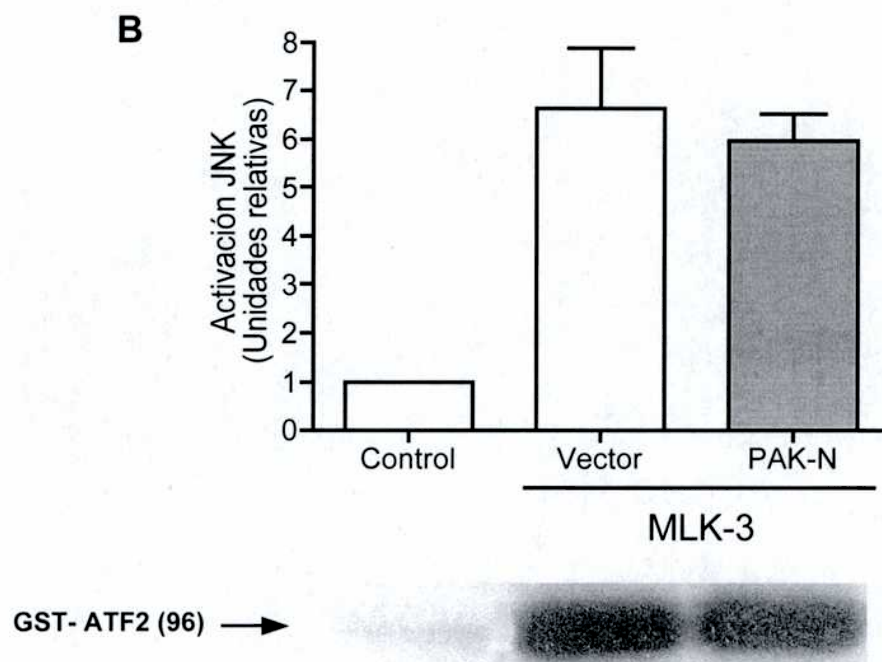


Figura 38. La mutante PAK-N bloque la activación de JNK mediada por Dbl, pero no por MLK-3. A) Células HEK 293T fueron transfectadas con HA-JNK y plásmidos que expresan Dbl y PAK-N según corresponde. Al cabo de 48hs, las células fueron lisadas y se midió actividad JNK. **B)** El mismo ensayo realizado en A), pero se transfectó con el activador MLK-3 en lugar de Dbl.

Una vez puesto a punto el ensayo de inhibición con la mutante PAK-N, se ensayó bajo similares condiciones con N-Epac. En la figura 39, se observa que la activación de JNK por N-Epac, es inhibida por la sobre-expresión de PAK-N. Resultados similares fueron obtenidos al activar con Epac FL (dato no mostrado).

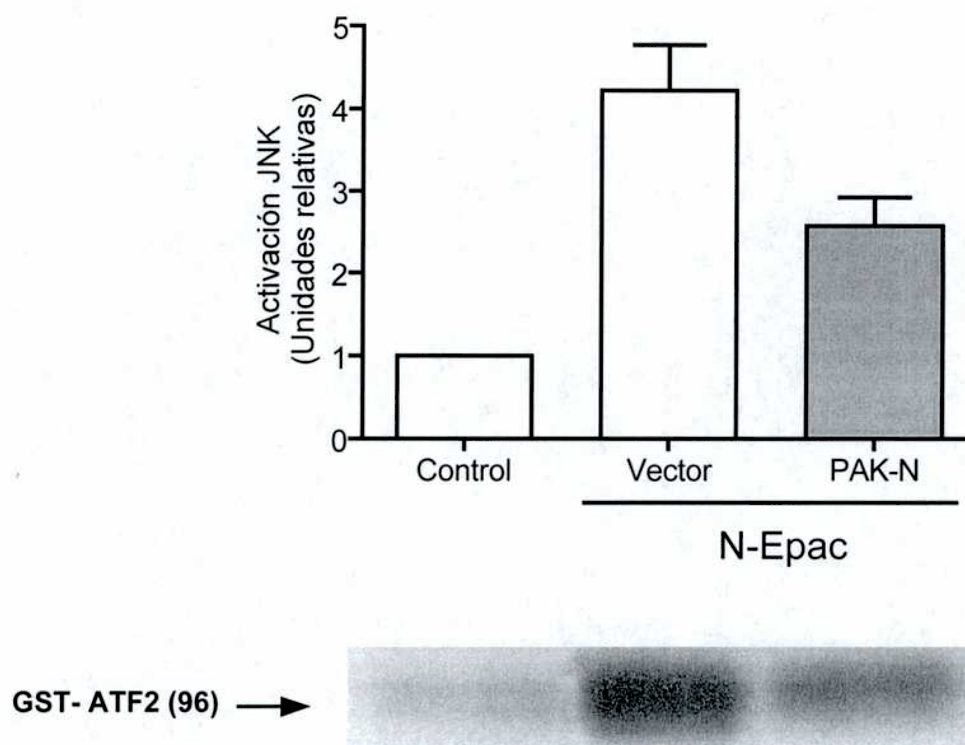


Figura 39. La mutante PAK-N bloque la activación de JNK mediada por N-Epac. Células HEK fueron transfectadas con HA-JNK y plásmidos que expresan N-Epac y PAK-N según corresponde. Al cabo de 48hs, las células fueron lisadas y se midió actividad JNK. Las barras representan los promedios de las actividades de tres experimentos independientes

Los resultados obtenidos con la mutante PAK-N, sugieren un aumento de los niveles de Rac/Cdc42 activas (unidos a GTP), en respuesta a la sobre-expresión de Epac. Estas pequeñas proteínas G activas, podrían ser las responsables de activar la cascada de señalización hacia JNK.

5.3 Formas dominantes negativas de Rac y Cdc42 inhiben la activación Epac-JNK

Los ensayos realizados con anterioridad, sugerían lo siguiente:

- a) La cascada clásica de fosforilación de JNK estaría involucrada (Por el bloqueo de SEK KR).
- b) Rac y Cdc42 activas son necesarias (Por el bloqueo de PAK-N).

La hipótesis que surgió luego de estos resultados, especialmente el descrito en el punto b), era que Epac podría estar involucrado en el aumento de la cantidad de Rac y Cdc42 unidos a GTP, siendo este el nexo entre Epac y la cascada clásica de JNK.

Para tal fin, utilizamos formas dominantes negativas de Rac/Cdc42 que son capaces de titular y bloquear factores intercambiadores de GDP/GTP.

Rac1 y Cdc42 son dos pequeñas proteínas G, conocidas por su capacidad de señalizar hacia JNK. De una manera similar a RapN17, Rac y Cdc42 S17N, son capaces de unirse con una alta afinidad a factores intercambiadores de la familia Rho, titulándolos, y evitando el intercambio sobre Rac y Cdc42 endógenas.

En la figura 40, a modo de control, se observa que tanto Rac, como Cdc42 N17, son capaces de bloquear la activación de JNK mediada por el factor intercambiador Dbl. Ya sea por una mayor expresión o por una mayor afinidad a este intercambiador, se evidencia que Rac N17 logra inhibir en forma mas eficiente la activación mediada por Dbl.

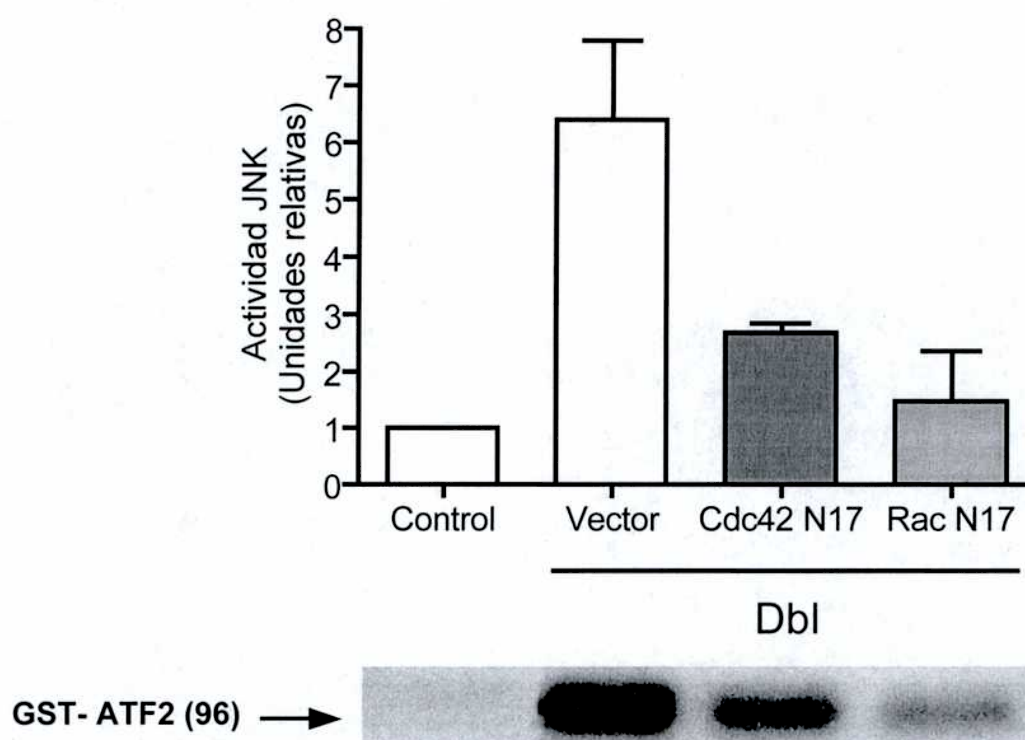


Figura 40. Las mutantes Rac y Cdc42 N17 bloquean la activación de JNK mediada por Dbl. Células HEK 293T fueron transfectadas con HA-JNK y plásmidos que expresan Dbl y las mutantes N17 de Rac y Cdc42 según corresponde. Al cabo de 48hs, las células fueron lisadas y se midió actividad JNK. Las barras indican los promedios de las actividades de dos experimentos independientes.

Como se muestra en la figura 41, ambas mutantes son capaces de inhibir la activación de JNK mediada por N-Epac. Este resultado, no solo muestra que la activación de Epac a JNK se da río arriba de Rac/Cdc42, sino que sugiere que habría una actividad intercambiadora aumentada para Rac y Cdc42.

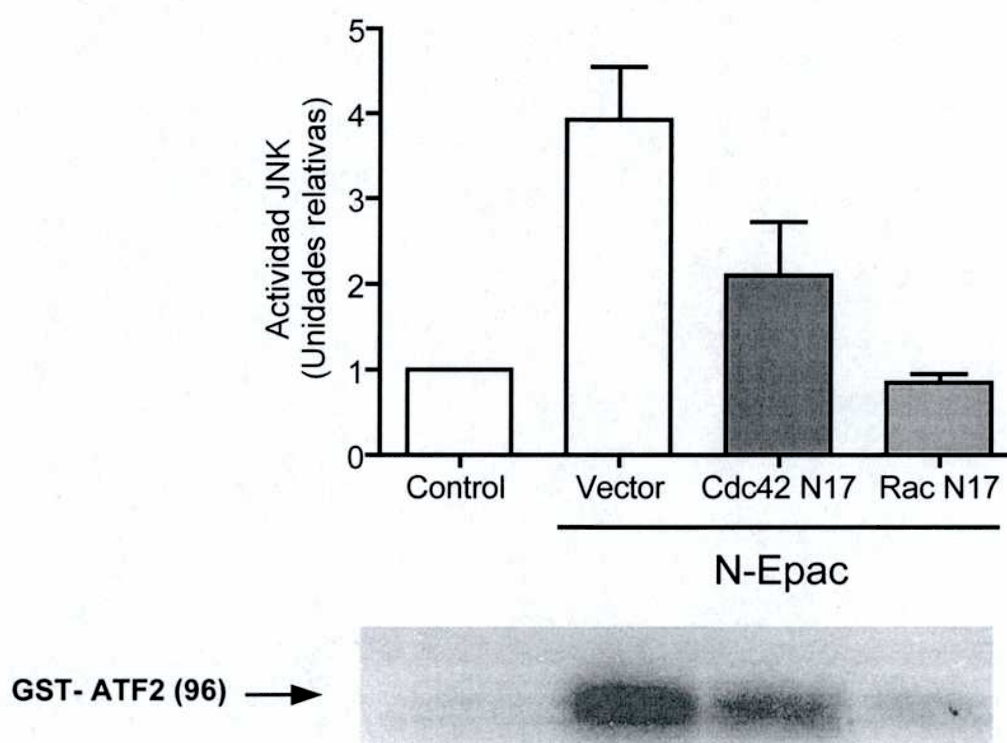


Figura 41. Las mutantes Rac y Cdc42 N17 bloquean la activación de JNK mediada por N-Epac. Células HEK 293T fueron transfectadas con HA-JNK y plásmidos que expresan N-Epac y las mutantes N17 de Rac y Cdc42 según corresponde. Al cabo de 48hs, las células fueron lisadas y se midió actividad JNK. Las barras indican los promedios de las actividades de dos experimentos independientes.

Estos resultados sugieren que la sobre-expresión de Epac, podría llegar a estar activando un potencial GEF para Rac/Cdc42. Dicha activación podría ser bloqueada al titular este potencial GEF, con formas dominantes negativas de Rac y Cdc42.

6. *Epac promueve, de modo indirecto, la carga de GTP sobre Rac/Cdc42*

6.1 *Epac aumenta los niveles de Rac/Cdc42-GTP*

A partir de la hipótesis en la que Epac podría estar acoplándose a la cascada de JNK, activando el intercambio de GDP/GTP sobre Rac/Cdc42, quedaba por demostrar si había un GEF capaz de aumentar Rac y/o Cdc42 unidos a GTP, cuya actividad era aumentada al sobre-expresar Epac. En este escenario, la sobre-expresión de Epac, debería aumentar el estado estacionario de Rac y/o Cdc42 unidos a GTP.

Ensayos de pull-down con la proteína GST-PBD (Pak binding domain) fueron realizados con tal fin. La idea básica del ensayo es similar al ensayo realizado para ver activación de Rap, pero en lugar de GST-RalGDS, se utiliza la proteína de fusión GST-PBD, específica para "pescar" Rac y Cdc42 unidas a GTP.

La afinidad de Rac/Cdc42 por PBD es varios ordenes de magnitud mayor cuando están unidas a GTP, que a GDP. En la figura 42, se muestra un ensayo donde un lisado celular se carga con GDP o GTP γ S y posteriormente se lo precipita con GST-PBD. El resultado se observa al revelar con anticuerpos contra Rac o Cdc42 en un ensayo de Western blot. Una mayor presencia de proteína, indica una mayor cantidad de esta unida a GTP. Este ensayo, nos sirvió para corroborar que la proteína GST-PBD purificada en *E. Coli* estaba funcionando adecuadamente y era capaz de discriminar entre el estado unido a GDP del estado unido a GTP.

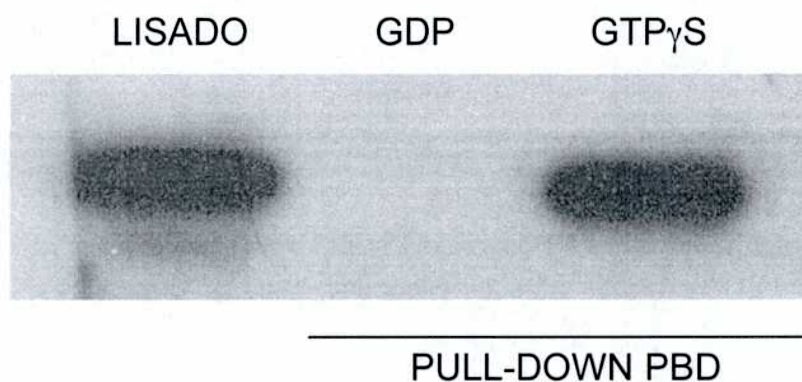


Figura 42. Puesta a punto de ensayos de activación de Rac. Lisados celulares fueron cargados con GDP o GTP γ S e incubados con GST-PBD. La presencia de Rac unida a GST-PBD fue revelada mediante un ensayo de WB, utilizando un anticuerpo anti Rac. Una alícuota de lisado total fue corrida para verificar la expresión de Rac endógena.

