



Dr EUGENIO SANTOS DE DIOS, Catedrático del Departamento de Microbiología y Genética,

Dr ALBERTO FERNANDEZ MEDARDE, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Microbiología y Genética,

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada **“Implicación de Pttg1 en procesos celulares y fisiológicos controlados por RasGrf1”** presentada por la licenciada **LARA MANYES i FONT**, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentada ante el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctora por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste a efectos legales, expide el presente certificado en Salamanca, a 16 de julio de 2012.

Dr Eugenio Santos de Dios

Director de la tesis doctoral

Dr Alberto Fernández Medarde

Director de la tesis doctoral

Esta memoria ha sido realizada siendo LARA MANYES I FONT beneficiaria de una ayuda predoctoral FPU del Ministerio de Educación para la elaboración de la tesis doctoral (2008-2012).

La investigación en el laboratorio ha sido financiada por los siguientes proyectos:

- Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca-IBMCC (CSIC-USAL). Fundación de Investigación del Cáncer (Cod. 1556). Ministerio de Sanidad. Fondo de Investigación Sanitaria (2007-2009). IP, E. Santos.
- Mecanismos de activación de oncoproteínas Ras: Análisis de especificidad funcional de diana Ras y sus activadores GEF en procesos fisiológicos y patológicos. Ministerio de Sanidad. Fondo de Investigación Sanitaria (2007-2009). IP, E. Santos.
- Estudios de especificidad funcional de oncoproteínas Ras y sus activadores celulares. Junta de Castilla y León (SA044A08) (2008-2010). IP, E. Santos.
- Especificidad funcional de proteínas Ras y sus activadores GEF en procesos fisiológicos y patológicos. Junta de Castilla y León GR93, Grupos de excelencia de Castilla y León (2008-2010). IP, E. Santos.
- Mecanismos de especificidad funcional de proteínas Ras y sus activadores celulares específicos GEF en procesos fisiológicos y patológicos. Fondo de Investigaciones Sanitarias. (Proyecto Intrasalud cPS09/01979) (2010-2013). IP, E. Santos.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER / INSTITUTO DE BIOLOGÍA
MOLECULAR Y CELULAR DEL CÁNCER (CSIC-USAL)**

Implicación de Pttg1 en procesos celulares y fisiológicos controlados por RasGrf1

TESIS DOCTORAL

Lara Manyes i Font

Salamanca, 2012

Tabla de contenidos

Abreviaturas	5
Índice de figuras	7
Índice de tablas	9
Introducción	11
I. RasGrf1, intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF)	11
1. Antecedentes	11
2. Estructura génica y expresión	11
a. Los loci de RasGrf1 y RasGrf2	12
b. Regulación de la expresión génica	14
3. Estructura y organización de las proteínas RasGrf	15
a. Estructura y organización de las proteínas RasGrf	15
b. Degradación proteolítica intracelular de las proteínas RasGrf	19
4. Señalización mediada por los RasGrf	19
a. Activación de los RasGrfs en respuesta al aumento de concentración de calcio intracelular	19
b. Activación de los RasGrfs en respuesta a receptores acoplados a proteína G (GPCR)	20
c. Activación de los RasGrfs en respuesta a receptores y no-receptores tirosin kinasa	22
5. Funciones de RasGrf a nivel celular	23
a. Crecimiento celular	23
b. Diferenciación	23
c. Morfología celular y organización	23
d. Excitabilidad y respuestas neuronales	24
e. Carcinogénesis	24
6. Funciones de RasGrf a nivel de organismo. Modelos animales de RasGrf1 y RasGrf2	25

II. Pituitary tumor transforming gene (Pttg1)	27
1. Antecedentes	27
2. Estructura génica y expresión a nivel de ARNm	27
3. Estructura proteica y expresión	29
a. Modificaciones posttranscripcionales de Pttg1	30
4. Funciones fisiológicas	30
a. Securina/replicación	30
b. Reparación del daño al ADN	31
c. Actividad transactivadora	31
5. Funciones tumorigénicas	32
a. Proliferación celular	32
b. Transformación celular y aneuploidía	32
c. Apoptosis	33
d. Angiogénesis	33
6. Modelo murino deficiente en Pttg1	34
III. Memoria y aprendizaje dependiente de hipocampo	35
1. Antecedentes	35
a. Los mecanismos de memoria son dependientes del tiempo	35
b. Desórdenes cognitivos	37
2. Modelos animales para estudiar la memoria y el aprendizaje	37
a. Comportamiento espacial	38
b. Sistemas de motivación en estudios de comportamiento	38
c. Bases celulares en comportamiento espacial	39
3. Hipocampo	39
a. Los receptores glutamatérgicos y su importancia en memoria y aprendizaje	40
b. Plasticidad sináptica	41
c. Señal glutamatérgica: interacciones con el receptor 5-HT _{1A} en hipocampo	43
IV. Páncreas: metabolismo y señalización	45
1. Posibles funciones de ERK1/2 en diabetes	46
Hipótesis y objetivos _____	49
Materiales y métodos _____	51
I. Primer capítulo	51
1. Herramientas bioinformáticas	51
2. Cultivos celulares	51

3.	Transducción lentiviral para el silenciamiento estable con shARN	52
4.	Ensayo de proliferación MTT	53
5.	Citometría de flujo	53
6.	Extracción de proteínas	54
7.	Electroforesis en gel de poliacrilamida y Western blot	54
8.	Determinación de la actividad transcripcional del promotores de Pttg1 ligado a un gen reportero de luciferasa	56
9.	Análisis estadístico	57
II. Segundo capítulo		57
1.	Animales	57
2.	Manipulación	58
3.	Experimento de discriminación visual	58
4.	Experimento de comportamiento	58
5.	Análisis estadístico	60
III. Tercer capítulo		61
1.	Animales	61
2.	Prueba de tolerancia a la glucosa	61
3.	Análisis estadístico de la prueba de tolerancia a la glucosa	62
Resultados y discusión		63
I. Análisis de las rutas de señalización implicadas en la regulación de la expresión de Pttg1 por la proteína GEF RasGrf1.		63
1.	Búsqueda bioinformática de proteínas clave en esta regulación	63
2.	Caracterización funcional de RasGrf1 y Pttg1 mediante silenciamiento estable de su expresión en células PC12	67
a.	Efecto de RasGrf1 y Pttg1 sobre la capacidad proliferativa en cultivo de las células PC12	68
b.	Estudio del ciclo celular en clones silenciados estables para RasGrf1 y Pttg1	70
c.	Efecto de la eliminación de Pttg1 y RasGrf1 sobre la activación de Ras y sus rutas efectoras	72
3.	Estudio de la activación del promotor de Pttg1 mediada por rutas de señalización activadas por RasGrf1	78
II. Estudio del comportamiento espacial en ratones RasGrf1^{-/-}, Pttg1^{-/-} y RasGrf1^{-/-} Pttg1^{-/-}		81
1.	Análisis del componente principal	82
2.	Tiempo total	83
3.	Errores de ejecución	84
4.	Estrategia de búsqueda espacial	86

III. Estudio del papel de RasGrf1 y Pttg1 en el control de ganancia de masa corporal y homeostasis de la glucosa	89
1. Análisis de la ganancia de masa corporal.	89
a. Animales no destetados	89
b. Animales destetados	90
2. Análisis de la de prueba de tolerancia a la glucosa	94
a. Prueba de tolerancia a la glucosa (GTT) a los 3 meses de edad en ratones RasGrf1-Pttg	94
b. Prueba de tolerancia a la glucosa (GTT) a los 10 meses de edad	96
Conclusiones _____	101
Bibliografía _____	103

Abreviaturas

ADN:	Ácido desoxirribonucleico	GTP:	5-trifosfato de guanosina
ADNc:	ADN complementario	IP:	Ioduro de propidio
ARN:	Ácido ribonucleico	Kb:	Kilo pares de bases
ARNm:	ARN mensajero	MAPKs:	Proteínas kinasas activadas por mitógenos
bp:	Pares de bases	MTT:	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
BSA:	Albúmina de suero bovino	PBS:	Tampón salino fosfato
cAMP:	3'-5'-adenosín monofosfato cíclico	PI3K:	Fosfatidilinositol 3-kinasa
CDKs:	Kinasas dependientes de ciclinas	PLC:	Fosfolipasa C
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium	RB:	Retinoblastoma
DMSO:	Dimetilsulfóxido	rpm:	Revoluciones por minuto
EDTA:	Ácido etilendiaminotetracético	RTKs:	Receptores tirosina kinasa
EGF:	Factor de crecimiento epidérmico	SAPKs:	Proteínas kinasas activadas por estrés
ERK:	Kinasas reguladas por señales extracelulares	SDS:	Dodecilsulfato sódico
FBS:	Suero fetal bovino	SH3:	Dominio de homología a SRC de tipo 3
GAPs:	Proteínas activadoras de la actividad GTPasa	shRNA:	RNA de interferencia ahorquillado
GDP:	5-difosfato de guanosina	SRE:	Elemento de respuesta al suero
GEFs:	Factores de intercambio de nucleótidos de guanina	TBS-T:	Tampón Tris salino y Tween 20
GO:	<i>Gene Ontology</i>	TCR:	Receptor de células T
GPCR:	Receptores acoplados a proteína G	°C:	Grados centígrados

Índice de figuras

Figura 1. Estructura genómica y de los loci de RasGrf1 y RasGrf2	13
Figura 2. Estructura de los dominios modulares de las proteínas RasGrf	17
Figura 3. Activación de los RasGrfs	21
Figura 4. Esquema de la proteína PTTG humana	28
Figura 5. Clasificación de los sistemas de memoria a largo plazo y las estructuras cerebrales relacionadas	36
Figura 6. Estructura del hipocampo	39
Figura 7. Ilustración esquemática de los mecanismos relacionados en LTP	43
Figura 8. Instalación de experimentación de comportamiento espacial	59
Figura 9. Silenciamiento de Pttg1 y RasGrf1 en células PC12 mediante interferencia estable con shARN	67
Figura 10. Medida de la proliferación celular en clones shPttg1, shRasGrf1 y pBK-CMV-RasGrf1	69
Figura 11. Estudio del ciclo celular en clones estables shRasGrf1 o shPttg1	71
Figura 12. Fosforilación de ERK1/2 y Akt en clones de células PC12 shPttg1 y shControl	73
Figura 13. Fosforilación de ERK1/2, Akt, JNK y p38 en clones de células PC12 shRasGrf1 y su shControl y pBK-CMV RasGrf1 y su control con el vector vacío	75
Figura 14. Western blots representativos de la sobreexpresión de RasGrf1 obtenida en COS1, 293T y BTC3	78
Figura 15. Medida del ensayo de luciferasa realizado con el promotor de Pttg1 en células COS1 y 293T	79
Figura 16. Medida del ensayo de luciferasa realizado con el promotor de Pttg1 En células BTC3 y PC12	80
Figura 17. Mantel con cuatro cuadrantes bien diferenciados para analizar la capacidad visual	81
Figura 18. Análisis del Componente Principal	82
Figura 19. Gráficas de barras de las medias obtenidas para diferentes variables medidas durante las sesiones del laberinto de Barnes	85
Figura 20. Gráficas representativas de la media de la evolución de los pesos de las crías durante la lactancia	90
Figura 21. Gráficas representativas de los pesos de ratones Pttg1 WT y KO	91
Figura 22. Gráficas representativas de los pesos de ratones RasGrf1-Pttg1 WT y KO	91

Figura 23. Gráfica de barras representativa de la media de los pesos de los ratones RasGrf1-Pttg1 a los 3 meses	92
Figura 24. Gráficas de barras representativas de la media de los pesos a los 10 meses de los ratones de los distintos genotipos	93
Figura 25. Gráficas representativas de las medias de los niveles de insulina obtenidos durante la prueba de tolerancia a la glucosa	95
Figura 26. Gráficas representativas de las medias de los niveles de glucosa obtenidos durante la prueba de tolerancia a la glucosa	97
Figura 27. Gráficas de barras de las medias obtenidas para el resto de variables medidas durante las sesiones del laberinto de Barnes	125

Índice de tablas

Tabla 1. Expresión de variantes e isoformas de RasGrf1	14
Tabla 2. Expresión de variantes e isoformas de RasGrf2	15
Tabla 3. Anticuerpos primarios usados en los experimentos de Western blot	55
Tabla 4. Anticuerpos secundarios usados en los experimentos de Western blot	56
Tabla 5. 36 secuencias consenso de factores de transcripción empleando los 2,3 kb de la secuencia del promotor de Pttg1 más cercanos al codón ATG	63
Tabla 6. Factores de transcripción con la expresión alterada en los arrays de tejidos de ratones deficientes en RasGrf1	64
Tabla 7. Proteínas que coinciden al comparar los interactomas de RasGrf1 y de los factores de transcripción de Pttg1.	121

Introducción

I. RasGrf1, intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF)

1. Antecedentes

El descubrimiento y caracterización de los genes CDC25 en *Saccharomyces* y STE6 en *Schyzosaccharomyces*, relacionados con las rutas de señalización a través de adenilato ciclasa y de Ras abrieron el camino al descubrimiento de la familia RasGrf en mamíferos [1, 2]. En una primera aproximación, Alan Wolfman e Ian Macara aislaron una proteína de 160kD a partir de un extracto citosólico de cerebro de rata capaz de acelerar la liberación de nucleótidos por parte de las proteínas p21Ras. A la misma se la llamó Ras-GRF, de sus siglas en inglés *Ras Guanosine nucleotide Releasing Factor* [3]. Prácticamente al mismo tiempo, el laboratorio de Tohru Kamata aisló de cerebro bovino una proteína asociada a membrana que liberaba nucleótidos de guanosina de diferentes miembros de la familia de GTPasas Ras [4]. En ratón se aisló el primer clon de cDNA al que llamaron CDC25Mm debido a que codificaba una proteína que compartía una alta homología con el CDC25 de levadura, especialmente en su región carboxi terminal [5, 6]. Posteriormente, en un screening de células madre embrionarias de ratón se aisló un clon parcial, con un 80% de identidad con CDC25Mm en el dominio catalítico, al que llamaron RasGrf2 [7]. Ahora que conocemos su estructura completa sabemos que comparten una distribución similar de dominios y una alta homología de secuencia [8].

2. Estructura génica y expresión

RasGrf1, a diferencia de *RasGrf2*, es un gen con impronta. La impronta genómica es un proceso de regulación epigenética que establece una metilación diferencial, específica de sexo, en el material genético que se hereda de cada progenitor. El establecimiento de estos patrones de metilación en los gametos provoca que, tras la fecundación, ciertos genes puedan ser activos en uno de los cromosomas parentales, pero no en el otro. Como consecuencia, puede existir un único alelo activo para el gen con impronta [9]. Se sabe

que los genes con impronta son deficientes en secuencias repetitivas (short interspersed transposable elements: SINEs) tanto en humanos [10] como en ratones [11]. Recientemente se ha publicado que, a diferencia del locus de *RasGrf1* en ratón, las regiones asociadas a regiones ricas en CpG del locus de *hRASGRF1* no muestran una metilación diferencial de tipo *parent-of-origin* [12].

a. Los loci de *RasGrf1* y *RasGrf2*

El gen de *Rasgrf1* en ratón está localizado en el cromosoma 9 y organizado en 26 exones. Su promotor abarca una región de 2.8 kbp en dirección 5' del sitio de inicio del mayor transcrito de *RasGrf1*, que incluye una isla CpG altamente conservada. A 489bp de la región inmediatamente anterior al primer sitio de inicio de la transcripción, se sitúan los sitios de unión de AP-1 y Oct1 [13]. Recientemente se ha ampliado a 1.3kbp el área que amplifica la expresión de *RasGrf1*, pues en esta región se han identificado secuencias consenso para los factores de transcripción cJun/AP1 [14].

El gen *RASGRF1* humano se localiza en el cromosoma 15 y está compuesta por 28 exones. Comparte un 82,2% de homología con el de ratón. En estudios empleando librerías de cDNA de cerebro humano se ha identificado una isoforma de 2,8kb, con 5'UTR diferente y una región N terminal más corta. 13 exones codifican una proteína llamada H-Grf55 con capacidad de complementar a CDC25 en *Saccharomyces* y activar la señalización por RAS en células de mamífero. La capacidad de liberar GDP está restringida a las proteínas de la familia RAS al no tener dominio DHPH [14, 15].

El gen *RasGrf1* en rata se localiza en el cromosoma 8 y está compuesto de 4 exones. Hasta el momento, en esta especie se han identificado tres transcritos, el más pequeño de los cuales se expresa exclusivamente en cerebro y páncreas y es similar a la proteína GRF β de ratón [16].

El gen en ratón de *RasGrf2* está compuesto por 24 exones localizados en el brazo largo del cromosoma 13 [17]. El transcrito completo de ARNm tiene una longitud de 7595 bp que codifica para una proteína de 1189 aminoácidos (aa) y 135.668 Da. En humanos este gen se encuentra en el cromosoma 5, comprendido en 24 exones, que se transcriben en un ARNm de 8100 bp de longitud y codifica para una proteína de 1237 aa con un peso de 140.764 Da [18].

Los mecanismos de metilación epigenética [13] y el splicing alternativo son los mayores responsables del control de la expresión de *RasGrf1*. *RasGrf1* es un gen con impronta que se expresa después del nacimiento en ratones, ratas y humanos [19]. Se ha visto que en cerebro de ratón neonato se expresa sólo el alelo paterno mientras que en otros tejidos, como pulmones, ovarios y testículos su expresión es bialélica [20, 21].

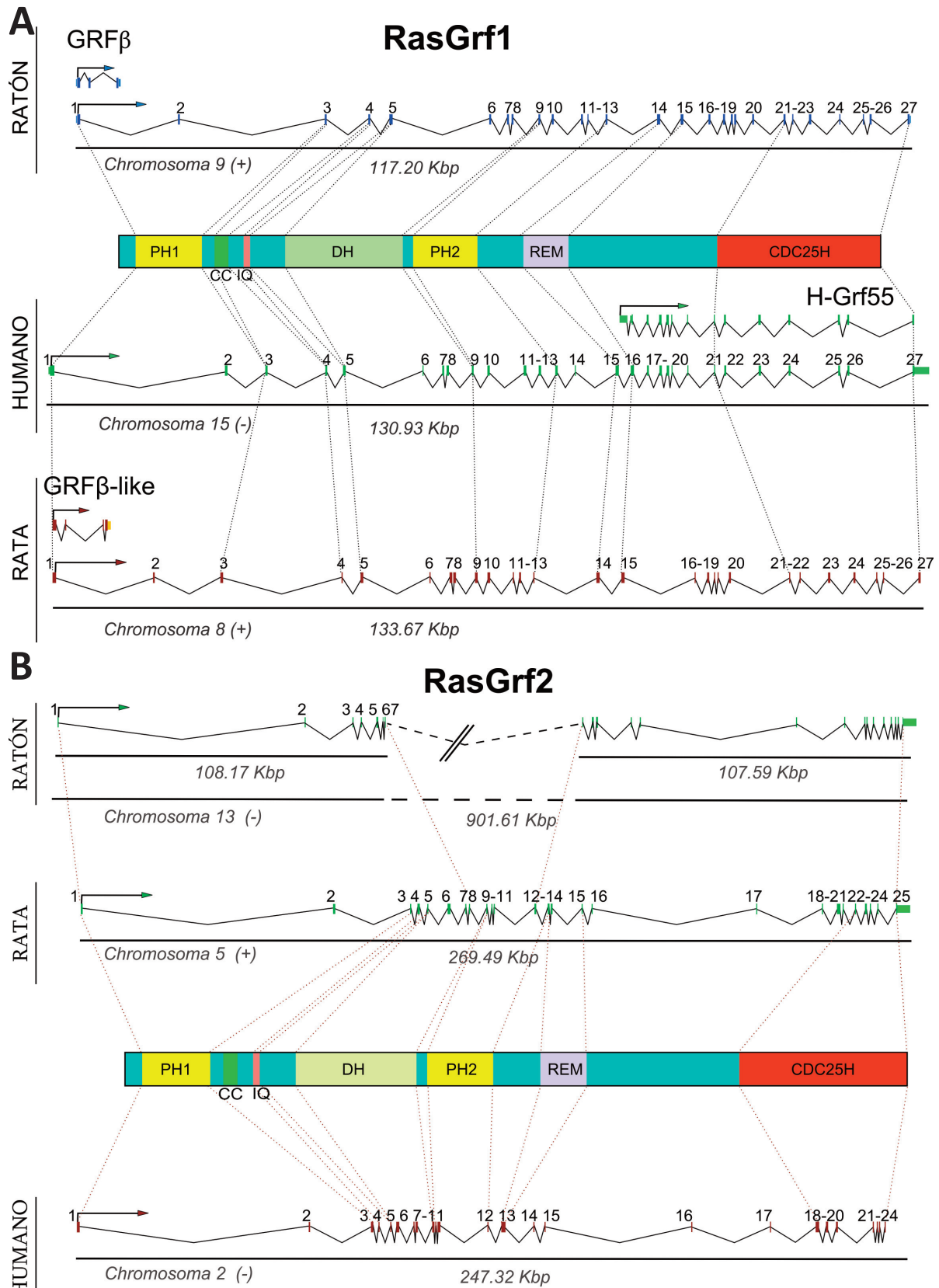


Fig 1. Estructura genómica y de los loci de *RasGrf1* (A) y *RasGrf2* (B). La organización genómica de intrones y exones en locus de *RasGrf* de ratón, rata y humano. Datos obtenidos de la base de datos Ensemble genome browser (ensemble.org). Extraídas de [18].

La expresión postnatal de RasGrf1 puede verse afectada por múltiples eventos de señalización. Los psychoestimulantes como la cocaína, anfetamina, o el tetrahidrocannabinol aumentan la expresión *in vivo* de esta proteína en el estriado y el córtex de rata y el cerebelo de ratón [22-24]. Se ha visto una reducción de la expresión de RasGrf1 en hipocampo de ratón transgénico que sobreexpresa la proteína precursora amiloide relacionada con la enfermedad de Alzheimer portadora de la mutación suiza (APPSw) [25] y en la glándula mamaria de ratones transgénicos que sobreexpresan ErbB2/Neu y la hormona luteinizante [26]. En el análisis proteómico de córtex de ratones que sobreexpresan la subunidad del receptor de NMDA NR2B se vio una gran bajada en la expresión de RasGrf1, sugiriendo un posible rol para esta proteína en la inhibición de la expresión de RasGrf1 o en la reducción de la expresión de RasGrf1 o de su vida media [27]. Por último explicar que en cultivos celulares de Rat1a, se ha demostrado que cJun/AP-1 ejerce un fuerte control de la expresión del transcrito p75-RasGrf1 [14].

b. Regulación de la expresión génica

Pese a no ser un gen impreso, la expresión de RasGrf2 también parece estar regulada por mecanismos epigenéticos. Se ha detectado una metilación significativa de la región 5' al inicio de la transcripción en líneas celulares de cáncer de páncreas, en carcinomas de mama de rata y en cáncer de colon y pulmón, aunque no se ha probado la actividad de RasGrf2 como supresor antitumoral en estos tejidos [28-30]. RasGrf2 se expresa en células madre embrionarias de ratón, donde fue descubierto [8]. *In vivo*, su expresión comienza tras el nacimiento siendo apenas detectable en ese momento y aumentando su concentración intracelular a medida que avanzan las semanas [19].

Humano	ARNm [6, 15, 31]	Cerebro Pulmones Páncreas Riñón Músculo esquelético y corazón Cerebro y pulmones fetales	9,6,5'5,2'4,2'2 kb 5,2'4,2'2 kb 5,2'2 kb 9,2'4 kb 2'2 kb 9,5,2'4,2'2 kb
	Proteína [31]	Cerebro, pulmones y páncreas Cerebro, pulmones y músculo esquelético	140 kDa Menor tamaño
Ratón	ARNm [5, 32, 33]	Cerebro y corazón Hígado, bazo y testículos	5,5'5,1'7 kb 1'7 kb
	Proteína [16, 33, 34]	Cerebro adulto Cerebro de embrión Islotes de páncreas aislados	140 kDa 58 kDa 140,20 kDa
Rata	Proteína [32, 35-38]	Neuronas maduras de cerebro y espina dorsal, hipocampo, córtex, cerebelo, tálamo e hipotálamo	140 kDa
		Páncreas acinar exocrino	58 kDa

Tabla 1. Expresión de variantes e isoformas de RasGrf1

Humano	Proteína [39]		136 kDa
Ratón	Proteína [7, 40, 41]	Sistema nervioso central, pulmones, retina Músculo Hígado Riñón Cerebro Corazón Pulmones Bazo Páncreas Testículos Células madre embrionarias	135 kDa 75,50 75,50 Todas menos 135 135,75,50 75,56,50 75 75 75,50 75,56,50 todas
Rata	ARNm [17]	cerebro páncreas, bazo, hígado, riñón	12,9,2'2 kb 12,2'2 kb

Tabla 2. Expresión de variantes e isoformas de RasGrf2

3. Estructura y organización de las proteínas RasGrf

a. Estructura y organización de las proteínas RasGrf

Ambas RasGrfs son proteínas multidominio que actúan como mediadoras de la señalización, transmitiendo diversos estímulos que llegan de receptores y segundos mensajeros hacia sus dianas de la familia de GTPasas Ras y Rac [18]. RasGrf1 es la mayor de la familia con 1273 aa y 145 kDa en humanos y 1262 aa y 144 kDa en ratón, especies entre las que se da un 83% de homología [16, 31, 33, 34]. La mayor diferencia se encuentra en los 13 aa “insertados” que hRasGrf1 tiene entre los residuos 614 y 615 correspondientes a mRasGrf1. RasGrf2 también tiene una gran homología entre la proteína murina con 1189 aa y 136 kDa [7, 40, 41] y la de humano con 1237 aa y 141 kDa [39]. Entre las versiones más cortas de estas proteínas merece la pena destacar: Grf β de 20 kDa [16] y HGRF55 de 55 kDa [15].

Tanto RasGrf1 como RasGrf2 presentan una serie de módulos o dominios comunes a muchas otras proteínas implicadas en señalización. Éstos están altamente conservados evolutivamente y tienen gran homología entre los dos miembros de la familia. Las diferentes funciones de cada dominio se ejercen mediante interacciones intra y/o intermoleculares, que permiten una fina regulación de los mecanismos y rutas de señalización en los que se ven involucrados. El resultado biológico final de la actividad de estas moléculas vendrá determinado por el balance de las interacciones de los estímulos recibidos y transmitidos a través de estos dominios [42].

Las proteínas RasGrf tienen dos dominios PH, el PH1 de la región N terminal, que parece más autosuficiente funcionalmente y PH2 que forma una unidad funcional con un domi-

nio DH adyacente [43]. Evidencias experimentales sugieren una importante contribución de estos dominios en la localización física de RasGrf1 en la membrana plasmática, probablemente por la interacción de los mismos con la fracción fosfatidilinositol de la membrana [44-46], función que ha sido descrita para este tipo de dominio en otras proteínas señalizadoras [43]. En fibroblastos, se demostró la necesidad de contar con la versión completa de RasGrf1 para activar mediante esmulación por suero a Ras, ya que las transfecciones realizadas con secuencias que carecían de los dominios PH no conseguían llevar a cabo esta activación [47]. En cualquier caso, al sobreexpresar versiones truncadas de RasGrf1, el anclaje a la membrana plasmática no desaparece por completo, aunque disminuye significativamente, lo que sugiere que otros dominios están también implicados en la localización en la membrana plasmática de este GEF [43, 47].

A PH1 se le ha asignado el rol de mediador de la interacción entre RasGrf1 y las subunidades β/γ de la proteína G [48-50]. Parece ser que esta interacción tiene que ver con la región carboxi terminal de PH1, mientras que la amino terminal sería responsable de la unión a fosfatidinositol [44]. PH1 también actúa de modulador intracelular, inhibiendo la actividad de RasGrf1. Se ha propuesto que la parte amino terminal de RasGrf1 regula negativamente la actividad GEF del dominio catalítico in vitro [51]. Hay publicaciones a favor [16, 47] y contrarias a [52] esta propuesta, pero en cada una emplean líneas celulares y construcciones de RasGrf1 distintas por lo que puede ser un proceso específico del tipo celular empleado y/o dependiente de aminoácidos concretos presentes en unas construcciones y no en otras.

Por otra parte PH1 coopera funcionalmente con los dominios vecinos en diferentes procesos celulares. Para activar a Ras, PH1 actúa junto con la hélice superenrollada y el dominio IQ, el cual se une a la calmodulina activada tras un incremento en el Ca^{+2} intracelular [53]. La activación de ERK mediante inducción por ácido lisofosfatídico (LPA) en células NIH3T3, demanda la presencia de los dominios PH1 e IQ [54]. Posiblemente, la colaboración de estos tres dominios sea fundamental para la interacción de RasGrf1 con la proteína de anclaje para p38 MAPK, IB2/JIP2. Ello permitirá el acercamiento y activación de p38 y Rac1 y de esta forma se acoplará la activación de RasGrf1 a Rac1, p38 y sus rutas efectoras [55]. Recientemente, se ha estudiado el interactoma del módulo PH1CCIQ de RasGrf1 y se ha visto por primera vez su capacidad para unirse un número considerable de ribosomas y proteínas que unen ARN, lo cual le podría conferir un rol en el control de la expresión génica [42]. Por último, es importante señalar que la región HIKE del receptor de NGF TrkA, interacciona con RasGrf1 mediante este dominio e induce su fosforilación y activación [56, 57].

Los dominios IQ de mRasGrf1 y mRasGrf2 son prácticamente idénticos, tanto en humano como en ratón. IQ es el dominio responsable de la activación de RasGrf1 por la calmodulina, cuya activación es dependiente de calcio [58]. En RasGrf2, en cambio, este dominio

es necesario pero no suficiente para unirse a calmodulina. Además, se ha visto que al eliminar IQ de la construcción de RasGrf2, éste sigue activando Ras pero no ERK en células 293T [59]. Ello puede ser debido a la necesidad de una red proteica que facilite la unión de Ras-GTP a sus efectores o por haberse visto afectada la localización subcelular de la proteína.

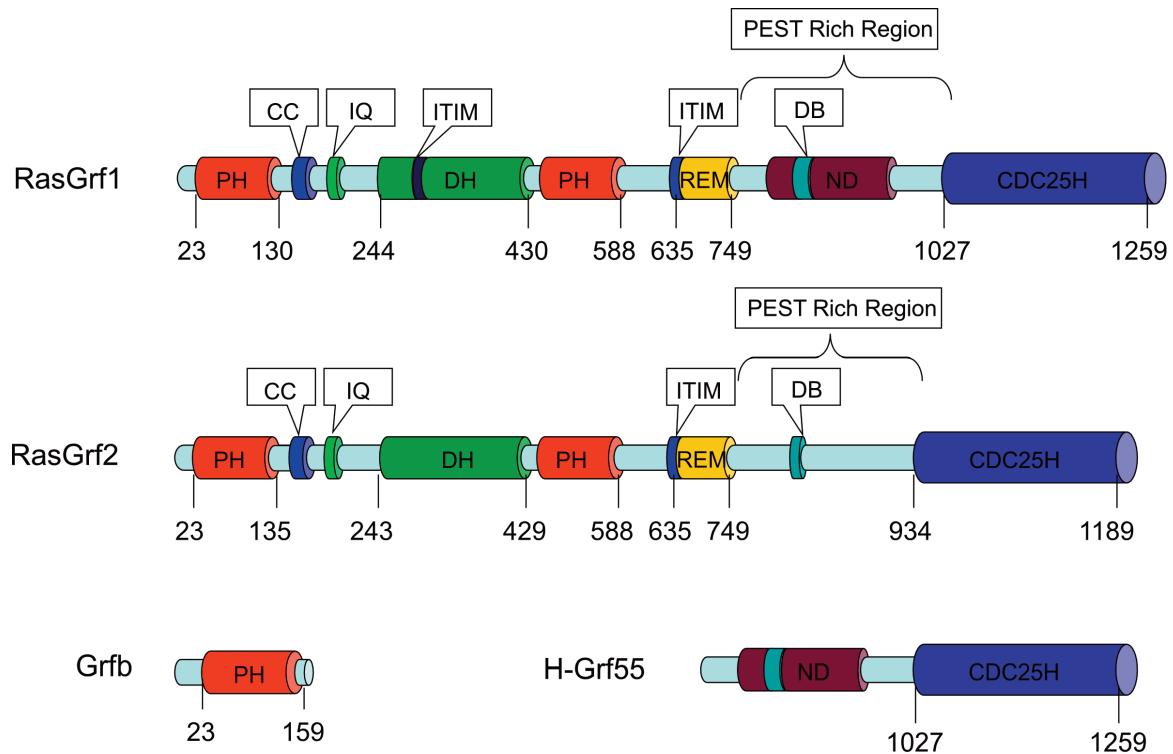


Fig 2. Estructura de los dominios modulares de las proteínas RasGrf. Distribución de los dominios de las proteínas RasGrf1 y RasGrf2 y dos isoformas de RasGrf1 que se expresan sólo en órganos determinados. Los tamaños representados son a escala aproximada. Los números de residuo que marcan los límites de los dominios pertenecen al ADNc de ratón. PH, *Pleckstrin homology domain*. CC, *coiled coil*, IQ *Isoleucine (I)/Glutamine (Q) motif*. DH, *Dbl homology domain*. ITIM, *Immuno Tyrosine based Inhibition Motifs*. REM, *Ras Exchange Motif*. CDB, *Cyclin Destruction Box*. ND, *Neurological Domain*. PEST Rich Region, (P)-*Proline*, (E)-*Glutamic acid*, (S)-*Serine*, (T)-*Threonine rich region*. CDC25H, *CDC25 homology domain*. Extraída de [18] con permiso de Fernández-Medarde, A.

El dominio DH está altamente conservado genéticamente entre humanos y ratones, lo que hace suponer el desempeño de un importante papel en cuanto a la funcionalidad de RasGrf, pero las publicaciones de estudios de deleciones parciales y mutaciones puntuales no lo han logrado aclarar. Actuando junto al dominio PH2 promueve el intercambio de GDP/GTP[60] en proteínas Rac, pero sólo al sobreexpresar con las subunidades beta/gamma [61] o al estimular con LPA [54]. DH parece ser la diana por la cual CDC42-GDP interacciona e inhibe a RasGrf1[52]. Asimismo, se intuye que podría estar dirigiendo a RasGrf a compartimentos de membrana específicos. Se ha visto que DH es necesario para la activación de H-Ras en el retículo endoplasmático pero no en la membrana plasmática [62]. Junto a PH2, DH se une a tubulina y al citoesqueleto microtubular [63] en

un proceso que activa la ruta Rac1/p38, pero no la de Ras/ERK y que es inhibido por SCLIP, una proteína que se une específicamente a los microtúbulos y a DH [64]. También se ha estudiado la homooligomerización y heterooligodimerización entre RasGrf1 y RasGrf2 mediante este dominio, proceso importante para la activación de determinadas rutas de señalización [39], aunque no se descarta la posibilidad de que otras proteínas estén implicadas en esta oligomerización.

Al igual que ocurre con el dominio DH, existen datos contradictorios sobre la función del dominio PH2 de RasGrf1 en la activación de Ras. En RasGrf2, juega un papel en la unión a efectores pero no se le ha detectado actividad catalítica propia [59]. El motivo ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) está presente por duplicado en RasGrf1, pero sólo una en RasGrf2. ITIM es diana de fosfatasa como SHP-1 y SHP-2 o SHIP [65] y podría estar implicado en la señalización a través de RasGrf1 y RasGrf2 de los receptores de las células T [66, 67]. El motivo REM (*Ras Exchange motif*) está conservado en la mayoría de los GEFs de la familia Ras y se sabe que está relacionado con la unión de estos GEF a sus dianas Ras GTPasa [68]. RasGrf2 se ubiquitina en la región CDB (*cyclin destruction box*) [59]. PEST es la diana de las proteasas tipo calpain en RasGrf1, aunque también se ha visto que es una posible diana para la fosforilación inducida por PKA [69, 70]. El dominio ND (*neuronal domain*) sólo aparece en RasGrf1 pero su función no está clara ya que una publicación la señala como responsable de la interacción con la subunidad NR2B del receptor NMDA, tanto en células HEK293T con co-expresión de las subunidades como en microsomas y cultivos primarios de cerebro de rata a los 14 días de edad, seguida de la activación de la ruta de ERK [71]. Existe otra publicación en la que se relaciona la contribución de RasGrf1-NR2B al proceso de LTD (*long term depression*) mediante la activación de p38MAPK [72]. En esta misma publicación, relacionan a RasGrf2 con el proceso de LTP (*long term potentiation*) a través de la activación de ERK. Todos los experimentos se realizaron en cortes de hipocampo de ratones RasGrf1 KO, RasGrf2 KO, RasGrf1-RasGrf2 dobles KO y sus controles [72].

El dominio más extremo en la parte carboxi terminal es CDC25H. Éste constituye el dominio catalítico necesario y suficiente para la actividad de intercambio de nucleótidos de Ras [73]. Es común a todos los GEF capaces de activar miembros de la subfamilia Ras [74]. Algunas publicaciones sugieren que la mitad amino terminal de RasGrf puede inhibir a la parte carboxi terminal, la cual muestra una mayor actividad como GEF al separarla del resto de la proteína [51, 63]. Por otra parte, hay publicaciones que afirman que una versión más corta de RasGrf1 [47], o simplemente el dominio catalítico [53], tienen una actividad basal o inducida por ionomicina similar o incluso inferior que la proteína completa. Las discrepancias pueden ser debidas al uso de diferentes sistemas celulares y ensayos bioquímicos, pero también podrían indicar que no existe una correlación directa entre la actividad enzimática intrínseca in vitro de las proteínas Ras purificadas y la actividad biológica in vivo mostrada en el contexto de varios sistemas biológicos [51, 75]. Sin embargo,

en estudios con RasGrf2 se ha visto que tanto la actividad de ERK como el intercambio de nucleótidos de Ras, se ven incrementados cuando se transfecta una construcción carente de la parte amino terminal de la proteína en células 293T, aunque esta activación se produce en ausencia de estímulos [59]. A pesar de la controversia, parece que estos trabajos apoyan la noción de que la parte amino terminal es responsable de la detección de interacciones con estímulos externos para modular la actividad de la proteína completa.

b. Degradación proteolítica intracelular de las proteínas RasGrf

Las proteínas RasGrf contienen en su región C terminal los dominios CDB (*cyclin destruction box*) y PEST relacionados respectivamente con procesos de ubiquitinación seguida de degradación proteosómica o degradación mediada por otro tipo de proteasas, como la calpaina. La modulación específica de las rutas que controlan estos procesos constituye un mecanismo de control adicional para regular la concentración intracelular de estas proteínas [51, 76-79].

4. Señalización mediada por los RasGrfs

Las primeras dianas de RasGrf1 y RasGrf2 que se descubrieron fueron las RasGTPasas canónicas, pero pronto se vio que, al contener otros dominios como el tándem DHPH, quizá fueran capaces de activar a miembros de la familia Rho [5], aunque en este caso, la actividad intercambiadora de RasGrf1 es específica de la GTPasa Rac1, no pudiendo activar a otros miembros de esta familia. Gracias a esta dualidad las proteínas RasGrf son capaces de activar a rutas de señalización implicadas en procesos muy variados.

a. Activación de los RasGrfs en respuesta al aumento de concentración de calcio intracelular:

El aumento del calcio intracelular provoca la activación de ambos RasGrfs y la señalización mediada por Ras [80]. Este proceso se inicia con la asociación de la calmodulina, tras su activación por calcio, al dominio IQ de RasGrf1 [58] y en el mismo también participan los dominios PH1 y CC (*coiled coil*), facilitando la localización subcelular [53]. Así mismo se ha visto que los dominios DH y PH2 son necesarios para una correcta activación de ERK al inducir las líneas celulares COS-7 y 293T con ionomicina [75]. La activación de RasGrf1 por el aumento del calcio intracelular, provocado por la inducción con ionomicina, está mediada por Cdc42 y tiene lugar preferentemente en la membrana plasmática [62].

La estimulación del receptor de NMDA (Fig. 3. A) provoca la activación dependiente de calcio en neuronas, en un ambiente fisiológico, a través de la interacción de RasGrf1 con la subunidad NR2B del receptor de NMDA. En un trabajo realizado en neuronas primarias,

se vio como, al transfectar un dominante negativo de NR2B, se bloqueaba la activación de ERK al estimular con NMDA y bicuculina [71]. En esta misma línea, otro estudio elaborado en secciones de hipocampo de ratón y neuronas en cultivo, describe que la activación de los receptores de NMDA y la consiguiente inducción de la fosforilación de la Ser916 de RasGrf1 y la activación de ERK, necesita de las acciones de la calmodulina quinasa y la calmodulina quinasa I [81]. Por el contrario, dos trabajos posteriores empleando ratones KO para RasGrf1 y RasGrf2 muestran que la activación de RasGrf1 por el receptor de NMDA contribuye en mayor medida a la activación de p38MAPK que a la de ERK, y sugieren una relación entre esta activación y la LTD (long term depression, depresión a largo plazo); mientras que la LTP (long term potentiation, potenciación a largo plazo) estaría mediada por la interacción entre la subunidad NR2A y RasGrf2, que activaría la ruta de ERK [72, 82]. Además, en secciones de córtex de ratones NR2B transgénicos se ha descrito una mejora de la LTP al reducir la expresión de RasGrf1 [27], lo que puede indicar una función distinta para este GEF dependiendo del área cerebral.

En resumen, las anteriores publicaciones apuntan a un primer nivel de especificidad entre las respectivas interacciones de los miembros de la familia RasGrf con las distintas subunidades del receptor de NMDA. El segundo nivel podría estar regulado por las diferentes proteínas de anclaje que determinan la interacción de RasGrf con efectores específicos [55, 83].

El receptor de AMPA activa RasGrf1 y RasGrf2 en presencia de calcio intracelular en cortes corticales de ratones post-adolescentes [84]. El receptor de serotonina acoplado a la proteína G heterotrimérica, al ser inducido por su agonista, parece necesitar la unión entre calcio/calmodulina y RasGrf1 para provocar la fosforilación de RasGrf1 por PKA in vitro y la fosforilación de ERK en células HEK293 [85] (Fig. 3. A).

Grf β actúa como un modulador negativo en la señalización mediada por calcio en células β pancreáticas, probablemente impidiendo la unión de RasGrf1 a proteínas activadoras o alterando su localización intracelular [16]. En células CHO se ha descrito que la activación por calcio de las proteasas m-calpain provoca la bajada de los niveles de expresión de RasGrf1. Además, la fosforilación de RasGrf1 en Ser731 por p35/CDK5 aumenta la sensibilidad a la degradación por calpain. El proceso desemboca en condensación y desorganización nuclear [79].

b. Activación de los RasGrfs en respuesta a receptores acoplados a proteína G (GPCR):

Los estímulos extracelulares que interaccionan específicamente con receptores transmembrana acoplados a proteína G heterotrimérica, pueden activar diversos segundos mensajeros y canales, para iniciar una gran variedad de rutas de señalización intracelular.

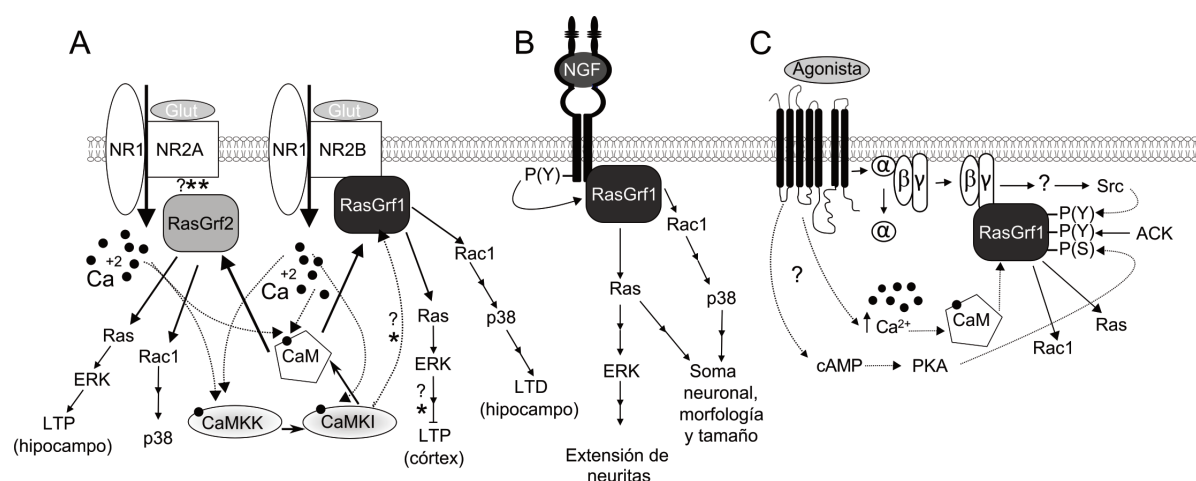


Fig. 3. Activación de los RasGrfs. **A.** Integración mediada por RasGrf de las señales de Ca^{2+} iniciadas por la activación de los receptores NMDA. Se ha demostrado que RasGrf1 se une directamente a la subunidad NR2B y se postula una interacción similar (?**) para RasGrf2 con la subunidad NR1A, basada en evidencias indirectas. Existe la hipótesis de que la calmodulina quinasa I (CaMKI) (?*) se une directamente a RasGrf1. Parece que la señalización intracelular activada por RasGrf1 podría, además de activar la respuesta LTD, inhibir la respuesta LTP. **B.** Activación de RasGrf1 por el receptor tirosina quinasa TrkA. **C.** Los receptores acoplados a proteínas G activan a RasGrf. Para que RasGrf1 se active es necesaria la fosforilación de los residuos de serina y tirosina. Además, para la estimulación completa de su actividad como intercambiador de nucleótidos, es imprescindible la acción de segundos mensajeros intracelulares como cAMP o calcio. P(Y), fosfotirosina; P(S), fosfoserina. Modif a partir de [18].

