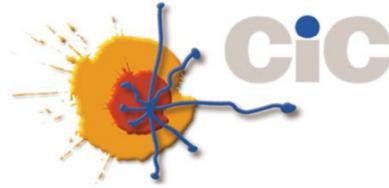




VNiVERSiDAD
D SALAMANCA



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

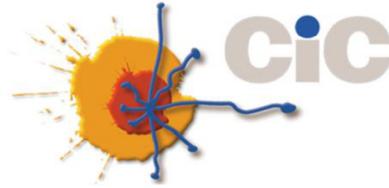
**Caracterización genómica y funcional de
fibroblastos embrionarios derivados de ratones
knockout para *Sos1* y *Sos2***

TESIS DOCTORAL

**Alicia Ginel Picardo
Salamanca, 2012**



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA



D. EUGENIO SANTOS DE DIOS, Catedrático del Departamento de Microbiología y Genética, y **D. ALBERTO FERNÁNDEZ MEDARDE**, profesor contratado doctor de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada **“Caracterización genómica y funcional de fibroblastos embrionarios derivados de ratones *knockout* para *Sos1* y *Sos2*”** presentada por la licenciada **ALICIA GINEL PICARDO**, 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 Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste a efectos legales, expide el presente certificado en Salamanca, a 27 de marzo de 2012.

Eugenio Santos de Dios

Director de la tesis

Alberto Fernández Medarde

Codirector de la tesis

Esta memoria ha sido realizada siendo **ALICIA GINEL PICARDO** beneficiaria de una beca FPU del Ministerio de Educación y Ciencia para la realización de la tesis doctoral (2005-2008).

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 (USAL/CSIC). 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 dianas 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 oncoproteínas 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

TABLA DE CONTENIDOS

Glosario de Abreviaturas	v
Índice de Figuras	vii
Índice de Tablas	ix

Introducción	1
--------------------	---

1. Conceptos generales	1
2. La familia de proteínas Sos	4
2.1 Miembros	4
2.2 Estructura	5
2.3 Regulación de la Actividad	7
2.3.1 Modelo clásico de translocación a la membrana	7
2.3.2 Mecanismo de activación alostérica e inhibición intramolecular	8
2.3.3 Regulación de la actividad mediante fosforilación	10
2.3.4 Regulación de la actividad GEF dual	11
3. Participación de las proteínas Sos en rutas de señalización intracelular	13
3.1 Señales activadoras	13
3.2 Señalización efectora	15
3.2.1 Rutas de señalización mediadas por Ras/MAPKs	16
(i) Ruta de señalización Ras/ERK	17
(ii) Papel de la ruta Ras/ERK en la progresión G1/S del ciclo celular	22
3.2.2 Rutas de señalización mediadas por PI3K	25
(i) Ruta de señalización PI3K/Akt	26
(ii) Contribución de la ruta PI3K/Akt a la progresión G1/S del ciclo celular	29
(iii) Señalización mediada por PI3K independiente de Akt	30
3.2.3 Otra señalización de interés	30
4. Significado funcional de las proteínas Sos in vivo	30
4.1 Análisis funcional de las proteínas Sos. Modelos animales	30
4.1.1 Pérdida de función	31
(i) Modelos animales	31
(ii) Cultivos celulares	32
4.1.2 Ganancia de función	33
4.2 Patologías asociadas a la función de Sos	34
4.2.1 Papel de Sos en procesos cancerígenos	34
4.2.2 Síndrome de Noonan	35
4.2.3 Fibromatosis gingival hereditaria tipo 1	38
4.2.4 Otras patologías	39

Objetivos	41
Materiales y Métodos	43
1. Inmortalización de fibroblastos embrionarios (MEFs)	43
2. Cultivos celulares	43
3. Extracción de DNA	44
4. Extracción de RNA	45
5. Hibridación con microarrays de expresión	46
5.1 Descripción de las muestras	46
5.2 Hibridación con microarrays GeneChip® de Affymetrix	46
6. Análisis de los datos de Microarrays de expresión	48
7. PCR cuantitativa o PCR en tiempo real	50
7.1 Transcripción inversa del RNA total extraído (Síntesis del cDNA)	50
7.2 PCR en tiempo real con SYBR Green	51
7.3 Diseño de los oligos	53
8. Curva de crecimiento y tiempo de duplicación	55
9. Extracción de proteínas, electroforesis y Western blot	55
9.1 Extracción de proteínas	55
9.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida y Western blot	56
10. Ensayos de precipitación de proteínas por afinidad o ensayos de pull down	58
11. Transducción lentiviral para el silenciamiento estable con shRNA	59
12. Ensayo de proliferación MTT	60
13. Citometría de flujo	60
13.1 Análisis del ciclo celular	60
13.2 Análisis de la muerte celular	61
13.3 Análisis de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	62
14. Análisis estadístico	63
Resultados	65
1. ANÁLISIS DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL DEPENDIENTE DE LA EXPRESIÓN DE SOS1 Y SOS2 EN FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS DE RATÓN	65
1.1 Confirmación del genotipo de las líneas celulares utilizadas	66
1.2 Microarrays de expresión: identificación de los genes expresados diferencialmente en MEFs <i>ko-Sos1</i> y <i>ko-Sos2</i>	66
1.3 Validación de los resultados obtenidos con los microarrays de expresión	68
1.3.1 Validación de los cambios en el RNA mediante PCR	69
1.3.2 Validación de los cambios de expresión proteica	70
1.4 Análisis funcional de los resultados obtenidos con los microarrays de expresión.	72

1.4.1	Clasificación y enriquecimiento funcional basado en categorías GO	72
1.4.2	Análisis de las funciones y rutas de señalización canónicas alteradas en fibroblastos ko-Sos1 mediante el programa IPA de Ingenuity	78
2.	CONTRIBUCIÓN DE SOS1 Y SOS2 EN LAS PRINCIPALES RUTAS DE SEÑALIZACIÓN MEDIADAS POR RAS	80
2.1	Efecto de Sos1 y Sos2 sobre la capacidad proliferativa en cultivo	80
2.2.	Estudio de la contribución de Sos1 y Sos2 a la activación de Ras y sus rutas efectoras	80
2.2.1	Papel de Sos1 y Sos2 en la activación de Ras, ERK1/2 y Akt	81
2.2.2	Papel de Sos1 y Sos2 sobre efectores de ERK y Akt	83
2.3	Estudio del ciclo celular en fibroblastos wt, ko-Sos1 y ko-Sos2	88
2.4	Estudio de la muerte celular inducida por tBHP en líneas wt, ko-Sos1 y ko-Sos2	90
3.	CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE SOS1 Y SOS2 MEDIANTE SILENCIAMIENTO ESTABLE DE SU EXPRESIÓN EN FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS DE RATÓN. Comparativa con los resultados anteriores en modelos knockout	92
3.1	Generación de clones con inhibición estable: shSos1 y shSos2	92
3.2	Confirmación de los cambios transcripcionales observados en las líneas ko-Sos1 y ko-Sos2	94
3.3	Efecto del silenciamiento estable de Sos1 y Sos2 en la activación de Ras y sus rutas efectoras	95
3.3.1	Activación de Ras en clones shSos1 y shSos2	95
3.3.2	Activación de ERK1/2 y Akt en clones shSos1 y shSos2	95
3.3.3	Efecto del silenciamiento de Sos1 y Sos2 sobre la fosforilación de GSK3 β y p70 ^{SGK} tras la estimulación con FBS, PDGF y EGF	97
3.4	Análisis de la capacidad proliferativa en clones shSos1 y shSos2	100
3.4.1	Efecto del silenciamiento de Sos1 y Sos2 sobre la proliferación en cultivo	100
3.4.2	Expresión de las ciclinas tipo D en clones shSos1 y shSos2	101
3.4.3	Análisis del ciclo celular en clones shSos1 y shSos2	103
3.5	Muerte celular y estrés oxidativo en células silenciadas para Sos1 o Sos2	105
3.5.1	Estudio de la muerte inducida por tBHP en clones shSos1 y shSos2	105
3.5.2	Análisis del potencial de membrana mitocondrial y del nivel de ROS intracelular en condiciones basales y de estrés oxidativo	108
3.5.3	Expresión de Sod2 en clones con silenciamiento de Sos1 y Sos2	111
Discusión		115
1.	Perfiles transcripcionales asociados a la ausencia de Sos1 y Sos2: especificidad funcional frente a redundancia	115

(i) Relevancia del papel de Sos1 frente a Sos2 en el desarrollo	117
(ii) Efecto predominante de Sos1 en otras funciones	119
2. Modelo de MEFs knockout inmortalizados	121
(i) Capacidad proliferativa en ausencia de las proteínas Sos	121
(ii) Las rutas de señalización mediadas por Ras en ausencia de Sos	123
(iii) Efecto de la eliminación de Sos en la muerte celular inducida por estrés oxidativo	127
3. Modelo de inhibición estable mediante shRNA	128
(i) Especificidad funcional: papel de Sos1 en la proliferación y la señalización intracelular	128
(ii) Hipótesis del efecto del estrés oxidativo sobre la señalización intracelular	130
Conclusiones	135
Apéndice	137
Bibliografía	145

Glosario de Abreviaturas

A

AhR: Receptor de hidrocarburos aromáticos

B

BCR: Receptor de células B
BSA: Albúmina sérica bovina

C

cAMP: Adenosín-3',5'-monofosfato cíclico
CDKs: Quinasas dependientes de ciclinas
cDNA: DNA complementario
cGMP: Guanosín-3',5'-monofosfato cíclico
CKI: Inhibidor de CDKs

D

DAG: Diacilglicerol
DEPC: Dietilpirocarbonato
DHE: Dihidroetidio
DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbeco
DMSO: Dimetil sulfóxido
DNA: Ácido desoxirribonucleico
dNTPs: Desoxinucleótido trifosfato
DTT: Ditiotreitól
DUSPs: Fosfatasa de especificidad dual

E

EDTA: Ácido etilen-diamino tetracético
EGF: Factor de crecimiento epidermal
ERK: Quinasas activadas por estímulos extracelulares
FAK: Quinasa de adhesiones focales
FBS: Suero bovino fetal
FDR: Tasa de falsos positivos

G

GAPs: Proteínas activadoras de la actividad GTPasa
Gapdh: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GDP: Guanosín 5-difosfato
GEFs: Factores de intercambio de nucleótidos de guanina
GO: *Gene Ontology*
GPCR: Receptores acoplados a proteínas G
GTP: Guanosín 5-trifosfato

I

IEGs: Genes de respuesta inmediata

IP: Ioduro de propidio
IRS: Sustrato del receptor de insulina

J

JMML: Leucemia juvenil mielomonocítica

L

Log₂Fold: Logaritmo en base 2 del ratio

M

MAPKs: Quinasas activadas por mitógenos
MEF: Fibroblastos embrionarios de ratón
MKPs: Fosfatasa de las MAPKs
moi: Multiplicidad de infección
mRNA: RNA mensajero
MTT: Metil tiazol tetrazolio

N

NAC: N-acetil cisteína
NCFC: Neuro-craneo-facio-cutáneo
NF1: Neurofibromina 1

P

PA: Ácido fosfatídico
pb: Pares de bases
PBS: Tampón salino fosfato
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa
PIP₂: Fosfatidilinositol-3,4-bisfosfato
PIP₃: Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato
PLC: Fosfolipasa C
PTB: Sitio de unión a fosfotirosinas
PTK: Proteínas tirosina quinasa

R

RB: Retinoblastoma
RNA: Ácido ribonucleico
ROS: Especies reactivas de oxígeno
rpm: Revoluciones por minuto
rRNA: RNA ribosómico
RTKs: Receptores tirosina quinasa

S

SAPKs: Proteínas quinasas activadas por estrés
SDS: Dodecil sulfato sódico
SH2: Dominio de homología a Src de tipo 2
SH3: Dominio de homología a Src de tipo 3
shRNA: RNA de interferencia ahorquillado
SNPs: Polimorfismos de nucleótido único

SRE: Elemento de respuesta a suero
SRF: Factor de respuesta a suero

T

TBS-T:

TCDD:

TCR: Receptor de células T

Tm: Temperatura de melting

X

XRE: Elemento de respuesta xenobiótica

Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo de activación de las GTPasas de la familia Ras	2
Figura 2. Estructura de las proteínas de la familia Sos	6
Figura 3. Modelo actual de activación de Sos en la membrana	9
Figura 4. Regulación de la actividad GEF de Sos sobre las GTPasas Ras y Rac	12
Figura 5. Señales activadoras de las proteínas Sos	13
Figura 6. Vías efectoras de las proteínas Ras	16
Figura 7. Cascadas de MAPKs en mamíferos	17
Figura 8. Ruta de señalización Ras/MAPKs	19
Figura 9. Regulación de la señal en la ruta Ras/ERK	21
Figura 10. Rutas efectoras de Ras en la progresión de la fase G1 del ciclo celular	22
Figura 11. Regulación de la expresión génica mediada por MAPKs	25
Figura 12. Ruta de señalización PI3K/Akt	27
Figura 13. Mutaciones en SOS1 asociadas a patologías humanas	36
Figura 14. Enfermedades humanas asociadas a mutaciones genes de la ruta Ras/MAPKs	37
Figura 15. Definición de los grupos muestrales	49
Figura 16. Análisis del genotipo de las líneas celulares utilizadas	66
Figura 17. Significación estadística de los contrastes seleccionados	67
Figura 18. Validación de los cambios de expresión detectados en microarrays mediante PCR cuantitativa	70
Figura 19. Validación de los cambios de expresión detectados en microarrays mediante Western blot	71
Figura 20. Análisis de enriquecimiento funcional con la aplicación bioinformática DAVID	74
Figura 21. Resultado del análisis funcional mediante el programa IPA de Ingenuity	79
Figura 22. Curvas de crecimiento de MEFs <i>wt</i> , <i>ko-Sos1</i> y <i>ko-Sos2</i>	81
Figura 23. Efecto de la eliminación de Sos1 o Sos2 sobre la activación de Ras y sus rutas efectoras	83
Figura 24. Inhibición de la ruta PI3K-Akt	85
Figura 25. Efecto de la eliminación de Sos1 y Sos2 sobre la fosforilación de GSK3 β	86
Figura 26. Efecto de la eliminación de Sos1 y Sos2 sobre la fosforilación de mTOR.	87
Figura 27. Efecto de la eliminación de Sos1 y Sos2 sobre la fosforilación de p70 ^{S6K}	88

Figura 28. Análisis del ciclo celular de MEFs <i>wt</i> , <i>ko-Sos1</i> y <i>ko-Sos2</i>	89
Figura 29. Muerte celular inducida por tBHP en MEFs <i>wt</i> , <i>ko-Sos1</i> y <i>ko-Sos2</i>	91
Figura 30. Silenciamiento de <i>Sos1</i> y <i>Sos2</i> en fibroblastos embrionarios mediante interferencia estable con shRNA.	93
Figura 31. Confirmación de los cambios de expresión observados en líneas <i>ko-Sos1</i> y <i>ko-Sos2</i> en clones <i>shSos1</i> y <i>shSos2</i>	94
Figura 32. Activación de Ras en células <i>shSos1</i> y <i>shSos2</i>	96
Figura 33. Fosforilación de ERK1/2 en células <i>shSos1</i> y <i>shSos2</i>	97
Figura 34. Fosforilación de Akt en células <i>shSos1</i> y <i>shSos2</i>	98
Figura 35. Fosforilación de los efectores GSK3 β y p70 ^{S6K} en fibroblastos <i>shSos1</i> y <i>shSos2</i> tras la estimulación con FBS	99
Figura 36. Fosforilación de Akt, ERK1/2, GSK3 β y p70 ^{S6K} en fibroblastos <i>shSos1</i> y <i>shControl</i> tras la estimulación con PDGF y EGF	100
Figura 37. Medida de la proliferación celular en clones <i>shSos1</i> y <i>shSos2</i>	101
Figura 38. Nivel de expresión de ciclinas tipo D y de represores de la <i>Ccnd1</i> en clones <i>shSos1</i> y <i>shSos2</i>	102
Figura 39. Estudio del ciclo celular y reguladores de la transición G1-S en ausencia de proteínas Sos	104
Figura 40. Expresión de los inhibidores de CDKs p21 ^{CIP1} y p27 ^{KIP1} en clones <i>shSos1</i> y <i>shSos2</i>	105
Figura 41. Muerte celular inducida por tBHP en clones <i>shSos1</i>	107
Figura 42. Muerte celular inducida por tBHP en clones <i>shSos2</i>	108
Figura 43. Determinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y el nivel de ROS intracelular en clones <i>shSos1</i> y <i>shSos2</i> en condiciones basales y de estrés oxidativo	110
Figura 44. Expresión de <i>Sod2</i> en clones <i>shSos1</i> y <i>shSos2</i>	112

Índice de Tablas

Tabla 1. Información general sobre las líneas celulares utilizadas.....	44
Tabla 2. Líneas celulares utilizadas en los microarrays de expresión	47
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR	54
Tabla 4. Anticuerpos utilizados en Western blot.....	57
Tabla 5. Número de genes significativos según el valor de FDR	68
Tabla 6. Transcritos diferencialmente expresados en <i>ko-Sos1</i> respecto al grupo Control.....	137
Tabla 7. Transcritos diferencialmente expresados en <i>ko-Sos2</i> respecto al grupo Control.....	143
Tabla 8. DAVID_ <i>ko-Sos1</i>	CD
Tabla 9. DAVID_ <i>ko-Sos2</i>	CD

Introducción

1. Conceptos generales

La célula se comunica con el entorno a través de numerosas rutas de señalización, mediante las cuales recibe y procesa señales del medio exterior. Los estímulos extracelulares son captados por receptores de superficie específicos que transmiten la información a través de redes de transducción de señales. Muchos de estos receptores transmiten dicha información a través de las pequeñas GTPasas de la familia Ras (Satoh et al., 1990a; Satoh et al., 1990b; Schlessinger, 2000), conservadas en todos los organismos eucariotas, desde levaduras hasta humanos. Este alto grado de conservación evolutivo sugiere que las proteínas Ras ejercen un papel fundamental en la biología celular (Santos and Nebreda, 1989; Wennerberg et al., 2005).

La actividad de las proteínas Ras está regulada por su unión a nucleótidos de guanina, de forma que en condiciones fisiológicas estas GTPasas ciclan entre un estado activo (unidas a GTP), y un estado inactivo (unidas a GDP) (Boguski and McCormick, 1993; Santos and Nebreda, 1989) (**Figura 1**). Este ciclo de activación-desactivación les permite funcionar como interruptores moleculares conectando la activación de receptores de membrana con múltiples rutas de señalización. De esta forma, regulan procesos fundamentales tales como la progresión del ciclo celular, expresión génica, transporte vesicular o remodelación del citoesqueleto. Mediante la regulación de estos procesos, la célula controla una amplia variedad de respuestas biológicas como la proliferación, diferenciación, motilidad, apoptosis y supervivencia celular (McKay and Morrison, 2007; Mitin et al., 2005; Takai et al., 2001).

El control de estos procesos es esencial para la biología celular. Por este motivo, defectos en la regulación de estas GTPasas y sus rutas efectoras pueden desencadenar diversas patologías en humanos, desde enfermedades congénitas con graves trastornos en el desarro-

llo (como el síndrome de Costello o el de Leopard) (Aoki et al., 2005; Kontaridis et al., 2006; Tidyman and Rauen, 2009), hasta diferentes tipos de cáncer o predisposición a desarrollarlos (Cawthon et al., 1990; Fernandez-Medarde and Santos, 2011a; Karnoub and Weinberg, 2008). De hecho, a comienzos de la década de los 80 un gran número de trabajos probaron la existencia de mutaciones en Ras presentes en diversos tumores humanos (Bos et al., 1987; Parada et al., 1982; Perucho et al., 1981; Santos et al., 1982; Santos et al., 1984). Aproximadamente el 30% de los tumores humanos expresan formas oncogénicas de Ras (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic>). Estas formas mutantes de Ras son insensibles a la actividad de sus inhibidores, manteniéndose en un estado constitutivamente activo que les confiere una importante capacidad oncogénica (Feramisco et al., 1984; Karnoub and Weinberg, 2008; Malumbres and Barbacid, 2003; Stacey and Kung, 1984).

Generalmente, la célula está sometida a gran cantidad de estímulos que debe integrar de forma adecuada. Además, debe garantizar que las proteínas que componen las rutas de transducción permanezcan inactivas en ausencia de los estímulos apropiados. Por esta razón, el ciclo de activación de Ras está controlado *in vivo* por dos grupos de proteínas reguladoras, los denominados GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors) que activan a Ras catalizando el intercambio de GDP por GTP, y los GAPs (GTPase-activating proteins), que lo inactivan estimulando su actividad intrínseca de hidrólisis de GTP a GDP (Boguski and McCormick, 1993). El equilibrio entre la actividad de ambos grupos de proteínas, GEFs y GAPs, determinará el nivel de activación de Ras (**Figura 1**).

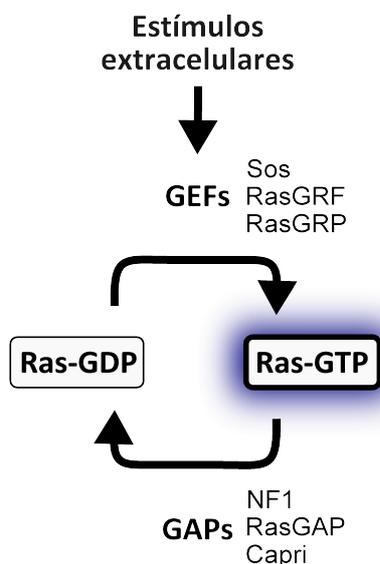


Figura 1. Ciclo de activación de las GTPasas de la familia Ras. El equilibrio entre la forma activa (unida a GTP) e inactiva (unida a GDP) de Ras está controlado por dos grupos de proteínas: los reguladores positivos que catalizan el intercambio de GDP por GTP (GEFs) y los reguladores negativos que promueven la inactivación de Ras estimulando su actividad intrínseca de hidrólisis del GTP a GDP (GAPs). Los receptores de membrana activados por señales extracelulares estimulan la actividad de los GEFs, cuya función es activar a Ras. Unidas a GTP, estas GTPasas interactúan con proteínas efectoras para promover las respuestas celulares adecuadas al estímulo recibido.

Los factores intercambiadores de nucleótidos o GEFs son proteínas constituidas por varios dominios mediante los cuales interactúan con distinto tipo de moléculas (proteínas, lípidos, segundos mensajeros, etc). Estas interacciones regulan su actividad en respuesta a

un complejo balance de estímulos activadores e inhibitorios (Bos et al., 2007). Al igual que ocurre con las GTPasas, fallos en la regulación de la actividad de los GEFs, por mutaciones activantes o por sobreexpresión, pueden contribuir a procesos de transformación celular, hiperplasia o alteraciones en el desarrollo (Hart et al., 2002; Tartaglia et al., 2007; Timofeeva et al., 2009; Tognon et al., 1998). No obstante, también se han descrito niveles de expresión de GEFs anormalmente reducidos en diversos tumores murinos y humanos, como ocurre en el caso de la metilación del promotor de RasGRF2 en cáncer de pulmón (Chen et al., 2006).

En mamíferos se han descrito 4 grupos principales de GEFs específicos de Ras: las proteínas Sos (Son of Sevenless), RasGRFs (Ras Guanine nucleotide Releasing Factor), RasGRPs (Ras Guanine nucleotide Releasing Protein) y CNrasGEF (Cyclic Nucleotide-dependent Ras GEF) (Bowtell et al., 1992; Ebinu et al., 1998; Pham et al., 2000; Shou et al., 1992) (Rojas and Santos, 2006). Todos los miembros contienen el dominio CDC25H (CDC25 homology), que cataliza el intercambio de nucleótidos y siempre va acompañado por el dominio REM, ambos esenciales para activar a Ras (**Figura 2**). Sin embargo, existen diferencias en el patrón de expresión, estructura y regulación de los distintos GEFs. Al igual que Ras, la expresión de las proteínas Sos es ubicua, mientras que los otros grupos de GEFs presentan una distribución tisular más restringida (Bowtell et al., 1992; Guerrero et al., 1996). Las proteínas RasGRF1 y RasGRF2 se expresan principalmente en el sistema nervioso pero también en otros órganos como los islotes pancreáticos y el pulmón, CNrasGEF, esencialmente en cerebro, y los GEFs RasGRPs están expresados fundamentalmente en células hematopoyéticas y en menor medida en cerebro (Ebinu et al., 1998; Guerrero et al., 1996; Wei et al., 1994). Cada grupo de GEFs además, parece responder preferentemente a señales distintas. Los GEFs de la familia RasGRP son activados por Ca^{+2} , DAG (Diacilglicerol) y ésteres de forbol, mientras que RasGRF1 y RasGRF2 responden a cambios en los niveles de Ca^{+2} citosólico y a la estimulación de proteínas G heterotriméricas. CNrasGEF responde a incrementos en la concentración intracelular de cAMP y cGMP, y las proteínas Sos han sido implicadas principalmente en la respuesta a la activación de receptores tirosina quinasa o RTKs (receptor tyrosine kinase), a través de su asociación con las proteínas adaptadoras Grb2 (growth factor receptor bound protein 2) y Shc (src homology 2 domain-containing transforming protein c) (Buday and Downward, 2008; Fernandez-Medarde and Santos, 2011b; Mitin et al., 2005; Quilliam et al., 2002).

La gran diversidad en este grupo de proteínas respecto a sus sustratos (los GEFs superan considerablemente en número a las GTPasas) confiere a Ras la posibilidad de activarse por diversos estímulos, en diferentes tejidos, y bajo una regulación espacio-temporal específica que depende además del tipo celular y del contexto (Mitin et al., 2005). La especificidad de los GEFs sobre las distintas GTPasas supone otro mecanismo importante de regulación. En el caso de las proteínas Sos, las cuales son el objeto de estudio de este trabajo, está descrito que pueden catalizar el intercambio de nucleótidos sobre las GTPasas clásicas de

la familia Ras, H-ras, K-ras y N-ras (Porfiri et al., 1994) y sobre otros miembros de la familia como TC21 (R-Ras2) y M-Ras (R-Ras3) (Graham et al., 1996; Ohba et al., 2000; Quilliam et al., 1999). Sin embargo, son incapaces de activar a las GTPasas R-Ras o RalA, también miembros de la familia Ras (Buday and Downward, 1993; Chardin et al., 1993; Gotoh et al., 1997). Además, Sos puede catalizar la activación de GTPasas pertenecientes a otras ramas de la superfamilia Ras. Así, dentro de la familia Rho/Rac, Sos muestra afinidad por la GTPasa Rac (Nimnual et al., 1998) y no por otros miembros como Cdc42 (Chardin et al., 1993).

2. La familia de proteínas Sos

2.1 Miembros

Las proteínas Sos fueron descubiertas mediante estudios genéticos del desarrollo del ojo compuesto de *Drosophila*. La ruta de señalización activada por el RTK Sevenless es fundamental para la formación de las células fotorreceptoras R7 del ojo de este insecto. Mediante el análisis de esta ruta se identificaron genes esenciales para la señalización por este receptor, entre los que se confirmó la presencia del homólogo de Ras en *Drosophila* y se descubrió el gen al que bautizaron como *Sos* (Son of Sevenless) (Rogge et al., 1991; Simon et al., 1991). El alineamiento de la secuencia proteica de dSos (*Sos* de *Drosophila*) con los activadores de Ras previamente descubiertos en levaduras CDC25, SDC25 y Ste6 (Broek et al., 1987; Hughes et al., 1990; Robinson et al., 1987), mostró un alto grado de similitud y la existencia de un dominio común en las proteínas de ambos organismos, correspondiente al dominio catalítico de CDC25. Trabajos posteriores identificaron los homólogos del gen dSos en *Caenorhabditis elegans* (Chang et al., 2000) y en mamíferos, donde a diferencia de moscas y gusanos existen dos genes homólogos, *mSos1* y *mSos2* en ratón (Bowtell et al., 1992), y *hSOS1* y *hSOS2* en humanos (Chardin et al., 1993).