Con la proteína GST-PBD funcionando, decidimos realizar un ensayo de activación de Cdc42 *in vivo*, en similares condiciones en las que luego íbamos a ensayar a Epac. Para tal fin, sobre-expresamos un intercambiador de Rac/Cdc42 como es el caso de Vav2. Como se observa en la figura 43, la sobre-expresión de Vav2 aumenta la carga de GTP sobre Cdc42, validando los ensayos de intercambio *in vivo*.

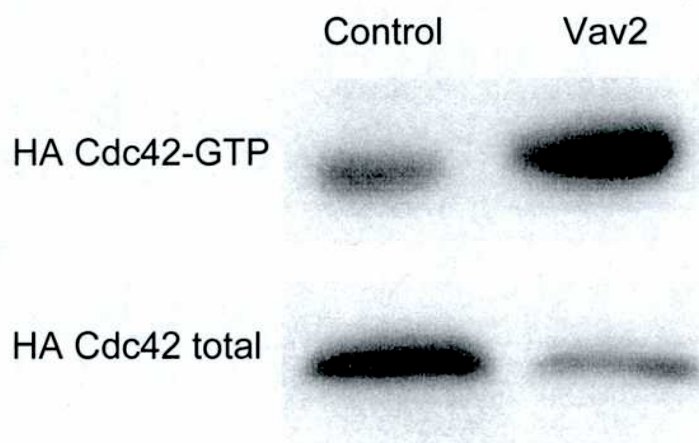


Figura 43. Vav2 induce la activación de Cdc42. Células HEK fueron transfectadas con HA-Cdc42 y Vav2 o un plásmido control. Al cabo de 48hs, las células fueron lisadas. **Panel superior.** La activación de Cdc42 fue ensayada con la proteína GST-PBD. **Panel inferior.** Una muestra de lisado total fue corrida para verificar que la diferencia de Cdc42-GTP se debía a una mayor activación y no a diferencias en la expresión. El ensayo fue revelado con anticuerpo anti HA.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, la sobre-expresión de Epac, o de sus mutantes, que fuesen capaces de activar JNK, deberían ser capaces de cargar GTP sobre Rac/Cdc42. En la figura 44, se ve que altos niveles de Epac o N-Epac aumentan la cantidad de Cdc42 unida a GTP.

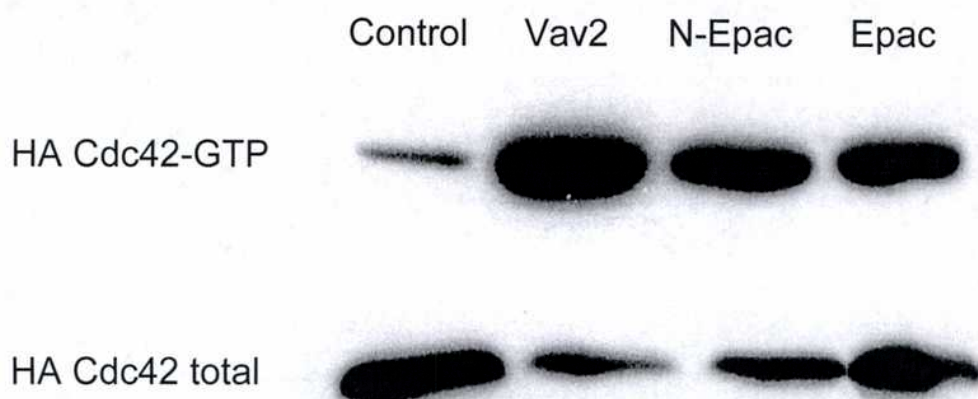


Figura 44. Epac y N-Epac inducen la activación de Cdc42. Células HEK 293T fueron transfectadas con HA-Cdc42 y plásmidos que expresan Epac o la mutante N-Epac. Vav2 fue utilizada como control positivo de carga de GTP sobre Cdc42. Al cabo de 48hs, las células fueron lisadas. **Panel superior.** La activación de Cdc42 fue ensayada con la proteína GST-PBD. **Panel inferior.** Una muestra de lisado total fue corrido para verificar que la diferencia de Cdc42-GTP se debía a una mayor activación y no a diferencias en la expresión. El ensayo fue revelado con anticuerpo anti HA.

En otro ensayo, pero esta vez con Rac1, se observa que GST-REM también es capaz de cargar GTP sobre esta proteína G (figura 45). Estos geles son representativos de experimentos realizados por triplicado.

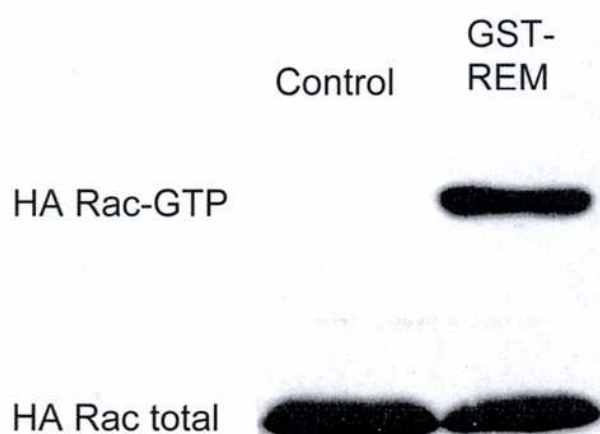


Figura 45. El dominio REM activa a Rac. Células HEK 293T fueron transfectadas con HA-Rac y GST-REM o un plásmido control. Al cabo de 48hs, las células fueron lisadas. **Panel superior.** La activación de Rac fue ensayada con la proteína GST-PBD. **Panel inferior.** Una muestra de lisado total fue corrido para verificar que la diferencia de Rac-GTP se debía a una mayor activación y no a diferencias en la expresión. El ensayo fue revelado con anticuerpo anti HA.

Dada la buena eficiencia de transfección en células HEK 293T, decidimos transfectar Epac, y observar si era suficiente para activar Rac1 endógena. En la figura 46, se observa que la sobre-expresión de Epac aumenta los niveles de Rac1 endógena unida a GTP.



Figura 46. Epac induce la activación de Rac endógena. Células HEK fueron transfectadas con Vav2, Epac o un plásmido control. Al cabo de 48hs, las células fueron lisadas y la activación de Rac endógena fue ensayada con la proteína GST-PBD. El ensayo fue revelado con anticuerpo anti Rac1.

Los resultados de los ensayos de activación de Rac/Cdc42, estarían sugiriendo que Epac podría estar señalizando a JNK, al aumentar los niveles de Rac/Cdc42 unidos a GTP.

6.2 RacN17 forma un complejo con N-Epac

Los datos presentados hasta aquí, indican que Epac promueve la carga de GTP sobre Rac y Cdc42. Si bien es posible que Epac sea *per se* el GEF que activa Rac y Cdc42, creemos que esta hipótesis no concuerda con el hecho de que la mutante N-Epac o el dominio REM aislado, ambas proteínas carentes del dominio GEF, sigan siendo capaces de aumentar el estado estacionario de Rac y Cdc42 unidas a GTP (figuras 44 y 45).

Una alternativa, es que Epac/REM esté estabilizando el estado unido a GTP de estas proteínas G, mostrando una interacción directa entre REM y Rac/Cdc42. Por último, Epac/REM podría estar activando un GEF de la familia Rho, y podríamos encontrar a Epac/REM y Rac/Cdc42 en un mismo complejo, ahora interaccionando en forma indirecta, a través de este potencial GEF.

Decidimos realizar ensayos de co-inmunoprecipitación, para verificar si podíamos encontrar a Epac y Rac en un mismo complejo proteico.

Dada la posibilidad de que Epac pudiese estar formando un complejo con Rac y un potencial GEF, decidimos utilizar la mutante RacN17. La idea era formar un complejo estable dentro de la célula entre RacN17 y un GEF de la familia Rho. Al inmunoprecipitar RacN17, el GEF asociado podría estar uniéndose a Epac (o como en este caso, a N-Epac).

HA RacS17N y myc N-Epac fueron transfectadas en forma transiente, y al cabo de 48hs, se lisaron las células en presencia de EDTA, con el fin de titular Mg^{++} , y favorecer la interacción de Rac S17N con un potencial GEF.

En la figura 47, se observa que en la inmunoprecipitación con HA-RacN17, se detecta la presencia de N-Epac.

Myc-V	+		-
Myc N-Epac		+	+
HA- RacN17	+	-	+

60Kd -

50Kd -

Figura 47. Rac y N-Epac forman un complejo *in vivo*. Células HEK fueron transfectadas con HA-RacN17, Myc N-Epac o plásmidos vacíos como control. Al cabo de 48hs, las células fueron lisadas e inmunoprecipitadas con anticuerpo anti HA. El WB observado es dicha inmunoprecipitación, revelada con anticuerpo anti myc.

Este resultado sugiere la existencia de un complejo conteniendo Rac S17N y N-Epac *in vivo*.

La observación de la existencia de un complejo *in vivo*, nos plantea dos hipótesis:

- a) La unión de Rac y N-Epac es a través de un complejo con un GEF.
- b) La unión de Rac y N-Epac es directa.

6.2.1 N-Epac y Rac no interaccionan *in vitro*

El resultado mostrado con anterioridad, sugiere la interacción entre Rac1 y N-Epac. Para estudiar la posibilidad de una interacción directa, decidimos trabajar *in vitro* con proteínas purificadas.

Proteínas GST-Rac y GST-Cdc42 purificadas a partir de bacterias y unidas a una matriz de glutatión-sefarosa, fueron cargadas con GDP, GTP γ S o dejadas libres de nucleótido, con el fin de obtener a estas proteínas G, en sus tres estados posibles. GST-V, que fue utilizado como control, fue tratado en idénticas condiciones que las proteínas G. En la figura 48, se muestran las proteínas GST-Rac y GST-Cdc42 purificadas.

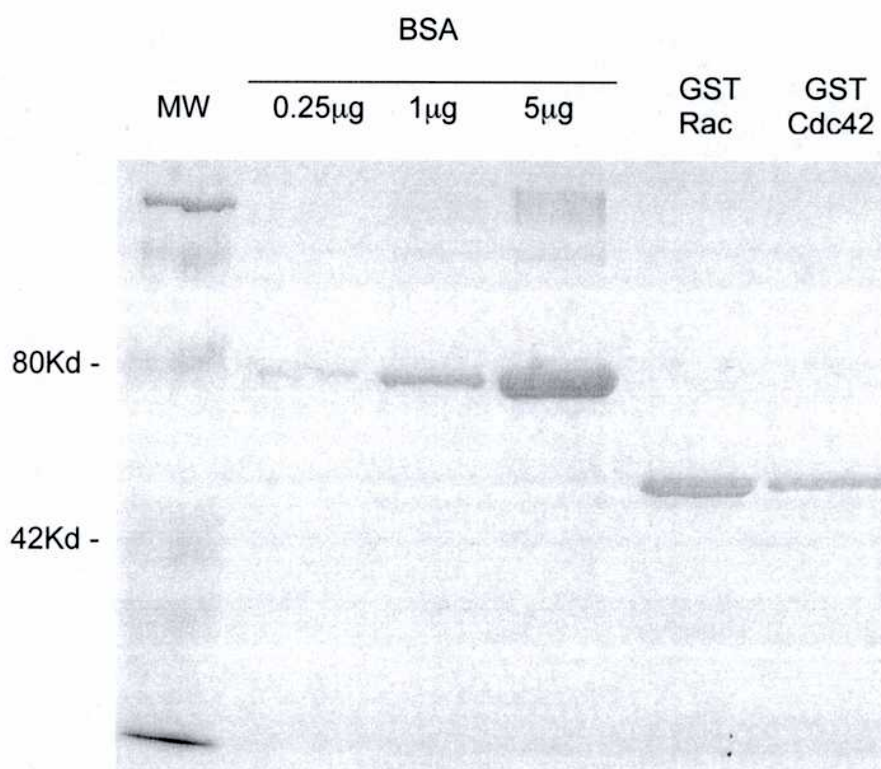


Figura 48. Purificación de proteína GST-Rac y GST-Cdc42. Proteínas GST-Rac, GST-Cdc42 y GST (no mostrado en este gel) fueron purificadas de bacterias como se describe en materiales y métodos. Una alícuota de las proteínas purificadas fueron corridas para cuantificarlas, utilizando una curva de concentración de BSA conocida. La tinción con Coomassie blue permite la visualización de las proteínas.

N-Epac fue traducido *in vitro* con Metionina marcada con ^{35}S , e incubado con las proteínas de fusión GST, para verificar si podían formar un complejo.

En la primera calle, junto con el marcador de peso molecular, se incluye un control de carga. Este control cuenta con cincuenta veces menos proteína N-Epac Met ^{35}S , que la utilizada en el ensayo. La razón por la cual se utiliza mucho menor cantidad de proteína marcada en el control es que demasiada proteína marcada, podría dificultar la detección de la marca en calles vecinas. Además, esto nos dio la ventaja de comprobar que la cantidad de ^{35}S N-Epac utilizada, era mas que suficiente para detectar la interacción. Como se observa en la figura 49, no se detecta la presencia de N-Epac Met ^{35}S en la precipitación de las proteínas de fusión GST, sugiriendo que no hay interacción directa entre N-Epac y Rac/Cdc42.

En el panel inferior de la figura 49 se muestra el mismo gel teñido con el colorante Coomassie blue, verificando la integridad y consistencia de cantidades de las proteínas de fusión GST.



Figura 49. Rac y Cdc42 no interaccionan con N-Epac *in vitro*. Proteínas GST-Rac, GST-Cdc42 y GST unidas a una matriz de glutatión-sefarosa, fueron sometidas al protocolo de carga de nucleótido descrito en materiales y métodos. Luego, estas proteínas fueron incubadas con N-Epac traducido *in vitro*, marcado radioactivamente. Al cabo de la incubación y los lavados, las proteínas GST fueron corridas en gel SDS-PAGE. **Panel superior.** El gel fue secado y expuesto, con el fin de detectar la presencia de marca en un complejo con GST-Rac o GST-Cdc42. En la última calle, se incluye una alícuota de proteína N-Epac radioactiva como control de carga, aproximadamente 50 veces menor a la utilizada en los ensayos con las proteínas GST. **Panel inferior.** El mismo gel teñido antes de ser expuesto, con el fin de observar las proteínas GST.

Este resultado sugiere que Rac y N-Epac no son capaces de interaccionar en forma directa, sino a través de alguna proteína intermediaria. Esta proteína intermediaria, podría ser un GEF para la familia Rho.

6.3 Medición de actividad intercambiadora en inmunoprecipitados de N-Epac

Diversos resultados nos indicaban que Epac podría estar activando JNK, al interactuar con un GEF de la familia Rho de GTPasas:

- a) Los ensayos de carga de GTP sobre Rac/Cdc42, donde la sobre-expresión de Epac aumenta Rac y Cdc42 unidos a GTP (figuras 44, 45 y 46).
- b) Los ensayos de inhibición mediados por Rac/Cdc42 N17, donde las mutantes N17 bloqueaban la activación de JNK mediada por Epac (figura 41).
- c) Los ensayos de co-inmunoprecipitación de RacN17 y N-Epac, que sugieren la existencia de un complejo entre estas dos proteínas (figura 47).

Si lográbamos detectar una actividad intercambiadora sobre Rac/Cdc42 en inmunoprecipitados de N-Epac, estaríamos demostrando que efectivamente hay un GEF de la familia Rho, formando forma un complejo con N-Epac.

El ensayo consiste en cargar a Rac o Cdc42 con un nucleótido fluorescente (mant-GDP). Este nucleótido solo es capaz de fluorescer al estar unido a la proteína, y no cuando se encuentra libre. La incubación de un factor intercambiador junto a Rac/Cdc42-mantGDP, en presencia de un exceso de GDP frío, debería dar como resultado un decaimiento exponencial de la fluorescencia, debido al intercambio de GDP-mant por GDP frío.