La estimulación del receptor por sus ligandos específicos provoca la división de los complejos G heterotriméricos en las subunidades $\text{G}\alpha\text{-GTP}$ y $\text{G}\beta\gamma$, quedando libres para interactuar específicamente con otros componentes situados por debajo de ellas en las rutas de transducción de señales [86, 87]. $\text{G}\beta\gamma$ interactúa con el dominio PH de proteínas como PLC γ , espectrina o IRS [48].

La estimulación con suero de las células NIH3T3 aumenta la actividad GEF de RasGrf1, lo que viene acompañado de su hiperfosforilación. En este trabajo sugieren que los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), y no los receptores tirosina quinasa (RTKs), son los responsables del efecto, ya que éste se suprime al pre-tratar las células con la toxina pertussis (PT) pero no con genisteína [88]. En células CHO se describió la misma sensibilidad al pre-tratamiento con PT al inducir con LPA o suero, pero no con PDGF (*platelet-derived growth factor*) [89]. La sobreexpresión in vitro del receptor muscarínico humano y la estimulación con carbacol provocan la fosforilación de RasGrf y aumentan su actividad GEF [90].

La fosforilación de los residuos de serina de RasGrf1 inducida por LPA se inhibe al bajar la concentración de calcio intracelular y mediante el tratamiento con PP1 (*protein phosphatase 1*) en células NIH3T3, lo cual sugiere un modelo en el que RasGrf1 actuaría como

integrador de señales [91]. La Ser916 de RasGrf1 se fosforila al estimular los receptores Trk mediante NGF, carbacol o forskolina en células PC12, COS-7 y secciones de proencéfalo y córtex de rata. En este mismo trabajo, los resultados extraídos del análisis de células PC12 diferenciadas correlacionan directamente la fosforilación, la expresión de H-Ras y el crecimiento de las neuritas [92]. Esta misma serina se fosforila al sobreexpresar receptores 5-HT4 y estimular con serotonina células HEK293 [85, 93].

La activación de GPRCs ha sido también asociada a la capacidad de los RasGrfs de activar a los miembros de la familia Rho, hay estudios de sobreexpresión de las subunidades $\beta\gamma$ de proteínas G en células 293T que demuestran el aumento de actividad GEF de RasGrf1 con respecto a Rac1 [61]. El dominio catalítico DH-PH2 de RasGrf1, responsable de la activación de Rac1, media la transducción de señales producidas a causa de la inducción por LPA que provocan la activación intracelular de JNK y el promotor c-fos [54].

c. Activación de los RasGrfs en respuesta a receptores y no-receptores tirosinasa:

Se ha demostrado que la interacción de la región N terminal de RasGrf1 con el dominio HIKE de TrkA, conduce a la fosforilación de tirosinas en el dominio PH1, en un proceso donde la transfección ectópica de RasGrf1 potencia la capacidad de NGF de promover la diferenciación, al inducir el crecimiento de neuritas en células PC12 [57]. Muy recientemente se ha descrito que este proceso de extensión de neuritas requiere la activación de H-Ras y Rac1 [94].

La tirosina kinasa no receptora, Src, media la señalización por GPCR, fosforila in vivo a RasGrf1 y activa su función como GEF de Rac1 [95]; aunque en el trabajo de Giglione y col. no ven ninguna actividad de Src sobre RasGrf1, también parece mantener activa la señalización por Ras al fosforilar a p120GAP, suprimiendo su actividad GAP [96]. La diferencia entre estos trabajos es que en el primero se realizan los ensayos en células 293T y en el segundo el análisis es in vitro, lo que sugiere que Src necesita otros componentes para actuar sobre RasGrf1. Lo que si ven en este segundo trabajo es que Lck, otra tirosina kinasa de la misma familia que Src, también es capaz de fosforilar y aumentar la capacidad GEF de RasGrf1 [96]. Por último mencionar que se sugiere una relación entre ACK1, una tirosina kinasa no receptora activada por Cdc42, una GTPasa de la familia Rho [97]. Cdc42 controla la translocación de RasGrf1 a la membrana plasmática en células COS-7 [52, 98] y se ha sugerido que también la de RasGrf2 en células HL-60 [99].

Al inducir el receptor de células T se activa RasGrf2, al igual que RasGrf1, en un proceso que parece requerir actividad tirosina kinasa de un miembro de la familia Scr [66].

5. Funciones de RasGrf a nivel celular

a. Crecimiento celular

El gen RasGrf1 de mamíferos fue identificado gracias a su capacidad para restaurar el fenotipo de crecimiento en levaduras carentes del locus CDC25 [6]. En fibroblastos de ratón se ha visto que su sobreexpresión induce la transformación celular e incrementa la proliferación [47, 100], al igual que en células NIH3T3 cuando fueron transfectadas con construcciones que se anclan constitutivamente a la membrana [101]. Para inducir proliferación, parece necesaria la integridad de los dominios de RasGrf1 implicados en la activación tanto de Ras como de Rac1, demostrando la necesidad de colaboración entre las rutas [52]. Es importante resaltar que fisiológicamente RasGrf1 sólo se expresa después del nacimiento y mayoritariamente en el sistema nervioso central (SNC), donde la proliferación celular es escasa.

Para RasGrf2 se ha relacionado este control de proliferación con contextos inmunológicos, donde se ha visto que participa en las respuestas de señalización de células T [66].

b. Diferenciación

Se ha visto que RasGrf1 promueve la diferenciación neuronal en estudios en los que se mide la elongación de las neuritas en líneas neuronales como SK-N-BE o PC12, en presencia de estímulos neurotróficos como ácido retinoico y NGF respectivamente, o mediante coexpresión con H-Ras, en un proceso independiente de los efectores Rac1 y PI3K [57, 92, 102, 103]. Muy recientemente se ha publicado que en células PC12, tanto la activación de TrkA por NGF como la de TrkB por BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*), ambos estímulos pertenecientes a la familia de las neurotrofinas, producen la diferenciación de estas células a través de la señalización de las rutas de Ras y Rac, mediante la activación de RasGrf1 [94].

En otro trabajo, se ha demostrado que SCLIP es capaz de inhibir la formación de neuritas inducidas por la activación de RasGrf1 en PC12 mediada por la activación de Rac1, pero no la mediada por H-Ras [64]. Como RasGrf1 también es capaz de interactuar con microtúbulos [63], existe la hipótesis de que este efecto inhibitor sea debido en mayor medida a una posible función de RasGrf1 en citoesqueleto que a su actividad GEF intrínseca [64].

c. Morfología celular y organización

También en células PC12 se ha descrito un aumento del tamaño del soma celular en un 25% de la población celular co-transfectada con RasGrf1 y H-Ras, debido a un proceso

independiente de la carga de GTP pero dependiente de la contribución de Rac1, PI3K y AKT [102]. En el trabajo de Talebian y col. citado en el apartado anterior, atribuyen este fenotipo a un artefacto causado por la sobreexpresión de H-Ras y no a la de RasGrf1, ya que sólo observan aumento del soma de las células PC12 al coexpresar ambas proteínas [94].

En un estudio en células COS-7 y cultivos corticales de rata, se ha observado la implicación de RasGrf1 en el control de la organización nuclear. En él demuestran que p35/Cdk5 fosforila a RasGrf1 y de esta manera provoca su degradación mediante m-calpain, regulando así sus niveles de expresión y la activación de Ras y Akt, para controlar la organización nuclear [79]. En este mismo tipo de neuronas se describe que la fosforilación de RasGrf2 por p35/Cdk5 provoca una acumulación de MAP1b, asociada con citoesqueleto [104].

d. Excitabilidad y respuestas neuronales

A RasGrf1 se le asigna un papel en procesos neuronales como la excitabilidad y la plasticidad sináptica, debido a su localización subcelular en las uniones sinápticas [105] y a la hiperexcitabilidad de las neuronas carentes de RasGrf1, probablemente debido a cambios en el equilibrio iónico de la membrana [106]. A ambos RasGrf se les atribuye un rol neuroprotectivo, ya que en episodios isquémicos experimentales se vio que su ausencia aumentaba los niveles celulares de apoptosis en ratones doble KO [19]. Este resultado fue confirmado en un estudio empleando un tratamiento de haloperidol, tras el cual se vio la disociación de RasGrf1 de los complejos del receptor de NMDA, provocando la activación de JNK y el incremento de la apoptosis [107]. Por otra parte está descrito que, en células epiteliales de lente de conejo, la activación de la ruta de Ras/ERK por RasGrf2 aumenta los niveles de p53 intracelular y la activación de la caspasa 3, lo cual apunta a un papel en apoptosis, al menos en este tipo celular [108].

e. Carcinogenesis

RasGrf1 podría estar relacionada con la invasión celular y la metástasis, debido a su capacidad para controlar la expresión de diferentes metaloproteinasas de matriz (MMP), fenómeno observado en una línea celular de melanoma humano [77] así como en sinoviocitos de tipo fibroblástico de pacientes con artritis reumatoide [109]. En otro trabajo reciente, los autores proponen que la eliminación de regiones diferencialmente metiladas en el locus impreso de RasGrf1 de células madre muy pequeñas de tipo embrionario/epiblastico (VSELs), podría provocar la formación de un tumor [110].

Aunque el papel de RasGrf2 en tumorigénesis no ha sido claramente definido, numerosos estudios han descrito la existencia de niveles reducidos de esta proteína en diversos tumores humanos y de roedores, asociados habitualmente a una metilación aberrante de

su locus genómico [28-30, 111]. Así mismo, las deficiencias genéticas en el locus de RasGrf2 junto con alteraciones en el de Vav1, podría estar relacionada con procesos de linfomagénesis y metástasis [67]. Reciente, Calvo y col. han descubierto que RasGrf2 actúa como un supresor tumoral mediante la inhibición de la actividad de Cdc42, independientemente de su capacidad de activar a Ras. Ambos RasGrfs modulan la actividad de Cdc42 [112].

6. Funciones de RasGrf a nivel de organismo. Modelos animales de RasGrf1 y RasGrf2

Por su expresión en el SNC, RasGrf1 parece tener un importante papel en procesos de memoria y aprendizaje. Un primer trabajo con ratones KO para este loci, mostró que los ratones presentaban defectos en el aprendizaje dependiente de amígdala como resultado de defectos en la LTP, mientras que el hipocampo no parecía estar afectado [113]. Otro estudio empleando una línea distinta de ratones KO ha descrito que estos tenían deficiencias en la generación de LTD, lo que produciría defectos en el aprendizaje dependiente de hipocampo [72, 114]. Estos resultados contradictorios es muy probable que se deban al uso de diferentes estrategias para suprimir la expresión del gen y/o por el diferente fondo genético que presentan las dos líneas de ratones KO.

Los ratones KO de RasGrf1 tienen defectos en fotorrecepción, sugiriendo un papel en retina, tejido proveniente del neuroectodermo. En los análisis electrorretinográficos realizados se han descubierto fuertes defectos en la percepción de la luz, un fenotipo que se agrava con la edad [41]. Recientemente un estudio “GWAS” identificó el locus de *RasGrf1* como susceptible de ser asociado a miopía y problemas en refracción en humanos, lo cual concuerda con alteraciones observadas en los cristalinicos de estos animales [115].

Estos ratones KO tienen reducida la tolerancia a la administración crónica de delta-9-tetrahidrocannabinol (THC). Parece ser que RasGrf1 es responsable de la adaptación del receptor cannabinoide CB1 en cerebelo y estriato [116, 117] y su eliminación suprime los cambios en plasticidad sináptica cerebelar después del tratamiento crónico con THC [118]. En respuesta al tratamiento con cocaína los ratones RasGrf1 KO muestran una menor sensibilización locomotora y preferencia de lugar condicionada (PLC), parámetros relacionados con la adicción [119]. PLC es una técnica que se basa en la premisa de que todos los seres vivos aprendemos a preferir estímulos que producen algún tipo de recompensa o euforia, evitando aquellos estímulos que producen dolor o disforia. Las cajas experimentales de PLC tienen dos compartimentos físicamente distintos (negro frente a blanco, suelo de reja frente a suelo de barras, etc.), los cuales funcionan como estímulos condicionados que los animales pueden distinguir perfectamente y asociar con los estados de recompensación o aversivos que experimentan [120].

Otro fenotipo descrito para estos ratones deficientes en RasGrf1 es un tamaño entre un 15% y un 25% inferior al de los controles que pone de relieve su importancia en el control del crecimiento postnatal [35, 40, 114]. En los estudios de caracterización, se vio que los niveles de hormona de crecimiento en la pituitaria de los ratones KO eran bajos, sugiriendo la importancia de la señalización mediada por RasGrf1 en el hipotálamo y cuya ausencia causaría defectos en la liberación de esta hormona y provocaría este fenotipo [35, 121].

En una de estas cepas de ratones KO para RasGrf1 se describió que los animales padecen intolerancia a la glucosa, bajos niveles de insulina circulante en plasma y una masa reducida de células β pancreáticas, que apuntan a un papel importante de RasGrf1 en el control de la proliferación y neogénesis de estas células [34].

En los ratones deficientes en RasGrf2 no se vio ningún fenotipo hasta que se estudió la señalización en cerebro y se describió una menor activación de ERK al inducir con NMDA [72]. Al eliminar la expresión de este gen junto con RasGrf1 se produce un aumento del daño neuronal inducido por isquemia en comparación con los mutantes simples y los controles, lo cual sugiere un solapamiento en la función neuroprotectora de estos genes, probablemente a causa de la reducción de la actividad de CREB [19]. También se ha podido observar un papel para este GEF al cruzar los ratones KO con animales carentes de Vav1, un intercambiador de nucleótidos de guanina de las GTPasas de la familia de Rho. Los ratones deficientes en RasGrf2/Vav1 han mostrado que RasGrf2 es un componente de la señalización que media la respuesta inmune a través del receptor de células T y NF-AT. Se ha observado que en estos ratones se da una sinergia en la deficiencia de ambos genes en procesos de linfomagénesis y metástasis [66, 67].

Es interesante apuntar que existe mucha similitud entre algunos de los fenotipos observados en los ratones KO para RasGrf1 y los descritos en otros animales deficientes en otras moléculas. Este es el caso de Pttg1 [122], S6K1 [123, 124] o Cdk4 [125], cuyo fenotipo coincide con el de RasGrf1 en cuanto a su menor tamaño y masa de células β pancreáticas reducida, lo que puede llevar a pensar que participan en las mismas rutas de señalización [18]. En nuestro laboratorio se han obtenido evidencias de una posible regulación de la expresión de Pttg1 ejercida por RasGrf1. Tanto en retina [41] como en algunas partes del cerebro e islotes de Langerhans (no publicado todavía) de los ratones RasGrf1 KO hay una bajada significativa de la expresión de Pttg1.

II. Pituitary tumor transforming gene (*Pttg1*)

1. Antecedentes

En los 15 años transcurridos desde su descubrimiento, *Pttg1* (*Pituitary tumor transforming gene 1*) ha sido ampliamente estudiada. Es una proteína multifuncional, relacionada fundamentalmente con la regulación del ciclo celular, daño al DNA y mecanismos de reparación actividad transcripcional directa, desarrollo de los órganos y metabolismo. Otro apunte importante es que *Pttg1* es un oncogen, y se ha relacionado un aumento de expresión con la transformación neoplásica. De hecho, su secuencia codificante se aisló por primera vez a partir de células tumorales de pituitaria de rata [126]. Su homología estructural le condujo a ser identificado como el homólogo en vertebrados de la securina, una proteína de levaduras crítica en la regulación de la separación de las cromátidas hermanas durante la mitosis [127].

2. Estructura génica y expresión a nivel de ARNm

El gen murino tiene un 88% de homología con el de rata. Se han descrito fragmentos de distintos tamaños obtenidos mediante splicing alternativo. El fragmento mayoritario, de 1 kb; un transcrito de 1'7 kb aislado en embriones entre los días 10-15, corazón y en las líneas celulares AtT20 y F9; así como un fragmento de 3 kb observado sólo en embriones, de la misma edad que los anteriores, y en la línea celular F9. Sólo se ha encontrado un sitio de comienzo de la transcripción a 303 bp en dirección 5' de este ATG que indica el sitio de inicio de la traducción. Deleciones seriadas en una región de 4'3 kb activa a 5' del ATG mostraron la importancia para la actividad promotora de tres secuencias (A-C) localizadas entre -313 a -150 bp, siendo la subregión -305 a -293 bp la más crítica [128]. El gen humano guarda un 85% de homología con el de rata y un 78% con el murino, está localizado en el cromosoma 5 [5q33 (18,22), 5q35.1 (23)] y se le conoce una sola isoforma de 1'3 kb [129].

El tamaño completo del cDNA de *Pttg1* en rata es de 974 bp pero mediante la técnica de Northern se ha visto la expresión de otras isoformas; una de 1'3 kb muy expresada en tumores de pituitaria y otra de 1 kb en testículos e hígado embrionario [126].

En humanos adultos los niveles más altos de ARNm para *PTTG1* se detectan en testículos y más débilmente en timo, intestino delgado, colon, placenta y bazo [129-131]. Se han observado abundantes niveles de ARNm de *Pttg1* en la mayoría de tumores pituitarios [128, 132-134] y se ha comprobado su sobreexpresión en cáncer colorrectal [135], esofágico [136], carcinoma hepático [137], en tumores de testículos, ovarios y mama [138], en leiomiomas de útero [139], así como en cáncer de tiroides [140] y de pulmón [141].

En condiciones fisiológicas, PTTG1 actúa como securina en mamíferos, exhibe un patrón de expresión ligado a la progresión del ciclo celular y está sujeta a ubiquitinación y degradación mediada por el proteasoma al final de la metafase [127, 142]. El ARNm de *Pttg1* aumenta durante la fase S y tiene su pico de máxima expresión en la transición S-G2, momento a partir del cual empieza a declinar [143, 144]. Los factores de transcripción Sp1, Oct-1 y, en menor medida, NF- κ B son importantes para mantener la actividad de transcripción basal del promotor de PTTG1 [145-147], sobretodo en células cancerígenas. Se ha descrito una posible relación entre la ruta de β -catenina/TCF y la regulación de hPTTG1 en cáncer de esófago y colorrectal [148, 149]. La Histona acetiltransferasa (HAT) p300 aumenta la actividad del promotor y la expresión de PTTG1 en células 293T; los ensayos ChIP demostraron el aumento en la acetilación de la histona H3 en este promotor al sobreexpresar p300 [150].

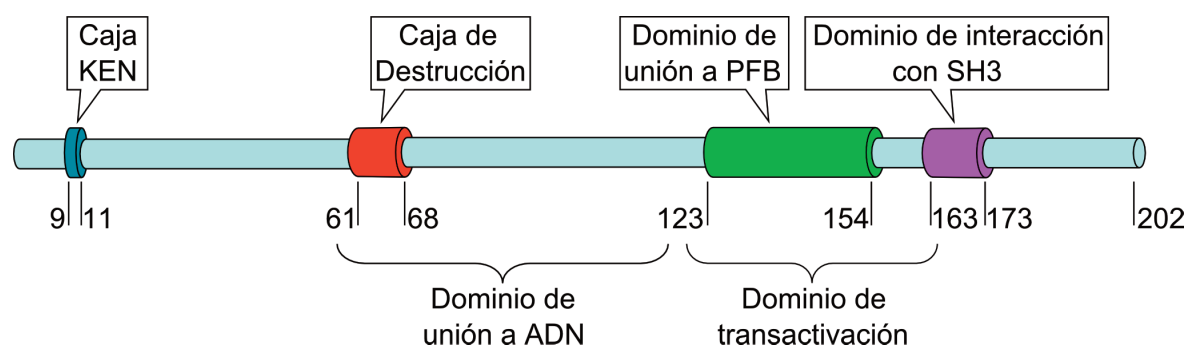


Fig 4. Esquema de la proteína PTTG humana. Los cilindros de colores representan a los dominios funcionales y los números, a la posición aminoacídica. El dominio de unión a ADN se encuentra entre los aminoácidos 61 y 118 [162]. El dominio de transactivación se halla entre los aminoácidos 119 y 164 [130, 144, 163].

La expresión del ARNm de *Pttg1* aumenta tras la administración de estrógeno, tanto *in vivo* en ratas como *in vitro* en las células de tumor pituitario de rata GH3 [151-153]. En células H-500 de cáncer de testículos de rata se vio que la unión del calcio extracelular de manera sostenida a los receptores de calcio inducía la expresión de ARNm de *Pttg1* [154] aunque este efecto parece ser específico del tipo celular ya que en células U87 de astrocitoma no se apreció. En este último tipo de línea celular se ha descrito un aumento de expresión de *Pttg1* al inducir con EGF y TGF α , ambos ligandos del receptor de EGF, y por HGF [155]. En células MCF-7 de cáncer de mama y en las U87, la insulina y el IGF-1 también provocan este aumento, mediado en ambos casos por la señalización a través de PI3K y MAPK [156, 157]. No queda claro si la inducción de la transcripción de PTTG1 es debida al agente inductor o a su capacidad secundaria de promover la proliferación [158].

El análisis del DNA genómico mediante PCR permitió la identificación de un homólogo de hPTTG1 con un intrón menos en el cromosoma 4p12. Su ADNc consta de 606 bp, con un 91% de identidad a nivel aminoacídico. A este nuevo gen se le denominó hPTTG2

[159]. La observación de múltiples poliformismos en timo normal en una región del hPTTG2 sugirió la existencia de una tercera isoforma [159]. Chen et al. describieron a hPTTG3, también con 606 bp y una identidad respecto a las isoformas 1 y 2 de 89 y 84% respectivamente [160].

3. Estructura proteica y expresión

La homología entre la proteína Pttg1 de rata y de humano asciende a 89%, mientras que la de éstas respecto a la murina es de 88 y 66% respectivamente [128]. La diferencia de migración observada en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) entre la de roedor, a 25kD, y la humana a 28-30 kD [130, 161] se atribuye a modificaciones posttranscripcionales [158]. A pesar de que las proteínas Pttg1 de vertebrados no comparten ninguna secuencia similar con sus homólogas en levaduras, existen características similares entre ellas, como los clusters de dominios ácidos y básicos [127].

hPTTG1 es muy hidrofílica y contiene una región amino terminal básica rica en aminoácidos [129], así como dos motivos ricos en prolina en la parte carboxi terminal [131], los que forman un hipotético dominio de interacción con los dominios de tipo (SH)-3 (*Src homology 3*). El análisis estructural determinó que Pttg1 prácticamente carece de estructura secundaria o terciaria [162], excepto la α -hélice en el segmento D150-F159, siendo ésta la región que interacciona con la separasa [163].

Como su variante humana, el Pttg1 murino ve anulada su funcionalidad si se mutan aminoácidos clave en su parte carboxi terminal (P139, S159) o en el motivo rico en PPXP [164]. En el Pttg1 de roedor se ha identificado tanto el dominio con capacidad de unión al DNA [165], como el de transactivación, ambos importantes para su actividad transcripcional [166]. Por último señalar que la parte amino terminal contiene la caja de destrucción D, conservada en las tres especies mencionadas, y la caja KEN en humanos o KDN en roedores, relacionadas con su degradación [127].

La localización subcelular de PTTG1 difiere entre los distintos estudios publicados, seguramente por los sistemas celulares y las técnicas empleadas, aunque parece ser tanto nuclear como citoplasmática. Recientemente se ha comenzado a elucidar alguna de sus posibles funciones en el citoplasma: la nucleación de los microtúbulos y polarización celular, dos procesos relacionados con la migración celular [167]. Existe la hipótesis de que Pttg1 fuese una proteína secretada, como apuntan los resultados obtenidos en líneas tumorales de pituitaria de ratón, donde ha sido detectada en el medio de cultivo, y en adenomas de pituitaria humanos y la línea celular AtT20, donde ha sido localizada en el aparato de Golgi y vesículas, aunque su función en dichos orgánulos se desconoce [168]. Sus funciones nucleares son: activador transcripcional y securina, bloqueando a la separasa hasta la alineación de las cromátidas hermanas en mitosis. Se ha identificado un fac-

tor de unión a PTTG (PBF), de 22 kD, que facilita la translocación al núcleo de PTTG1. Otros mecanismos descritos, como la activación de la cascada de MAPK mediante la estimulación con EGF o la expresión de la forma activa de MEK1, también estimulan la actividad de transactivación de PTTG [166].

a. Modificaciones posttranscripcionales de Pttg1

- Fosforilación

Pttg1 migra a veces como un doblete, aparentemente a causa de la fosforilación dependiente de la progresión del ciclo celular, sobre todo durante la mitosis. Cdk1 lo fosforila en S165 [169], MAPK en S162 [166] y también es fosforilado por DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*), aunque se desconoce el residuo afectado y el efecto que dicha fosforilación tiene sobre su función [170].

- Degradación

Se ha estudiado la ubiquitinación de hPTTG1 por el complejo promotor de anafase/ciclosoma (APC/C) en sus cajas D y KEN [142]. El proceso es catalizado mediante la activación de éste complejo a través de las proteínas fzy (fizzy/cdc20) y fzs (fizzy-related/cdh1/hct1) [142].

4. Funciones fisiológicas

a. Securina/replicación

Durante la metafase, las cromátidas hermanas están unidas entre sí por el complejo de cohesina, un proceso esencial para la correcta orientación bipolar de los cromosomas en los husos mitóticos [171]. La cohesina se ha descrito como un complejo multiproteico que necesita la actividad de 4 proteínas: Smc1, Smc3, Scc1 y Scc3. Se ha propuesto diferentes variantes de modelo de anillo de cohesina, encargado de sujetar a las cromátidas hermanas [172-176].

La securina se une a la separasa durante la mayor parte del ciclo celular e inhibe su actividad proteolítica [177-180]. En vertebrados, los complejos CiclinaB-Cdk1 también actúan paralelamente en este proceso, catalizando una fosforilación inhibitoria de la separasa [181, 182]. En la transición de la metafase a la anafase, cuando las cromátidas hermanas se han orientado, la fosforilación de los complejos APC por parte de ciclinaB/cdk1 provoca la ubiquitinación de la securina para su degradación proteosomal, mientras que la ciclinaB también se degrada [169]. La liberación de la separasa provoca la degradación, a su vez, de los complejos de cohesina [183], lo que permite la separación de las cromátidas hermanas y su segregación a ambas células hijas.

b. Reparación del daño al ADN

En células de mamífero, hPTTG1 se une a Ku-70, la subunidad reguladora de DNA-PK, un enzima relacionado con la reparación de roturas en la doble hélice del ADN. Se ha visto que la asociación se interrumpe en respuesta al daño al genoma, sugiriendo un papel para PTTG1 en la relación entre las rutas de respuesta al daño en el ADN y la segregación de las cromátidas hermanas, evitando la progresión de la mitosis mientras esté en curso la reparación [170]. Se ha visto en células de mamífero que la exposición a rayos X y luz UV reduce rápidamente los niveles de hPTTG1 tanto por inhibición de su síntesis como por un aumento de su degradación proteasomal [184] y el tratamiento de líneas celulares humanas cancerígenas con doxorubicina y bleomicina inducen la supresión dependiente de p53 de la expresión de PTTG1 [146].

c. Actividad transactivadora

Debido a su estructura y concretamente a la de su dominio carboxi terminal, similar a la de muchos activadores de la transcripción descritos en eucariotas [185], Domínguez y col. comenzaron el análisis de la función en transactivación de Pttg1 [130]. Los estudios de delección y mutagénesis de la parte carboxi terminal de mPttg1 sugieren que la estructura tridimensional es importante para esta función y han permitido distinguir los sitios críticos para la transactivación [164]. Pttg1 contiene un sitio consenso de fosforilación de MAPK dentro del dominio de transactivación, el cual, coincidiendo con lo descrito por Wang y Melmed [164], se halla entre los aminoácidos 119 y 164. La interacción de Pttg1 con MEK1 es necesaria para mediar los efectos de MAPK sobre su actividad transactivadora [166].

En otro estudio empleando líneas celulares con la expresión de Pttg1 inducible y arrays de DNA con 84 genes, se vio que al inducir Pttg1, aumentaba la expresión de 5 genes. Éstos son: *c-myc*, *PKC β -1*, *MEK1*, *MEK3* y *HSP70*. Pttg1 se une al promotor de *c-myc* cerca de TSS en un complejo proteico que contiene a USF-1. En este análisis también se identificó una región que se une a ADN entre los residuos 60 y 118, y esta unión es imprescindible para su actividad transcripcional [165]. FGF-2, factor de crecimiento de fibroblastos mitógeno y angiogénico, es una diana canónica de PTTG1. Ambos están sobreexpresados en diferentes tipos de tumores [134, 138-140, 151, 186] e *in vitro* se ha demostrado el aumento del ARNm de FGF-2 al sobreexpresar PTTG1 en varias líneas celulares, incluidos cultivos primarios [187]. Además se ha visto que la co-expresión con PBF (*Pttg1 binding protein*) aumenta considerablemente este efecto sobre FGF-2, lo que indica la necesidad de ambos para activar la transcripción de FGF-2 [187].

hPTTG1 regula la expresión hormonal en la pituitaria, función localizada entre los aminoácidos 147-202. En células GH3 lacto-somatotróficas, de pituitaria se vio que la trans-

fección del fragmento carboxi terminal de PTTG1 disminuye unas 10 veces la expresión del ARNm de la prolactina y su secreción. En cambio la expresión del ARNm y secreción de GH se incrementó en 4 veces [188].

Por último mencionar al estudio ChIP-on-chip, en el que se obtuvieron unos 700 promotores significativamente enriquecidos al inmunoprecipitar con un anticuerpo contra PTTG1, de los cuales 400 fueron identificados y clasificados en tres grupos funcionales: ciclo celular, control metabólico y rutas de transducción de señales. Estas regiones promotoras estaban enriquecidas en sitios de unión a factores de transcripción, especialmente Sp1 [189]. Se ha demostrado que PTTG1 interacciona con Sp1 para ejercer un rol coordinado en la modulación de la transición de fase G1/S, en un proceso independiente de p21 [189].

5. Funciones tumorigénicas

a. Proliferación celular

Las publicaciones en las que se analiza el efecto de Pttg1 en proliferación son poco con
36
cluyentes, ya que en algunos casos, al sobreexpresar esta proteína, aumenta [131, 165, 190] y en otros disminuye [126, 191] e incluso produce una parada del ciclo celular, provocando la acumulación de células en G2/M [144, 192, 193]. Estas variaciones pueden ser debidas a la mayor o menor facilidad de PTTG1 para translocarse al núcleo y la degradación que se produzca en cada tipo celular. En cambio, todos los trabajos en los que se ha disminuido experimentalmente la expresión de hPTTG1 con ARNsi, coinciden en señalar una inhibición de la proliferación independientemente de la línea celular empleada [137, 155, 194].

En células NT-2 se ha demostrado que dependiendo del nivel de expresión de PTTG1, se promueve la proliferación, cuando éste es bajo, o se producirá un retraso, e incluso parada del ciclo celular, con niveles altos [195]. Es interesante saber que el estado de fosforilación de PTTG1 también afecta al control de este proceso, ya que la presencia de PTTG1 fosforilado reduce la proliferación, mientras que en ausencia de fosforilación, se incrementa la proliferación de las células NIH3T3 transfectadas [196].

b. Transformación celular y aneuploidía

La capacidad transformante de PTTG1 está bien demostrada tanto *in vivo* como *in vitro* [126, 129, 131, 165, 184, 190]. Parece que uno de los mecanismos subyacentes a esta capacidad de PTTG1 sobreexpresado es la inducción de inestabilidad cromosómica y aneuploidía. En el estudio realizado por Yu y col. en las células humanas de cáncer de

pulmón H1299, demostraron que la acumulación de PTTG1, tanto por sobreexpresión como por su degradación defectuosa, inhibe la progresión de la mitosis y la segregación de los cromosomas sin afectar directamente a la citokinesis, lo que da lugar a aneuploidía [197].

Las células HCT116 de cáncer colorrectal humano también han sido empleadas para estudios similares por mantener su kariotipo estable y los puntos de comprobación de sus husos mitóticos intactos [198, 199]. En uno de ellos, la inactivación de *hPTTG1* por recombinación homóloga provoca pérdida cromosómica unida a anafases aberrantes durante las cuales las células intentan realizar, sin éxito, la segregación cromosómica. Este proceso se ha relacionado con defectos bioquímicos en la activación de la separasa y con una pérdida de efectividad al cortar la subunidad Scc1 de la cohesina [200]. Más adelante se vio, en estas mismas células, que PTTG1 parece ser necesario para la correcta localización centrosómica de la separasa durante la mitosis [201]. En otro estudio realizado en células HCT116, se observó que la pérdida cromosómica era transiente, después de unos pocos pases las células volvían a ser capaces de mantener su kariotipo estable pero persistían los defectos en la actividad de la separasa y en la lisis de Scc1. Concluyeron que muy probablemente había mecanismos compensatorios para la segregación cromosómica en las células humanas [202].

c. Apoptosis

Tal y como hemos visto anteriormente para la función proliferativa de PTTG1, su papel en apoptosis parece estar igualmente condicionado por su nivel de expresión intracelular. Los diversos estudios analizando el papel de Pttg1 en apoptosis, han obtenido resultados dispares en cuanto a los niveles de expresión a la que se induce apoptosis o supervivencia, pero en general sugieren que Pttg1 puede estar implicado tanto en procesos proapoptóticos, mediante su inducción del promotor de *p53* [192], como en bloqueo de la apoptosis por su unión específica a la proteína *p53* [193]. Estos resultados proponen un mecanismo tumorigénico para PTTG1, ya que la inhibición de la apoptosis mediada por *p53* a causa de la alta expresión de PTTG1, podría explicar la supervivencia de las células tumorales con *p53* intracelular funcional [193, 203].

d. Angiogénesis

La angiogénesis es un proceso importante para el desarrollo tumoral. En cáncer de colon se ha observado una fuerte correlación entre PTTG1 y la vascularización tumoral [204]. Asimismo, la expresión de esta proteína estimulada por estrógeno y la angiogénesis coinciden con la inducción en la pituitaria de FGF-2 y de VEGF-A (factor de crecimiento endotelial vascular) [151]. Se ha comprobado en varias líneas celulares que la sobreexpresión de PTTG1 induce a su vez la de FGF-2 [129, 139, 151, 196, 205] y, en algunos casos, ade-

más estimula la producción de VEGF-A [139, 190, 205, 206]. Un estudio con arrays de cDNA específico de genes relacionados con angiogénesis y células de tiroides transfectadas con PTTG1, reveló la regulación por la misma de gran cantidad de genes angiogénicos, entre ellos *ID3* y *TSP-1* [207]. PTTG1 unido a PBF induce la expresión de FGF-2, actuando directamente sobre su promotor como activador transcripcional [187], en cambio, se desconoce el mecanismo empleado para modular la expresión de VEGF-A.

6. Modelo murino deficiente en PTTG1

Los ratones *Pttg1*^{-/-} son viables y fértiles, algo que sorprendió a quienes lo crearon, aunque las hembras son subfértiles si las comparamos con camadas de ratones heterocigotos o control [208]. Estos ratones padecen hipoplasia esplénica y testicular, hiperplasia tímica y trombocitopenia, a pesar de tener un número de megacariocitos normal en médula ósea [208]. En otro estudio se vio que poseen un peso medio inferior al de los ratones control [209]. Los MEFs de *Pttg1*^{-/-} se dividen a la misma velocidad que los controles pero muestran una fase G1 más corta y la G2M prolongada, además se observan multitud de núcleos dañados, una morfología cromosómica aberrante, signos de aneuploidía y división centromérica prematura [208].

Estos animales tienen afectada la homeostasis de glucosa, lo cual conduce a los ratones machos a padecer diabetes en la madurez tardía [122]. Su desarrollo está relacionado con daño celular no autoinmune, insulinopenia y una masa de células β reducida [122]. La reducción de la masa de células β en los islotes de páncreas ya era evidente antes de la manifestación de la diabetes y su proliferación estaba mermada [122]. Los núcleos pleiotrópicos encontrados sugieren defectos en división celular [122] y más adelante se descubrió que estas células sufrían apoptosis en la primera etapa postnatal y senescencia en la etapa adulta, seguramente por acumulación de daño al ADN [210]. Se consiguió rescatar el fenotipo de los machos *Pttg1*^{-/-} realizándoles una gonadectomía y administrándoles estradiol, aunque no se observó ningún cambio en la morfología hipoplásica de las células β [211]. Los esteroides sexuales, también llamados gonadales, de la terapia hormonal pudieron prevenir la diabetes tardía gracias al aumento de la sensibilidad a la insulina, seguramente mediante el incremento de adiponectina en suero [211].

Los fenotipos y datos obtenidos en los estudios realizados con *RasGrf1* y *Pttg1* tanto *in vivo* como *in vitro*, apuntan a similitudes de función entre ambas proteínas en órganos cuyo análisis hemos decidido abordar. En esta tesis doctoral nos hemos centrado en dos órganos, cerebro y páncreas, y en estudios en cultivos celulares. En cerebro hemos elegido el hipocampo por la relación previamente observada en este órgano en nuestro laboratorio entre la expresión de *RasGrf1* y *Pttg1* y por la implicación de *RasGrf1* en memoria y aprendizaje, mientras que en páncreas hemos seleccionado los islotes de Langerhans por los defectos vistos en mantenimiento de la homeostasis de la glucosa y en la masa y número de islotes tanto en los ratones KO para *RasGrf1* como para *Pttg1*.

III. Memoria y aprendizaje dependiente de hipocampo

1. Antecedentes

Las funciones cognitivas corresponden a aquellas de más alto nivel dentro de los procesos mentales; incluyen la atención, la comprensión y el uso del habla, así como la memoria y el aprendizaje. Estos dos últimos se pueden definir como aquellos procesos en los cuales los individuos adquieren conocimiento, habilidades y experiencia, lo cual es retenido y como resultado se obtiene un comportamiento adaptativo. Las teorías neurobiológicas generales asumen que los cambios dependientes de la actividad en plasticidad sináptica son los componentes críticos subyacentes a la memoria y el aprendizaje. La investigación actual en este campo está centrada por lo tanto en caracterizar los cambios adaptativos tanto a nivel sináptico como a nivel de redes neuronales, que se modifican por la experiencia. Cada vez hay más evidencias que apuntan a que las propiedades de la red de transmisión sináptica son las responsables de los mecanismos de las adaptaciones neuronales. Se cree que neurotransmisores y rutas de señalización regulan los cambios a corto y largo plazo en plasticidad neuronal y fortaleza sináptica en neuronas y redes neuronales [212].

La generación de la memoria implica una serie de eventos que se suceden en el tiempo en el siguiente orden: la codificación, la consolidación, el almacenamiento y la recuperación. La codificación consiste literalmente en convertir la información recibida en un código, en prepararla y procesarla; cuanto más elaborada y detallada sea, más robusta será la memoria proporcionada [213]. En 1900, George Elias Müller y Alfons Pilzecker propusieron el concepto de consolidación al hipotetizar que la memoria necesita tiempo para fijarse y que durante este periodo puede sufrir alteraciones [214]. El almacenamiento es el resultado de la consolidación, es decir, la memoria a largo plazo, aunque ésta posteriormente se altere con el paso del tiempo [215]. Dependiendo del tipo de memoria parece que la información tiende a almacenarse en unas áreas del cerebro u otras. Finalmente la recuperación de la memoria es una recolección de recuerdos, un proceso mnemónico durante el cual la información almacenada es recordada e incorporada al comportamiento en curso [216].

Todavía no están bien determinados los mecanismos neuroquímicos y moleculares responsables de cada etapa del procesamiento de la memoria. Actualmente sabemos que diversos neurotransmisores juegan diferentes papeles en codificación y consolidación de la memoria recién adquiridas y que las cascadas moleculares relacionadas con procesos de consolidación incluyen respuestas como síntesis de proteínas, cambios en proteínas sinápticas y crecimiento dendrítico [213, 216].

a. Los mecanismos de memoria son dependientes del tiempo

El cerebro procesa la información de manera dependiente del tiempo. El término memoria a corto plazo se refiere a aquellos procesos en los cuales la información se maneja temporalmente antes de que sea retenida y consolidada como memoria a largo plazo. La información mantenida como memoria a corto plazo parece situarse en el córtex prefrontal [219, 220]. Para la conversión de esta memoria en memoria a largo plazo declarativa [221, 222], el lóbulo medio temporal es esencial pero su función parece durar un periodo limitado de tiempo [223]. Otros estudios apoyan la hipótesis de que el lóbulo medio temporal tiene un papel clave en la codificación de nueva información, mientras que el almacenaje permanente tendría lugar en el neocórtex [224]. Descubrimientos recientes apuntan a que los sistemas de memoria juegan un papel mucho más complejo en el proceso de aprendizaje. Las interacciones entre estos sistemas son, por lo tanto, complejas también en cualquier tipo de tarea de memoria, incluso en las consideradas simples [225].

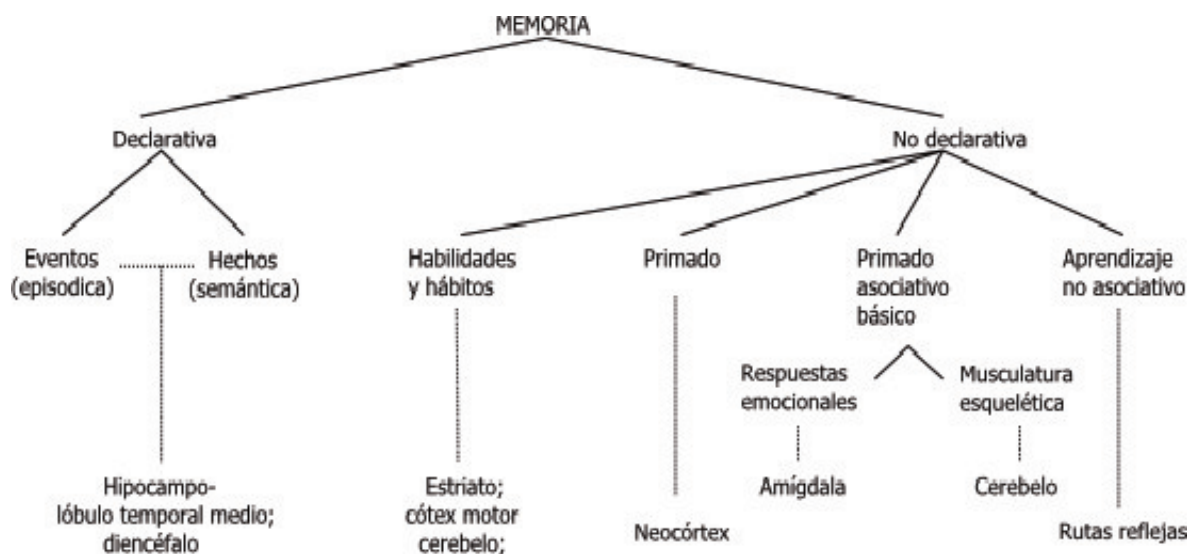


Fig 5. Clasificación de los sistemas de memoria a largo plazo y las estructuras cerebrales relacionadas. La memoria declarativa es aquella capaz de recolectar conscientemente hechos y eventos, mientras que la no declarativa requiere, por ejemplo, cambios en el comportamiento experimentado o en las respuestas emocionales condicionadas. Modificado desde [217, 218].

La investigación actual le da un papel al hipocampo en la recuperación de los tipos de memoria llamados episódica y contexto-dependientes. La teoría de huellas múltiples propone que el contexto espacio-temporal de la información contribuye al aspecto episódico de una memoria que siempre, independientemente del tiempo, involucra al hipocampo (espacial) y al córtex frontal (temporal) [226]. Sin embargo la memoria semántica (vocabulario, hechos...) sin contexto parece ser recuperable sin la participación del hipocampo [227, 228].

b. Desordenes cognitivos

Los defectos cognitivos son la característica principal de muchos desordenes neurodegenerativos como la demencia y la enfermedad de Parkinson, así como desordenes relacionados con la ansiedad, la depresión o la esquizofrenia. Además las disfunciones cognitivas pueden aparecer como consecuencia de un infarto, trauma craneal o tumores cerebrales [229, 230]. La demencia se define como una enfermedad degenerativa del cerebro que se manifiesta por una pérdida progresiva de la función de ambas memorias, a corto y a largo plazo, y de cambios en la personalidad. Varios desordenes patológicos la causan, pero la enfermedad de Alzheimer es el mayor responsable con un 50% de los casos. El Alzheimer se caracteriza por una atrofia en el lóbulo medio temporal, en concreto del hipocampo, como se ha visto en pacientes con Alzheimer temprano [231], una pérdida progresiva de las funciones de los neurotransmisores asociados a memoria y aprendizaje y, aunque varios de ellos estén implicados, hay un consenso general sobre la importancia de la pérdida de funciones colinérgicas en córtex e hipocampo para la aparición de los defectos cognitivos vistos en esta enfermedad [232-234]. La única alternativa médica disponible para el tratamiento sintomático de la enfermedad son las drogas que incrementan la cantidad de acetilcolina (ACh) en el SNC.

La hipoxia cerebral puede inducir un síndrome de amnesia. Se ha comprobado que el área CA1 del hipocampo es especialmente sensible a la hipoxia [221]. De igual manera, heridas en la cabeza pueden causar amnesia transiente o permanente, mientras que los pacientes con conmoción cerebral media normalmente tienen olvidos [229].

2. Modelos animales para estudiar la memoria y el aprendizaje

Se han empleado distintas aproximaciones para analizar los mecanismos de la memoria y el aprendizaje. Una está basada en intentar correlacionar los cambios de comportamiento como resultado de un entrenamiento y las alteraciones en los mecanismos moleculares y neuroquímicos del cerebro [213]. La segunda aproximación es la de entrenar y evaluar a los animales bajo la influencia de la manipulación de sistemas de los neurotransmisores, ligados a procesos cognitivos. Por último mencionar la aproximación que hemos utilizado durante esta tesis, en la que se indican cambios en la plasticidad sináptica mediante alteraciones percibidas en la actuación aprendida por el animal. Esta aproxi-

mación está basada en dos afirmaciones, primero que es posible distinguir entre aprendizaje y actuación, y segundo, que la manipulación es selectiva. Por lo tanto es preferible escoger tareas que involucren circuitos anatómicos suficientemente diferentes como el aprendizaje espacial [217].