Las proteínas dSos y sus equivalentes en mamíferos comparten un 45% de identidad aminoacídica. La zona más conservada corresponde a una región de 420 aminoácidos, homóloga a su vez al dominio catalítico de CDC25 (el GEF de Ras en *Saccharomyces cerevisiae*) (Chardin et al., 1993). La identidad entre *Sos1* y *Sos2* en ambas especies de mamíferos es del 69% aproximadamente, reduciéndose al 40% en la región C-terminal donde la identidad queda restringida a los motivos ricos en prolina (Bowtell et al., 1992; Chardin et al., 1993). Sin embargo, entre *mSos1* y *hSOS1*, así como entre *mSos2* y *hSOS2*, la identidad alcanza el 98%, sugiriendo que cada uno de los loci que codifican estas proteínas está altamente conservado en mamíferos (Bowtell et al., 1992).

Los miembros de la familia Sos presentan un patrón de expresión muy amplio a lo largo del desarrollo y en la etapa adulta, así como en diversas líneas celulares. Los estudios realizados con dSos, al igual que con sus equivalentes en mamíferos (*Sos1* y *Sos2*), mostraron

expresión en prácticamente todos los tejidos adultos y etapas del desarrollo analizadas (Bonfini et al., 1992; Bowtell et al., 1992; Chardin et al., 1993). También se han descrito varios transcritos alternativos para *hSOS1* expresados diferencialmente dependiendo del tipo celular, el tejido o la etapa del desarrollo (Guerrero et al., 1996). Adicionalmente, existen dos isoformas de SOS1 en humanos, *Isfl* y *Isfil*, cuya diferencia reside en un fragmento de 15 aminoácidos localizado en la región C-terminal, junto a un motivo rico en prolina necesario para la interacción con Grb2 (Rojas et al., 1996). La inserción de 15 aminoácidos en la secuencia de la *Isfil* incrementa su afinidad por Grb2, aumentando la señalización a través de Ras y su potencial transformante (Rojas et al., 1999; Zarich et al., 2000). De hecho, *Isfil* posee una actividad intercambiadora mayor que *Isfl* (Rojas et al., 1999). Algunos tejidos expresan una de las dos isoformas, mientras que otros muestran diferentes proporciones de ambas dependiendo del tejido y la fase embrionaria. Estas diferencias pueden determinar la intensidad de la activación de Ras en diferentes tejidos y/o etapas del desarrollo (Rojas et al., 1996).

A pesar de la semejanza entre *Sos1* y *Sos2*, existen importantes diferencias bioquímicas y funcionales entre ambas proteínas. La región C-terminal es la que presenta mayor variabilidad, quedando las zonas conservadas restringidas a los motivos ricos en prolina implicados en la unión a Grb2 (**Figura 2**). Esto podría explicar porqué *hSOS2* tiene más afinidad por Grb2 que *hSOS1* (Yang et al., 1995). También en la región C-terminal, se han observado diferencias en las secuencias consenso de fosforilación presentes en *hSOS1* y *hSOS2*, lo que implicaría una regulación diferente (Corbalan-García et al., 1996). Adicionalmente, *mSos1* es más estable que *mSos2* pues éste es degradado en el proteasoma debido a la presencia de señales de ubiquitinación ausentes en *mSos1* (Nielsen et al., 1997). Además, se han descrito diferencias en la señalización inducida por EGF (epidermal growth factor), que apuntan a una participación de *Sos1* en la transmisión de señales a corto y largo plazo, mientras *Sos2* estaría actuando únicamente a corto plazo (Qian et al., 2000). Por último, probablemente reflejo de las diferencias bioquímicas y de regulación molecular observadas entre ambas proteínas, la relevancia funcional en modelos animales difiere considerablemente. Los ratones *knockout* (*ko*) para *Sos1* mueren en el desarrollo en la mitad de la gestación (Qian et al., 2000; Wang et al., 1997), mientras que los deficientes en *Sos2* son viables y sin fenotipo aparente (Esteban et al., 2000).

2.2 Estructura

La familia Sos en mamíferos está constituida por proteínas de alto peso molecular formadas por varios dominios conservados a lo largo de la evolución (**Figura 2**):

Dominio histona (H). Ocupa el extremo N-terminal de las proteínas Sos. Consta de aproximadamente 200 aminoácidos, y posee una estructura de pseudo-dímero semejante a los dímeros de histonas (Sondermann et al., 2003). Fue descubierto mediante la búsqueda

de proteínas con motivos de homología con histonas (Baxevanis et al., 1995), sin embargo, fue años más tarde cuando se atribuyó a esta región un control negativo sobre la actividad de Sos (Jorge et al., 2002). Posteriormente, diversos estudios han implicado a este dominio en la regulación de la inhibición intramolecular de Sos, así como en la interacción de Sos con la membrana plasmática a través de unas regiones conservadas en su superficie cargadas positivamente (Gureasko et al., 2010; Gureasko et al., 2008; Sondermann et al., 2005; Yadav and Bar-Sagi, 2010).

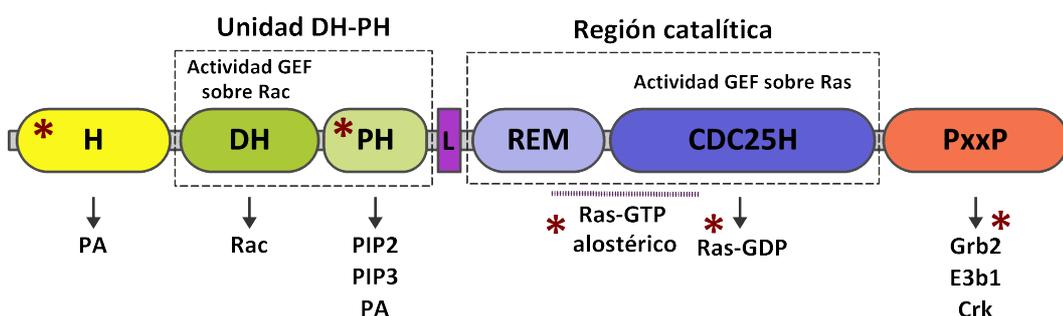


Figura 2. Estructura de las proteínas de la familia Sos. Las proteínas Sos están formadas por varios dominios con los que interaccionan distintos tipos de moléculas. En la parte inferior de cada dominio están indicadas las proteínas y lípidos que se han descrito interaccionando con Sos. **H**, dominio Histona; **DH**, dominio de homología a Dbl; **PH**, dominio de homología a Pleckstrina; **L**, Helical Linker; **REM**, motivo de intercambio de Ras; **CDC25H**, dominio de homología a CDC25; **PxxP**, motivos ricos en prolina (dominio de unión a Grb2). Los asteriscos en rojo indican los puntos de unión a la membrana descritos para Sos (*).

Unidad DH-PH. Los dominios DH y PH aparecen generalmente juntos y en ese orden, constituyendo un tándem funcional implicado en la activación de las GTPasas de la familia Rho/Rac. Esta región también está implicada en la inhibición intramolecular de Sos (Corbalan-Garcia et al., 1998; Kim et al., 1998; Qian et al., 1998), y en la interacción con la membrana (Chen et al., 1997; Lemmon et al., 1996; Zhao et al., 2007). El dominio DH (homólogo al dominio catalítico del GEF *Dbl*) consta de 200 aminoácidos y posee actividad GEF sobre las GTPasas de la familia Rho/Rac (Schmidt and Hall, 2002). En el caso de Sos, el dominio DH es capaz de activar a Rac pero no a otros miembros de la familia como Cdc42 (Nimnual et al., 1998). El dominio PH (homólogo a repeticiones internas de la proteína *pleckstrina*) consta de aproximadamente 120 aminoácidos y está altamente conservado, especialmente en proteínas implicadas en transducción de señales o con funciones citoesqueléticas (Lemmon and Ferguson, 2000; Lemmon et al., 1996). La función del dominio PH en las proteínas Sos está asociada a la translocación a la membrana mediante su interacción con fosfoinosítoles (Chen et al., 1997; Kubiseski et al., 1997; Nimnual et al., 1998; Rameh et al., 1997).

Región catalítica. Esta región está unida a la N-terminal por un enlace helicoidal (L). Contiene los dominios CDC25H (homólogo a CDC25, el GEF de Ras en *S. cerevisiae*) y REM (Ras exchange motif), conservados en todos los GEFs específicos de Ras (Bos et al., 2007; Zheng and Quilliam, 2003). Juntos abarcan aproximadamente 500 aminoácidos, necesarios y suficientes para catalizar el intercambio de nucleótidos sobre Ras (Egan et al., 1993; Kim et al., 1998; Liu et al., 1993). Esta actividad reside en el dominio CDC25H mientras que el dominio REM parece tener una función auxiliar reguladora. En esta región existe un segundo sitio de unión a Ras denominado sitio alostérico, formado por parte del dominio REM y parte del CDC25H (Margarit et al., 2003). La unión de una molécula de RasGTP a este sitio aumenta la afinidad por el RasGDP, incrementando la actividad catalítica de Sos (Boykevich et al., 2006; Margarit et al., 2003).

Dominio rico en prolina o SH3-b (SH3 binding). Finalmente, las proteínas Sos poseen motivos ricos en prolina (PxxP) en su extremo C-terminal, que consta de aproximadamente 280 aminoácidos. Estos motivos interactúan con dominios SH3 (src homology domain type 3), frecuentes en proteínas implicadas en señalización celular, tales como las proteínas adaptadoras Grb2, Crk (v-crck sarcoma virus CT10 oncogene homolog) o E3b1/Abi1 (abl-interactor 1) (Matsuda et al., 1994; Okada and Pessin, 1996; Scita et al., 1999). Las funciones atribuidas a esta región han sido, por una parte, la translocación de Sos a la membrana mediante su unión a Grb2 (Buday and Downward, 1993; Olivier et al., 1993; Rozakis-Adcock et al., 1993; Simon et al., 1993), y por otra, la regulación negativa de su actividad catalítica (Aronheim et al., 1994; Byrne et al., 1996; Corbalan-Garcia et al., 1998; Karlovich et al., 1995; McCollam et al., 1995; Zarich et al., 2000). Esta región además, posee secuencias de fosforilación específicas para diferentes quinasas, principalmente las MAPKs (Mitogen-activated protein kinases) ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinases) (Porfiri and McCormick, 1996). Como explicaremos más adelante (**sección 2.3.3**), estos eventos de fosforilación se han asociado a un mecanismo de retroalimentación negativa de la ruta de señalización mediada por Ras.

2.3 Regulación de la Actividad

Los principales procesos y modificaciones que coordinan la regulación de la actividad de Sos son, fundamentalmente, la translocación a la membrana plasmática donde se encuentra Ras, la eliminación del efecto inhibitorio que ejercen las regiones N-terminal y C-terminal sobre la región catalítica (inhibición intramolecular), la estimulación alostérica del dominio catalítico, y por último, la fosforilación en su extremo C-terminal (Bos et al., 2007).

2.3.1 Modelo clásico de translocación a la membrana

En ausencia de estímulos extracelulares Sos se encuentra en el citosol formando un complejo con Grb2 (Buday and Downward, 1993; Gale et al., 1993; Rozakis-Adcock et al., 1993). Tras la activación de RTKs este complejo es reclutado a la membrana plasmática mediante

la unión de Grb2 a residuos de tirosina fosforilados en los receptores activados (**Figura 3**). Esta translocación del complejo Grb2-Sos a la membrana tras la activación de RTKs constituía el modelo inicial para la activación de Ras mediada por Sos (Buday and Downward, 1993; Egan et al., 1993; Gale et al., 1993; Olivier et al., 1993; Rozakis-Adcock et al., 1993). Apoyando este modelo, se había observado que no existían diferencias en la actividad catalítica de Sos antes y después del estímulo (Buday and Downward, 1993; Gale et al., 1993), y que la localización artificial de Sos en la membrana por farnesilación o miristoilación era suficiente para activar a Ras, independientemente de la activación de los receptores (Aronheim et al., 1994; Quilliam et al., 1994). Sin embargo, numerosas evidencias experimentales indicaron que la activación de Ras por Sos era un proceso más complejo de lo que proponía este modelo. En este sentido, varios trabajos demostraron que Sos puede localizarse en la membrana y activar a Ras sin que sea necesaria su unión a Grb2 (Karlovich et al., 1995; McCollam et al., 1995; Wang et al., 1995), y que la actividad catalítica de Sos aumenta en respuesta a estímulos extracelulares (Li et al., 1996; Li et al., 1993; Rojas et al., 1999). Incluso, en algunos tipos celulares como las células hematopoyéticas, se había descrito que la activación de Ras ocurre sin que los complejos Grb2-Sos localicen en la membrana (Welham et al., 1994). En conjunto, los datos de estos trabajos contradecían en parte el modelo inicial, revelando la existencia de una regulación de la actividad de Sos mucho más compleja en la que, como mostraremos a continuación, las contradicciones pueden encontrar una explicación.

2.3.2 Mecanismo de activación alostérica e inhibición intramolecular

El mecanismo de activación alostérica de Sos mediado por Ras está basado en la unión con alta afinidad de una molécula de RasGTP al sitio alostérico de Sos. Esta interacción produce cambios en la región catalítica que estabilizan a Sos en una conformación activa, estimulando intensamente su actividad intercambiadora de nucleótidos (Boykevisch et al., 2006; Freedman et al., 2006; Margarit et al., 2003). Además, RasGTP tiene más afinidad por el sitio alostérico que RasGDP, lo que convierte esta interacción en un mecanismo de retroalimentación positiva que, tanto *in vitro* como *in vivo*, es fundamental para la correcta activación de Sos (Boykevisch et al., 2006; Sondermann et al., 2004).

Por otra parte, diversos trabajos han revelado la existencia de un mecanismo de regulación de la actividad por interacciones intramoleculares, denominado inhibición intramolecular. Este mecanismo consiste en la interacción entre varios dominios para estabilizar a la proteína en su conformación inactiva. Muchos de estos trabajos atribuyen un control negativo de la actividad catalítica de Sos a las regiones N-terminal (Corbalan-Garcia et al., 1998; Kim et al., 1998; Qian et al., 1998) y C-terminal (Aronheim et al., 1994; Byrne et al., 1996; Corbalan-Garcia et al., 1998; Karlovich et al., 1995; Kim et al., 1998; McCollam et al., 1995; Wang et al., 1995). De acuerdo con esta idea, construcciones de Sos que carecen de la región C-terminal presentan un incremento en la actividad intercambiadora *in vitro* e *in vivo*,

Cuando la célula recibe las señales adecuadas, Sos adquiere la conformación activa liberándose de las interacciones intramoleculares. La unión de los dominios H y PH a la membrana son fundamentales para esta liberación. El dominio PH se une al fosfatidil PIP₂ (fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato) (Chen et al., 1997; Kubiseski et al., 1997) y también al ácido fosfatídico (PA) generado por la PLD2 (phospholipase D₂), que al igual que Sos, es reclutada por Grb2 a los receptores activados (Di Fulvio et al., 2006; Zhao et al., 2007). El dominio H también puede asociarse al PA mediante sus regiones cargadas positivamente, y de hecho, se ha demostrado que esta interacción es esencial para la activación de Ras en respuesta a EGF (Gureasko et al., 2010; Yadav and Bar-Sagi, 2010). Se cree que la asociación a la membrana reorienta a Sos provocando la liberación de la unidad DH-PH del sitio alostérico. Esta nueva configuración hace posible la unión de Sos con dos moléculas de Ras (Ras alostérico y Ras sustrato), lo que además estabiliza a Sos en la membrana (**Figura 3**). No obstante, qué señales desencadenan esta reorientación de Sos y cuál es el mecanismo por el que ocurre aún no está del todo claro.

Por último, es interesante apuntar que la translocación a la membrana mediada por Grb2 es aún un elemento importante en la regulación de la actividad de Sos, ya que puede contribuir a su activación no sólo asociándolo a los receptores activados, sino también mediante la liberación de la regulación negativa que ejerce la región C-terminal (Aronheim et al., 1994; Rojas et al., 1999; Zarich et al., 2000; Zarich et al., 2006). Asimismo, puede favorecer la estabilización de Sos en la membrana, dirigirlo a receptores específicos, o incluso puede promover la localización de PLD2 y Sos1 en los mismos sitios, potenciando allí de forma regulada y específica, la señalización mediada por Ras (Hancock, 2007).

2.3.3 Regulación de la actividad mediante fosforilación

La fosforilación de Sos tras la estimulación con factores de crecimiento ha sido asociada a un mecanismo de retroalimentación negativa (Klarlund et al., 1995; Langlois et al., 1995; Waters et al., 1995b). En la región C-terminal, Sos contiene secuencias consenso para MAPKs, cuyos residuos de serina/treonina son fosforilados por dichas quinasas *in vitro* e *in vivo* (Corbalan-Garcia et al., 1996; Cherniack et al., 1994; Porfiri and McCormick, 1996; Ueki et al., 1994). No obstante, otras quinasas pueden participar en la fosforilación de Sos como demuestran varios trabajos en los que esta fosforilación es dependiente de MEK, pero no necesariamente de ERK (Dong et al., 1996; Holt et al., 1996; Zhao et al., 1997), o en células PC12, donde Sos es fosforilado por p90RSK-2 (Douville and Downward, 1997).

La retroalimentación negativa consiste en la desactivación de la ruta de Ras después de la estimulación, pero este proceso puede ser diferente dependiendo del estímulo y el tipo celular. La fosforilación de Sos tras la estimulación con insulina promueve la disociación de los complejos Grb2-Sos (Cherniack et al., 1995; Dong et al., 1996; Holt et al., 1996; Klarlund et al., 1995; Langlois et al., 1995; Waters et al., 1995a; Waters et al., 1995b), mientras que la estimulación con EGF provoca la disociación entre el complejo Grb2-Sos y la proteína

adaptadora Shc unida al receptor, o directamente la disociación del receptor (Klarlund et al., 1995; Porfiri and McCormick, 1996; Rozakis-Adcock et al., 1995). También la internalización y degradación de los receptores activados, como ocurre con los receptores de EGF y PDGF (pero no de Insulina), contribuye a la desactivación de la ruta (Klarlund et al., 1995; Osterop et al., 1993). Finalmente, mencionar que además de residuos de serina/treonina, se ha descrito la fosforilación de Sos en tirosina por la proteína tirosina quinasa (PTK) Abl, lo cual promueve la actividad intercambiadora sobre la GTPasa Rac (Sini et al., 2004).

2.3.4 Regulación de la actividad GEF dual

Las proteínas Sos funcionan como GEFs duales sobre las GTPasas Ras y Rac (Innocenti et al., 2002; Nimnual and Bar-Sagi, 2002; Nimnual et al., 1998). La actividad catalítica de Sos sobre la GTPasa Rac reside en el dominio DH (Nimnual et al., 1998), y está regulada por diferentes mecanismos. Además de la fosforilación en tirosina que acabamos de comentar, la interacción con PIP₃ en la membrana plasmática y la asociación con Eps8 (Epidermal growth factor receptor pathway substrate 8) y E3b1/Abi-1 son otros mecanismos de regulación conocidos.

Esta actividad dual está determinada por la asociación de Sos a diferentes complejos moleculares de señalización. Sos funciona como GEF de Ras cuando está unido a Grb2, y sobre Rac cuando forma un complejo con E3b1 y Eps8 (Innocenti et al., 2002; Scita et al., 1999) (**Figura 4**). La formación del complejo Sos1-E3b1-Eps8 (S/E/E8) es fundamental para la actividad catalítica sobre Rac (Innocenti et al., 2002; Scita et al., 1999; Scita et al., 2001). E3b1 estabiliza la unión entre Sos1 y Eps8, el cual, interacciona con el receptor activado y con F-actina (permitiendo la localización del complejo en estructuras como las ondulaciones de membrana o *ruffles* (Scita et al., 1999; Scita et al., 2001) (**Figura 4**). La interacción de Sos con Grb2 o E3b1 es excluyente, y la afinidad por Sos *in vitro* es similar para ambas proteínas. Sin embargo, en fibroblastos la abundancia de los complejos Sos-Grb2 (S/G) es aproximadamente 10 veces mayor que los complejos S/E/E8 (Innocenti et al., 2002). Además, la dinámica y la regulación de ambos complejos tras la activación del receptor es diferente; mientras que los complejos S/G se disocian rápidamente tras la estimulación, los complejos S/E/E8 permanecen estables en las mismas condiciones. Estas diferencias explican en parte, la cinética de activación transitoria de Ras comparada con la activación prolongada de Rac en respuesta a factores de crecimiento (Innocenti et al., 2002).

Adicionalmente, PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) desempeña un papel esencial en la regulación de la actividad GEF sobre Rac. Por un lado, la interacción de la subunidad reguladora de PI3K, p85, con el complejo S/E/E8 es necesaria para esta actividad (Innocenti et al., 2003). Por otro, la asociación del dominio PH de Sos con PIP3 (generado por la actividad de PI3K) provoca un cambio conformación que libera al dominio DH de la inhibición intramolecular, promoviendo la activación de Rac (Das et al., 2000; Soisson et al., 1998) (**Figura 4**). De hecho, diversos experimentos han demostrado que los efectos citoesqueléticos in-

ducidos por Ras, están mediados por la actividad de PI3K sobre Rac (Nimnual et al., 1998; Rodriguez-Viciano et al., 1997). La regulación de la actividad GEF dual de Sos constituye un mecanismo de coordinación espacial y temporal de las rutas de señalización mediadas por ambas GTPasas (Mitin et al., 2005; Nimnual and Bar-Sagi, 2002) (**Figura 4**). Por último, recientemente se ha publicado que la proteína anti-apoptótica CIIA/Vps28 (Vacuolar protein sorting 28) estimula la actividad Rac-GEF de SOS1 contribuyendo a la migración inducida por TGFβ (Transforming growth factor β) (Hwang et al., 2011).

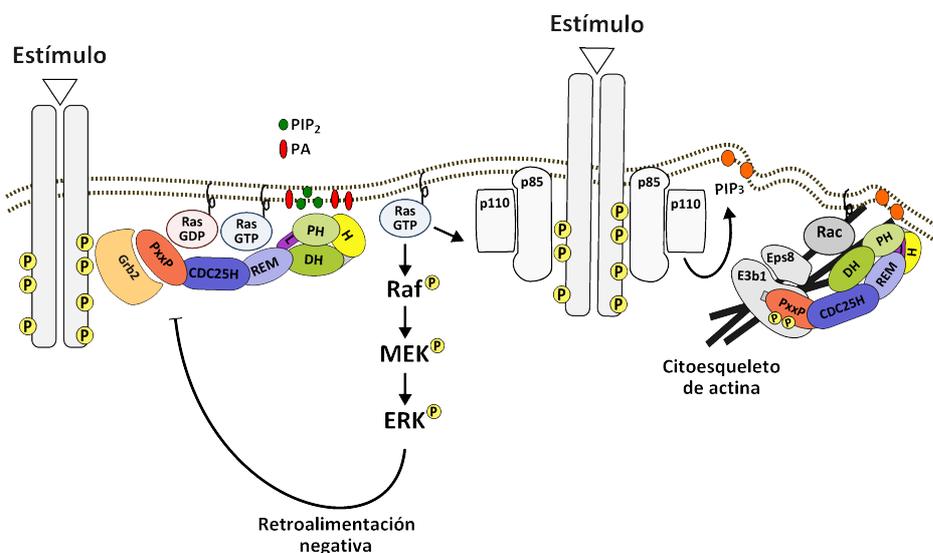


Figura 4. Regulación de la actividad GEF de Sos sobre las GTPasas Ras y Rac. Las proteínas Sos activan a las GTPasas Ras cuando se encuentran asociadas a Grb2, y a Rac, cuando forman un complejo con E3b1 y Eps8. La estimulación con factores de crecimiento induce la translocación del complejo Grb2-Sos a la membrana, donde las proteínas Sos activan a Ras, y éste a sus rutas efectoras. Asimismo, el estímulo induce la actividad de PI3K directamente, o mediante la interacción con Ras activo, promoviendo la formación de PIP₃. La interacción del dominio PH de Sos (unido a E3b1 y Eps8) con el PIP₃ de la membrana provoca un cambio conformacional que libera al dominio DH, el cual activa a Rac en los compartimentos celulares donde la actividad de esta GTPasa es necesaria (*ruffles*). Eps8 media la interacción de este complejo con el citoesqueleto de actina. Al mismo tiempo, la activación de la ruta Ras/ERK conduce a una retroalimentación negativa basada en la fosforilación de Sos por ERK. Esta fosforilación provoca la disociación de los complejos Grb2-Sos, pero no de Sos/Eps8/E3b1, manteniendo la activación de Rac de forma sostenida.

3. Participación de las proteínas Sos en rutas de señalización intracelular

3.1 Señales activadoras

La estimulación con factores de crecimiento desencadena la activación de RTKs en la superficie celular. Estos receptores ejercen un importante papel en diversos procesos biológicos incluyendo el desarrollo embrionario y la oncogénesis, para lo cual controlan procesos celulares fundamentales como la progresión del ciclo celular, migración, metabolismo, supervivencia, y diferenciación celular (Schlessinger, 2000). La mayoría de RTKs estimulan la actividad de las GTPasas Ras (Sato et al., 1992; Schlessinger, 2000), cuya activación en este contexto está mediada principalmente por las proteínas Sos. Sin embargo, Sos puede activar a Ras tras la estimulación de otros receptores, incluyendo receptores acoplados a proteínas G o GPCR (G-protein-coupled receptors), receptores de citoquinas, el receptor de células T o TCR (T-cell receptor) y de células B o BCR (B-cell receptor) en linfocitos, y también integrinas (**Figura 5**), como veremos a continuación.

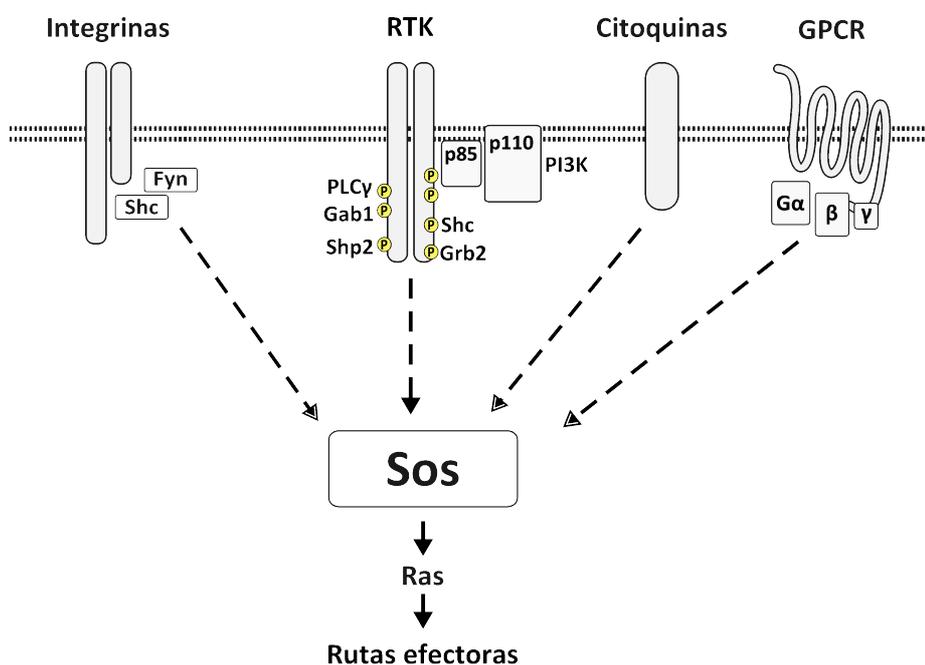


Figura 5. Señales activadoras de las proteínas Sos. Diversos tipos de receptores pueden desencadenar la activación de las proteínas Sos. La estimulación de RTKs promueve la activación de las GTPasas Ras mediante la translocación del complejo Sos-Grb2 a la membrana. Asimismo, receptores de citoquinas, receptores acoplados a proteínas G (GPCR), e incluso integrinas, pueden estimular la actividad GEF de Sos, generalmente a través de la activación de PTKs que fosforilan a los receptores y a proteínas adaptadoras como Shc, promoviendo el reclutamiento del complejo Grb2-Sos al receptor activado. Una vez activo, Ras transmite la señal a diversas rutas efectoras.