Antes de poder practicar este tipo de ensayos, era necesario la verificación de varios pasos, que serán detallados más adelante:

1. Purificación de proteínas Rac y Cdc42 libres de GST.
2. Verificar que las proteínas purificadas sean capaces de cargar nucleótidos de guanina, al igual que las proteínas endógenas.
3. Inducir la liberación del nucleótido de las proteínas, por ejemplo, en presencia de EDTA.
4. Obtener inmunoprecipitados de N-Epac, junto a proteínas asociadas.

6.3.1 Preparación de proteína Rac/Cdc42

Las proteínas GST-Rac y GST-Cdc42, fueron purificadas de similar manera a la purificada en los ensayos de interacción *in vitro* con ^{35}S N-Epac. Normalmente, las proteínas purificadas se obtienen unidas a GDP. Como la proteína sin nucleótido se desnaturaliza y precipita, se tomó la precaución de purificarlas en presencia de 5mM Mg^{++} y 0.1mM GDP, con el fin de lograr que el GDP permaneciese estable en la proteína G.

Debido a que el epítipo GST es muy voluminoso (27Kd), e incluso es más grande que Rac o Cdc42 (21Kd), decidimos sacarlo para que no interfiera en la unión al factor intercambiador que esperábamos se uniese a N-Epac. Utilizamos la proteasa trombina, capaz de cortar la proteína de fusión, dejando a Rac y Cdc42 libres de GST. En la figura 50, se observan las proteínas Rac y Cdc42 luego del corte con trombina.

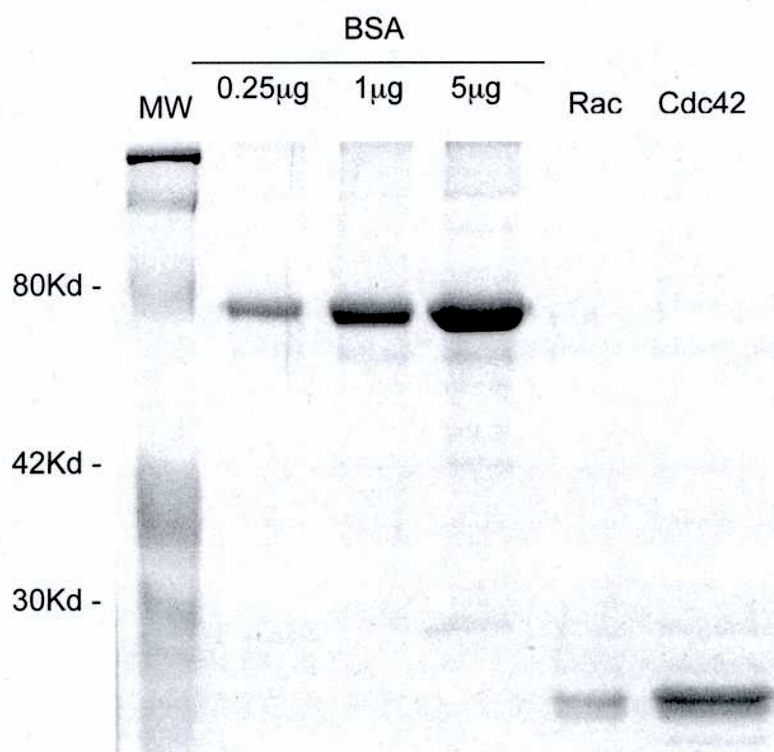


Figura 50. Digestión con trombina de las proteínas GST-Rac y GST-Cdc42. Proteínas GST-Rac y GST-Cdc42 purificadas y unidas a una matriz de sefarosa, fueron sometidas a digestión con trombina toda la noche, con el fin de cortar el GST y obtener las proteínas G solas. Al cabo de la digestión, se centrifugaron las muestras y se tomó el sobrenadante, conteniendo Rac y Cdc42. Una alícuota de este sobrenadante fue corrido y teñido con Coomassie blue. La curva de BSA fue utilizada para la cuantificación de las proteínas purificadas.

Una vez obtenidas Rac y Cdc42, y previo al paso de cargado de Rac y Cdc42 con el nucleótido fluorescente, necesitábamos confirmar que ambas proteínas mantenían la capacidad de cargar tanto GDP como GTP: Ensayos de pull-down, como los descritos con anterioridad, fueron realizados. Rac y Cdc42 purificados fueron cargados con GDP o GTP γ S e incubados con GST-PBD. En la figura 51, se observa en el Western Blot contra Rac o Cdc42, que ambas proteínas se comportan de una forma similar a las endógenas (ver figura 42).

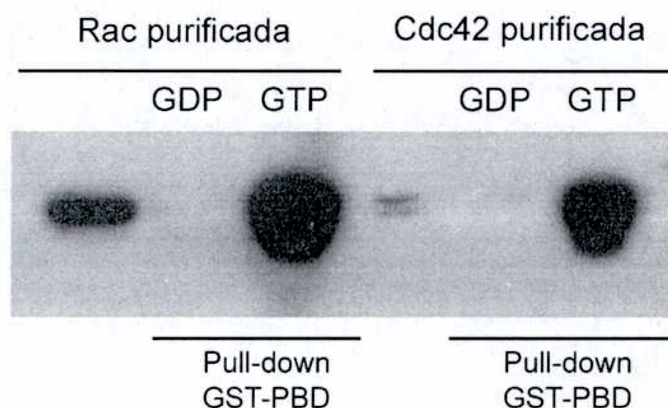


Figura 51. Validación de Rac y Cdc42 purificadas. Proteínas Rac y Cdc42 purificadas fueron cargados con GDP o GTP γ S e incubados con GST-PBD. La presencia de estas proteínas G unidas a GST-PBD (cargadas con GTP) fue revelada mediante un ensayo de WB, utilizando un anticuerpo anti Rac o anti Cdc42. Una alícuota de ambas proteínas fue corrida para verificar el reconocimiento de ambos anticuerpos.

El próximo paso consistía en cargar estas proteínas con mant-GDP: Proteína purificada fue incubada en presencia de EDTA y un exceso de 100X de mant-GDP con respecto al GDP unido a Rac o Cdc42. El EDTA cumple la función de desestabilizar el GDP unido a la proteína. Al poner un exceso de mant-GDP, este compite eficientemente con el GDP frío, que se libera de la proteína y se une de una forma inestable (por la ausencia de Mg $^{++}$). Finalmente, la reacción finaliza al agregar un exceso de Mg $^{++}$, que estabiliza el mant-GDP en la proteína.

Los primeros ensayos realizados fueron controles. La proteína cargada con mant-GDP mostraba un cierto valor de fluorescencia al ser medida en el fluorímetro. En estas condiciones, la proteína fue incubada en presencia de un exceso de GDP frío y EDTA. La idea básica es la misma que cuando cargamos el mant-GDP sobre Rac/Cdc42: desestabilizar el nucleótido mantido por el secuestro de Mg $^{++}$, y que el

exceso de GDP frío compita con la proteína, mostrando un decaimiento exponencial en la fluorescencia. En este caso, el EDTA estaría actuando como un GEF. Este fenómeno se observa en la figura 52 .

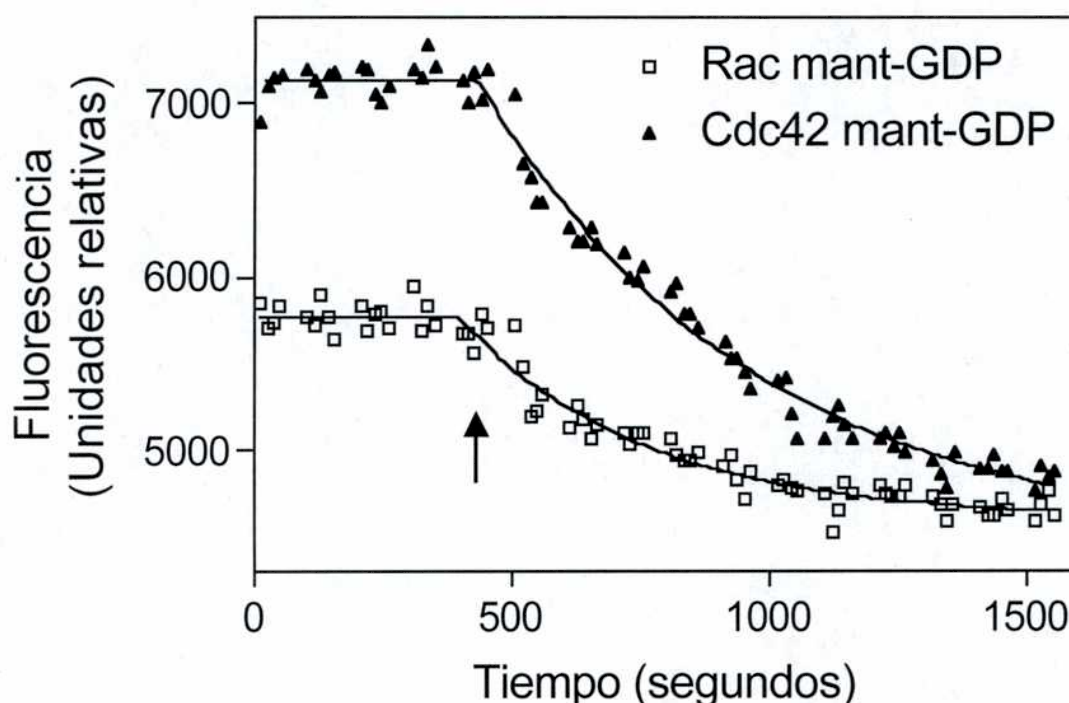


Figura 52. Ensayos controles de medición de actividad GEF *in vitro*. Proteínas Rac y Cdc42 cargados con mantGDP, en presencia de exceso de GDP frío, se les midió la fluorescencia, con el objeto de observar la tasa de intercambio intrínseca de las proteínas G purificadas. Una vez agregado EDTA a la reacción (flecha), se continuó con la medición de fluorescencia.

6.3.2 Obtención de inmunoprecipitado de N-Epac

Células HEK 293T crecidas en placas de 100 mm fueron transfectadas con un plásmido que expresa la proteína myc N-Epac. Al cabo de 48hs, las células fueron lisadas. La inmunoprecipitación fue realizada con un anticuerpo anti myc (9E10) unido covalentemente a una matriz de sefarosa.

Myc N-Epac, junto con las proteínas celulares asociadas, fueron liberadas del anticuerpo con un exceso de péptido 9E10. La idea es que este péptido, al estar en exceso, pueda competir por el anticuerpo, y desplazar a myc N-Epac.

Esta elusión no es posible realizarla con alta concentración de sales o bajando el pH, dado que lo que se pretende medir es una actividad enzimática. Para buscar las mejores condiciones de la elusión, se procedió a ensayar distintas temperaturas.

En la figura 53 se muestra un ejemplo con myc Epac, donde se eluyó a diferentes temperaturas. La idea era aumentar el equilibrio dinámico entre el anticuerpo y la proteína de fusión myc, haciendo que el péptido pueda competir mas eficientemente por el anticuerpo.

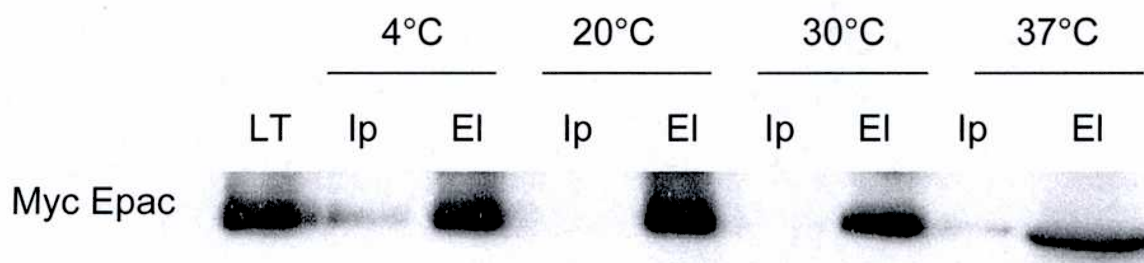


Figura 53. Elusión de proteínas inmunoprecipitadas. Células HEK fueron transfectadas con un plásmido que expresa myc-Epac. Al cabo de 48hs, las células fueron inmunoprecipitadas con un anticuerpo anti myc unido covalentemente a una matriz de sefarosa. Una vez lavados los inmunocomplejos, se eluyeron las proteínas unidas al anticuerpo con un exceso de péptido myc. El péptido fue incubado a diferentes temperaturas, indicadas en la figura

6.3.3 El inmunoprecipitado de N-Epac tiene asociado actividad intercambiadora

Los ensayos de intercambio sobre Rac/Cdc42 fueron realizados en fluorímetro en placas de 96 pocillos, excitando a 355nm y leyendo a 460nm, a una temperatura de 25°C. Las mediciones se realizaron cada 5 segundos, completando un total de 250 repeticiones.

Cdc42 mostró una mayor fluorescencia comparada con Rac, seguramente debida a una mayor eficiencia en el cargado de mant-GDP. Con el agregado de EDTA, Cdc42 nos mostró además una mayor ventana entre el estado unido al mant-GDP y el unido al GDP frío (ver figura 52). Debido a estas diferencias, decidimos realizar los ensayos con esta pequeña proteína G y no con Rac.

Cdc42 GDP-mant (2μM), en presencia de 2mM de GDP frío, fue incubado con el inmunoprecipitado de N-Epac.

En la figura 54, se observa que el inmunoprecipitado de N-Epac trae consigo una actividad GEF, dado el decaimiento exponencial de la fluorescencia sobre Cdc42. Este dato experimental, nos permitió confirmar la presencia de un factor intercambiador en un complejo con Epac.

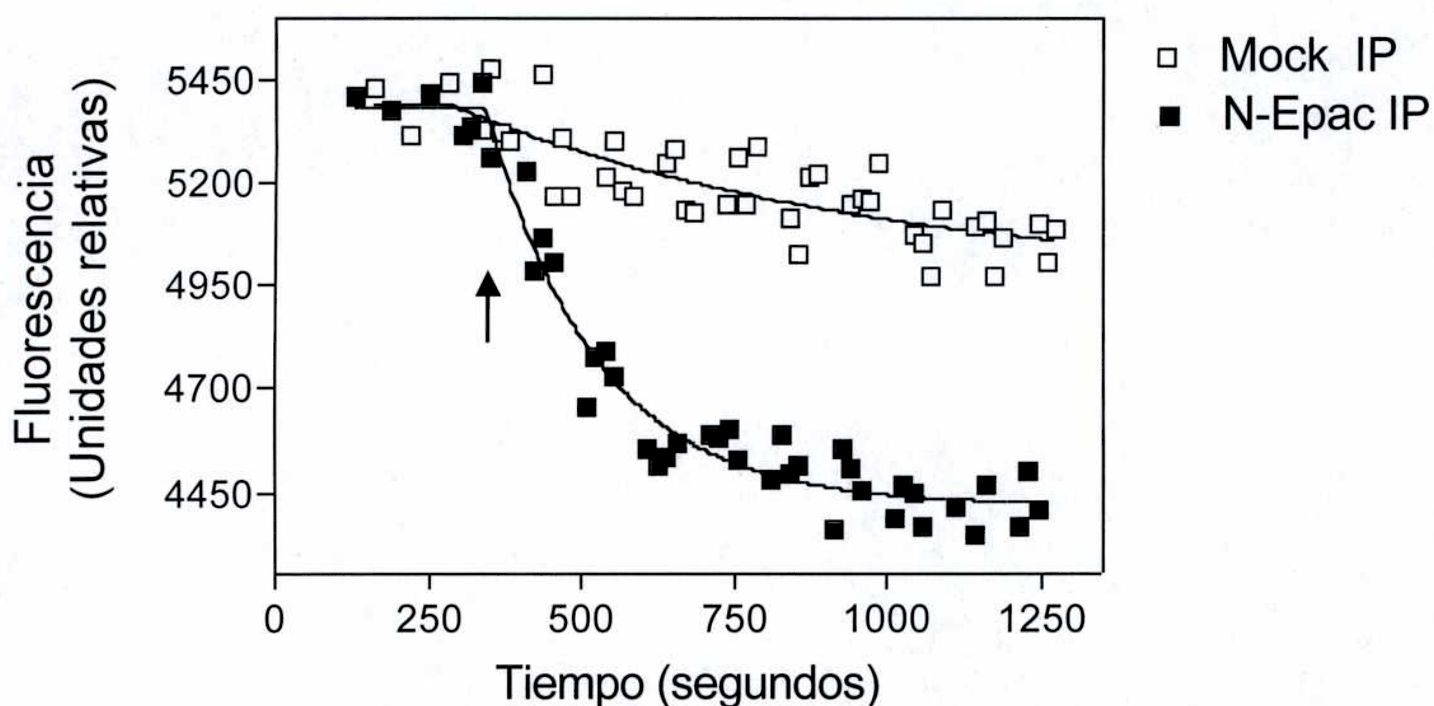


Figura 54. Actividad GEF presente en inmunoprecipitados de N-Epac. Cdc42 cargada con mantGDP, en presencia de exceso de GDP frío, fue medida su fluorescencia. Luego, esta fue incubada con el producto de la elusión del inmunoprecipitado de N-Epac, o un inmunoprecipitado control, sin transfectar (mock).