Uno de los primeros científicos en estudiar la memoria y el aprendizaje a través de experimentos de comportamiento fue el fisiólogo ruso Iván Paulov (1849-1936), quién en sus famosos estudios empleando perros, descubrió los mecanismos fisiológicos subyacentes al condicionamiento clásico. Hoy en día hay muchos modelos de comportamiento que se usan para estudiar diferentes mecanismos cerebrales importantes para la memoria y el aprendizaje. Sin embargo aunque muchas de estas tareas de aprendizaje parezcan simples, es todo un reto intentar entender sus mecanismos biológicos. Es importante señalar que sólo se pueden sacar conclusiones sobre alteraciones en la memoria mediante cambios en el comportamiento, lo que significa que no se pueden interpretar cambios moleculares o neuroquímicos cerebrales sin correlación comportamental.

a. Comportamiento espacial

La habilidad animal de navegar y orientarse en un ambiente es de vital importancia para sobrevivir, por ejemplo, a la hora de salir a buscar comida y volver a la guarida. La memoria espacial es crítica para todas las especies, ya que en el proceso de búsqueda de un camino para llegar a un lugar determinado, el destino final no suele ser visible y la navegación se basa en la memorización de pistas específicas a lo largo de la ruta [235]. El comportamiento espacial se ha clasificado en dos categorías: navegación taxonómica, en la cual se emplean marcas del terreno como pistas respecto a las cuales el animal se puede acercar o alejar, y la navegación local, que requiere la integración de diferentes pistas para la identificación del área en la cual el animal puede calcular un camino [236].

b. Sistemas de motivación en estudios de comportamiento

La memoria y el aprendizaje en roedores y humanos dependen de diversos factores o motivaciones. El operante condicional está basado en el refuerzo positivo, es decir, regalar un premio, por ejemplo comida, después de una acción concreta, como presionar un botón. La aversión pasiva (PA) está basada en el refuerzo negativo; la respuesta comportamental se adquiere motivada por la necesidad de evitar un ambiente experimental relacionado con un evento poco agradable, como un shock eléctrico. En aprendizaje espacial, es habitual motivar a las ratas en el laberinto acuático de Morris, ya que no les gusta demasiado el agua aunque saben nadar por instinto. En nuestros estudios con el laberinto de Barnes para ratones la motivación aversiva aplicada ha sido una combinación de luz intensa y ruido blanco, de la que los animales se libran escapando a un compartimento oscuro, es decir, completando la tarea.

c. Bases celulares en comportamiento espacial

En la década de los 70, O'Keefe y Dostrovsky descubrieron un grupo de células dentro de la capa de células piramidales del hipocampo, a las que se denominó células de lugar, que se excitan cuando el animal está en una localización concreta [237, 238]. Se ha sugerido que estos agrupamientos de células de lugar que emiten juntas en relación a pistas en el ambiente, pueden proveer un mapa cognitivo del medio. La teoría del mapa cognitivo de la función del hipocampo sugiere que éste actúa como un sistema de mapeado aloentróico [236]. Más adelante se demostró que cuando un animal se sitúa en un ambiente nuevo, las células de lugar se forman rápidamente y se mantienen por un largo periodo de tiempo [239]. Sin embargo, otros estudios describen que las células de lugar también se excitan con el comportamiento en curso y el contexto de eventos en los que el animal se encuentre. Por lo tanto, la actividad neuronal del hipocampo posee ambas características, la espacial y la no espacial, indicando que estas células deben tener más funciones en los procesos de memoria espacial [240, 241].

3. Hipocampo

La región del hipocampo incluye a la formación del hipocampo, la cual consiste en tres regiones citoarquitectónicamente diferentes llamadas: giro dentado, el hipocampo propiamente (subdividido en CA3, CA2 y CA1; CA= Cornu Ammonis) y el subículo, y la región del parahipocampo adyacente, dividida en los córtices entorrinal, perirrinal y postrinal (en mamíferos, excepto primates) o parahipocampal (en primates) [242, 243].

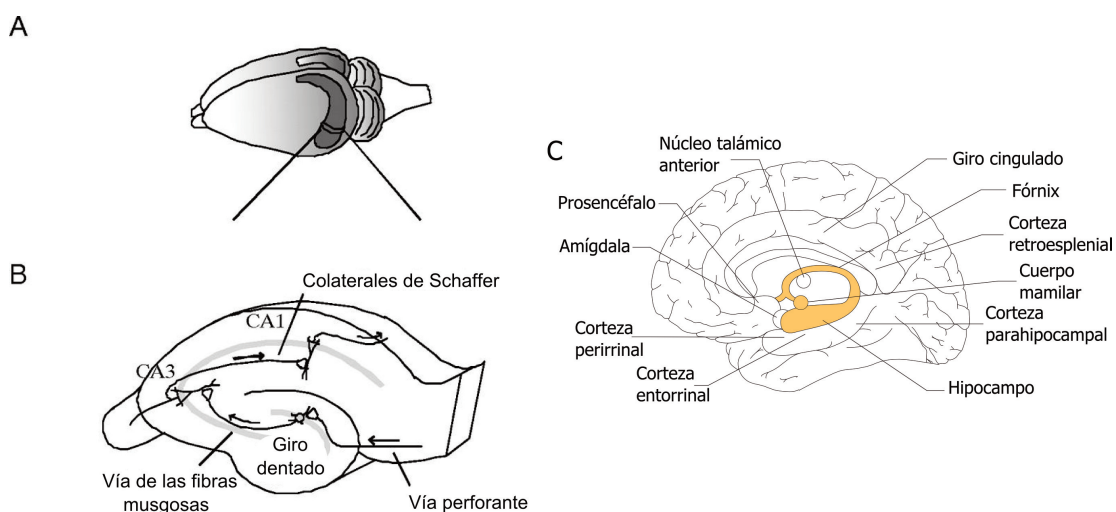


Fig 6. Estructura del hipocampo. A. Cerebro de ratón con el hipocampo resaltado [246]. B. Partes del hipocampo de ratón. CA, cornus ammonis [246]. C. Cerebro humano con el hipocampo resaltado. Modificado de [247].

La información proveniente de las áreas asociadas del neocórtex llega a la formación del hipocampo principalmente vía el córtex entorrinal. Esta proyección, llamada ruta perforante, termina en las dendritas de las células granuladas del giro dentado, que forman las fibras musgosas las cuales proyectan hacia el CA3, desde el cual los colaterales de Schaffer proyectan al CA1. Finalmente las células piramidales de CA1 proyectan fuera del hipocampo hacia las capas corticales profundas vía subículo y corteza entorrinal [243, 244], ruta denominada trisináptica. Las células piramidales y granuladas, que son glutamatérgicas, representan el 90% de las neuronas del hipocampo, mientras que el 10% restante lo componen interneuronas GABAérgicas [245].

La entrada cortical del hipocampo es la principal fuente de información para sus funciones mnemónicas. De cualquier forma también hay fibras aferentes desde las áreas subcorticales, como el septo o el hipotálamo que pueden modular la función del hipocampo [243].

a. Los receptores glutamatérgicos y su importancia en memoria y aprendizaje

En el cerebro, las neuronas se comunican unas con otras, principalmente, mediante transmisión química. La actividad neuronal tiene como resultado la liberación de neurotransmisores desde el axón terminal al espacio sináptico, dónde se unen a receptores situados en las neuronas pre o postsinápticas y ejercen su efecto fisiológico. La neurotransmisión química está estrechamente controlada, tanto a nivel del cuerpo celular como en su parte más extrema, por diferentes mecanismos autorreguladores pre y postsinápticos, que ajustan la transmisión a las necesidades neuronales. Esta fina regulación de la transmisión química puede venir dada por:

- una alteración en la tasa de excitabilidad neuronal que indica cambios en la actividad.
- una alteración en la cantidad de neurotransmisores liberados por cada impulso neuronal.
- variaciones en las funciones de los receptores pre o postsinápticos y sistemas intracelulares de segundo mensajero.

Las evidencias disponibles sugieren que cambios en múltiples mecanismos de los neurotransmisores esconden alteraciones en la plasticidad neuronal, expresadas como una variación en memoria y aprendizaje [212].

El glutamato es un aminoácido no esencial, así como el neurotransmisor excitador predominante en el encéfalo de mamíferos. Tiene un papel dual en funciones motoras y cognitivas [248, 249]. Se sintetiza de dos maneras: partiendo de glucosa, en el ciclo de Krebs y mediante la transaminación del α -oxoglutarato, o partiendo de glutamina sintetizada

por las células gliales y transportada al nervio terminal, donde la enzima glutaminasa la transforma en glutamato. En el nervio terminal se almacena en vesículas sinápticas, y si la célula se despolariza, lo liberarán al espacio sináptico. Los transportadores de glutamato situados en la membrana plasmática del nervio terminal presináptico o de las células gliales terminan con la acción del glutamato liberado mediante un mecanismo de recaptación de alta afinidad [250].

Los receptores glutamatérgicos se dividen en dos grupos:

.-Metabotrópicos: acoplados a proteínas G y ligados a segundos mensajeros intracelulares. Median una transmisión más lenta y modulable que los ionotrópicos.

.-Ionotrópicos: se nombran por el nombre del agonista específico que los activa.

- AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico): están ampliamente distribuidos en el SNC, unidos a canales iónicos y median una respuesta rápida, inmediata a la respuesta postsináptica a la liberación de glutamato.

- NMDA (N-methyl-D-aspartato): también unidos a canales iónicos y distribuidos por todo en SNC, con una densidad particularmente alta en hipocampo y córtex cerebral. Inicia la acción más lentamente y parece tener un papel importante en plasticidad sináptica.

- Kainato: A diferencia de los receptores AMPA, los receptores kainato juegan un papel minoritario en la señalización de las sinapsis [251]. No obstante, desempeñan un rol fundamental en la plasticidad sináptica, pues afectan a la respuesta a posteriori de la célula estimulada [252]. Se localizan de manera abundante en el hipocampo [253].

Los dos primeros tipos de receptores ionotrópicos han sido los más estudiados en memoria y aprendizaje y se cree que pueden tener diferentes funciones en plasticidad sináptica [254].

b. Plasticidad sináptica

La investigación en plasticidad sináptica se vió muy influenciada por las teorías innovadoras en su momento presentadas por el fisiólogo Donald Hebb, quien en 1949 lanzó la hipótesis del grado de correlación entre la actividad pre y postsináptica y el incremento de la fuerza de las conexiones neuronales, llamada "Sinapsis de Hebb". Otra de sus hipótesis fue la de las "asambleas celulares", neuronas que emiten a la vez, representan patrones sensoriales y contribuyen a la entrada sensorial.

Hoy en día hay un consenso general en que los cambios de la intensidad de las sinapsis y la plasticidad neuronal tienen un rol dual en los mecanismos subyacentes a la memoria y el aprendizaje. Se han descrito dos tipos de plasticidad sináptica duradera en el cerebro de mamíferos:

- LTD: bajada en la intensidad sináptica.

- LTP: incremento en la intensidad sináptica. A su vez se clasifica en:

- asociativa: presenta tres características [255].

- la cooperación, significando ésta que existe un umbral para inducir LTP en el que la despolarización de la membrana postsináptica tiene que ser suficientemente fuerte para desplazar el Mg^{+2} que bloquea el receptor de NMDA.

- el asociacionismo se refiere al fenómeno en el cual una señal débil puede verse potenciada vía las sinapsis vecinas en la misma neurona

- la especificidad que establece que la LTP asociativa es específica de señal, que sólo ocurre en las sinapsis activadas.

- no asociativa: inducida al margen de la actividad en curso en las sinapsis vecinas.

Se sabe que los receptores de NMDA son responsables de la LTP asociativa, actúan como detectores cooperantes para la inducción de LTP. El canal del receptor contiene un sitio de unión para Mg^{+2} en el canal dependiente de voltaje, que lo bloquea. Éste se libera por despolarización postsináptica mediada por la activación de otro receptor ionotrópico (receptores AMPA mayoritariamente) [254, 256]. La activación del receptor de NMDA provoca un aumento de la concentración postsináptica de Ca^{+2} que sirve como segundo mensajero y activa las cascadas de transducción de señales [257]. La LTP se puede dividir en fase temprana, que dura menos de 4 horas e incluye mecanismos posttranslacionales, y la fase tardía, que dura más de 4 horas y necesita transcripción génica y síntesis proteica [258, 259]. La síntesis proteica en neuronas está regulada por factores de transcripción como CREB (*cAMP response element-binding protein*), al cual se le relaciona con el desarrollo de la fase tardía de LTP que dura días e incluso semanas [258, 260]. Diversas proteínas kinasas se han asociado a esta fase tardía, incluyendo a CaMKII y PKC.

Aunque hay evidencias convincentes de que cambios en la fuerza sináptica tienen un importante papel en los mecanismos subyacentes a memoria y aprendizaje, el rol de LTP en animales no está probado. La cuestión crucial es si los cambios en fortaleza sináptica, como indica la LTP, codifican memoria por sí mismos o actúan como soporte en las funciones mnemónicas [261].

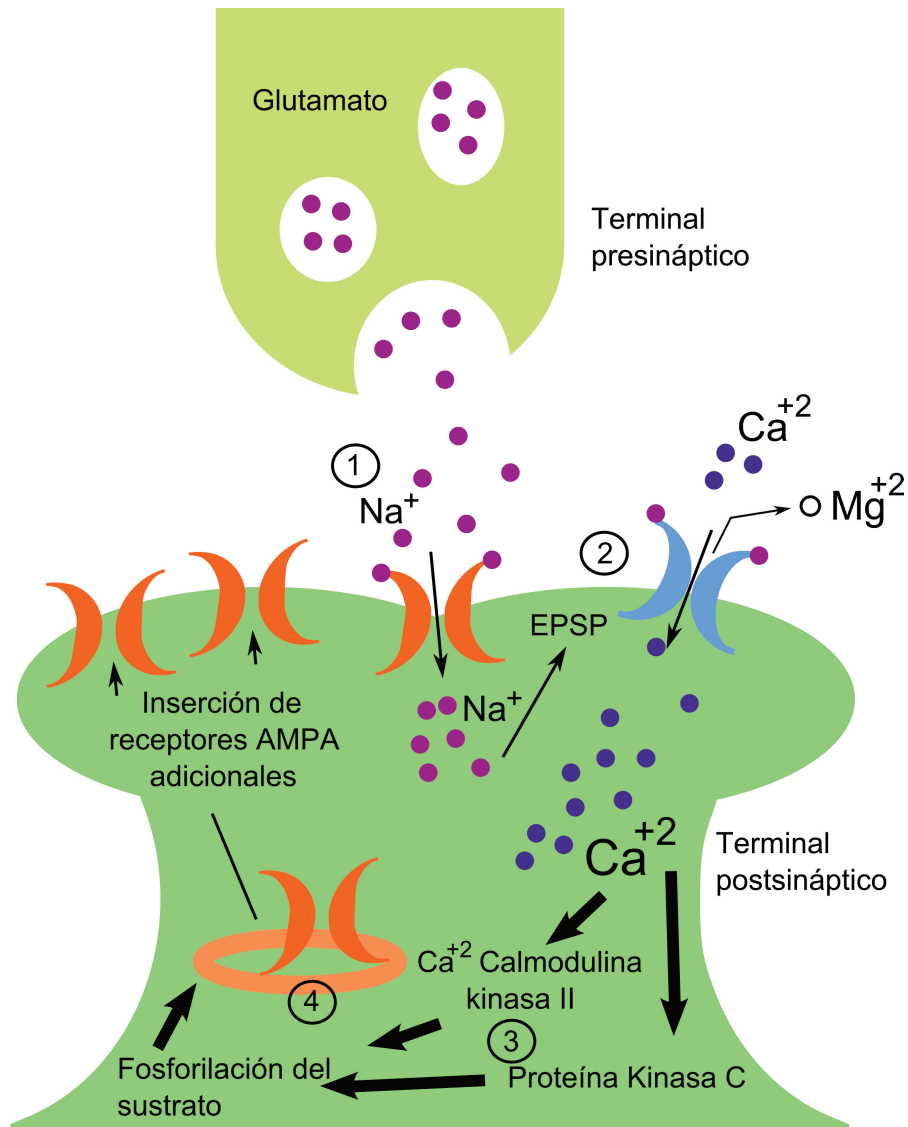


Fig 7. Ilustración esquemática de los mecanismos relacionados en LTP. El glutamato se libera desde el terminal presináptico y se une a los receptores AMPA postsinápticos (1). A partir de la activación, se abre el canal del receptor AMPA y entra Na^+ en la célula, provocando un potencial postsináptico excitatorio (EPSP) que depolariza la membrana postsináptica. Éste produce la expulsión del Mg^{+2} asociado al canal de NMDA, permitiendo la entrada de Ca^{+2} a la célula (2). Los iones de Ca^{+2} activan a las proteínas kinasas postsinápticas (3) que pueden actuar promoviendo la externalización de receptores AMPA adicionales a la membrana postsináptica (4), aumentando así la sensibilidad al glutamato. Modificada a partir de [262].

c. Señal glutamatérgica: interacciones con el receptor 5-HT1A en hipocampo

Se ha descrito que los agonistas del receptor 5-HT1A inhiben la excitación de las células piramidales del hipocampo [263] e interfieren con la excitación mediada por los receptores de NMDA y la inducción de LTP en el córtex visual y el hipocampo [264, 265]. Ade-

más la activación del receptor de 5-HT_{1A} suprime la función del receptor de NMDA en el córtex prefrontal, en parte por la acción mediada por la CaMKII [266]. Esta activación también bloquea el aumento del glutamato extracelular causado por el antagonista CPP del receptor de NMDA, como se ha visto por microdiálisis in vivo en el córtex prefrontal [267].

En el septo medio/limbo vertical de la banda diagonal de Broca (MS/vDB) existen neuronas glutamatérgicas que pueden regular a las neuronas del septo, que a su vez proyectan al hipocampo, y, por tanto, también pueden regular sus funciones. Se ha descrito que cambios en la actividad transmisora glutamatérgica y en la función de los receptores de NMDA de estas neuronas del MS/vDB puede influenciar a la plasticidad sináptica en el hipocampo y por lo tanto a la memoria y el aprendizaje [268]. Los receptores NMDA del septo son dianas de los receptores de 5-HT_{1A} y al activarse estos últimos las funciones de los primeros parecen suprimirse. La interacción 5-HT_{1A}-NMDA podría constituir un nuevo mecanismo relacionado con el control de los procesos emocionales y cognitivos favorecidos por la proyección del septohipocampo [269].

IV. Páncreas: metabolismo y señalización

La insulina se almacena en vesículas secretoras en las células β del páncreas y se secreta por exocitosis para mantener la homeostasis glucémica y lipídica [270]. Las señales metabólicas generadas a través del catabolismo de la glucosa en las células β median la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS, por sus siglas en inglés) [271]. La glicólisis y el metabolismo oxidativo mitocondrial con la consecuente producción de ATP son necesarios para la GSIS. El aumento del ratio de ATP/ADP provoca el bloqueo en la membrana plasmática de los canales de potasio sensibles a ATP (KATP) [272]. La despolarización de la membrana celular que provoca este bloqueo genera un flujo de calcio hacia el interior de la célula β en la cual, al elevarse la concentración de Ca^{+2} intracelular, se produce la exocitosis de insulina. Al mismo tiempo, en la membrana plasmática se genera adenosina monofosfato ciclica (cAMP) en respuesta a la estimulación por glucosa de las adenilato ciclasas. Por tanto, mientras que en el hígado este aumento del cAMP señala escasez de glucosa en ayuno, en células β avisa del aumento de glucosa disponible al alimentarse. Esta exocitosis está regulada en parte por PKA y por isoformas específicas de PKC [273-275] que modifican el ensamblaje de proteínas asociadas a vesículas alterando su estado de fosforilación [276, 277]. Una vez finalizada la secreción de insulina, los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv) o de Ca^{+2} de la membrana plasmática, repolarizan a la célula β para devolverla al estado inicial [278-280].

La característica clave de las células β es su habilidad para alterar la secreción de insulina muy rápidamente en respuesta a cambios en la concentración de glucosa en sangre relativamente modestos [281]. La fase inicial aguda solo dura unos minutos y le sigue una segunda fase de liberación sostenida [282]. Este patrón bifásico de secreción de insulina es importante para un control metabólico óptimo. La absorción de glucosa por las células β pancreáticas está regulada via GLUT2, un facilitador del transporte de glucosa, y por la fosforilación de glucosa por glucokinasa (GK). GK, también llamado el “sensor de glucosa” de las células β , permite traducir los cambios en la concentración de glucosa extracelular en cambios paralelos en la tasa de fosforilación de glucosa [283, 284].

El aumento de cAMP por acción de la glucosa tiene un componente de sensibilidad al Ca^{+2} en las células β [285]. La calmodulina podría ser la responsable de la estimulación de isoformas adenilato ciclasas como ADCY1 u 8 [286, 287]. ADYC8 responde rápidamente a cambios en Ca^{+2} y hace oscilar el cAMP en respuesta a cambios transientes en Ca^{+2} [288]. Además esta proteína se organiza en microdominios, generando reservorios intracelulares de cAMP con activación local de PKA [289].

1. Posibles funciones de ERK1/2 en diabetes

En células β pancreáticas, la glucosa regula tanto la secreción como la producción de insulina a nivel transcripcional. Los mismos nutrientes y hormonas que estimulan la secreción de insulina incrementan también la actividad de ERK1/2 [290, 291]. La recaptación de glucosa y su metabolismo son necesarios para activar a ERK1/2 en células β . Su depolarización tanto con potasio como con drogas antidiabéticas tipo sulfonilurea también produce esta activación pero con una cinética diferente a la activación por glucosa [291, 292]. La entrada de calcio a través de los canales de calcio dependientes de voltaje es esencial para conseguir la máxima actividad de ERK1/2 que se alcanza a causa de un incremento en la concentración intracelular de glucosa [74, 76-78]. La calcineurina, una fosfatasa dependiente de calcio y la calmodulina, también juegan un papel importante en la activación de ERK1/2 mediada por la glucosa, otros nutrientes y la hormona Glp1 (*Glucagon like peptide 1*) [293, 294].

ERK1/2 es necesario para que el rango fisiológico de concentraciones de glucosa sea suficiente para estimular la transcripción de insulina [295, 296]. Se han encontrados elementos sensibles a la glucosa en el promotor del gen de la insulina, en la región cercana al sitio de inicio de la transcripción. Los elementos E y A son los más sensibles a la glucosa y se encuentran en dos regiones de este promotor. Algunos factores de transcripción contribuyen tanto a la diferenciación de las células β como a la transcripción de la insulina y algunas de ellas, por ejemplo $\beta 2$, PDX-1 y MafA, muestran una expresión restringida a este tejido [297, 298]. Estos factores se unen a regiones sensibles a la glucosa y son los responsables de que la síntesis de insulina inducida por la glucosa sea específica de las células β . Estos tres factores son sustratos de ERK1/2 in vitro y se han observado cambios funcionales debidos a su fosforilación, en concreto se ha visto un incremento en su unión al ADN. Se han asociado mutaciones en $\beta 2$ y PDX-1 con la diabetes tipo MODY (del inglés *Maturity Onset Diabetes of the Young*), que se caracteriza por un inicio de la enfermedad en pacientes menores de 25 años, por su herencia autosómica dominante (por eso es frecuente encontrar 3 generaciones de una misma familia afectadas) y porque no necesitan insulina al menos en los 5 años posteriores al diagnóstico [298].

Las concentraciones de glucosa que se mantienen elevadas durante más de 24h, inhiben la transcripción de insulina [296, 299, 300]. Este efecto inhibitorio también depende de la actividad de ERK1/2 [296]. La exposición prolongada a una alta concentración de glucosa en sangre induce la expresión de CCAAT/enhancer binding protein β (C/EBP- β). Esta proteína se une al promotor del gen de la insulina de manera dependiente de ERK1/2 y cambia la composición de otros factores unidos al promotor, contribuyendo de esta forma a la inhibición de la transcripción de la insulina. Todavía no se han identificado completamente los mecanismos mediante los cuales ERK1/2 controla las interacciones de los factores de transcripción estimulantes e inhibitorios. En su conjunto, estos datos sugieren

que los defectos en la transcripción de la insulina que ocurren en la diabetes tipo II son en parte debidos a factores que inhiben al promotor de la insulina a través de ERK1/2 [301]. La gran cantidad de insulina producida por las células β las hace extremadamente susceptibles al estrés del retículo endoplásmico [302]. Este estrés puede provocar la muerte de las células β . El daño celular y el estrés exacerbado del retículo endoplásmico inducen a CHOP, el factor homólogo de C/EBP- β , pero no se conocen bien los mecanismos, aunque pueden incluir entre otros la anulación del bloqueo de la transcripción, característica del inicio de la respuesta al estrés del retículo endoplásmico [303]. La bajada total de la expresión de CHOP prolonga la supervivencia de las células β durante este estrés [304]. La actividad de ERK1/2 suprime la transcripción de CHOP [305]. El promotor de este gen contiene una secuencia similar a la región del gen de la insulina que se une a MafA. Esta proteína se une al promotor de CHOP en células expuestas a concentraciones fisiológicas de insulina [305]. Esta unión se ve afectada por la inhibición de la actividad de ERK1/2, por lo que en estas condiciones, aumenta la expresión de la proteína CHOP en células β . Por lo tanto, ERK1/2 regula la expresión de genes en los dos sentidos, positivo y negativo, que son importantes para las funciones de las células β [301].

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

En el laboratorio de Eugenio Santos, mediante análisis del perfil transcripcional dependiente de la expresión de RasGrf1 en retina de ratón, se vio que entre los genes más afectados por la deficiencia en RasGrf1 estaba Pttg1 [41]. Otro análisis del mismo tipo realizado en este laboratorio, tanto en islotes de ratón como en córtex cerebral y bulbo olfatorio, volvió a presentar a Pttg1 como gen afectado por la deficiencia de RasGrf1 (datos no publicados).

La hipótesis principal del presente estudio consiste en que el GEF RasGrf1 regula directa o indirectamente la expresión de Pttg1. La hipótesis secundaria consiste en que los fenotipos comunes observados en los animales KO de RasGrf1 y Pttg1 tendrían una base molecular común, produciéndose por deficiencias en las mismas rutas de señalización.

Objetivos

1. Demostrar que la expresión de Pttg1 está regulada por la proteína GEF RasGrf1.
2. Comprobar si el fenotipo de los ratones doble KO para estos loci coincide o se incrementa al compararlo con el de los KO sencillos.

Para lograr el objetivo general antes descrito se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- 1.1 Generación y caracterización de clones de células PC12 con disminución de la expresión de RasGrf1 y Pttg1 de manera estable.
- 1.2 Caracterización de las rutas de señalización intracelular relacionadas con el GEF RasGrf1.
- 1.3 Evaluación de la actividad del promotor de Pttg1 frente a diversos estímulos celulares.

- 2.1 Estudio de comportamiento espacial de los ratones deficientes en RasGrf1, Pttg1 y RasGrf1-Pttg1.
- 2.2 Prueba de tolerancia a la glucosa a los 3 meses de los ratones deficientes en RasGrf1 y 10 meses de los ratones deficientes en RasGrf1, Pttg1 y RasGrf1-Pttg1.

Materiales y métodos

I. Primer capítulo

1. Herramientas bioinformáticas

En la búsqueda de posibles factores de transcripción para la secuencia de 2,3 kb del promotor de Pttg1, empleamos el programa online TFSEARCH ver.1.3 ©1995 Yutaka Akiyama (Kyoto University). Éste busca fragmentos altamente correlacionados con la secuencia introducida en el programa en la base de datos TFMATRIX (bioruby/lib/bio/db/transfac.rb), que contiene perfiles de sitios de unión a factores de transcripción conocidos.

Utilizamos el programa online Cytoscape [306] (cytoscape.org), una plataforma de software de código abierto para la visualización y el análisis de redes complejas con la posibilidad de integrarlas con cualquier tipo de información sobre las proteínas o genes que contengan. El plugin APID2NET [307] (bioinfow.dep.usal.es/apid/apid2net) nos ha sido de gran utilidad a la hora de encontrar proteínas candidatas a ser nexo entre la señalización de RasGrf1 y los posibles factores de transcripción de Pttg1. Esta herramienta web permite explorar y analizar la información conocida sobre interacciones proteína-proteína, integrada y unificada en una plataforma común. APID2NET proporciona un marco dónde todas las interacciones entre proteínas experimentalmente validadas (BIND, BioGRID, DIP, HPRD, IntAct y MINT) se reúnen, facilitando así la exploración del interactoma de interés.

2. Cultivos celulares

Las líneas celulares: PC12, COS1 y 293T, se cultivaron en medio DMEM suplementado con 2mM de glutamina, 50 unidades/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina (todos los productos de Gibco, Invitrogen). El medio de las líneas COS1 y 293T se suplementó, además, con 10% de FBS (suero fetal bovino), y la de PC12, con 10% de FBS y 5% de HS (suero de caballo) (Gibco, Invitrogen). Las células BTC3 se cultivaron en medio RPMI suplementado de la misma manera que las líneas COS1 y 293T. El cultivo de estas líneas

celulares se realizó sobre placas de poliestireno (BD Bioscience) en una incubadora a 37°C y una atmósfera al 5% de CO₂ y 98% de humedad relativa. Los pases de las líneas COS1, 293T y BTC3 se realizaron lavando una vez con PBS estéril e incubando 1-3 minutos a 37°C con TrypLE™ (Gibco, Invitrogen). Posteriormente, la suspensión celular se transfirió a nuevas placas de cultivo realizando la dilución adecuada.

Para todos los experimentos realizados se utilizaron cultivos subconfluentes, que se encuentran en fase de crecimiento exponencial y por tanto presentan transcripción y síntesis de proteínas activas. Para los estudios de señalización, fue necesario privar de suero a los cultivos durante 4 horas, utilizando medio suplementado con todos los aditivos excepto suero.

Para las estimulaciones e inhibiciones se emplearon los siguientes compuestos:

- .-Factor de crecimiento nervioso (NGF) 100 ng/ml (Promega)
- .-Ionomicina 100 nM (Sigma)
- .-Factor de crecimiento de la epidermis (EGF) 60 ng/ml (Peprotech)

3. Transducción lentiviral para el silenciamiento estable con shARN

Para la generación de las líneas celulares deficientes en RasGrf1 y Pttg1 utilizamos técnicas de transducción viral utilizando partículas lentivirales MISSION® shARN (Sigma). Este producto contiene 5 tipos de partículas lentivirales, que portan 5 construcciones diferentes de shARN dirigidas específicamente contra los transcritos de RasGrf1 (NM_011245), Pttg1 (NM_013917) o una construcción non-target, sin diana, que ha sido diseñada para no afectar a ningún transcrito en concreto (SHC002V) y que fue empleada como control. La eficiencia de cada construcción fue comprobada por separado con una primera infección, a partir de la cual se seleccionaron aquellas que producían una mayor inhibición del transcrito. Estas construcciones fueron utilizadas para generar clones individuales (procedentes de una sola célula) con silenciamiento estable de RasGrf1 o Pttg1.

Se sembraron células PC12 al 50% de confluencia en placas de 6 pocillos, y a las 24 horas se añadieron las partículas lentivirales portadoras de las construcciones seleccionadas (con mayor eficiencia) con una multiplicidad de infección o moi, por sus siglas en inglés, entre 0,001-0,1, realizando para ello diluciones seriadas de la misma mezcla de partículas. Previamente, habíamos añadido al medio polibreno a una concentración final de 8 µg/ml (bromuro de hexadimetrina, Sigma); este compuesto anula las cargas eléctricas que producen una repulsión entre la membrana plasmática y la superficie de las partículas virales. A continuación, para aumentar la eficiencia de transducción, las placas se centrifugaron a 2000 rpm durante una hora a 32°C, tras lo cual se llevaron de nuevo las placas a la incubadora. Al día siguiente, el medio de cultivo con los virus y el polibreno fue reemplazado por medio fresco. Transcurridas 48 horas, las células fueron seleccionadas con

puromicina a una concentración final de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (calculada previamente con células sin infectar mediante la realización de una curva de supervivencia). Se picaron clones aislados de células resistentes a la puromicina usando cilindros de clonación de 8x8 mm (Millipore) y 100 μl de medio con una pipeta para succionar la colonia escogida y depositarla en un pocillo de placas de 24 pocillos. Finalmente, los clones fueron expandidos y se analizó la inhibición de cada proteína. Para el análisis de la expresión de Pttg1, fue necesario sincronizar las células en G2/M con nocodazol (Sigma) a 500 ng/ml durante 12h.

4. Ensayo de proliferación MTT

Esta técnica evalúa la proliferación celular haciendo uso del reactivo MTT, bromuro de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (Sigma), que es reducido en las mitocondrias de células viables y metabólicamente activas transformándose en formazán. En este proceso el compuesto cambia de color (de amarillo a púrpura) y se vuelve hidrofóbico, por lo que se puede solubilizar con DMSO y cuantificar por colorimetría.

Los clones estables fueron sembrados en placas de 24 pocillos, en un número relativamente bajo, 4 placas con 25000 células/pocillo y 4 con 5000 células/pocillo, para que no alcanzasen la confluencia en ningún momento del ensayo (8 días). Para el procesamiento de cada placa, una por día, se retiró el medio de cultivo y se añadió por pocillo una mezcla de 200 μl de medio completo y 22 μl de MTT (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en PBS). La placa se incubó a 37°C durante 2 horas. Pasado este tiempo, se añade a cada pocillo 480 μl de isopropanol (Merck). Finalmente, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm en el lector de placas Ultra Evolution Microplate Reader (TECAN).

Como punto inicial del experimento, se utilizó la primera placa cuya absorbancia fue medida a las 24h de sembrar los clones, a la cual se le asignó un valor arbitrario de 1.

5. Citometría de flujo

Para llevar a cabo este ensayo, las células fueron marcadas con yoduro de propidio (IP), un agente intercalante que emite fluorescencia cuando se une al ADN. La cantidad celular de ADN, y por tanto la fluorescencia del IP, varía en las diferentes fases del ciclo celular, siendo el doble en la fase G2/M respecto a la fase G0/G1 y presentando todo el rango de valores intermedios en la fase S, en la que se replica el material genético.

Los experimentos se realizaron con cultivos celulares en crecimiento activo (subconfluentes). En un primer paso se recogieron las células PC12, que no necesitan tripsina para despegarse de la superficie de la placa, y se centrifugaron a 1200 rpm 5 minutos en un tubo Falcon de 15 ml. Se retiró el sobrenadante, se lavaron las células con 1 ml de PBS y se repitió la centrifugación. Se aspiró el PBS y, para la fijación y permeabilización de las

células, se añadieron 700 μl de etanol a 4°C por tubo y se incubaron a esa temperatura durante 1 hora aproximadamente. A continuación, se realizó un lavado con PBS frío y después de absorber el sobrenadante, y cada muestra se resuspendió en una mezcla compuesta por: 300 μl de PBS a 4°C, 16 μl de ribonucleasa A a 1 mg/ml (Sigma) y 8 μl de IP a 1 mg/ml (Sigma). Posteriormente las muestras se incubaron en agitación, a temperatura ambiente y en oscuridad durante 2 horas. La ribonucleasa A elimina rápidamente todo el RNA de las muestras y el IP se une estequiometricamente al ADN. Finalmente, las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo utilizando el programa CellQuest. Normalmente adquirimos 10000 células a una velocidad de 100-200 eventos/segundo, para evitar errores de conteo como aglomeraciones celulares. Las poblaciones se seleccionaron con el programa WinMDI, descartando restos celulares y dobletes. El cálculo de la distribución poblacional en cada fase del ciclo se realizó mediante el análisis del histograma con el programa anteriormente mencionado.

6. Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas se colocaron las placas sobre hielo, se retiró el medio de cultivo y se lavó con PBS a 4°C. Después se añadieron, dependiendo de la cantidad de células, entre 100 y 300 μl de tampón de lisis (Cell lysis buffer 1x, Cell signaling) suplementado inmediatamente antes de su uso con NaF 1mM, como inhibidor de fosfatasa, y con PSMF y la mezcla Complete (Roche), como inhibidores de proteasas. El Complete se vende en pastillas, cada una de las cuales se diluyó en 2 ml de agua milliQ estéril y de esta solución se añadieron 40 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de buffer. Con ayuda de un rascador se despegaron las células y se pasaron los lisados a tubos de microcentrifuga correctamente rotulados. Se incubaron 5 minutos a 4°C, tras los cuales fueron agitados durante 15 segundos con ayuda de un vórtex y centrifugados durante 10 minutos a 4°C. Por último el sobrenadante se guardó en tubos de microcentrifuga nuevos y rotulados.

A continuación, se determinó la concentración proteica mediante el uso del reactivo Bradford (Bio-Rad). De cada muestra, por duplicado, se mezcló en una cubeta de espectro 1 μl de lisado con 800 μl de agua milliQ estéril, añadiéndose por último 200 μl de Bradford. Tras mezclar bien por vórtex e incubar 5 minutos a temperatura ambiente, medimos la absorbancia en el espectrofotómetro (Ultrospec 2000, Pharmacia biotech) a 595 nm. Las concentraciones de cada muestra se calcularon interpolando en la recta patrón, previamente obtenida mediante concentraciones conocidas de BSA, de la que obtuvimos la fórmula mediante un modelo de regresión.

7. Electroforesis en gel de poliacrilamida y Western blot

De cada lisado celular se cogen los μl calculados para la cantidad de proteína que queremos cargar, entre 25 y 50 μg y se introdujeron en un nuevo tubo de microcentrifuga rotulado. La muestra restante se congeló a -80°C y, cuando fue necesario volverla a utilizar,

se midió la concentración proteica de nuevo. En el nuevo tubo de microcentrífuga, con la cantidad de proteína necesaria, se añade tampón de carga Laemmli 6x (Tris HCl 200mM, pH 6,8; Glicerol 40%; SDS 4%; β -mercaptoetanol 4%; azul de bromofenol 0,04%) y se desnaturizó hirviendo durante 5 minutos. A continuación, los extractos proteicos se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), para separar las proteínas en función de su peso molecular. La presencia del detergente SDS mantiene la desnaturización proteica y les aporta una carga negativa provocando su migración hacia el ánodo tras aplicarse una corriente eléctrica. Además, el agente reductor β -mercaptoetanol presente en el tampón de carga de las muestras rompe los enlaces disulfuro separando a las proteína en sus subunidades.

El porcentaje del gel de poliacrilamida, entre el 12 y el 7,5%, dependerá del tamaño de las proteínas que se quieran visualizar. A mayor porcentaje, más dificultad tendrán las proteínas de mayor tamaño en avanzar hacia el ánodo, por lo que se utilizarán porcentajes altos para visualizar proteínas de poco peso molecular y viceversa. Los reactivos TEMED (tetrametiletilendiamina, Sigma) y APS 10% (persulfato de amonio, Sigma) que se utilizaron en la preparación de los geles, sirven para provocar la polimerización del gel, por ello son los últimos en añadirse, justo antes de introducir la mezcla entre los cristales de electroforesis. Tras la polimerización, el gel se introdujo en la cubeta (Bio-Rad), ésta se llenó con tampón de electroforesis SDS-PAGE 1x (Tris HCl 25mM, pH8,3; Glicina 200mM, SDS 0,05%) y se aplicaron 100-150 voltios hasta que el frente, marcado por el azul de bromofenol, desaparece por el borde inferior del gel.

Anticuerpos primarios	Casa comercial	Origen	Dilución
P-ERK (Tyr204)	Santa Cruz	mouse	1:1000
ERK	Santa Cruz	rabbit	1:1000
P-Akt	HomemadeL15	rabbit	1:2000
Akt	Santa Cruz	rabbit	1:1000
P-p38 (Thr180/Tyr182)	BD	mouse	1:1000
p38	Santa Cruz	rabbit	1:1000
P-JNK (Thr183/Tyr185)	Cell Signaling	rabbit	1:1000
JNK	Santa Cruz	rabbit	1:1000
RasGrf1	Homemade L1	rabbit	1:2000
Pttg1	Immunostep	rabbit	1:1000
β -tubulin	Sigma	mouse	1:5000
CDK1	Santa Cruz	mouse	1:1000
Cyclin B	Santa Cruz	rabbit	1:500

Tabla 3. Anticuerpos primarios usados en los experimentos de Western blot. α -P-Akt [308]. α -RasGrf1 [40].

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas separadas por tamaño, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Invitrogen) adaptada para su uso en el aparato de transferencia rápida iBlot® (Invitrogen). La membrana con las proteínas en su superficie se incubó entre 30 minutos y varias horas en BSA al 2% en TBS-T (20 mM Tris/HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl y Tween-20 al 0,05%). El siguiente paso fue incubar la membrana con el o los anticuerpos primarios correspondientes, toda la noche a 4°C o 2 horas a temperatura ambiente, en la dilución en BSA al 2% en TBS-T especificada en la tabla 3.

Anticuerpos secundarios	Casa comercial	Origen	Dilución
Alexa Fluor® 680	Invitrogen	goat α -mouse IgG	1:10000
Alexa Fluor® 680	Invitrogen	goat α -rabbit IgG	1:10000
IRDye 800CW	LI-COR	goat α -mouse IgG	1:10000
IRDye 800CW	LI-COR	goat α -rabbit IgG	1:10000

Tabla 3. Anticuerpos secundarios usados en los experimentos de Western blot.

Pasado el tiempo necesario para la incubación, se realizaron 4 lavados de 5 minutos por membrana, con 20 ml de TBS-T aproximadamente, en una cubeta tapada y en agitación. A continuación se incubó durante 1 hora cada membrana con el o los anticuerpos secundarios adecuados, Tabla 4, diluidos a 1:10000, en la misma solución que los primarios. Posteriormente, se realizaron 4 lavados de 10 minutos con 20 ml de TBS-T en agitación. El revelado se realizó mediante un escáner de fluorescencia Odyssey (LI-COR Bioscience) y la cuantificación de las proteínas detectadas se realizó empleando el software provisto por el fabricante.

8. Determinación de la actividad transcripcional del promotor de Pttg1 ligado a un gen reportero de luciferasa

El sistema de valoración de la actividad transcripcional mediante el gen reportero de la luciferasa, se basa en la transfección en células de un vector que contiene un gen de la luciferasa bajo el control de un promotor concreto. La unión de los factores de transcripción adecuados a sus sitios de unión en el promotor permitirá la transactivación del gen reportero de luciferasa con la consiguiente síntesis de la proteína luciferasa. En todos los casos se empleó el reportero de luciferasa Luc, en el que la luciferasa se encuentra bajo el control de una secuencia de 2,3 kb, correspondiente al promotor de Pttg1 [145], cedido amablemente por el Prof. Slomo Melded.

La transfección se realizó mediante la Lipofectamina 2000® (Invitrogen), siguiendo el protocolo del fabricante. 48 horas después, momento de máxima expresión de los plásmidos

itransfectados, las células se estimularon o inhiben durante 7 horas, por triplicado, con los siguientes compuestos:

- Factor de crecimiento nervioso (NGF) 100 ng/ml (Promega)
- Ionomicina 500nM (Sigma)
- Factor de crecimiento de la epidermis (EGF) 100ng/ml (Peprotech)
- Ácido lisofosfatídico (LPA) 0,25 ng/ml (Sigma)
- U0126 25μM (Promega)
- Wortmanina 100nM (Sigma)
- SP600125 20μM (Calbiochem)

A continuación, se retiró el medio de cultivo, se lavó una vez con PBS, se lisaron los extractos en el tampón de lisis de luciferasa, incluido en el kit Dual-luciferase reporter assay system (Promega), y se congelaron a -80°C durante 10 minutos, como procedimiento de lisado mecánico. Después de descongelar, se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante. Se midió la actividad luciferasa mediante el kit mencionado anteriormente, en el luminómetro Lumat LB 9507 Tube luminometer (BERTHOLD TECHNOLOGIES GmbH & Co. KG). El mecanismo de reacción se basa en la adición de un reactivo capaz de oxidar a la luciferasa con la consiguiente producción de luz a 556 nm, la cual se cuantifica en un luminómetro. Estos experimentos se realizaron siempre al menos 3 veces de forma independiente y cada punto por triplicado.

9. Análisis estadístico

Empleamos la prueba t de Student para comparar dos grupos de datos. Como prueba post hoc usamos Bonferroni.

II. SEGUNDO CAPÍTULO

1. Animales

Para el estudio de los experimentos realizados en este capítulo de resultados se utilizaron noventa y ocho ratones C57BL/6J, con pesos entre los 17g y los 34g. Para estudiar el fenotipo de los ratones deficientes en Pttg1, amablemente cedidos por el Prof. Melmed [208], se emplearon 12 machos y 11 hembras control y 10 machos y 9 hembras Pttg1 KO. Para analizar el del KO para RasGrf1, de nuestro laboratorio, cuya construcción transgénica se encuentra publicada [34], se emplearon 8 machos y 8 hembras control y 6 machos y 5 hembras RasGrf1 KO. Para el de RasGrf1-Pttg1, generados por cruce de los dos genotipos anteriores, empleamos en este experimento 9 machos y 6 hembras control y 9 machos y 5 hembras doble KO.

Los ratones se alojaron en microaisladores ventilados tipo ILL con individuos de su mismo sexo y genotipo. Fueron mantenidos en la misma celda, fotoperiodo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad y alimentación (Teklad 2014, Harlan Laboratories) y agua disponibles *ad libitum*. Todas las pruebas fueron realizadas durante la fase de luz. Los ratones se trasladaban 1 hora antes a la habitación de experimentación, para su habituación al nuevo entorno antes de efectuar las pruebas, minimizando así el estrés.