En primer lugar, los RTKs son proteínas transmembrana que contienen un dominio N-terminal extracelular de unión al ligando y un dominio C-terminal intracelular con actividad tirosina quinasa. La mayoría están en la membrana como monómeros inactivos cuya dimerización es consecuencia de la unión de la parte extracelular a un ligando específico. La dimerización induce la activación del receptor y su autofosforilación en residuos de tirosina que sirven como sitios de unión específicos para proteínas con dominios SH2 o PTB (Phospho-tyrosine binding) (Schlessinger, 2000). Estas proteínas pueden ser enzimas cuya actividad es estimulada al unirse al receptor (incluyendo las quinasas Src y PI3K, la fosfolipasa C (PLC) o la fosfatasa Shp2), y proteínas adaptadoras, como Grb2 y Shc (Lowenstein et al., 1992; Skolnik et al., 1993), que contienen dominios de interacción con otras proteínas. Asimismo, algunos RTK pueden reclutar las denominadas proteínas “acopladoras” (*docking proteins*) como IRS (Insulin Receptor substrate), FRS (FGF Receptor substrate), y Gab (Grb2-associated binder) (Holgado-Madruga et al., 1996; Kouhara et al., 1997; Skolnik et al., 1993). Estas proteínas acopladoras son fosforiladas por el RTK y mediante esos residuos fosforilados reclutan a otras proteínas. En conjunto, el receptor activado funciona como una plataforma de reclutamiento de diversas proteínas señalizadoras que amplifican la señal y activan las rutas efectoras necesarias para una respuesta biológica apropiada (McKay and Morrison, 2007; Schlessinger, 2000) (**Figura 5**).

La participación de Sos en estas rutas consiste en su capacidad para integrar las señales procedentes de los RTKs y asegurar una correcta activación de Ras. Como explicamos previamente (**sección 2.4.2**), el complejo Sos-Grb2 es reclutado a la membrana a través de la unión de Grb2 a las fosfotirosinas del receptor activado (Buday and Downward, 1993; Egan et al., 1993; Rozakis-Adcock et al., 1993). No todos los RTKs poseen secuencias consenso para la unión de Grb2, en cuyo caso otras proteínas como Shc, Gab1 o Shp2 median el reclutamiento del complejo Grb2-Sos al receptor activado (Holgado-Madruga et al., 1996; Li et al., 1994; Rozakis-Adcock et al., 1992). Una vez en la membrana, Sos se encuentra en la conformación activa gracias a la función coordinada de varios de sus dominios. Allí, cataliza el intercambio de nucleótidos sobre las GTPasas Ras presentes en las proximidades (**Figura 3**).

Como hemos mencionado, Sos también puede participar en la señalización inducida por otro tipo de receptores, como el TCR, BCR o receptores de citoquinas. Estos receptores carecen de actividad tirosina quinasa, pero tras su unión al ligando, inducen la actividad de PTKs tales como las quinasas JAK (Janus kinase) o la familia de quinasas Src (Fyn, Lck, etc); Estas PTKs fosforilan residuos de tirosina de la cola citoplasmática del receptor, promoviendo la unión de diversas proteínas señalizadoras, entre ellas, el complejo Grb2-Sos y Shc, que conducen a la activación de Ras (Widmann et al., 1999; Winston and Hunter, 1996). Además, se ha descrito que durante la maduración de células T, la correcta activación de Ras tras la estimulación del TCR depende de la acción coordinada de RasGRP y Sos (Roose et al., 2007), donde el primero (menos potente) proporcionaría las moléculas ini-

ciales de RasGTP que posteriormente estimularían alostéricamente a Sos, incrementando considerablemente la activación de Ras aún con estímulos débiles. Recientemente, estudios con ratones mutantes para Sos1 en linfocitos T, han demostrado que éste ejerce un papel importante en determinadas etapas de la maduración de estos linfocitos, concretamente en la β -selección del pre-TCR (Kortum et al., 2011).

Por otro lado, la estimulación de GPCRs puede activar la ruta Ras/MAPK a través de la estimulación de distintas PTKs, tales como Pyk2 (activada por un aumento del Ca^{+2} intracelular) (Avraham et al., 2000; Dikic et al., 1996), miembros de la familia de quinasas Src (Wan et al., 1996), o PI3K (en fibroblastos) (Lopez-Illasaca et al., 1997). En todos los casos estas quinasas fosforilan residuos de tirosina en la cola intracelular del receptor, lo que de nuevo conduce al reclutamiento del complejo Grb2-Sos y la consiguiente activación de la ruta Ras/MAPKs.

Por último, la fosforilación de Shc por la quinasa Fyn (de la familia Src) tras la activación de determinadas integrinas provoca la translocación del complejo Grb2-Sos y la activación de la ruta Ras/ERK; asimismo, la activación de integrinas induce la fosforilación de FAK (Focal adhesión kinase), la cual puede formar un complejo con Grb2-Sos y activar la ruta Ras/ERK (Barberis et al., 2000; Vuori et al., 1996). En células endoteliales, la estimulación de integrinas específicas induce el reclutamiento de Sos por PI3K y la posterior activación de Rac, la cual contribuye a la progresión del ciclo mediante la expresión de la Ccnd1 (Cyclin D1) (Mettouchi et al., 2001).

3.2 Señalización efectora

La actividad GEF de las proteínas Sos sobre las GTPasas Ras y Rac induce la activación de un gran número de moléculas efectoras en las rutas de señalización en las que éstas participan. Las proteínas Ras en su forma activa pueden interaccionar con un gran número de efectores, entre los que encontramos quinasas (Raf, PI3K, MEKK1), GEFs de otras GTPasas (RalGDS, Tiam, RIN, PLC ϵ), GAPs (NF1, p120GAP), etc, de forma que la señal puede amplificarse y diversificarse activando numerosas rutas de señalización (Karnoub and Weinberg, 2008; Repasky et al., 2004; Shields et al., 2000; Vojtek and Der, 1998) (**Figura 6**). La activación de una u otra vía dependerá principalmente del estímulo recibido y del tipo celular. Las rutas efectoras de Ras más estudiadas son Ras/MAPKs, PI3K/Akt, y Ras/RalGDS. La señalización a través de Ras/MAPKs y PI3K/Akt participa en la regulación de funciones celulares diversas y a veces opuestas, tales como: proliferación, supervivencia, muerte celular, diferenciación, motilidad, metabolismo y senescencia (Meloche and Pouyssegur, 2007; Vivanco and Sawyers, 2002; Rojas nad Santos, 2002; Vojtek and Der, 1998). Puesto que ambas rutas son efectoras de Ras y responden a la estimulación de RTKs, a continuación explicaremos más detalladamente la señalización a través de las mismas.

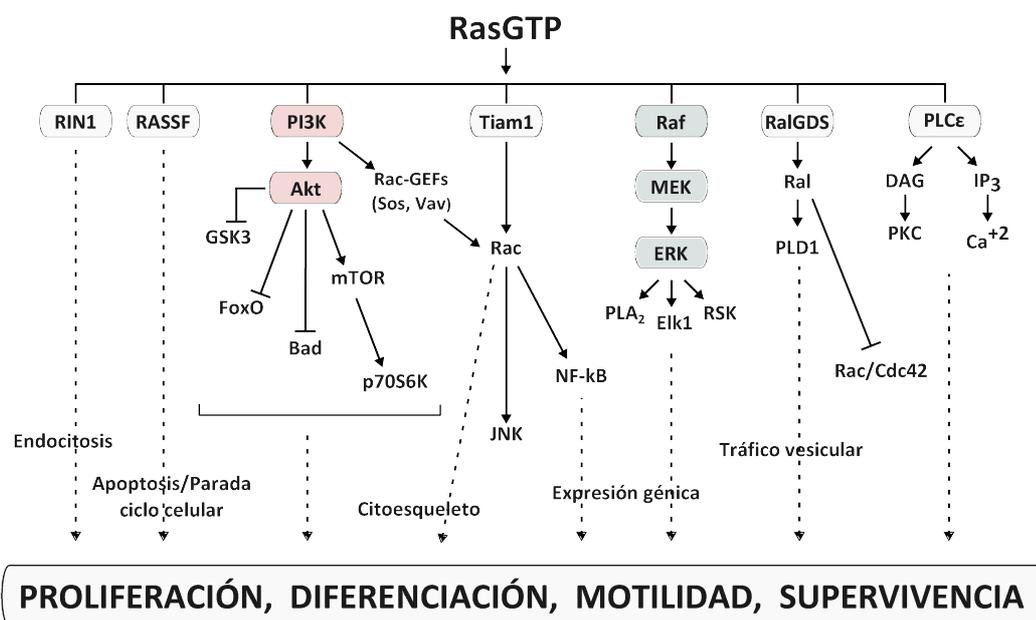


Figura 6. Vías efectoras de las proteínas Ras. Una vez activadas, las GTPasas Ras interaccionan con numerosas proteínas efectoras, promoviendo la estimulación de diversas rutas de señalización. A través de estas rutas Ras controla procesos fundamentales como la proliferación, la diferenciación, motilidad y supervivencia, entre otros. Adaptada de Vojtek and Der, 1998.

3.2.1 Rutas de señalización mediadas por Ras/MAPKs

En mamíferos, la familia de proteínas quinasas activadas por mitógenos o MAPKs está constituida principalmente por 4 grupos: ERK1/2, JNK1/2/3, p38 (p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$) y ERK5, además de las MAPKs denominadas atípicas, que incluyen ERK3/4, ERK7, y NLK (Nemo like kinase) (Cargnello and Roux, 2011). Estas quinasas ejercen una función clave en la transducción de señales, modulando la expresión génica y la actividad de diversas proteínas en respuesta a estímulos extracelulares. De esta manera, controlan procesos biológicos tales como la embriogénesis, proliferación, diferenciación, migración y apoptosis, entre otros (Pearson et al., 2001; Turjanski et al., 2007). Generalmente, las MAPKs ERK1/2 son activadas tras la estimulación con factores de crecimiento, suero, ligandos para GPCRs, e integrinas, mientras que la activación de JNK y p38 está asociada tradicionalmente a citoquinas y diversos estímulos de estrés; de hecho, ambos grupos son también denominados SAPKs (Stress-activating protein kinase) (**Figura 7**). Sin embargo, estas quinasas SAPKs también pueden ser activadas por hormonas y factores de crecimiento (Coso et al., 1995; Miller et al., 1996; Minden et al., 1995), y diversos tipos de estrés y citoquinas inducen la activación de ERK1/2 (Johnson and Lapadat, 2002; Pearson et al., 2001; Raman et al., 2007). Igualmente, ERK5 puede ser activada en respuesta a factores de crecimiento y a varios tipos de estrés (Cargnello and Roux, 2011; Turjanski et al., 2007). En todos los casos, las rutas de señalización

de MAPKs, conservadas en todos los organismos eucariotas desde levaduras a humanos, están formadas por módulos de 3 componentes que se activan en cascada mediante fosforilación: las quinasas MAPKKK (MAPK Kinase Kinase), MAPKK (MAPK Kinase), y por último las MAPKs (Chang and Karin, 2001; Roberts and Der, 2007) (**Figura 7**).

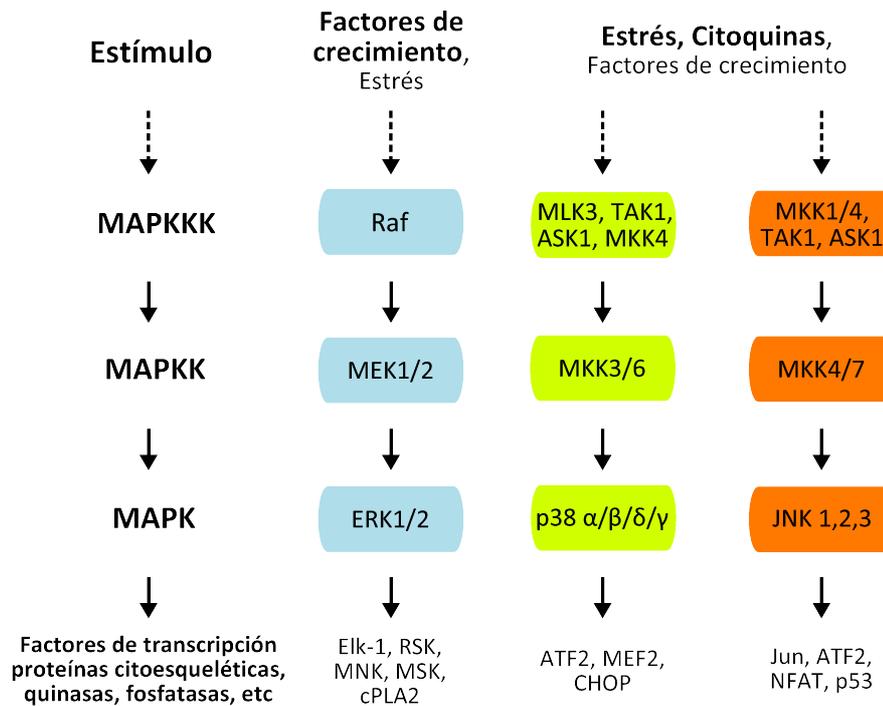


Figura 7. Cascadas de MAPKs en mamíferos. Existen 3 grupos principales de MAPKs en mamíferos (ERK1/2, p38 α/β/δ/γ, y JNK1/2/3). Las rutas de señalización de las MAPKs están formadas por 3 elementos que se activan en cascada mediante fosforilación. La cascada de ERK1/2 es activada principalmente por factores de crecimiento, mientras que las que culminan en la activación de JNK y p38 son estimuladas por señales de estrés fundamentalmente. Muchos de los sustratos de las MAPKs son factores de transcripción a través de los cuales regulan la expresión génica. Adaptada de Roberts et al, 2007.

(i) Ruta de señalización Ras/ERK

La ruta Ras/ERK es esencial para la transmisión de señales mitogénicas procedentes de RTKs. El primer componente (MAPKKK) es la serina/treonina quinasa Raf (Raf-1, A-Raf y B-Raf). La unión de Raf al dominio efector de Ras-GTP implica su translocación a la membrana, requisito esencial para su posterior activación (Marais et al., 1995; Stokoe et al., 1994). El mecanismo de activación de Raf está sujeto a una regulación compleja, donde la liberación de la conformación inactiva es crucial; dependiendo del contexto celular, intervienen interacciones con diversas proteínas y eventos de fosforilación y defosforilación de residuos específicos en los que pueden participar las quinasas Src, PKC o PAK, y fosfatasa

como PP2A (Dhillon and Kolch, 2002; Kolch et al., 1993; Marais et al., 1995). Raf activado, fosforila y activa al segundo componente de la cascada (MAPKK), las quinasas MEK1/2, capaces de fosforilar en treonina y tirosina al último componente del módulo (MAPK), las serina/treonina quinasas ERK1/2 (Boulton et al., 1991; Kyriakis et al., 1992; Seger et al., 1992) (**Figura 8**).

La señalización mediada por ERK regula numerosos procesos celulares, tales como la expresión génica, proliferación, supervivencia, muerte celular, motilidad, metabolismo y diferenciación (Raman et al., 2007). Para ello, fosforila numerosos sustratos citosólicos y nucleares que incluyen desde factores de transcripción, quinasas y fosfatasa, hasta proteínas citoesqueléticas y reguladores de la apoptosis (Brondello et al., 1999; Yoon and Seger, 2006). En condiciones basales ERK se encuentra inactivo en el citoplasma, y tras su activación, transloca al núcleo donde regula la expresión y la actividad de múltiples sustratos, gran parte de ellos relacionados con la progresión del ciclo celular (Chambard et al., 2007; Yoon and Seger, 2006). En fibroblastos, se ha descrito una activación bifásica de ERK mostrando un primer pico intenso a los 5-10 minutos de la recepción del estímulo y un segundo pico menos intenso pero sostenido, varias horas después (Kahan et al., 1992; Meloche and Pouyssegur, 2007).

Expresión génica y crecimiento celular:

En el núcleo, ERK regula la expresión génica mediante la fosforilación de diversos factores de transcripción, tales como Elk-1 (Gille et al., 1995), ATF-2 (Ouwens et al., 2002), Sp1 (Merchant et al., 1999; Milanini-Mongiat et al., 2002) o c-Myc (Murphy et al., 2004; Seth et al., 1992), además de otros sustratos nucleares como las quinasas MSK1/2 (Mitogen and stress-activated protein kinases) (**Figura 8**). Estas quinasas, por un lado intervienen en la remodelación de la cromatina mediante la fosforilación de la histona H3, y por otro, fosforilan y activan factores de transcripción, diversificando la señalización de ERK en el núcleo (Deak et al., 1998; Soloaga et al., 2003). ERK contribuye igualmente a la proliferación y el crecimiento celular estimulando la síntesis de pirimidinas de novo mediante la fosforilación de la enzima CPSII (Carbamoyl phosphate synthetase) (Graves et al., 2000), y favoreciendo la síntesis de ribosomas mediante el aumento de transcripción de RNA ribosómico, a través de la activación del factor UBF (RNA Pol I upstream-binding factor) (Stefanovsky et al., 2001) (**Figura 8**).

Por otra parte, ERK1/2 fosforila numerosos sustratos en el citoplasma, incluyendo proteínas citoesqueléticas (Martinez-Quiles et al., 2004), enzimas como la cPLA2 (Phospholipase A2) (Lin et al., 1993), y varias proteínas que regulan el crecimiento y proliferación celular. En este último grupo encontramos las quinasas MNK1/2 (MAPK-interacting kinase 1/2), cuya interacción con eIF4E (factor de iniciación de la traducción 4E) regula positivamente la síntesis proteica (Waskiewicz et al., 1997), las serina/treonina quinasas RSK (Ribosomal protein S6 kinases), como p90RSK1, que estimulan la traducción mediante la fosforilación de la

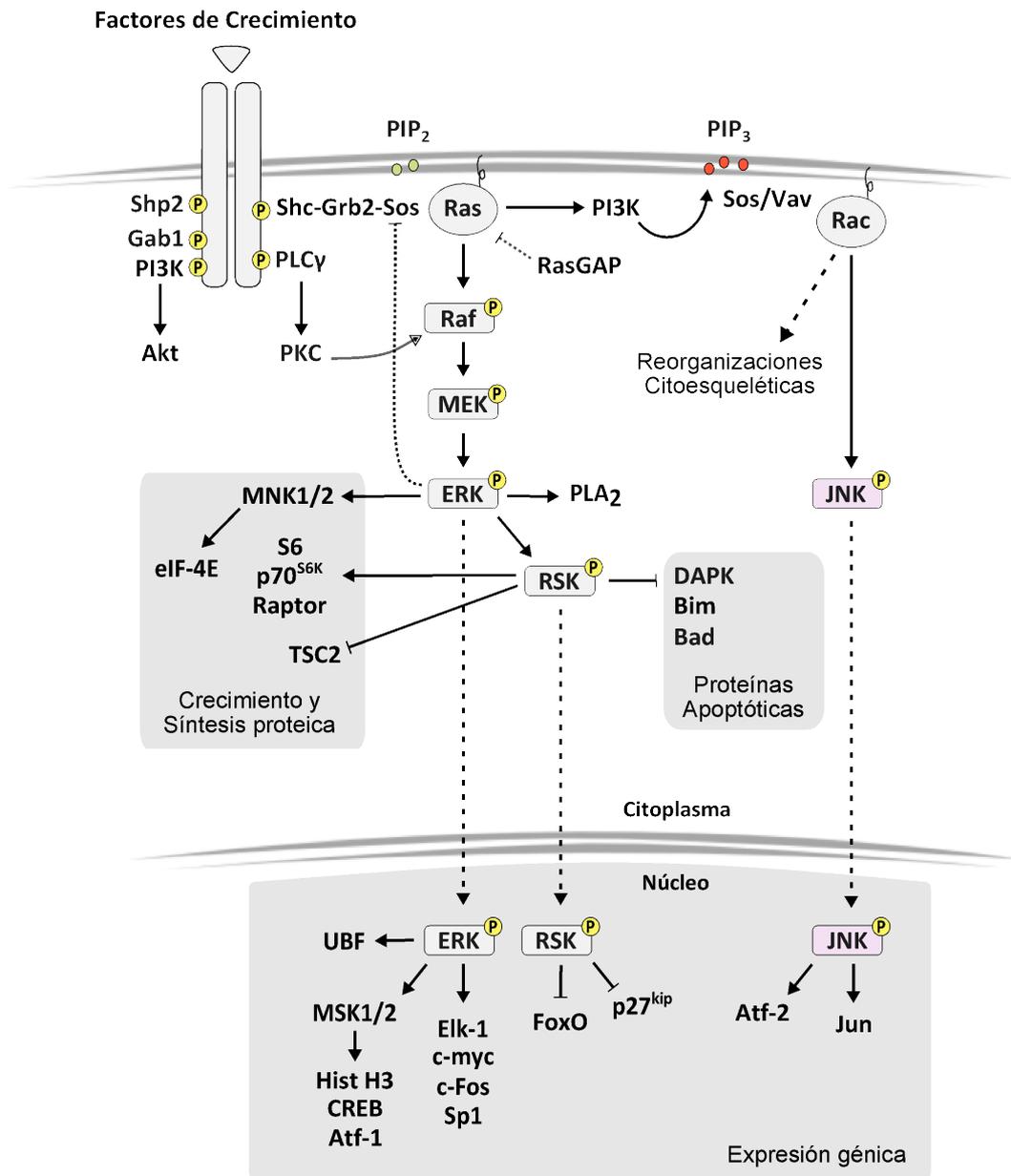


Figura 8. Ruta de señalización Ras/MAPKs. La estimulación con factores de crecimiento produce el reclutamiento del complejo Grb2-Sos a la membrana. Allí, las proteínas Sos activan a Ras, y éste a su ruta efectora Raf/MEK/ERK. Una vez activo, ERK1/2 fosforila numerosas proteínas tanto en el citoplasma como en el núcleo, regulando procesos celulares como el crecimiento, la síntesis de proteínas, la supervivencia, y la expresión génica.

proteína ribosomal S6 (Roux et al., 2007), y que también translocan al núcleo donde regulan la transcripción de genes implicados en la progresión del ciclo (Chen et al., 1993; Rivera et al., 1993). Finalmente, ERK promueve la estimulación de mTOR (mammalian target of rapamycin), un regulador central del crecimiento celular, mediante la fosforilación de raptor

(el cual forma un complejo con mTOR induciendo su activación) (Carriere et al., 2011), y la fosforilación e inhibición de TSC2 (Tuberous sclerosis complex 2), un regulador negativo de mTOR (Ma et al., 2005). p90RSK1, también participa en la inhibición de TSC2 por fosforilación directa (Roux et al., 2004) (**Figura 8**). Ambos eventos conducen a la activación de mTOR y por tanto la regulación positiva de la síntesis proteica y el crecimiento celular.

Supervivencia:

La supervivencia inducida por factores de crecimiento es otra de las funciones mediadas por la ruta Ras/ERK. Las quinasas ERKs y RSKs promueven la supervivencia celular mediante la inactivación de proteínas pro-apoptóticas como Bad (BCL2-associated agonist of cell death), Bim (BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)) o DAPK (Death-associated protein kinase), y a través de la inducción transcripcional de genes implicados en supervivencia como Bcl-2 y Bcl-XL (Anjum et al., 2005; Bonni et al., 1999; Ley et al., 2003) (**Figura 8**). Sin embargo, en determinadas condiciones y dependiendo del estímulo y del tipo celular, la activación de Ras/ERK puede favorecer procesos antiproliferativos y de muerte, tales como apoptosis, autofagia o senescencia (Cagnol and Chambard, 2010; Lee et al., 2003; Zugasti et al., 2001). Por ejemplo, la apoptosis inducida por estrés oxidativo en fibroblastos murinos requiere la actividad de la ruta Ras/ERK (Lee et al., 2003). Asimismo, se ha discutido que ERK puede inducir la expresión de proteínas pro-apoptóticas y estimular la apoptosis por la vía extrínseca e intrínseca, pero que en condiciones normales la concentración de estas proteínas no llega a superar el umbral que desencadena la muerte celular (Cagnol and Chambard, 2010). Frecuentemente, los procesos de muerte mediados por ERK requieren una activación sostenida en compartimentos celulares específicos, que en algunos casos depende de la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS), pues éstas modulan la duración de la señal de ERK inactivando sus fosfatasas (Cagnol and Chambard, 2010).

Regulación de la señal en la ruta Ras/ERK:

En conjunto, la determinación de una respuesta celular específica a los estímulos recibidos depende de varios factores: la intensidad y duración de la señal, la interacción de las quinasas con proteínas de andamiaje o *scaffold*, la localización subcelular de ERK1/2, y la disponibilidad de sustratos (Murphy and Blenis, 2006; Raman et al., 2007). La inducción de diferenciación o proliferación en células PC12 estimuladas con NGF (Nerve growth factor) o EGF, respectivamente, constituye un ejemplo clásico del efecto de la duración de la señal en la especificación de la respuesta. NGF produce una activación sostenida de ERK que induce la diferenciación a neuronas, mientras que la estimulación con EGF produce una activación transitoria favoreciendo la proliferación (Marshall, 1995). La intensidad y duración de la señal representa el balance entre las señales activadoras y los diferentes mecanismos de inactivación de la ruta Ras/ERK. En este sentido, las fosfatasas duales de treonina y tirosina DUSPs (Dual-specificity phosphatases) o MKPs (MAP Kinase phosphatases) tienen un papel principal en la inactivación de ERK (**Figura 9**). Las diferencias en la localización y la

inducción de las mismas contribuyen a la regulación espacial y temporal de la señal transmitida por ERK (Keyse, 1998; Pearson et al., 2001; Sun et al., 1993). Además, otras fosfatasas, como la fosfatasa de serina/treonina PP2A, proteínas de la familia Sprouty (reguladores negativos de la ruta Ras/MAPKs), y la actividad de las proteínas Ras-GAPs, son otros mecanismos de regulación negativa y modulación de la señal (Alessi et al., 1995; Bernards and Settleman, 2004; Hanafusa et al., 2002). Igualmente, la inhibición de componentes de la ruta como Sos, Raf y MEK, a través de la fosforilación mediada por ERK1/2, constituye un proceso de retroalimentación negativa (Dougherty et al., 2005; Eblen et al., 2004; Rozakis-Adcock et al., 1995) (**Figura 9**).

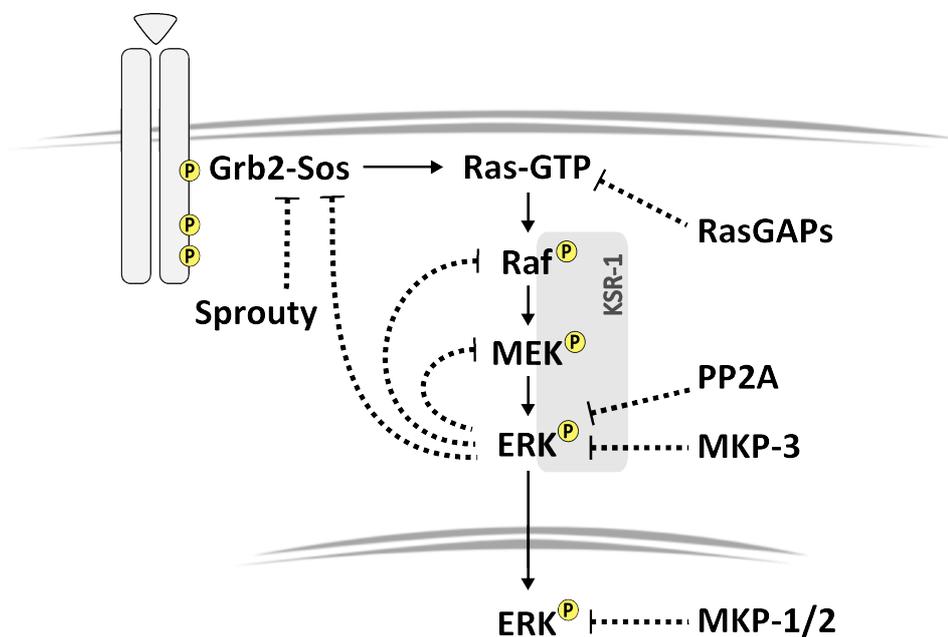


Figura 9. Regulación de la señal en la ruta Ras/ERK. La duración, intensidad y localización subcelular de la señal transmitida por la ruta Ras/ERK está controlada por diversos factores. Entre ellos, la actividad de las proteínas Sprouty, la estimulación de la actividad GTPasa de Ras por las proteínas RasGAP, la fosforilación de Sos, Raf, y MEK mediada por ERK1/2, y diversos tipos de fosfatasas (como las MKPs (MAPK phosphatase) y las fosfatasas de la familia PP2A), constituyen los principales mecanismos de regulación negativa de la señalización a través de la ruta Sos/Ras/ERK. Además, las proteínas scaffold, como KSR-1, suponen otro nivel de regulación, delimitando la señal espacialmente y promoviendo la interacción con otras proteínas u otras rutas.