Este resultado, avala la hipótesis, en la cual Epac podría estar formando un complejo con un GEF para Rac/Cdc42. La existencia de este complejo, podría explicar el aumento de Rac y Cdc42 unidas a GTP, al sobre-expresar Epac, y la posterior activación de JNK.

Discusión

Los mecanismos de transducción de señales que involucran proteínas que unen e hidrolizan GTP, constituyen una pieza fundamental en el proceso de señalización desde factores de crecimiento a proteínas MAPKs.

En el presente manuscrito, hemos descripto novedosas propiedades para el factor intercambiador Epac y la MAPK JNK:

- 1) Epac activa a JNK, independiente de Rap.
- 2) La estimulación de Epac a JNK, no está relacionada con su actividad GEF dependiente de AMPc.
- 3) Epac, a través del dominio REM, promueve el intercambio de GTP sobre las pequeñas proteínas Rac y Cdc42

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los experimentos de intercambio de nucleótido *in vivo* e *in vitro*, sugerimos que la sobre-expresión de Epac, es capaz de activar un potencial GEF para Rac/Cdc42. El hecho de que N-Epac, una mutante de Epac carente del dominio GEF, sea capaz de formar un complejo con una forma dominante negativa de Rac (RacN17), sumado al resultado que muestra que no fuimos capaces de encontrar una interacción directa entre Epac y Rac, sugiere que Rac no se estaría uniendo directamente a Epac, sino a través de un putativo GEF.

Recientemente, se ha descubierto que los GEFs PDZ-RhoGEF, LARG y p115 RhoGEF para la GTPasa Rho, son capaces de formar hetero-oligómeros (28). Un posible mecanismo de activación de JNK, involucraría la hetero-oligomerización de Epac y otro GEF, cuya actividad intercambiadora, en este caso para Rac/Cdc42, sea incrementada.

Diversos abordajes, todavía sin resultados concretos, se han realizado con el fin de encontrar un potencial GEF para Rac/Cdc42 asociado a Epac:

1. **Mediante el uso de proteínas purificadas en bacterias:** GST-REM y GST (como control) purificadas, y unidas a una matriz de glutatión-sefarosa, fueron incubadas con lisados celulares de HEK 293T, cuyas proteínas totales fueron marcadas con metionina ³⁵S. Luego de la incubación, proteínas diferenciales entre GST y GST-REM fueron detectadas al correr las muestras en un gel PAGE SDS, y posteriormente expuestas a una placa

radiográfica. Con este tipo de ensayos, hemos encontrado una proteína celular de aproximadamente 35Kd, que interacciona con el dominio REM.

2. **Transfectando transientemente myc N-Epac:** Células HEK 293T marcadas con metionina ³⁵S, fueron transfectadas con myc N-Epac o sin transfectar (como control). Al inmunoprecipitar, corrimos los inmunocomplejos en gel SDS PAGE e hicimos el mismo análisis realizado en el punto anterior, sin haber podido detectar alguna proteína diferencial.
3. **Ensayo de doble híbrido en levaduras:** Utilizando la mutante N-Epac como "bait", estamos realizando un ensayo de doble híbrido en levaduras, sin haber obtenido resultados todavía.

Las aproximaciones experimentales descritas en el punto 1 y 2, tenían como finalidad realizar el mismo ensayo sin marcar las proteínas celulares y en una mayor escala (mayor número de células). El gel corrido, podía ser teñido con algún colorante tipo Coomassie blue, y analizar bandas de interés con el método de espectrometría de masa (MALDI TOF).

Epac no es el único GEF para la familia Rap, capaz de activar a JNK. C3G, otro activador de Rap, también es capaz de activar a JNK, pero mediante la pequeña proteína G R-Ras (139). Asimismo, otros GEFs tales como Dbl, Ost, Vav, mSos1, Ras-GRP/CalDag-GEFII y Ras-GRF (36, 139, 145), son capaces de activar a JNK, pero a diferencia de Epac, en todos los demás casos, la actividad GEF es requerida.

Otro grupo creciente de intercambiadores para Rac y Cdc42 (Ejemplos: Dock180-ELMO, Zizimin) han sido descritos, cuya propiedad principal es que carecen del dominio Dbl, característico de los GEFs de la familia Rho (20, 131). Es posible especular con que Epac pertenezca a esta familia de GEFs, pero a diferencia de estos intercambiadores, Epac no es capaz de unirse a Rac directamente, y por lo tanto, sería incapaz de actuar como un GEF *per se*.

A diferencia de otros GEFs, Epac necesita para activar a Rap de la unión directa de un factor soluble, como es el caso de AMPc. La unión de este nucleótido, induce un

cambio conformacional que expone el dominio GEF (162). Para nuestro conocimiento, ninguna otra función de Epac que no involucre la unión de AMPc se ha descrito hasta el momento fuera de los resultados aquí descritos.

A pesar de estar mostrando una nueva función de Epac, un ejemplo precedente también muestra la independencia del AMPc en la función de la proteína quinasa dependiente de AMPc: LPS induce la fosforilación de p65 NF κ B mediada por PKA, independiente de AMPc (242).

Numerosos trabajos muestran que Epac2 es capaz de formar un complejo con la proteína Rim2 y la pequeña proteína G Rab3 (63, 90, 149). Este complejo, involucrado en procesos de exocitosis, no es capaz de cargar GTP sobre Rab3, revelando otro ejemplo de una función asociada a Epac que no involucra el intercambio de nucleótido. Sin embargo, a diferencia de los datos presentados aquí, la funcionalidad del complejo Epac2-Rim2-Rab3 necesita el sitio de unión de AMPc intacto, sugiriendo que este proceso es dependiente de la unión de AMPc a Epac2 (149).

El dominio REM de Epac ha sido identificado por este trabajo como el mínimo dominio capaz de señalizar a JNK. Este dominio es el dominio común que poseen Epac FL, N-Epac y Δ Epac, todos buenos activadores de JNK. Todos los intercambiadores de la familia Cdc25 para Ras y Rap contienen este dominio REM (13). A pesar de esto, para nuestro conocimiento, ninguno de ellos capaz de activar a JNK, mostrando que el dominio REM de Epac posee características particulares, comparándolo con los otros dominios REM. Basado en la estructura cristalográfica del complejo Ras-Sos (12), ha sido sugerido que el dominio REM no posee una función directa en el intercambio de nucleótido, aunque participa en la estabilización de la estructura de Ras compatible con la salida del GDP, y posterior entrada del GTP.

Nuestros resultados revelan que el dominio REM señaliza a JNK, dejando el interrogante de cuales podrían ser las proteínas blanco de Epac-REM, capaces de señalizar a esta SAPK. Recientemente, una nueva función del dominio REM perteneciente al GEF Sos ha sido atribuida: la unión de una proteína Ras activa (Ras-GTP), a una región de Sos que involucra al dominio REM, promueve un cambio alostérico en Sos, tal que es favorecido el intercambio de GDP/GTP de una segunda

molécula de Ras (125). Esto podría sugerir un rol similar para el dominio REM de Epac: Epac/REM podría estar uniendo Rac o Cdc42 activas (unidas a GTP). El complejo Epac/REM-Rac activa, podría interactuar con un GEF de la familia Rho, promoviendo el intercambio de otras moléculas de Rac y/o Cdc42. Esto podría explicar como el dominio REM aislado es capaz de activar a Rac (figura 45).

La utilización de mutantes dominantes negativas de diversas moléculas (ej: Rac/Cdc42 N17, PAK-N, SEK1 KR) nos ha brindado la información de que la sobre-expresión de Epac es capaz de aumentar la actividad de un potencial GEF para la familia Rho de GTPasas. El bloqueo de dicha activación por la sobre-expresión de la mutante Pak-N, nos indica que Rac y/o Cdc42 unidos a GTP son necesarios, mientras que la inhibición por Rac y Cdc42 N17 sugiere la presencia de un GEF para estas pequeñas proteínas G.

El escenario aquí descrito, involucra a Epac con capacidad de activar a otras pequeñas proteínas G no pertenecientes a la familia Rap de GTPasas. Un ejemplo análogo, recientemente publicado, es la activación de Rac por Sos (83, 145). Esta interacción entre GEFs y GTPasas no canónicas, involucra la formación de complejos multiproteicos (83). Intercambiadores con múltiples dominios, como Sos o Epac, podrían dar un marco de *cross-talk* entre pequeñas proteínas G, dependiendo a que proteínas se asocian.

Un dominio DEP se encuentra en la región amino terminal de Epac. A pesar de que reportes previos muestran que algunos dominios DEP pueden señalizar a JNK (17), hemos demostrado que este dominio de Epac no está involucrado en la activación de JNK, por dos evidencias experimentales:

- 1) Δ Epac, una mutante que carece del dominio DEP y CBD, es capaz de activar a JNK, de similar manera que Epac FL.
- 2) GST-DEP, una proteína de fusión que contiene este dominio aislado, es incapaz de activar a JNK

Un resultado que nos extrañó, fue comprobar mediante los ensayos de activación de Rap *in vivo*, que la sobre-expresión de N-Epac era capaz de bloquear la

activación de estas proteínas G mediada por Epac/AMPC (FK). Tres interpretaciones encontramos para este resultado:

- a) N-Epac podría competir con Epac por co-factores necesarios en el intercambio sobre Rap.
- b) N-Epac, al contener el dominio DEP de localización a membrana, podría estar desplazando a Epac, impidiendo su correcta localización.
- c) Epac podría no actuar como monómero, y N-Epac podría formar complejos no productivos con Epac, por ejemplo un heterodímero Epac/N-Epac.

Un trabajo recientemente publicado, muestra que GEFs de la familia Rho, que contienen dominios RGS, son capaces de formar oligómeros, a través de sus regiones C-terminales. Este descubrimiento, podría avalar la hipótesis c) aquí planteada (28).

La fosforilación y activación de factores de transcripción se encuentra vinculado a procesos de proliferación, diferenciación o muerte celular inducidos por la activación de MAPKs. En el caso particular de JNK, diversos factores de transcripción son fosforilados en respuesta a factores de crecimiento, citoquinas y stress ambiental (84). Por ejemplo, en esta tesis, mostramos como control que MLK-3, una MAPKKK río arriba de JNK, logra activar factores de transcripción como ATF-2 y c-jun.

La sobre-expresión de Epac, N-Epac o Δ Epac, todos fuertes activadores de JNK, no logran activar la capacidad reguladora de la transcripción de c-Jun o ATF-2. Si bien JNK, al ser activada por Epac, es capaz de fosforilar a ATF-2 en los ensayos de activación *in vitro* (los ensayos de activación de JNK utilizan una región de ATF-2 como sustrato), no hemos podido observar esta inducción en ensayos *in vivo*, con proteínas reporteras. Dos posibles explicaciones encontramos para este resultado:

- a) La sobre-expresión de proteínas como MLK-3 son capaces de activar a JNK, y a otra vía de señalización. En este escenario, es necesario la activación de JNK y otra proteína X, para activar los factores de transcripción tales como c-

Jun y ATF-2. Epac podría estar activando solamente a JNK, y por eso no aumenta la actividad de estos factores

- b) Epac podría estar activando además de JNK, algún mecanismo inhibitorio, que bloquee la activación de los factores de transcripción.

Resultados obtenidos en nuestro laboratorio, muestran que Epac y N-Epac son capaces de aumentar la expresión de la proteína KLF-6. Esta proteína es capaz de inhibir la activación del factor de transcripción c-Jun (J.L. Bocco, N. Koritschoner, dato no publicado). Estos resultados avalan la segunda hipótesis planteada, donde la activación de factores de transcripción se ve enmascarada por mecanismos inhibitorios.

Una posible explicación del mecanismo de activación de Epac a JNK, es que dicha activación fuese inespecífica, y que la sobre-expresión de Epac, fuese censada por la célula como un mecanismo de stress. El resultado de que otra SAPK, como es el caso de p38, no fuese sensible frente a la expresión de Epac, sugeriría que no es un mecanismo general de stress lo que se produce al sobre-expresar Epac, sino la activación de una vía específica de señalización. A pesar de que la familia de p38 cuenta con por lo menos cuatro miembros (descritos en la sección Introducción), los ensayos fueron realizados con p38 α , prototipo de esta familia.

Un importante interrogante es que rol juega el AMPc en esa novedosa vía. En este trabajo, utilizando ensayos de activación de Rap, mostramos que la estimulación de células HEK con FK es capaz de activar la vía de Epac-Rap. Por otro lado, la estimulación con este mismo inductor de AMPc, es capaz de bloquear la activación JNK mediada por Epac. Este último resultado se correlaciona con un reporte previo, que mediante la utilización de células de tiroides, demuestran que altas dosis de TSH (una hormona que aumenta los niveles de AMPc) inhibe la activación de JNK, pero bajas dosis de TSH es capaz de activar JNK, mostrando una dosis-respuesta bifásica, dependiendo de la concentración de AMPc (71).

JNK es activada en diversos procesos apoptóticos (47, 214, 232). Un trabajo recientemente publicado, demuestra que la apoptosis en células β mediada por palmitato, un ácido graso saturado, es prevenida en forma dosis dependiente por AMPc: altas dosis de AMPc, inducidas por FK + IBMX (un inhibidor de la fosfodiesterasa), son capaces de inhibir apoptosis y son independientes de PKA, ya que no se bloquea el

efecto anti-apoptótico con H89 o KT5720, dos fuertes inhibidores de la PKA. De hecho, este rol protector es mimificado con 8CPT-2Me-cAMP, un análogo de AMPc específico de Epac, sugiriendo un rol antiapoptótico para este GEF (106). Sorprendentemente, bajas concentraciones de AMPc, inducidas por la hormona GLP-1, también tienen un rol anti-apoptótico, pero dependiente de PKA (106). Posiblemente, una alta concentración intracelular de AMPc determine la activación de Epac y un potencial rol de supervivencia, y una baja concentración de este permita que Epac señalice a JNK, promoviendo un proceso de muerte celular. Esta hipótesis es coherente con la observación de que JNK es necesaria para la apoptosis neuronal en respuesta a la falta de factores neurotróficos (232).