El diseño experimental, los cuidados y el mantenimiento de los animales, se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones dictadas en la Directiva 86/609/EEC y las recogidas en el RD 1201/05 sobre animales utilizados en experimentación y otros fines científicos. Asimismo, el proyecto experimental fue evaluado por el comité de bioética de la Universidad de Salamanca previamente a su ejecución.

2. Manipulación

La semana anterior al comienzo de los experimentos se realizó este procedimiento para la habituación de los ratones a la experimentadora. Todos los días a la misma hora se cogía a los ratones uno por uno durante un minuto y, protegiéndolos de la luz con un trapo mientras se les sostenía de la base de cola, se les acariciaba la base del lomo firme pero despacio. Se anotaron todas las incidencias para ver la bajada de estrés según avanzaba la semana. No hubo que descartar a ningún ratón ya que todos respondieron positivamente a la manipulación.

3. Experimento de discriminación visual

Para comprobar la función visual de los ratones se realizó el siguiente experimento. Cada animal fue situado en una mesa dividida en cuatro cuadrantes pintados de diferente manera (Fig. 17 de Resultados) durante 5 minutos. Se calculó el porcentaje de tiempo que cada animal pasó en cada área y de qué manera cambiaba de una zona a otra, si lo hacía con precaución o sin notar aparentemente las diferencias entre un área y la siguiente.

4. Experimento de comportamiento

El laberinto de Barnes (Stoelting Europe) es una base circular gris antirreflectante de 91 cm de diámetro y con 20 agujeros equidistantes de 5 cm de diámetro y con una caja de escape bajo uno de ellos. La densidad de las pistas fue de baja a moderada, como recomiendan anteriores estudios con roedores [18]. Para reducir la pista del olor, tanto el laberinto como los agujeros se limpiaron con etanol 70% entre sesión y sesión. No se movió ningún elemento en la sala de experimentación durante los meses en que se realizaron las sesiones de comportamiento.



Fig 8. Instalación de experimentación de comportamiento espacial. **1.** Mesa del laberinto de Barnes. **2.** Focos a la altura necesaria para que en la mesa hubiesen 3000 lux (lumen /m²), el nivel de iluminación propuesto por el protocolo seguido [309]. **3.** Altavoces a través de los cuales se aplicó los ratones ruido blanco a 80 dB. **4.** Webcam centrada para grabar cada sesión y permitir así el funcionamiento del software informático. **5.** Puesto de la investigadora durante las sesiones. **6.** Túnel de escape expresamente abierto. Durante las sesiones estaba encajado bajo el agujero correspondiente. Los círculos negros muestran las pistas expresamente colocadas.

El primer día del experimento, los ratones fueron situados en el centro del laberinto, conducidos por la experimentadora hasta el agujero de escape y mantenidos dentro del mismo durante un minuto. Después de esto empezó la primera sesión: cada ratón fue puesto en el centro del laberinto en una caja opaca blanca. 10 segundos después se quitó la caja, se encendió el ruido blanco a 80 dB y la luz a 3000 lux. El ratón podía explorar libremente el laberinto durante un máximo de 5 minutos o hasta que entrara en el agujero de escape. Los ratones realizaron la prueba durante 22 días seguidos, descansaron 12 días y volvieron al laberinto durante cuatro días para examinar la retención de memoria.

El examen de aprendizaje reverso empezó al finalizar el de retención y consistió en girar 180° el agujero de salida de su posición original.

Se grabaron todas las sesiones con una webcam y se analizaron los siguientes parámetros con el software Any-Maze (Stoelting). Se recogieron datos de los siguientes parámetros de la tarea:

- a. Tiempo empleado para investigar el primer agujero de la sesión.
- b. Errores de ejecución: aquellos en los que el ratón vuelve a un agujero ya explorado.
- c. Perseverancias: exploraciones secuenciales repetidas de un agujero falso o dos contiguos.
- d. Distancia del primer agujero explorado al agujero de escape.
- e. N° total de agujeros explorados.
- f. Tiempo total para escapar.

Las estrategias de búsqueda utilizadas por cada ratón se clasificaron en porcentaje de tiempo empleado en cada una de las tres categorías definidas [13]:

- a. Estrategia de búsqueda al azar: búsquedas localizadas en agujeros separados cruzando el laberinto por el centro.
- b. Estrategia de búsqueda seriada: búsquedas sistemáticas en el sentido de las agujas del reloj o en sentido contrario.
- c. Estrategia de búsqueda espacial: alcanzar el agujero de salida con un número de errores y de distancia al agujero de escape menor o igual a 3.

5. Análisis estadístico

Se utilizó la mediana de los datos de los cuatro periodos analizados. Todos los grupos de datos son no paramétricos y fueron tratados como tales. Los datos se analizaron mediante la ANOVA de Friedman para medidas repetidas, con genotipo-sexo como factor entre sujetos y con el tiempo como factor intra sujetos. La prueba de los signos de Wilcoxon se usó como post hoc para medidas repetidas. La prueba de Kruskal-Wallis se utilizó para analizar las diferencias entre los grupos en cada periodo por separado y la prueba de Mann-Whitney como post hoc. También se llevó a cabo el análisis del componente principal. Todos los análisis se realizaron con el programa IBM SPSS Statistics 19.

III. TERCER CAPÍTULO

1. Animales

Para los experimentos de la prueba de tolerancia a la glucosa hemos empleado un total de 117 ratones C57BL/6J, con pesos entre los 14,8 g y los 32,0 g. Para estudiar el fenotipo de los ratones deficientes en RasGrf1-Pttg1 a los tres meses se emplearon 7 machos y 6 hembras control y 12 machos y 11 hembras doble KO. Para estudiar el fenotipo a los 10 meses de este mismo genotipo utilizamos 6 machos y 6 hembras control y 13 machos y 13 hembras doble KO. Para el de RasGrf1 a los 10 meses se emplearon 4 machos y 10 hembras control y 6 machos y 5 hembras RasGrf1 KO. Para el de Pttg1 a los 10 meses, 5 machos y 4 hembras control y 4 machos y 5 hembras doble KO. Para reducir el número total de ratones empleados en esta tesis doctoral, siguiendo las recomendaciones europeas sobre experimentación animal, algunos de los ratones de 10 meses utilizados en este experimento habían sido empleados previamente en el estudio de comportamiento espacial.

Para establecer el fenotipo de la masa corporal se emplearon 23 ratones para cada grupo de crías sin destetar, 92 en total: Pttg1 control y KO, RasGrf1 control y KO. Estos mismos ratones se siguieron pesando después del destete, distinguiendo machos de hembras para cada grupo y se añadieron ratones a los grupos. Se pesaron en total 42 machos y 48 hembras control y 26 machos y 25 hembras KO para Pttg1. Para RasGrf1-Pttg1 se pesaron 30 machos y 37 hembras control y 39 machos y 34 hembras doble KO.

Los pesos de los ratones de 3 y 10 meses corresponden a los pesos de los ratones de la prueba de tolerancia a la glucosa.

Los ratones estuvieron estabulados en las condiciones ya mencionadas en el capítulo anterior. El procedimiento de experimentación también fue aprobado por el comité de bioética de la Universidad de Salamanca.

2. Prueba de tolerancia a la glucosa

Uno o dos días antes de la prueba, se pesó a los ratones y se les practicó una punción submandibular [310] bajo el efecto de la anestesia, isoflurano inhalado (Schering Plough), para establecer su cantidad de glucosa en sangre habitual. Los ratones pasaron la noche anterior a la prueba en ayunas, unas 14 horas en total. Se les retiró la comida de las jaulas, dejando el agua ad libitum. A cada ratón se le practicó la primera punción antes de la inyección intraperitoneal de glucosa, 2 mg/g de peso del ratón. La jeringa utilizada tenía un volumen máximo de 1 ml. La dilución de glucosa, 250 mg/ml en PBS, se realizó el mismo día de la prueba. Las siguientes punciones se realizaron a los 15, 30

y 90 minutos de inyectarles la glucosa. Se extrajeron una media de 200 μ l de sangre por punción.

La glucosa se midió en el momento gracias al glucómetro ACCU-CHECK Sensor Comfort (Roche) y sus tiras reactivas. El rango es de 0 a 600 ng de glucosa/dl de sangre. Para la medida de los niveles de insulina se obtuvo el plasma dejando reposar la sangre en los tubos de microcentrífuga de 500 μ l durante 30 minutos a temperatura ambiente. Mientras esperaban a ser centrifugados, se guardaron a 4°C. Al obtener todas las muestras se centrifugan a 1500 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se recupera el sobrenadante transparente libre de coágulos, quedando éstos al fondo del tubo. El suero se guarda a -80°C hasta su uso. La insulina en plasma se midió con un kit de detección de insulina de rata y ratón por el método ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3. Análisis estadístico de la prueba de tolerancia a la glucosa

Los datos de todos los grupos, tanto del parámetro correspondiente a los niveles de glucosa como del de la insulina, tienen una distribución paramétrica. Se aplicó la prueba estadística de ANOVA (*analysis of variance*) de un factor independiente. También se realizó la prueba de Levene para comprobar la homogeneidad de varianzas asumida por ANOVA que, en caso de ser significativa, es decir, en caso de no ser homogéneas, el dato estadístico tenido en cuenta es el de Welch. Como pruebas post hoc, para saber qué grupo es el que nos da la significación con la prueba de ANOVA o Levene, se aplicaron las pruebas de Bonferroni y Gabriel, ésta última especialmente útil en aquellos casos en los que la n de los grupos comparados difiere considerablemente.

Resultados y discusión

I. Análisis de las rutas de señalización implicadas en la regulación de la expresión de Pttg1 por la proteína GEF RasGrf1.

1. Búsqueda bioinformática de proteínas clave en esta regulación

Para conocer si había probabilidades objetivas con los datos publicados hasta el momento de que RasGrf1 controlara la expresión de Pttg1, decidimos hacer un análisis que nos mostrara qué factores de transcripción pueden estar implicados en la regulación de la actividad del promotor de Pttg1, cuya secuencia y caracterización ya habían sido descritas anteriormente [145]. Para ello empleamos el programa TFSEARCH ver.1.3 (ver materiales y métodos), que busca fragmentos de secuencias altamente correlacionadas con la base de datos TFMATRIX, que contiene perfiles a sitios de unión de factores de transcripción conocidos (ver materiales y métodos).

Este análisis dio como resultado 36 posibles factores de transcripción empleando las 2,3 kb sugeridas [145] en un principio como posible secuencia promotora (Tabla 5).

AML-1a	E2F	HSF2	RORalp
Brn-2	E4BP4	Ik-2	S8
CdxA	Elk-1	Ik-3	Sox-5
C/EBP	Evi-1	Lyf-1	Sp1
C/EBPb	GATA-1	MEF-2	SRY
c-Ets	GATA-2	MZF1	TATA
COUP-T	GATA-3	Nkx-2	USF
CP2	HFH-1	NRF-2	v-Myb
CRE-BP	HNF-3b	Oct-1	YY1
deltaE	HNF-4	Pbx-1	

Tabla 5. 36 secuencias consenso de factores de transcripción empleando los 2,3 kb de la secuencia del promotor de Pttg1 más cercanos al codón ATG.

El siguiente paso fue emplear el programa bioinformático Cytoscape, y su plugin APID2NET (ver materiales y métodos), para conocer el interactoma de RasGrf1, a 4 niveles de conexión, con al menos un método experimental para cada interacción propuesta, y el de la lista de 36 factores de transcripción obtenida en el paso anterior, con 3 niveles de conexión y al menos un método experimental para cada interacción. Del interactoma de RasGrf1, obtuvimos 1457 proteínas y del de la lista de factores de transcripción 669. Comparando las dos listas, vimos que coincidían 159 proteínas, posibles candidatas a ser el nexo entre la expresión/actividad de RasGrf1 y la expresión de Pttg1 (Tabla 7 de material suplementario).

Por otra parte, quisimos comparar la lista de 36 factores de transcripción con los factores de transcripción afectados por la delección de RasGrf1 in vivo en células β de páncreas y en retina de ratón obtenidos mediante el análisis de microarrays comerciales (Affimetrix MOE 430A mouse Gene Chips). Se obtuvieron 3 coincidencias con los factores afectados en los arrays de células β y 9 en los de retina, resaltados en negrita.

WT versus KO para RasGrf1			
array de células β		array de retina	
Aebp2	Ftsj1	Pit1	COMP1
Ankrd10	Jund1	PPAR	Cdx-2
Brd4	Nr3c1	XFD-2	TCF-4
Btg2	Phtf1	CDX	E2F-4:DP-2
Cbfb	Plagl1	PBX	E2F-1:DP-2
Cul3	Pnrc1	Cdc5	E2F-1:DP-1
Ddit3	Smc4l1	GR	Imperfect
Egr1	Supt4h1	TTF1	Hogness/Goldberg
Fosb	Tcf4	E47	BOX
Foxa2	Rmpo	NF-1	Major T-antigen
Foxp1	Zhx1	HNF-1	AR
		MEF-2	MyoD
		Nrf-1	

Tabla 6. Factores de transcripción con la expresión alterada en los arrays de tejidos de ratones deficientes en RasGrf1.

Existen evidencias del control de la ruta de las MAPKs sobre la expresión de Egr1 (early growth response 1). Se ha descrito que el factor del complejo ternario (TCF) Elk-1, sirve de puente entre la transcripción génica mediada por SRF (serum response factor) y la ruta Raf/MEK/ERK [311, 312]. Se ha demostrado la relación entre SFR y la regulación transcripcional de Egr1 [313]. Pero existen otras dos MAPKs asociadas a estrés mecánico, JNKs y p38, que también inducen la expresión de Egr1 [314]. Es interesante señalar que la expresión de este factor de transcripción se ve afectada por la insulina en adipocitos 3T3-L1 resistentes a la insulina [315]. La inducción de Egr1 requiere la bajada de expresión del microARN-191 mediada por ERK y la fosforilación del factor represor de ETS2 (ERF), el cual sale del núcleo [316].

Respecto al factor de transcripción FosB, se ha publicado recientemente que en células mamarias humanas, mientras que EGF induce a *Egrf1* y es necesario para la migración, c-Fos y FosB, inducidos mediante suero, aumentan la proliferación [316]. En la región 5' anterior al gen *FosB*, se han identificado varias secuencias consenso, entre ellas sitios de unión a SRE y AP-1 [317].

En un estudio publicado en 2009 se relaciona directamente la expresión *RasGrf1* con la proliferación de las células β [318]. En el experimento estimulan la proliferación de la línea celular de insulinoma de ratón R7T1 con agonistas de los canales de calcio de tipo L, del inglés long-lasting, y agonistas de los receptores Glp-1. Al analizar los resultados de los arrays de estas células estimuladas hallan, entre los genes regulados positivamente, a *RasGrf1* y entre los factores de transcripción a *Egr1* y *FosB*.

Curiosamente, un buen ejemplo de la importancia de los factores FoxA en múltiples estadios del desarrollo del mismo tipo celular, es el páncreas. Se ha demostrado que *Foxa1/Foxa2* activan al gen más importante responsable del desarrollo pancreático, *Pdx1*[319]. Además, en las células β maduras, estos dos factores cooperan en el control de la secreción de insulina y reprimen el programa de transcripción neuronal a través de un mecanismo desconocido por el momento [320]. Por todo, las alteraciones en la expresión de estos factores de transcripción pueden ser un reflejo de la menor señalización a través de la ruta de las MAPKs en los animales *RasGrf1* KO.

Pit-1 es un factor de transcripción específico de la pituitaria, clave para la diferenciación celular durante la organogénesis de la pituitaria anterior en mamíferos [321, 322] y como activador transcripcional de la pituitaria [323]. Actuando con factores adicionales de manera coordinada, es responsable de la especificación, expansión y supervivencia de tres tipos celulares (somatotropos, lactotropos y tirotropos) durante el desarrollo de la pituitaria anterior [324] y de la regulación transcripcional de los promotores diana de estos genes: *GH*, *prolactina*, *TSH*, *GHRH*, genes receptores y él mismo, *Pit-1* [323-329]. Se ha detectado su expresión en carcinoma ductal de mama y mama sana [330], placenta [331], tejido hematopoiético y linfoide, en las líneas celulares leucémicas HL-60 y RAJI [332] y, recientemente, en la línea MCF-7 de adenocarcinoma humano de mama, donde además se ha visto que activa la transcripción de *GH* e induce la proliferación [333]. En los ratones *RasGrf1* KO se ha visto que existe una menor cantidad de GH circulante, lo que podría ser debido a alteraciones en la expresión de este factor de transcripción [35].

Las proteínas PBX se consideran factores centrales en el desarrollo. Su papel consiste en integrar señales de transducción específicas con numerosas proteínas, para regular los programas de expresión génica durante el desarrollo [334]. La isoforma *Pbx1a* se expresa sólo en cerebro y mayoritariamente durante la etapa adulta, mientras que la *Pbx1b* es ubicua y sobretodo presente en la etapa embrionaria [335]. En páncreas embrionario

Pbx1b sólo se detecta en el núcleo de las células acinares, Pbx2 tanto en la fracción nuclear como en la citoplásmica de las células endocrinas y acinares, mientras que Pbx3 sólo en el citoplasma de ambos tipos [336]. No se conoce hasta el momento una posible relación entre estos factores de crecimiento y RasGrf1 o Pttg1, pero su función y localización nos hace pensar que dicha relación pudiera existir.

El gen del receptor del glucocorticoide humano (hGR) expresa mayoritariamente dos isoformas: hGR α y hGR β [337, 338]. Las hormonas glucocorticoides controlan distintos procesos fisiológicos, como el metabolismo, la inflamación, el desarrollo y el comportamiento [339]. Estas respuestas son el resultado directo de la actividad como factor de transcripción de hormonas de GR α [340]. Por otra parte, el papel de GR β en el control de procesos fisiológico apenas se ha estudiado [341].

Sobre el factor de transcripción NF-1 existe un estudio con resultado negativo sobre su papel como factor de transcripción de Pttg1 en las líneas celulares U2OS y Saos2 de osteosarcoma humano [146], pero no existen más datos relacionándolo con Pttg1 o RasGrf1.

El receptor de andrógeno (AR) es un factor de transcripción [342] muy estudiado, pero no hemos encontrado ninguna relación bibliográfica con Pttg1 ni RasGrf1. Por otra parte, AR interacciona con otros factores de transcripción conocidos para Pttg1, como Sp1 [145].

MyoD es una proteína que juega un papel clave en la regulación de la diferenciación muscular. Pertenece a la familia de proteínas MRF (factores reguladores de la miogénesis) [343]. Colabora con los factores de transcripción Mef2 (myocyte enhancer factor 2) dirigiendo la transcripción de genes relacionados con los músculos [344]. Es interesante mencionar que interacciona con Sp1 [345], H-Ras [346] y K-Ras [347], entre otros, pudiendo ejercer un papel en la señalización mediada por RasGrf1.

La proteína Retinoblastoma (Rb) interacciona con los factores de transcripción E2F, entre otros, para controlar la transición del ciclo celular G1/S y permitir la proliferación [348]. La asociación de heterodímeros DP a E2F sirve para regular la unión a sus dianas, entre ellas las ciclinas D1 y E, c-myc y cdc2, cuyos productos son necesarios para la síntesis de nucleótidos, replicación de ADN y progresión del ciclo celular [349]. En ratones Rb^{+/-} se ha detectado un incremento en la expresión de E2F1 y Pttg1 en la pituitaria y en tumores humanos de pituitaria también se ha visto una correlación en la expresión de estas dos proteínas [350]. Han demostrado la unión de E2F1 al promotor de hPTTG1 y la activación de la transcripción del mismo [350]. Así pues, la activación aberrante de la ruta Rb/E2F1 puede inducir la expresión exagerada de Pttg1, provocando una separación de la cromátidas hermanas poco fiable [127], inestabilidad cromática [351], pérdida del control proliferativo [197] y, como consecuencia, el comienzo del proceso tumoral [352].

2. Caracterización funcional de RasGrf1 y Pttg1 mediante silenciamiento estable de su expresión en células PC12.

Elegimos las células PC12 para realizar los estudios in vitro por su extensa bibliografía en estudios neurobiológicos y neuroquímicos desde que se estableció esta línea celular hace más de 30 años [353]. Pensamos que su origen neuronal podría simplificar la comparación de los resultados obtenidos en ellas a los obtenidos en los arrays de retina de ratón, dónde inicialmente habíamos observado una asociación entre Pttg1 y RasGrf1 [354].

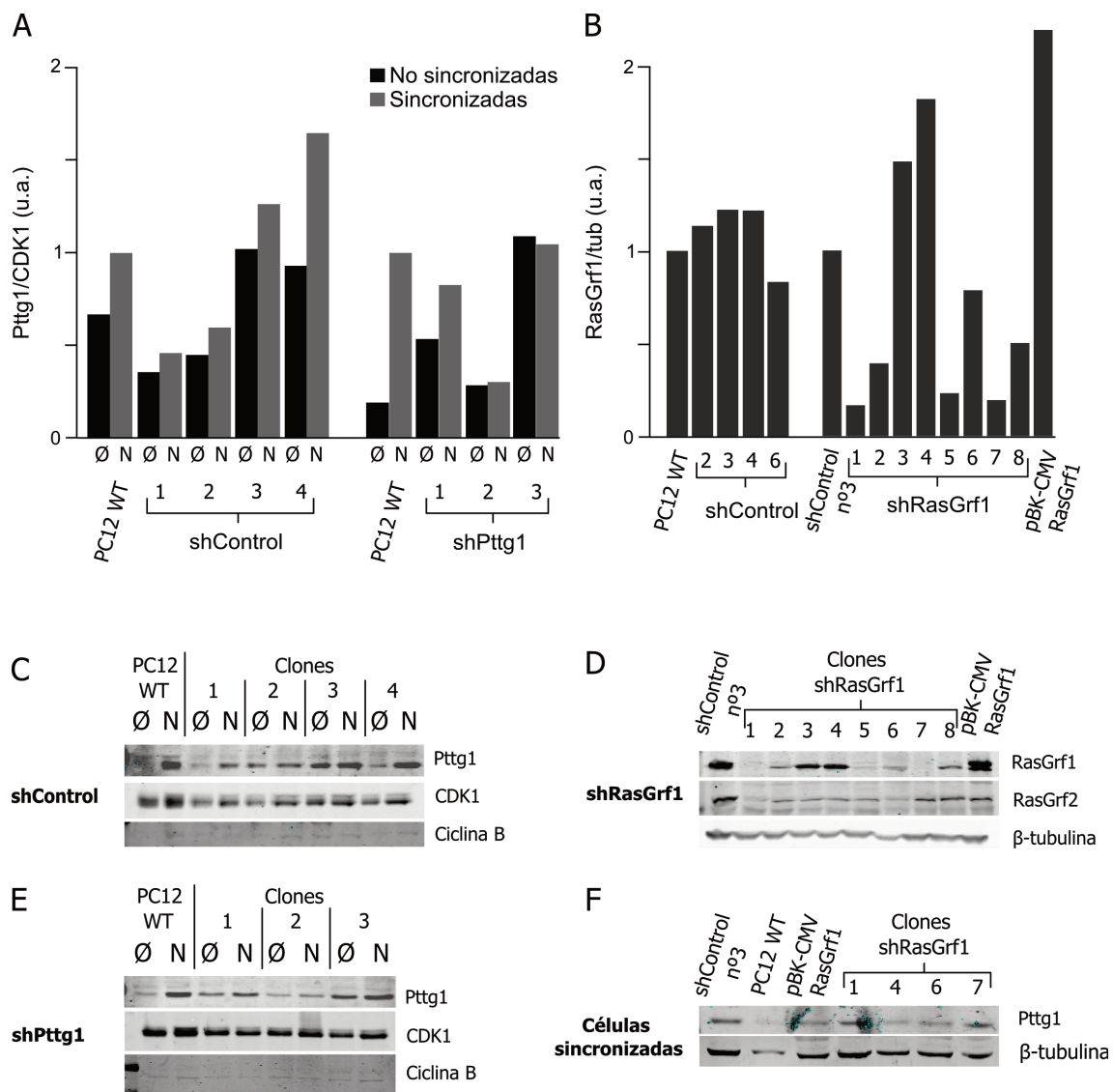


Fig 9. Silenciamiento de Pttg1 y RasGrf1 en células PC12 mediante interferencia estable con shARN. **A.** Gráfica representativa de los resultados obtenidos en los Western blots **C** y **E**. **B.** Gráfica representativa de la expresión de RasGrf1 en los Western blots **D** y **F**.

Para disminuir la expresión de las proteínas RasGrf1 y Pttg1 de manera estable infectamos los cultivos con partículas lentivirales portadoras de construcciones de ARNsh dirigidas específicamente contra los transcritos de cada uno de los loci. Igualmente, se empleó la construcción ARNsh control (non-targeting control), que contiene una secuencia capaz de activar la maquinaria de silenciamiento celular sin afectar a los niveles de ningún transcrito en concreto, lo cual permite valorar los efectos inespecíficos de esta técnica.

Cuarenta y ocho horas después de realizar la infección, se seleccionaron las células positivamente infectadas añadiendo puromicina al medio. Una vez eliminadas las células no infectadas, se generaron clones procedentes de una sola célula para asegurar una integración única de la construcción de ARNsh en el genoma celular. Así se intenta evitar la variabilidad en los resultados por causas ajenas al nivel de expresión de la proteína de interés en cada clon. Para analizar la expresión de Pttg1 fue necesario sincronizar las células en fase G2/M, su momento de máxima expresión. Se añadió nocodazol al medio, 500 ng/ml, durante 12 horas. Éste impide la polimerización de los microtúbulos, evitando la formación de los husos mitóticos de la metafase.

Una vez obtenidos varios clones para cada proteína y para el control, se analizó la expresión de las proteínas por Western blot. La correcta sincronización de las células se comprobó con la relación entre la expresión de ciclina B, máxima en esta fase del ciclo y la expresión de Cdk1, que no varía durante la mitosis. En el momento de mayor expresión de Pttg1, la relación de entre ciclina B/Cdk1 es también es máxima. Como se aprecia (Fig. 9 C y E), la máxima expresión obtenida de ciclinaB en las células PC12 empleadas, es relativamente difícil de detectar. Aun así, estamos seguros de la correcta parada del ciclo utilizando el nocodazol durante el tiempo y la concentración indicados, ya que previamente realizamos ensayos a diferentes concentraciones y tiempos con PC12 WT para determinar cuáles emplearíamos para obtener la máxima expresión de Pttg1.

De esta manera decidimos emplear para nuestros experimentos los clones control nº 3 y nº 6, el clon shPttg1 nº2 y los clones shRasGrf1 nº1 y nº7. Al volver a intentar conseguir mayor número de clones con una disminución considerable de la expresión de Pttg1, obtuvimos uno más que añadimos a los experimentos con el fin de aumentar la n, de expresión similar al shPttg1 nº2. Los clones shPttg1 fueron los más difíciles de obtener, seguramente por la dificultad a la hora de proliferar de estas células PC12 sin unos niveles intracelulares mínimos de Pttg1.

a. Efecto de RasGrf1 y Pttg1 sobre la capacidad proliferativa en cultivo de las células PC12.

Los ensayos de proliferación se realizaron midiendo la incorporación de MTT. Este ensayo permite estimar indirectamente la tasa de crecimiento basándose en la actividad mito-

condrial de las células en proliferación. Pensamos que en nuestras células es un método válido, ya que en crecimiento activo no hemos observado, en ninguno de los clones con los que hemos trabajado, un consumo del medio de cultivo a un ritmo diferente. Gracias al rojo fenol, indicador de pH común presente en los medios de cultivo, se observa paulatinamente, primero un cambio de rojo a naranja y posteriormente a amarillo, ya que el acúmulo de productos de desecho liberados acidifica el medio.

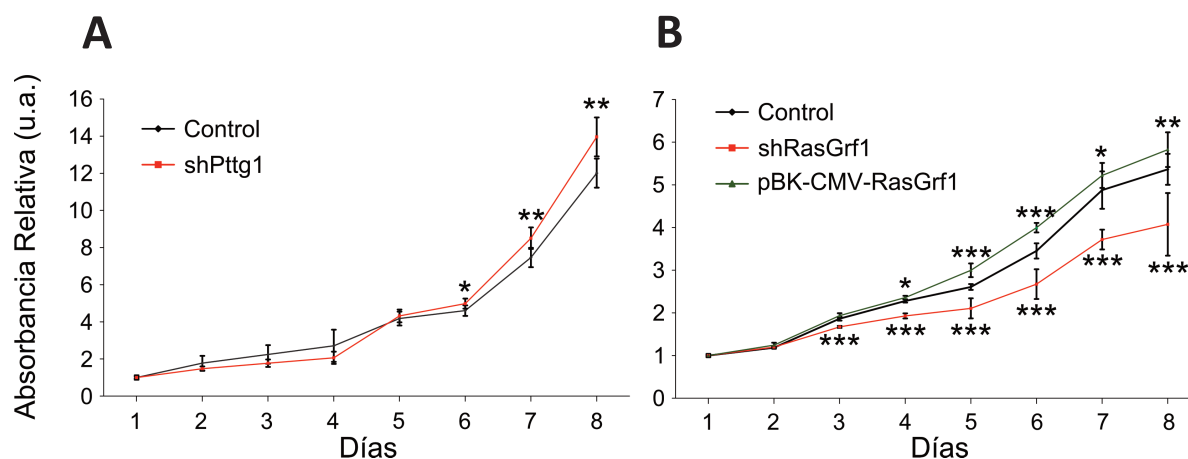


Fig 10. Medida de la proliferación celular en clones shPttg1 (A), shRasGrf1 y pBK-CMV-RasGrf1 (B). La medida de la tasa de proliferación se realizó mediante el ensayo de incorporación de MTT. Se sembraron cantidades iguales de los clones utilizados para cada ensayo. Los valores de absorbancia están expresados en unidades relativas tomando como referencia el punto inicial del experimento, que corresponde a la absorbancia obtenida para cada clon 24h después de la siembra. Cada punto representa la media de la absorbancia relativa de triplicados para cada punto. Las barras de error para cada punto representan \pm DE de la absorbancia relativa de sus respectivos triplicados. *, $p < 0,05$ respecto a shControl (t-test). **, $p < 0,01$ respecto a shControl (t-test). ***, $p < 0,001$ respecto a shControl (t-test).

Tras el análisis de los resultados comprobamos un claro descenso de la tasa de crecimiento en el clon de shRasGrf1 respecto a la media control de los clones estables shControl y pBK-CMV vacío, mientras que al comparar el clon con sobreexpresión estable de RasGrf1 con respecto a la misma media control, se observa un ligero incremento en la proliferación. La tasa de crecimiento media de los dos clones shPttg1 utilizados con respecto a la del clon shControl también está ligeramente aumentada.

El único estudio de proliferación con la expresión de PTTG1 muy atenuada por siARN (short interference) que hemos encontrado en la bibliografía ha sido en células HepG2 y SMMC-7721, de hepatocarcinoma humano. En éstas se ha visto una inhibición de la proliferación mediante la misma técnica empleada en nuestro laboratorio, el ensayo de MTT [355]. La marcada disminución al tercer día de ensayo contrasta con nuestros resultados, los cuales concuerdan con nuestra hipótesis de mayor, aunque moderada, proli-

feración al reducir la actividad de un importante checkpoint de la anafase en la mitosis. El motivo de estos resultados opuestos probablemente sea debido al uso de diferentes líneas celulares y al nivel de reducción de expresión de Pttg1 obtenido. Me gustaría apuntar que al sobreexpresar PTTG1 de manera estable en diferentes líneas celulares, también se han obtenido resultados contrarios: aumento de la proliferación en las líneas NIH3T3 y HEK 293 [196] e inhibición de la misma en HeLa y A549 [190, 356].

Por último, es necesario mencionar los resultados obtenidos por Yu y col. en 2006 con células MIN6, de insulinoma de ratón, muy parecidas a las que nosotros hemos empleado para los estudios de luciferasa con el promotor de Pttg1 que mostraré más adelante. Al sobreexpresar Pttg-EGFP en niveles bajos, éste se degradaba dos minutos antes de la transición de metafase a anafase, en cambio, al sobreexpresar abundante Pttg-EGFP, se paraba la transición, alrededor del 18% de las células no conseguían degradar el Pttg-EGFP y entraban en apoptosis [357].

b. Estudio del ciclo celular en clones silenciados estables para RasGrf1 y Pttg1

Los resultados del apartado anterior, es decir, una mayor proliferación tanto de los clones con expresión reducida para Pttg1 como para el que sobreexpresa RasGrf1, nos hicieron preguntarnos si el ciclo celular de estos clones estaría alterado. Quisimos ver el estado del ciclo celular en crecimiento activo. En el momento de realizar el experimento, el número de pases entre los clones era similar y su mantenimiento en cultivo idéntico. Los resultados de la citometría de flujo confirmaron el papel clave de estas proteínas en la regulación de la mitosis en células PC12 ya que en los clones con bajada de expresión de RasGrf1 o Pttg1 se aprecia claramente una inestabilidad cromosómica (CIN) que no observamos en los clones control.

La inestabilidad cromosómica (CIN) describe un incremento en la tasa de cromosomas segregados defectuosamente en mitosis provocando un fallo en el mantenimiento del complemento cromosómico correcto (euploidía). El estado cromosómico aberrante de una célula se puede clasificar por cambios en la ploidía, ganancia o pérdida de cromosomas enteros (aneuploidía) o reordenamientos cromosómicos mayores (GCR), todos característicos de tumores sólidos. Pueden causar la CIN múltiples mecanismos relacionados con la segregación cromosómica, como un punto de control del ensamblaje del huso mitótico demasiado débil o sobreactivado, defectos en la cohesión de las cromátidas hermanas, un incremento en las uniones merotéticas kinetocoro-microtúbulo o la presencia de centrosomas extra. La CIN tiene lugar al inicio del desarrollo cancerígeno y está asociado a un mal pronóstico. Durante mucho tiempo se ha propuesto que la CIN contribuye a la progresión del tumor, sin embargo estudios recientes sugieren que puede promover o suprimir la progresión, dependiendo del contexto [358].

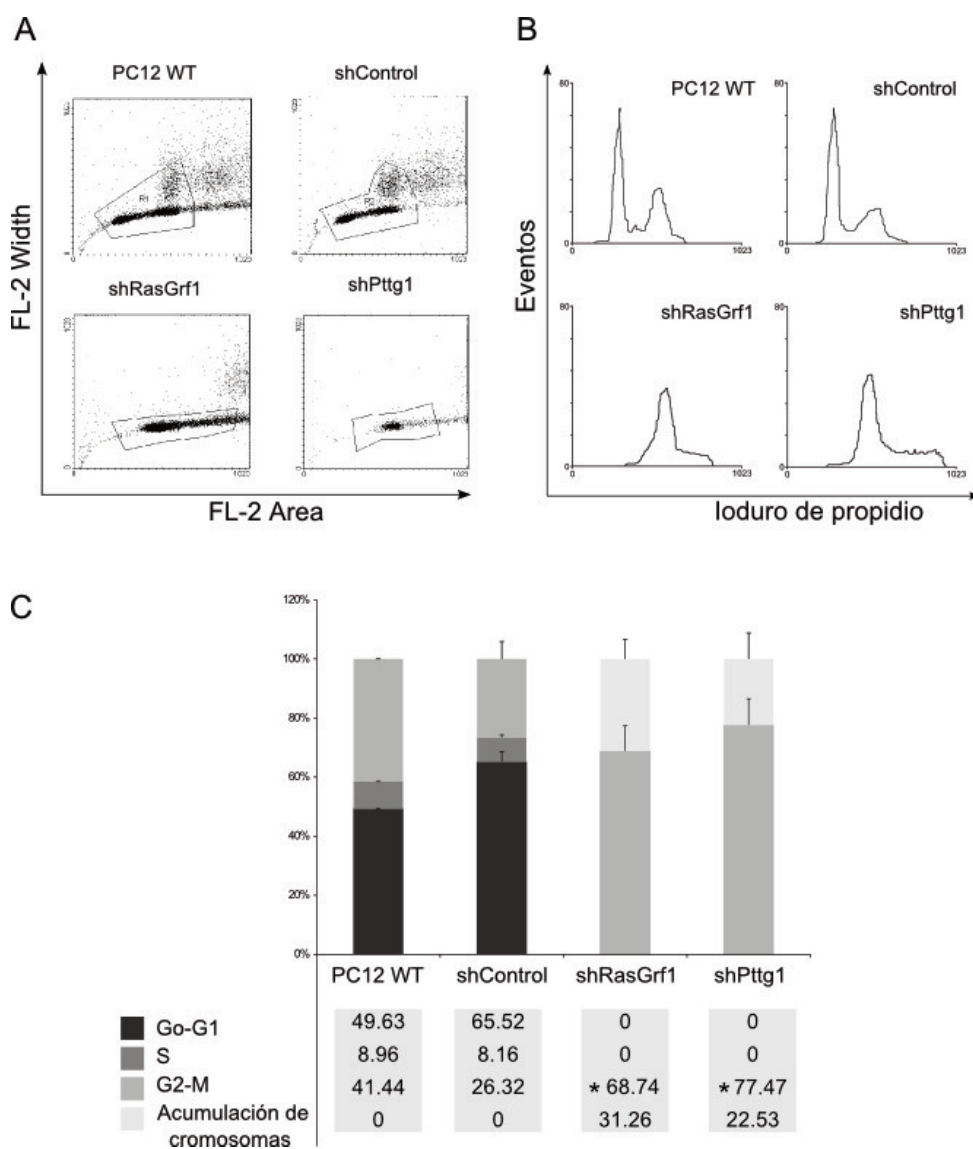


Fig 11. Estudio del ciclo celular en clones estables shRasGrf1 o shPttg1. El perfil del ciclo celular de clones shRasGrf1 y shPttg1, sus controles shControl y células PC12 sin transfectar en crecimiento activo se analizó por citometría de flujo. **A.** Gráficas de puntos representativas de cada clon representando el tamaño celular en el eje vertical (Y) y la complejidad interna en el eje horizontal (X). **B.** Histogramas representativos de la fluorescencia del ioduro de propidio emitida por los clones estudiados. **C.** Los diagramas de barras presentan la media \pm SD del porcentaje de células presentes en cada fase del ciclo celular. Las tablas inferiores muestran los porcentajes medios de 3 experimentos independientes para cada clon. * $p < 0,05$

El punto de control de la formación del huso mitótico (SAC, por sus siglas en inglés) es una ruta de señalización que asegura la correcta segregación de las cromátidas hermanas inhibiendo la transición metafase-anafase hasta que todos los cromosomas están unidos de manera bipolar al huso mitótico [359]. El complejo APC/C, una ubiquitina ligasa E3, es responsable de la segregación cromosómica al marcar a reguladores mitóticos para su degradación [360, 361]. CDC20 es el cofactor clave de APC/C en esta ruta, se encarga de marcar a PTTG1 y a la ciclina B cuando se completa la unión al huso [362].

Un análisis detallado de los genes con la expresión alterada en tumores muestra un alto enriquecimiento de los genes centrosomales y mitóticos en su perfil de expresión [363]. Se observó sobreexpresión de CDK1 y algunos de sus reguladores como la ciclina B1, ciclina B2, CKS1 y 2. El perfil CIN incluye componentes adicionales de la maquinaria centrosómica y de segregación cromosómica, como NEK2, aurora kinasa A, aurora kinasa B, CDC20, CDCA8, CENPF, separasa (codificada por ESPL1), hPTTG1, TTK o MAD2L1 [364]. Los tumores CIN sobreexpresan a menudo proteínas centrosómicas como CDK1, así como las ciclinas E, A y B, además de RasGrf1, NEK2, Aurora kinasa A, PLK1 o TPX2 [364, 365]. Los resultados obtenidos empleando el clon shPttg1 nº2, analizado en este experimento, concuerdan con la bibliografía. Como en los artículos comentados en el apartado de transformación celular y aneuploidía sobre Pttg1 en la introducción, hemos observado la consecuencia de los defectos provocados por bajos niveles de expresión de Pttg1. Estos datos refuerzan nuestra idea de que la dificultad en la obtención de clones de células PC12 estables silenciados para Pttg1, es debida a fallos irreversibles durante la mitosis, que impiden su proliferación.

Podemos concluir que, tanto RasGrf1 como Pttg1, analizados los resultados obtenidos y teniendo en cuenta la bibliografía, están implicados en el mantenimiento del kariotipo estable y en la correcta segregación de cromosomas en la mitosis. RasGrf1 activa rutas proliferativas mediadas por Ras, oncogén sobre el cual está sobradamente discutido su papel transformante. Al fallar la regulación de la actividad de estas rutas activadas por RasGrf1, es muy probable que no se produzca, de manera eficiente, la transcripción génica necesaria para que la maquinaria proteica necesaria durante la mitosis funcione correctamente, provocando la acumulación de cromosomas observada en el clon shRasGrf1 nº1.

c. Efecto de la eliminación de Pttg1 y RasGrf1 sobre la activación de Ras y sus rutas efectoras.

Para examinar el estado de las rutas de señalización intracelular activadas por RasGrf1 en las células PC12 con expresión atenuada de Pttg1 y RasGrf1 empleamos diferentes compuestos conocidos que estimulan la actividad de RasGrf1: NGF y ionomicina. Así como EGF, que activa la ruta de ERK sin estimular a RasGrf1. En PC12, los efectos de estos compuestos están ampliamente documentados y son las únicas células que expresan los receptores de EGF y NGF al mismo tiempo. En 1981, Huff y col. determinaron que NGF y EGF actúan de manera independiente en estas células, aunque algunas de sus consecuencias fuesen similares, como el aumento de la adhesión celular, ya el NGF induce diferenciación y el EGF proliferación [366].

La familia de las neurotrofinas, en la cual se incluye al NGF (*nerve growth factor*), está compuesta por factores de crecimiento que median diferentes respuestas celulares, como

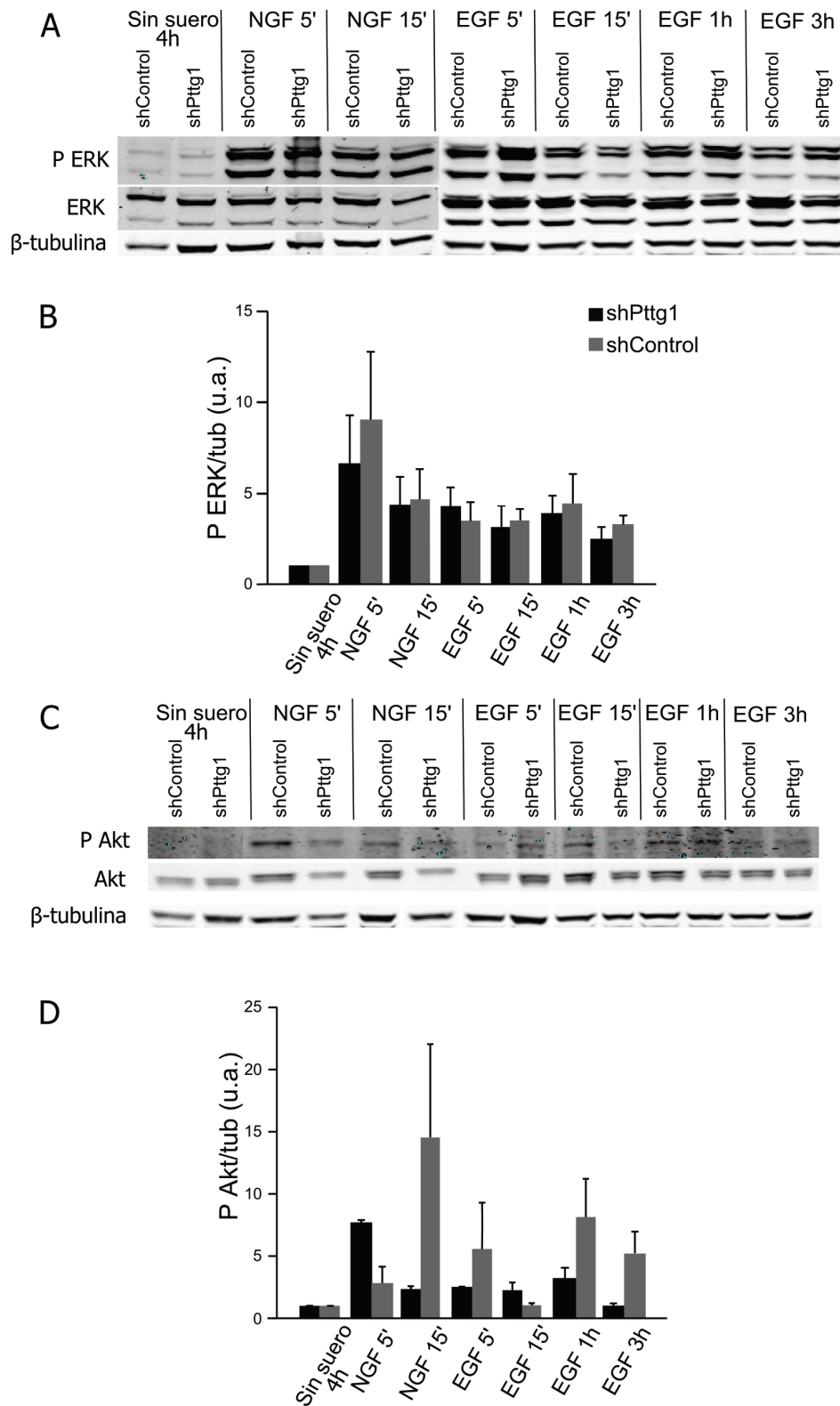


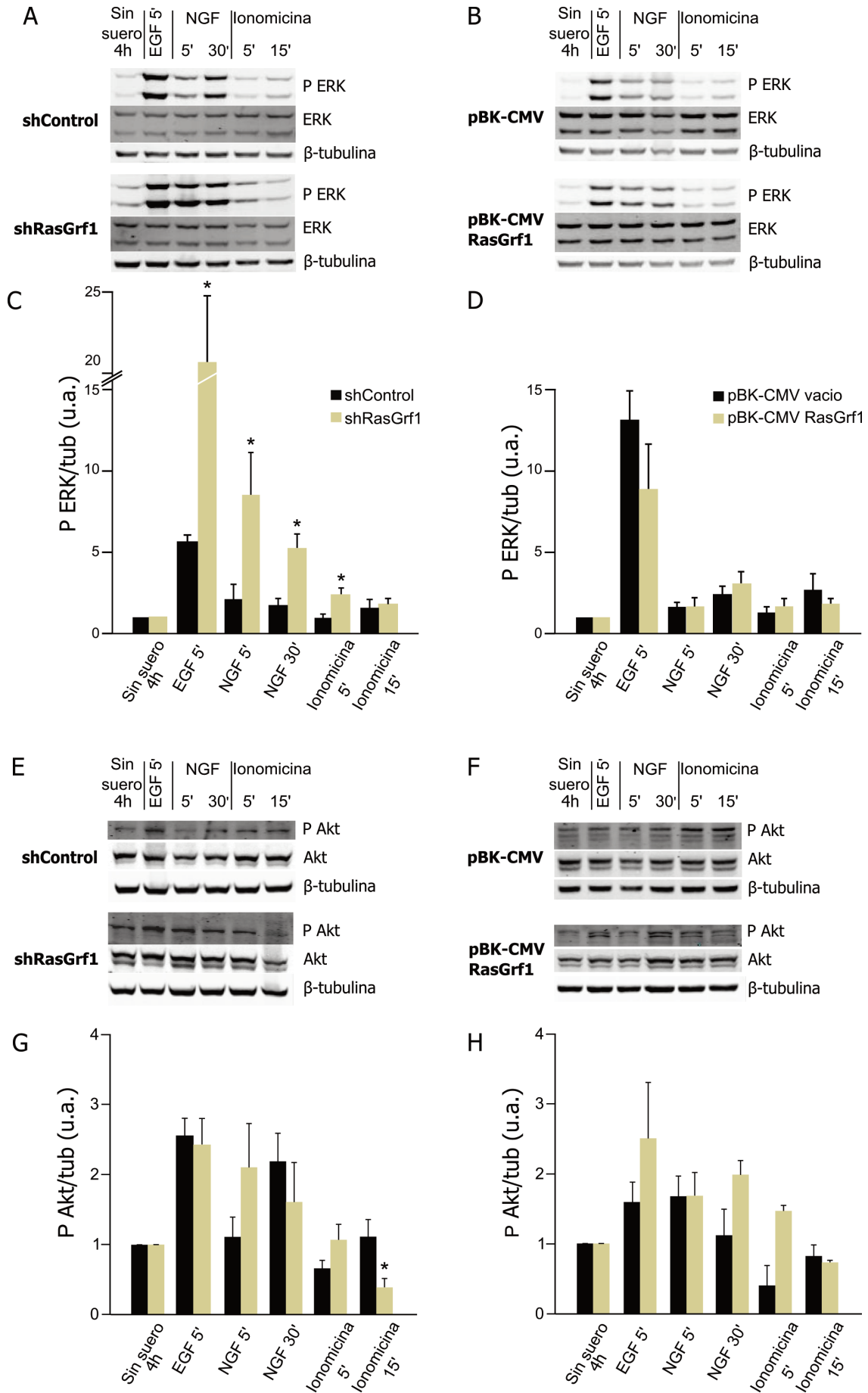
Fig 12. Fosforilación de ERK1/2 y Akt en clones de células PC12 shPttg1 y shControl. Se privó de suero durante 4h a cultivos subconfluentes antes de estimular con NGF (100 ng/ml) o EGF (25 ng/ml) durante los tiempos indicados. Se muestran los Western blot representativos de los niveles de fosforilación de ERK1/2 (**A**) y Akt (**C**). Las gráficas de barras representan la media de los valores obtenidos en 4 experimentos diferentes con un clon shControl y dos shPttg1 para ERK1/2 (**B**) y en 2 experimentos diferentes con un clon shControl y dos shPttg1 para Akt (**D**). tub, β -tubulina.