Por último, otro nivel de regulación lo componen las proteínas *scaffolds*, por ejemplo KSR-1 (Kinase suppressor of Ras) o MP-1 (MEK-partner 1). Este tipo de proteínas interactúan con miembros específicos de la cascada agrupándolos espacialmente. Estos complejos, además de optimizar la transmisión de la señal, la delimitan a compartimentos subcelulares específicos, proporcionando un punto de comunicación con otras rutas de señalización (Calvo et al., 2010; Pearson et al., 2001) (**Figura 9**).

(ii) Papel de la ruta Ras/ERK en la progresión G1/S del ciclo celular

En primer lugar, consideraremos brevemente algunos conceptos básicos de la regulación de la fase G1 del ciclo celular, para facilitar la comprensión de esta sección y parte de los resultados. Los estímulos mitogénicos promueven la entrada de células quiescentes (G0) en la fase G1 del ciclo celular, así como la progresión a través de la misma hasta la entrada en la fase de síntesis de DNA o fase S. La activación de Ras es esencial en este proceso (Cai et al., 1990; Dobrowolski et al., 1994). Varios estudios han demostrado la existencia de dos picos de activación de Ras tras la estimulación mitogénica (Gille and Downward, 1999; Satoh et al., 1990b; Taylor and Shalloway, 1996). El primero se produce rápidamente tras la estimulación, y se transmite principalmente a través de la ruta efectora Ras/ERK, mientras que el segundo pico corresponde a la activación de la ruta PI3K/Akt a partir de la mitad de la fase G1 (Gille and Downward, 1999; Jones and Kazlauskas, 2001a; Jones et al., 1999) (Figura 10).

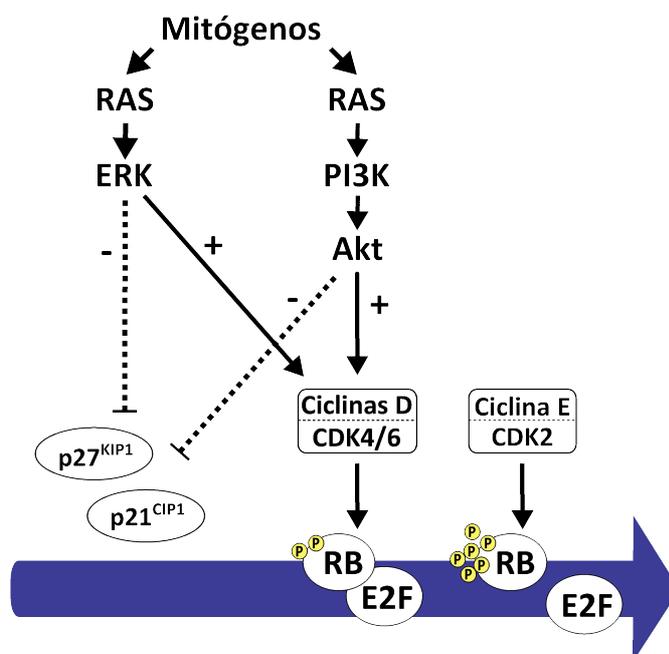


Figura 10. Rutas efectoras de Ras en la progresión de la fase G1 del ciclo celular. La estimulación mitogénica de células quiescentes (G0) induce dos picos de activación de Ras. El primer pico se detecta rápidamente tras la entrada en G1 y está asociado a la activación de la cascada Ras/Raf/MEK/ERK. El segundo pico tiene lugar en mitad de la fase G1 y se corresponde con la activación de la ruta PI3K/Akt. Ambas vías efectoras contribuyen a la progresión de la fase G1 regulando positivamente la expresión de ciclinas D y la activación de los complejos CDK-ciclina. Además, regulan negativamente la expresión de p27^{Kip1} y también alteran la localización subcelular de p27^{Kip1} y p21^{Cip1} inhibiendo su función.

La transición G1/S del ciclo celular está estrictamente regulada por la acción coordinada de las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y sus subunidades reguladoras, las ciclinas (Malumbres and Barbacid, 2001). La activación de los complejos CDK-Ciclina durante la fase G1 depende de la estimulación con factores de crecimiento. Esta estimulación induce

la activación de Ras y sus rutas efectoras Ras/ERK y PI3K/Akt, cuya señalización produce la acumulación de las ciclinas tipo D (CcnD) y la disminución de los inhibidores de CDKs (CKIs), reguladores negativos de la progresión del ciclo (Aktas et al., 1997; Jones and Kazlauskas, 2001b; Torii et al., 2006). Las CcnD se asocian con los CDK4/6 formando los complejos CDK-Ciclina que una vez activos, fosforilan a las proteínas de la familia Retinoblastoma (RB) (Adams, 2001). Estas proteínas mantienen secuestrados a los factores de transcripción E2F, encargados de inducir la expresión de multitud de genes necesarios para la replicación del DNA (Harbour and Dean, 2000). La fosforilación de RB por los complejos CDK4/6-CcnD induce una actividad transcripcional parcial de E2F que resulta en la expresión de la otra ciclina reguladora de la fase G1, la ciclina E (CcnE). La formación del complejo CDK2-CcnE contribuye a la hiperfosforilación e inactivación total de RB, desencadenando la liberación de E2F y consecuentemente la entrada en fase S (Lundberg and Weinberg, 1998). De este modo, las rutas efectoras de Ras regulan la transición G1/S acoplado los factores mitogénicos a la fosforilación e inactivación de RB (Peeper et al., 1997) (**Figura 10**).

Al mismo tiempo, la transición G1/S está controlada por los CKIs, que funcionan como reguladores negativos (Sherr and Roberts, 1999), y pueden ser agrupados en dos familias distintas según sus características funcionales y estructurales:

- La familia INK4, formada por 4 miembros (p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d}) que inhiben el ciclo bloqueando la asociación de CDK4/6 con las CcnD mediante su unión a los CDKs.
- La familia CIP/KIP, formada por 3 miembros (p21^{CIP1}, p27^{KIP1}, y p57^{KIP2}), tienen un espectro de acción más amplio pues inhiben la actividad de las ciclinas D, E, A y B uniéndose al complejo CDK-ciclina (Sherr and Roberts, 1999).

Las proteínas p21^{CIP1} y p27^{KIP1} inhiben la actividad de los complejos CDK-Ciclinas, pero además, son esenciales para su activación y estabilización promoviendo el ensamblaje de los mismos (Cheng et al., 1999; LaBaer et al., 1997). La estimulación de la ruta Ras/ERK por factores de crecimiento induce la expresión de p21^{CIP1} (cuyos niveles son mínimos en células quiescentes) (Liu et al., 1996). p21^{CIP1} funciona como un sensor de la intensidad de la señal, pues una activación excesiva de esta ruta conduce a una parada de ciclo en G1 debido al aumento de expresión de p21^{CIP1} (Pumiglia and Decker, 1997; Sewing et al., 1997; Woods et al., 1997). p27^{KIP1} sin embargo, está altamente expresado en células quiescentes, pues su transcripción es estimulada por rutas inhibitorias de la progresión del ciclo (Kuiperij et al., 2005; Medema et al., 2000). Tras la entrada en fase G1 por estimulación mitogénica, las rutas efectoras de Ras reducen los niveles de p27^{KIP1} progresivamente, mediante su degradación proteica o la inhibición de su transcripción (Aktas et al., 1997; Kawada et al., 1997; Pruitt and Der, 2001; Takuwa and Takuwa, 1997); aunque también pueden alterar su localización subcelular (Fujita et al., 2003). Recientemente se ha descrito que la actividad de complejos AP-1 (Activator protein 1) tras el estímulo mitogénico reprime la transcripción de p27^{KIP1}, contribuyendo a su disminución (Khattar and Kumar, 2010).

La activación de las MAPKs ERK1/2 mediada por Ras es esencial para la progresión del ciclo (Pages et al., 1993). Una vez activas, la translocación de las mismas al núcleo es un evento crítico para la regulación de la expresión génica y la replicación del DNA inducida por factores de crecimiento (Brunet et al., 1999a). En el núcleo, ERK induce la actividad de factores de transcripción pre-existentes promoviendo la expresión de un conjunto de genes denominados IEGs (Immediate early genes), cuyos productos génicos incluyen nuevos factores de transcripción que posteriormente regulan la progresión del ciclo y la supervivencia (Fambrough et al., 1999; Murphy and Blenis, 2006). Como ejemplo ilustrativo, ERK1/2 activa al factor de transcripción de la familia TCF (Ternary complex factor) Elk-1, el cual forma un complejo con el factor SRF (Serum response factor) (Marais et al., 1993). Este complejo activa la transcripción de IEGs, tales como *c-Fos*, a través de la unión a elementos SRE (Serum response elements) presentes en sus promotores (Gille et al., 1995). Posteriormente, la activación sostenida de ERK produce la estabilización de *c-Fos* por fosforilación directa (ya que los productos de genes IEGs tienen una vida media muy corta) (Murphy et al., 2004; Murphy et al., 2002), el cual se asocia con *c-Jun* constituyendo el complejo AP-1. Este complejo (de proteínas recién sintetizadas) induce la transcripción de importantes reguladores del ciclo celular, como la *Ccnd1* (Albanese et al., 1995; Balmanno and Cook, 1999) o *c-myc* (Iavarone et al., 2003) (**Figura 11**); si bien, ERK también regula la expresión de *Ccnd1* a través de otros factores de transcripción (Klein and Assoian, 2008), entre ellos el propio *c-myc* (Daksis et al., 1994). Varios trabajos han demostrado que la activación sostenida de ERK es esencial para la acumulación de la *Ccnd1* a lo largo de la fase G1 (Lavoie et al., 1996; Weber et al., 1997), ya que esta activación continuada produce la fosforilación y estabilización de muchos de los sustratos esenciales para la progresión del ciclo (Murphy et al., 2004).

Adicionalmente, un estudio reciente ha demostrado que la activación sostenida de ERK es necesaria además, para la continua inhibición transcripcional (dependiente en su mayoría de la actividad del complejo AP-1) de una serie de genes antiproliferativos durante la fase G1, favoreciendo así la entrada en fase S (Yamamoto et al., 2006). La inhibición de la ruta Ras/ERK durante la fase G1, incluso justo antes de la entrada en fase S, produce una parada del ciclo celular debido al aumento de expresión de estos genes antiproliferativos (*JunD*, *Tob1*, etc) (Yamamoto et al., 2006). Por tanto, la activación sostenida de ERK es necesaria para la inducción de genes proliferativos (*Ccnd1*) y la inhibición de genes antiproliferativos.

3.2.2 Rutas de señalización mediadas por PI3K

Anteriormente comentamos que la activación de RTKs por factores de crecimiento induce el reclutamiento de multitud de proteínas a los residuos fosforilados del receptor, entre ellas, las proteínas de la familia PI3K (Kazlauskas and Cooper, 1990; Ruderman et al., 1990). Estas proteínas están formadas por una subunidad catalítica (p110) y una subunidad regu-

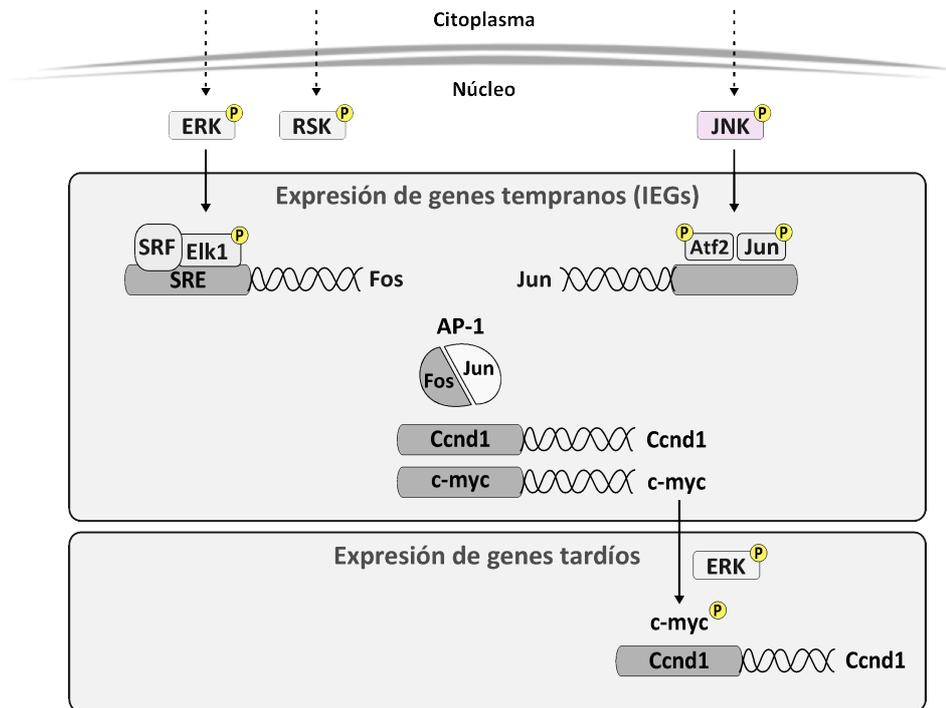


Figura 11. Regulación de la expresión génica mediada por MAPKs. Las MAPKs ERK y JNK translocan al núcleo donde fosforilan factores de transcripción preexistentes como Elk-1 y Atf-2, respectivamente. Estos factores de transcripción inducen la expresión de genes de respuesta inmediata o IEGs (lmmmediate early genes), como *c-Fos* y *c-Jun*. Estas proteínas recién sintetizadas funcionan también como factores de transcripción, y forman el complejo AP-1 cuya actividad transcripcional induce la expresión de genes reguladores del ciclo celular, entre ellos la *ciclina D1* (*Ccnd1*) o *c-myc*. La activación sostenida de ERK produce la estabilización de los productos proteicos de los genes IEGs mediante fosforilación, favoreciendo la actividad de los mismos a lo largo de la fase G1 del ciclo celular. Por ejemplo, *c-myc* una vez fosforilado por ERK, se estabiliza e induce la transcripción de la *Ccnd1* contribuyendo a su acumulación en la fase G1 del ciclo.

ladora (p85), y se unen al receptor directamente, o a través de proteínas adaptadoras mediante el dominio SH2 de la subunidad p85. Esta interacción produce un cambio conformacional en p85 que se transmite a p110, aumentando su actividad enzimática, que cataliza la formación de PIP₂ y PIP₃ en la membrana. Estos fosfolípidos actúan como segundos mensajeros constituyendo un punto de anclaje para multitud de moléculas efectoras como PDK1 (3-phosphoinositide dependent protein kinase 1) y Akt/PKB (AKR mouse transforming virus protein) (Franke et al., 1995), entre otras (Figura 12). Ras-GTP puede activar a PI3K interaccionando directamente con la subunidad catalítica p110 (Kodaki et al., 1994; Rodriguez-Viciana et al., 1994). Esta interacción estimula la actividad de PI3K, y además actúa sinérgicamente con la activación de PI3K por los receptores activados (Rodriguez-Viciana et al., 1996). Adicionalmente, existen al menos dos fosfatasa cuya actividad regula negativamente la señalización a través de PI3K mediante la reducción de los niveles de PIP₃ en la membrana: PTEN (Phosphatase and Tensin homologue deleted on

chromosome 10) y SHIP (SH2-containing inositol 5'-phosphatase) (Vivanco and Sawyers, 2002) (**Figura 12**).

(i) Ruta de señalización PI3K/Akt

La actividad de PI3K desencadena la activación de diferentes proteínas señalizadoras. La serina/treonina quinasa PDK1 (constitutivamente activa), interacciona con la membrana a través de la unión de su dominio PH a los PIP₃ generados por la actividad de PI3K (Alessi et al., 1997; Anderson et al., 1998). Del mismo modo, Akt también transloca a la membrana mediante la interacción de su dominio PH con PIP₂ y PIP₃ (Andjelkovic et al., 1997). La serina/treonina quinasa Akt es uno de los principales efectores de PI3K, que puede ser activado tras la estimulación con factores de crecimiento (Alessi et al., 1996) y mediante estrés oxidativo (Van der Kaay et al., 1999; Wang et al., 2000). Una vez activo, Akt puede fosforilar un gran número de sustratos para regular diversos procesos fundamentales como la supervivencia, proliferación, crecimiento celular, angiogénesis, metabolismo y migración (Franke, 2008; Manning and Cantley, 2007). En la membrana, Akt se activa completamente tras la fosforilación de dos residuos específicos, la treonina 308 (Thr308) y la serina 473 (Ser473). Aunque la fosforilación en Thr308 es suficiente para activar a Akt, la activación completa requiere la fosforilación en Ser473 (Alessi et al., 1996; Stokoe et al., 1997). PDK1 fosforila Akt en Thr308 (Alessi et al., 1997; Andjelkovic et al., 1997) lo que promueve un cambio de conformación que permite la fosforilación de la Ser473 por mTORC2 (mamma-target of rapamycin complex 2) (Sarbasov et al., 2005). Se han descrito otras quinastas que pueden fosforilar Akt en este residuo dependiendo del contexto, por ejemplo DNA-PK (Bozulic et al., 2008), proteínas asociadas a lipid-rafts (Hill et al., 2002), e incluso la autofosforilación del propio Akt (Toker and Newton, 2000). No obstante, se considera que tras la estimulación con factores de crecimiento la fosforilación de Akt en Ser473 es realizada principalmente por mTORC2 (**Figura 12**). La activación de la ruta PI3K/Akt ejerce un papel fundamental en la regulación de procesos celulares como la supervivencia, proliferación, crecimiento, metabolismo y angiogénesis, entre otros (Franke, 2008).

Supervivencia:

La supervivencia celular está controlada fundamentalmente por la ruta PI3K/Akt, aunque también participa en su regulación la ruta Ras/ERK, explicado previamente. Diversas proteínas pro-apoptóticas son dianas de Akt (Franke et al., 1997), como es el caso de ASK1 (Apoptosis signal-regulating kinase 1), JNK, Bad, Bax, Casp9 (Caspase 9) y los factores de transcripción FoxO (Forkhead box protein O), que regulan la expresión de genes pro-apoptóticos como *Bim* (Brunet et al., 1999b; Cardone et al., 1998; Datta et al., 1997; Gardai et al., 2004; Kim et al., 2001; Kops and Burgering, 1999) (**Figura 12**). Akt fosforila estas proteínas pro-apoptóticas promoviendo su secuestro por la familia de proteínas 14-3-3, y por tanto bloqueando su actividad.

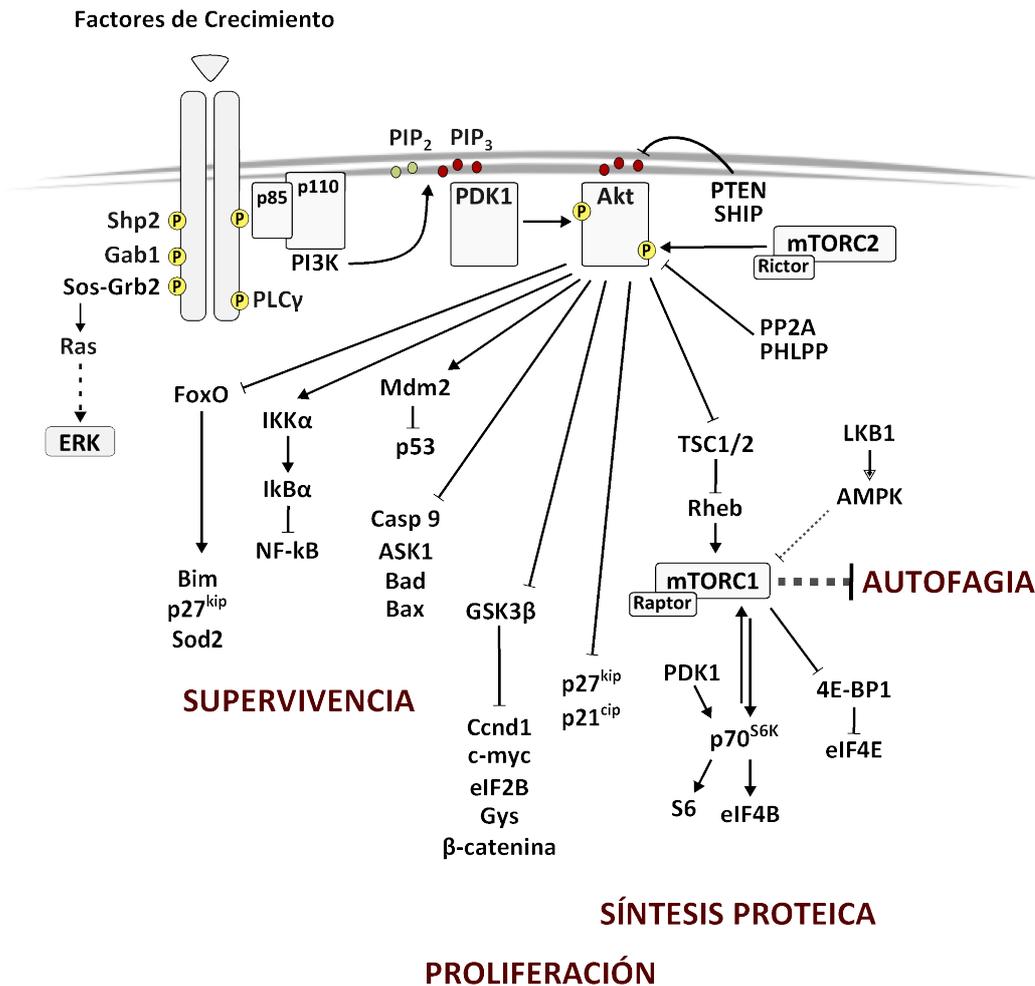


Figura 12. Ruta de señalización PI3K/Akt. La estimulación con factores de crecimiento induce la activación de la enzima PI3K, cuya actividad cataliza la formación de PIP₂ y PIP₃ en la membrana. Estos fosfolípidos sirven como punto de anclaje para diversas proteínas, como las quinasas PDK1 y Akt. En la membrana, Akt es activada por la fosforilación de PDK1 y mTORC2. Una vez activa, Akt fosforila multitud de sustratos, regulando principalmente la supervivencia celular, la proliferación, el crecimiento celular y la síntesis de proteínas. Las fosfatasas PTEN y SHIP reducen los niveles de PIP₂ y PIP₃ en la membrana regulando negativamente la actividad de PI3K.

En determinadas circunstancias Akt también puede inhibir la apoptosis mediante la regulación de los factores de transcripción p53 y NF-κB. NF-κB pertenece a una familia de factores de transcripción cuya función, dependiendo del contexto y del tipo celular, puede estar implicada en respuesta inmune e inflamatoria, regulación de la apoptosis, proliferación y transformación celular (Barkett and Gilmore, 1999; Pahl, 1999). Normalmente, NF-κB induce la expresión de genes implicados en supervivencia, tales como *Sod2* (Superóxido dismutase 2) o *Bcl-xL* (Bernard et al., 2002; Pahl, 1999), si bien en otras ocasiones favorece la apoptosis (Barkett and Gilmore, 1999). Diversos trabajos han demostrado que Akt puede activar a NF-κB mediante la fosforilación y activación de la quinasa IKK (IκBα Kinase), en-

cargada de fosforilar al inhibidor de NF- κ B para su degradación (Ozes et al., 1999; Romashkova and Makarov, 1999). Sin embargo, otros estudios muestran, también en fibroblastos, que la activación de Akt tras la estimulación con PDGF no induce la actividad de NF- κ B (Rauch et al., 2000), diferencias debidas probablemente al tipo celular. Por otro lado, la fosforilación de Mdm2 (transformed mouse 3T3 cell double minute 2) por parte de Akt induce su translocación al núcleo donde Mdm2 es capaz de inhibir a p53, uno de los factores de transcripción pro-apoptóticos mejor conocidos (Mayo and Donner, 2001) (**Figura 12**).

Crecimiento celular:

El crecimiento celular es un proceso necesario para la proliferación, y está regulado por la ruta PI3K/Akt a través de las serina/treonina quinasas mTOR y p70^{S6K} (ribosomal protein S6 kinase), reguladores fundamentales de la síntesis de proteínas y el crecimiento celular (Franke, 2008; Wullschleger et al., 2006) (**Figura 12**). La quinasa mTOR puede formar dos complejos excluyentes y funcionalmente distintos: mTORC1 (mTOR complex 1) cuando está unido a raptor (regulatory asociated protein of mTOR), y mTORC2 (mTOR complex 2) cuando está asociado a rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR). mTORC1 funciona como un sensor molecular que regula la síntesis proteica, el crecimiento celular y la autofagia en función de la disponibilidad de nutrientes y el nivel energético (Dennis et al., 2001; Shaw and Cantley, 2006). mTORC2 sin embargo, parece estar implicado en la polaridad celular y el control espacial del crecimiento (Shaw and Cantley, 2006).

Una vez activo, Akt promueve la activación de mTOR mediante la fosforilación e inactivación del complejo TSC1/2 (Tuberous sclerotic complex 1/2), un regulador negativo de mTOR (Inoki et al., 2002) (**Figura 12**). No obstante, se ha observado que mTOR también puede ser fosforilado directamente por Akt (Nave et al., 1999). Los principales sustratos de mTORC1 que regulan el crecimiento celular son por un lado, la quinasa p70^{S6K} (Isotani et al., 1999; Saitoh et al., 2002), cuya activación estimula la síntesis proteica activando al factor de iniciación de la traducción eIF4B y a la proteína ribosomal S6 (Raught et al., 2004), y por otro lado, el regulador negativo de la traducción 4E-BP1 (eIF4E binding protein 1) al que fosforila e inhibe (Burnett et al., 1998; Gingras et al., 1998). Los distintos componentes de esta ruta interaccionan entre sí añadiendo una mayor complejidad. Por ejemplo, p70^{S6K} puede fosforilar a mTOR estableciendo una retroalimentación positiva (Chiang and Abraham, 2005; Holz and Blenis, 2005), y la activación completa de p70^{S6K} requiere la fosforilación secuencial en Thr389 por mTOR y a continuación en Thr229 por PDK1 (Dufner and Thomas, 1999; Pullen et al., 1998; Shaw and Cantley, 2006) (**Figura 12**).

Adicionalmente, Akt inhibe la actividad de la serina/treonina quinasa GSK3 β (Glycogen shynthase kinase 3 beta) mediante fosforilación (Cross et al., 1995). Esta quinasa inhibe la síntesis de glucógeno mediante la fosforilación de la enzima Gys (Glycogen synthase), e igualmente fosforila e inactiva al factor de iniciación de la traducción eIF2B, inhibiendo la síntesis proteica necesaria para el crecimiento y la proliferación celular (Cohen and Frame,

2001; Welsh et al., 1998) (**Figura 12**). Asimismo, GSK3 β participa en la ruta de Wnt/ β -catenina regulando los niveles citoplasmáticos de β -catenina, pues la fosforila induciendo su degradación. La activación de la ruta mantiene a GSK3 β retenida en un complejo con la proteína *scaffold* Axin (inhibiendo su actividad), de manera que β -catenina se asocia con el factor de transcripción TCF y estimulan la expresión génica (Rayasam et al., 2009).

(ii) Contribución de la ruta PI3K/Akt a la progresión G1/S del ciclo celular

En la sección anterior comentamos que el segundo pico de activación de Ras tras la estimulación mitogénica en fibroblastos está asociado a la activación de la ruta PI3K/Akt (Jones and Kazlauskas, 2001a). La activación de esta ruta en la fase G1 es necesaria para la progresión del ciclo y la entrada en fase S (Cheatham et al., 1994; Jones et al., 1999; Vemuri and Rittenhouse, 1994). Varios componentes de la maquinaria de división celular son regulados por la ruta PI3K/Akt, muchos de ellos comunes con la señalización mediada por Ras/ERK, estableciéndose una cooperación entre ambas vías que favorece la progresión del ciclo (Liang and Slingerland, 2003) (**Figura 10**). En este sentido, la activación de Akt contribuye a la estabilidad proteica de la Ccnd1 mediante la fosforilación e inactivación de la quinasa GSK3 β , pues esta quinasa fosforila Ccnd1 en Thr286 para su posterior degradación (Cross et al., 1995; Diehl et al., 1998) (**Figura 12**).

La activación de la ruta de mTOR favorece la proliferación mediante el aumento de la síntesis proteica y el crecimiento celular, procesos en los que también cooperan ambas rutas, Ras/ERK y PI3K/Akt; por ejemplo, en la inhibición de TSC2 (Inoki et al., 2002; Ma et al., 2005) y la estimulación de factores de iniciación de la traducción como eIF4B (Shahbazian et al., 2006).