Las proteínas amiloides β ($A\beta$) son uno de los mayores componentes de las personas con el mal de Alzheimer y derivan del precursor APP, a través de la acción de β y γ secretasas. Sin embargo, la vía de la α -secretasa, produce a partir de APP, la secreción de sAPP α , un producto secretado al medio extracelular, que no posee características amiloidogénicas y posee efectos potenciando la memoria. La activación del receptor de serotonina con el agonista 5-HT $_4$, aumenta los niveles de AMPc y secreta la proteína sAPP α . Este proceso, es dependiente del incremento de AMPc, pero no de la activación de PKA. Mediante el uso de ensayos de transfecciones transientes, deducen que el AMPc es capaz de activar Epac, el cual aumenta la carga de GTP sobre Rap. Rap-GTP, es capaz de aumentar el estado unido a GTP de Rac (122). Este mecanismo de señalización entre Epac y Rac, es diferente al descrito por nosotros, ya que involucra la activación de Rap. Igualmente, es interesante destacar ejemplos donde Epac puede señalizar hacia otras pequeñas proteínas G diferentes de Rap.

Un aspecto de Epac aun no tomado en cuenta, es el de su capacidad de señalización en ausencia de AMPc. De esta manera, el concepto de proteína activa señalizando y proteína inactiva no transmitiendo señales, podría no ser tan lineal. Ejemplos de este concepto se encuentran para pequeñas proteínas G:

- a) La sobre-expresión de la mutante unida a GDP de Ras, RasN17, es capaz de bloquear la fosforilación y activación del factor de transcripción Elk-1 inducido por PMA (phorbol myristate acetate), aunque no logra bloquear la actividad y fosforilación de ERK1 cotransfectada. Además, una mutante

unida a GTP, no mimifica a RasN17, sugiriendo la especificidad de Ras unida a GDP. Por otro lado, la formación de focos en células NIH 3T3 inducida por la sobre-expresión de RasV12, es bloqueada por la sobre-expresión de RasN17. Todos estos puntos, sugieren que Ras-GDP (N17) no solo es capaz de actuar inhibiendo GEFs, sino tendría otra función asociada a su "estado inactivo" (200).

- b) RasGRF es un GEF que señala a Ras/MAPK. El mantenimiento de Cdc42 unido a GDP por la sobre-expresión de Rho-GDI, inhibe la señalización de RasGRF a Ras de forma basal o inducido por LPA o ionomicina. Esta inhibición, no puede mimificarse con Cdc42-GTP o moléculas efectoras de Cdc42 activa, sugiriendo que Cdc42-GDP propiamente dicha sería la responsable de la inhibición. Estos resultados sugerirían que la función de Cdc42 no solo sería activar a moléculas efectoras en su estado unido a GTP, sino que Cdc42-GDP estaría actuando al inhibir vías paralelas de señalización (6).

Teniendo en cuenta los ejemplos mostrados, podría ser posible que Epac este señalizando en ausencia de AMPc hacia JNK a través de Epac/REM, y en condiciones en las cuales los niveles de AMPc aumentan pueda activar la vía de Rap/ERK. En la figura 55 se muestra un esquema donde se representa esta hipótesis.

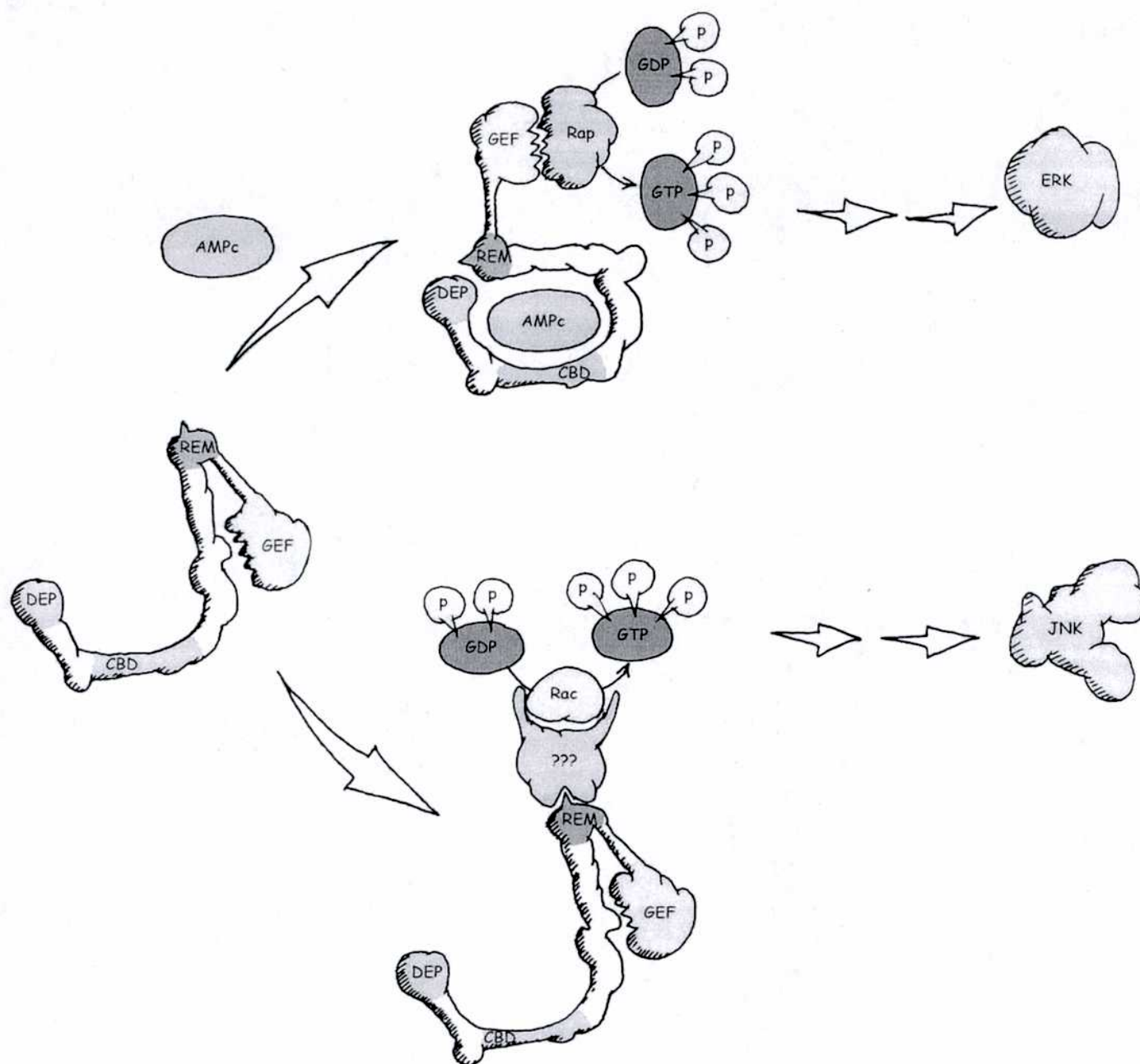
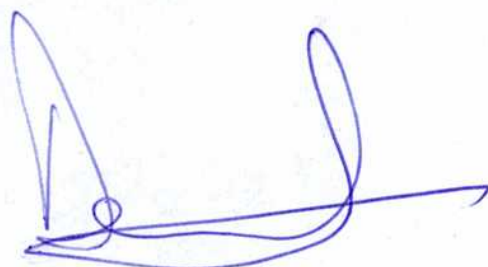


Figura 55. La activación de Epac hacia vía de MAPKs podría depender de la concentración de AMPc intracelular. Altos niveles de AMPc podrían favorecer la actividad intercambiadora de Epac sobre proteínas Rap, generando un aumento de los niveles de ERK1/2 activo. Bajos niveles de AMPc podrían favorecer la activación de Epac/REM a un potencial GEF de la familia Rho (en la figura indicado

La independencia de Rap en la activación de Epac a JNK, y la señalización de la mutante N-Epac, carente del dominio GEF, representa a nuestro entender, la primera evidencia de señalización de Epac independiente de su función como GEF a través de un nuevo dominio efector, agregando nuevos ingredientes en el complejo escenario de la señalización por GEFs.

Una implicación importante de este trabajo, es la posibilidad de encontrar una función estimuladora asociada a Epac-REM/JNK, a partir de la estimulación de un agonista aún no identificado. A pesar que las señales río arriba de Epac no han sido identificadas en este trabajo, nuevos activadores de JNK, como nutrientes, factores de crecimiento, osmolaridad, temperatura, pH, radiación, etc., podrían utilizar la señalización de Epac, independiente de AMPc y proteínas Rap. Nuestros resultados sugieren un mecanismo independiente de AMPc, para la transmisión de señales del medio ambiente que son discriminadas por Epac en la activación de JNK.



HECENBAUM DAVID



O.A. CORO

Bibliografía

1. **Adler, V., A. Polotskaya, F. Wagner, and A. S. Kraft.** 1992. Affinity-purified c-Jun amino-terminal protein kinase requires serine/threonine phosphorylation for activity. *J Biol Chem* **267**:17001-5.
2. **Akada, R., L. Kallal, D. I. Johnson, and J. Kurjan.** 1996. Genetic relationships between the G protein beta gamma complex, Ste5p, Ste20p and Cdc42p: investigation of effector roles in the yeast pheromone response pathway. *Genetics* **143**:103-17.
3. **Altschuler, D. L., S. N. Peterson, M. C. Ostrowski, and E. G. Lapetina.** 1995. Cyclic AMP-dependent activation of Rap1b. *J Biol Chem* **270**:10373-6.
4. **Altschuler, D. L., and F. Ribeiro-Neto.** 1998. Mitogenic and oncogenic properties of the small G protein Rap1b. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:7475-9.
5. **Amano, M., M. Ito, K. Kimura, Y. Fukata, K. Chihara, T. Nakano, Y. Matsuura, and K. Kaibuchi.** 1996. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* **271**:20246-9.
6. **Arozarena, I., D. Matallanas, and P. Crespo.** 2001. Maintenance of CDC42 GDP-bound state by Rho-GDI inhibits MAP kinase activation by the exchange factor Ras-GRF. evidence for Ras-GRF function being inhibited by Cdc42-GDP but unaffected by CDC42-GTP. *J Biol Chem* **276**:21878-84.
7. **Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl.** 1989. *Current Protocols in Molecular Biology*.
8. **Behrens, A., K. Sabapathy, I. Graef, M. Cleary, G. R. Crabtree, and E. F. Wagner.** 2001. Jun N-terminal kinase 2 modulates thymocyte apoptosis and T cell activation through c-Jun and nuclear factor of activated T cell (NF-AT). *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:1769-74.
9. **Berthet, J., T. W. Rall, and E. W. Sutherland.** 1957. The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. IV. Effect of epinephrine and glucagon on the reactivation of phosphorylase in liver homogenates. *J Biol Chem* **224**:463-75.
10. **Bird, T. A., J. M. Kyriakis, L. Tyshler, M. Gayle, A. Milne, and G. D. Virca.** 1994. Interleukin-1 activates p54 mitogen-activated protein (MAP) kinase/stress-activated protein kinase by a pathway that is independent of p21ras, Raf-1, and MAP kinase kinase. *J Biol Chem* **269**:31836-44.
11. **Birnbaumer, L., S. L. Pohl, and M. Rodbell.** 1971. The glucagon-sensitive adenyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. II. Comparison between glucagon- and fluoride-stimulated activities. *J Biol Chem* **246**:1857-60.
12. **Boriack-Sjodin, A. P., M. S. Margarit, D. Bar-Sagi, and J. Kuriyan.** 1998. The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature* **394**:337-343.
13. **Bos, J. L.** 2000. Ras. *In* A. Hall (ed.), *GTPases*.
14. **Boulton, T. G., S. H. Nye, D. J. Robbins, N. Y. Ip, E. Radziejewska, S. D. Morgenbesser, R. A. DePinho, N. Panayotatos, M. H. Cobb, and G. D. Yancopoulos.** 1991. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65**:663-75.
15. **Boulton, T. G., G. D. Yancopoulos, J. S. Gregory, C. Slaughter, C. Moomaw, J. Hsu, and M. H. Cobb.** 1990. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* **249**:64-7.
16. **Boussiotis, V. A., G. J. Freeman, A. Berezovskaya, D. L. Barber, and L. M. Nadler.** 1997. Maintenance of human T cell anergy: blocking of IL-2 gene transcription by activated Rap1. *Science* **278**:124-8.

17. **Boutros, M., N. Paricio, D. Strutt, and M. Mlodzik.** 1998. Dishevelled Activates JNK and Discriminates between JNK Pathways in planar Polarity and *wingless* Signaling. *Cell* **94**:109-118.
18. **Braga, V. M.** 2002. Cell-cell adhesion and signalling. *Curr Opin Cell Biol* **14**:546-56.
19. **Brandt, D., M. Gimona, M. Hillmann, H. Haller, and H. Mischak.** 2002. Protein kinase C induces actin reorganization via a Src- and Rho-dependent pathway. *J Biol Chem* **277**:20903-10.
20. **Brugnera, E., L. Haney, C. Grimsley, M. Lu, S. F. Walk, A. C. Tosello-Trampont, I. G. Macara, H. Madhani, G. R. Fink, and K. S. Ravichandran.** 2002. Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nat Cell Biol* **4**:574-82.
21. **BurrIDGE, K., and M. Chrzanowska-Wodnicka.** 1996. Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**:463-518.
22. **Butcher, R. W., and E. W. Sutherland.** 1962. Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine. *J Biol Chem* **237**:1244-50.
23. **Casey, P. J., M. P. Graziano, M. Freissmuth, and A. G. Gilman.** 1988. Role of G proteins in transmembrane signaling. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **53 Pt 1**:203-8.
24. **Cassel, D., H. Levkovitz, and Z. Selinger.** 1977. The regulatory GTPase cycle of turkey erythrocyte adenylate cyclase. *J Cyclic Nucleotide Res* **3**:393-406.
25. **Cerione, R. A., and Y. Zheng.** 1996. The Dbl family of oncogenes. *Curr Opin Cell Biol* **8**:216-22.
26. **Chen, R. H., S. Corbalan-Garcia, and D. Bar-Sagi.** 1997. The role of the PH domain in the signal-dependent membrane targeting of Sos. *Embo J* **16**:1351-9.
27. **Chen, Y. R., and T. H. Tan.** 2000. The c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptotic signaling (review). *Int J Oncol* **16**:651-62.
28. **Chikumi, H., A. Barac, B. Behbahani, Y. Gao, H. Teramoto, Y. Zheng, and J. S. Gutkind.** 2004. Homo- and hetero-oligomerization of PDZ-RhoGEF, LARG and p115RhoGEF by their C-terminal region regulates their in vivo Rho GEF activity and transforming potential. *Oncogene* **23**:233-40.
29. **Christensen, A. E., F. Selheim, J. de Rooij, S. Dremier, F. Schwede, K. K. Dao, A. Martinez, C. Maenhaut, J. L. Bos, H. G. Genieser, and S. O. Dorskland.** 2003. cAMP analog mapping of Epac1 and cAMP kinase. Discriminating analogs demonstrate that Epac and cAMP kinase act synergistically to promote PC-12 cell neurite extension. *J Biol Chem* **278**:35394-402.
30. **Chrzanowska-Wodnicka, M., and K. BurrIDGE.** 1996. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol* **133**:1403-15.
31. **Clark, S. G., M. J. Stern, and H. R. Horvitz.** 1992. *C. elegans* cell-signalling gene *sem-5* encodes a protein with SH2 and SH3 domains. *Nature* **356**:340-4.
32. **Cook, S. J., B. Rubinfeld, I. Albert, and F. McCormick.** 1993. RapV12 antagonizes Ras-dependent activation of ERK1 and ERK2 by LPA and EGF in Rat-1 fibroblasts. *Embo J* **12**:3475-85.
33. **Cooper, J. A., and T. Hunter.** 1983. Identification and characterization of cellular targets for tyrosine protein kinases. *J Biol Chem* **258**:1108-15.
34. **Cooper, J. A., and T. Hunter.** 1981. Similarities and differences between the effects of epidermal growth factor and Rous sarcoma virus. *J Cell Biol* **91**:878-83.