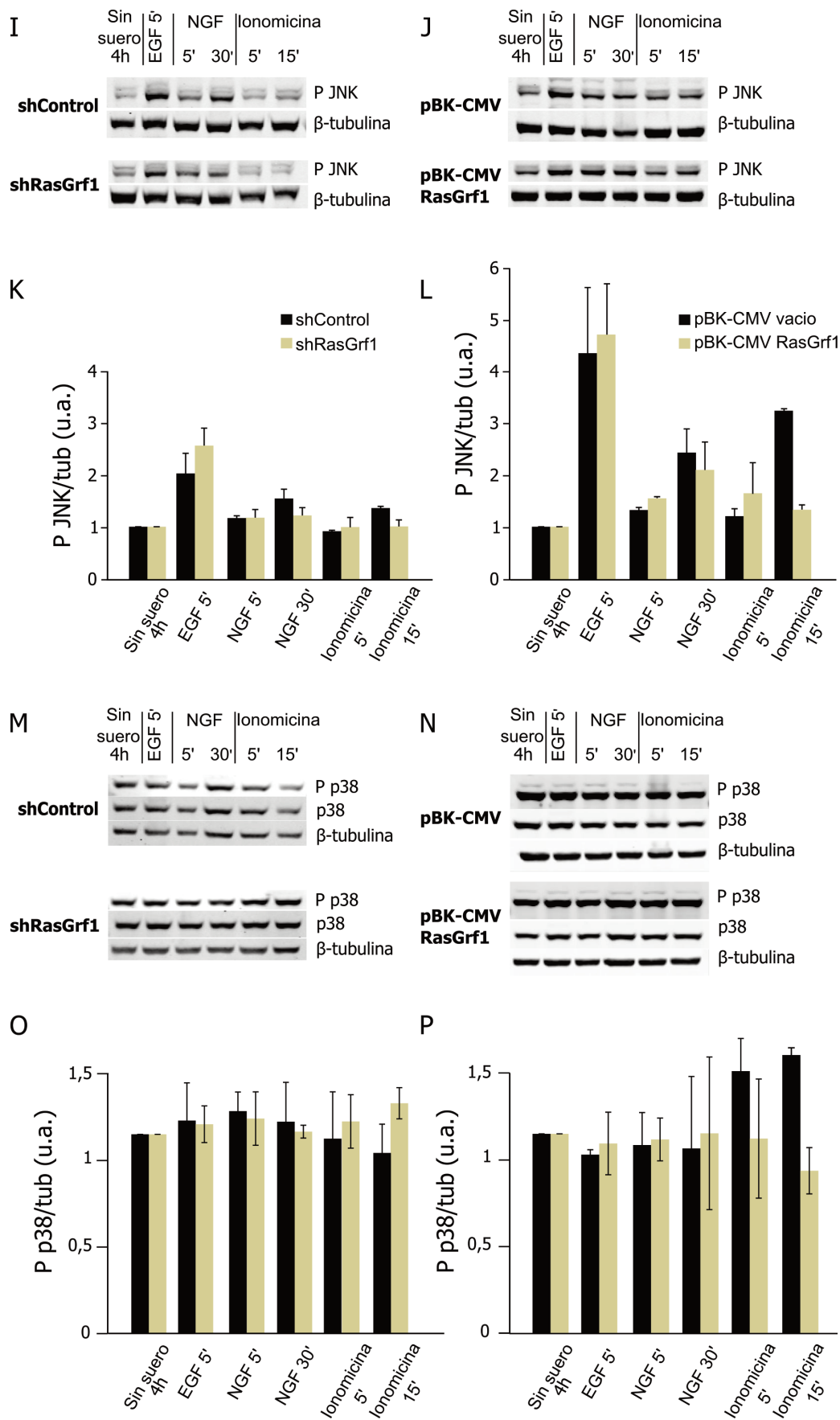
la mitogénesis, apoptosis y neuritogénesis en el desarrollo del sistema nervioso [367]. En cerebro se las asocia a la regulación del crecimiento de los axones [368], memoria y LTP [369], señalización vía calcio [370], y sinaptogénesis [371]. En células PC12, la acción de NGF, que se une específicamente al receptor TrkA (*tropomyocin-related kinase A*), provoca su dimerización, fosforilación y estabilización de su conformación activa. Esto permite la unión de Shc a los receptores y el reclutamiento de Grb2 y Sos a la membrana plasmática, permitiendo la interacción de Sos con sus dianas Ras y la activación de la ruta de las MAPKs. Una ruta alternativa vía FRS-2 involucra a la proteína adaptadora Crk y al GEF C3G, el cual estimula a Rap1 y a la isoforma B-Raf, provocando la activación prolongada de las MAPKs y de la diferenciación [372-374]. Por último se ha demostrado, en estudios de transfección, que TrkA, mediante su dominio HIKE, activa a RasGrf1 en su dominio PH1, obteniendo un aumento en el crecimiento de neuritas en las células PC12 [57].

EGF (*Epidermal Growth Factor*) es un factor de crecimiento que, al unirse a su receptor, EGFR, estimula el crecimiento celular, la proliferación y la diferenciación [375]. Su descubrimiento le valió a Stanley Cohen, de la Universidad de Vanderbilt, el Premio Nobel en Fisiología y Medicina en 1986. EGF no activa RasGrf1, pero sí a la ruta de ERK [88]. Se ha publicado recientemente un estudio en el que muestran una potente activación de PKA por parte de NGF y EGF en la membrana plasmática. Éste es a su vez un activador de Raf-1 [376], de diferente duración. Además se identificó a PDE3 como responsable de la duración de la actividad de ERK en el núcleo, tras la estimulación de EGF de una manera dependiente de PKA [377].

El tercer compuesto utilizado fue la ionomicina, un ionóforo selectivo de calcio ampliamente usado en células PC12 [378]. Arozarena y col. (2004) sugieren que, en células COS-7, la estimulación del aumento de calcio intracelular por presencia de ionomicina en el medio de cultivo prima la activación vía RasGrf1 y RasGrf2 del H-Ras de la membrana plasmática [62].

Fig 13. Fosforilación de ERK1/2, Akt, JNK y p38 en clones de células PC12 shRasGrf1 y su shControl y pBK-CMV RasGrf1 y su control con el vector vacío. Se privó de suero durante 4 horas a cultivos subconfluentes antes de estimular con EGF (25 ng/ml), NGF (100 ng/ml) o ionomicina (100 nM) durante los tiempos indicados. Se muestran los Western blot representativos de los niveles de fosforilación de las proteínas estudiadas. Las gráficas de barras representan la media de los valores obtenidos en 3 experimentos diferentes con un clon pBK-CMV, pBK-CMV RasGrf1 y shControl y dos shRasGrf1 para ERK1/2 y Akt y en 2 experimentos diferentes con un clon pBK-CMV, pBK-CMV RasGrf1 y shControl y dos shRasGrf1 para JNK y p38. Las barras de error representan + ET. * p<0,05.





Los resultados obtenidos mediante estas estimulaciones con los clones estables de shPttg1 de PC12 no muestran resultados significativos al compararlos con el clon control, ni en la ruta de señalización de ERK ni en la de Akt. Era de esperar ya que, según nuestra hipótesis, Pttg1 se vería afectada por el estado de estas rutas, es decir, estaría regulada por ellas, pero no las regularía por sí misma. Aunque en esta última ruta, fig B, se aprecien resultados distintos a los del control, éstos son debidos a la gran variabilidad de los datos obtenidos con los clones shPttg1, como se puede observar en las barras de error. El análisis estadístico no mostró ningún tipo de tendencia, más bien otros factores deben estar influyendo en la fosforilación de Akt.

En el estudio de RasGrf1 mediante clones estables de células PC12, quisimos comprobar el estado de las rutas de las MAPKs, ERK, JNK y p38, y de PI3K/Akt por su integración con la ruta de Raf/MEK/ERK [379]. Pensamos que al conocer las rutas afectadas por la ausencia y sobreexpresión de RasGrf1 podríamos acotar mejor a los factores de transcripción implicados en la regulación por RasGrf1 de la expresión de Pttg1.

No vemos diferencias significativas a corto plazo con los estímulos empleados en P-Akt (C), P-JNK (E y F) o P-p38 (G y H). En éstas dos últimas lo esperábamos por ser rutas activadas por estímulos de estrés, no proliferativos. Si nos fijamos en la gráfica de P-Akt (D) con pBK-CMV-RasGrf1 vemos una sutil tendencia al aumento de la fosforilación, sin llegar a ser significativa estadísticamente. Este ligero pero constante incremento del P-Akt es independiente de la fosforilación de ERK, que no varía con respecto al shControl.

Dónde sí encontramos diferencias significativas es en los niveles de fosforilación de ERK al disminuir la expresión de RasGrf1 de manera estable. Al estimular con EGF, a pesar de estar descrita su independencia de RasGrf1, parece clara la influencia de éste en la fosforilación de ERK, probablemente modulando la intensidad de las fosforilaciones de la ruta. Al estimular con NGF seguimos observando una mayor fosforilación de ERK, a pesar de que en este caso RasGrf1 sí interviene en la señalización directamente. Finalmente, con la estimulación por ionomicina, sólo vemos un pequeño aumento, aunque significativo también, de la fosforilación de ERK a los 5'.

En el trabajo de Abreu y col. realizado en células FLS (*fibroblast-like synovial*), logran silenciar parcialmente a RasGrf1 pero no miran el estado de las rutas de señalización que activa [109]. Se basan en los resultados de Zhu y col., obtenidos en células M2 de melanoma humano, en las que se observa que una reducción de 50% en la expresión de RasGrf1 asociado a membrana, provocada por la expresión de la proteína FLNa, correlaciona con la disminución constitutiva de la cascada de activación de Ras/ERK [77]. En células PC12, los estudios hallados en la bibliografía sobre la expresión de RasGrf1 se centran en su activación y en que isoforma de Ras activan, pero no indagan más allá en las rutas de fosforilación.

En conjunto, los datos de los experimentos de estimulación a corto plazo con diversos compuestos activadores de las rutas de las MAPKs y de PI3K/Akt muestran un aumento de la fosforilación de la ruta de ERK cuando disminuimos la expresión de RasGrf1 de manera estable en células PC12.

3. Estudio de la activación del promotor de Pttg1 mediada por rutas de señalización activadas por RasGrf1.

Tras conocer que la única ruta de señalización afectada tras la disminución de expresión de RasGrf1, de las estudiadas, era la de Raf/MEK/ERK, quisimos evaluar si ésta era también la única capaz de modular la actividad del promotor de Pttg1. Por este motivo, llevamos a cabo ensayos de luciferasa, transfectando diferentes líneas celulares con un plásmido que contiene al promotor de Pttg1 (2,3 kb) unido al reportero de la luciferasa y cotransfectando el vector pBK-CMV vacío o pBK-CMV-RasGrf1. Además se cotransfectó en todos los casos el vector portador de la Renilla para normalizar.

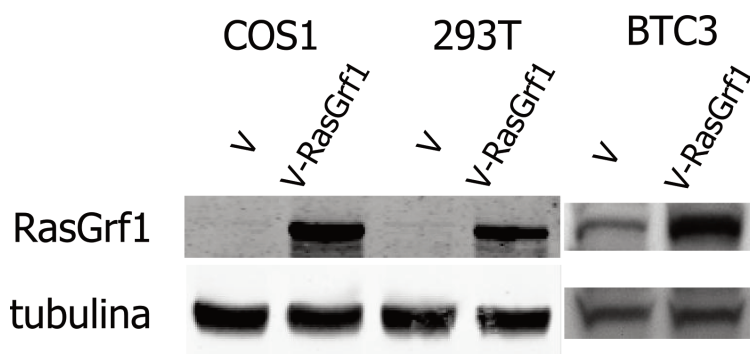


Fig 14. Western blots representativos de la sobreexpresión de RasGrf1 obtenida en COS1, 293T y BTC3. V, pBK-CMV.

La sobreexpresión de RasGrf1 regula de manera diferente la actividad del promotor de Pttg1 según la línea celular en la que realizamos el ensayo. En las líneas celulares COS1 y 293T, en las cuáles RasGrf1 no se expresa, su sobreexpresión reduce la actividad del promotor. Este resultado nos desconcertó. Al analizar los resultados más en detalle, vimos que en las células COS1, la inducción mediante ionomicina y LPA sí aumenta la actividad del promotor de Pttg1 en presencia de RasGrf1 alrededor de un 50% respecto al control transfectado pero sin estimular. En cambio, la presencia de EGF no varió la actividad de este promotor. En las células 293T no observamos este aumento de la actividad con ninguno de los compuestos empleados.

En lo que respecta al ensayo con inhibidores específicos, comprobamos que sólo la inhibición de MEK1 con U0126 redujo en todas las líneas celulares a la mitad la actividad del promotor mientras los otros inhibidores no mostraban resultados claros. Este resultado apunta a un papel específico de esta ruta en control del promotor de Pttg1.

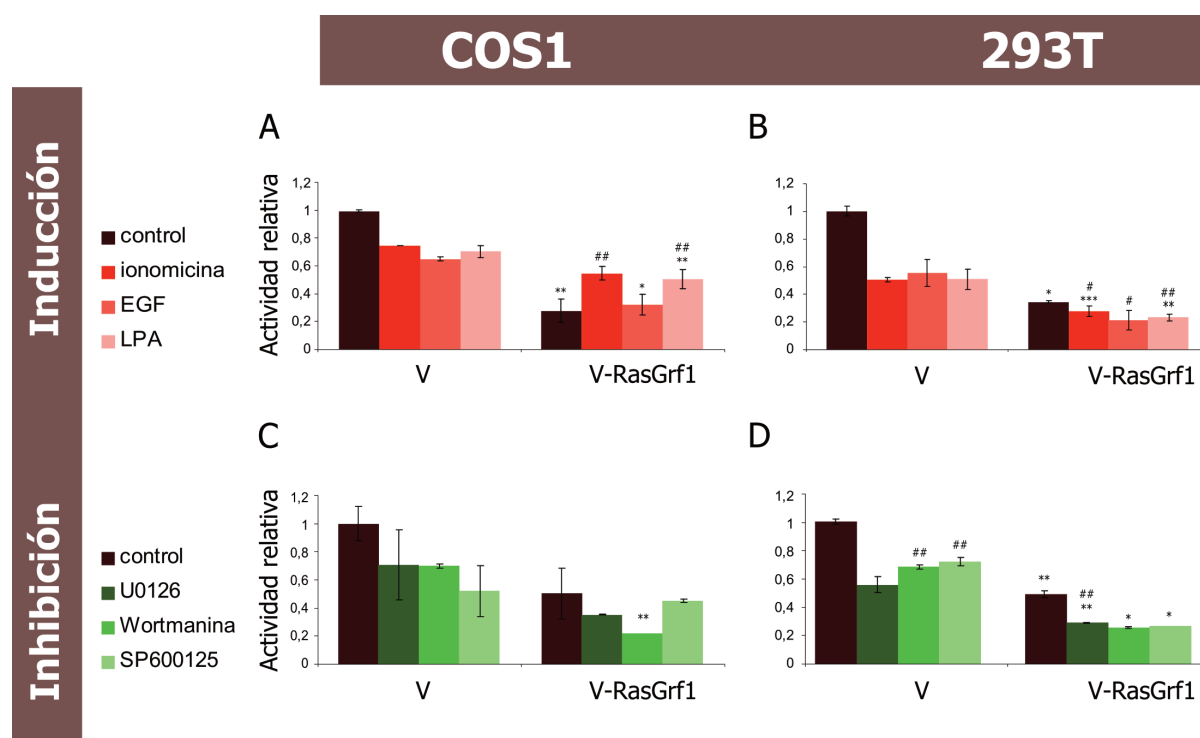


Fig 15. Medida del ensayo de luciferasa realizado con el promotor de Pttg1 en células COS1 y 293T. Todas las inducciones e inhibiciones fueron de 7h en células transfectadas 48h antes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ respecto al mismo estímulo sin sobreexpresión de RasGrf1. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ respecto al control con la misma construcción transfectada.

Las células COS1y 293T son líneas celulares que se transfectan fácilmente y por ello han sido muy utilizadas en estudios de señalización. Sin embargo la ausencia de expresión de RasGrf1 endógeno no hace que éstas sean el modelo ideal para estudiar el papel de este GEF. Por ello, quisimos ver, en la línea BTC3, de insulinoma de ratón, dónde sí hay expresión endógena de RasGrf1, qué efecto tiene la sobreexpresión de RasGrf1. En este ensayo hubo menos sorpresas, a pesar de que los inductores no aumentaron la actividad del promotor, la sobreexpresión sí lo hizo en un 30%. De los inhibidores, como cabía esperar, sólo disminuyó la actividad del promotor el U0126, tanto en las células con RasGrf1 endógeno como sobreexpresado.

Finalmente, quisimos ver el efecto al estimular con NGF sobre la actividad del promotor en los clones, el compuesto empleado en los ensayos de WB. Nos interesa este y no otro por su especificidad a la hora de activar el receptor TrkA y éste a RasGrf1. En los clones sin estimular encontramos diferencias significativas entre shControl y shRasGrf1, en el que la disminución de la actividad del promotor es de un 75%. Sorprendentemente no vemos una mayor actividad del promotor en el clon estable sobreexpresando RasGrf1, aunque al estimular con NGF durante 7h el aumento es espectacular, de un 90% aproximadamente. Tampoco vimos una mayor activación del promotor en el ensayo de inhibición con clones transientes, aunque la transfección no funcionó tan bien como en las otras tres líneas celulares.

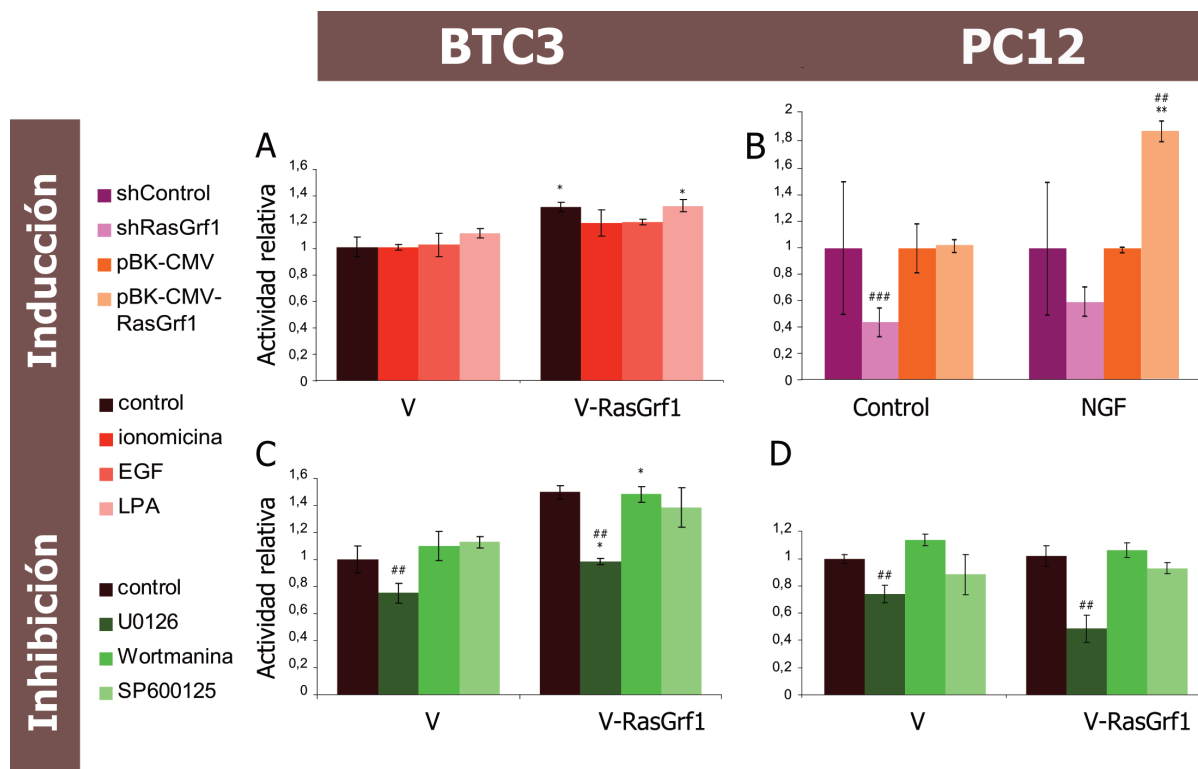


Fig 16. Medida del ensayo de luciferasa realizado con el promotor de Pttg1 En células BTC3 y PC12. Todas las inducciones e inhibiciones fueron de 7h en células transfectadas 48h antes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ respecto al mismo estímulo sin sobreexpresión de RasGrf1. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ respecto al control con la misma construcción transfectada.

Nuestros resultados sugieren que la ruta de señalización de ERK tiene un papel en el control de la actividad del promotor de Pttg1 en todas las líneas analizadas. Este control parece depender de la activación de Ras por RasGrf1 en las células de insulinoma o PC12, donde RasGrf1 se expresa de manera endógena, pero no en otras líneas celulares, en las cuáles otro GEF debe ser el responsable de este control vía Ras. El efecto de la actividad de MEK en la regulación del promotor de Pttg1 podría desempeñar un papel importante en aquellos tumores donde se observe una pérdida de regulación de la expresión de Pttg1 [316].

II. Estudio del comportamiento espacial en ratones $RasGrf1^{-/-}$, $Pttg1^{-/-}$ y $RasGrf1^{-/-} Pttg1^{-/-}$.

Uno de los principales objetivos de esta tesis ha sido determinar si los ratones $Pttg1$ KO tienen afectado el funcionamiento del hipocampo, donde esta proteína se expresa de manera abundante, según los datos de hibridación in situ del Allen Institute for Brain Science (brain-map.org), y en caso de observar un fenotipo, si este se agrava o no en los ratones dobles KO $RasGrf1$ - $Pttg1$. También queríamos comprobar si nuestra línea de ratones $RasGrf1$ KO tenía la memoria espacial afectada, como en el trabajo de Giese y col. [114], o, en cambio, no tenía este problema, como en el de Brambilla y col. [113]. Previamente, estudiamos en cortes histológicos de hipocampo teñidos con hematoxilina/eosina, la estructura del hipocampo de los ratones $Pttg1$ KO y los dobles KO a diferentes edades, y vimos que era normal, como la de los $RasGrf1$ KO [354].

En este capítulo analizamos la memoria espacial de los tres genotipos mencionados mediante el laberinto circular de Barnes. Es una tarea de aprendizaje y memoria visuoespacial diseñada para ratas y posteriormente adaptada a ratones [380, 381]. Se ha demostrado que este laberinto es válido para reconocer problemas en la función del hipocampo [382] y ofrece algunas ventajas con respecto a otros laberintos. No se necesita privar a los animales de alimento, no afectan a su realización pequeños problemas motores que en otros laberintos se magnificarían y es menos estresante para los ratones que el laberinto de agua de Morris [383]. Además, hemos optado por un protocolo que permite determinar en la misma sesión aspectos relacionados tanto con la memoria de referencia, es decir, el aprendizaje de la tarea, como con la de ejecución, relacionada con la realización eficaz de la tarea [309].

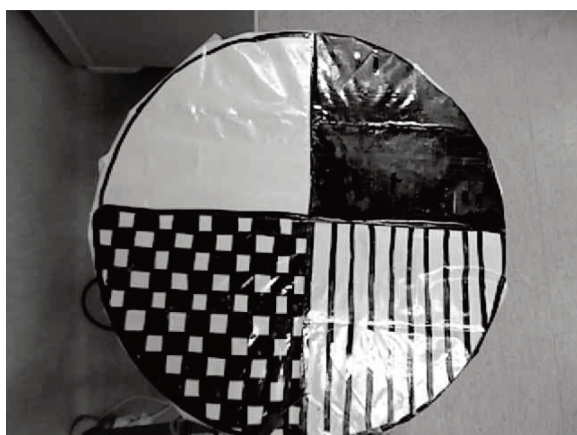
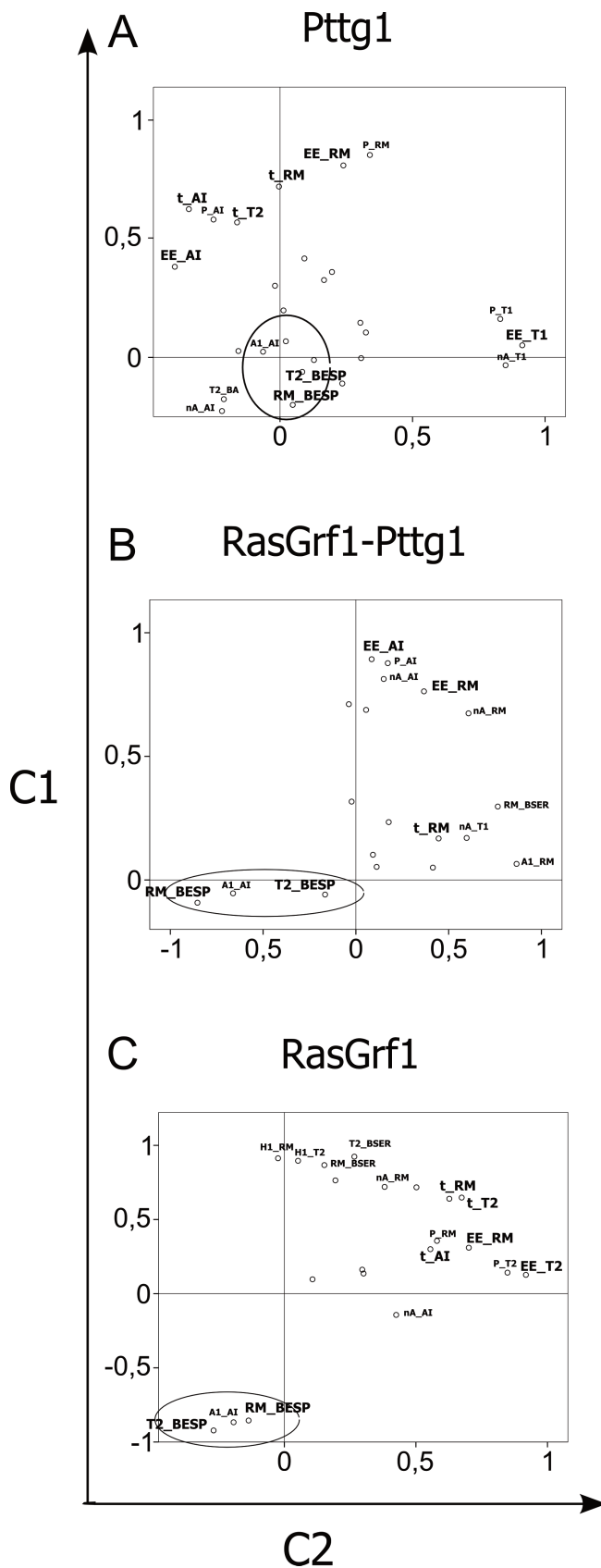


Fig 17. Mantel con cuatro cuadrantes bien diferenciados para analizar la capacidad visual.

Para asegurarnos de que los ratones no tenían problemas visuales que les impidieran orientarse por las pistas del entorno del laberinto, realizamos un sencillo experimento de discriminación visual. Sabemos que los ratones salvajes son animales nocturnos que huyen de

la claridad para no ser descubiertos por sus cazadores, no tienen la vista demasiado desarrollada pero sí lo suficiente como para distinguir alteraciones del terreno y fuertes contrastes, como blanco y negro. Valiéndonos de estas premisas, preparamos un mantel con



cuatro cuadrantes bien diferenciados que colocamos encima de la mesa del laberinto. Encendimos el foco a 3000 lux sobre ella y dejamos al ratón moverse libremente por la mesa durante 5'.

Todos los ratones mostraron preferencia por el cuadrante negro y el de cuadrados negros y blancos, por ser los más oscuros. Al explorar por primera vez un cuadrante, todos ellos dudaron, probaron con una pata, despacio, y sólo al comprobar que era seguro pasaban. Hay que resaltar que al cabo de un par de vueltas todos se habituaban a la mesa e iban sin miedo de un cuadrante a otro. No se observaron diferencias entre las distintas líneas de ratones empleados, lo que nos validó el empleo del laberinto de Barnes para los estudios de memoria.

1. Análisis del Componente Principal

El Análisis del Componente Principal (PCA) fue realizado con rotación ortogonal (varimax), de los tres genotipos estudiados. Los diagramas con la puntuación ilustran las variables que se incluyeron en el análisis del laberinto de Barnes. Las variables más alejadas del origen son más importantes para ver diferencias entre grupos.

Fig 18. Análisis del Componente Principal. C1, componente 1. C2, componente 2. Variables: t, tiempo total; EE, errores de ejecución; BESP, búsqueda espacial; p, perseverancias; nA, número de agujeros explorados. Periodos: T1, cuatro primeros días de aprendizaje; T2, cuatro últimos días de aprendizaje; RM, retención de memoria; AI, aprendizaje inverso.

Esta representación nos permite comprobar que los diagramas de RasGrf1 (C) y de RasGrf1-Pttg1 (B) son muy parecidos, con casi todas las variantes en el cuadrante doble positivo, y sólo tres variables, las mismas, en el doble negativo. En cambio, en el diagrama de Pttg1 (A) las variables se encuentran más dispersas, influenciadas unas por otras de manera diferente que en los otros dos genotipos. Las variables rodeadas indican un comportamiento similar de los genotipos RasGrf1 KO y RasGrf1-Pttg1 KO respecto a sus controles WT ya que se localizan en el mismo cuadrante, mientras que estas mismas variables en el análisis de los ratones Pttg1 se encuentran en cuadrantes diferentes.

Gracias a este análisis de las variables, podemos distinguir cuales son las que más aportan al fenotipo. Las más alejadas del punto de intersección de los orígenes de ambos ejes son similares en los tres genotipos, aunque se encuentren en cuadrantes diferentes. Hemos elegido tres para analizar en profundidad: el tiempo total necesario para realizar la tarea, el número de errores de ejecución cometidos y el porcentaje de tiempo empleado en la estrategia de búsqueda espacial, la más eficaz.

2. Tiempo total

El tiempo total empleado para completar la tarea nos proporciona información del nivel de aprendizaje de la misma y su calidad. El tiempo máximo es de 300 segundos, tras el cual el ratón es conducido por la experimentadora al agujero de escape y se le ayuda a entrar en el mismo si éste no quiere. En ocasiones el ratón se dirige rápidamente al agujero correcto pero no entra hasta que realiza una vuelta completa al laberinto o hasta que intenta entrar varias veces. Esto nos dice que, o bien no recuerda si era exactamente ese agujero, o bien no recuerda si es suficientemente seguro, ya que los ratones no llegan a tocar el fondo con las patas delanteras hasta que las traseras dejan de estar en contacto con la superficie. Para intentar que desconfíen lo menos posible, en cuanto entran en el túnel se apaga la luz y el ruido banco y se les deja 30 segundos de habituación en cada sesión.

No encontramos diferencias significativas entre los WT y KO machos y hembras de RasGrf1 en el tiempo total empleado para finalizar la tarea en ningún periodo. Los 4 grupos estudiados para este genotipo aprendieron a realizar la prueba ya que sí hay diferencias significativas entre los periodos para algunos grupos: WT machos $\chi^2(3)=0,266$, $p<0,05$; WT hembras $\chi^2(3)=0,013$, $p<0,05$; KO machos $\chi^2(3)=0,001$, $p<0,05$; KO hembras $\chi^2(3)=0,007$, $p<0,05$. El test de Wilcoxon, usado como prueba *post hoc*, no muestra diferencias significativas pero sí la mejora considerable de las hembras WT y de los machos KO de T1 a T2 y de los dos grupos WT y los machos KO de T1 a MR.

Este resultado encaja perfectamente con el trabajo de Raffaele d'Isa y col. [384] recientemente publicado, en el que, después de diez años de controversia, finalmente llegan a

la conclusión de que los ratones RasGrf1 KO no tienen problemas de memoria espacial, sino de condicionamiento de miedo contextual. En el estudio se usó la línea de ratón GENA53, en la que se anula la expresión de RasGrf1 mediante mutagénesis química, que provoca una sola mutación non-sense en el locus, sin necesidad de insertar un casete de resistencia a la neomicina. Según argumentan, esta inserción podría haber provocado alteraciones genómicas que explicarían las diferencias fenotípicas encontradas entre la línea de ratón RasGrf1 de Giese y col. [114] y la de Brambilla y col. [113].

No existen diferencias significativas entre los ratones WT y KO de RasGrf1-Pttg1 al comparar los grupos entre sí para cada periodo pero sí al comparar los periodos para cada grupo. WT machos $\chi^2(3)=0,030$, $p<0,05$; WT hembras $\chi^2(3)=0,000$, $p<0,05$; KO machos $\chi^2(3)=0,006$, $p<0,05$; KO hembras $\chi^2(3)=0,011$, $p<0,05$. En la prueba post hoc vemos que sólo el grupo de las hembras WT es significativo de T1 a T2, de T1 a MR y de MR a RL, de T2 a MR no lo es pero tiende, apuntando a que ha consolidado mejor lo aprendido que el resto de grupos.

El tiempo total empleado por los ratones Pttg1 presenta diferencias significativas tanto entre los periodos para cada grupo como entre los grupos en un mismo periodo. Entre los periodos para cada grupo la ANOVA de Friedman nos da una significación para cada grupo: WT machos $\chi^2(3)=0,000$, $p<0,05$; WT hembras $\chi^2(3)=0,000$, $p<0,05$; KO machos $\chi^2(3)=0,002$, $p<0,05$; KO hembras $\chi^2(3)=0,001$, $p<0,05$. Comprobamos mediante el test post hoc que todos los grupos mejoraron su tiempo significativamente de T1 a T2 pero ninguno de T2 a MR, de MR a RL sólo los machos WT aumentaron su tiempo en el laberinto significativamente. Entre los grupos para cada periodo el test estadístico Kruskal-Wallis nos da diferencias significativas entre los grupos en T2 ($p<0,05$). Mediante la prueba post hoc vemos que hay diferencias significativas entre las hembras en T2 y tienden a serlo en MR. También tienden a la diferencia significativa los machos WT y KO en T1.

3. Errores de ejecución

Los errores de ejecución contabilizan el número de veces que el ratón pasa por agujeros ya visitados, al menos una vez. Cuantos más errores cometan los animales, mayor será el tiempo total transcurrido y peor será su estrategia de búsqueda. Eso es exactamente lo que nos están diciendo los diagramas representativos del PCA de los ratones RasGrf1 y RasGrf1-Pttg1: las variables que representan a los errores de ejecución y tiempo total en los diferentes periodos se encuentran en el cuadrante doble positivo, mientras que las de búsqueda espacial están en el doble negativo. En cambio en el de Pttg1 está todo mucho más difuso ya que los grupos analizados no se han comportado de la misma manera.

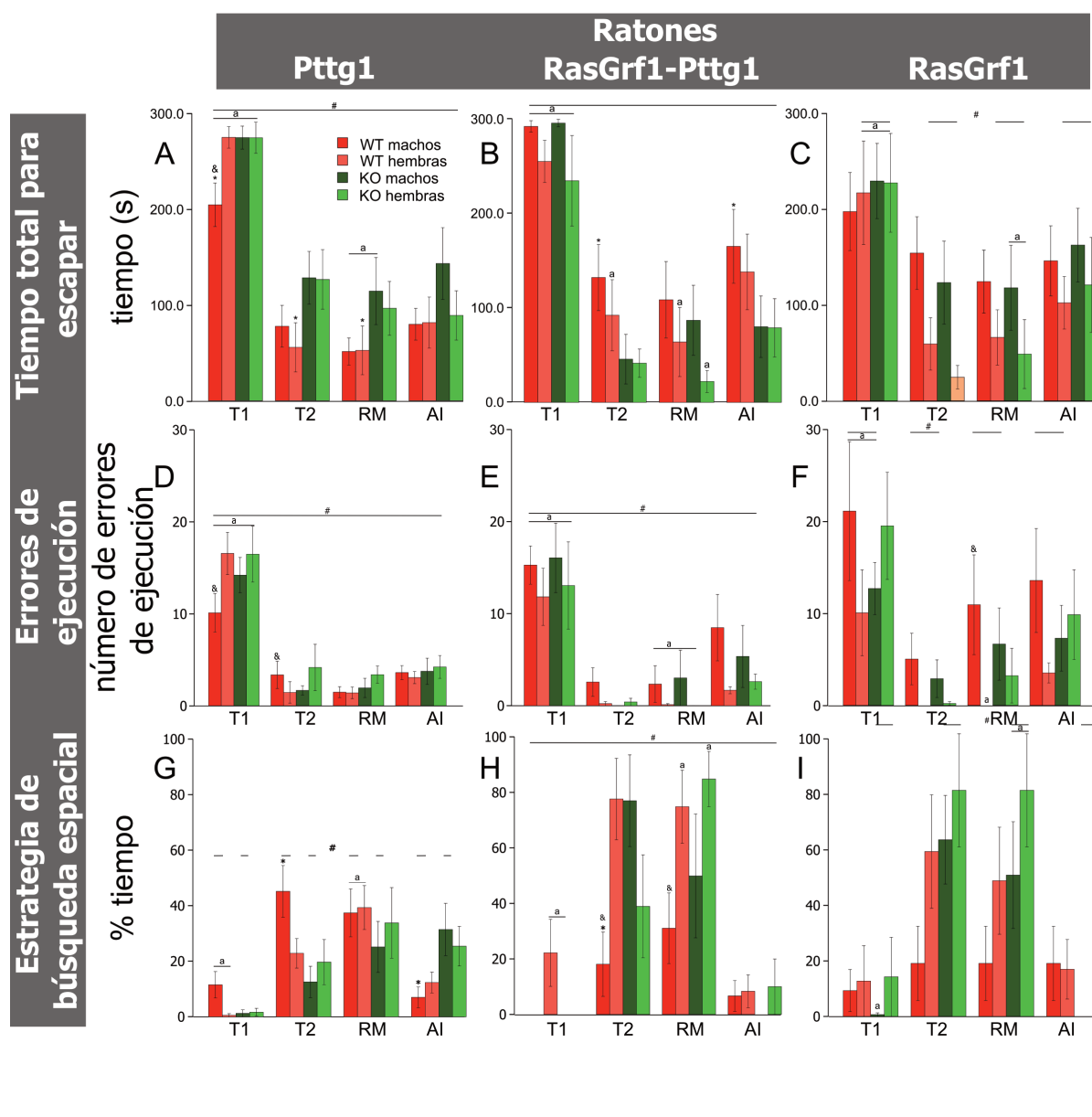


Fig 19. Gráficas de barras de las medias obtenidas para diferentes variables medidas durante las sesiones del laberinto de Barnes. Los ratones de los tres genotipos estudiamos, KO y controles, realizaron una sesión por día en el laberinto de Barnes. Los datos representan la media de las medianas de bloques de 4 días de varios índices del laberinto. T1: primeros 4 días de entrenamiento (D1-D4). T2: 4 últimos días de entrenamiento (D19-D22). RM: los 4 días siguientes al descanso de 12 días. AI: 4 días realizando la prueba con el laberinto girado 180°. #, indica un efecto general, independiente del genotipo ($p < 0,05$); a, indica una diferencia significativa, independiente del genotipo, comparada con el siguiente periodo; *, indica una diferencia significativa comparada con los ratones KO del mismo sexo ($p < 0,0125$); &, indica una diferencia significativa entre ratones del mismo genotipo y sexo contrario ($p < 0,0125$).

No hay diferencias significativas en la prueba de Kruskal-Wallis para ningún periodo en ningún fenotipo, lo cual quiere decir que no hubo ningún grupo que tuviese dificultades extremas en aprender a realizar la tarea ni ninguno que la realizase mucho mejor que el resto. Lo que sí encontramos es variabilidad, fijándonos en las barras de error. Dentro de un mismo grupo, la calidad de la ejecución podía variar bastante.

En cambio sí las encontramos diferencias en la prueba de medidas repetidas de Friedman, que representa la mejora o empeoramiento de la realización de la tarea al encontrar cambios significativos entre periodos para un mismo grupo.

Rechazamos la hipótesis nula para los ratones RasGrf1 machos WT $\chi^2(3)=0.03$, $p<0,05$) y KO ($\chi^2(3)=0,026$, $p<0,05$ y para las hembras WT $\chi^2(3)=0,005$, $p<0,05$, pero no para las hembras KO ($\chi^2(3)=0,053$, $p>0,05$). Los ratones Pttg1 muestran diferencias significativas en los cuatro grupos: machos WT $\chi^2(3)=0,001$, $p<0,05$ y KO $\chi^2(3)=0,002$, $p<0,05$ y para las hembras WT ($\chi^2(3)=0.000$, $p<0,05$ y KO $\chi^2(3)=0,007$, $p<0,05$. En el post hoc comprobamos que existe una tendencia entre los periodos de T1 a T2 pero no en el resto. Para los ratones doble KO RasGrf1-Pttg1 también rechazamos la hipótesis nula para todos los grupos WT machos $\chi^2(3)=0,000$, $p<0,05$; WT hembras $\chi^2(3)=0,000$, $p<0,05$; KO machos $\chi^2(3)=0,001$, $p<0,05$; KO hembras $\chi^2(3)=0,008$, $p<0,05$ pero en el post hoc comprobamos que además de la tendencia entre T1 a T2, indicando mejora por el descenso del número de errores, también la vemos entre MR a RL, mostrando un empeoramiento, especialmente en los dos grupos de machos.

4. Estrategia de búsqueda espacial

Esta estrategia de búsqueda del agujero de salida en el laberinto de Barnes es la más eficaz, ya que consiste en llegar al agujero de salida directamente, sin investigar más de dos agujeros falsos, al recordar su localización gracias a las pistas del entorno. Analizando el porcentaje de tiempo que los ratones han utilizado esta estrategia y en qué periodos, podemos sacar conclusiones más concretas sobre el aprendizaje de esta tarea. La estrategia menos eficaz es la de buscar al azar, así que los resultados obtenidos en esta variable en todos los genotipos son lógicos, la usan durante el primer periodo y en los siguientes vemos que han aprendido que la seriada, pese a no ser la mejor, es la más fácil.