Por otro lado, como comentamos anteriormente, la estimulación con mitógenos controla los niveles de expresión de los CKIs p21^{CIP1} y p27^{KIP1} a través de Ras y sus rutas efectoras (Mirza et al., 2004; Pruitt and Der, 2001). En el caso de p27^{KIP1}, tras la entrada en fase G1 los niveles proteicos descienden progresivamente debido a un aumento en su degradación, pero también a una disminución en la transcripción; Akt reprime la transcripción de p27^{KIP1} inducida por los factores de transcripción FoxO mediante la inhibición de los mismos por fosforilación (Dijkers et al., 2000; Medema et al., 2000). Asimismo, la estimulación mitogénica de PI3K contribuye a la disminución de los niveles proteicos de p27^{KIP1} (Takuwa and Takuwa, 1997). Además, Akt puede fosforilar p27^{KIP1} y p21^{CIP1} induciendo su localización citoplasmática y bloqueando por tanto, su efecto inhibitorio sobre la progresión del ciclo celular (Liang et al., 2002; Rossig et al., 2001; Shin et al., 2002; Zhou et al., 2001).

Por último, entre los mecanismos de regulación negativa conocidos para esta ruta, podemos señalar la participación de las fosfatasa PTEN y SHIP en la inhibición de la actividad de PI3K (Vivanco and Sawyers, 2002), y la fosforilación de IRS y Rictor por p70^{S6K} (Mendoza et al., 2011). Asimismo, se han descrito dos tipos de fosfatasa que pueden catalizar la defosforilación directa de Akt, las fosfatasa PHLPP1 y PHLPP2 (PH domain and lucine rich

repeat protein phosphatase), y las fosfatasa de la familia PP2A (Brognard et al., 2007; Gao et al., 2005; Kuo et al., 2008).

(iii) Señalización mediada por PI3K independiente de Akt

Además de la multitud de procesos que PI3K controla a través de Akt, existen otras vías efectoras independientes de esta quinasa. Así, PI3K puede activar a la serina/treonina quinasa SGK (Serum and glucocorticoid-inducible kinase) (Park et al., 1999) y a las GTPasas Cdc42 y Rac, con independencia de Akt (Vivanco and Sawyers, 2002). De hecho, la señalización coordinada entre las GTPasas Ras y Rac está mediada por PI3K (Rodríguez-Viciano et al., 1997). En este proceso, Sos tiene un papel fundamental acoplando la señalización entre ambas GTPasas, tal y como se comentó en la sección 2.3.4. (Innocenti et al., 2003; Nimnual et al., 1998). No obstante, Ras también puede activar a Rac independientemente de PI3K, mediante la interacción directa con el GEF de Rac Tiam1 (Lambert et al., 2002).

3.2.3 Otra señalización de interés

Dado que las proteínas Sos pueden activar a Rac en determinadas condiciones, es importante tener en cuenta que estas GTPasas son reguladoras del citoesqueleto de actina, el ciclo celular y la transcripción génica (Westwick et al., 1997). En este sentido, se ha descrito que la actividad GEF de Sos sobre Rac es capaz de integrar señales procedentes de receptores de factores de crecimiento y de integrinas específicas, induciendo la expresión de Ccnd1 y por tanto la progresión de la fase G1 del ciclo celular (Mettouchi et al., 2001). De hecho, diversos estudios han demostrado que Rac1 contribuye a la progresión de la fase G1 incrementando los niveles de mRNA de la Ccnd1 (Joyce et al., 1999; Klein et al., 2007; Westwick et al., 1997), por ejemplo a través de la activación de NF- κ B (Joyce et al., 1999).

4. Significado funcional de las proteínas Sos *in vivo*

4.1 Análisis funcional de las proteínas Sos. Modelos animales

La mayoría de trabajos publicados en la investigación de las proteínas Sos han sido realizados preferentemente con Sos1, o con construcciones de las que no se especifica la isoforma de procedencia. De hecho, la bibliografía relativa específicamente a Sos2 es muy reducida. Sólo en algunos casos los trabajos abarcan el estudio comparativo de Sos1 y Sos2, o al menos detectan ambas isoformas a la vez (Nielsen et al., 1997; Oh-hora et al., 2003; Qian et al., 2000; Yang et al., 1995), aportando información sobre la redundancia o especificidad que existe entre ellas. En este sentido, los ratones *ko* individuales para Sos1 y Sos2 han aportado información crucial acerca de la función de cada isoforma (Esteban et al., 2000; Qian et al., 2000; Wang et al., 1997). Adicionalmente, podemos destacar la genera-

ción de modelos animales para reproducir patologías humanas como el síndrome de Noonan (Chen et al., 2010b) y un modelo de desarrollo tumoral utilizando un ratón transgénico para una forma mutante de *Sos1* expresada en queratinocitos (Sibilia et al., 2000). La mayoría de enfermedades humanas relacionadas con las proteínas SOS están asociadas a mutaciones en *SOS1*, mientras que sólo se ha descrito implicación de *SOS2* en leucemias causadas por translocaciones del gen *MLL* (*m*ixed *l*ineage *l*eukemia) (Yam et al., 2004), y en estudios de susceptibilidad a la enfermedad de Alzheimer (Hamilton et al., 2007).

4.1.1 Pérdida de función

(i) Modelos animales

El análisis funcional de las proteínas *Sos* *in vivo* ha proporcionado información sobre la redundancia o especificidad funcional de estas proteínas. La generación de ratones deficientes en *Sos1* y *Sos2* mediante inactivación por recombinación homóloga, ha revelado que *Sos1* es esencial para el desarrollo embrionario, pues su ausencia es letal a mitad de la gestación (Qian et al., 2000; Wang et al., 1997). Este mismo fenotipo se ha descrito en otras especies como *D. melanogaster* y *C. elegans* donde la expresión de *Sos* también es necesaria en el desarrollo (Chang et al., 2000; Rogge et al., 1991; Simon et al., 1991). En cambio, los ratones deficientes en *Sos2* son viables, fértiles y sin fenotipo aparente (Esteban et al., 2000). Este hecho es importante, pues demuestra que *Sos2* no es capaz de compensar la deficiencia de *Sos1* en el desarrollo embrionario a pesar del alto grado de semejanza en secuencia y estructura, e incluso del amplio patrón de expresión de ambas proteínas; y además, apunta a que ninguno de los GEFs específicos de Ras que se expresen en ese momento del desarrollo puede sustituir la función de *Sos1*.

Los embriones deficientes en *Sos1* mueren entre los días 9-11 DPC (*d*ay *p*ost-*c*onception), posiblemente por causas secundarias a defectos en la placenta. La capa de espongiotrofoblastos y el laberinto placentario presentan graves defectos de desarrollo y organización, y la vasculatura en el laberinto es defectuosa, probablemente impidiendo una correcta alimentación del embrión (Qian et al., 2000). La expresión de *Sos1* en estas capas de la placenta de animales *wt* es muy superior a la de *Sos2*, sugiriendo un requerimiento específico de *Sos1* para el desarrollo de la placenta y su correcta vascularización (Qian et al., 2000). En contraste con estos datos, los resultados obtenidos por otro grupo anteriormente mostraron que la eliminación de *Sos1* en ratón es letal a día 12 DPC debido a problemas cardíacos en el embrión, y defectos en el saco vitelino (Wang et al., 1997). La discusión científica sobre las diferencias en la muerte embrionaria en ambos estudios concluye que presumiblemente, la variabilidad genética entre las estirpes murinas y las células madre embrionarias utilizadas, así como las distintas estrategias empleadas para la inactivación genética de *Sos1* (eliminación de exones distintos), podrían explicar las discrepancias observadas. No obstante, en ambos trabajos la ausencia de *Sos1* es letal en el desarrollo, lo

que contrasta claramente con la función dispensable de Sos2. Estos datos sugieren funciones únicas y específicas para ambas proteínas en mamíferos.

(ii) Cultivos celulares

Pese a que comparten la misma actividad enzimática y gran parte de la estructura molecular, las proteínas Sos1 y Sos2 presentan diferencias en sus propiedades bioquímicas y de señalización como explicamos anteriormente (ver **sección 2.1**). La estabilidad proteica de mSos1 es mayor (Nielsen et al., 1997), y hSOS2 tiene más afinidad que hSOS1 por Grb2 (Yang et al., 1995). Es probable que las diferencias entre Sos1 y Sos2 en la región C-terminal puedan ser responsables, al menos en parte, de algunas de estas diferencias bioquímicas y funcionales, por ejemplo la afinidad por Grb2 (al que se une por esta región).

Diversos experimentos realizados con fibroblastos embrionarios (MEFs, mouse embrionic fibroblast) inmortalizados derivados de ratones *ko* para Sos1 (*ko-Sos1*), han proporcionado información sobre las propiedades señalizadoras de ambas proteínas. Estudios de señalización en respuesta a EGF sugieren que Sos1 participa en la respuesta a corto y largo plazo mientras que Sos2 sólo es capaz de mediar señales a corto plazo (Qian et al., 2000). Concretamente, tras la estimulación con EGF a tiempos cortos (5-30 minutos) los niveles de activación de Ras y la actividad de ERK no disminuyen en los MEFs *ko-Sos1* comparados con MEFs *wt*, indicando que Sos2 puede compensar la carencia de Sos1 en estas condiciones. Sin embargo, a tiempos largos (por encima de 60-90 minutos) se observa una reducción de la activación de ERK en las células deficientes en Sos1 (Qian et al., 2000). Los autores sugieren que Sos1, pero no Sos2, es capaz de señalizar a largo plazo debido a que su unión a los complejos formados tras la estimulación con EGF (compuestos por EGFR-Shc-Grb2-Sos) es más estable que la unión de Sos2, como demuestran experimentos de inmunoprecipitación realizados en estos MEFs (Qian et al., 2000). En cierto desacuerdo con estos resultados, ensayos de estimulación con EGF durante 5 minutos realizados en MEFs primarios *ko-Sos1* mostraron una reducción en la fosforilación de ERK1/2 respecto a MEFs *wt*. Estos MEFs, a diferencia de los anteriores proceden de los embriones *ko-Sos1* con defectos cardíacos (Wang et al., 1997). También en contraposición, la sobreexpresión de dominantes negativos de Sos1 en células CHO-IR (Chinese hamster ovary-insulin receptor), que sobreexpresan el receptor de insulina, ha mostrado que la activación de la ruta Ras/ERK tras la estimulación con insulina a tiempos cortos depende notablemente de la actividad de Sos1 (Park et al., 2000; Sakaue et al., 1995). Si bien, no se puede descartar que estos dominantes negativos inhiban también la actividad de Sos2, evitando que pueda compensar a Sos1 en estas condiciones.

Finalmente, y a favor de las diferencias en las propiedades biológicas de ambas proteínas, los MEFs *ko-Sos1* mostraron resistencia a la transformación por los oncogenes v-Src o EGFR (EGF receptor), indicando que la actividad de Sos2 no era capaz de transmitir la señal oncogénica (Qian et al., 2000). La transformación celular requiere la continua actividad del on-

cogén, lo que correlaciona con la capacidad de Sos1 para señalar a largo plazo. Apoyando esta idea, experimentos de inmunoprecipitación con Shc y v-Src (constitutivamente activo y por tanto señalizando a largo plazo) confirmaron que Sos1 se une a estas proteínas más eficientemente que Sos2. Además, demostraron que la restauración de la expresión de Sos1 en los MEFs *ko-Sos1* restablece la susceptibilidad de estas células a la transformación por v-Src (Qian et al., 2000). Igualmente, otros estudios han descrito que la expresión de formas miristoiladas de Sos1 en fibroblastos NIH3T3 exhiben mayor capacidad transformante que las de Sos2. Según los autores, esto puede ser debido a diferencias en la estabilidad de ambas proteínas (Nielsen et al., 1997).

A la vista de todos estos datos, el estudio funcional *in vivo* de las proteínas Sos, especialmente Sos1, requiere la generación de modelos inducibles que permitan eliminar la expresión una vez concluido el desarrollo embrionario. De esta manera, podríamos averiguar en primer lugar, si la función de Sos1 es esencial no sólo en el desarrollo embrionario sino también en la etapa post-natal del ratón, y si su eliminación produce algún fenotipo en el ratón adulto.

4.1.2 Ganancia de función

Además de los modelos basados en la inactivación de la función, existen varios modelos genéticos de mutantes de Sos1 con ganancia de función (Chen et al., 2010b; Modzelewska et al., 2007; Sibilía et al., 2000):

- En *C. elegans*, la ganancia de función de Sos-1 por una mutación en el dominio DH produce defectos en el desarrollo del gusano (Modzelewska et al., 2007). En este trabajo además, generaron un mutante de *SOS1* humano, *SOS1^{C282R}*, homólogo al encontrado en *C. elegans*. Esta mutación altera la inhibición que ejerce el dominio DH sobre el sitio alostérico provocando un aumento en la actividad de *SOS1*, y una mayor estimulación de la ruta Ras/ERK en células humanas en cultivo (Modzelewska et al., 2007).

- Mutantes de *hSOS1* análogos a estos se han detectado en pacientes con síndrome de Noonan (NS) (Roberts et al., 2007) (ver a continuación, **sección 4.2.3**). De hecho, recientemente se ha generado un modelo murino que expresa de forma inducible el mutante *Sos1^{E846K}*. Esta mutación activante presente en pacientes con NS, afecta al dominio catalítico CDC25 aumentando la actividad GEF (Chen et al., 2010b) (**Figura 13**, pág. 36). Los ratones homocigotos para la mutación sufren en su mayoría letalidad embrionaria por defectos severos en la función cardiovascular, y los heterocigotos desarrollan un espectro fenotípico muy parecido al que sufren los pacientes humanos con este síndrome, incluyendo anomalías hematológicas, dismorfia facial, y graves defectos cardíacos (Chen et al., 2010b).

- Por otro lado, las mutaciones en Sos1 que implican ganancia de función pueden contribuir al desarrollo tumoral. La expresión específica en queratinocitos de una forma constitutivamente activa de Sos, *SOS-F* (construida mediante la eliminación de gran parte de la región

C-terminal y la adición de un grupo farnesilo para su localización estable en la membrana), induce la formación de tumores en la piel de ratones transgénicos para *SOS-F* (Sibilia et al., 2000). Curiosamente, los tumores que desarrollan estos animales transgénicos dependen de la función de EGFR. La activación exacerbada de *SOS-F* induce un aumento de proliferación en estos tumores, sin embargo, la función de EGFR transmite señales anti-apoptóticas independientes de *SOS1* (probablemente a través de Akt), necesarias para la supervivencia de las células tumorales (Sibilia et al., 2000). En consonancia con estos resultados, estudios anteriores realizados con fibroblastos NIH3T3 y Rat-1 demostraron que formas constitutivamente activas de Sos, mediante farnesilación, miristoilación o a través de la eliminación de su región C-terminal, pueden inducir transformación celular (Aronheim et al., 1994; Nielsen et al., 1997; Wang et al., 1995).

- Asimismo, los mutantes de *SOS1* en humanos que carecen de la región C-terminal por la aparición de un codón de stop prematuro, también presentan una ganancia de función. Cuando estos mutantes se encuentran en la línea germinal provocan un crecimiento exacerbado en la encía, dando lugar a una patología denominada fibromatosis gingival (Hart et al., 2002) (ver a continuación, **sección 4.2.3**).

4.2 Patologías asociadas a la función de Sos

4.2.1 Papel de Sos en procesos cancerígenos

Actualmente, las patologías humanas asociadas a alteraciones en las proteínas Sos están causadas principalmente por una ganancia de función, bien por mutaciones puntuales en la secuencia génica o bien por sobreexpresión. Efectivamente, se ha descrito sobreexpresión de *SOS1* en ciertos tipos de tumores humanos, como en cáncer de vejiga (Watanabe et al., 2000), de riñón (Shinohara et al., 1997), y en cáncer de mama y próstata de pacientes afro-americanos respecto a europeo-americanos (Field et al., 2011; Timofeeva et al., 2009). Recientemente, también se ha observado que la estabilidad del complejo Sos1-E3b1-Eps8 en carcinoma de ovario es necesaria para la adquisición de la capacidad metastática. La deficiencia en la expresión de al menos uno de los elementos de este complejo correlaciona con la incapacidad para metastatizar observada en estas células tumorales (Chen et al., 2010a).

Curiosamente, a diferencia de muchos de los elementos de la ruta RTK/Ras/MAPKs, cuyas formas mutantes están claramente implicadas en procesos carcinogénicos, apenas existen evidencias de mutaciones de *SOS1* presentes en cáncer. De hecho, la búsqueda de mutaciones en *SOS1* realizada en una serie amplia de diferentes tumores ha confirmado que las mutaciones somáticas en este locus son raras en cáncer humano, haciéndolas casi indistinguibles de la tasa natural de mutación (Swanson et al., 2008). Estos datos indican que la principal alteración de Sos1 que puede contribuir al proceso tumoral es la sobreexpresión.

En este contexto, es interesante señalar que existen contaminantes ambientales con propiedades cancerígenas que pueden estimular directamente la expresión de *SOS1* (Pierre et al., 2011). Por ejemplo, la dioxina TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin) funciona como un ligando para el receptor AhR (Aryl hydrocarbon receptor), un factor de transcripción citosólico inducible por unión a ligando. Una vez estimulado, AhR transloca al núcleo y promueve la transcripción de genes relacionados con funciones de detoxificación y metabolismo (Barouki et al., 2007). Recientemente, estudios realizados en la línea celular de hepatocarcinoma humano HepG2, demuestran que tras el tratamiento con esta dioxina, AhR promueve la transcripción de *SOS1*. Así, la sobreexpresión de *SOS1* en estas células desencadena un aumento de la activación de su ruta efectora Ras/ERK, y consecuentemente una tasa proliferativa mayor (Pierre et al., 2011). La exposición continuada a este tipo de tóxicos ambientales puede producir una estimulación constitutiva y patológica de la ruta Sos/Ras/ERK, un proceso que puede ser particularmente relevante en aquellas células cancerosas que no poseen mutaciones en Ras.

4.2.2 Síndrome de Noonan

El síndrome de Noonan (NS) es un desorden del desarrollo, autosómico dominante, genéticamente heterogéneo, y caracterizado por baja estatura, rasgos faciales únicos, anomalías hematológicas, defectos cardíacos congénitos y un grado variable de retrasos neurocognitivos (Noonan, 2006; Tartaglia et al., 2010; Tidyman and Rauen, 2009). Se han descrito varias mutaciones en *SOS1* presentes en la línea germinal, responsables de un 15% de los casos de NS familiar y esporádico (Roberts et al., 2007; Tartaglia et al., 2007). Aparte de *SOS1*, mutaciones en otros elementos de la ruta Ras/MAPK pueden causar este síndrome, como ocurre con *PTPN11* (que codifica la fosfatasa Shp2) cuyas mutaciones producen el 50% de los casos de NS (Tartaglia et al., 2001), o en menor proporción con otros genes como *KRAS*, *RAF1*, *BRAF* o *MEK1* (Nava et al., 2007; Pandit et al., 2007; Sarkozy et al., 2009; Schubert et al., 2006). No obstante, aún queda un 20-25% de casos de los que no se conoce la alteración que los origina. La ausencia de mutaciones en *SOS2* similares a las detectadas en *SOS1*, ha descartado, al menos hasta ahora, que este locus esté afectado en pacientes con NS (Roberts et al., 2007; Tartaglia et al., 2007).

Existe un número considerable de mutaciones diferentes de *SOS1* descritas en pacientes con NS, todas basadas en una sustitución aminoacídica, que da lugar a una ganancia de función. La mayoría se encuentran en los dominios DH, PH, REM, en la zona de unión entre el dominio PH y REM (L), y en menor proporción, en los dominios H y CDC25H (Roberts et al., 2007; Shannon and Bollag, 2007; Tartaglia et al., 2010; Tartaglia et al., 2007) (**Figura 13**). Estas mutaciones alteran la conformación inactiva de SOS, pues afectan a las interacciones intramoleculares (entre la unidad DH-PH y el sitio alostérico, y entre el dominio H y la zona de unión L) que en ausencia de estímulo mantienen a Sos en un estado inactivo (ver **sección 2.3.2**). Varios trabajos han aportado datos experimentales demostrando que

estas mutaciones implican una ganancia de función. Por ejemplo, la expresión de estos mutantes en células humanas en cultivo produce un aumento en la activación de Ras y ERK, incrementando tanto la duración como la intensidad de la señal (Roberts et al., 2007; Tartaglia et al., 2007).

Asimismo, experimentos con mutantes que afectan al dominio H y PH, confirman el aumento en la actividad catalítica de SOS1 tanto *in vitro* como en cultivo (Gureasko et al., 2010; Gureasko et al., 2008; Yadav and Bar-Sagi, 2010). Por último, como hemos comentado previamente, el fenotipo del ratón *knock-in* para *Sos1*^{E846K} pone de manifiesto la ganancia de función de estos mutantes y sus efectos en el desarrollo de un organismo vivo (Chen et al., 2010b).

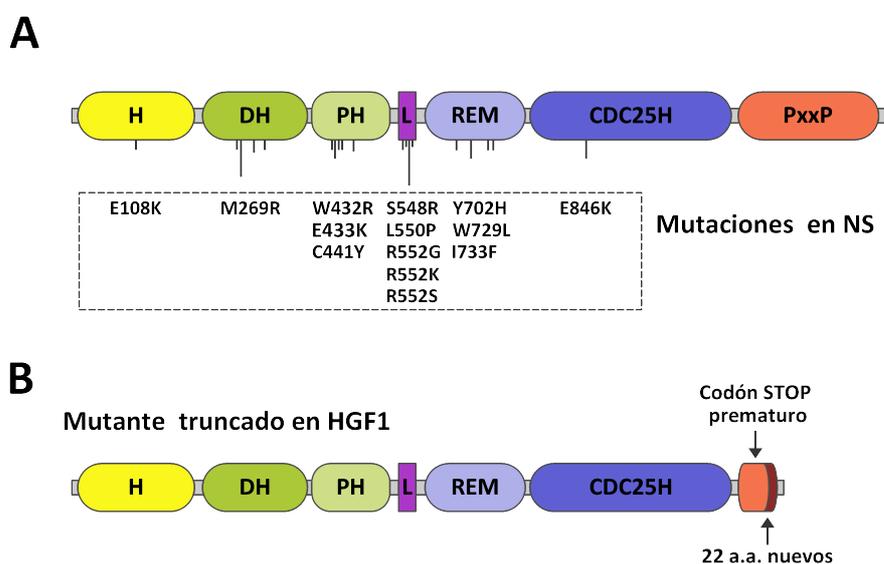


Figura 13. Mutaciones en SOS1 asociadas a patologías humanas. (A) Esquema de la estructura proteica de SOS1 en la que se detallan la posición de los residuos alterados en pacientes con síndrome de Noonan (NS). La mayoría de estas mutaciones, afectan a las interacciones intramoleculares que mantienen a Sos en su conformación inactiva, provocando un aumento en su actividad catalítica. (B) Representación de la forma truncada de SOS1 detectada en la fibromatosis gingival hereditaria tipo 1 (HGF1). Este mutante presenta un codón de parada prematuro debido a la inserción de una citosina en la región C-terminal. Adicionalmente, la forma truncada contiene 22 aminoácidos nuevos en el extremo de la proteína.

Desde un punto de vista más general, es interesante destacar que la “desregulación” de la ruta Ras/MAPKs puede causar una serie de síndromes y desórdenes en el desarrollo conocidos como “Rasopatías” (Figura 14). Gran parte de estas patologías comparten características fenotípicas similares, y han sido clasificadas conjuntamente en la familia de síndromes Neuro-cardio-facio-cutáneos (NCFC) (Bentires-Alj et al., 2006; Fernandez-Medarde and Santos, 2011a). Esta familia engloba, además del NS:

- Síndrome de Costello (CS), causado por mutaciones en *H-RAS* (Aoki et al., 2005), y en menor medida en *K-RAS* y *B-RAF* (Aoki et al., 2008).
- Síndrome de LEOPARD (LS), por mutaciones en *PTPN11*, *RAF1*, o *B-RAF* (Legius et al., 2002; Pandit et al., 2007; Sarkozy et al., 2009).
- Neurofibromatosis tipo 1 (NF1), generada por mutantes en *NF1* (Cawthon et al., 1990).
- Síndromes cardio-facio-cutáneos (CFC), asociados a mutaciones en *B-RAF*, *K-RAS*, y menos frecuentemente en *MEK1/2* (Niihori et al., 2006; Rodriguez-Viciano et al., 2006) (**Figura 14**).

La mayoría de las mutaciones que causan estos síndromes también producen una ganancia de función, excepto en el caso de la Neurofibromatosis tipo 1 (Fernandez-Medarde and Santos, 2011a). La mutación que afecta al gen *NF1* supone una pérdida de función, si bien en términos de señalización global esta mutación conduce a la activación de Ras (pues se trata de una proteína GAP), contribuyendo igualmente a la hiperactivación de la ruta de Ras/MAPKs (**Figura 14**). Lógicamente, el estado de hiperactivación que producen estas mu-

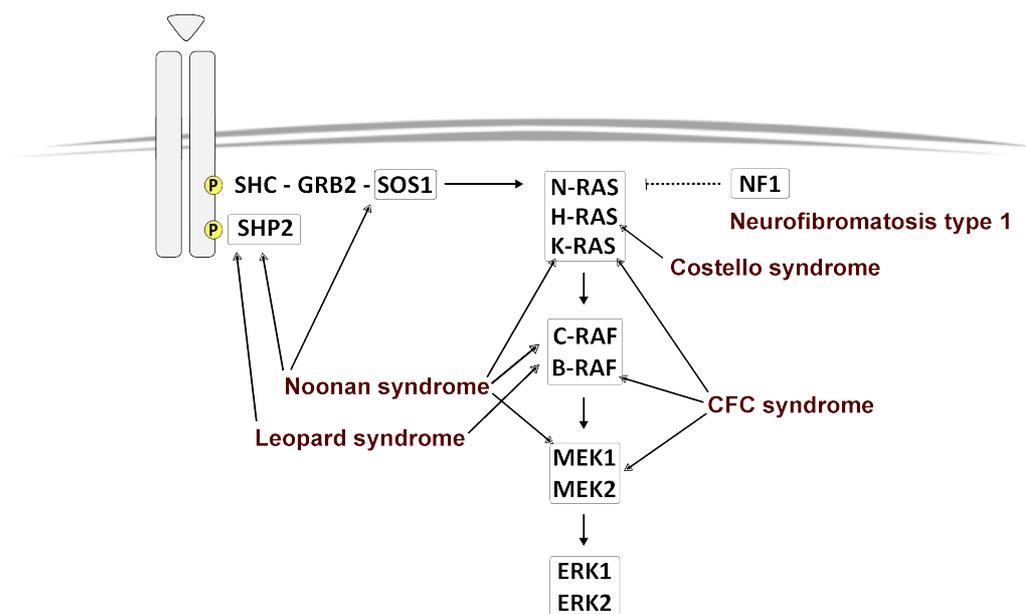


Figura 14. Enfermedades humanas asociadas a mutaciones genes de la ruta Ras/MAPKs. La ruta de señalización Ras/MAPKs controla funciones celulares fundamentales como la proliferación celular, diferenciación y supervivencia. Se han encontrado mutaciones germinales en los genes que codifican prácticamente todos los componentes de esta ruta, provocando síndromes del desarrollo y enfermedades como la neurofibromatosis tipo 1 (causada por mutaciones en el gen *NF1*), el síndrome de Costello (mutaciones en *H-RAS*), síndromes cardio-facio-cutáneos (mutaciones en *K-RAS*, *B-RAF*, y *MEK1/2*), síndrome de Leopard (mutaciones en *PTPN11*, *C-RAF* y *B-RAF*), y el síndrome de Noonan (mutaciones en *PTPN11*, *SOS1*, *K-RAS*, *C-RAF*, *B-RAF* y *MEK1*). Todos ellos se han agrupado en una familia de los denominados síndromes neuro-cardio-facio-cutáneos (NCFC). Adaptada de Tidyman and Rauen, 2009.

taciones repercute en la predisposición de los pacientes a sufrir cáncer. Concretamente, los pacientes con NS tienen predisposición a desarrollar tumores sólidos como el rabdomiosarcoma, y enfermedades mieloproliferativas, en especial la leucemia juvenil mielomonocítica (JMML) (Denayer et al., 2008). Sin embargo, los casos con mutaciones en *SOS1* no parecen tener más riesgo de desarrollar cáncer que la población sana, ni tampoco de sufrir JMML (Kratz et al., 2007; Swanson et al., 2008).