35. **Coso, O. A., M. Chiariello, G. Kalinec, J. M. Kyriakis, J. Woodgett, and J. S. Gutkind.** 1995. Transforming G protein-coupled receptors potently activate JNK (SAPK). Evidence for a divergence from the tyrosine kinase signaling pathway. *J Biol Chem* **270**:5620-4.
36. **Coso, O. A., M. Chiariello, J. C. Yu, H. Teramoto, P. Crespo, N. Xu, T. Miki, and J. S. Gutkind.** 1995. The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* **81**:1137-46.
37. **Coso, O. A., H. Teramoto, W. F. Simonds, and J. S. Gutkind.** 1996. Signaling from G protein-coupled receptors to c-Jun kinase involves beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting on a Ras and Rac1-dependent pathway. *J Biol Chem* **271**:3963-6.
38. **Cote, J. F., and K. Vuori.** 2002. Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity. *J Cell Sci* **115**:4901-13.
39. **Crespo, P., X. R. Bustelo, D. S. Aaronson, O. A. Coso, M. Lopez-Barahona, M. Barbacid, and J. S. Gutkind.** 1996. Rac-1 dependent stimulation of the JNK/SAPK signaling pathway by Vav. *Oncogene* **13**:455-60.
40. **Davis, R. J.** 1993. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* **268**:14553-6.
41. **Davis, R. J.** 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**:239-52.
42. **Davoren, P. R., and E. W. Sutherland.** 1963. The Cellular Location of Adenyl Cyclase in the Pigeon Erythrocyte. *J Biol Chem* **238**:3016-23.
43. **de Rooij, J., H. Rehmann, M. van Triest, R. H. Cool, A. Wittinghofer, and J. L. Bos.** 2000. Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs. *J Biol Chem* **275**:20829-36.
44. **de Rooij, J., F. J. Zwartkruis, M. H. Verheijen, R. H. Cool, S. M. Nijman, A. Wittinghofer, and J. L. Bos.** 1998. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* **396**:474-7.
45. **de Vos, A. M., L. Tong, M. V. Milburn, P. M. Matias, J. Jancarik, S. Noguchi, S. Nishimura, K. Miura, E. Ohtsuka, and S. H. Kim.** 1988. Three-dimensional structure of an oncogene protein: catalytic domain of human c-H-ras p21. *Science* **239**:888-93.
46. **DeMali, K. A., K. Wennerberg, and K. Burridge.** 2003. Integrin signaling to the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* **15**:572-82.
47. **Deng, Y., X. Ren, L. Yang, Y. Lin, and X. Wu.** 2003. A JNK-dependent pathway is required for TNFalpha-induced apoptosis. *Cell* **115**:61-70.
48. **Der, C. J., T. G. Krontiris, and G. M. Cooper.** 1982. Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**:3637-40.
49. **Derijard, B., M. Hibi, I. H. Wu, T. Barrett, B. Su, T. Deng, M. Karin, and R. J. Davis.** 1994. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **76**:1025-37.
50. **Didsbury, J., R. F. Weber, G. M. Bokoch, T. Evans, and R. Snyderman.** 1989. rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J Biol Chem* **264**:16378-82.
51. **Doggett, T. A., J. T. Swarthout, S. C. Jefcoat, Jr., D. Wilhelm, A. Dieckmann, P. Angel, and N. C. Partridge.** 2002. Parathyroid hormone inhibits c-Jun N-terminal kinase activity in rat osteoblastic cells by a protein kinase A-dependent pathway. *Endocrinology* **143**:1880-8.
52. **Downward, J.** 1996. Control of ras activation. *Cancer Surv* **27**:87-100.

53. **Downward, J., R. Riehl, L. Wu, and R. A. Weinberg.** 1990. Identification of a nucleotide exchange-promoting activity for p21ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:5998-6002.
54. **Doye, A., A. Mettouchi, G. Bossis, R. Clement, C. Buisson-Touati, G. Flatau, L. Gagnoux, M. Piechaczyk, P. Boquet, and E. Lemichez.** 2002. CNF1 exploits the ubiquitin-proteasome machinery to restrict Rho GTPase activation for bacterial host cell invasion. *Cell* **111**:553-64.
55. **Ebinu, J. O., D. A. Bottorff, E. Y. Chan, S. L. Stang, R. J. Dunn, and J. C. Stone.** 1998. RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science* **280**:1082-6.
56. **Eden, S., R. Rohatgi, A. V. Podtelejnikov, M. Mann, and M. W. Kirschner.** 2002. Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* **418**:790-3.
57. **Enserink, J. M., A. E. Christensen, J. de Rooij, M. van Triest, F. Schwede, H. G. Genieser, S. O. Doskeland, J. L. Blank, and J. L. Bos.** 2002. A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nat Cell Biol* **4**:901-6.
58. **Eva, A., and S. A. Aaronson.** 1985. Isolation of a new human oncogene from a diffuse B-cell lymphoma. *Nature* **316**:273-5.
59. **Fanger, G. R., P. Gerwins, C. Widmann, M. B. Jarpe, and G. L. Johnson.** 1997. MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases? *Curr Opin Genet Dev* **7**:67-74.
60. **Feig, L. A.** 1994. Guanine-nucleotide exchange factors: a family of positive regulators of Ras and related GTPases. *Curr Opin Cell Biol* **6**:204-11.
61. **Flatau, G., E. Lemichez, M. Gauthier, P. Chardin, S. Paris, C. Fiorentini, and P. Boquet.** 1997. Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine. *Nature* **387**:729-33.
62. **Franke, B., J. W. Akkerman, and J. L. Bos.** 1997. Rapid Ca²⁺-mediated activation of Rap1 in human platelets. *Embo J* **16**:252-9.
63. **Fujimoto, K., T. Shibasaki, N. Yokoi, Y. Kashima, M. Matsumoto, T. Sasaki, N. Tajima, T. Iwanaga, and S. Seino.** 2002. Piccolo, a Ca²⁺ sensor in pancreatic beta-cells. Involvement of cAMP-GEFII.Rim2.Piccolo complex in cAMP-dependent exocytosis. *J Biol Chem* **277**:50497-502.
64. **Fukuhara, S., H. Chikumi, and J. S. Gutkind.** 2001. RGS-containing RhoGEFs: the missing link between transforming G proteins and Rho? *Oncogene* **20**:1661-8.
65. **Fung, B. K.** 1983. Characterization of transducin from bovine retinal rod outer segments. I. Separation and reconstitution of the subunits. *J Biol Chem* **258**:10495-502.
66. **Gibbs, J. B., I. S. Sigal, M. Poe, and E. M. Scolnick.** 1984. Intrinsic GTPase activity distinguishes normal and oncogenic ras p21 molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**:5704-8.
67. **Gill, G. N., and L. D. Garren.** 1971. Role of the receptor in the mechanism of action of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**:786-90.
68. **Goldfarb, M., K. Shimizu, M. Perucho, and M. Wigler.** 1982. Isolation and preliminary characterization of a human transforming gene from T24 bladder carcinoma cells. *Nature* **296**:404-9.
69. **Gupta, S., T. Barrett, A. J. Whitmarsh, J. Cavanagh, H. K. Sluss, B. Derijard, and R. J. Davis.** 1996. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *Embo J* **15**:2760-70.

70. **Habets, G. G., R. A. van der Kammen, J. C. Stam, F. Michiels, and J. G. Collard.** 1995. Sequence of the human invasion-inducing TIAM1 gene, its conservation in evolution and its expression in tumor cell lines of different tissue origin. *Oncogene* **10**:1371-6.
71. **Hara, T., H. Namba, N. Takamura, T. T. Yang, Y. Nagayama, S. Fukata, K. Kuma, N. Ishikawa, K. Ito, and S. Yamashita.** 1999. Thyrotropin regulates c-Jun N-terminal kinase (JNK) activity through two distinct signal pathways in human thyroid cells. *Endocrinology* **140**:1724-30.
72. **Hart, M. J., A. Eva, D. Zangrilli, S. A. Aaronson, T. Evans, R. A. Cerione, and Y. Zheng.** 1994. Cellular transformation and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the dbl oncogene product. *J Biol Chem* **269**:62-5.
73. **Hart, M. J., X. Jiang, T. Kozasa, W. Roscoe, W. D. Singer, A. G. Gilman, P. C. Sternweis, and G. Bollag.** 1998. Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by G α 13. *Science* **280**:2112-4.
74. **Harvey, J. J.** 1964. An Unidentified Virus Which Causes the Rapid Production of Tumours in Mice. *Nature* **204**:1104-5.
75. **Hata, Y., A. Kikuchi, T. Sasaki, M. D. Schaber, J. B. Gibbs, and Y. Takai.** 1990. Inhibition of the ras p21 GTPase-activating protein-stimulated GTPase activity of c-Ha-ras p21 by smg p21 having the same putative effector domain as ras p21s. *J Biol Chem* **265**:7104-7.
76. **Haynes, R. C., Jr.** 1958. The activation of adrenal phosphorylase by the adrenocorticotrophic hormone. *J Biol Chem* **233**:1220-2.
77. **Herskowitz, I.** 1995. MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell* **80**:187-97.
78. **Hibi, M., A. Lin, T. Smeal, A. Minden, and M. Karin.** 1993. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* **7**:2135-48.
79. **Hofer, F., S. Fields, C. Schneider, and G. S. Martin.** 1994. Activated Ras interacts with the Ral guanine nucleotide dissociation stimulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:11089-93.
80. **Hu, C. D., K. Kariya, T. Okada, X. Qi, C. Song, and T. Kataoka.** 1999. Effect of phosphorylation on activities of Rap1A to interact with Raf-1 and to suppress Ras-dependent Raf-1 activation. *J Biol Chem* **274**:48-51.
81. **Hurley, J. B., M. I. Simon, D. B. Teplow, J. D. Robishaw, and A. G. Gilman.** 1984. Homologies between signal transducing G proteins and ras gene products. *Science* **226**:860-2.
82. **Ikeda, M., S. Koyama, M. Okazaki, K. Dohi, and A. Kikuchi.** 1995. rap1 p21 regulates the interaction of ras p21 with RGL, a new effector protein of ras p21. *FEBS Lett* **375**:37-40.
83. **Innocenti, M., E. Frittoli, I. Ponzanelli, J. R. Falck, S. M. Brachmann, P. P. Di Fiore, and G. Scita.** 2003. Phosphoinositide 3-kinase activates Rac by entering in a complex with Eps8, Abi1, and Sos-1. *J Cell Biol* **160**:17-23.
84. **Ip, Y. T., and R. J. Davis.** 1998. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* **10**:205-19.
85. **Ito, M., K. Yoshioka, M. Akechi, S. Yamashita, N. Takamatsu, K. Sugiyama, M. Hibi, Y. Nakabeppu, T. Shiba, and K. I. Yamamoto.** 1999. JSAP1, a novel jun N-terminal protein kinase (JNK)-binding protein that functions as a Scaffold factor in the JNK signaling pathway. *Mol Cell Biol* **19**:7539-48.

86. **Johnson, R., B. Spiegelman, D. Hanahan, and R. Wisdom.** 1996. Cellular transformation and malignancy induced by ras require c-jun. *Mol Cell Biol* **16**:4504-11.
87. **Just, I., J. Selzer, M. Wilm, C. von Eichel-Streiber, M. Mann, and K. Aktories.** 1995. Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* **375**:500-3.
88. **Kamata, T., and J. R. Feramisco.** 1984. Epidermal growth factor stimulates guanine nucleotide binding activity and phosphorylation of ras oncogene proteins. *Nature* **310**:147-50.
89. **Kang, G., J. W. Joseph, O. G. Chepurny, M. Monaco, M. B. Wheeler, J. L. Bos, F. Schwede, H. G. Genieser, and G. G. Holz.** 2003. Epac-selective cAMP analog 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP as a stimulus for Ca²⁺-induced Ca²⁺ release and exocytosis in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* **278**:8279-85.
90. **Kashima, Y., T. Miki, T. Shibasaki, N. Ozaki, M. Miyazaki, H. Yano, and S. Seino.** 2001. Critical role of cAMP-GEFII--Rim2 complex in incretin-potentiated insulin secretion. *J Biol Chem* **276**:46046-53.
91. **Kawasaki, H., G. M. Springett, N. Mochizuki, S. Toki, M. Nakaya, M. Matsuda, D. E. Housman, and A. M. Graybiel.** 1998. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* **282**:2275-9.
92. **Kawata, M., Y. Matsui, J. Kondo, T. Hishida, Y. Teranishi, and Y. Takai.** 1988. A novel small molecular weight GTP-binding protein with the same putative effector domain as the ras proteins in bovine brain membranes. Purification, determination of primary structure, and characterization. *J Biol Chem* **263**:18965-71.
93. **Kazlauskas, A., and J. A. Cooper.** 1988. Protein kinase C mediates platelet-derived growth factor-induced tyrosine phosphorylation of p42. *J Cell Biol* **106**:1395-402.
94. **Kelkar, N., S. Gupta, M. Dickens, and R. J. Davis.** 2000. Interaction of a mitogen-activated protein kinase signaling module with the neuronal protein JIP3. *Mol Cell Biol* **20**:1030-43.
95. **Kikuchi, A., S. D. Demo, Z. H. Ye, Y. W. Chen, and L. T. Williams.** 1994. ralGDS family members interact with the effector loop of ras p21. *Mol Cell Biol* **14**:7483-91.
96. **Kimura, K., M. Ito, M. Amano, K. Chihara, Y. Fukata, M. Nakafuku, B. Yamamori, J. Feng, T. Nakano, K. Okawa, A. Iwamatsu, and K. Kaibuchi.** 1996. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* **273**:245-8.
97. **Kirstein, W. H., and L. A. Mayer.** 1967. Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. *J. Natl. Cancer Inst.* **39**:311-335.
98. **Kitayama, H., Y. Sugimoto, T. Matsuzaki, Y. Ikawa, and M. Noda.** 1989. A ras-related gene with transformation suppressor activity. *Cell* **56**:77-84.
99. **Klainer, L. M., Y. M. Chi, S. L. Freidberg, T. W. Rall, and E. W. Sutherland.** 1962. Adenyl cyclase. IV. The effects of neurohormones on the formation of adenosine 3',5'-phosphate by preparations from brain and other tissues. *J Biol Chem* **237**:1239-43.
100. **Knaus, U. G., and G. M. Bokoch.** 1998. The p21Rac/Cdc42-activated kinases (PAKs). *Int J Biochem Cell Biol* **30**:857-62.
101. **Kovalovsky, D., D. Refojo, A. C. Liberman, D. Hochbaum, M. P. Pereda, O. A. Coso, G. K. Stalla, F. Holsboer, and E. Arzt.** 2002. Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways. *Mol Endocrinol* **16**:1638-51.