Los datos de los ratones RasGrf1 muestran diferencias significativas en los grupos de KO de ambos sexos en el análisis de medidas repetidas de Friedman: machos $\chi^2(3)=0,002$, $p<0,05$ y hembras $\chi^2(3)=0.008$, $p<0,05$. El análisis post hoc muestra una tendencia de los dos grupos de KO entre los periodos de T1 a T2 y de MR a RL.

Para los ratones Pttg1 no encontramos significación entre grupos para cada periodo, pero en T2 nos acercamos mucho con $0,055$ $p>00,05$. Al analizar con el test de Mann-Whitney

como post hoc para investigar qué comparación o comparaciones estaban cerca de la diferencia significativa en T2 vemos que entre los machos WT y KO hay una tendencia muy marcada $U=23.5$, $r=-0.51$; 0.013 $p>0.0125$. Resulta llamativo que este genotipo sea el único en el que los machos WT utilizan más esta estrategia, especialmente en T2, que cualquiera de los otros tres grupos. Este resultado aporta pruebas, desde una perspectiva más, que apuntan a problemas en el aprendizaje de esta tarea en los ratones Pttg1 KO. Un dato interesante de este genotipo es el resultado obtenido en esta variable en el periodo AI, en el que el agujero de escape se sitúa exactamente al otro lado de la mesa del laberinto, ya que rotamos ésta 180° . Los ratones KO de ambos sexos utilizan esta estrategia en un porcentaje parecido al periodo anterior, RM, en cambio, los dos grupos WT apenas la emplean. La explicación no es que tengan una gran plasticidad neuronal y hayan entendido a la primera que el agujero se encuentra al otro lado, que es para lo que sirve el análisis de este periodo, sino que nunca aprendieron demasiado bien donde estaba el agujero de escape e iban indistintamente a un lado o al otro del laberinto. Sacamos esta conclusión gracias al análisis otra gráfica, la que representa la distancia al primer agujero explorado (material suplementario). Nos dice que el único grupo que consiguió aprender donde estaba el agujero de escape simplemente mirando las pistas e intentaba ir a por él desde el inicio de la sesión era el de los machos WT.

Los ratones doble KO mostraron diferencias significativas entre periodos para todos los grupos: WT machos $\chi^2(3)=0.029$, $p<0,05$; WT hembras $\chi^2(3)=0.002$, $p<0,05$; KO machos $\chi^2(3)=0,007$, $p<0,05$; KO hembras $\chi^2(3)=0,016$, $p<0,05$. Aunque sólo hay un grupo significativo para el análisis post hoc, hembras WT entre RM y AI, hay tendencia para las KO de ese mismo periodo y entre T1 a T2 para las hembras WT y los machos KO. Entre grupos sólo hayamos significación para el periodo T2: $H(3)=9,024$, $p<0,05$, y al realizar el análisis post hoc vemos que el grupo de machos WT, al compararse con el resto de grupos por separado, no muestra diferencias significativas pero sí muy marcadas.

Se sabe que en la modulación de la actividad NMDA ejercida por la insulina está involucrada la fosforilación de las subunidades NR2A y NR2B [385]. Hace un par de años, se publicó un trabajo sobre la importancia de la insulina en el aprendizaje espacial [386]. Los ratones Pttg1 KO machos a los tres meses de edad, en ayunas, tienen los niveles de insulina reducidos a la mitad [122]. Esta diferencia con las hembras, que además muestran una mayor sensibilidad a la insulina, puede ser una razón para que, al realizar una PCA de los grupos del mismo sexo y diferente genotipo, los grupos de machos salgan en diferentes cuadrantes y los de hembras no (datos no mostrados). De todas formas, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas ni tendencias importantes entre los grupos KO machos y hembras así que no creemos que ese sea el motivo de un peor comportamiento espacial, sino que los machos WT realmente hicieron un buen trabajo y entre los dos grupos de hembras hubo diferencias, pero no tan notables como entre los machos. Los ratones RasGrf1-Pttg1 KO mostraron un comportamiento espacial similar al de los

RasGrf1: en los dos genotipos las hembras aprendieron y realizaron mejor la tarea, especialmente las RasGrf1 KO, y en ambos genotipos los grupos KO en general aprendieron y realizaron la tarea en el laberinto de igual manera, en ocasiones mejor, que los WT. El predominio de las características de los ratones RasGrf1 KO en el fenotipo de comportamiento espacial de los ratones RasGrf1-Pttg1 KO debe guardar alguna relación con la función de estas proteínas en desarrollo y en plasticidad sináptica. Pensamos que una razón probable es que los cambios en el transcriptoma provocados por la delección de RasGrf1 predominen, en el hipocampo, a los cambios producidos por la de Pttg1.

En conclusión, los ratones Pttg1 KO muestran un comportamiento espacial alterado, por lo que una o más funciones del hipocampo podrían estar comprometidas. La falta de Pttg1 podría estar causando un desarrollo defectuoso de este órgano. Otra hipótesis es que se vea afectada alguna de sus funciones no canónicas por su ausencia, poco conocidas actualmente, y esto provocara defectos en la plasticidad sináptica necesaria para crear la memoria espacial necesaria.

III. Estudio del papel de RasGrf1 y Pttg1 en el control de ganancia de masa corporal y homeostasis de la glucosa

Para completar los aspectos más interesantes para nosotros de la caracterización fenotípica de los ratones RasGrf1^{-/-}-Pttg1^{-/-}, decidimos realizar un seguimiento de la evolución de su peso y el estado de sus islotes de Langerhans, en especial del fenotipo de las células β , encargadas de producir insulina. Sabemos que tanto los ratones RasGrf1 [34] como los Pttg1 [122] simples KO machos, tienen un número y un tamaño significativamente menor de islotes pancreáticos. Las hembras de los ratones Pttg1 también experimentan este fenotipo pero gracias a los estrógenos la reducida cantidad de insulina que son capaces de liberar al torrente sanguíneo es suficiente para metabolizar la glucosa en sangre, aunque el fenotipo se agrava con la edad [122].

1. Análisis de la ganancia de masa corporal.

Se ha descrito en la mayoría de las líneas de ratones RasGrf1 KO, en los machos, un menor tamaño corporal [34, 35, 114, 121] y en la línea en la cual lo sobreexpresan, un aumento del mismo con respecto a los ratones macho control [119]. Estos datos confirman que RasGrf1 es importante para el desarrollo corporal postnatal [384]. En los ratones machos Pttg1 KO a partir de los 5 meses se observan diferencias importantes en el peso respecto a los ratones control, aunque en las hembras no se observa este fenotipo [122]. Un dato interesante es que los ratones RasGrf1 KO ven disminuida la cantidad de IGF-1 (factor de crecimiento insulínico-1) [34, 35, 114] y la expresión de Pttg1 depende de la ruta de señalización IGF-1/PI3K/Akt en células de cáncer de mama y astrocitos malignos [156, 157]. La ruta de señalización de IGF-1 contribuye, además de al crecimiento en la pubertad [387], a la masa de células β , ya que se ha visto que los ratones con una expresión aumentada de este factor de crecimiento desarrollan hiperplasia específicamente en las estas células del páncreas [388].

a. Animales no destetados.

Durante los primeros 23 días de vida, las crías convivieron en la caja de sus padres. De esta manera se alimentaron primero con la leche materna hasta que fueron capaces de alimentarse por sí mismos con la comida de las cajas (ver materiales y métodos). Se han pesado 23 animales de cada grupo para realizar este experimento, aunque la n varía cada día, ya que no obtuvimos a todos los ratones a la vez ni tampoco ha sido posible pesarlos a todos cada día.

Los ratones Pttg1 nos sorprendieron al no mostrar diferencias entre los WT y los KO durante este periodo. Al comparar los WT de Pttg1 con los WT de RasGrf1 vimos que había diferencias significativas en el resultado del test estadístico t independiente a pesar de

tener el mismo fondo genético. Suponemos que el azar al escoger las camadas o circunstancias particulares de los cruces de ratones para generarlas, como un amamantamiento poco nutritivo, hayan podido ser los responsables de estos datos.

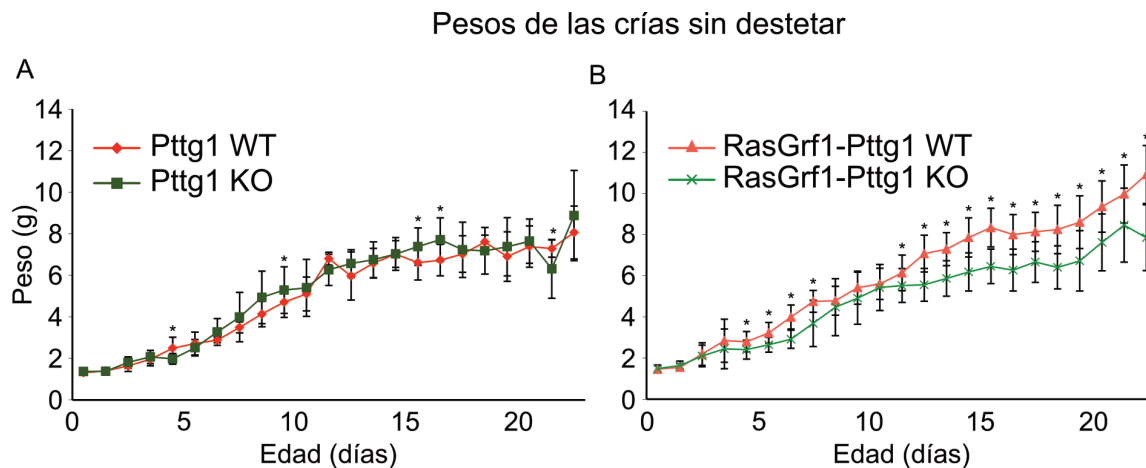


Fig 20. Gráficas representativas de la media de la evolución de los pesos de las crías durante la lactancia. **A.** Datos de las crías Pttg1. **B.** Datos de las crías RasGrf1-Pttg1. Las barras de error representan \pm DE. *, $p < 0,05$.

Los ratones RasGrf1-Pttg1 sí muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos, especialmente a partir del día 13 de vida, donde vemos cómo los WT empiezan a coger peso de manera sostenida mientras que la evolución de la ganancia de peso en los dobles KO es más lenta. Los grupos de Pttg1 KO y RasGrf1-Pttg1 KO apenas muestran diferencias entre los días 12 y 19 de vida, entre los cuales parece que Pttg1 KO gane más peso, aunque en los últimos días antes del destete se igualen los datos. Podemos afirmar que las crías de los ratones RasGrf1-Pttg1 KO mantienen el mismo fenotipo de ganancia de peso durante el amamantamiento que las crías de Pttg1 KO, mientras que las crías control ganan peso de manera constante durante toda la etapa de lactancia.

b. Animales destetados

- De 23 a 65 días:

Entre los días 21 y 24 se desteta a los ratones, separándoles, por sexo y genotipo, en grupos de 2 a 6 ratones por caja.

Las diferencias significativas para los ratones machos Pttg1 (Fig. A) comienzan a partir del día 25. Los ratones WT ganan peso con mayor rapidez entre los días 26 y 36, luego siguen ganando peso hasta el día 65, pero a un ritmo menor. En cambio los KO cogen peso pero

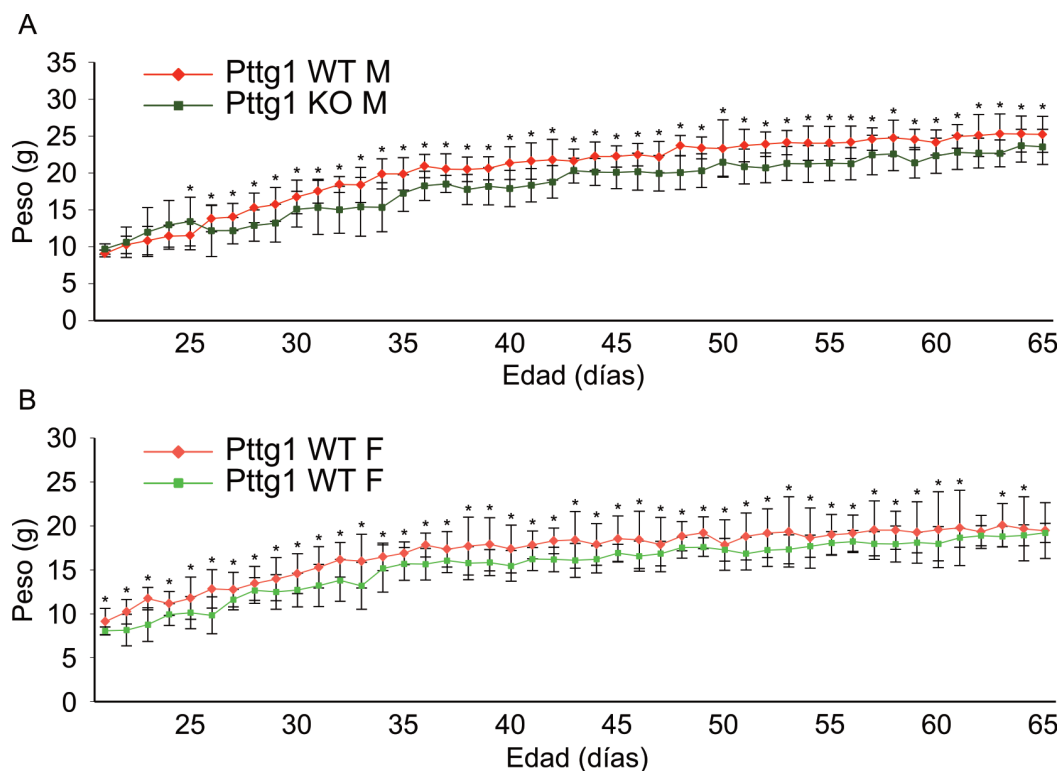


Fig 21. Gráficas representativas de los pesos de ratones Pttg1 WT y KO. **A.** Datos referentes a los machos Pttg1 WT y KO. **B.** Datos referentes a las hembras de estos genotipos. *, $p < 0,05$ en el test estadístico t-student. Las barras de error representan \pm DE.

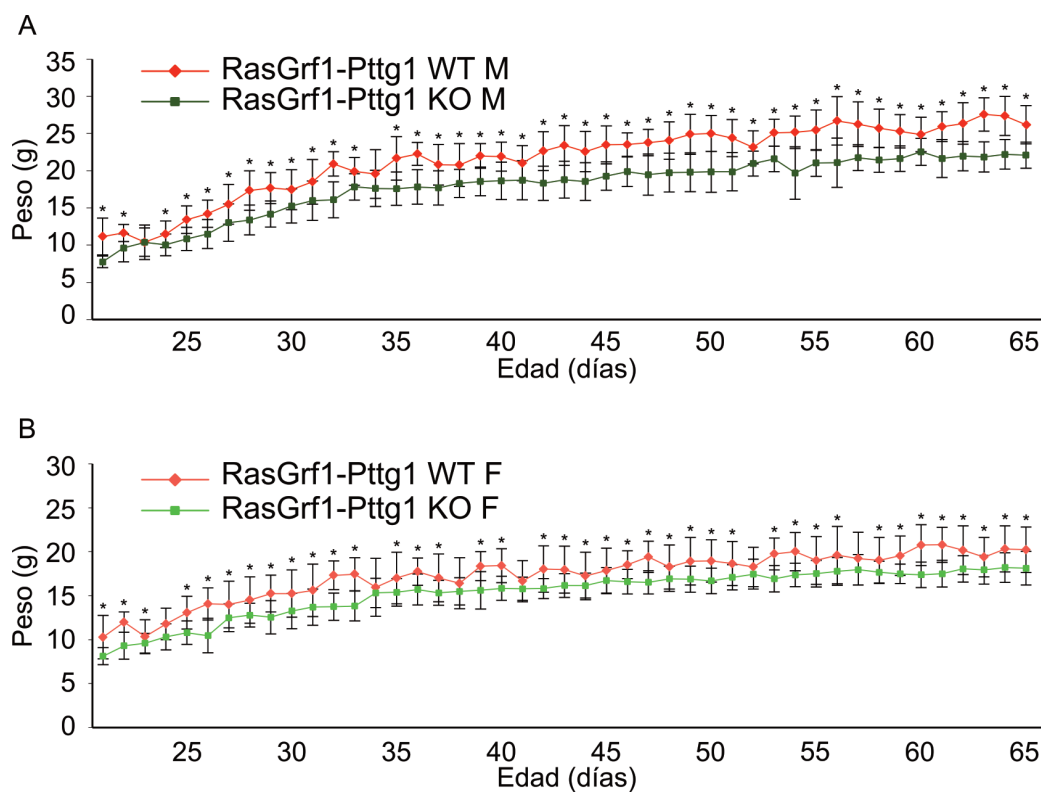


Fig 22. Gráficas representativas de los pesos de ratones RasGrf1-Pttg1 WT y KO. **A.** Datos referentes a los machos RasGrf1-Pttg1 WT y KO. **B.** Datos referentes a las hembras de estos genotipos. *, $p < 0,05$ en el test estadístico t-student. Las barras de error representan \pm DE.

siempre de manera sostenida, sin ningún periodo con cambios más acusados. Efectivamente al comparar los resultados con los datos publicados para los ratones Pttg1 KO machos a los dos meses de edad, las diferencias, a pesar de ser significativas, son muy pequeñas [122]. Seguramente la significación en nuestro caso se deba al número de ratones empleado en cada grupo, lo cual permite observar que aunque ligera, esta diferencia es constante.

Las hembras Pttg1 KO también muestran un peso significativamente inferior con respecto a sus controles WT, aunque vemos una reducción de estas diferencias en los días 62 y 65, apuntando a un peso muy similar en la edad adulta. Estos datos confirman la diferencia entre las hembras y los machos Pttg1 KO descritas para este parámetro [122].

Los ratones machos RasGrf1-Pttg1 muestran diferencias cada vez más marcadas con el paso de los días, especialmente del día 42 en adelante. Las hembras doble KO mantienen una diferencia significativa en prácticamente todos los puntos con las WT de entre 1 y 3 gramos, que ni siquiera en los días 64-65 llega a reducir. Con estos datos podemos afirmar que, en esta etapa pre-púber, los ratones RasGrf1-Pttg1 KO, tanto machos como hembras, ven su fenotipo agravado con respecto a los ratones Pttg1 KO simples.

- A los 3 meses de edad

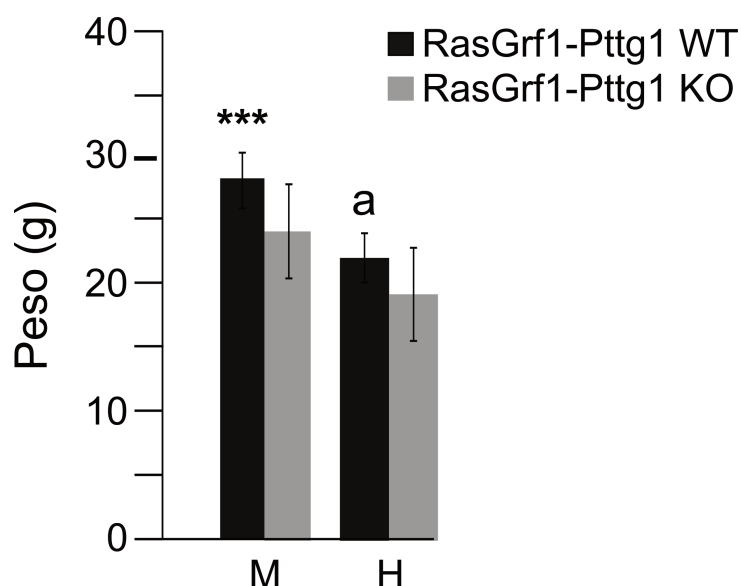


Fig 23. Gráfica de barras representativa de la media de los pesos de los ratones RasGrf1-Pttg1 a los 3 meses. M, machos. H, hembras. Las barras de error representan la \pm DE. ***, $p < 0,001$, respecto a cada uno de los grupos restantes. a, $p < 0,05$ respecto al otro grupo de su mismo sexo.

Los ratones RasGrf1-Pttg1 a los tres meses de edad muestran diferencias significativas en su peso con respecto a su sexo y genotipo $F(3, 38,041)=38,311$, $p < 0,001$, $\omega=0,57$. En la prueba *post hoc* Bonferroni vemos que el grupo de machos WT mantiene diferencias significativas ($p < 0,001$) con el resto de grupos y que entre los dos grupos de hembras también existen diferencias significativas ($p < 0,05$). Con respecto a los machos Pttg1 KO a los tres meses observamos un peso muy similar [122], al igual que al compararlos con los machos RasGrf1 KO de cuatro meses [384].

.-A los 10 meses de edad:

Los ratones Pttg1 a los 10 meses muestran diferencias significativas al realizar una prueba de ANOVA para un factor y medidas independientes $F(3, 15)=13,210$, $p<0,001$, $\omega=0,81$. Con la prueba *post hoc* Bonferroni comprobamos que hay diferencias significativas entre el grupo de machos WT y el resto de grupos.

Encontramos diferencias significativas entre los grupos de ratones RasGrf1-Pttg1 a los 10 meses $F(3, 31)=21,254$, $p<0,001$, $\omega=0,8$. En la prueba *post hoc* Bonferroni comprobamos que el grupo de machos WT mantiene diferencias significativas con todos los grupos y que los grupos de hembras también son significativamente diferentes entre sí, como a los 3 meses de edad.

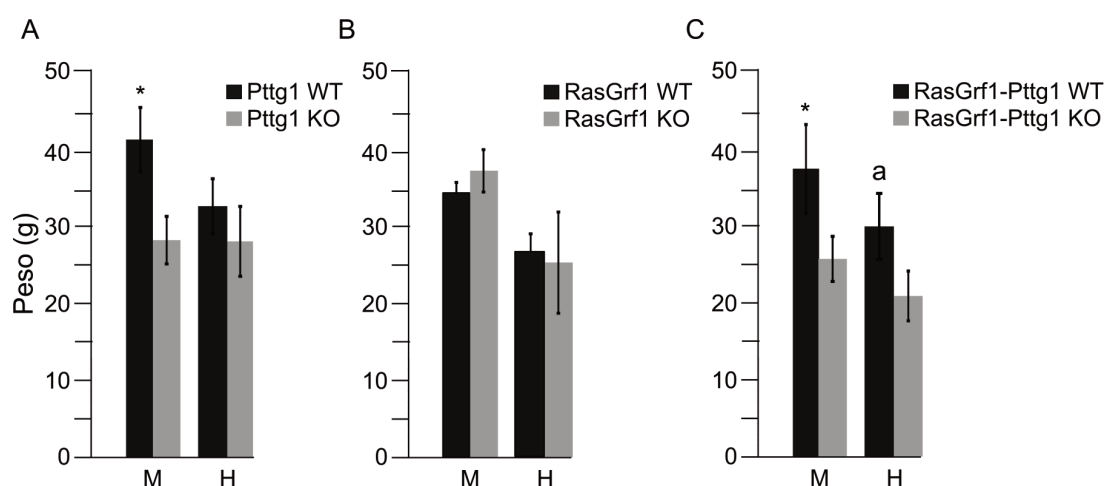


Fig 24. Gráficas de barras representativas de la media de los pesos a los 10 meses de los ratones de los distintos genotipos. **A.** Gráfica de los datos obtenidos de los ratones Pttg1. **B.** Gráfica de los datos obtenidos de los ratones RasGrf1. **C.** Gráfica de los datos obtenidos de los ratones RasGrf1-Pttg1. M, machos. H, hembras. Las barras de error representan \pm DE. *, $p<0,05$, respecto a cada uno de los grupos restantes. a, $p<0,05$ respecto al otro grupo de su mismo sexo.

Los ratones RasGrf1 de nuestro laboratorio han perdido el fenotipo de menor tamaño corporal. Los ratones machos Pttg1 KO a los 10 meses muestran una diferencia de peso con respecto a los control como los datos ya publicados, aunque la media de éstos sea de unos 5 g superior. Efectivamente las hembras no muestran diferencias significativas, confirmando aquello publicado [122]. A pesar de haber perdido el fenotipo del peso reducido en los RasGrf1 KO, los ratones doble KO a los 10 meses muestran un peso ligeramente inferior al de los Pttg1 KO simples, especialmente las hembras.

2. Análisis de la de prueba de tolerancia a la glucosa.

Por último estudiamos la capacidad de secreción de insulina estimulada por glucosa de los islotes de Langerhans. Primero realizamos los experimentos en ratones de 3 meses, la edad a la que se habían realizado los estudios publicados de los ratones RasGrf1 KO [34] y Pttg1 KO [122]. Además, quisimos ir un poco más allá y estudiamos también estos parámetros a los 10 meses de edad, para poder comparar los resultados con los datos publicados para los ratones Pttg1 [122]. Hemos realizado los experimentos en animales de ambos sexos sin tener en cuenta el momento del ciclo menstrual en el que se hallaban las hembras.

a. Prueba de tolerancia a la glucosa (GTT) a los 3 meses de edad en ratones RasGrf1-Pttg1.

.-Niveles de insulina:

No encontramos ningún efecto significativo del genotipo y el sexo de los ratones en los niveles de insulina al realizar ANOVA para muestras independientes de todos los grupos (Fig 25. A).

Al comparar dos medias con la prueba t-student vemos que entre los machos WT y doble KO obtuvimos diferencias significativas a los tiempos indicados:

- t=0: WT (M=1,06, SE=0,36); doble KO (M=0,17, SE=0,06) $p < 0,05$
- t=30: WT (M=0,52, SE=0,09); doble KO (M=0,26, SE=0,06) $p < 0,05$
- t=90: WT (M=0,44, SE=0,08); doble KO (M=0,22, SE=0,05) $p < 0,05$

Realizamos la prueba t-student para las hembras de la misma manera y no obtenemos diferencias significativas entre ellas.

Al comparar estos datos con los resultados publicados para los ratones machos Pttg1 KO de 3 meses de edad, vemos que son muy similares [122]. Si miramos la gráfica publicada por Font de Mora [34] para los ratones RasGrf1, comprobamos que también obtiene significación estadística para el punto 0'. Nuestros resultados muestran que los ratones RasGrf1-Pttg1 KO machos tienen el fenotipo agravado con respecto a los ratones RasGrf1 KO, pero prácticamente idéntico a los ratones Pttg1 KO machos. Las hembras doble KO también ofrecen este fenotipo de liberación reducida de insulina, como las hembras Pttg1 KO, pero no tenemos datos de las hembras RasGrf1 a los 3 meses para comparar los datos con mayor exactitud.

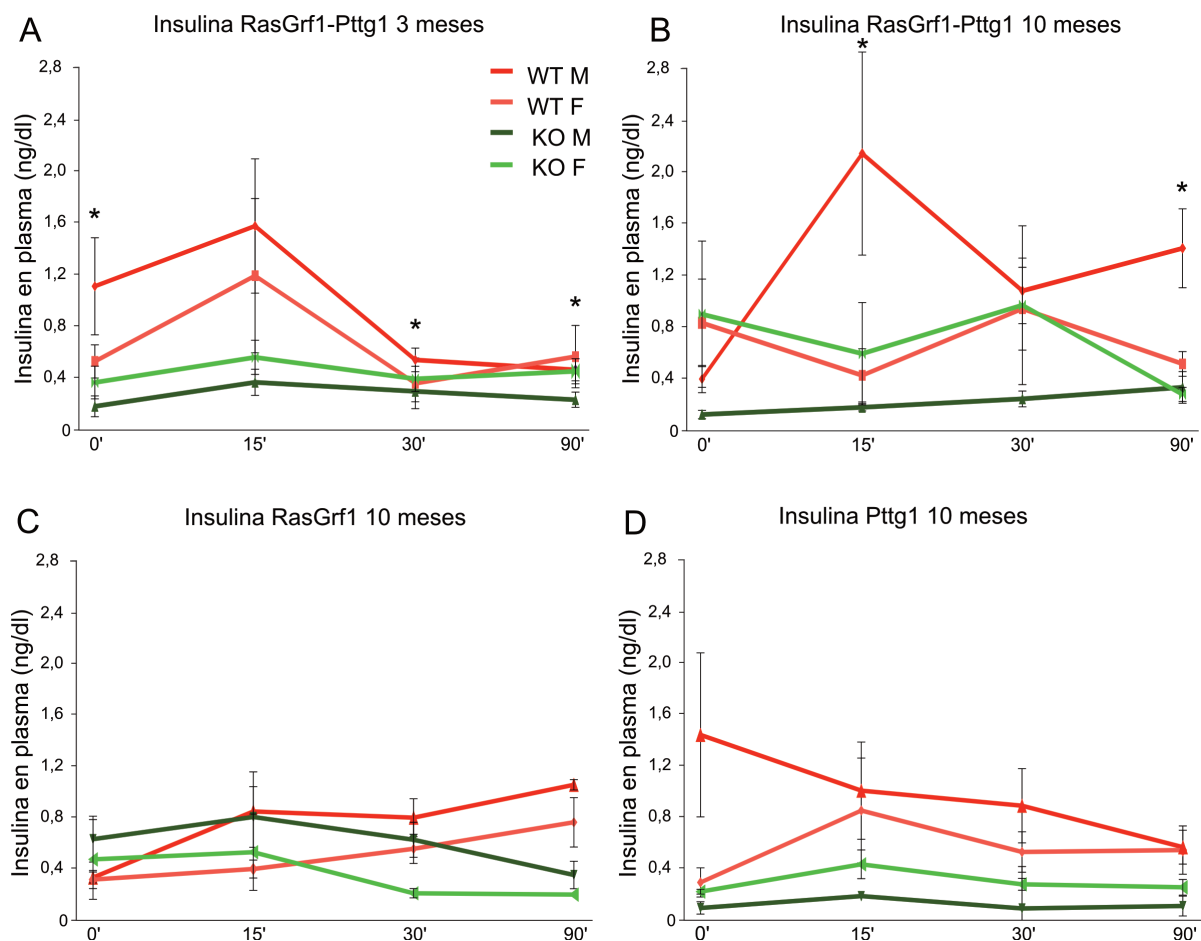


Fig 25. Gráficas representativas de las medias de los niveles de insulina obtenidos durante la prueba de tolerancia a la glucosa. **A.** Datos de los ratones RasGrf1-Pttg1 a los 3 meses. **B.** Datos de los ratones RasGrf1-Pttg1 a los 10 meses. **C.** Datos de los ratones RasGrf1 a los 10 meses. **D.** Datos de los ratones Pttg1 a los 10 meses. Las barras de error representan \pm DE. *, $p < 0,05$, respecto a cada uno de los grupos restantes. a, $p < 0,05$ respecto al otro grupo de su mismo sexo.

.-Niveles de glucosa:

Con la prueba de ANOVA para un factor para muestras independientes encontramos diferencias significativas a $t 30'$ $F(3, 33)=5,224$, $p < 0,01$, $\omega = 0,51$ y $t 90'$ $F(3, 33)=7,602$ $p < 0,01$, $\omega = 0,59$. No encontramos significación estadística en las pruebas *post hoc*. Este parámetro se ve significativamente agravado al comparar los datos con los de Pttg1 KO y RasGrf1 KO a la misma edad. Los valores de glucosa en sangre para los animales RasGrf1 KO no son tan altos, con un máximo de 200 mg/dl los ratones control y 350 los KO, ni aumentan en los periodos de 15 a 30 y de 30 a 90 minutos [34]. Los ratones machos Pttg1 KO no muestran diferencias con respecto a los control a esta edad. Por el contrario, el grupo de hembras doble KO se comportó como los dos grupos control, como esperábamos que ocurriese, al igual que las hembras Pttg1 KO simples [122].

Podemos concluir que en células β pancreáticas de ratón a los tres meses de edad, predomina el fenotipo observado en los ratones Pttg1 KO que el de los RasGrf1 KO.

b Prueba de tolerancia a la glucosa (GTT) a los 10 meses de edad.

.-Niveles de insulina:

- Ratones RasGrf1-Pttg1:

Con la prueba estadística ANOVA encontramos un efecto significativo del genotipo y el sexo de los ratones en los niveles de insulina a los 15 minutos, $F(3, 30) = 4,725$, $p < 0,01$, $\omega = 0,5$, y a los 90 minutos, $F(3, 22) = 9,709$, $p < 0,001$, $\omega = 0,7$.

Con la prueba *post hoc* Gabriel, para tamaños muestrales ligeramente diferentes, vemos que tanto a los 15 como a los 90 minutos es el grupo de machos WT el que se desmarca significativamente de los otros tres grupos.

- Ratones RasGrf1:

Encontramos un efecto significativo del genotipo y el sexo de los ratones en los niveles de insulina a los 30 minutos, $F(3, 20) = 3,292$, $p < 0,05$, $\omega = 0,46$.

- Ratones Pttg1:

No encontramos ningún efecto significativo del genotipo y el sexo de los ratones en los niveles de insulina pero sí observamos una tendencia que podría convertirse en significativa al aumentar el tamaño muestral.

Lo primero que llama la atención de las gráficas de los niveles de insulina a los 10 meses (Fig 25. B, C, D) son las diferencias entre los ratones control. Efectivamente el grupo de machos control de la Fig 25. B, con mayor error que los otros grupos de machos control en las gráficas C y D, muestra valores incluso más altos que a los 3 meses de edad, algo sorprendente cuando sabemos que la edad reduce el número de islotes pancreáticos y, por tanto, la liberación de insulina al torrente sanguíneo. La dificultad intrínseca de la técnica y la alta sensibilidad del kit de detección de insulina pueden ser los responsables de estos errores en la medida. Consideramos que los datos de los animales macho control para RasGrf1 son más fiables por su baja tasa de error y su similitud a los valores de los machos control de Pttg1.

Una vez aclarado esto, podemos fijarnos más concretamente en los grupos de ratones KO. El único grupo de machos que ofrece datos por encima del grupo de hembras es el

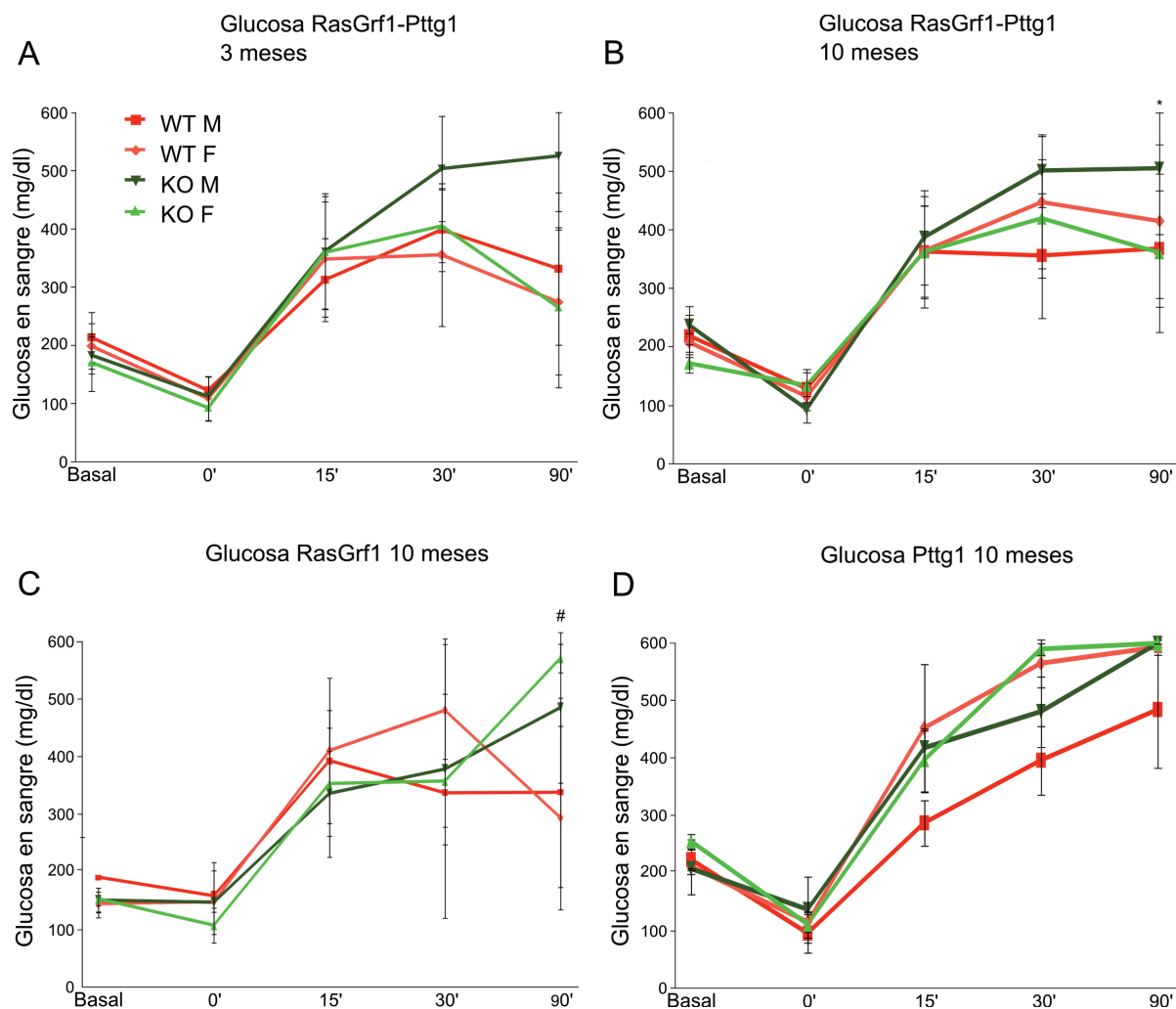


Fig 26. Gráficas representativas de las medias de los niveles de glucosa obtenidos durante la prueba de tolerancia a la glucosa. **A.** Datos de los ratones RasGrf1-Pttg1 a los 3 meses. **B.** Datos de los ratones RasGrf1-Pttg1 a los 10 meses. **C.** Datos de los ratones RasGrf1 a los 10 meses. **D.** Datos de los ratones Pttg1 a los 10 meses. Las barras de error representan \pm DE. *, $p < 0,05$, entre machos. #, $p < 0,05$ entre hembras.

de los RasGrf1 KO. Este grupo de ratones libera una cantidad de insulina muy parecida a los machos control a los 15' y 30' de la inyección intraperitoneal de glucosa, pero a los 90' comienza a disminuir su nivel de insulina en sangre, mientras los control lo aumentan ligeramente. Podemos afirmar que los ratones RasGrf1 KO, tanto machos como hembras, consiguen liberar rápidamente la misma cantidad de insulina que los ratones control, pero su nivel disminuye antes.

Los ratones Pttg1 KO machos de 10 meses apenas consiguen liberar 0,2 ng/ml frente al estímulo, mientras que las hembras del mismo genotipo liberan el doble de cantidad. Los niveles de insulina de los ratones Pttg1 KO se ven gravemente afectados. Los ratones RasGrf1-Pttg1 KO machos presentan el mismo fenotipo que los machos Pttg1 KO, pero

las hembras tienen un patrón muy similar al de las hembras control. Podemos afirmar a la vista de los datos mostrados que, mientras los machos doble KO ven seriamente perjudicada la liberación de insulina independientemente de su edad, predominando el fenotipo por deficiencia en *Pttg1*, las hembras *RasGrf1-Pttg1* KO no ven disminuir sus niveles de insulina en sangre de los 3 a los 10 meses de edad frente a este estímulo.

En conclusión, la ausencia de *RasGrf1* en ratones tanto machos como hembras de 10 meses, no produce una reducción de la cantidad de insulina liberada en un primer momento en la prueba de tolerancia a la glucosa, pero éstos no son capaces de mantener los niveles que observamos en los ratones control a los 90' de iniciar la prueba. Por otra parte, los grupos de machos doble KO y *Pttg1* KO a los 10 meses son incapaces de elevar sus niveles de insulina frente al estímulo, mientras que las hembras sí responden en un primer momento liberando una cantidad de insulina equivalente o un poco menor que la de las control, sin embargo a los 90' sus niveles decaen a los valores encontrados en los machos.

- Niveles de glucosa:

- Ratones *RasGrf1-Pttg1*:

Con la prueba estadística ANOVA encontramos un efecto significativo del genotipo y el sexo de los ratones en los niveles de glucosa en estado basal $F(3, 27)=9,761$, $p<0,001$, $\omega=0,67$; a t 0' $F(3, 31)=5,481$, $p<0,01$, $\omega=0,52$ y a t 30' $F(3, 31)=3,584$, $p<0,05$, $\omega=0,42$.

Con las pruebas *post hoc* Bonferroni y Gabriel comprobamos que en estado basal el grupo de hembras doble KO es significativamente diferente de los grupos de machos WT y doble KO. A tiempo 0' vemos diferencias significativas entre los dos grupos de dobles KO y rozando la significación entre los dos grupos de machos. A t 90' hay diferencias significativas en ambos parámetros entre los dos grupos de machos.

- Ratones *RasGrf1*:

Sólo encontramos diferencias significativas a los 90 minutos $F(3, 16)=3,900$, $p<0,05$, $\omega=0,55$. En la prueba *post hoc* Gabriel vemos que a ese tiempo existen diferencias significativas entre las hembras WT y KO.

- Ratones *Pttg1*:

Encontramos diferencias significativas a nivel basal $F(3, 5,59)=15,422$, $p<0,01$, $\omega=0,43$; a t quince $F(3, 13)=5,263$, $p<0,05$, $\omega=0,65$; a t treinta $F(3, 4,866)=15,733$, $p<0,01$, $\omega=0,86$ y a t noventa $F(3, 12)=4,234$, $p<0,05$, $\omega=0,61$.

Empleando las pruebas *post hoc* Bonferroni y Gabriel, vemos que no hay ningún grupo respecto a otro que nos refleje la diferencia significativa obtenida en la prueba anterior ni en estado basal ni a t noventa. En cambio ambos test nos muestran que a tiempo 15' el grupo de los machos WT es significativamente diferente al de las hembras WT, y con tendencia a serlo con respecto a los dos grupos de ratones KO. A tiempo treinta el grupo de machos WT muestra diferencias significativas en ambos test con los dos grupos de hembras, WT y KO, y el grupo de machos KO es significativamente diferente del de las hembras KO.

Como podemos comprobar al ver la evolución de los datos de los ratones control y hembras RasGrf1-Pttg1 KO de los 3 a los 10 meses (Fig 26. B), el catabolismo de la glucosa se agrava con la edad. Encontramos significación estadística a los 90' entre los grupos de machos. A pesar de que la diferencia entre las medias es mayor a los 3 meses, el error es menor a los 10. Los machos doble KO no empeoran con la edad, es decir, su tasa de glucosa en sangre al realizar esta prueba a los 3 meses es equivalente a la obtenida a los 10 meses. Los tres grupos de hembras control a los 10 meses tienen picos de glucosa más altos que los machos control, indicando un agravamiento del metabolismo glucémico por razón de sexo al envejecer.

Los resultados con los animales KO simples a los 10 meses son mucho más sorprendentes. Los ratones deficientes para RasGrf1, tanto machos como hembras, pese a tener unos niveles de insulina al realizar la prueba superiores a los de los animales deficientes en Pttg1, son incapaces de reducir la cantidad de glucosa sanguínea. Si nos fijamos con más detalle, la evolución de la curva de glucosa de los ratones RasGrf1 KO es perfectamente acorde con la de insulina. Durante la primera media hora siguiente a la inyección de glucosa, los niveles de insulina entre controles y KO son parecidos y los de glucosa también. En cambio, a los 90', observamos la caída de los niveles de insulina y, por lo tanto, los de glucosa se disparan. Llama especialmente la atención el grupo de las hembras RasGrf1 KO, de las que cabría esperar que el estrógeno hiciera su efecto, como se argumenta en el artículo de Wang [122] para explicar por qué el fenotipo de las hembras Pttg1 KO no se ve afectado. El mismo interés despierta los resultados con los ratones Pttg1 KO y las hembras Pttg1 control, que ven aumentados sus niveles de glucosa en sangre a la cifra más alta del glucómetro, 600 mg/dl.

En resumen, podemos confirmar un fenotipo similar, tanto en la liberación de insulina por parte de las células β , como en la homeostasis de la glucosa, entre los tres genotipos estudiados: ratones Pttg1 KO, RasGrf1 KO y RasGrf1-Pttg1 KO. Concluimos que tanto RasGrf1 como Pttg1 están involucrados en expansión y mantenimiento de los islotes de Langerhans, además de tener un papel importante en el catabolismo de la glucosa por la reducción de la liberación de insulina a la sangre.

Conclusiones

- 1.** Clones estables de células PC12 con una menor expresión de la proteína Pttg1 presentan un aumento de la tasa proliferativa, mientras que los clones con menor expresión de RasGrf1 muestran un descenso de la misma. Asimismo, la sobreexpresión estable de RasGrf1 en esta línea celular aumenta su proliferación.
- 2.** Los clones estables de células PC12 con menor expresión tanto de Pttg1 como de RasGrf1 muestran inestabilidad cromosómica.
- 3.** La fosforilación de ERK1/2 a corto plazo en los clones con bajada de expresión estable de RasGrf1 está aumentada, mientras que la fosforilación de Akt, JNK y p38 no varía.
- 4.** La actividad del promotor de Pttg1 está parcialmente regulada por la ruta de señalización intracelular de ERK. En las líneas celulares BTC3 y PC12, donde existe expresión endógena de RasGrf1, la actividad de este promotor se ve afectada de manera diferente que en las líneas COS1 y 293T, carentes de expresión endógena. En la línea BTC3, la sobreexpresión de RasGrf1 influye positivamente en la actividad del promotor de Pttg1, mientras que en las células, para que la sobreexpresión de RasGrf1 induzca la actividad de este promotor, es necesaria la estimulación con NGF.
- 5.** Los ratones deficientes en Pttg1 muestran defectos en aprendizaje y memoria espacial, mientras que la ausencia de RasGrf1 en la línea de ratones generada en nuestro laboratorio no causa este defecto. Los ratones RasGrf1-Pttg1 doble KO no presentan ningún fenotipo, al igual que los KO sencillos para RasGrf1.
- 6.** Los animales RasGrf1-Pttg1 doble KO tienen un peso corporal reducido, como los RasGrf1 KO y los Pttg1 KO a todas las edades analizadas. A los diez meses de edad, los dobles KO tanto machos como hembras manifiestan menor peso que los animales simples KO para Pttg1 a esta edad.
- 7.** A los tres meses de edad, se observa que los ratones machos doble KO para RasGrf1-Pttg1 tienen el mismo fenotipo en la prueba de tolerancia a la glucosa que los machos Pttg1 KO y que éste se ve agravado con respecto a los machos RasGrf1 KO de la misma edad. Las hembras doble KO de tres meses también presentan el mismo fenotipo que las hembras Pttg1 KO a esa edad.
- 8.** A los diez meses, los ratones Pttg1-RasGrf1 doble KO presentan un fenotipo en la prueba de tolerancia a la glucosa similar al observado a los tres meses. Los ratones de los tres genotipos a los diez meses muestran fenotipos similares entre sí al ser sometidos a esta prueba.