4.2.3 Fibromatosis gingival hereditaria tipo 1

La fibromatosis gingival hereditaria tipo 1, HGF1 (Hereditary gingival fibromatosis type 1), es una condición genética rara, autosómica dominante, caracterizada por un crecimiento benigno de la encía (gingiva). Mediante estudios genéticos se ha identificado una mutación en *SOS1* presente en pacientes con HGF1. Esta mutación consiste en la inserción de una citosina que origina un cambio en el marco de lectura, dando lugar a un codón de stop prematuro. Esto genera una proteína truncada que carece de gran parte de la región C-terminal y que además posee 22 aminoácidos nuevos en el extremo C-terminal (Hakkinen and Csiszar, 2007; Hart et al., 2002) (**Figura 13**). Estas modificaciones confieren una ganancia de función, tal y como señalan varios trabajos comentados previamente, en los que la delección de esta región incrementa la actividad catalítica de Sos, e incluso puede estimular su potencial transformante *in vivo* (Aronheim et al., 1994; Sibilina et al., 2000; Wang et al., 1995).

Los estudios realizados con fibroblastos procedentes de la encía de pacientes con HGF1, han demostrado que existe un incremento significativo en la proliferación de estas células, tanto en cultivos en monocapa como en cultivos en matrices tridimensionales (Lee et al., 2006). Los niveles de activación de Ras y ERK en fibroblastos HGF1 son más elevados que en fibroblastos gingivales de individuos sanos, observándose además una activación de ERK mantenida en el tiempo que depende de la expresión del mutante de *SOS1* (Jang et al., 2007). Consecuentemente, la activación sostenida de la ruta Ras/ERK en los fibroblastos HGF1 induce un aumento en la expresión de proteínas reguladoras de la progresión del ciclo celular, tales como las ciclinas D, ciclinas E, E2F y PCNA, además de un incremento en la fosforilación de RB en comparación con fibroblastos gingivales sanos. Estos datos pueden explicar el efecto hiperproliferativo en los fibroblastos HGF1 (Jang et al., 2007).

La inhibición de la forma mutante de *SOS1* mediante RNA de interferencia en fibroblastos HGF1 reduce considerablemente la proliferación (Jang et al., 2007). Esta reducción es mayor que la obtenida mediante la inhibición de la forma silvestre de *SOS1*, apoyando la idea de que la principal causa de la hiperplasia en enfermos con HGF1 es la presencia de este mutante de *SOS1* en estos fibroblastos (Jang et al., 2007).

4.2.4 Otras patologías

Se han realizado varios estudios con genes candidatos para encontrar componentes genéticos que contribuyan a la predisposición a padecer diabetes tipo 2. En este análisis se ha identificado una asociación significativa de SNPs (Single-nucleotide polymorphisms) de *SOS1* con un mayor riesgo de sufrir esta enfermedad (Barroso et al., 2003). En un estudio posterior, escogieron los mismos genes candidatos utilizados en diabetes para buscar genes de susceptibilidad para Alzheimer, pues existen evidencias sólidas de que el metabolismo de la glucosa y la señalización por Insulina están íntimamente relacionados con la aparición de la enfermedad de Alzheimer. En este estudio encontraron una asociación significativa de algunas variantes de *SOS2* con la predisposición a desarrollar esta enfermedad (Hamilton et al., 2007).

Como curiosidad, recientemente se ha publicado un estudio que relaciona *SOS1* con el hirsutismo, un trastorno caracterizado por el crecimiento excesivo de vello en mujeres siguiendo un patrón de distribución masculino (generalmente dependiente de andrógenos) (Minella et al., 2011). En este trabajo analizaron el perfil transcripcional de tejido epitelial genital de pacientes con hirsutismo severo, y encontraron sobreexpresión de *SOS1* en todas las muestras analizadas. Además, emplearon una línea de fibroblastos dérmicos normales que tras 24 horas de tratamiento con testosterona y DHT (dihidrotestosterona) mostraron un aumento de mRNA y proteína de *SOS1* (Minella et al., 2011).

Finalmente, la consideración de *SOS1* como diana terapéutica, no sólo en los síndromes causados por mutaciones en *SOS1* sino también en cáncer, no ha sido seriamente valorada hasta el momento. Varios experimentos con células procedentes de pacientes con HGF1, y también con cáncer de próstata, están demostrando que la inhibición de las formas mutantes de *SOS1* disminuye la migración y proliferación de estos tipos celulares. Estos resultados indican que *SOS1* podría considerarse como una futura diana para el tratamiento de estas patologías (Jang et al., 2007; Timofeeva et al., 2009). La generación de modelos animales que reproduzcan estas enfermedades permitiría valorar por un lado, si estos genes representan dianas efectivas y por otro, la eficacia *in vivo* de los fármacos dirigidos a la inhibición de estos mutantes.

Objetivos

Como hemos explicado en la introducción, las proteínas Sos1 y Sos2 presentan un alto grado de homología y funcionan como GEFs de las GTPasas de la familia Ras. Sin embargo, el grado de redundancia o especificidad funcional entre ambas no se ha esclarecido por completo. Los resultados obtenidos *in vivo* con los ratones *ko* para cada uno de los loci apuntan a una clara especificidad funcional, revelando un papel esencial de Sos1 en el desarrollo embrionario, y por tanto la incapacidad de Sos2 para compensar su ausencia. Por otro lado, apenas se han realizado estudios comparativos *in vitro* que proporcionen información acerca de las diferencias en la función biológica de cada isoforma.

Por estos motivos, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Identificar el perfil de expresión transcripcional asociado a la ausencia de Sos1 o Sos2 en condiciones de crecimiento activo, mediante la utilización de fibroblastos embrionarios derivados de ratones *ko* para cada una de estas isoformas (caracterización genómica).
2. Caracterizar funcionalmente la deficiencia de Sos1 o Sos2 en los correspondientes fibroblastos derivados de los ratones *ko*:
 - 2.1. Analizando la contribución de cada isoforma a las rutas de señalización mediadas por Ras.
 - 2.2. A través del estudio funcional de los procesos celulares más relevantes afectados por la eliminación de Sos1 y Sos2.
3. Comparar y validar los resultados obtenidos previamente mediante el silenciamiento estable de la expresión de Sos1 o Sos2 utilizando RNA de interferencia (shRNA)

Materiales y Métodos

1. Inmortalización de fibroblastos embrionarios (MEFs)

Para la obtención de líneas inmortalizadas de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs), partimos de cultivos de fibroblastos primarios en pases 2-4 que habían sido congelados previamente tras la disgregación mecánica del embrión (9-10 DPC). Esta disgregación fue realizada en tripsina-EDTA 0,25% (Gibco-BRL) durante 30 minutos y los embriones fueron genotipados por PCR utilizando DNA de los sacos vitelinos. Los cultivos se mantuvieron creciendo en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) hasta el pase 10-15 aproximadamente en el que el cultivo sufre la denominada "crisis de inmortalización". En ese momento, la mayoría de células del cultivo muere, excepto aquellas inmortalizadas espontáneamente que serán las progenitoras de la línea celular. Finalmente, conseguimos un conjunto de líneas MEFs derivadas de embriones *wt*, heterocigotos para *Sos1* (*ht-Sos1*), *ko* para *Sos1* (*ko-Sos1*), heterocigotos para *Sos2* (*ht-Sos2*), y *ko* para *Sos2* (*ko-Sos2*), descritas en la **Tabla 1**. Adicionalmente, subclonamos algunas líneas *wt* y *ko-Sos1* utilizando cilindros de clonación de 8X8mm (Millipore) con los que recogimos grupos de células con aspecto morfológico similar y a su vez, diferentes al resto de células del cultivo. De esta forma obtuvimos líneas celulares diferentes aunque del mismo origen embrionario.

2. Cultivos celulares

Condiciones de cultivo

Las líneas celulares de MEFs inmortalizados se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de FBS, 2mM de glutamina, 50 unidades/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomomicina (todos los productos de Gibco, Invitrogen). El cultivo de estas líneas celulares se realizó sobre placas de poliestireno (BD Bioscience) en un incubador a 37°C y una atmósfera

Genotipo	Número de líneas de embriones diferentes	Número total de líneas disponibles	Tipo celular
<i>wt</i>	5 originales ^a	5 + 2 líneas subclonadas ^b	MEFs inmortalizados
<i>ht-Sos1</i>	3 originales	3	MEFs inmortalizados
<i>ko-Sos1</i>	2 originales	2 + 2 líneas subclonadas ^b	MEFs inmortalizados
<i>ht-Sos2</i>	2 originales	2	MEFs inmortalizados
<i>ko-Sos2</i>	2 originales	2	MEFs inmortalizados

Tabla 1. Información general sobre las líneas celulares utilizadas. Todas las líneas utilizadas en este trabajo son fibroblastos embrionarios de ratón (Mouse Embryonic Fibroblast, MEFs) inmortalizados de forma espontánea. Las líneas proceden de embriones de dos ratones *knockout* distintos (ratón *ko* para *Sos1* y el *ko* para *Sos2*), generados con estirpes diferentes de células madre embrionarias. ^a En el grupo de las 5 líneas con genotipo *wt*, 2 proceden del fondo genético del ratón *ko* para *Sos1* y 3 del *ko* para *Sos2*. ^b Algunas líneas han sido subclonadas desde las originales, obteniendo líneas diferentes aunque del mismo origen embrionario.

al 5% de CO₂ y 98% de humedad relativa. Los pases se realizaron lavando el cultivo dos veces con PBS estéril (precalentado a 37°C), e incubando las células con tripsina-EDTA 0,25% (Gibco, Invitrogen) durante 1-5 minutos a 37°C, tras los cuales se neutralizó la tripsina con medio de cultivo fresco. Posteriormente, la suspensión celular se transfirió a nuevas placas de cultivo realizando la dilución adecuada.

Para todos los experimentos realizados, incluidos los estudios con microarrays de expresión, se utilizaron cultivos celulares subconfluentes, que se encuentran en crecimiento exponencial y por tanto presentan transcripción y síntesis de proteínas activas. Para los estudios de señalización, fue necesario inicialmente privar de suero a los cultivos subconfluentes durante 4 horas o toda la noche (12-16 horas) (especificado en cada caso) utilizando medio DMEM con todos los suplementos mencionados anteriormente excepto el FBS. Posteriormente, los cultivos privados de suero fueron estimulados con 20% FBS o con factores de crecimiento específicos, como PDGF 50ng/ml (Sigma) y EGF 50ng/ml (Sigma) durante los tiempos indicados. El tratamiento con el inhibidor de PI3K, Wortmanina (Sigma), se realizó a una concentración final de 100nM durante 1 hora, después de 12 horas de privación de suero, y antes de la estimulación con 20% FBS. Por último, el tratamiento con el agente oxidante tBHP (*t*ert-*b*utyl *h*ydroperoxide) (Sigma) se realizó durante 2 horas a una concentración de 50μM o 300μM (especificado en cada caso), tras las cuales se retiró el tratamiento y se sustituyó por medio de cultivo fresco.

3. Extracción de DNA

Para confirmar el genotipo de las líneas de fibroblastos embrionarios inmortalizados en el laboratorio y utilizados en este trabajo, extrajimos DNA genómico de cultivos celulares de todos los genotipos. Las placas fueron colocadas sobre hielo y lavadas dos veces con PBS

frío (sin Ca^{2+} y sin Mg^{2+}). Para recoger las células se añadió PBS frío (sin Ca^{2+} , sin Mg^{2+}) con EDTA 1mM y se levantaron con ayuda de un rascador. La suspensión celular se centrifugó a 1500 rpm, 10 minutos y a 4°C, tras lo cual eliminamos el sobrenadante, lavamos las células en 5-10 volúmenes de PBS frío (sin Ca^{2+} , sin Mg^{2+} y con EDTA 1mM), y repetimos la centrifugación anterior. Las células se resuspenden en 1ml de TE (Tris-HCl 10mM pH 7.0-8.5 y EDTA 1mM) por cada 5×10^7 células. A continuación, añadimos tampón de lisis (Tris 100mM pH 8.0, EDTA 5mM pH 8.0, NaCl 200mM, SDS 0,2% y H_2O Milli-Q) junto con 100µl de proteínaasa K (Roche) por cada 8ml de tampón de lisis, añadida en fresco. Incubamos toda la noche en agitación a 37°C, y al día siguiente añadimos 1 vol de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1; Invitrogen) para la extracción del DNA. Mezclamos suavemente durante 10 minutos y centrifugamos a 2000 rpm, 10 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación recogimos la fase acuosa, en la que se encuentra el DNA. Para precipitar el DNA utilizamos 2 volúmenes de etanol 100% y centrifugamos a 2000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente eliminamos el sobrenadante y lavamos el precipitado con 1 volumen de etanol 70%, volvimos a centrifugar en las mismas condiciones, desechemos el sobrenadante y dejamos secar a temperatura ambiente. Por último, el DNA precipitado de cada genotipo lo resuspendimos en 100-150µl de agua MQ, dependiendo de la cantidad de células presentes en el cultivo de partida (2-3 placas de 100mm en 120µl de agua MQ)

El DNA obtenido se utilizó para genotipar las líneas celulares mediante PCR siguiendo el protocolo descrito previamente (Qian et al., 2000). Las líneas fueron designadas como MEFs *wt* (homocigoto silvestre), *ht-Sos1* (heterocigoto para *Sos1*), *ko-Sos1* (homocigoto *knockout* para *Sos1*), *ht-Sos2* (heterocigoto para *Sos2*), y *ko-Sos2* (homocigoto *knockout* para *Sos2*).

4. Extracción de RNA

La extracción de RNA total de las líneas celulares se realizó mediante el protocolo de extracción con Trizol® (Invitrogen). Una vez alcanzada la confluencia adecuada (75-90%, subconfluentes), las placas de cultivo se colocaron sobre hielo, se retiró el medio, se lavaron con PBS frío dos veces y se añadió 1 ml de Trizol® por placa de 100mm. Con ayuda de una pipeta, se levantaron y lisaron las células bañadas en Trizol®. El lisado celular fue recogido en un eppendorf, y tras una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente (para permitir la disociación de los complejos ribonucleoprotéicos), se añadieron 200µl de cloroformo (Panreac). Tras agitar vigorosamente durante 15 segundos, incubamos otros 3 minutos a temperatura ambiente, y centrifugamos a 12000 rpm, durante 15 minutos a 4°C (para generar las distintas fases). Se formaron 3 fases: la fase inferior de color rojo fenol/cloroformo (proteínas), una interfase de color blanquecino (DNA), y una fase superior acuosa (RNA). La fase acuosa se separó de las demás con cuidado y se transfirió a un tubo nuevo. A continuación se añadieron 500µl de isopropanol (Merck) para precipitar el RNA, se incubó

10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet (precipitado de RNA) fue lavado con 1 volumen (1ml) de etanol 70% agitando en vórtex. Tras una nueva centrifugación a velocidad máxima, durante 5 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente. Finalmente, el RNA se resuspendió en 100µl de agua DEPC (DiethylenePyrocarbonate, Ambion) incubando 10 minutos a 60°C.

A continuación, llevamos a cabo la purificación del RNA, un paso necesario para la siguiente hibridación con microarrays de expresión, así como para la realización de PCR a tiempo real o PCR cuantitativa. Para la purificación del RNA se utilizó el kit de columnas RNeasy® Mini Kit (Qiagen) según especifican las instrucciones del fabricante. Todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente, y además, llevamos a cabo la digestión en columna con DNAsa (opcional en el protocolo) para eliminar la contaminación con DNA genómico en todas las muestras. Posteriormente, la concentración y pureza del RNA se valoraron en el espectrofotómetro “ND1000” (Nanodrop).

5. Hibridación con microarrays de expresión

5.1 Descripción de las muestras

Las muestras utilizadas para la hibridación con microarrays de expresión se encuentran descritas en la **Tabla 2**. Están divididas en dos grupos, dependiendo de la colonia murina de procedencia (pues ambas colonias están generadas con estirpes diferentes de células madre embrionarias): ratones modificados para *Sos1* o para *Sos2*. El número de réplicas utilizado para cada genotipo está descrito en la misma tabla, **Tabla 2**, especificándose también la cantidad de estas réplicas que proceden de embriones diferentes (réplicas biológicas). Aquellas réplicas que por el contrario proceden del mismo embrión, corresponden a las mismas líneas subclonadas, o que se encuentran en un pase diferente. La condición en la que se clasifica cada genotipo y por tanto cada muestra, y el contraste utilizado en el análisis de los datos, constituyen las columnas restantes de la **Tabla 2** y se explicarán en la siguiente sección (sección 6, pág. 48).

5.2 Hibridación con microarrays GeneChip® de Affymetrix

La hibridación de las muestras de RNA de cada genotipo con microarrays de expresión de Affymetrix fue realizada en la Unidad de Genómica del CIC de acuerdo con el siguiente protocolo resumido:

Inicialmente, se evaluó la integridad y pureza (ausencia de contaminación de DNA) de las muestras de RNA total purificadas utilizando el chip “Agilent 2100 Bioanalyzer” (Agilent Technologies), un sistema miniaturizado de electroforesis que permite evaluar concentraciones mínimas de RNA. La relación entre las áreas producidas por los RNA ribosómicos (rRNA) 28S y 18S debe estar entre 1.8-2.1, siendo este parámetro el principal indicador de

Genotipo	Ratón <i>knockout</i> de procedencia	Número de réplicas ^a (procedentes de embriones distintos)	Condición	Contraste utilizado en análisis de microarrays
<i>wt</i>	Sos1	6 (2)	Control	
<i>ht-Sos1</i>	Sos1	5 (3)	Control	<i>ko-Sos1 vs Control</i>
<i>ko-Sos1</i>	Sos1	6 (2)	<i>Knockout Sos1</i>	
<i>wt</i>	Sos2	3 (3)	Control	
<i>ht-Sos2</i>	Sos2	2 (2)	Control	<i>ko-Sos2 vs Control</i>
<i>ko-Sos2</i>	Sos2	3 (2)	<i>Knockout Sos2</i>	

Tabla 2. Líneas celulares utilizadas en los microarrays de expresión. Las muestras procedentes de las líneas derivadas de los ratones *ko* para Sos1 y *ko* para Sos2 fueron comparadas y analizadas en dos grupos diferentes. A pesar de que todas las líneas fueron normalizadas en conjunto, los contrastes con los que obtuvimos los transcritos diferencialmente expresados se realizaron por separado. Los contrastes analizados incluyen las muestras *wt* y *ht* en la misma condición (Control).^a El número de réplicas utilizado para cada genotipo está indicado en la tercera columna; las líneas procedentes de embriones diferentes vienen indicadas dentro del paréntesis (réplicas biológicas). El resto de réplicas, procedentes por tanto de los mismos embriones, corresponden a las mismas líneas en un pase diferente, o a las líneas subclonadas.

calidad. Un ratio distinto al mencionado refleja la degradación parcial de la muestra o la presencia de contaminantes.

A continuación, una vez cuantificadas y comprobada la integridad de las muestras, se procede a retrotranscribir el RNA usando el kit “One Cycle cDNA Synthesis” (Affymetrix), que hace uso de un protocolo típico de retrotranscripción con oligo dT que incluye la secuencia del promotor de la polimerasa del fago T7. La reacción es purificada mediante fenol/cloroformo y precipitación con etanol, incluyendo el reactivo “PLG-Phase Lock Gels” (Eppendorf), que forma una barrera inerte entre las fases acuosa y orgánica facilitando la extracción.

Tras ello, el cDNA (DNA complementario) generado se transcribe in vitro en presencia de nucleótidos biotinilados y enzima T7 RNA polimerasa para generar cRNA marcado, para lo cual se utiliza el kit BioArray RNA labeling (Enzo), que además consigue una amplificación lineal de entre 40 y 80 veces. Al finalizar la reacción, ésta se somete a una nueva purificación. A continuación, el cRNA es fragmentado obteniéndose tamaños de entre 35 y 200 pb, óptimos para una correcta hibridación con el microarray, mediante fragmentación alcalina por adición de 2µl de tampón de fragmentación 5X (Tris-acetato 200mM pH 8.1, KOAc 500mM, MgOAc 150 mM) por cada 8µl de cRNA e incubación a 94°C durante 35 minutos. El resultado se comprueba mediante electroforesis en gel de agarosa.

Finalmente, el cRNA fragmentado, junto con los controles internos de la transcripción, hibridación y marcaje, se añaden al microarray de Affymetrix **GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array** (empleado en nuestro estudio) y se incuban durante 16 horas a 45°C con ro-

tación constante a 0,4 g en el horno de hibridación GeneChip Hybridization Oven 640 (Affymetrix). Después se realiza la tinción con estreptavidina-ficoeritrina (SAPE) en la unidad de procesamiento GeneChip Fluidics Station (Affymetrix). Esta unidad se encarga igualmente de los lavados finales. La unidad de escaneo GeneArray (Affymetrix) adquiere la señal de fluorescencia y digitaliza los resultados. El programa informático asociado GCOS (Gene Chip Operating System, Affymetrix) procesa inicialmente los datos, calculando los valores de calidad de la hibridación (entre otras la comparabilidad de las muestras hibridadas y la longitud de los mRNA hibridados).

6. Análisis de los datos de Microarrays de expresión

El análisis de los datos de microarrays consta de varias etapas: (1) normalización y cálculo de la señal, (2) análisis estadístico de la expresión diferencial entre las condiciones de estudio, y (3) análisis funcional.

(1) Normalización y cálculo de la señal:

Inicialmente, se aplicó el algoritmo RMA (Robust Multi-array Average) (Irizarry et al., 2003a; Irizarry et al., 2003b) a los datos crudos de fluorescencia procedentes de cada muestra (de cada hibridación). Este algoritmo:

- (i) elimina el ruido de fondo,
- (ii) normaliza por cuantiles,
- (iii) calcula la señal de cada *probeset* en todas las muestras.

En nuestro estudio, utilizamos una versión modificada del RMA, *ProbePacket 2* (PP2). Esta modificación aporta algunas ventajas al algoritmo RMA: en primer lugar, realiza un alineamiento previo de todas las sondas (deshaciendo el concepto de *probeset*) con las secuencias del genoma de ratón recogidas en la base de datos de Ensembl (www.ensembl.org). Esto permite descartar sondas que hibridan con intrones, con regiones intergénicas, y sondas inespecíficas (aquellas que hibridan con más de un locus). En segundo lugar, RMA excluye del análisis aquellas sondas que considera *outliers* aplicando medianas consecutivas. En PP2, este cálculo consiste en el sumatorio de la señal de todas las sondas que detectan un mismo transcrito (agrupadas tras el alineamiento), evitando así la eliminación de *outliers* (que pueden aportar información biológica importante).

(2) Análisis estadístico de la expresión diferencial:

El estudio de la expresión diferencial se llevó a cabo aplicando el algoritmo SAM (Significance Analysis of Microarrays) (Tusher et al., 2001). Este algoritmo calcula un valor de diferencia de expresión (*d-value*) que se define como el cociente entre la diferencia directa de expresión (entre grupos) y la suma de la dispersión de las réplicas de cada grupo. Además, SAM calcula la tasa de falsos positivos o FDR (False Discovery Rate) mediante la rea-

lización de cientos de permutaciones de los elementos respecto a los grupos definidos por el usuario.

Contrastes y definición de los grupos:

Teniendo en cuenta que los genotipos de las líneas disponibles procedían de colonias de ratones *ko* distintas (generadas con estirpes diferentes de células madre embrionarias), el análisis estadístico SAM se aplicó por separado a las muestras procedentes de cada colonia. Por tanto, se realizaron dos contrastes independientes: un contraste para *ko-Sos1* y otro para *ko-Sos2*, como se describe en la **Tabla 2** (pág. 47).

Por otro lado, para la aplicación de SAM las muestras se agruparon en dos condiciones de estudio (grupos): *ko* (*knockout*) y Control, ésta última constituida por las muestras de MEFs *wt* y *ht*. Ambos genotipos fueron incluidos en el grupo Control tras comprobar que presentaban un comportamiento transcripcional similar. Observamos que la incorporación de las muestras *ht* junto con *wt* disminuyó el número de falsos positivos (o dicho de otro modo, aumentó el número de transcritos significativos), mejorando los resultados estadísticos en ambos casos (contrastados para *Sos1* y para *Sos2*) (**Figura 15**). De hecho, se examinaron los transcritos significativos obtenidos tras comparar *ko vs wt*, y *ko vs wt+ht* (para las “muestras *Sos1*” y para las “muestras *Sos2*”) y comprobamos una clara coincidencia cualitativa, demostrando que las muestras *wt* y *ht* pueden ser agrupadas en la misma condición y así aumentar el tamaño muestral.

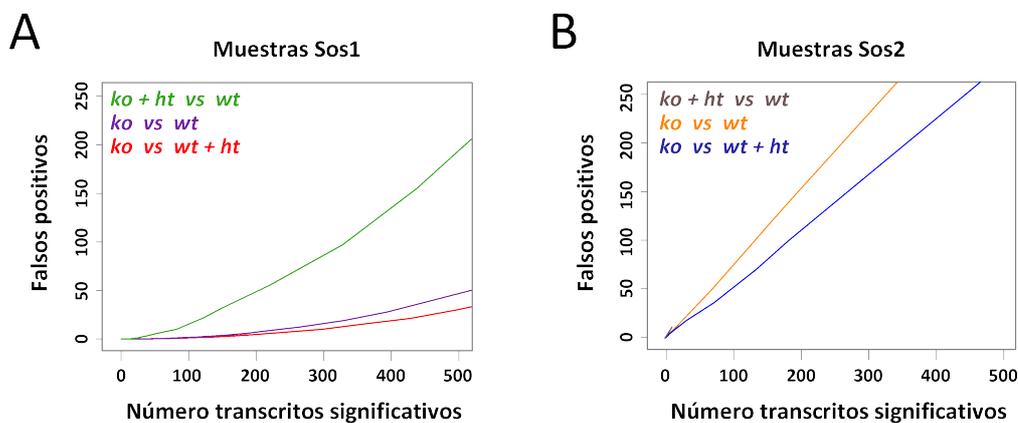


Figura 15. Definición de los grupos muestrales. Cada curva corresponde a un análisis SAM representado por el número de falsos positivos (eje Y) respecto al número de transcritos significativos obtenidos (eje X). Se realizaron tres contrastes diferentes en los que las muestras *ht* se agruparon con las muestras *ko* (*ht + ko vs wt*) con las muestras *wt* (*ko + ht vs wt*) o no se incluyeron (*ko vs wt*). El análisis estadístico SAM se aplicó por separado a las muestras de microarrays procedentes de MEFs derivados de “ratones *Sos1*” (**A**) y de “ratones *Sos2*” (**B**).

(3) Análisis funcional:

El análisis funcional de los resultados se realizó con DAVID, un programa que usa Gene Ontology entre otras bases de datos funcionales (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>). DAVID evalúa estadísticamente el enriquecimiento en términos GO de tu lista respecto a la anotación en el genoma completo, asociando un p-valor al enriquecimiento observado. Posteriormente, DAVID clasifica los términos enriquecidos en grupos de “términos GO redundantes” (que comparten la mayoría de sus genes anotados). Éstos llevan asociado un valor de enriquecimiento o ES (Enrichment Score) que refleja la importancia estadística de ese conjunto de términos y sus genes (procedentes de tu lista) respecto al genoma completo.

Para este análisis utilizamos una lista de 325 transcritos (FDR 0,025) del contraste para las líneas *ko-Sos1*, y una lista de 73 transcritos (FDR 0,522) del contraste con las líneas *ko-Sos2*. Los resultados pueden consultarse en las **Tablas 8 y 9** (CD adjunto).

Paralelamente, utilizamos la aplicación IPA (Ingenuity Pathways Analysis) de Ingenuity® Systems (www.ingenuity.com), que además de realizar análisis de enriquecimiento funcional, evalúa la asociación de los genes de tu lista con rutas de señalización canónicas recogidas en su base de datos. Ambos análisis llevan asociado un p-valor. En este caso, los resultados del contraste para *ko-Sos2* no fueron analizados debido a su escasa significación estadística.