102. **Kozasa, T., X. Jiang, M. J. Hart, P. M. Sternweis, W. D. Singer, A. G. Gilman, G. Bollag, and P. C. Sternweis.** 1998. p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for G α 12 and G α 13. *Science* **280**:2109-11.
103. **Kozma, R., S. Ahmed, A. Best, and L. Lim.** 1995. The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* **15**:1942-52.
104. **Kraemer, A., H. R. Rehmann, R. H. Cool, C. Theiss, J. de Rooij, J. L. Bos, and A. Wittinghofer.** 2001. Dynamic interaction of cAMP with the Rap guanine-nucleotide exchange factor Epac1. *J Mol Biol* **306**:1167-77.
105. **Krengel, U., L. Schlichting, A. Scherer, R. Schumann, M. Frech, J. John, W. Kabsch, E. F. Pai, and A. Wittinghofer.** 1990. Three-dimensional structures of H-ras p21 mutants: molecular basis for their inability to function as signal switch molecules. *Cell* **62**:539-48.
106. **Kwon, G., K. L. Pappan, C. A. Marshall, J. E. Schaffer, and M. L. McDaniel.** 2004. cAMP Dose-dependently prevents palmitate-induced apoptosis by both protein kinase A- and cAMP-guanine nucleotide exchange factor-dependent pathways in beta-cells. *J Biol Chem* **279**:8938-45.
107. **Kyriakis, J. M., P. Banerjee, E. Nikolakaki, T. Dai, E. A. Rubie, M. F. Ahmad, J. Avruch, and J. R. Woodgett.** 1994. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* **369**:156-60.
108. **Kyriakis, J. M., D. L. Brautigan, T. S. Ingebritsen, and J. Avruch.** 1991. pp54 microtubule-associated protein-2 kinase requires both tyrosine and serine/threonine phosphorylation for activity. *J Biol Chem* **266**:10043-6.
109. **Lambert, J. M., Q. T. Lambert, G. W. Reuther, A. Malliri, D. P. Siderovski, J. Sondek, J. G. Collard, and C. J. Der.** 2002. Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3)K-independent mechanism. *Nat Cell Biol* **4**:621-5.
110. **Lang, P., F. Gesbert, M. Delespine-Carmagnat, R. Stancou, M. Pouchelet, and J. Bertoglio.** 1996. Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *Embo J* **15**:510-9.
111. **Laroche-Joubert, N., S. Marsy, S. Michelet, M. Imbert-Teboul, and A. Doucet.** 2002. Protein kinase A-independent activation of ERK and H,K-ATPase by cAMP in native kidney cells: role of Epac I. *J Biol Chem* **277**:18598-604.
112. **Lawler, S., Y. Fleming, M. Goedert, and P. Cohen.** 1998. Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases in vitro. *Curr Biol* **8**:1387-90.
113. **Leonardi, A., H. Ellinger-Ziegelbauer, G. Franzoso, K. Brown, and U. Siebenlist.** 2000. Physical and functional interaction of filamin (actin-binding protein-280) and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *J Biol Chem* **275**:271-8.
114. **Li, F., and H. N. Higgs.** 2003. The mouse Formin mDia1 is a potent actin nucleation factor regulated by autoinhibition. *Curr Biol* **13**:1335-40.
115. **Lin, R., S. Bagrodia, R. Cerione, and D. Manor.** 1997. A novel Cdc42Hs mutant induces cellular transformation. *Curr Biol* **7**:794-7.
116. **Liu, Z. G., H. Hsu, D. V. Goeddel, and M. Karin.** 1996. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* **87**:565-76.
117. **Lou, L., J. Urbani, F. Ribeiro-Neto, and D. L. Altschuler.** 2002. cAMP inhibition of Akt is mediated by activated and phosphorylated Rap1b. *J Biol Chem* **277**:32799-806.
118. **Lowenstein, E. J., R. J. Daly, A. G. Batzer, W. Li, B. Margolis, R. Lammers, A. Ullrich, E. Y. Skolnik, D. Bar-Sagi, and J. Schlessinger.** 1992. The SH2

- and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* **70**:431-42.
119. **M'Rabet, L., P. Coffe, F. Zwartkruis, B. Franke, A. W. Segal, L. Koenderman, and J. L. Bos.** 1998. Activation of the small GTPase rap1 in human neutrophils. *Blood* **92**:2133-40.
 120. **Machesky, L. M., and A. Hall.** 1996. Rho: a connection between membrane receptor signalling and the cytoskeleton. *Trends Cell Biol* **6**:304-10.
 121. **Madaule, P., and R. Axel.** 1985. A novel ras-related gene family. *Cell* **41**:31-40.
 122. **Maillet, M., S. J. Robert, M. Cacquevel, M. Gastineau, D. Vivien, J. Bertoglio, J. L. Zugaza, R. Fischmeister, and F. Lezoualc'h.** 2003. Crosstalk between Rap1 and Rac regulates secretion of sAPPalpha. *Nat Cell Biol* **5**:633-9.
 123. **Manser, E., H. Y. Huang, T. H. Loo, X. Q. Chen, J. M. Dong, T. Leung, and L. Lim.** 1997. Expression of constitutively active alpha-PAK reveals effects of the kinase on actin and focal complexes. *Mol Cell Biol* **17**:1129-43.
 124. **Mansour, S. J., W. T. Matten, A. S. Hermann, J. M. Candia, S. Rong, K. Fukasawa, G. F. Vande Woude, and N. G. Ahn.** 1994. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* **265**:966-70.
 125. **Margarit, S. M., H. Sondermann, B. E. Hall, B. Nagar, A. Hoelz, M. Pirruccello, D. Bar-Sagi, and J. Kuryan.** 2003. Structural Evidence for Feedback Activation by Ras GTP of the Ras-Specific Nucleotide Exchange Factor SOS. *Cell* **112**:685-695.
 126. **Marti, A., Z. Luo, C. Cunningham, Y. Ohta, J. Hartwig, T. P. Stossel, J. M. Kyriakis, and J. Avruch.** 1997. Actin-binding protein-280 binds the stress-activated protein kinase (SAPK) activator SEK-1 and is required for tumor necrosis factor-alpha activation of SAPK in melanoma cells. *J Biol Chem* **272**:2620-8.
 127. **Matuoka, K., M. Shibata, A. Yamakawa, and T. Takenawa.** 1992. Cloning of ASH, a ubiquitous protein composed of one Src homology region (SH) 2 and two SH3 domains, from human and rat cDNA libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:9015-9.
 128. **McDonald, P. H., C. W. Chow, W. E. Miller, S. A. Laporte, M. E. Field, F. T. Lin, R. J. Davis, and R. J. Lefkowitz.** 2000. Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science* **290**:1574-7.
 129. **McGrath, J. P., D. J. Capon, D. V. Goeddel, and A. D. Levinson.** 1984. Comparative biochemical properties of normal and activated human ras p21 protein. *Nature* **310**:644-9.
 130. **Mei, F. C., J. Qiao, O. M. Tsygankova, J. L. Meinkoth, L. A. Quilliam, and X. Cheng.** 2002. Differential signaling of cyclic AMP: opposing effects of exchange protein directly activated by cyclic AMP and cAMP-dependent protein kinase on protein kinase B activation. *J Biol Chem* **277**:11497-504.
 131. **Meller, N., M. Irani-Tehrani, W. B. Kiosses, M. A. Del Pozo, and M. A. Schwartz.** 2002. Zizimin1, a novel Cdc42 activator, reveals a new GEF domain for Rho proteins. *Nat Cell Biol* **4**:639-47.
 132. **Merritt, S. E., M. Mata, D. Nihalani, C. Zhu, X. Hu, and L. B. Holzman.** 1999. The mixed lineage kinase DLK utilizes MKK7 and not MKK4 as substrate. *J Biol Chem* **274**:10195-202.
 133. **Mertens, A. E., R. C. Roovers, and J. G. Collard.** 2003. Regulation of Tiam1-Rac signalling. *FEBS Lett* **546**:11-6.
 134. **Michiels, F., J. C. Stam, P. L. Hordijk, R. A. van der Kammen, L. Ruuls-Van Stalle, C. A. Feltkamp, and J. G. Collard.** 1997. Regulated membrane

- localization of Tiam1, mediated by the NH2-terminal pleckstrin homology domain, is required for Rac-dependent membrane ruffling and C-Jun NH2-terminal kinase activation. *J Cell Biol* **137**:387-98.
135. **Milburn, M. V., L. Tong, A. M. deVos, A. Brunger, Z. Yamaizumi, S. Nishimura, and S. H. Kim.** 1990. Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science* **247**:939-45.
 136. **Minden, A., A. Lin, F. X. Claret, A. Abo, and M. Karin.** 1995. Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* **81**:1147-57.
 137. **Minden, A., A. Lin, M. McMahon, C. Lange-Carter, B. Derijard, R. J. Davis, G. L. Johnson, and M. Karin.** 1994. Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science* **266**:1719-23.
 138. **Minden, A., A. Lin, T. Smeal, B. Derijard, M. Cobb, R. Davis, and M. Karin.** 1994. c-Jun N-terminal phosphorylation correlates with activation of the JNK subgroup but not the ERK subgroup of mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol* **14**:6683-8.
 139. **Mochizuki, N., Y. Ohba, S. Kobayashi, N. Otsuka, A. M. Graybiel, S. Tanaka, and M. Matsuda.** 2000. Crk activation of JNK via C3G and R-Ras. *J. Biol Chem.* **275**:12667-12671.
 140. **Moodie, S. A., B. M. Willumsen, M. J. Weber, and A. Wolfman.** 1993. Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science* **260**:1658-61.
 141. **Mulcahy, L. S., M. R. Smith, and D. W. Stacey.** 1985. Requirement for ras proto-oncogene function during serum-stimulated growth of NIH 3T3 cells. *Nature* **313**:241-3.
 142. **Mumby, S. M.** 2000. GTPases.
 143. **Munemitsu, S., M. A. Innis, R. Clark, F. McCormick, A. Ullrich, and P. Polakis.** 1990. Molecular cloning and expression of a G25K cDNA, the human homolog of the yeast cell cycle gene CDC42. *Mol Cell Biol* **10**:5977-82.
 144. **Muschel, R. J., G. Khoury, P. Lebowitz, R. Koller, and R. Dhar.** 1983. The human c-ras1H oncogene: a mutation in normal and neoplastic tissue from the same patient. *Science* **219**:853-6.
 145. **Nimnual, A. S., B. A. Yatsula, and D. Bar-Sagi.** 1998. Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos. *Science* **279**:560-3.
 146. **Nishiyama, T., T. Sasaki, K. Takaishi, M. Kato, H. Yaku, K. Araki, Y. Matsuura, and Y. Takai.** 1994. rac p21 is involved in insulin-induced membrane ruffling and rho p21 is involved in hepatocyte growth factor- and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced membrane ruffling in KB cells. *Mol Cell Biol* **14**:2447-56.
 147. **Nobes, C. D., and A. Hall.** 1995. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**:53-62.
 148. **Noren, N. K., W. T. Arthur, and K. Burridge.** 2003. Cadherin engagement inhibits RhoA via p190RhoGAP. *J Biol Chem* **278**:13615-8.
 149. **Ozaki, N., T. Shibasaki, Y. Kashima, T. Miki, K. Takahashi, H. Ueno, Y. Sunaga, H. Yano, Y. Matsuura, T. Iwanaga, Y. Takai, and S. Seino.** 2000. cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nat Cell Biol* **2**:805-11.

150. **Pages, G., P. Lenormand, G. L'Allemain, J. C. Chambard, S. Meloche, and J. Pouyssegur.** 1993. Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:8319-23.
151. **Pai, E. F., W. Kabsch, U. Krengel, K. C. Holmes, J. John, and A. Wittinghofer.** 1989. Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature* **341**:209-14.
152. **Pawson, T.** 1995. Protein modules and signalling networks. *Nature* **373**:573-80.
153. **Pfeuffer, T.** 1977. GTP-binding proteins in membranes and the control of adenylate cyclase activity. *J Biol Chem* **252**:7224-34.
154. **Pfeuffer, T., and E. J. Helmreich.** 1975. Activation of pigeon erythrocyte membrane adenylate cyclase by guanylnucleotide analogues and separation of a nucleotide binding protein. *J Biol Chem* **250**:867-76.
155. **Pizon, V., P. Chardin, I. Lerosey, B. Olofsson, and A. Tavitian.** 1988. Human cDNAs rap1 and rap2 homologous to the Drosophila gene Dras3 encode proteins closely related to ras in the 'effector' region. *Oncogene* **3**:201-4.
156. **Pohl, S. L., L. Birnbaumer, and M. Rodbell.** 1971. The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. I. Properties. *J Biol Chem* **246**:1849-56.
157. **Pulverer, B. J., J. M. Kyriakis, J. Avruch, E. Nikolakaki, and J. R. Woodgett.** 1991. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* **353**:670-4.
158. **Purchio, A. F., E. Erikson, J. S. Brugge, and R. L. Erikson.** 1978. Identification of a polypeptide encoded by the avian sarcoma virus src gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**:1567-71.
159. **Rangarajan, S., J. M. Enserink, H. B. Kuiperij, J. de Rooij, L. S. Price, F. Schwede, and J. L. Bos.** 2003. Cyclic AMP induces integrin-mediated cell adhesion through Epac and Rap1 upon stimulation of the beta 2-adrenergic receptor. *J Cell Biol* **160**:487-93.
160. **Ray, L. B., and T. W. Sturgill.** 1988. Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:3753-7.
161. **Reddy, E. P., R. K. Reynolds, E. Santos, and M. Barbacid.** 1982. A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* **300**:149-52.
162. **Rehmann, H., B. Prakash, E. Wolf, A. Rueppel, J. De Rooij, J. L. Bos, and A. Wittinghofer.** 2003. Structure and regulation of the cAMP-binding domains of Epac2. *Nat Struct Biol* **10**:26-32.
163. **Rehmann, H., A. Rueppel, J. L. Bos, and A. Wittinghofer.** 2003. Communication between the regulatory and the catalytic region of the cAMP-responsive guanine nucleotide exchange factor Epac. *J Biol Chem* **278**:23508-14.
164. **Rehmann, H., F. Schwede, S. O. Doskeland, A. Wittinghofer, and J. L. Bos.** 2003. Ligand-mediated activation of the cAMP-responsive guanine nucleotide exchange factor Epac. *J Biol Chem* **278**:38548-56.
165. **Ribeiro-Neto, F., J. Urbani, N. Lemee, L. Lou, and D. L. Altschuler.** 2002. On the mitogenic properties of Rap1b: cAMP-induced G(1)/S entry requires activated and phosphorylated Rap1b. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:5418-23.
166. **Ridley, A. J., and A. Hall.** 1992. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**:389-99.

167. **Ridley, A. J., H. F. Paterson, C. L. Johnston, D. Diekmann, and A. Hall.** 1992. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**:401-10.
168. **Rodbell, M., L. Birnbaumer, S. L. Pohl, and H. M. Krans.** 1971. The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanylnucleotides in glucagon action. *J Biol Chem* **246**:1877-82.
169. **Rodbell, M., H. M. Krans, S. L. Pohl, and L. Birnbaumer.** 1971. The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. 3. Binding of glucagon: method of assay and specificity. *J Biol Chem* **246**:1861-71.
170. **Rodbell, M., H. M. Krans, S. L. Pohl, and L. Birnbaumer.** 1971. The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. IV. Effects of guanylnucleotides on binding of 125I-glucagon. *J Biol Chem* **246**:1872-6.
171. **Rodriguez-Viciana, P., P. H. Warne, R. Dhand, B. Vanhaesebroeck, I. Gout, M. J. Fry, M. D. Waterfield, and J. Downward.** 1994. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* **370**:527-32.
172. **Rogge, R., R. Cagan, A. Majumdar, T. Dulaney, and U. Banerjee.** 1992. Neuronal development in the Drosophila retina: the sextra gene defines an inhibitory component in the developmental pathway of R7 photoreceptor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:5271-5.
173. **Rojas, R. J., R. J. Kimple, K. L. Rossman, D. P. Siderovski, and J. Sondek.** 2003. Established and emerging fluorescence-based assays for G-protein function: Ras-superfamily GTPases. *Comb Chem High Throughput Screen* **6**:409-18.
174. **Rossomando, A. J., D. M. Payne, M. J. Weber, and T. W. Sturgill.** 1989. Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:6940-3.
175. **Sakkab, D., M. Lewitzky, G. Posern, U. Schaeper, M. Sachs, W. Birchmeier, and S. M. Feller.** 2000. Signaling of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF) to the small GTPase Rap1 via the large docking protein Gab1 and the adapter protein CRKL. *J Biol Chem* **275**:10772-8.
176. **Sakoda, T., K. Kaibuchi, K. Kishi, S. Kishida, K. Doi, M. Hoshino, S. Hattori, and Y. Takai.** 1992. smg/rap1/Krev-1 p21s inhibit the signal pathway to the c-fos promoter/enhancer from c-Ki-ras p21 but not from c-raf-1 kinase in NIH3T3 cells. *Oncogene* **7**:1705-11.
177. **Sander, E. E., and J. G. Collard.** 1999. Rho-like GTPases: their role in epithelial cell-cell adhesion and invasion. *Eur J Cancer* **35**:1302-8.
178. **Sander, E. E., J. P. ten Klooster, S. van Delft, R. A. van der Kammen, and J. G. Collard.** 1999. Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol* **147**:1009-22.
179. **Sasaoka, T., W. J. Langlois, J. W. Leitner, B. Draznin, and J. M. Olefsky.** 1994. The signaling pathway coupling epidermal growth factor receptors to activation of p21ras. *J Biol Chem* **269**:32621-5.
180. **Schaeffer, H. J., A. D. Catling, S. T. Eblen, L. S. Collier, A. Krauss, and M. J. Weber.** 1998. MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science* **281**:1668-71.
181. **Schlessinger, J.** 1993. How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends Biochem Sci* **18**:273-5.
182. **Schlichting, I., S. C. Almo, G. Rapp, K. Wilson, K. Petratos, A. Lentfer, A. Wittinghofer, W. Kabsch, E. F. Pai, G. A. Petsko, and et al.** 1990. Time-