Bibliografía

1. Broek, D., et al., *The S. cerevisiae CDC25 gene product regulates the RAS/adenylate cyclase pathway*. Cell, 1987. **48**(5): p. 789-99.
2. Robinson, L.C., et al., *CDC25: a component of the RAS-adenylate cyclase pathway in Saccharomyces cerevisiae*. Science, 1987. **235**(4793): p. 1218-21.
3. Wolfman, A. and I.G. Macara, *A cytosolic protein catalyzes the release of GDP from p21ras*. Science, 1990. **248**(4951): p. 67-9.
4. Huang, Y.K., H.F. Kung, and T. Kamata, *Purification of a factor capable of stimulating the guanine nucleotide exchange reaction of ras proteins and its effect on ras-related small molecular mass G proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(20): p. 8008-12.
5. Martegani, E., et al., *Cloning by functional complementation of a mouse cDNA encoding a homologue of CDC25, a Saccharomyces cerevisiae RAS activator*. EMBO J, 1992. **11**(6): p. 2151-7.
6. Wei, W., et al., *Identification of a mammalian gene structurally and functionally related to the CDC25 gene of Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(15): p. 7100-4.
7. Chen, L., et al., *A murine CDC25/ras-GRF-related protein implicated in Ras regulation*. Dev Genet, 1993. **14**(5): p. 339-46.
8. Fam, N.P., et al., *Cloning and characterization of Ras-GRF2, a novel guanine nucleotide exchange factor for Ras*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(3): p. 1396-406.
9. Biliya, S. and L.A. Bulla, Jr., *Genomic imprinting: the influence of differential methylation in the two sexes*. Exp Biol Med (Maywood). **235**(2): p. 139-47.
10. Grealley, J.M., *Short interspersed transposable elements (SINEs) are excluded from imprinted regions in the human genome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(1): p. 327-32.
11. Ke, X., et al., *The distinguishing sequence characteristics of mouse imprinted genes*. Mamm Genome, 2002. **13**(11): p. 639-45.
12. Pitamber, P.N., Z. Lombard, and M. Ramsay, *No Evidence for a Parent-of-Origin Specific Differentially Methylated Region Linked to RASGRF1*. Front Genet, 2012. **3**: p. 41.
13. de la Puente, A., et al., *Structural characterization of Rasgrf1 and a novel linked imprinted locus*. Gene, 2002. **291**(1-2): p. 287-97.
14. Leaner, V.D., et al., *p75-Ras-GRF1 is a c-Jun/AP-1 target protein: its up regulation results in increased Ras activity and is necessary for c-Jun-induced nonadherent growth of Rat1a cells*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(8): p. 3324-37.
15. Schweighoffer, F., et al., *Identification of a human guanine nucleotide-releasing factor (H-GRF55) specific for Ras proteins*. Oncogene, 1993. **8**(6): p. 1477-85.
16. Arava, Y., R. Seger, and M.D. Walker, *GRFbeta, a novel regulator of calcium signaling, is expressed in pancreatic beta cells and brain*. J Biol Chem, 1999. **274**(35): p. 24449-52.

17. Fam, N.P., et al., *Mapping of the Ras-GRF2 gene (GRF2) to mouse chromosome 13C3-D1 and human chromosome 5q13, near the Ras-GAP gene*. Genomics, 1997. **39**(1): p. 118-20.
18. Fernandez-Medarde, A. and E. Santos, *The RasGrf family of mammalian guanine nucleotide exchange factors*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1815**(2): p. 170-88.
19. Tian, X., et al., *Developmentally regulated role for Ras-GRFs in coupling NMDA glutamate receptors to Ras, Erk and CREB*. EMBO J, 2004. **23**(7): p. 1567-75.
20. Kaneda, M., et al., *Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting*. Nature, 2004. **429**(6994): p. 900-3.
21. Plass, C., et al., *Identification of Grf1 on mouse chromosome 9 as an imprinted gene by RLG5-M*. Nat Genet, 1996. **14**(1): p. 106-9.
22. Colombo, G., et al., *Transcriptomic and proteomic analyses of mouse cerebellum reveals alterations in RasGRF1 expression following in vivo chronic treatment with delta 9-tetrahydrocannabinol*. J Mol Neurosci, 2009. **37**(2): p. 111-22.
23. Parelkar, N.K., et al., *Amphetamine alters Ras-guanine nucleotide-releasing factor expression in the rat striatum in vivo*. Eur J Pharmacol, 2009. **619**(1-3): p. 50-6.
24. Zhang, G.C., et al., *Cocaine increases Ras-guanine nucleotide-releasing factor 1 protein expression in the rat striatum in vivo*. Neurosci Lett, 2007. **427**(2): p. 117-21.
25. Stein, T.D. and J.A. Johnson, *Lack of neurodegeneration in transgenic mice overexpressing mutant amyloid precursor protein is associated with increased levels of transthyretin and the activation of cell survival pathways*. J Neurosci, 2002. **22**(17): p. 7380-8.
26. Landis, M.D., et al., *Sustained trophism of the mammary gland is sufficient to accelerate and synchronize development of ErbB2/Neu-induced tumors*. Oncogene, 2006. **25**(23): p. 3325-34.
27. Gu, F., et al., *Translational responses of NR2B overexpression in the cerebral cortex of transgenic mice: a liquid chromatography-based proteomic approach*. Brain Res, 2009. **1250**: p. 1-13.
28. Chen, H., et al., *Aberrant methylation of RASGRF2 and RASSF1A in human non-small cell lung cancer*. Oncol Rep, 2006. **15**(5): p. 1281-5.
29. Hagihara, A., et al., *Identification of 27 5' CpG islands aberrantly methylated and 13 genes silenced in human pancreatic cancers*. Oncogene, 2004. **23**(53): p. 8705-10.
30. Jacinto, F.V., et al., *Discovery of epigenetically silenced genes by methylated DNA immunoprecipitation in colon cancer cells*. Cancer Res, 2007. **67**(24): p. 11481-6.
31. Guerrero, I., et al., *Expression of alternative forms of Ras exchange factors GRF and SOS1 in different human tissues and cell lines*. Oncogene, 1996. **12**(5): p. 1097-107.
32. Shou, C., et al., *Molecular cloning of cDNAs encoding a guanine-nucleotide-releasing factor for Ras p21*. Nature, 1992. **358**(6384): p. 351-4.
33. Ferrari, C., et al., *Expression of two different products of CDC25Mm, a mammalian Ras activator, during development of mouse brain*. Exp Cell Res, 1994. **210**(2): p. 353-7.
34. Font de Mora, J., et al., *Ras-GRF1 signaling is required for normal beta-cell development and glucose homeostasis*. EMBO J, 2003. **22**(12): p. 3039-49.
35. Itier, J.M., et al., *Imprinted gene in postnatal growth role*. Nature, 1998. **393**(6681): p. 125-6.
36. Wei, W., et al., *Localization of the cellular expression pattern of cdc25NEF and ras in the juvenile rat brain*. Brain Res Mol Brain Res, 1993. **19**(4): p. 339-44.
37. Zippel, R., et al., *Ras-GRF, the activator of Ras, is expressed preferentially in mature neurons of the central nervous system*. Brain Res Mol Brain Res, 1997. **48**(1): p. 140-4.
38. Tung, P.S., et al., *A 54-kDa protein related to ras-guanine nucleotide release factor expressed in the rat exocrine pancreas*. Cell Tissue Res, 1997. **289**(3): p. 505-15.
39. Anborgh, P.H., et al., *Ras-specific exchange factor GRF: oligomerization through its Dbl homology domain and calcium-dependent activation of Raf*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(7): p. 4611-22.

40. Fernandez-Medarde, A., et al., *Targeted disruption of Ras-Grf2 shows its dispensability for mouse growth and development*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(8): p. 2498-504.
41. Fernandez-Medarde, A., et al., *RasGRF1 disruption causes retinal photoreception defects and associated transcriptomic alterations*. *J Neurochem*, 2009. **110**(2): p. 641-52.
42. Lavagni, P., et al., *Identification of novel RasGRF1 interacting partners by large-scale proteomic analysis*. *J Mol Neurosci*, 2009. **37**(3): p. 212-24.
43. Blomberg, N. and M. Nilges, *Functional diversity of PH domains: an exhaustive modelling study*. *Fold Des*, 1997. **2**(6): p. 343-55.
44. Harlan, J.E., et al., *Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate*. *Nature*, 1994. **371**(6493): p. 168-70.
45. Lemmon, M.A. and K.M. Ferguson, *Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains*. *Biochem J*, 2000. **350 Pt 1**: p. 1-18.
46. Maffucci, T. and M. Falasca, *Specificity in pleckstrin homology (PH) domain membrane targeting: a role for a phosphoinositide-protein co-operative mechanism*. *FEBS Lett*, 2001. **506**(3): p. 173-9.
47. Cen, H., et al., *Regulated and constitutive activity by CDC25Mm (GRF), a Ras-specific exchange factor*. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(12): p. 7718-24.
48. Inglese, J., et al., *G beta gamma interactions with PH domains and Ras-MAPK signaling pathways*. *Trends Biochem Sci*, 1995. **20**(4): p. 151-6.
49. Sawai, T., et al., *Interaction between Pleckstrin homology domains and G protein beta-gamma-subunits: analyses of kinetic parameters by a biosensor-based method*. *Biol Pharm Bull*, 1999. **22**(3): p. 229-33.
50. Touhara, K., et al., *Binding of G protein beta gamma-subunits to pleckstrin homology domains*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(14): p. 10217-20.
51. Baouz, S., et al., *The N-terminal moiety of CDC25(Mm), a GDP/GTP exchange factor of Ras proteins, controls the activity of the catalytic domain. Modulation by calmodulin and calpain*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(10): p. 6671-6.
52. Arozarena, I., et al., *The Rho family GTPase Cdc42 regulates the activation of Ras/MAP kinase by the exchange factor Ras-GRF*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(34): p. 26441-8.
53. Buchsbaum, R., et al., *The N-terminal pleckstrin, coiled-coil, and IQ domains of the exchange factor Ras-GRF act cooperatively to facilitate activation by calcium*. *Mol Cell Biol*, 1996. **16**(9): p. 4888-96.
54. Innocenti, M., et al., *CDC25(Mm)/Ras-GRF1 regulates both Ras and Rac signaling pathways*. *FEBS Lett*, 1999. **460**(2): p. 357-62.
55. Buchsbaum, R.J., B.A. Connolly, and L.A. Feig, *Regulation of p70 S6 kinase by complex formation between the Rac guanine nucleotide exchange factor (Rac-GEF) Tiam1 and the scaffold spinophilin*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(21): p. 18833-41.
56. MacDonald, J.I., J.M. Verdi, and S.O. Meakin, *Activity-dependent interaction of the intracellular domain of rat trkA with intermediate filament proteins, the beta-6 proteasomal subunit, Ras-GRF1, and the p162 subunit of eIF3*. *J Mol Neurosci*, 1999. **13**(1-2): p. 141-58.
57. Robinson, K.N., et al., *Neurotrophin-dependent tyrosine phosphorylation of Ras guanine-releasing factor 1 and associated neurite outgrowth is dependent on the HIKE domain of TrkA*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(1): p. 225-35.
58. Farnsworth, C.L., et al., *Calcium activation of Ras mediated by neuronal exchange factor Ras-GRF*. *Nature*, 1995. **376**(6540): p. 524-7.
59. de Hoog, C.L., et al., *Calmodulin-independent coordination of Ras and extracellular signal-regulated kinase activation by Ras-GRF2*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(8): p. 2727-33.
60. Fan, W.T., et al., *The exchange factor Ras-GRF2 activates Ras-dependent and Rac-dependent mitogen-activated protein kinase pathways*. *Curr Biol*, 1998. **8**(16): p. 935-8.

61. Kiyono, M., T. Satoh, and Y. Kaziro, *G protein beta gamma subunit-dependent Rac-guanine nucleotide exchange activity of Ras-GRF1/CDC25(Mm)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(9): p. 4826-31.
62. Arozarena, I., et al., *Activation of H-Ras in the endoplasmic reticulum by the RasGRF family guanine nucleotide exchange factors*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(4): p. 1516-30.
63. Forlani, G., et al., *The guanine nucleotide exchange factor RasGRF1 directly binds microtubules via DHPH2-mediated interaction*. FEBS J, 2006. **273**(10): p. 2127-38.
64. Baldassa, S., et al., *SCLIP, a microtubule-destabilizing factor, interacts with RasGRF1 and inhibits its ability to promote Rac activation and neurite outgrowth*. J Biol Chem, 2007. **282**(4): p. 2333-45.
65. Sinclair, N.R., *Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs on activating molecules*. Crit Rev Immunol, 2000. **20**(2): p. 89-102.
66. Ruiz, S., E. Santos, and X.R. Bustelo, *RasGRF2, a guanosine nucleotide exchange factor for Ras GTPases, participates in T-cell signaling responses*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(23): p. 8127-42.
67. Ruiz, S., E. Santos, and X.R. Bustelo, *The use of knockout mice reveals a synergistic role of the Vav1 and Rasgrf2 gene deficiencies in lymphomagenesis and metastasis*. PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8229.
68. Lai, C.C., et al., *Influence of guanine nucleotides on complex formation between Ras and CDC25 proteins*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(3): p. 1345-52.
69. Baouz, S., et al., *Sites of phosphorylation by protein kinase A in CDC25Mm/GRF1, a guanine nucleotide exchange factor for Ras*. J Biol Chem, 2001. **276**(3): p. 1742-9.
70. Mattingly, R.R., *Phosphorylation of serine 916 of Ras-GRF1 contributes to the activation of exchange factor activity by muscarinic receptors*. J Biol Chem, 1999. **274**(52): p. 37379-84.
71. Krapivinsky, G., et al., *The NMDA receptor is coupled to the ERK pathway by a direct interaction between NR2B and RasGRF1*. Neuron, 2003. **40**(4): p. 775-84.
72. Li, S., et al., *Distinct roles for Ras-guanine nucleotide-releasing factor 1 (Ras-GRF1) and Ras-GRF2 in the induction of long-term potentiation and long-term depression*. J Neurosci, 2006. **26**(6): p. 1721-9.
73. Coccetti, P., et al., *The minimal active domain of the mouse ras exchange factor CDC25Mm*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **206**(1): p. 253-9.
74. Quilliam, L.A., J.F. Rebhun, and A.F. Castro, *A growing family of guanine nucleotide exchange factors is responsible for activation of Ras-family GTPases*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 2002. **71**: p. 391-444.
75. Freshney, N.W., S.D. Goonesekera, and L.A. Feig, *Activation of the exchange factor Ras-GRF by calcium requires an intact Dbl homology domain*. FEBS Lett, 1997. **407**(1): p. 111-5.
76. Gnesutta, N., et al., *Cloning and characterization of mouse UBPY, a deubiquitinating enzyme that interacts with the ras guanine nucleotide exchange factor CDC25(Mm)/Ras-GRF1*. J Biol Chem, 2001. **276**(42): p. 39448-54.
77. Zhu, T.N., et al., *Filamin A-mediated down-regulation of the exchange factor Ras-GRF1 correlates with decreased matrix metalloproteinase-9 expression in human melanoma cells*. J Biol Chem, 2007. **282**(20): p. 14816-26.
78. de Hoog, C.L., et al., *Ras binding triggers ubiquitination of the Ras exchange factor Ras-GRF2*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(6): p. 2107-17.
79. Kesavapany, S., et al., *Neuronal nuclear organization is controlled by cyclin-dependent kinase 5 phosphorylation of Ras Guanine nucleotide releasing factor-1*. Neurosignals, 2006. **15**(4): p. 157-73.
80. Cullen, P.J. and P.J. Lockyer, *Integration of calcium and Ras signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(5): p. 339-48.

81. Schmitt, J.M., et al., *Calmodulin-dependent kinase kinase/calmodulin kinase I activity gates extracellular-regulated kinase-dependent long-term potentiation*. J Neurosci, 2005. **25**(5): p. 1281-90.
82. Jin, S.X. and L.A. Feig, *Long-term potentiation in the CA1 hippocampus induced by NR2A subunit-containing NMDA glutamate receptors is mediated by Ras-GRF2/Erk map kinase signaling*. PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11732.
83. Buchsbaum, R.J., B.A. Connolly, and L.A. Feig, *Interaction of Rac exchange factors Tiam1 and Ras-GRF1 with a scaffold for the p38 mitogen-activated protein kinase cascade*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(12): p. 4073-85.
84. Tian, X. and L.A. Feig, *Age-dependent participation of Ras-GRF proteins in coupling calcium-permeable AMPA glutamate receptors to Ras/Erk signaling in cortical neurons*. J Biol Chem, 2006. **281**(11): p. 7578-82.
85. Norum, J.H., et al., *Endogenous expression and protein kinase A-dependent phosphorylation of the guanine nucleotide exchange factor Ras-GRF1 in human embryonic kidney 293 cells*. FEBS J, 2005. **272**(9): p. 2304-16.
86. Bhattacharya, M., A.V. Babwah, and S.S. Ferguson, *Small GTP-binding protein-coupled receptors*. Biochem Soc Trans, 2004. **32**(Pt 6): p. 1040-4.
87. Ritter, S.L. and R.A. Hall, *Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(12): p. 819-30.
88. Shou, C., et al., *Differential response of the Ras exchange factor, Ras-GRF to tyrosine kinase and G protein mediated signals*. Oncogene, 1995. **10**(10): p. 1887-93.
89. Zippel, R., et al., *The brain specific Ras exchange factor CDC25 Mm: modulation of its activity through Gi-protein-mediated signals*. Oncogene, 1996. **12**(12): p. 2697-703.
90. Mattingly, R.R. and I.G. Macara, *Phosphorylation-dependent activation of the Ras-GRF/CDC25Mm exchange factor by muscarinic receptors and G-protein beta gamma subunits*. Nature, 1996. **382**(6588): p. 268-72.
91. Mattingly, R.R., V. Saini, and I.G. Macara, *Activation of the Ras-GRF/CDC25Mm exchange factor by lysophosphatidic acid*. Cell Signal, 1999. **11**(8): p. 603-10.
92. Yang, H., et al., *Phosphorylation of the Ras-GRF1 exchange factor at Ser916/898 reveals activation of Ras signaling in the cerebral cortex*. J Biol Chem, 2003. **278**(15): p. 13278-85.
93. Norum, J.H., et al., *Epac- and Rap- independent ERK1/2 phosphorylation induced by Gs-coupled receptor stimulation in HEK293 cells*. FEBS Lett, 2007. **581**(1): p. 15-20.
94. Talebian, A., et al., *Ras Guanine Nucleotide Releasing Factor 1 (RasGrf1) Enhancement of Trk Receptor-Mediated Neurite Outgrowth Requires Activation of Both H-Ras and Rac*. J Mol Neurosci, 2012.
95. Kiyono, M., Y. Kaziro, and T. Satoh, *Induction of rac-guanine nucleotide exchange activity of Ras-GRF1/CDC25(Mm) following phosphorylation by the nonreceptor tyrosine kinase Src*. J Biol Chem, 2000. **275**(8): p. 5441-6.
96. Giglione, C., S. Gonfloni, and A. Parmeggiani, *Differential actions of p60c-Src and Lck kinases on the Ras regulators p120-GAP and GDP/GTP exchange factor CDC25Mm*. Eur J Biochem, 2001. **268**(11): p. 3275-83.
97. Kiyono, M., et al., *Stimulation of Ras guanine nucleotide exchange activity of Ras-GRF1/CDC25(Mm) upon tyrosine phosphorylation by the Cdc42-regulated kinase ACK1*. J Biol Chem, 2000. **275**(38): p. 29788-93.
98. Arozarena, I., D. Matallanas, and P. Crespo, *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, 2001. **276**(24): p. 21878-84.
99. Rabiet, M.J., et al., *Inhibitory effects of a dominant-interfering form of the Rho-GTPase Cdc42 in the chemoattractant-elicited signaling pathways leading to NADPH oxidase activation in differentiated HL-60 cells*. Blood, 2002. **100**(5): p. 1835-44.

100. Khosravi-Far, R. and C.J. Der, *The Ras signal transduction pathway*. *Cancer Metastasis Rev*, 1994. **13**(1): p. 67-89.
101. Quilliam, L.A., et al., *Membrane-targeting potentiates guanine nucleotide exchange factor CDC25 and SOS1 activation of Ras transforming activity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(18): p. 8512-6.
102. Yang, H. and R.R. Mattingly, *The Ras-GRF1 exchange factor coordinates activation of H-Ras and Rac1 to control neuronal morphology*. *Mol Biol Cell*, 2006. **17**(5): p. 2177-89.
103. Tonini, R., et al., *Expression of Ras-GRF in the SK-N-BE neuroblastoma accelerates retinoic-acid-induced neuronal differentiation and increases the functional expression of the IRK1 potassium channel*. *Eur J Neurosci*, 1999. **11**(3): p. 959-66.
104. Kesavapany, S., et al., *p35/cyclin-dependent kinase 5 phosphorylation of ras guanine nucleotide releasing factor 2 (RasGRF2) mediates Rac-dependent Extracellular Signal-regulated kinase 1/2 activity, altering RasGRF2 and microtubule-associated protein 1b distribution in neurons*. *J Neurosci*, 2004. **24**(18): p. 4421-31.
105. Sturani, E., et al., *The Ras Guanine nucleotide Exchange Factor CDC25Mm is present at the synaptic junction*. *Exp Cell Res*, 1997. **235**(1): p. 117-23.
106. Tonini, R., et al., *Involvement of CDC25Mm/Ras-GRF1-dependent signaling in the control of neuronal excitability*. *Mol Cell Neurosci*, 2001. **18**(6): p. 691-701.
107. Zhuravliova, E., et al., *Haloperidol induces neurotoxicity by the NMDA receptor downstream signaling pathway, alternative from glutamate excitotoxicity*. *Neurochem Int*, 2007. **50**(7-8): p. 976-82.
108. Li, D.W., et al., *Calcium-activated RAF/MEK/ERK signaling pathway mediates p53-dependent apoptosis and is abrogated by alpha B-crystallin through inhibition of RAS activation*. *Mol Biol Cell*, 2005. **16**(9): p. 4437-53.
109. Abreu, J.R., et al., *The Ras guanine nucleotide exchange factor RasGRF1 promotes matrix metalloproteinase-3 production in rheumatoid arthritis synovial tissue*. *Arthritis Res Ther*, 2009. **11**(4): p. R121.
110. Shin, D.M., et al., *Molecular characterization of isolated from murine adult tissues very small embryonic/epiblast like stem cells (VSELs)*. *Mol Cells*. **29**(6): p. 533-8.
111. Qiu, C., et al., *Allelic imbalance and altered expression of genes in chromosome 2q11-2q16 from rat mammary gland carcinomas induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine*. *Oncogene*, 2003. **22**(8): p. 1253-60.
112. Calvo, F., et al., *RasGRF suppresses Cdc42-mediated tumour cell movement, cytoskeletal dynamics and transformation*. *Nat Cell Biol*. **13**(7): p. 819-26.
113. Brambilla, R., et al., *A role for the Ras signalling pathway in synaptic transmission and long-term memory*. *Nature*, 1997. **390**(6657): p. 281-6.
114. Giese, K.P., et al., *Hippocampus-dependent learning and memory is impaired in mice lacking the Ras-guanine-nucleotide releasing factor 1 (Ras-GRF1)*. *Neuropharmacology*, 2001. **41**(6): p. 791-800.
115. Hysi, P.G., et al., *A genome-wide association study for myopia and refractive error identifies a susceptibility locus at 15q25*. *Nat Genet*, 2010. **42**(10): p. 902-5.
116. Rubino, T., et al., *Ras/ERK signalling in cannabinoid tolerance: from behaviour to cellular aspects*. *J Neurochem*, 2005. **93**(4): p. 984-91.
117. Rubino, T., et al., *Changes in the expression of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestins in mouse brain during cannabinoid tolerance: a role for RAS-ERK cascade*. *Mol Neurobiol*, 2006. **33**(3): p. 199-213.
118. Tonini, R., et al., *ERK-dependent modulation of cerebellar synaptic plasticity after chronic Delta9-tetrahydrocannabinol exposure*. *J Neurosci*, 2006. **26**(21): p. 5810-8.
119. Fasano, S., et al., *Ras-guanine nucleotide-releasing factor 1 (Ras-GRF1) controls activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling in the striatum and long-term behavioral responses to cocaine*. *Biol Psychiatry*, 2009. **66**(8): p. 758-68.

120. Tzschentke, T.M., *Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues*. Prog Neurobiol, 1998. **56**(6): p. 613-72.
121. Clapcott, S.J., et al., *Two ENU-induced mutations in Rasgrf1 and early mouse growth retardation*. Mamm Genome, 2003. **14**(8): p. 495-505.
122. Wang, Z., et al., *Pituitary tumor transforming gene-null male mice exhibit impaired pancreatic beta cell proliferation and diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(6): p. 3428-32.
123. Pende, M., et al., *Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished beta-cell size in S6K1-deficient mice*. Nature, 2000. **408**(6815): p. 994-7.
124. Um, S.H., et al., *Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity*. Nature, 2004. **431**(7005): p. 200-5.
125. Martin, J., et al., *Genetic rescue of Cdk4 null mice restores pancreatic beta-cell proliferation but not homeostatic cell number*. Oncogene, 2003. **22**(34): p. 5261-9.
126. Pei, L. and S. Melmed, *Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG)*. Mol Endocrinol, 1997. **11**(4): p. 433-41.
127. Zou, H., et al., *Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis*. Science, 1999. **285**(5426): p. 418-22.
128. Wang, Z. and S. Melmed, *Characterization of the murine pituitary tumor transforming gene (PTTG) and its promoter*. Endocrinology, 2000. **141**(2): p. 763-71.
129. Zhang, X., et al., *Structure, expression, and function of human pituitary tumor-transforming gene (PTTG)*. Mol Endocrinol, 1999. **13**(1): p. 156-66.
130. Dominguez, A., et al., *hpttg, a human homologue of rat pttg, is overexpressed in hematopoietic neoplasms. Evidence for a transcriptional activation function of hPTTG*. Oncogene, 1998. **17**(17): p. 2187-93.
131. Kakar, S.S. and L. Jennes, *Molecular cloning and characterization of the tumor transforming gene (TUTR1): a novel gene in human tumorigenesis*. Cytogenet Cell Genet, 1999. **84**(3-4): p. 211-6.
132. Saez, C., et al., *hpttg is over-expressed in pituitary adenomas and other primary epithelial neoplasias*. Oncogene, 1999. **18**(39): p. 5473-6.
133. Hunter, J.A., et al., *The relationship between pituitary tumour transforming gene (PTTG) expression and in vitro hormone and vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from human pituitary adenomas*. Eur J Endocrinol, 2003. **148**(2): p. 203-11.
134. McCabe, C.J., et al., *Expression of pituitary tumour transforming gene (PTTG) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in human pituitary adenomas: relationships to clinical tumour behaviour*. Clin Endocrinol (Oxf), 2003. **58**(2): p. 141-50.
135. Heaney, A.P., et al., *Transforming events in thyroid tumorigenesis and their association with follicular lesions*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(10): p. 5025-32.
136. Shibata, Y., et al., *Expression of PTTG (pituitary tumor transforming gene) in esophageal cancer*. Jpn J Clin Oncol, 2002. **32**(7): p. 233-7.
137. Cho-Rok, J., et al., *Adenovirus-mediated transfer of siRNA against PTTG1 inhibits liver cancer cell growth in vitro and in vivo*. Hepatology, 2006. **43**(5): p. 1042-52.
138. Puri, R., et al., *Molecular cloning of pituitary tumor transforming gene 1 from ovarian tumors and its expression in tumors*. Cancer Lett, 2001. **163**(1): p. 131-9.
139. Tsai, S.J., et al., *Expression and functional analysis of pituitary tumor transforming gene-1 [corrected] in uterine leiomyomas*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(6): p. 3715-23.
140. Boelaert, K., et al., *Pituitary tumor transforming gene and fibroblast growth factor-2 expression: potential prognostic indicators in differentiated thyroid cancer*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(5): p. 2341-7.
141. Rehfeld, N., et al., *The influence of the pituitary tumor transforming gene-1 (PTTG-1) on survival of patients with small cell lung cancer and non-small cell lung cancer*. J Carcinog, 2006. **5**: p. 4.

142. Zur, A. and M. Brandeis, *Securin degradation is mediated by fzy and fzr, and is required for complete chromatid separation but not for cytokinesis*. EMBO J, 2001. **20**(4): p. 792-801.
143. Vlotides, G., et al., *Mechanisms for growth factor-induced pituitary tumor transforming gene-1 expression in pituitary folliculostellate TtT/GF cells*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(12): p. 3321-35.
144. Yu, R., et al., *Pituitary tumor transforming gene (PTTG) regulates placental JEG-3 cell division and survival: evidence from live cell imaging*. Mol Endocrinol, 2000. **14**(8): p. 1137-46.
145. Clem, A.L., T. Hamid, and S.S. Kakar, *Characterization of the role of Sp1 and NF-Y in differential regulation of PTTG/securin expression in tumor cells*. Gene, 2003. **322**: p. 113-21.
146. Zhou, Y., et al., *DNA damage-induced inhibition of securin expression is mediated by p53*. J Biol Chem, 2003. **278**(1): p. 462-70.
147. Zhou, C., et al., *Oct-1 induces pituitary tumor transforming gene expression in endocrine tumors*. Endocr Relat Cancer, 2008. **15**(3): p. 817-31.
148. Zhou, C., et al., *Overexpression of human pituitary tumor transforming gene (hPTTG), is regulated by beta-catenin/TCF pathway in human esophageal squamous cell carcinoma*. Int J Cancer, 2005. **113**(6): p. 891-8.
149. Hlubek, F., et al., *Securin (hPTTG1) expression is regulated by beta-catenin/TCF in human colorectal carcinoma*. Br J Cancer, 2006. **94**(11): p. 1672-7.
150. Li, T., et al., *Histone acetyltransferase p300 regulates the expression of human pituitary tumor transforming gene (hPTTG)*. J Genet Genomics, 2009. **36**(6): p. 335-42.
151. Heaney, A.P., et al., *Early involvement of estrogen-induced pituitary tumor transforming gene and fibroblast growth factor expression in prolactinoma pathogenesis*. Nat Med, 1999. **5**(11): p. 1317-21.
152. Heaney, A.P., M. Fernando, and S. Melmed, *Functional role of estrogen in pituitary tumor pathogenesis*. J Clin Invest, 2002. **109**(2): p. 277-83.
153. Yin, H., et al., *Strain difference in regulation of pituitary tumor transforming gene (PTTG) in estrogen-induced pituitary tumorigenesis in rats*. Jpn J Cancer Res, 2001. **92**(10): p. 1034-40.
154. Tfelt-Hansen, J., et al., *Calcium-sensing receptor induces messenger ribonucleic acid of human securin, pituitary tumor transforming gene, in rat testicular cancer*. Endocrinology, 2003. **144**(12): p. 5188-93.
155. Tfelt-Hansen, J., et al., *Expression of pituitary tumor transforming gene (PTTG) and its binding protein in human astrocytes and astrocytoma cells: function and regulation of PTTG in U87 astrocytoma cells*. Endocrinology, 2004. **145**(9): p. 4222-31.
156. Chamaon, K., et al., *Regulation of the pituitary tumor transforming gene by insulin-like-growth factor-I and insulin differs between malignant and non-neoplastic astrocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **331**(1): p. 86-92.
157. Thompson, A.D., 3rd and S.S. Kakar, *Insulin and IGF-1 regulate the expression of the pituitary tumor transforming gene (PTTG) in breast tumor cells*. FEBS Lett, 2005. **579**(14): p. 3195-200.
158. Vlotides, G., T. Eigler, and S. Melmed, *Pituitary tumor-transforming gene: physiology and implications for tumorigenesis*. Endocr Rev, 2007. **28**(2): p. 165-86.
159. Prezant, T.R., P. Kadioglu, and S. Melmed, *An intronless homolog of human proto-oncogene hPTTG is expressed in pituitary tumors: evidence for hPTTG family*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(3): p. 1149-52.
160. Chen, L., et al., *Identification of the human pituitary tumor transforming gene (hPTTG) family: molecular structure, expression, and chromosomal localization*. Gene, 2000. **248**(1-2): p. 41-50.
161. Yu, R. and S. Melmed, *Oncogene activation in pituitary tumors*. Brain Pathol, 2001. **11**(3): p. 328-41.

162. Sanchez-Puig, N., D.B. Veprintsev, and A.R. Fersht, *Human full-length Securin is a natively unfolded protein*. *Protein Sci*, 2005. **14**(6): p. 1410-8.
163. Csizmok, V., et al., *Structural and dynamic characterization of intrinsically disordered human securin by NMR spectroscopy*. *J Am Chem Soc*, 2008. **130**(50): p. 16873-9.
164. Wang, Z. and S. Melmed, *Pituitary tumor transforming gene (PTTG) transforming and transactivation activity*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(11): p. 7459-61.
165. Pei, L., *Identification of c-myc as a down-stream target for pituitary tumor-transforming gene*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(11): p. 8484-91.
166. Pei, L., *Activation of mitogen-activated protein kinase cascade regulates pituitary tumor-transforming gene transactivation function*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(40): p. 31191-8.
167. Moreno-Mateos, M.A., et al., *PTTG1/securin modulates microtubule nucleation and cell migration*. *Mol Biol Cell*. **22**(22): p. 4302-11.
168. Minematsu, T., et al., *PTTG is a secretory protein in human pituitary adenomas and in mouse pituitary tumor cell lines*. *Endocr Pathol*, 2007. **18**(1): p. 8-15.
169. Ramos-Morales, F., et al., *Cell cycle regulated expression and phosphorylation of hpttg proto-oncogene product*. *Oncogene*, 2000. **19**(3): p. 403-9.
170. Romero, F., et al., *Human securin, hPTTG, is associated with Ku heterodimer, the regulatory subunit of the DNA-dependent protein kinase*. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(6): p. 1300-7.
171. Tanaka, T., et al., *Cohesin ensures bipolar attachment of microtubules to sister centromeres and resists their precocious separation*. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(8): p. 492-9.
172. Nasmyth, K., *How might cohesin hold sister chromatids together?* *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2005. **360**(1455): p. 483-96.
173. Yanagida, M., *Basic mechanism of eukaryotic chromosome segregation*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2005. **360**(1455): p. 609-21.
174. Gruber, S., C.H. Haering, and K. Nasmyth, *Chromosomal cohesin forms a ring*. *Cell*, 2003. **112**(6): p. 765-77.
175. Haering, C.H., et al., *Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex*. *Mol Cell*, 2002. **9**(4): p. 773-88.
176. Huang, C.E., M. Milutinovich, and D. Koshland, *Rings, bracelet or snaps: fashionable alternatives for Smc complexes*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2005. **360**(1455): p. 537-42.
177. Uhlmann, F., F. Lottspeich, and K. Nasmyth, *Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1*. *Nature*, 1999. **400**(6739): p. 37-42.
178. Ciosk, R., et al., *An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast*. *Cell*, 1998. **93**(6): p. 1067-76.
179. Hornig, N.C., et al., *The dual mechanism of separase regulation by securin*. *Curr Biol*, 2002. **12**(12): p. 973-82.
180. Waizenegger, I., et al., *Regulation of human separase by securin binding and autocleavage*. *Curr Biol*, 2002. **12**(16): p. 1368-78.
181. Stemmann, O., et al., *Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase*. *Cell*, 2001. **107**(6): p. 715-26.
182. Nasmyth, K., *How do so few control so many?* *Cell*, 2005. **120**(6): p. 739-46.
183. Wirth, K.G., et al., *Separase: a universal trigger for sister chromatid disjunction but not chromosome cycle progression*. *J Cell Biol*, 2006. **172**(6): p. 847-60.
184. Romero, F., et al., *Securin is a target of the UV response pathway in mammalian cells*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(7): p. 2720-33.
185. Ptashne, M., *How eukaryotic transcriptional activators work*. *Nature*, 1988. **335**(6192): p. 683-9.

186. Zhang, X., et al., *Pituitary tumor transforming gene (PTTG) expression in pituitary adenomas*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(2): p. 761-7.
187. Chien, W. and L. Pei, *A novel binding factor facilitates nuclear translocation and transcriptional activation function of the pituitary tumor-transforming gene product*. J Biol Chem, 2000. **275**(25): p. 19422-7.
188. Horwitz, G.A., et al., *Human pituitary tumor-transforming gene (PTTG1) motif suppresses prolactin expression*. Mol Endocrinol, 2003. **17**(4): p. 600-9.
189. Tong, Y., et al., *Pituitary tumor transforming gene interacts with Sp1 to modulate G1/S cell phase transition*. Oncogene, 2007. **26**(38): p. 5596-605.
190. Hamid, T., M.T. Malik, and S.S. Kakar, *Ectopic expression of PTTG1/securin promotes tumorigenesis in human embryonic kidney cells*. Mol Cancer, 2005. **4**(1): p. 3.
191. Mu, Y.M., et al., *Human pituitary tumor transforming gene (hPTTG) inhibits human lung cancer A549 cell growth through activation of p21(WAF1/CIP1)*. Endocr J, 2003. **50**(6): p. 771-81.
192. Yu, R., et al., *Pituitary tumor transforming gene causes aneuploidy and p53-dependent and p53-independent apoptosis*. J Biol Chem, 2000. **275**(47): p. 36502-5.
193. Bernal, J.A., et al., *Human securin interacts with p53 and modulates p53-mediated transcriptional activity and apoptosis*. Nat Genet, 2002. **32**(2): p. 306-11.
194. Solbach, C., et al., *Pituitary tumor-transforming gene (PTTG): a novel target for anti-tumor therapy*. Anticancer Res, 2005. **25**(1A): p. 121-5.
195. Boelaert, K., et al., *A potential role for PTTG/securin in the developing human fetal brain*. FASEB J, 2003. **17**(12): p. 1631-9.
196. Boelaert, K., et al., *PTTG's C-terminal PXXP motifs modulate critical cellular processes in vitro*. J Mol Endocrinol, 2004. **33**(3): p. 663-77.
197. Yu, R., et al., *Overexpressed pituitary tumor-transforming gene causes aneuploidy in live human cells*. Endocrinology, 2003. **144**(11): p. 4991-8.
198. Lengauer, C., K.W. Kinzler, and B. Vogelstein, *Genetic instability in colorectal cancers*. Nature, 1997. **386**(6625): p. 623-7.
199. Bunz, F., et al., *Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage*. Science, 1998. **282**(5393): p. 1497-501.
200. Jallepalli, P.V., et al., *Securin is required for chromosomal stability in human cells*. Cell, 2001. **105**(4): p. 445-57.
201. Tong, Y., et al., *Pituitary tumor transforming gene 1 regulates Aurora kinase A activity*. Oncogene, 2008. **27**(49): p. 6385-95.
202. Pflieger, K., et al., *Securin is not required for chromosomal stability in human cells*. PLoS Biol, 2005. **3**(12): p. e416.
203. Hamid, T. and S.S. Kakar, *PTTG/securin activates expression of p53 and modulates its function*. Mol Cancer, 2004. **3**: p. 18.
204. Heaney, A.P., et al., *Expression of pituitary-tumour transforming gene in colorectal tumours*. Lancet, 2000. **355**(9205): p. 716-9.
205. McCabe, C.J., et al., *Vascular endothelial growth factor, its receptor KDR/Flk-1, and pituitary tumor transforming gene in pituitary tumors*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(9): p. 4238-44.
206. Kim, D.S., et al., *Pituitary tumor transforming gene (PTTG) stimulates thyroid cell proliferation via a vascular endothelial growth factor/kinase insert domain receptor/inhibitor of DNA binding-3 autocrine pathway*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(11): p. 4603-11.
207. Kim, D.S., et al., *Pituitary tumor-transforming gene regulates multiple downstream angiogenic genes in thyroid cancer*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(3): p. 1119-28.
208. Wang, Z., R. Yu, and S. Melmed, *Mice lacking pituitary tumor transforming gene show testicular and splenic hypoplasia, thymic hyperplasia, thrombocytopenia, aberrant cell cycle progression, and premature centromere division*. Mol Endocrinol, 2001. **15**(11): p. 1870-9.

209. Chesnokova, V., et al., *Pituitary hypoplasia in Pttg-/- mice is protective for Rb+/- pituitary tumorigenesis*. Mol Endocrinol, 2005. **19**(9): p. 2371-9.
210. Chesnokova, V., et al., *Diminished pancreatic beta-cell mass in securin-null mice is caused by beta-cell apoptosis and senescence*. Endocrinology, 2009. **150**(6): p. 2603-10.
211. Fraenkel, M., et al., *Sex-steroid milieu determines diabetes rescue in pttg-null mice*. J Endocrinol, 2006. **189**(3): p. 519-28.
212. Kandel, E.R., *The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses*. Science, 2001. **294**(5544): p. 1030-8.
213. Squire, L.R. and E. Kandel, eds. *Memory: from mind to molecules*. Scientific American Library, New York. 2000.
214. Müller, G.E. and A. Pilzecker, *Experimentelle beitrage zur lehrevom Gedachtniss*. . Zeitschrift fur psychologie 1900. **Erganzungsband 1**: p. 300.
215. Barlett, F., *Remembering: A study in experimental and social psychology*. Cambridge University press, London., 1932.
216. Byrne, ed. *Learning & Memory*. ed. M.r. USA. 2003: New York.
217. Milner, B., L.R. Squire, and E.R. Kandel, *Cognitive neuroscience and the study of memory*. Neuron, 1998. **20**(3): p. 445-68.
218. Squire, L.R. and S. Zola-Morgan, *Memory: brain systems and behavior*. Trends Neurosci, 1988. **11**(4): p. 170-5.
219. Faw, B., *Pre-frontal executive committee for perception, working memory, attention, long-term memory, motor control, and thinking: a tutorial review*. Conscious Cogn, 2003. **12**(1): p. 83-139.
220. Lee, I. and R.P. Kesner, *Time-dependent relationship between the dorsal hippocampus and the prefrontal cortex in spatial memory*. J Neurosci, 2003. **23**(4): p. 1517-23.
221. Zola-Morgan, S., L.R. Squire, and D.G. Amaral, *Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus*. J Neurosci, 1986. **6**(10): p. 2950-67.
222. Scoville, W.B. and B. Milner, *Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions*. J Neurochem, 1957. **20**: p. 10.
223. Squire, L.R. and P. Alvarez, *Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective*. Curr Opin Neurobiol, 1995. **5**(2): p. 169-77.
224. Poldrack, R.A. and J.D. Gabrieli, *Functional anatomy of long-term memory*. . J Clin Neurophysiol 1997. **14**: p. 16.
225. Kim, J.J. and M.G. Baxter, *Multiple brain-memory systems: the whole does not equal the sum of its parts*. Trends Neurosci, 2001. **24**(6): p. 324-30.
226. Nadel, L. and M. Moscovitch, *Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex*. Curr Opin Neurobiol, 1997. **7**(2): p. 217-27.
227. Moscovitch, M., et al., *Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: a unified account based on multiple trace theory*. J Anat, 2005. **207**(1): p. 35-66.
228. Rosenbaum, R.S., G. Winocur, and M. Moscovitch, *New views on old memories: re-evaluating the role of the hippocampal complex*. Behav Brain Res, 2001. **127**(1-2): p. 183-97.
229. Kopelman, M.D., *Disorders of memory*. Brain, 2002. **125**(Pt 10): p. 2152-90.
230. Zakharov, V.V., T.V. Akhutina, and N.N. Yakhno, *Memory impairment in Parkinson's disease*. Neurosci Behav Physiol, 2001. **31**(2): p. 157-63.
231. de Leon, M.J., et al., *The radiologic prediction of Alzheimer disease: the atrophic hippocampal formation*. American Journal of Neuroradiology, 1993. **14**(4): p. 897-906.
232. Davies, P. and A.J. Maloney, *Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease*. Lancet, 1976. **2**(8000): p. 1403.
233. Perry, E.K., et al., *Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue*. J Neurol Sci, 1977. **34**(2): p. 247-65.