7. PCR cuantitativa o PCR en tiempo real

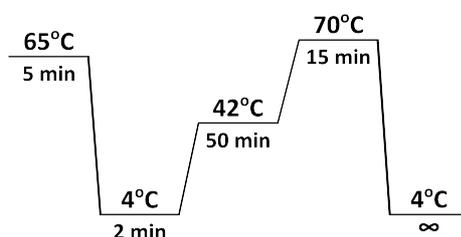
La cuantificación relativa de la expresión génica mediante PCR cuantitativa o PCR en tiempo real requiere un paso previo de retrotranscripción a partir del RNA mensajero (mRNA). Tras esta reacción se obtiene DNA complementario (cDNA) sobre el que se realiza una PCR, caracterizada por la monitorización de cada ciclo de amplificación a través del aumento de la fluorescencia emitida por un agente intercalante del DNA (SYBR Green).

7.1 Transcripción inversa del RNA total extraído (Síntesis del cDNA)

Una vez comprobada la concentración, integridad y pureza del RNA total extraído previamente se procedió a la transcripción inversa o retrotranscripción del RNA usando cebadores oligo dT para enriquecer el cDNA final en secuencias de mRNA, descartando el rRNA (pues no contiene información codificante y supone la mayor parte del RNA total de la célula). Los siguientes pasos los realizamos siempre sobre hielo. Partimos de 2µg de RNA a los que adicionamos 1µl de cebadores oligo dT, y agua DEPC (Ambion) hasta un total de 11µl en tubos de 0,2ml. Esta mezcla preparada para cada muestra se introdujo en el termociclador y se sometió a un primer paso de desnaturalización de estructuras secundarias, consistente en 5 minutos a 65°C. Después, una etapa de enfriamiento a 4°C (evitando así la renaturalización del RNA) durante 2 minutos, momento en el que se detuvo el programa, los tubos se sacaron del termociclador y se colocaron sobre hielo. A continuación, añadimos la siguiente mezcla de reacción por tubo (9µl):

Tampón 5x	4µl
0.1M DTT	2µl
dNTPs (10 mM cada uno)	1µl
Inhibidor de RNasa (Ambion)	1µl
Retrotranscriptasa SSII.....	1µl

Estos reactivos se encuentran en el kit de retrotranscripción SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Al añadir los 9µl de esta mezcla en cada tubo conseguimos un volumen final de reacción de 20µl. Los tubos se introdujeron de nuevo en el termociclador y continuamos con el programa según el siguiente esquema:



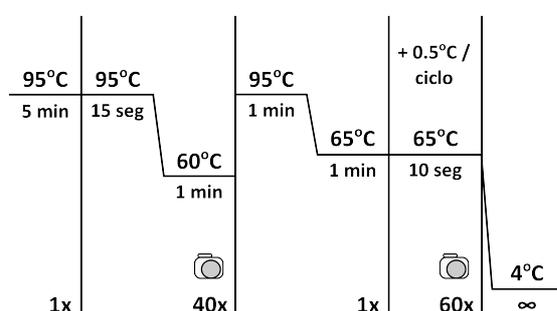
La reacción de retrotranscripción tiene lugar a 42°C durante 50 minutos, seguido de un paso de inactivación enzimática a 70°C. Al finalizar el programa, llevamos el volumen de reacción hasta 100µl finales, obteniendo así una concentración final de cDNA de 20ng/µl (se asume una eficiencia de retrotranscripción próxima al 100%).

7.2 PCR en tiempo real con SYBR Green

Las muestras de cDNA se utilizaron para la realización de la PCR en tiempo real. Para ello, se usaron 20ng (1µl) por muestra y se utilizó el kit IQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad), que contiene el reactivo SYBR Green. Este agente emite fluorescencia cuando se intercala en el DNA de doble cadena, reflejando el aumento del producto de PCR en cada ciclo de amplificación pudiendo así monitorizarse en tiempo real. La amplificación se llevó a cabo en placas de 96 pocillos en un termociclador iCycler (Bio-Rad). Todos los experimentos incluyeron triplicados de cada condición y controles negativos (cDNA sustituido por agua). Además, se comprobó (junto a las muestras o en otra placa) la eficiencia de los pares de oligos de todos los genes analizados mediante una curva patrón, formada por 3 puntos de una dilución seriada de cDNA (preferiblemente de una muestra que exprese niveles altos del gen que se quiere cuantificar). La mezcla de reacción que utilizamos por gen y por cada pocillo en la placa de 96 pocillos se describe en la siguiente tabla:

cDNA.....	1µl
iQ SYBR Green Mix.....	12.5µl
Oligo directo (Fw) (10mM)	0.4µl
Oligo reverso (Rv) (10mM)	0.4µl
Agua Milli-Q.....	10.7µl
Total	25µl

Programa del termociclador (PCR a tiempo real):



El programa incluye un primer ciclo de desnaturalización (5 minutos a 95°C), y a continuación 40 ciclos de PCR (cada uno formado por 15 segundos de desnaturalización a 95°C y 1 minuto de anillamiento y extensión a 60°C) en los que la cámara captura el nivel de fluorescencia de cada pocillo. Después, contiene un ciclo de desnaturalización 1 minuto a 95°C y 1 minuto a 65°C en el que el producto amplificado empieza a renaturalizar. Entonces comienza la curva de disociación, que consiste en 60 ciclos de incremento gradual de temperatura (0,5°C cada ciclo) en los que la cámara captura la fluorescencia por pocillo cada 10 segundos. Conforme aumenta la temperatura el producto de PCR se desnaturaliza, el SYBR Green se libera y por tanto, la fluorescencia decrece. La representación de la derivada de la fluorescencia respecto al tiempo que se genera (una curva tipo campana) es una firma característica del amplicón, que depende no sólo de su composición de GC y su tamaño, sino también de la propia secuencia, por lo que permite detectar amplificaciones inespecíficas.

El análisis de los datos se realizó con el programa informático Bio-Rad iQ5 2.1 Standard Edition Optical System Software (Bio-Rad), basado en la comparación del ciclo de amplificación en que cada muestra alcanza un nivel de fluorescencia arbitrario conocido como ciclo umbral o Ct (threshold cycle); aquellas muestras que antes lleguen a ese umbral (de fluorescencia) tendrán una mayor expresión del transcrito. Sin embargo, para descartar posibles errores debidos al pipeteo, a diferencias en la eficiencia de retrotranscripción, etc,

normalizamos el Ct para el gen de estudio con el Ct de un gen de expresión constitutiva (*housekeeping*) en cada muestra. Decidimos usar el gen Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*Gapdh*) como gen de referencia (pues tras realizar un prueba de varios *housekeeping*s éste fue el más estable en todas las muestras), cuyos niveles de expresión se asumen iguales en las distintas muestras comparadas.

La fórmula matemática de esta normalización (Pfaffl, 2001) consiste en:

$$\text{cambio de expresion relativa} = \frac{E_x^{Ct_{wt} - Ct_{ko}}}{E_{Gapdh}^{Ct_{wt} - Ct_{ko}}}$$

donde,

E_x es la eficiencia de los oligos del gen de estudio

E_{Gapdh} es la eficiencia de los oligos del gen de referencia *Gapdh*

Ct_{wt} es el ciclo en el que la muestra *wt* alcanzó el umbral de fluorescencia arbitrario

Ct_{ko} es el ciclo en el que la muestra *ko* alcanzó el umbral de fluorescencia arbitrario

7.3 Diseño de los oligos

El diseño de oligos para la validación de los microarrays se realizó de la siguiente manera: Primero identificamos la región de cDNA detectada por el microarray. Para ello, mapeamos las 11 sondas del *probeset* de Affymetrix en la secuencia de cDNA del gen según la base de datos de Ensembl (generalmente cubren la región 3' del gen). Diseñamos los oligos sobre esa región.

El resto de oligos utilizados en este trabajo se diseñaron de la misma manera (excepto el mapeo de la sondas del *probeset*), utilizando habitualmente la región 3' del gen, pues debido a la retrotranscripción con oligo dT, probablemente esa zona esté más representada en el cDNA. Además, cuando fue posible los oligos directo y reverso fueron diseñados para que hibridaran en exones distintos, evitando la amplificación de DNA genómico contaminante que pudiera existir en la muestra de RNA.

Los oligos se diseñaron con la programa informático *Primer3* (Rozen and Skaletsky, 2000) a través de la interfaz web <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>, optimizando los valores de parámetros como la autocomplementariedad de los oligos, la complementariedad en 3', el valor de Tm (2-3 grados superior a la temperatura de anillamiento seleccionando las tablas termodinámicas de SantaLucía 1998), el tamaño del amplicón (90-150 pb) y la composición en GC (50 – 65%), entre otros. Consecuentemente, la eficiencia de la PCR con estos oligos fue cercana al 100%. Además, mediante PCR convencional y posterior visualización en gel de agarosa, se comprobó que los todos los oligos amplificaban eficientemente y de forma específica una sola banda. La secuencia de los oligos para PCR cuantitativa utilizados en este trabajo se resume en la **Tabla 3**.

Símbolo	DIRECTO (5' -> 3')	REVERSO (5' -> 3')	Tamaño Fragmento
Igfbp6	GCCAGGAGCAGTGGGTGAAGCC	GGGCGTGAAGGTGGGTCTTGGG	123 pb
Slco2a1	GCCAAATGGTTTATCTCGGCGTGGCAA	TGGCCCGTGAGGTTGTGTGGAGC	148 pb
Mapkapk3	ACAGCACGGGCAACCTTGGGACT	CCAGGACCAGACCTTGTAAGCACGGC	142 pb
Pax3	GCTCGTTGCCAAACAACCTCACATCTG	CGTGGACATTTCTGTTCTAGCCCTGCCT	137 pb
Rps4y2	TCGCATCGGCGTCATACCAACC	TCCACGGCTTGTGCCCTTCCC	137 pb
Tpbp	AGGCTTGTCCACTTCCACACTTCACC	CCGCAGGCATCGAGGAGTACCGAAA	150 pb
Gab1	GATTCTGGGAAGTCCACGCCACCAC	GGTCCACCACAACGTAATCCACCCTCT	94 pb
Pitpnm1	CCAGGAACACCTCCCACCACCCTG	CCAGATTCACACAGTACCAAGGCGG	142 pb
Gsc	GGCACCGCACCATCTTCCCGA	CCAGACTCCACCCTCTCCTCCCGA	137 pb
Foxf1a	GTCTGGCAGCATCTCCACGCACT	TGGGCGACTGTGAGTGATACCGAGG	110 pb
Adam19	ACCATGCTTTATGTGGCCTGGGTTC	TGGCTTTCGAGTTCTAAGTTGGCAGG	149 pb
Cnrip1	GGCTGTTTCCCAATGACCTCCTACCCC	GGCAGACAGGATAGATGCAGGAACACCA	151 pb
Zfp105	TCACTGTCCACCAGCGAACCACA	ACCAAAGCAGGGCATCGTACTCTTCT	149 pb
Notch1	ACACCTGACTGCCAAAGGGCTCCA	GGCTCCACCACATTCCAGCACAC	154 pb
Arhgap24	CCCNAGGAGAAGCGAGAGAGAAACACAA	ACAGACCAACCACCTGATCCCACACC	141 pb
Mapkapk5	GGATAAGGCGGTGGTTGCGGGG	GGGTTGTTGACAGAGTGCAGGGGTTTG	111 pb
Rgs12	AGGACTCGTGACTGCCCTCCAC	ACACCCACGGGACTTCATGCTTCCA	100 pb
Edg3	TGACTTATCTGTTGCGGGCTCCATCCTTC	AGCACATCACCACTGCCTTCCCT	111 pb
Lhx8	GGATGGGACGATGCTGACTGCGCT	GGTCATTGGATGGGGTAACAAGGGCTGGA	90 pb
Fut8	TCGGCCAAGCAGAAGACGCACTAA	AAAGAGGCGTCCACCAGTGCAGC	106 pb
Zfp664	GGTGTGGTGATTCTGAGACTGGCAAC	GGTGACTGAGCGGCTGGGCAA	87 pb
Eaf2	CAGAGGCTGATGCTACTTGTCAACGACTT	CAGTCTCACTGTCGCTTTCTGACTACT	109 pb
Nudcd3	TGGCTACTGTGGATGAGGAGCAGG	TGGACTTTCAGCTCGTGGCTCTGGG	103 pb
Drg1	TGTACCATCTCTGCTCATCACCGCT	CTGGTAACTGGCCTTTCGGTTTGGTGT	110 pb
Glpr1	GTCAGCCATCTCTGCCTGGTATGAAGAAA	TCTGCCAAACAACCTGAGTATAATGGCC	102 pb
Moxd1	GCCTGGAGAGATGGGTGGGTACGA	GACATGGCTTAGGTAGCCTGGGAAGGA	97 pb
Crif1	CTCAAGCAGTTCCTCGGCTGGCTC	TCCTGGTTTCGGGCTTGTGTGACTTCT	116 pb
Cgref	GAGATGTTCCAGGTCCCAGAGAAGGTGC	GGCTCTCCAGTGTTCACCAGCA	99 pb
Mmp14	GGTATCCCAAGTCAGCTCTGCGGGAC	TCCACTGCCCTCCTCATCCACCTCAA	119 pb
Ptk2	ATGCTAGGGCAGACACGGCCACA	CCTCGTTGCTGGTGAATGCTAGAGA	96 pb
Tnfrsf11b	GCCTTCTTCAGGTTTGTCTTCTACCA	TCCGTTTTATCCTCTCTACACTCTCGGCA	115 pb
Ube2e2	AGAGCGGAGCATGACCGGATGG	TAACAACAGGCGACAGAACGGAGGG	147 pb
Dusp10	GCAAACCTGCCAAACCGTGCC	AGAGAAGGTGTGAGGCGAGCCGA	92 pb
Ptprb	ACCCTTGCTCTGACTACATCAACGCC	TTCTGCTCCACGCCATCTTCCA	127 pb
Sos1	CAGAGCCTGAGCCAACAGAAGCTGA	CGACACACATTTAACACCCTCAACTGCAC	130 pb
Sos2	CAGTGGAAATGGCACATCAGTAGAACAGGA	CACTCCCTACAAGTTCAGAGGGCTGG	144 pb
Cdnd1	CTCCTGCTACCGCACAAACGCAC	GCCAGACCAGCCTCTTCTTCCA	180 pb
Cdnd2	AGCGTGGGAGCAGCCATCTGTG	GGCAGGCTTTGAGACAATCCACATAGTC	124 pb
Cdnd3	GCGCCTGCTCTATGTCTGCGGATG	GGCTTTGGGCACTGGGCTGGG	161 pb
Yy1	TGCAGAGTGTGGCAAAGCGTTCGT	GGCCTGTCTCCGGTATGGATTCGC	165 pb
Banp	GCTAATCCCTCCAGCTTTGGCCTCT	ACTGAACCTGAATGCTACTGCCCTGGA	172 pb
Hdac1	CCTGACAAACGCATCTCCATCTGCTCC	GCGACCACCTTCTCCCTCCTCATCT	93 pb
Bim	CGCCCGGAGATACGGATTGCACAG	GGGTGGTCTTCCAGCTCGCGGTAA	110 pb
Sod2	AGGGTGGTGGAGAACCCAAAGGAGAG	AGCAGGCAGCAATCTGTAAGCGACC	171 pb

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR. En cada caso se detalla el nombre del gen, la pareja de oligonucleótidos directo y reverso utilizados y la longitud del fragmento amplificado.

8. Curva de crecimiento y tiempo de duplicación

Las curvas de crecimiento de los MEFs *wt*, *ko-Sos1* y *ko-Sos2* fueron realizadas durante 5 días de cultivo, en placas de 6cm y con duplicados experimentales para cada línea celular. Se realizaron 3 experimentos independientes y se utilizaron al menos 2 líneas procedentes de embriones distintos para cada genotipo. Se sembraron 100.000 células en todas las placas (duplicados por cada día de ensayo y por genotipo) y se realizaron contajes del número de células en una cámara de Neubauer (Zuzi) cada 24 horas, durante los 5 días de cultivo. El número total de células fue estimado según la fórmula:

$$\frac{\text{células}}{\text{mL}} = c \cdot f \cdot 10^4$$

Donde,

c, es el promedio (4 medidas/placa) del número de células en la cuadrícula de la cámara
f, es el factor de dilución de la suspensión celular.

Se realizaron medias de todas las líneas del mismo genotipo y se representó una sola curva para cada uno de ellos.

Para el cálculo del tiempo de duplicación se utilizó la aplicación web: <http://www.doubling-time.com/compute.php>, en la que se introdujeron los datos obtenidos en las curvas de crecimiento entre los días 2-4, cuando la tasa de crecimiento era prácticamente constante.

9. Extracción de proteínas, electroforesis y Western blot

9.1 Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas se colocaron las placas sobre hielo, se retiró el medio de cultivo y se lavaron dos veces con PBS frío. Después se añadieron, dependiendo de la cantidad de células, 250-500µl de tampón de lisis RIPA (Tris HCl 10mM pH 7.5, NaCl 150mM, EDTA 1mM, NP-40 1%, SDS 0,1%) por placa de 10mm, suplementado en fresco con inhibidores de fosfatasa (NaF 1mM, Na₃VO₄ 1mM) e inhibidores de proteasas (Pmsf 1mM y la mezcla de inhibidores de proteasas Cømplete (Roche) (1 pastilla para 50ml de tampón)). Las células se despegaron de la placa con ayuda de un rascador. Los lisados celulares se pasaron a un tubo eppendorf y se incubaron en hielo durante 10 minutos, tras los cuales, se centrifugaron a 13000 x g durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante se recogió en tubos nuevos.

A continuación, se determinó la concentración proteica mediante el uso del reactivo Bradford (Bio-Rad). Para ello elaboramos una recta patrón de concentración conocida (desde 0,5 a 5µg/µl) a partir de una solución de BSA de 2mg/ml (Sigma). Cada muestra, medida por triplicado, se preparó añadiendo a 800µl de agua, 1 ó 2µl de lisado celular y 200µl de Bradford en cubetas de espectrofotometría. Tras mezclar bien por vórtex e incubar 5 mi-

nutos a temperatura ambiente, medimos la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595nm. Las concentraciones de cada muestra se calcularon interpolando en la recta patrón, de la que obtuvimos la fórmula mediante un modelo de regresión.

9.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida y Western blot

Una vez cuantificados, los lisados celulares se desnaturalizaron añadiéndoles tampón de carga Laemmli 4X (Tris HCl 200mM, pH 6.8; Glicerol 40%; SDS 4%; β -mercaptoetanol 4%; azul de bromofenol 0,04%) e hirviendo durante 5 minutos. A continuación, los extractos proteicos se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) para separar las proteínas en función de su peso molecular. La presencia del detergente SDS desnaturaliza las proteínas y les aporta una carga neta negativa, haciendo que éstas migren 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 di-sulfuro separando a las proteínas en sus subunidades. Al aplicarse un campo eléctrico, las proteínas desnaturalizadas y con carga negativa, migrarán a través del gel a una velocidad dependiente de su peso molecular y no de su carga o su estructura terciaria y cuaternaria.

El porcentaje del gel de poliacrilamida dependerá el tamaño de las proteínas que se quieran visualizar, utilizándose mayores porcentajes cuánto más pequeñas sean las proteínas de interés. Los reactivos TEMED (Tetramethylethylenediamine, Sigma) y APS 10% (Ammonium persulfate, Sigma) utilizados en la preparación de los geles, desencadenan la reacción de polimerización del gel por lo que se añadieron justo antes de la adicción de la mezcla a los cristales. Tras la polimerización, el gel se introdujo en la cubeta (Bio-Rad) la cual se rellenó con tampón de electroforesis SDS-PAGE 1X (Tris HCl 25mM pH 8,3; Glicina 200mM, SDS 0,05%) y se aplicaron 100-150 voltios hasta que el frente alcanzó el borde del gel.

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas separadas por tamaño se transfirieron a una membrana de PVDF (poli fluoruro de vinilideno, Millipore) utilizando el equipo de transferencia húmeda de Bio-Rad y el tampón de transferencia 1X (Tris 25mM, Glicina 192mM, Metanol 20%). Para su hidratación, la membrana fue sumergida previamente en metanol durante 1 minuto y aclarada con agua. La transferencia se realizó a 4°C, a un amperaje constante de 330mA durante 90 minutos o bien a 40V durante toda la noche.

Después de la transferencia las membranas se enjuagaron con TBS-T (solución salina tamponada con Tris y Tween-20 al 0,05%) para eliminar los restos de metanol y se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente en leche desnatada al 5% o en 2% BSA, disueltos en TBS-T. Después se aclararon con TBS-T y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente, toda la noche a 4°C o dos horas a temperatura ambiente (especificado en cada caso, **Tabla 4**). Las diluciones, condiciones de incubación, casa comercial y origen de todos los anticuerpos utilizados en este trabajo se describen en la **Tabla 4**.

Anticuerpo	Compañía	Origen	Dilución
Sos1 (C-23)	Santa Cruz	rabbit	1:1000
Sos1	BD Bioscience	mouse	1:500
Sos2 (C-19)	Santa Cruz	rabbit	1:1000
Sos2 (H-80)	Santa Cruz	rabbit	1:500
Ras (pan-Ras)	Upstate	mouse	1:1000
H-ras	Santa Cruz	mouse	1:1000
β -tubulina	Sigma	mouse	1:5000
Edg3	Abcam	rabbit	1:500
Fut8	Santa Cruz	Goat	1:500
Vrk2	casero	rabbit	1:1000
Pttg1	Abcam	mouse	1:500
Ccng1	Santa Cruz	Rabbit	1:500
p21 ^{CIP1}	Santa Cruz	mouse	1:500
p21 ^{CIP1} (sc-397)	Santa Cruz	rabbit	1:500
Pitpnm1	Santa Cruz	mouse	1:200
Foxf1a	Abcam	rabbit	1:500
Mdm2	Abcam	mouse	1:500
Hck	Santa Cruz	rabbit	1:1000
Grb2	Santa Cruz	rabbit	1:1000
Smac	Santa Cruz	rabbit	1:1000
Thbd	Santa Cruz	goat	1:500
Ccnd1	Santa Cruz	mouse	1:500
Ccnd2	Abcam	mouse	1:1000
Vcl	Sigma	mouse	1:200
Tsc2	Cell Signaling	rabbit	1:500
Spry3	Santa Cruz	rabbit	1:1000
Shc1	Cell Signaling	rabbit	1:500
p-ERK Tyr204	Santa Cruz	mouse	1:1000
ERK	Santa Cruz	rabbit	1:1000
p-Akt	casero L15	rabbit	1:2000
Akt	Santa Cruz	rabbit	1:1000
p-GSK3 β (Ser9)	Cell Signaling	rabbit	1:500
GSK3 β	Cell Signaling	rabbit	1:1000
p-p70 ^{S6K} (Thr421/Ser424)	Cell Signaling	rabbit	1:500
p-p70 ^{S6K} (Thr389)	Cell Signaling	mouse	1:500
p-mTOR (Ser4228)	Cell Signaling	rabbit	1:500
CcnE	SantaCruz	rabbit	1:1000
p-RB (Ser780)	Cell Signaling	rabbit	1:1000
Pcna	Boehring	mouse	1:500
p27 ^{kip1} (554069)	Pharmingen	mouse	1:1000
Sod2	Abcam	mouse	1:2000
I κ B α (Ser32)	Cell signaling	rabbit	1:500
p-JNK (Thr183/Tyr185)	Cell Signaling	rabbit	1:500

Tabla 4. Anticuerpos utilizados en Western blot. En la tabla se detalla la dilución a la que se utilizó cada uno de los anticuerpos, así como su origen y la compañía. Las formas fosforiladas de los anticuerpos utilizados se indican con una p previa al nombre del anticuerpo y se detalla entre paréntesis el/los residuo/s fosforilados que reconoce dicho anticuerpo.

A continuación, se realizaron tres lavados de 10 minutos con TBS-T, y posteriormente las membranas se incubaron una hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes diluidos en TBS-T. En el caso de secundarios anti-rabbit la dilución fue de 1:10000, mientras que *anti-mouse* y *anti-goat* fueron utilizados a una dilución de 1:5000. Tras la incubación se realizaron de nuevo tres lavados de 10 minutos con TBS-T. Se usaron anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa HRP (Amersham Bioscience) o conjugados con fluorocromos (Molecular Probes, Invitrogen), de forma que el revelado se llevó a cabo por quimioluminiscencia utilizando el reactivo ECL (GE Healthcare) o mediante un escáner de fluorescencia *Odyssey* (LI-COR Biosciences). La posterior cuantificación de las proteínas detectadas se realizó con el programa Image J.

Por último, en determinadas ocasiones las membranas se utilizaron más de una vez. Para ello, se utilizó una solución de borrado o stripping precalentada a 56°C (Tris HCl 62,5mM, pH 6.8; SDS 2%, β-mercaptoetanol 100mM), en la que se incubaron las membranas a 56°C en agitación durante 20 minutos (cuando no disponíamos de baño con agitación, alternamos la incubación en el baño estático a 56°C, con agitación a temperatura ambiente, cada 5 minutos, durante un total de 20 minutos igualmente). A continuación las membranas se lavaron con TBS-T tres veces, se bloquearon de nuevo con leche 5% o BSA 2%, y finalmente se incubaron otra vez con un anticuerpo primario siguiendo el protocolo previamente descrito.

10. Ensayos de precipitación de proteínas por afinidad o ensayos de pull down

La determinación del nivel de activación de las GTPasas Ras se llevó a cabo mediante ensayos de precipitación por afinidad o *pull down*. Para ello, cultivos celulares subconfluentes fueron privados de suero durante toda la noche (en el caso de los MEFs *wt*, *ko-Sos1* y *ko-Sos2*) o 4 horas (para las líneas con silenciamiento estable *shSos1*, *shSos2* y sus respectivos controles *shControl*), y posteriormente estimuladas con 20% FBS durante los tiempos indicados. A continuación, las placas fueron colocadas sobre hielo, se retiró el medio de cultivo, se lavaron dos veces con PBS frío, y se añadieron 500-700µl de tampón de lisis MLB 1X (Magnesium-containing Lysis Buffer: HEPES 25mM, pH 7,5, NaCl 150mM, Igepal CA-630 1%, MgCl₂ 10mM, EDTA 1mM, glicerol 10%) (Upstate, Millipore) al que se añade en fresco NaF 25mM, Na₃VO₄ 1mM, PMSF 1mM y la mezcla de inhibidores de proteasas Cømplete (Roche). Las células se levantaron de la placa con ayuda de un rascador, y el lisado celular se transfirió a un tubo eppendorf.

Posteriormente los lisados se centrifugaron a 13000 g, durante 15 minutos a 4°C, se recogió el sobrenadante (del cual guardamos una alícuota para analizar la expresión de Ras en los lisados totales) y se añadieron, dependiendo de la cantidad de lisado, entre 10-15µl de bo-

litas de glutatión-agarosa unidas al dominio RBD (Ras binding domain) de Raf1 (Upstate, Millipore). La mezcla se incubó en un agitador de rotación orbital a 4°C durante 30 minutos, tras lo cual, las muestras se centrifugaron a 14000 g, durante 5 segundos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y las muestras se lavaron tres veces con 500µl de tampón de lisis MLB 1X (para eliminar las uniones inespecíficas), depositando las bolitas en el fondo del tubo después de cada lavado con pulsos de 5 segundos en la centrifuga. Finalmente, las muestras se resuspendieron en tampón de carga Laemmli y se hirvieron 5 minutos. Las proteínas fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%, seguida de Western blot. Los niveles de Ras-GTP fueron cuantificados con el programa Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) normalizando los valores respecto a la cantidad de Ras total presente en el lisado celular.

11. Transducción lentiviral para el silenciamiento estable con shRNA

Para la generación de las líneas celulares deficientes en Sos1 o Sos2 empleamos técnicas de transducción viral utilizando partículas lentivirales MISSION® shRNA (Sigma). Este producto contiene 5 tipos de partículas lentivirales, que portan 5 construcciones diferentes de shRNA dirigidas específicamente contra los transcritos de mSos1 (NM_009231), mSos2 (XM_127051), o una construcción de shRNA que no afecta a ningún transcrito en concreto (SHC002V) y que fue utilizada como control. La eficiencia de cada construcción fue comprobada por separado con una primera infección, a partir de la cual se seleccionaron aquellas que conseguían una mayor inhibición del transcrito. Estas construcciones fueron utilizadas para generar clones individuales (procedentes de una sola célula) con silenciamiento estable de Sos1 o Sos2.