- resolved X-ray crystallographic study of the conformational change in Ha-Ras p21 protein on GTP hydrolysis. *Nature* **345**:309-15.
183. **Schmidt, A., and A. Hall.** 2002. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* **16**:1587-609.
184. **Schmidt, M., S. Evellin, P. A. Weernink, F. von Dorp, H. Rehmann, J. W. Lomasney, and K. H. Jakobs.** 2001. A new phospholipase-C-calcium signalling pathway mediated by cyclic AMP and a Rap GTPase. *Nat Cell Biol* **3**:1020-4.
185. **Scita, G., J. Nordstrom, R. Carbone, P. Tenca, G. Giardina, S. Gutkind, M. Bjarnegard, C. Betsholtz, and P. P. Di Fiore.** 1999. EPS8 and E3B1 transduce signals from Ras to Rac. *Nature* **401**:290-3.
186. **Scolnick, E. M., A. G. Papageorge, and T. Y. Shih.** 1979. Guanine nucleotide-binding activity as an assay for src protein of rat-derived murine sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:5355-9.
187. **Self, A. J., and A. Hall.** 1995. Purification of recombinant Rho/Rac/G25K from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* **256**:3-10.
188. **Sells, M. A., U. G. Knaus, S. Bagrodia, D. M. Ambrose, G. M. Bokoch, and J. Chernoff.** 1997. Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells. *Curr Biol* **7**:202-10.
189. **Shih, C., L. C. Padhy, M. Murray, and R. A. Weinberg.** 1981. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* **290**:261-4.
190. **Shih, C., B. Z. Shilo, M. P. Goldfarb, A. Dannenberg, and R. A. Weinberg.** 1979. Passage of phenotypes of chemically transformed cells via transfection of DNA and chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:5714-8.
191. **Shih, C., and R. A. Weinberg.** 1982. Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. *Cell* **29**:161-9.
192. **Shih, T. Y., M. O. Weeks, H. A. Young, and E. M. Scolnick.** 1979. Identification of a sarcoma virus-coded phosphoprotein in nonproducer cells transformed by Kirsten or Harvey murine sarcoma virus. *Virology* **96**:64-79.
193. **Shih, T. Y., M. O. Weeks, H. A. Young, and E. M. Scolnick.** 1979. p21 of Kirsten murine sarcoma virus is thermolabile in a viral mutant temperature sensitive for the maintenance of transformation. *J Virol* **31**:546-6.
194. **Shimizu, K., M. Goldfarb, M. Perucho, and M. Wigler.** 1983. Isolation and preliminary characterization of the transforming gene of a human neuroblastoma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**:383-7.
195. **Simon, M. N., C. De Virgilio, B. Souza, J. R. Pringle, A. Abo, and S. I. Reed.** 1995. Role for the Rho-family GTPase Cdc42 in yeast mating-pheromone signal pathway. *Nature* **376**:702-5.
196. **Smeal, T., B. Binetruy, D. A. Mercola, M. Birrer, and M. Karin.** 1991. Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature* **354**:494-6.
197. **Smith, M. R., S. J. DeGudicibus, and D. W. Stacey.** 1986. Requirement for c-ras proteins during viral oncogene transformation. *Nature* **320**:540-3.
198. **Spaargaren, M., and J. R. Bischoff.** 1994. Identification of the guanine nucleotide dissociation stimulator for Ral as a putative effector molecule of R-ras, H-ras, K-ras, and Rap. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:12609-13.
199. **Spiegel, S.** 1990. Cautionary note on the use of the B subunit of cholera toxin as a ganglioside GM1 probe: detection of cholera toxin A subunit in B subunit preparations by a sensitive adenylate cyclase assay. *J Cell Biochem* **42**:143-52.

200. **Stewart, S., and K. L. Guan.** 2000. The dominant negative Ras mutant, N17Ras, can inhibit signaling independently of blocking Ras activation. *J Biol Chem* **275**:8854-62.
201. **Stork, P. J.** 2003. Does Rap1 deserve a bad Rap? *Trends Biochem Sci* **28**:267-75.
202. **Su, Y., W. R. Dostmann, F. W. Herberg, K. Durick, N. H. Xuong, L. Ten Eyck, S. S. Taylor, and K. I. Varughese.** 1995. Regulatory subunit of protein kinase A: structure of deletion mutant with cAMP binding domains. *Science* **269**:807-13.
203. **Sutherland, E. W., I. Oye, and R. W. Butcher.** 1965. The Action of Epinephrine and the Role of the Adenyl Cyclase System in Hormone Action. *Recent Prog Horm Res* **21**:623-46.
204. **Sutherland, E. W., and T. W. Rall.** 1958. Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem* **232**:1077-91.
205. **Sutherland, E. W., and G. A. Robison.** 1966. The role of cyclic-3',5'-AMP in responses to catecholamines and other hormones. *Pharmacol Rev* **18**:145-61.
206. **Sweet, R. W., S. Yokoyama, T. Kamata, J. R. Feramisco, M. Rosenberg, and M. Gross.** 1984. The product of ras is a GTPase and the T24 oncogenic mutant is deficient in this activity. *Nature* **311**:273-5.
207. **Tabin, C. J., S. M. Bradley, C. I. Bargmann, R. A. Weinberg, A. G. Papageorge, E. M. Scolnick, R. Dhar, D. R. Lowy, and E. H. Chang.** 1982. Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* **300**:143-9.
208. **Takai, Y., T. Sasaki, K. Tanaka, and H. Nakanishi.** 1995. Rho as a regulator of the cytoskeleton. *Trends Biochem Sci* **20**:227-31.
209. **Taparowsky, E., Y. Suard, O. Fasano, K. Shimizu, M. Goldfarb, and M. Wigler.** 1982. Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change. *Nature* **300**:762-5.
210. **Teramoto, H., O. A. Coso, H. Miyata, T. Igishi, T. Miki, and J. S. Gutkind.** 1996. Signaling from the small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 to the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase pathway. A role for mixed lineage kinase 3/protein-tyrosine kinase 1, a novel member of the mixed lineage kinase family. *J Biol Chem* **271**:27225-8.
211. **Teramoto, H., P. Crespo, O. A. Coso, T. Igishi, N. Xu, and J. S. Gutkind.** 1996. The small GTP-binding protein rho activates c-Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases in human kidney 293T cells. Evidence for a Pak-independent signaling pathway. *J Biol Chem* **271**:25731-4.
212. **Thompson, P. W., A. M. Randi, and A. J. Ridley.** 2002. Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, but not ICAM-2, activates RhoA and stimulates c-fos and rhoA transcription in endothelial cells. *J Immunol* **169**:1007-13.
213. **Toda, T., I. Uno, T. Ishikawa, S. Powers, T. Kataoka, D. Broek, S. Cameron, J. Broach, K. Matsumoto, and M. Wigler.** 1985. In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell* **40**:27-36.
214. **Tournier, C., P. Hess, D. D. Yang, J. Xu, T. K. Turner, A. Nimnual, D. Bar-Sagi, S. N. Jones, R. A. Flavell, and R. J. Davis.** 2000. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* **288**:870-4.
215. **Tournier, C., A. J. Whitmarsh, J. Cavanagh, T. Barrett, and R. J. Davis.** 1999. The MKK7 gene encodes a group of c-Jun NH2-terminal kinase kinases. *Mol Cell Biol* **19**:1569-81.
216. **Trahey, M., and F. McCormick.** 1987. A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science* **238**:542-5.

217. **Trahey, M., G. Wong, R. Halenbeck, B. Rubinfeld, G. A. Martin, M. Ladner, C. M. Long, W. J. Crosier, K. Watt, K. Kohts, and et al.** 1988. Molecular cloning of two types of GAP complementary DNA from human placenta. *Science* **242**:1697-700.
218. **Urano, T., R. Emkey, and L. A. Feig.** 1996. Ral-GTPases mediate a distinct downstream signaling pathway from Ras that facilitates cellular transformation. *Embo J* **15**:810-6.
219. **Valencia, A., P. Chardin, A. Wittinghofer, and C. Sander.** 1991. The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry* **30**:4637-48.
220. **Van Aelst, L., and C. D'Souza-Schorey.** 1997. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* **11**:2295-322.
221. **van der Geer, P., and T. Pawson.** 1995. The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction. *Trends Biochem Sci* **20**:277-80.
222. **van der Geer, P., S. Wiley, V. K. Lai, J. P. Olivier, G. D. Gish, R. Stephens, D. Kaplan, S. Shoelson, and T. Pawson.** 1995. A conserved amino-terminal Shc domain binds to phosphotyrosine motifs in activated receptors and phosphopeptides. *Curr Biol* **5**:404-12.
223. **Walsh, D. A., J. P. Perkins, and E. G. Krebs.** 1968. An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* **243**:3763-5.
224. **Watanabe, N., T. Kato, A. Fujita, T. Ishizaki, and S. Narumiya.** 1999. Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol* **1**:136-43.
225. **Westwick, J. K., A. D. Cox, C. J. Der, M. H. Cobb, M. Hibi, M. Karin, and D. A. Brenner.** 1994. Oncogenic Ras activates c-Jun via a separate pathway from the activation of extracellular signal-regulated kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:6030-4.
226. **Westwick, J. K., C. Weitzel, A. Minden, M. Karin, and D. A. Brenner.** 1994. Tumor necrosis factor alpha stimulates AP-1 activity through prolonged activation of the c-Jun kinase. *J Biol Chem* **269**:26396-401.
227. **Whiteway, M. S., C. Wu, T. Leeuw, K. Clark, A. Fourest-Lieuvin, D. Y. Thomas, and E. Leberer.** 1995. Association of the yeast pheromone response G protein beta gamma subunits with the MAP kinase scaffold Ste5p. *Science* **269**:1572-5.
228. **Whitmarsh, A. J., J. Cavanagh, C. Tournier, J. Yasuda, and R. J. Davis.** 1998. A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation. *Science* **281**:1671-4.
229. **Wolfman, A., and I. G. Macara.** 1990. A cytosolic protein catalyzes the release of GDP from p21ras. *Science* **248**:67-9.
230. **Wu, J., P. Dent, T. Jelinek, A. Wolfman, M. J. Weber, and T. W. Sturgill.** 1993. Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science* **262**:1065-9.
231. **Wu, W. J., R. Lin, R. A. Cerione, and D. Manor.** 1998. Transformation activity of Cdc42 requires a region unique to Rho-related proteins. *J Biol Chem* **273**:16655-8.
232. **Xia, Z., M. Dickens, J. Raingeaud, R. J. Davis, and M. E. Greenberg.** 1995. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* **270**:1326-31.

233. **Yasuda, J., A. J. Whitmarsh, J. Cavanagh, M. Sharma, and R. J. Davis.** 1999. The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins. *Mol Cell Biol* **19**:7245-54.
234. **Yeh, W. C., A. Shahinian, D. Speiser, J. Kraunus, F. Billia, A. Wakeham, J. L. de la Pompa, D. Ferrick, B. Hum, N. Iscove, P. Ohashi, M. Rothe, D. V. Goeddel, and T. W. Mak.** 1997. Early lethality, functional NF-kappaB activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice. *Immunity* **7**:715-25.
235. **York, R. D., H. Yao, T. Dillon, C. L. Ellig, S. P. Eckert, E. W. McCleskey, and P. J. Stork.** 1998. Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* **392**:622-6.
236. **Yoshida, Y., M. Kawata, Y. Miura, T. Musha, T. Sasaki, A. Kikuchi, and Y. Takai.** 1992. Microinjection of smg/rap1/Krev-1 p21 into Swiss 3T3 cells induces DNA synthesis and morphological changes. *Mol Cell Biol* **12**:3407-14.
237. **Zhang, K., M. Noda, W. C. Vass, A. G. Papageorge, and D. R. Lowy.** 1990. Identification of small clusters of divergent amino acids that mediate the opposing effects of ras and Krev-1. *Science* **249**:162-5.
238. **Zhang, X. F., J. Settleman, J. M. Kyriakis, E. Takeuchi-Suzuki, S. J. Elledge, M. S. Marshall, J. T. Bruder, U. R. Rapp, and J. Avruch.** 1993. Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature* **364**:308-13.
239. **Zhao, Z. S., T. Leung, E. Manser, and L. Lim.** 1995. Pheromone signalling in *Saccharomyces cerevisiae* requires the small GTP-binding protein Cdc42p and its activator CDC24. *Mol Cell Biol* **15**:5246-57.
240. **Zheng, J., R. H. Chen, S. Corblan-Garcia, S. M. Cahill, D. Bar-Sagi, and D. Cowburn.** 1997. The solution structure of the pleckstrin homology domain of human SOS1. A possible structural role for the sequential association of diffuse B cell lymphoma and pleckstrin homology domains. *J Biol Chem* **272**:30340-4.
241. **Zheng, Y., D. Zangrilli, R. A. Cerione, and A. Eva.** 1996. The pleckstrin homology domain mediates transformation by oncogenic dbl through specific intracellular targeting. *J Biol Chem* **271**:19017-20.
242. **Zhong, H., H. SuYang, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and S. Ghosh.** 1997. The Transcriptional Activity of NF-kB Is Regulated by the Ikb-Associated PKAc Subunit through a Cyclic AMP-Independent Mechanism. *Cell* **89**:413-424.
243. **Zhou, K., Y. Wang, J. L. Gorski, N. Nomura, J. Collard, and G. M. Bokoch.** 1998. Guanine nucleotide exchange factors regulate specificity of downstream signaling from Rac and Cdc42. *J Biol Chem* **273**:16782-6.
244. **Zwartkruis, F. J., R. M. Wolthuis, N. M. Nabben, B. Franke, and J. L. Bos.** 1998. Extracellular signal-regulated activation of Rap1 fails to interfere in Ras effector signalling. *Embo J* **17**:5905-12.

Abreviaturas

FL: Full length o forma completa
 WT: wild type o forma salvaje
 AMPc: Adenosina mono fosfato cíclico
 MAPK: mitogen-activated protein kinase
 GDP: Guanosina di fosfato
 GTP: Guanosina tri fosfato
 WB: Western Blot
 GEF: guanine nucleotide exchange factor o factor intercambiador de GDP/GTP
 FK: Forskolina
 ATP: Adenosina tri fosfato
 RalGDS(RBD): Dominio RBD (**R**ap **b**inding **d**omain) de RalGDS
 PBD(CRIB): Dominio CRIB (**C**dc42 **R**ac interacting **b**inding domain)
 HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos
 DAG: Diacil glicerol
 CRH: Hormona liberadora de corticotrofina
 EGF: Factor de crecimiento epidérmico
 PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas
 PIP2: Fosfoinositol bi fosfato
 PIP3: Fosfoinositol tri fosfato
 PMA: Phorbol myristate acetate
 PKA: Proteína quinasa dependiente de AMPc
 PKC: Proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina
 RGS: Regulator of G protein signaling
 LPA: 1-oleoyl-lyso-phosphatidic acid
 TSH: Hormona estimuladora de tiroides
 SOS: Son of sevenless
 SAPK: stress-activated protein kinase
 GAP: GTPase-activating protein o proteína activadora de la actividad GTPasa
 JNK: c-Jun NH₂-terminal kinase
 ERK: Extracellular regulated kinase
 GST: Glutathione S-transferase

DEP: Dishevelled, Egl-10 and Pleckstrin

REM: Ras exchange motif

CBD: cAMP binding domain

HA: Hemagglutinin