234. Whitehouse, P.J., et al., *Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain*. Science, 1982. **215**(4537): p. 1237-9.
235. Hartley, T., J. King, and N. Burgess, *Studies of the neuronal basis of human navigation and memory*. 2003, New York: Oxford University Press.
236. O'Keefe, J. and L. Nadel, *The hippocampus as a cognitive map*. University Press, Oxford 1978.
237. O'Keefe, J., *Place units in the hippocampus of the freely moving rat*. Exp Neurol, 1976. **51**(1): p. 78-109.
238. O'Keefe, J. and J. Dostrovsky, *The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat*. Brain Res, 1971. **34**(1): p. 171-5.
239. Wilson, M.A. and B.L. McNaughton, *Dynamics of the hippocampal ensemble code for space*. Science, 1993. **261**(5124): p. 1055-8.
240. Eichenbaum, H., et al., *The hippocampus, memory, and place cells: is it spatial memory or a memory space?* Neuron, 1999. **23**(2): p. 209-26.
241. Eichenbaum, H., *Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory*. Neuron, 2004. **44**(1): p. 109-20.
242. Witter, M.P., et al., *Cortico-hippocampal communication by way of parallel parahippocampal-subicular pathways*. Hippocampus, 2000. **10**(4): p. 398-410.
243. Witter, M.P. and D.G. Amaral, *Hippocampal formation*. 2004, San Diego: Academic Press.
244. Amaral, D.G. and M.P. Witter, *The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data*. Neuroscience, 1989. **31**(3): p. 571-91.
245. Freund, T.F. and G. Buzsaki, *Interneurons of the hippocampus*. Hippocampus, 1996. **6**(4): p. 347-470.
246. Nguyen, P.V., *Comparative plasticity of brain synapses in inbred mouse strains*. J Exp Biol, 2006. **209**(Pt 12): p. 2293-303.
247. Bird, C.M. and N. Burgess, *The hippocampus and memory: insights from spatial processing*. Nat Rev Neurosci, 2008. **9**(3): p. 182-94.
248. Greenamyre, J.T. and R.H. Porter, *Anatomy and physiology of glutamate in the CNS*. Neurology, 1994. **44**(11 Suppl 8): p. S7-13.
249. Grillner, S., *The motor infrastructure: from ion channels to neuronal networks*. Nat Rev Neurosci, 2003. **4**(7): p. 573-86.
250. Cooper, J., F. Bloom, and R. Roth, *The biochemical basis of neuropharmacology*, ed. O.U. Press. 2003, New York.
251. Song, I. and R.L. Huganir, *Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity*. Trends Neurosci, 2002. **25**(11): p. 578-88.
252. Contractor, A., et al., *Identification of the kainate receptor subunits underlying modulation of excitatory synaptic transmission in the CA3 region of the hippocampus*. J Neurosci, 2000. **20**(22): p. 8269-78.
253. Frerking, M., R.C. Malenka, and R.A. Nicoll, *Synaptic activation of kainate receptors on hippocampal interneurons*. Nat Neurosci, 1998. **1**(6): p. 479-86.
254. Riedel, G., B. Platt, and J. Micheau, *Glutamate receptor function in learning and memory*. Behav Brain Res, 2003. **140**(1-2): p. 1-47.
255. Bliss, T.V. and G.L. Collingridge, *A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus*. Nature, 1993. **361**(6407): p. 31-9.
256. Nowak, L., et al., *Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons*. Nature, 1984. **307**(5950): p. 462-5.
257. LaMantia, A.S., *Plasticity of mature synapses and circuits*. 2004, Sunderland: Sinauer Associates Inc.
258. Abraham, W.C. and J.M. Williams, *Properties and mechanisms of LTP maintenance*. Neuroscientist, 2003. **9**(6): p. 463-74.

259. Nguyen, P.V., T. Abel, and E.R. Kandel, *Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP*. *Science*, 1994. **265**(5175): p. 1104-7.
260. Abraham, W.C., et al., *Induction and experience-dependent consolidation of stable long-term potentiation lasting months in the hippocampus*. *J Neurosci*, 2002. **22**(21): p. 9626-34.
261. Martin, S.J. and R.G. Morris, *New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited*. *Hippocampus*, 2002. **12**(5): p. 609-36.
262. Purves, D., et al., eds. *Neuroscience*. 3rd ed. 2004, Sinauer Associates: Sunderland, MA.
263. Tada, K., et al., *Anxiolytic 5-hydroxytryptamine_{1A} agonists suppress firing activity of dorsal hippocampus CA1 pyramidal neurons through a postsynaptic mechanism: single-unit study in unanesthetized, unrestrained rats*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999. **288**(2): p. 843-8.
264. Edagawa, Y., H. Saito, and K. Abe, *Stimulation of the 5-HT_{1A} receptor selectively suppresses NMDA receptor-mediated synaptic excitation in the rat visual cortex*. *Brain Res*, 1999. **827**(1-2): p. 225-8.
265. Sakai, N. and C. Tanaka, *Inhibitory modulation of long-term potentiation via the 5-HT_{1A} receptor in slices of the rat hippocampal dentate gyrus*. *Brain Res*, 1993. **613**(2): p. 326-30.
266. Yuen, E.Y., et al., *Serotonin 5-HT_{1A} receptors regulate NMDA receptor channels through a microtubule-dependent mechanism*. *J Neurosci*, 2005. **25**(23): p. 5488-501.
267. Calcagno, E., M. Carli, and R.W. Invernizzi, *The 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT prevents prefrontocortical glutamate and serotonin release in response to blockade of cortical NMDA receptors*. *J Neurochem*, 2006. **96**(3): p. 853-60.
268. Elvander-Tottie, E., et al., *N-methyl-D-aspartate receptors in the medial septal area have a role in spatial and emotional learning in the rat*. *Neuroscience*, 2006. **142**(4): p. 963-78.
269. Elvander-Tottie, E., et al., *5-HT_{1A} and NMDA receptors interact in the rat medial septum and modulate hippocampal-dependent spatial learning*. *Hippocampus*, 2009. **19**(12): p. 1187-98.
270. Gauthier, B.R. and C.B. Wollheim, *Synaptotagmins bind calcium to release insulin*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008. **295**(6): p. E1279-86.
271. Henquin, J.C., *Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose*. *Diabetes*, 2000. **49**(11): p. 1751-60.
272. Ashcroft, F.M. and F.M. Gribble, *New windows on the mechanism of action of K(ATP) channel openers*. *Trends Pharmacol Sci*, 2000. **21**(11): p. 439-45.
273. Cantley, J., et al., *Deletion of PKCepsilon selectively enhances the amplifying pathways of glucose-stimulated insulin secretion via increased lipolysis in mouse beta-cells*. *Diabetes*, 2009. **58**(8): p. 1826-34.
274. Frangioudakis, G., et al., *Diverse roles for protein kinase C delta and protein kinase C epsilon in the generation of high-fat-diet-induced glucose intolerance in mice: regulation of lipogenesis by protein kinase C delta*. *Diabetologia*, 2009. **52**(12): p. 2616-20.
275. Schmitz-Peiffer, C. and T.J. Biden, *PKCdelta blues for the beta-cell*. *Diabetes*, 2010. **59**(1): p. 1-3.
276. Foster, L.J., et al., *Binary interactions of the SNARE proteins syntaxin-4, SNAP23, and VAMP-2 and their regulation by phosphorylation*. *Biochemistry*, 1998. **37**(31): p. 11089-96.
277. Fernandez-Alfonso, T., R. Kwan, and T.A. Ryan, *Synaptic vesicles interchange their membrane proteins with a large surface reservoir during recycling*. *Neuron*, 2006. **51**(2): p. 179-86.
278. MacDonald, P.E. and M.B. Wheeler, *Voltage-dependent K(+) channels in pancreatic beta cells: role, regulation and potential as therapeutic targets*. *Diabetologia*, 2003. **46**(8): p. 1046-62.

279. Lajus, S., et al., *Alpha-latrotoxin induces exocytosis by inhibition of voltage-dependent K⁺ channels and by stimulation of L-type Ca²⁺ channels via latrophilin in beta-cells*. J Biol Chem, 2006. **281**(9): p. 5522-31.
280. Hiriart, M. and L. Aguilar-Bryan, *Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic beta-cell*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **295**(6): p. E1298-306.
281. Newgard, C.B., *While tinkering with the beta-cell...metabolic regulatory mechanisms and new therapeutic strategies: American Diabetes Association Lilly Lecture, 2001*. Diabetes, 2002. **51**(11): p. 3141-50.
282. Rorsman, P., et al., *The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion*. News Physiol Sci, 2000. **15**: p. 72-77.
283. Matschinsky, F.M., *Regulation of pancreatic beta-cell glucokinase: from basics to therapeutics*. Diabetes, 2002. **51 Suppl 3**: p. S394-404.
284. Matschinsky, F.M., B. Glaser, and M.A. Magnuson, *Pancreatic beta-cell glucokinase: closing the gap between theoretical concepts and experimental realities*. Diabetes, 1998. **47**(3): p. 307-15.
285. Dyachok, O., et al., *Glucose-induced cyclic AMP oscillations regulate pulsatile insulin secretion*. Cell Metab, 2008. **8**(1): p. 26-37.
286. Fridlyand, L.E., et al., *Regulation of cAMP dynamics by Ca²⁺ and G protein-coupled receptors in the pancreatic beta-cell: a computational approach*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **293**(6): p. C1924-33.
287. Delmeire, D., et al., *Type VIII adenylyl cyclase in rat beta cells: coincidence signal detector/generator for glucose and GLP-1*. Diabetologia, 2003. **46**(10): p. 1383-93.
288. Masada, N., et al., *Distinct mechanisms of regulation by Ca²⁺/calmodulin of type 1 and 8 adenylyl cyclases support their different physiological roles*. J Biol Chem, 2009. **284**(7): p. 4451-63.
289. Willoughby, D., et al., *Direct demonstration of discrete Ca²⁺ microdomains associated with different isoforms of adenylyl cyclase*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 1): p. 107-17.
290. Frodin, M., et al., *Glucose, other secretagogues, and nerve growth factor stimulate mitogen-activated protein kinase in the insulin-secreting beta-cell line, INS-1*. J Biol Chem, 1995. **270**(14): p. 7882-9.
291. Khoo, S. and M.H. Cobb, *Activation of mitogen-activating protein kinase by glucose is not required for insulin secretion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(11): p. 5599-604.
292. Benes, C., et al., *Rapid activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in response to physiological concentration of glucose in the MIN6 pancreatic beta cell line*. J Biol Chem, 1998. **273**(25): p. 15507-13.
293. Arnette, D., et al., *Regulation of ERK1 and ERK2 by glucose and peptide hormones in pancreatic beta cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(35): p. 32517-25.
294. Gomez, E., C. Pritchard, and T.P. Herbert, *cAMP-dependent protein kinase and Ca²⁺ influx through L-type voltage-gated calcium channels mediate Raf-independent activation of extracellular regulated kinase in response to glucagon-like peptide-1 in pancreatic beta-cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(50): p. 48146-51.
295. Khoo, S., et al., *Regulation of insulin gene transcription by ERK1 and ERK2 in pancreatic beta cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(35): p. 32969-77.
296. Lawrence, M.C., et al., *ERK1/2-dependent activation of transcription factors required for acute and chronic effects of glucose on the insulin gene promoter*. J Biol Chem, 2005. **280**(29): p. 26751-9.
297. German, M., et al., *The insulin gene promoter. A simplified nomenclature*. Diabetes, 1995. **44**(8): p. 1002-4.
298. Malecki, M.T., *Genetics of type 2 diabetes mellitus*. Diabetes Res Clin Pract, 2005. **68 Suppl1**: p. S10-21.

299. Sharma, A., et al., *The reduction of insulin gene transcription in HIT-T15 beta cells chronically exposed to high glucose concentration is associated with the loss of RIPE3b1 and STF-1 transcription factor expression*. Mol Endocrinol, 1995. **9**(9): p. 1127-34.
300. Lu, M., J. Seufert, and J.F. Habener, *Pancreatic beta-cell-specific repression of insulin gene transcription by CCAAT/enhancer-binding protein beta. Inhibitory interactions with basic helix-loop-helix transcription factor E47*. J Biol Chem, 1997. **272**(45): p. 28349-59.
301. Lawrence, M.C., et al., *The roles of MAPKs in disease*. Cell Res, 2008. **18**(4): p. 436-42.
302. Harding, H.P. and D. Ron, *Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes: a review*. Diabetes, 2002. **51 Suppl 3**: p. S455-61.
303. Oyadomari, S., E. Araki, and M. Mori, *Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells*. Apoptosis, 2002. **7**(4): p. 335-45.
304. Oyadomari, S., et al., *Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes*. J Clin Invest, 2002. **109**(4): p. 525-32.
305. Lawrence, M.C., et al., *Differential regulation of CHOP-10/GADD153 gene expression by MAPK signaling in pancreatic beta-cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(28): p. 11518-25.
306. Cline, M.S., et al., *Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape*. Nat Protoc, 2007. **2**(10): p. 2366-82.
307. Prieto, C. and J. De Las Rivas, *APID: Agile Protein Interaction DataAnalyzer*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(Web Server issue): p. W298-302.
308. Montero, J.C., et al., *Expression of c-Kit isoforms in multiple myeloma: differences in signaling and drug sensitivity*. Haematologica, 2008. **93**(6): p. 851-9.
309. Barr, A.M., et al., *Altered performance of reelin-receptor ApoER2 deficient mice on spatial tasks using the Barnes maze*. Behav Neurosci, 2007. **121**(5): p. 1101-5.
310. Heimann, M., et al., *Sublingual and submandibular blood collection in mice: a comparison of effects on body weight, food consumption and tissue damage*. Lab Anim, 2010. **44**(4): p. 352-8.
311. Whitmarsh, A.J., et al., *Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element*. Science, 1995. **269**(5222): p. 403-7.
312. Marais, R., J. Wynne, and R. Treisman, *The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain*. Cell, 1993. **73**(2): p. 381-93.
313. Datta, R., et al., *Reactive oxygen intermediates target CC(A/T)6GG sequences to mediate activation of the early growth response 1 transcription factor gene by ionizing radiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(6): p. 2419-22.
314. Lim, C.P., N. Jain, and X. Cao, *Stress-induced immediate-early gene, egr-1, involves activation of p38/JNK1*. Oncogene, 1998. **16**(22): p. 2915-26.
315. Sartipy, P. and D.J. Loskutoff, *Expression profiling identifies genes that continue to respond to insulin in adipocytes made insulin-resistant by treatment with tumor necrosis factor-alpha*. J Biol Chem, 2003. **278**(52): p. 52298-306.
316. Tarcic, G., et al., *EGR1 and the ERK-ERF axis drive mammary cell migration in response to EGF*. FASEB J, 2011. **26**(4): p. 1582-92.
317. Lazo, P.S., et al., *Structure and mapping of the fosB gene. FosB downregulates the activity of the fosB promoter*. Nucleic Acids Res, 1992. **20**(2): p. 343-50.
318. Wang, W., et al., *Identification of small-molecule inducers of pancreatic beta-cell expansion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(5): p. 1427-32.
319. Gao, N., et al., *Dynamic regulation of Pdx1 enhancers by Foxa1 and Foxa2 is essential for pancreas development*. Genes Dev, 2008. **22**(24): p. 3435-48.
320. Gao, N., et al., *Foxa1 and Foxa2 maintain the metabolic and secretory features of the mature beta-cell*. Mol Endocrinol, 2010. **24**(8): p. 1594-604.
321. Simmons, D.M., et al., *Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors*. Genes Dev, 1990. **4**(5): p. 695-711.

322. Dolle, P., et al., *Expression of GHF-1 protein in mouse pituitaries correlates both temporally and spatially with the onset of growth hormone gene activity.* Cell, 1990. **60**(5): p. 809-20.
323. Lefevre, C., et al., *Tissue-specific expression of the human growth hormone gene is conferred in part by the binding of a specific trans-acting factor.* EMBO J, 1987. **6**(4): p. 971-81.
324. Li, S., et al., *Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1.* Nature, 1990. **347**(6293): p. 528-33.
325. Nelson, C., et al., *Activation of cell-specific expression of rat growth hormone and prolactin genes by a common transcription factor.* Science, 1988. **239**(4846): p. 1400-5.
326. Lin, C., et al., *Pit-1-dependent expression of the receptor for growth hormone releasing factor mediates pituitary cell growth.* Nature, 1992. **360**(6406): p. 765-8.
327. Lin, S.C., et al., *Pituitary ontogeny of the Snell dwarf mouse reveals Pit-1-independent and Pit-1-dependent origins of the thyrotrope.* Development, 1994. **120**(3): p. 515-22.
328. Chen, R.P., et al., *Autoregulation of pit-1 gene expression mediated by two cis-active promoter elements.* Nature, 1990. **346**(6284): p. 583-6.
329. McCormick, A., et al., *Regulation of the pituitary-specific homeobox gene GHF1 by cell-autonomous and environmental cues.* Nature, 1990. **345**(6278): p. 829-32.
330. Gil-Puig, C., et al., *Pit-1 is expressed in normal and tumorous human breast and regulates GH secretion and cell proliferation.* Eur J Endocrinol, 2005. **153**(2): p. 335-44.
331. Bamberger, A.M., et al., *Expression of pit-1 messenger ribonucleic acid and protein in the human placenta.* J Clin Endocrinol Metab, 1995. **80**(7): p. 2021-6.
332. Delhase, M., et al., *The transcription factor Pit-1/GHF-1 is expressed in hemopoietic and lymphoid tissues.* Eur J Immunol, 1993. **23**(4): p. 951-5.
333. Gil-Puig, C., et al., *Pit-1/GHF-1 and GH expression in the MCF-7 human breast adenocarcinoma cell line.* J Endocrinol, 2002. **173**(1): p. 161-7.
334. Laurent, A., et al., *PBX proteins: much more than Hox cofactors.* Int J Dev Biol, 2008. **52**(1): p. 9-20.
335. Schnabel, C.A., et al., *Expression of Pbx1b during mammalian organogenesis.* Mech Dev, 2001. **100**(1): p. 131-5.
336. Swift, G.H., et al., *An endocrine-exocrine switch in the activity of the pancreatic homeodomain protein PDX1 through formation of a trimeric complex with PBX1b and MRG1 (MEIS2).* Mol Cell Biol, 1998. **18**(9): p. 5109-20.
337. Chrousos, G.P. and T. Kino, *Intracellular glucocorticoid signaling: a formerly simple system turns stochastic.* Sci STKE, 2005. **2005**(304): p. pe48.
338. Lewis-Tuffin, L.J. and J.A. Cidlowski, *The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGRbeta) and glucocorticoid resistance.* Ann N Y Acad Sci, 2006. **1069**: p. 1-9.
339. Vegiopoulos, A. and S. Herzig, *Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases.* Mol Cell Endocrinol, 2007. **275**(1-2): p. 43-61.
340. Kumar, R., B.H. Johnson, and E.B. Thompson, *Overview of the structural basis for transcription regulation by nuclear hormone receptors.* Essays Biochem, 2004. **40**: p. 27-39.
341. Scheinman, R.I., et al., *Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors.* Mol Cell Biol, 1995. **15**(2): p. 943-53.
342. Rundlett, S.E., X.P. Wu, and R.L. Miesfeld, *Functional characterizations of the androgen receptor confirm that the molecular basis of androgen action is transcriptional regulation.* Mol Endocrinol, 1990. **4**(5): p. 708-14.
343. Davis, R.L., H. Weintraub, and A.B. Lassar, *Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts.* Cell, 1987. **51**(6): p. 987-1000.
344. Puri, P.L. and V. Sartorelli, *Regulation of muscle regulatory factors by DNA-binding, interacting proteins, and post-transcriptional modifications.* J Cell Physiol, 2000. **185**(2): p. 155-73.

345. Zhu, L., V. Michel, and M. Bakovic, *Regulation of the mouse CTP: phosphoethanolamine cytidyltransferase gene Pcyt2 during myogenesis*. *Gene*, 2009. **447**(1): p. 51-9.
346. Konieczny, S.F., et al., *Inhibition of myogenic differentiation by the H-ras oncogene is associated with the down regulation of the MyoD1 gene*. *Oncogene*, 1989. **4**(4): p. 473-81.
347. Lassar, A.B., et al., *Transformation by activated ras or fos prevents myogenesis by inhibiting expression of MyoD1*. *Cell*, 1989. **58**(4): p. 659-67.
348. Weinberg, R.A., *The retinoblastoma protein and cell cycle control*. *Cell*, 1995. **81**(3): p. 323-30.
349. Bracken, A.P., et al., *E2F target genes: unraveling the biology*. *Trends Biochem Sci*, 2004. **29**(8): p. 409-17.
350. Zhou, C., et al., *E2F1 induces pituitary tumor transforming gene (PTTG1) expression in human pituitary tumors*. *Mol Endocrinol*, 2009. **23**(12): p. 2000-12.
351. Kim, D., et al., *Pituitary tumour transforming gene (PTTG) induces genetic instability in thyroid cells*. *Oncogene*, 2005. **24**(30): p. 4861-6.
352. Abbud, R.A., et al., *Early multipotential pituitary focal hyperplasia in the alpha-subunit of glycoprotein hormone-driven pituitary tumor-transforming gene transgenic mice*. *Mol Endocrinol*, 2005. **19**(5): p. 1383-91.
353. Greene, L.A. and A.S. Tischler, *Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1976. **73**(7): p. 2424-8.
354. Fernandez-Medarde, A., et al., *Laser microdissection and microarray analysis of the hippocampus of Ras-GRF1 knockout mice reveals gene expression changes affecting signal transduction pathways related to memory and learning*. *Neuroscience*, 2007. **146**(1): p. 272-85.
355. Liang, M., et al., *Role of the pituitary tumor transforming gene 1 in the progression of hepatocellular carcinoma*. *Cancer Biol Ther*, 2010. **11**(3): p. 337-45.
356. Liu, C.L., et al., *L2dtl is essential for cell survival and nuclear division in early mouse embryonic development*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(2): p. 1109-18.
357. Yu, R., et al., *Murine pituitary tumor-transforming gene functions as a securin protein in insulin-secreting cells*. *J Endocrinol*, 2006. **191**(1): p. 45-53.
358. Yuen, K., *Chromosome Instability (CIN), Aneuploidy and Cancer*. eLS, 2010.
359. Musacchio, A. and E.D. Salmon, *The spindle-assembly checkpoint in space and time*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(5): p. 379-93.
360. Peters, J.M., *The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. **7**(9): p. 644-56.
361. Sullivan, M. and D.O. Morgan, *Finishing mitosis, one step at a time*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(11): p. 894-903.
362. Malumbres, M. and M. Barbacid, *Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm*. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(3): p. 153-66.
363. Perez de Castro, I., G. de Carcer, and M. Malumbres, *A census of mitotic cancer genes: new insights into tumor cell biology and cancer therapy*. *Carcinogenesis*, 2007. **28**(5): p. 899-912.
364. Carter, S.L., et al., *A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers*. *Nat Genet*, 2006. **38**(9): p. 1043-8.
365. Fukasawa, K., *Oncogenes and tumour suppressors take on centrosomes*. *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(12): p. 911-24.
366. Huff, K., D. End, and G. Guroff, *Nerve growth factor-induced alteration in the response of PC12 pheochromocytoma cells to epidermal growth factor*. *J Cell Biol*, 1981. **88**(1): p. 189-98.

367. Meakin, S.O., *Recent Research Developments in Neurochemistry*. 2000. **3**: p. 75-91.
368. McAllister, A.K., L.C. Katz, and D.C. Lo, *Opposing roles for endogenous BDNF and NT-3 in regulating cortical dendritic growth*. *Neuron*, 1997. **18**(5): p. 767-78.
369. Kang, H., et al., *Neurotrophins and time: different roles for TrkB signaling in hippocampal long-term potentiation*. *Neuron*, 1997. **19**(3): p. 653-64.
370. Ghosh, A., J. Carnahan, and M.E. Greenberg, *Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons*. *Science*, 1994. **263**(5153): p. 1618-23.
371. Martinez, A., et al., *TrkB and TrkC signaling are required for maturation and synaptogenesis of hippocampal connections*. *J Neurosci*, 1998. **18**(18): p. 7336-50.
372. Marshall, C.J., *Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation*. *Cell*, 1995. **80**(2): p. 179-85.
373. York, R.D., et al., *Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor*. *Nature*, 1998. **392**(6676): p. 622-6.
374. Meakin, S.O., et al., *The signaling adapter FRS-2 competes with Shc for binding to the nerve growth factor receptor TrkA. A model for discriminating proliferation and differentiation*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(14): p. 9861-70.
375. Carpenter, G. and S. Cohen, *Epidermal growth factor*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(14): p. 7709-12.
376. Dumaz, N. and R. Marais, *Protein kinase A blocks Raf-1 activity by stimulating 14-3-3 binding and blocking Raf-1 interaction with Ras*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(32): p. 29819-23.
377. Herbst, K.J., M.D. Allen, and J. Zhang, *Spatiotemporally regulated protein kinase A activity is a critical regulator of growth factor-stimulated extracellular signal-regulated kinase signaling in PC12 cells*. *Mol Cell Biol*. **31**(19): p. 4063-75.
378. Pozzan, T., et al., *Ca²⁺-dependent and -independent release of neurotransmitters from PC12 cells: a role for protein kinase C activation?* *J Cell Biol*, 1984. **99**(2): p. 628-38.
379. Mendoza, M.C., E.E. Er, and J. Blenis, *The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation*. *Trends Biochem Sci*, 2011. **36**(6): p. 320-8.
380. Bach, M.E., et al., *Impairment of spatial but not contextual memory in CaMKII mutant mice with a selective loss of hippocampal LTP in the range of the theta frequency*. *Cell*, 1995. **81**(6): p. 905-15.
381. Holmes, A., et al., *Behavioral profiles of inbred strains on novel olfactory, spatial and emotional tests for reference memory in mice*. *Genes Brain Behav*, 2002. **1**(1): p. 55-69.
382. Paylor, R., et al., *Learning impairments and motor dysfunctions in adult Lhx5-deficient mice displaying hippocampal disorganization*. *Physiol Behav*, 2001. **73**(5): p. 781-92.
383. Pompl, P.N., et al., *Adaptation of the circular platform spatial memory task for mice: use in detecting cognitive impairment in the APP(SW) transgenic mouse model for Alzheimer's disease*. *J Neurosci Methods*, 1999. **87**(1): p. 87-95.
384. d'Isa, R., et al., *Mice Lacking Ras-GRF1 Show Contextual Fear Conditioning but not Spatial Memory Impairments: Convergent Evidence from Two Independently Generated Mouse Mutant Lines*. *Front Behav Neurosci*, 2011. **5**: p. 78.
385. Christie, J.M., R.J. Wenthold, and D.T. Monaghan, *Insulin causes a transient tyrosine phosphorylation of NR2A and NR2B NMDA receptor subunits in rat hippocampus*. *J Neurochem*, 1999. **72**(4): p. 1523-8.
386. Muller, A.P., et al., *Exercise increases insulin signaling in the hippocampus: physiological effects and pharmacological impact of intracerebroventricular insulin administration in mice*. *Hippocampus*, 2010. **21**(10): p. 1082-92.
387. Murras, N., et al., *Sex steroids, growth hormone, insulin-like growth factor-1: neuroendocrine and metabolic regulation in puberty*. *Horm Res*, 1996. **45**(1-2): p. 74-80.
388. George, M., et al., *Beta cell expression of IGF-I leads to recovery from type 1 diabetes*. *J Clin Invest*, 2002. **109**(9): p. 1153-63.

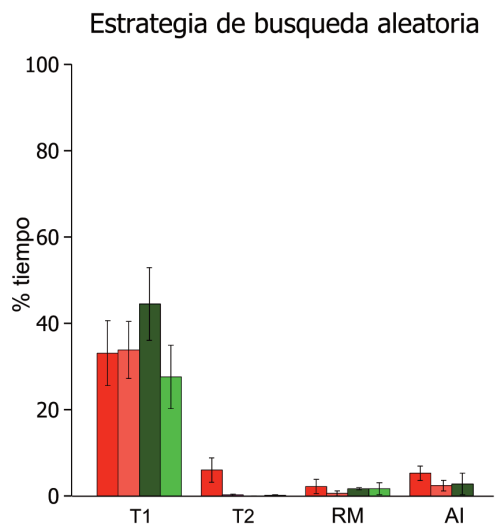
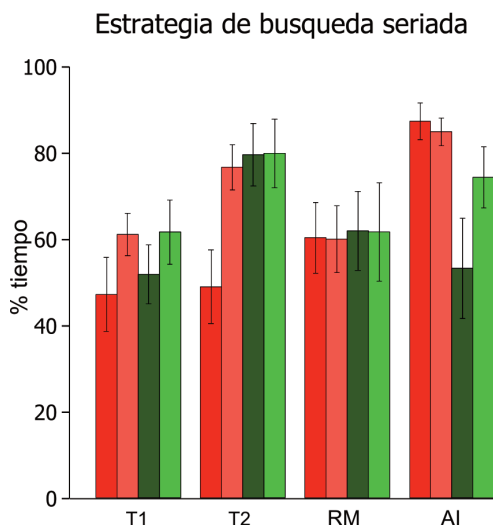
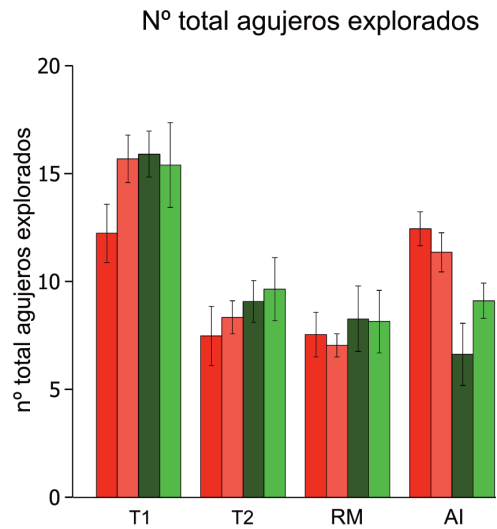
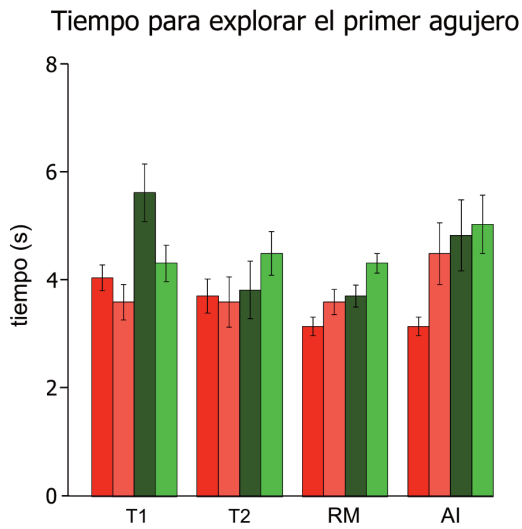
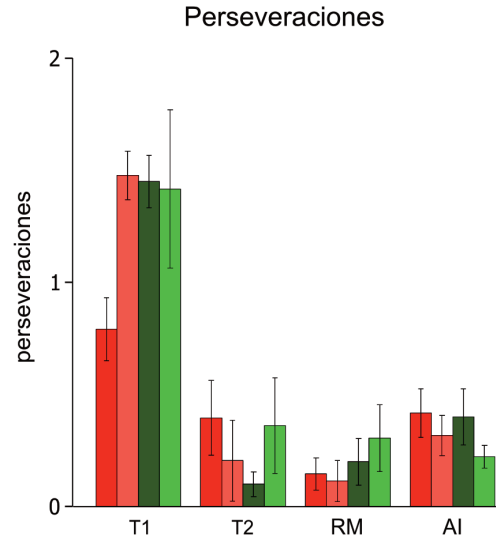
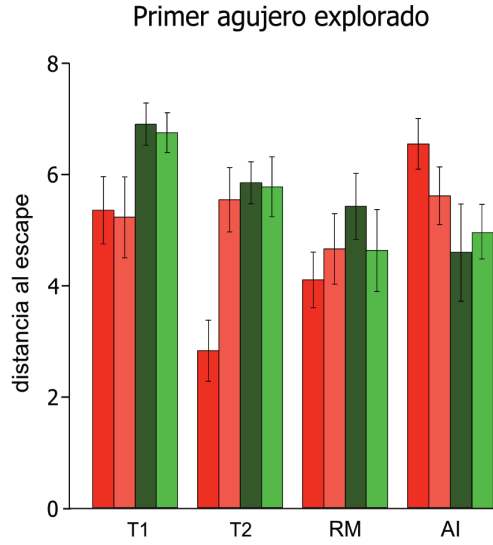
NOMBRE (UNIPROT)	DESCRIPCIÓN
HDAC7_HUMAN	Histone deacetylase 7
HD_HUMAN	Huntingtin
PIAS1_HUMAN	E3 SUMO-protein ligase PIAS1
G3P_HUMAN	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
TF2AA_HUMAN	Transcription initiation factor IIA subunit 1
HDAC1-HUMAN	Histone deacetylase 1
CUL1_HUMAN	Cullin-1
MEF2D_HUMAN	Myocyte-specific enhancer factor 2D
LT_SV40	Large T antigen
SMCA4_HUMAN	Probable global transcription activator SNF2L4
TF3B_HUMAN	Transcription factor IIIB 90 kDa subunit
WWTR1_HUMAN	WW domain-containing transcription regulator protein 1
HNF4A-HUMAN	Hepatocyte nuclear factor 4-alpha
CCND1_HUMAN	G1/S-specific cyclin-D1
PML_HUMAN	Probable transcription factor PML
ARI3A_HUMAN	AT-rich interactive domain-containing protein 3A
CCNA2_HUMAN	Cyclin-A2
TAF1B-HUMAN	TATA box-binding protein-associated factor RNA polymerase I subunit B
CDK7_HUMAN	Cell division protein kinase 7
NUCL_HUMAN	Nucleolin
TF2H1_HUMAN	General transcription factor IIH subunit 1
ANDR-HUMAN	Androgen receptor
HMGB2-HUMAN	High mobility group protein B2
CEBPB_HUMAN	CCAAT/enhancer-binding protein beta
FOXO1-HUMAN	Forkhead box protein O1
P73_HUMAN	Tumor protein p73
PCAF_HUMAN	Histone acetyltransferase PCAF
CABL1-MOUSE	CDK5 and ABL1 enzyme substrate 1
HSF1_HUMAN	Heat shock factor protein 1
PHB_HUMAN	Prohibitin
PARP1-HUMAN	Poly "ADP-ribose" polymerase 1
2AAA_HUMAN	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform
SUMO3_HUMAN	Small ubiquitin-related modifier 3
PCK2_HUMAN	Serine/threonine-protein kinase PCK2
VE6_HPV18	Protein E6
ATF3_HUMAN	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-3
ATR_HUMAN	Serine/threonine-protein kinase ATR
HIPK1_HUMAN	Homeodomain-interacting protein kinase 1
JUN_HUMAN	Transcription factor AP-1
CREM_HUMAN	cAMP-responsive element modulator
KU70_HUMAN	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1

CDC2_HUMAN	Cell division control protein 2 homolog
TAF9_HUMAN	Transcription initiation factor TFIID subunit 9
SET_HUMAN	Protein SET
FOS_HUMAN	Proto-oncogene protein c-fos
TFDP1-HUMAN	Transcription factor Dp-1
RUVB2_HUMAN	RuvB-like 2
NF1_HUMAN	Neurofibromin
GCR-HUMAN	Glucocorticoid receptor
TFDP2_HUMAN	Transcription factor Dp-2
TIP60_HUMAN	Histone acetyltransferase HTATIP
TAF1C-HUMAN	TATA box-binding protein-associated factor RNA polymerase I subunit C
MAT1_HUMAN	CDK-activating kinase assembly factor MAT1
SYEP_HUMAN	Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase
CSK21_HUMAN	Casein kinase II subunit alpha
SMRC1-HUMAN	SWI/SNF complex subunit SMARCC1
DAXX_HUMAN	Death domain-associated protein 6
TAZ_HUMAN	Tafazzin
ATF1_HUMAN	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-1
IASPP_HUMAN	RelA-associated inhibitor
NFKB1-HUMAN	Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit
MDM4_HUMAN	Protein Mdm4
FHL2_HUMAN	Four and a half LIM domains protein 2
MK01-HUMAN	Mitogen-activated protein kinase 1
UBC9-HUMAN	SUMO-conjugating enzyme UBC9
NMDZ1_HUMAN	Glutamate "NMDA" receptor subunit zeta-1
RB_HUMAN	Retinoblastoma-associated protein
GRB2_HUMAN	Growth factor receptor-bound protein 2
MIP_HUMAN	Lens fiber major intrinsic protein
NECD-HUMAN	Necdin
SP1-HUMAN	Transcription factor Sp1
CABL1-HUMAN	CDK5 and ABL1 enzyme substrate 1
HSP7C_HUMAN	Heat shock cognate 71 kDa protein
ABL1-HUMAN	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase ABL1
RUVB1_HUMAN	RuvB-like 1
NFYB_HUMAN	Nuclear transcription factor Y subunit beta
NCOA1_HUMAN	Nuclear receptor coactivator 1
SMAD4_HUMAN	Mothers against decapentaplegic homolog 4
CASP8_HUMAN	Caspase-8
TF65_HUMAN	Transcription factor p65
SMAD2_HUMAN	Mothers against decapentaplegic homolog 2
CASP3_HUMAN	Caspase-3
SYUA_HUMAN	Alpha-synuclein
P53_HUMAN	Cellular tumor antigen p53
SMAD3_HUMAN	Mothers against decapentaplegic homolog 3

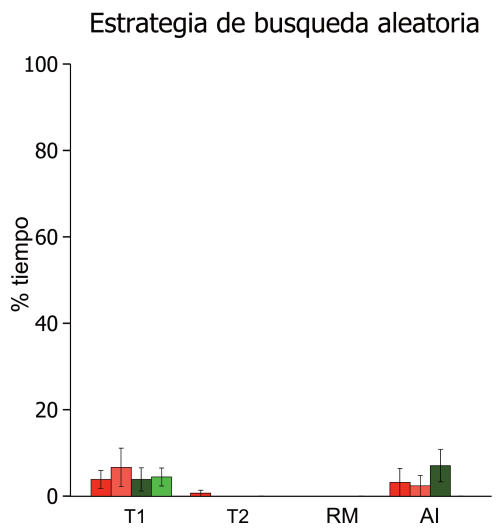
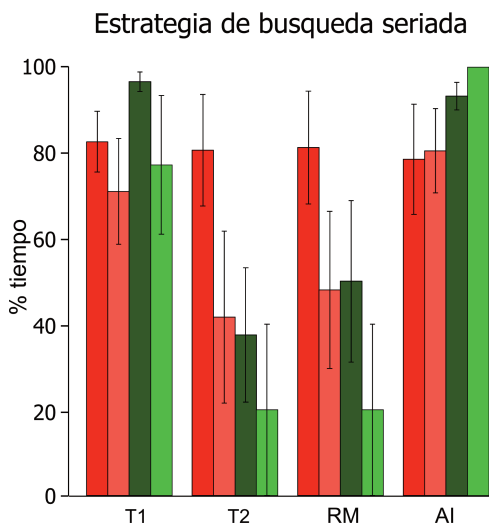
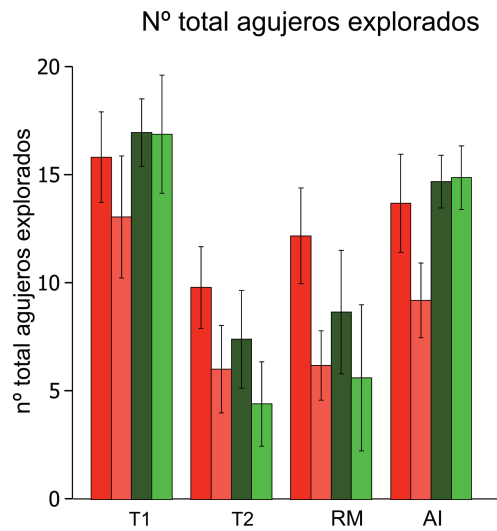
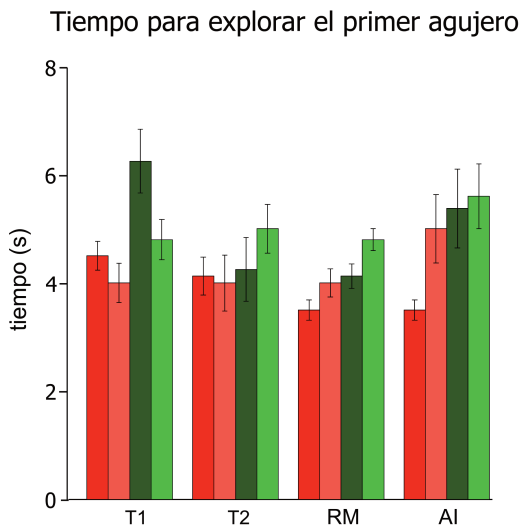
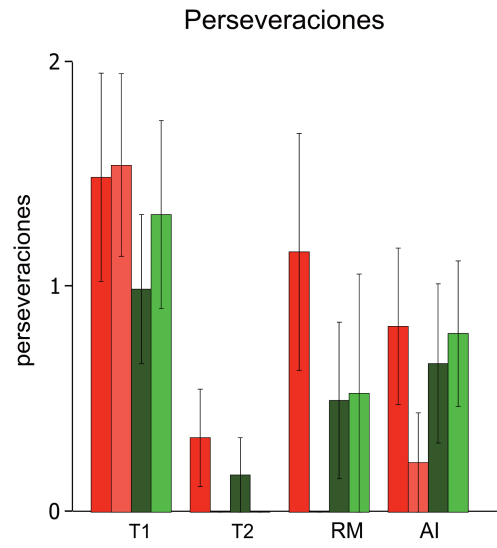
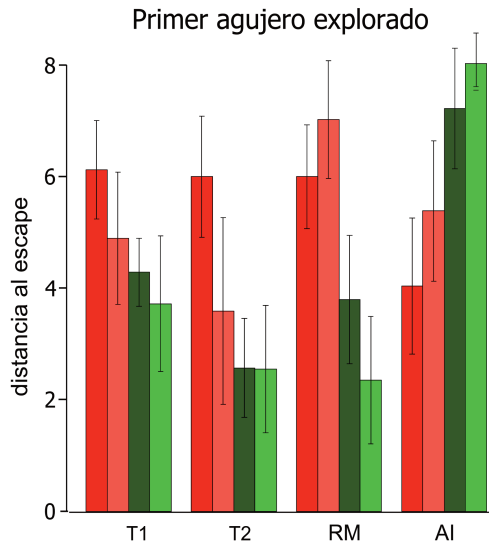
MED1_HUMAN	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 1
TP53B_HUMAN	Tumor suppressor p53-binding protein 1
TBP-HUMAN	TATA-box-binding protein
YAP1_HUMAN	65 kDa Yes-associated protein
HIPK2_HUMAN	Homeodomain-interacting protein kinase 2
SNF5_HUMAN	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily B member 1
MSX1_HUMAN	Homeobox protein MSX-1
MK11-HUMAN	Mitogen-activated protein kinase 11
SRC_HUMAN	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
CHD3_HUMAN	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 3
MYC_HUMAN	Myc proto-oncogene protein
CHX9_HUMAN	ATP-dependent RNA helicase A
E2F1-HUMAN	Transcription factor E2F1
IFI5B_MOUSE	Interferon-activable protein 205-B
EGR1_HUMAN	Early growth response protein 1
FYN_HUMAN	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn
PABP4_HUMAN	Polyadenylate-binding protein 4
BRCA1_HUMAN	Breast cancer type 1 susceptibility protein
MK08-HUMAN	Mitogen-activated protein kinase 8
AKT1_HUMAN	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase
HDAC4_HUMAN	Histone deacetylase 4
NCK1_HUMAN	Cytoplasmic protein NCK1
MTA2_HUMAN	Metastasis-associated protein MTA2
TAF1A-HUMAN	TATA box-binding protein-associated factor RNA polymerase I subunit A
NYFA-HUMAN	Nuclear transcription factor Y subunit alpha
KZF3-HUMAN	Zinc finger protein Aiolos
NCOA2_HUMAN	Nuclear receptor coactivator 2
CDK2_HUMAN	Cell division protein kinase 2
SP3_HUMAN	Transcription factor Sp3
CDN1A-HUMAN	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1
PKCDELTA_HUMAN	Protein kinase C delta type
VRK1_HUMAN	Serine/threonine-protein kinase VRK1
TAF1-HUMAN	Transcription initiation factor TFIID subunit 1
TAF6-HUMAN	Transcription initiation factor TFIID subunit 6
H2B2E_HUMAN	Histone H2B type 2-E
STAT3_HUMAN	Signal transducer and activator of transcription 3
PRKDC_HUMAN	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
PIAS2_HUMAN	E3 SUMO-protein ligase PIAS2
MK09_HUMAN	Mitogen-activated protein kinase 9
TAF2_HUMAN	Transcription initiation factor IIA subunit 2
PTEN-HUMAN	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase
YY1_HUMAN	Transcriptional repressor protein YY1
THRA_HUMAN	Thyroid hormone receptor alpha

MP2K1_HUMAN	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1
RBL1_HUMAN	Retinoblastoma-like protein 1
SAP18_HUMAN	Histone deacetylase complex subunit SAP18
HIF1A_HUMAN	Hypoxia-inducible factor 1 alpha
KLF4_HUMAN	Krueppel-like factor 4
CSN2_HUMAN	COP9 signalosome complex subunit 2
MCM2_HUMAN	DNA replication licensing factor MCM2
EP300_HUMAN	Histone acetyltransferase p300
MAPK5_HUMAN	MAP kinase-activated protein kinase 5
SUMO1-HUMAN	Small ubiquitin-related modifier 1
GSK3B_HUMAN	Glycogen synthase kinase-3 beta
HMGB1_HUMAN	High mobility group protein B1
KLF6_HUMAN	Krueppel-like factor 6
CDK5-HUMAN	Cell division protein kinase 5
MK03-HUMAN	Mitogen-activated protein kinase 3
CD2A2_HUMAN	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, isoform 4
GCR-MOUSE	Glucocorticoid receptor
CHK2_HUMAN	Serine/threonine-protein kinase Chk2
CBP_HUMAN	CREB-binding protein
NCOR2_HUMAN	Nuclear receptor corepressor 2
ESR1_HUMAN	Estrogen receptor
HNRPK_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
ESR2_HUMAN	Estrogen receptor beta
CSN7A_HUMAN	COP9 signalosome complex subunit 7a
SIN3A-HUMAN	Paired amphipathic helix protein Sin3a
MDM2-HUMAN	E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2
UBIQ_HUMAN	Ubiquitin
NCOA3_HUMAN	Nuclear receptor coactivator 3
VE2-HPV16	Regulatory protein E2
MK07_HUMAN	Mitogen-activated protein kinase 7
BARD1_HUMAN	BRCA1-associated RING domain protein 1

Gráficas de los ratones WT y KO Pttg1



Gráficas de los ratones WT y KO RasGrf1



Gráficas de los ratones WT y KO RasGrf1-Pttg1