Para ello, se sembraron células al 50% de confluencia en placas de 6 pocillos, y al día siguiente las partículas lentivirales portadoras de las construcciones seleccionadas (con mayor eficiencia) fueron añadidas al medio de cultivo de dichas placas con una multiplicidad de infección o moi (multiplicity of infection) entre 0,85-1. Además, se añadió polibreno a una concentración final de 8µg/ml (hexadimethrine bromide, SIGMA); este compuesto anula las cargas eléctricas que producen una repulsión entre la membrana celular 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 las placas fueron colocadas de nuevo en el incubador. Al día siguiente, el medio de cultivo con los virus y el polibreno fue reemplazado por medio fresco. Transcurridas 48 horas, las células fueron transferidas a placas de 100mm en diluciones de 1:10, 1:20 y 1:50 de la placa original. Posteriormente, las células fueron seleccionadas con puromicina a una concentración final de 1,5µg/ml (calculada previamente con células sin infectar mediante la realización de una curva de supervivencia). Se picaron clones aislados de células resistentes al antibiótico usando cilindros de clonación de 8x8 mm (Millipore) y 150µl de tripsina, depositándose cada uno de los clones aislados en un pocillo de placas de 24 pocillos. Finalmente,

los clones fueron expandidos y la inhibición de Sos1 y Sos2 fue examinada en cada uno de ellos.

Es importante comentar que para la obtención de clones utilizamos una estrategia alternativa en varias ocasiones, en la cual, las células se infectaron del modo descrito, pero varios pocillos fueron infectados con diluciones seriadas de la misma mezcla de partículas lentivirales. De esta forma, conseguimos que en algunas de las diluciones se infecten pocas células favoreciendo el crecimiento de clones aislados una vez aplicado el antibiótico de selección.

12. Ensayo de proliferación MTT

Este ensayo evalúa la proliferación celular haciendo uso del reactivo MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma] o sal de tetrazolio, que es reducida en las mitocondrias de células viables y metabólicamente activas transformándose en formazán. En este proceso el reactivo cambia de color (de amarillo a púrpura) y se vuelve hidrofóbico, por lo que se puede solubilizar con DMSO y cuantificar por colorimetría.

Las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos, en diferentes cantidades para que no alcanzasen la confluencia en ningún momento del ensayo (4 días), sembrándose desde 25.000 a 4.000 células por pocillo (una placa por día de medida). Cada condición fue ensayada por cuadruplicado. Para el procesamiento de cada placa (correspondiente a un día del ensayo distinto), se retiró el medio de cultivo y se añadió por pocillo una mezcla de 270µl de medio DMEM completo y 30µl de MTT (5µg/µl en PBS). La placa se incubó a 37°C durante una hora, tras la cual el medio fue retirado. Se añadieron 500µl de DMSO y la placa se agitó suavemente durante 10 minutos (protegida de la luz). Finalmente, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 570nm en el lector de placas Ultra Evolution Microplate Reader (TECAN).

Como punto inicial del experimento (Basal), se utilizó una placa en la que se sembraron 20.000 células/pocillo y cuya absorbancia fue medida 12 horas después de la siembra, cuando las células se encontraban totalmente adheridas al sustrato. Los valores de absorbancia de cada punto de tiempo se expresaron tomando como referencia el punto de inicio o Basal, al que se asignó un valor arbitrario (Basal = 1).

13. Citometría de flujo

13.1 Análisis del ciclo celular

Para la realización de este análisis, las células fueron marcadas con yoduro de propidio (IP), un agente intercalante que emite fluorescencia cuando se une al DNA. La cantidad celular de DNA, 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 o de replicación del DNA.

Los experimentos se realizaron con cultivos celulares en crecimiento activo (subconfluentes). En primer lugar se retiró el medio de cultivo y se pasó a un tubo. Las placas se lavaron con PBS estéril a 37°C, y se levantaron las células con tripsina diluida 1:2 en PBS, sin dejar demasiado tiempo para no deteriorar la membrana celular (entre 1-2 minutos). Para detener la actividad de la tripsina se añadió a las placas el medio recogido anteriormente, y tras pasar la suspensión celular a tubos de citometría, se centrifugaron a 1200 rpm durante 8 minutos. Se aspiró el sobrenadante y se lavaron las células con PBS. A continuación, para la fijación y permeabilización de las células se añadió a cada tubo 700µl de etanol 70% frío y se incubaron cubiertos con “parafilm” a 4°C un mínimo de 30 minutos y un máximo de 24 horas. Transcurrido ese tiempo, se realizó un lavado con PBS frío centrifugando 5 minutos a 1200 rpm y aspirando el sobrenadante, y cada muestra se resuspendió en una mezcla compuesta por: 300µl de PBS frío, 16µl de ribonucleasa A (25µg/µl, Sigma) y 8µl de IP (1µg/µl, Sigma). Posteriormente las muestras se incubaron en agitación, a temperatura ambiente y en oscuridad durante 1-2 horas. La ribonucleasa A elimina rápidamente todo el RNA de las muestras y el IP se une estequiométricamente al DNA. Finalmente, las muestras se adquieren en el citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson) utilizando el programa CellQuest. Normalmente se adquieren 20.000 células a una velocidad no superior a 200-300 eventos por segundo, para evitar la aparición de dobletes. Las poblaciones se seleccionaron con el programa Paint-a-Gate, descartando los dobletes y restos celulares (debris). El cálculo de la distribución poblacional en cada fase del ciclo se realizó mediante el uso de algoritmos implementados en los programas ModFit LT (Verity Software House) y FlowJo (Treestar).

13.2 Análisis de la muerte celular

Este ensayo está basado en la translocación de la fosfatidilserina (PS) de la cara interna a la externa de la membrana plasmática, evento que ocurre en etapas tempranas de la apoptosis. La Anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos (dependiente de Ca²⁺), que presenta gran afinidad y especificidad por la PS. Por tanto, ésta se une a la PS en células que estén iniciando el proceso apoptótico. Cuando las células se encuentran en una fase más avanzada de la apoptosis (o en una muerte por necrosis), se produce una pérdida de la integridad de la membrana plasmática que posibilita el marcaje de DNA por colorantes vitales, como la 7-actinomicina D (7-AAD). De esta manera, el doble marcaje con Anexina V (conjugada con el fluorocromo APC) y 7-AAD puede ser cuantificado por citometría de flujo, y nos permite diferenciar las siguientes poblaciones celulares:

- Células negativas para ambos marcadores: viables
- Células positivas para Anexina V-APC y negativas para 7AAD: apoptosis temprana
- Células positivas para ambos marcadores: apoptosis tardía o necrosis
- Células positivas para 7AAD: probablemente necrosis

Este ensayo no permite distinguir la apoptosis tardía de la muerte por necrosis, pues en ambas situaciones se ha perdido la integridad de la membrana y los marcadores vitales tiñen el DNA.

Se utilizaron cultivos celulares subconfluentes en condiciones normales o tratados con tBHP (concentración especificada en cada caso) durante 2 horas, tras las cuales se reemplazó el tratamiento por medio fresco. Después de 20-22 horas se retiró el medio (de células tratadas y sin tratar) y se pasó a tubos de citometría (para no perder aquellas células despegadas del sustrato por procesos de muerte). A continuación, se lavaron con PBS y el lavado se recogió en el mismo tubo. Las células se levantaron con tripsina diluida 1:2 en PBS, sin dejar demasiado tiempo para no deteriorar la membrana celular (entre 1-2 minutos). La tripsina se neutralizó añadiendo el medio recogido anteriormente. La suspensión de células se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos, se lavó con PBS a 37°C, y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones. Se aspiró el sobrenadante y cada muestra se resuspendió en 100µl de Binding Buffer 1X (HEPES/NaOH 10mM pH 7,4, NaCl 140mM, CaCl₂ 25mM) (BD Bioscience) a los que se añadieron 5µl de 7-AAD (BD Bioscience) y 5µl de Anexina V-APC (BD Bioscience) por muestra. Se incubaron en oscuridad durante 15 minutos y en agitación, tras los cuales se añadieron 300µl más de Binding Buffer por muestra (para facilitar la lectura de la muestra en el citómetro). Finalmente, se adquirieron 20.000 células en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson), a una velocidad no superior a 500-800 eventos por segundo. El análisis de los datos se realizó con el programa WinMDI 2.9.

13.3 Análisis de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Para la determinación de los niveles de ROS intracelular y del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) las células fueron marcadas con los compuestos fluorescentes DHE (dihydroethidium, Sigma) y DiOC₆(3) (3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide, Invitrogen). La fluorescencia emitida por ambos marcadores fue analizada por citometría de flujo. El DHE es una forma reducida del etidio, un agente intercalante que cuando es oxidado en el interior celular se une al DNA emitiendo fluorescencia roja. Se ha descrito que el DHE reacciona específicamente con el anión superóxido y con menor preferencia con otras especies de ROS (Bindokas et al., 1996; Rothe and Valet, 1990). El DiOC₆(3) es un fluorocromo lipofílico y permeable, que a bajas concentraciones marca específicamente la membrana mitocondrial. Este compuesto difunde por la membrana plasmática, entra en el citosol y se incorpora a la membrana mitocondrial dependiendo de su $\Delta\Psi_m$. Su fluorescencia aumenta una vez incorporado. Por tanto, se pueden detectar las variaciones en el $\Delta\Psi_m$ a través de la incorporación de DiOC₆(3).

Para llevar a cabo este análisis utilizamos cultivos celulares con una confluencia del 50-60%. Se retiró el medio y se pasó a un tubo, las placas se lavaron con PBS estéril a 37°C, y

se levantaron las células con tripsina diluida 1:2 en PBS, sin dejar demasiado tiempo para no deteriorar la membrana celular (entre 1-2 minutos). La actividad de la tripsina se neutralizó añadiendo a las placas el medio recogido anteriormente, y tras pasar la suspensión celular a tubos de citometría, se centrifugaron a 1200 rpm durante 8 minutos. Se aspiró el sobrenadante y se añadió a cada muestra 300-400µl de la mezcla: 2µM DHE y 20nM DiOC₆(3) en PBS. Las células se incubaron con los marcadores durante 45 minutos en oscuridad a 37°C. Como control positivo se trataron células de cada condición con tBHP (50µM o 300µM, especificado en cada caso) durante 2 horas, tras las cuales el medio fue reemplazado por medio fresco. Dos horas después fueron procesadas junto al resto de muestras siguiendo el protocolo descrito. Por último, las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson) utilizando el programa CellQuest. Se adquirieron 20.000 células, y los datos fueron analizados con el programa FCS Express 4 Image Cytometry™ (De Novo Software), cuantificando la fluorescencia media (geometric mean) de DHE y DiOC₆(3) en cada muestra.

14. Análisis estadístico

El test estadístico utilizado dependió del número de grupos experimentales analizados y de la distribución de los datos:

Experimentos con dos grupos: los experimentos del capítulo 3 constan de dos grupos experimentales (*shSos1/2* vs *shControl*). Cuando los datos siguieron una distribución normal, se aplicó el test **t-Student** con dos colas para muestras no pareadas utilizando Excel (Microsoft). Por el contrario, cuando los datos no se ajustaron a una distribución normal se aplicó el test no paramétrico **U de Mann-Whitney** utilizando el programa informático SPSS Statistic 17.0. Los resultados se consideraron significativos cuando el p-valor < 0,05.

Experimentos con más de dos grupos: los experimentos del capítulo 2 constan de tres grupos experimentales (MEFs *wt*, *ko-Sos1* y *ko-Sos2*). Cuando los datos siguieron una distribución normal, se aplicó el análisis de la varianza (**ANOVA**) seguido de un test de **Bonferroni** (que informa sobre qué comparación/es presentan las diferencias significativas encontradas con la ANOVA) utilizando el programa informático SPSS Statistic 17.0. Si bien, cuando los datos no se ajustaron a una distribución normal, se aplicó el test no paramétrico **Kruskal-Wallis** utilizando el programa informático SPSS Statistic 17.0. Los resultados se consideraron significativos cuando el p-valor < 0,05.

Resultados

1. ANÁLISIS DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL DEPENDIENTE DE LA EXPRESIÓN DE SOS1 Y SOS2 EN FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS DE RATÓN

A pesar de la elevada similitud en secuencia y estructura de las proteínas Sos, el papel biológico de las mismas así como el solapamiento o especificidad funcional entre ellas sigue generando muchas preguntas. En este sentido, como explicamos en la Introducción (pág. 31), la generación de ratones *ko* individuales para *Sos1* y *Sos2* ha revelado que la función biológica de estas proteínas *in vivo* es específica, al menos durante el desarrollo embrionario. En esta etapa *Sos1* ejerce un papel esencial en el correcto desarrollo de la placenta (Qian et al., 2000) y del sistema cardiovascular de ratón (Wang et al., 1997), que no puede ser compensado por la actividad de *Sos2*. Estos datos apuntan a la existencia de especificidad funcional, sin embargo, la mayoría de los estudios *in vitro* con cultivos celulares han sido realizados sólo con una de las isoformas (generalmente *Sos1*), siendo pocos los trabajos comparativos (Nielsen et al., 1997; Qian et al., 2000; Yang et al., 1995) o en los que al menos se consideren ambas isoformas (Boykevisch et al., 2006; Oh-hora et al., 2003). En este contexto, y puesto que estas proteínas activan a las GTPasas Ras y Rac cuya función reguladora de la expresión génica está ampliamente documentada, en este trabajo nos preguntamos si la actividad biológica de las proteínas Sos puede asociarse a un perfil transcripcional específico. Para este fin, empleamos MEFs inmortalizados derivados de dichos ratones *ko*, y realizamos un estudio del perfil de expresión génica global mediante la hibridación con microarrays de Affymetrix, que permiten evaluar la expresión simultánea de más de 39.000 transcritos del genoma de ratón.

1.1 Confirmación del genotipo de las líneas celulares utilizadas

Antes de realizar las hibridaciones con los microarrays, corroboramos el genotipo de las líneas MEFs inmortalizadas mediante PCR (a partir de DNA genómico) y Western blot (**Figura 16**). Los oligos utilizados en la PCR permitieron detectar la presencia del alelo *wt* (silvestre) y *ko* (mutante) para ambos loci *Sos1* y *Sos2*. Los oligos que detectan el alelo mutante anillan en la zona donde está insertado el *cassette* de neomicina, de manera que se amplifica un producto de diferente tamaño si el alelo es mutante o silvestre. Esto permitió verificar qué líneas portaban ambos alelos silvestres (*wt*), un alelo mutante y otro silvestre (*ht*), o los dos alelos mutantes (*ko*), para los loci *Sos1* y *Sos2* (**Figura 16-A**). En la **Figura 16-B** podemos observar que no existe proteína *Sos1* o *Sos2* en los lisados de fibroblastos deficientes para *Sos1* y *Sos2*, respectivamente, indicando que los anticuerpos utilizados son específicos (**Figura 16-B**). Además, no se aprecian cambios de expresión compensatorios de *Sos1* o *Sos2* debido a la ausencia de la otra isoforma.

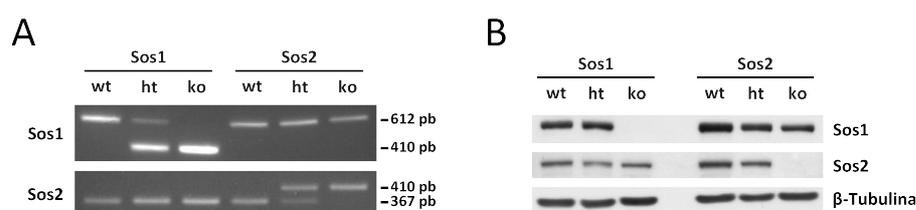


Figura 16. Análisis del genotipo de las líneas celulares utilizadas. (A) El genotipo de los MEFs aislados de ratones silvestres (*wt*), heterocigotos (*ht*) y knockouts (*ko*) para los genes *Sos1* y *Sos2* se comprobó mediante PCR a partir de DNA genómico. Los productos amplificados con un tamaño de 410 bp corresponden a los alelos *ko* para ambos loci, mientras que los alelos silvestres tienen un tamaño de 612 y 367 bp para los loci *Sos1* y *Sos2*, respectivamente. (B) Detección de las proteínas *Sos1* y *Sos2* mediante Western Blot en lisados celulares totales de las líneas MEFs de los genotipos disponibles.

1.2 Microarrays de expresión: identificación de los genes expresados diferencialmente en MEFs *ko-Sos1* y *ko-Sos2*

Para el estudio del perfil transcripcional se compararon fibroblastos embrionarios de ratones *ko* para *Sos1* o *Sos2* con sus respectivos controles en crecimiento activo. Se extrajo RNA de cultivos subconfluentes de cada genotipo. Este RNA se hibridó con microarrays **Mouse Genome 430 2.0** (Affymetrix) una vez comprobada la calidad y concentración del mismo mediante el chip Agilent 2100 Bioanalyze. Las líneas empleadas incluyen MEFs *wt*, *ht* y *ko* derivadas de ratones *ko* para *Sos1*, e igualmente MEFs *wt*, *ht* y *ko* derivados de ratones *ko* para *Sos2*. La información referente al número de réplicas de cada genotipo, así como la cantidad de éstas que proceden de embriones diferentes (réplicas biológicas), se encuentra detallada en la **Tabla 2** (pág. 47).

Los datos crudos de fluorescencia obtenidos de cada una de las hibridaciones fueron normalizados mediante el programa RMA (Robust Multi-array Average) (Irizarry et al., 2003b). El algoritmo de este programa elimina el ruido de fondo, normaliza los datos, y por último calcula el nivel de expresión de cada sonda en todos los microarrays analizados. Se utilizó una versión modificada del RMA, *ProbePacket2* (PP2) (ver Materiales y métodos, pág. 48). Esta modificación supuso la eliminación de sondas inespecíficas y la utilización de la señal de todas las sondas que detectan un mismo transcrito, evitando la exclusión de las consideradas *outliers* (el algoritmo original las elimina aplicando medianas consecutivas). El análisis de expresión diferencial se llevó a cabo aplicando el algoritmo SAM (Significance Analysis of Microarrays) (Tusher et al., 2001), mediante el cual se obtiene una lista de transcritos con cambios de expresión estadísticamente significativos, y cuya extensión dependerá de la tasa de falsos positivos (FDR) determinada en el estudio. El FDR seleccionado dependerá del tipo de estudio y del error que estemos dispuestos a asumir. Cabe destacar que el FDR es una herramienta estadística, y en este sentido no debe tratarse como una validación biológica. Por eso, la significación funcional del perfil de expresión diferencial debe ser confirmada y evaluada experimentalmente.

Como comentamos en Materiales y Métodos, los contrastes analizados fueron *ko-Sos1 vs Control* y *ko-Sos2 vs Control*, donde la condición Control incluye las hibridaciones con las líneas *wt* y *ht* en cada caso (Figura 17).

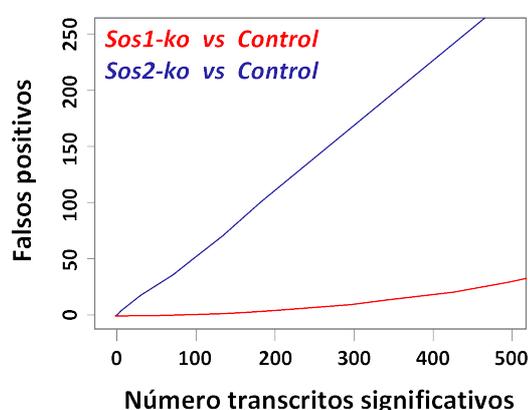


Figura 17. Significación estadística de los contrastes seleccionados. Resultados del análisis estadístico SAM para el contraste *ko-Sos1 vs Control* (*wt+ht*) (en rojo), y en el contraste *ko-Sos2 vs Control* (*wt+ht*) (en azul). Cada curva corresponde a un análisis SAM representado por el número de falsos positivos (ordenada en eje Y) respecto al número de transcritos significativos obtenidos (ordenada en eje X). El análisis estadístico SAM se realizó tras la normalización y cálculo de la señal utilizando la versión modificada del RMA, *ProbePacket2* (PP2).

El análisis de los datos reveló que la eliminación de *Sos1* produce una alteración de la expresión génica mucho mayor que la eliminación de *Sos2*. En el contraste *ko-Sos1 vs Control* pudimos observar un número elevado de transcritos significativos aplicando valores de

FDR pequeños. Por ejemplo, fijando un FDR de 0,02 (2% de falsos positivos) el número de transcritos significativos fue de 297. En la **Tabla 5** quedan resumidos varios ejemplos de la variación en el número de genes significativos dependiendo del FDR fijado, aportando una idea más general y más amplia de la significación estadística de cada contraste. La representación gráfica de esta visión global se muestra en la **Figura 17**. Estas gráficas representan el número de falsos positivos (eje Y) respecto al número total de transcritos significativos (eje X), donde cada punto (x,y) corresponde a un FDR distinto. En ellas, podemos apreciar claramente que la deficiencia de *Sos1* genera cambios en un gran número de transcritos, con un número muy pequeño de falsos positivos (**Figura 17**, *ko-Sos1 vs Control*). Por el contrario, la deficiencia de *Sos2* en fibroblastos embrionarios apenas produce cambios en la expresión génica de los mismos (**Figura 17**, *ko-Sos2 vs Control*).

Contraste	FDR	Nº transcritos significativos	Nº locus diferentes	Transcritos sobreexpresados	Transcritos reprimidos
<i>ko-Sos1 vs Control</i>	0,0075	127	111	49 (38)	78 (73)
	0,014	203	176	81 (65)	122 (111)
	0,025	325	274	142 (116)	183 (158)
	0,042	500	426	223 (187)	277 (239)
	0,066	740	627	301 (256)	439 (371)
	0,11	1086	905	477 (400)	609 (505)
<i>ko-Sos2 vs Control</i>	0,206	1	1	1	-
	0,285	2	2	2	-
	0,522	73	70	26 (25)	47 (45)
	0,535	96	92	33 (32)	63 (60)
	0,546	136	125	50 (46)	86 (79)

Tabla 5. Número de genes significativos según el valor de FDR. Distintos valores de FDR (False Discovery Rate) generan listas con mayor o menor número de transcritos significativos. En esta tabla se resumen varios ejemplos para cada contraste. La tercera columna corresponde al número de locus diferentes de los que provienen los transcritos significativos, y las dos últimas columnas contienen la cantidad de transcritos que aumentan y que disminuyen para cada FDR.

En el CD adjunto se incluye la lista completa para ambos contrastes (esta lista contiene todos los transcritos detectados por el microarray), ordenada de mayor a menor *d-value*, o lo que es lo mismo, ordenados por la consistencia en el cambio de expresión. Adicionalmente, las listas de transcritos significativos con un FDR de 0,0075 en el contraste para *ko-Sos1* (**Tabla 6**), y un FDR de 0,522 en el contraste para *ko-Sos2* (**Tabla 7**), pueden consultarse en el Apéndice de esta memoria (pág. 137).

1.3 Validación de los resultados obtenidos con los microarrays de expresión

El estudio con microarrays de expresión detecta cambios en los niveles de mRNA entre distintas muestras biológicas. Para la interpretación de estos resultados hay que tener en

cuenta muchos factores, entre ellos, que las diferencias de expresión de mRNA no siempre reflejan cambios a nivel proteico. De hecho, existen mecanismos de regulación de la expresión génica posteriores a la síntesis del mRNA (post-transcripcionales) y a la síntesis proteica (regulación post-traducciona). Por este motivo, es necesario validar los resultados mediante otras aproximaciones. Por un lado, con técnicas de cuantificación del mRNA alternativas a la hibridación con microarrays (como la PCR en tiempo real), y por otro, analizando el nivel de expresión proteico. De esta manera podremos evaluar la fiabilidad de los resultados y nos permitirá estudiar las implicaciones funcionales de los cambios observados a nivel transcripcional. No obstante, los cambios de mRNA proporcionan información fundamental acerca de la actividad de la maquinaria transcripcional, la activación o inhibición de factores de transcripción específicos, y el estado de las rutas de señalización que regulan la expresión génica.

1.3.1 Validación de los cambios en el RNA mediante PCR

Para la validación por PCR cuantitativa (o PCR en tiempo real) escogimos un grupo de transcritos con cambios de expresión importantes, y por tanto, incluidos en la cabecera de la lista de transcritos significativos. Intentamos enriquecer esta selección en aquellos genes que tuvieran funciones relacionadas con las conocidas para las proteínas de estudio. Para el contraste de las líneas *ko-Sos1* se seleccionaron 24 genes incluidos en la **Tabla 6** (pág. 137), así como un par de genes con cambios menos significativos que también quisimos validar (*Gab1* y *Tpbp*). Para los resultados con *ko-Sos2*, seleccionamos 12 genes incluidos en la **Tabla 7** (pág. 143); la mayoría no son significativos con un FDR aceptable, pero presentan cambios de expresión considerables, por lo era interesante comprobar si estos cambios se reproducían mediante otra metodología. En total validamos la expresión de 36 transcritos, que corresponden a 36 genes, pues se seleccionaron transcritos procedentes de locus diferentes.

Para la validación de cada gen se utilizaron 3 muestras de cada condición (*wt* y *ko*) correspondientes a 3 réplicas distintas de los microarrays. Dado que el experimento se realizó por duplicado, para cada gen se comprobaron en total 6 muestras de cDNA de *wt* y 6 muestras de *ko* en las que estaban representadas prácticamente todas las réplicas de los microarrays. El diseño de los oligos, tal y como se explica en Materiales y Métodos, se realizó identificando primero la zona del cDNA cubierta por las 11 sondas del probeset de Affymetrix (la mayoría mapean en la región 3'), y la expresión de *Gapdh* fue utilizada como referencia. La **Figura 18** recoge los resultados (expresado como \log_2) para el grupo de genes seleccionados. Con el objetivo de incluir una comparativa visual, junto a los datos de PCR se representaron los datos del nivel de cambio obtenido en los microarrays para esos mismos genes. Los resultados de la PCR cuantitativa también se encuentran en las **Tablas 6 y 7** del Apéndice en la columna denominada *Validación RT-PCR y WB*.

En general, pudimos confirmar el cambio de expresión de todos los genes analizados, si bien en muchos casos existen diferencias en la cantidad de cambio, siendo ésta mayor en los datos obtenidos con PCR cuantitativa (**Figura 18**).

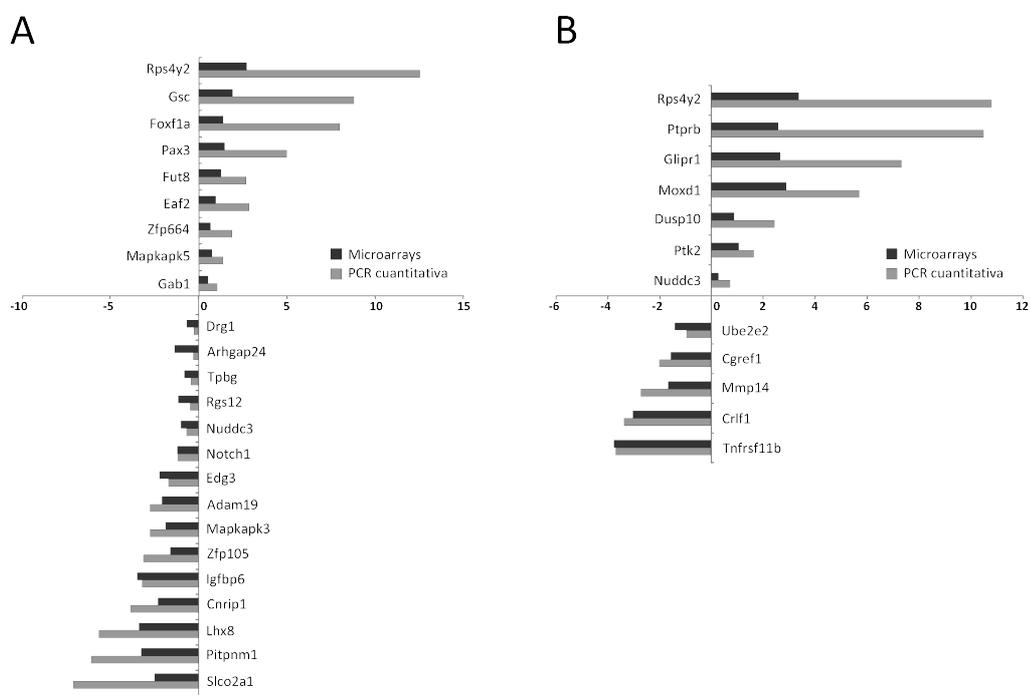


Figura 18. Validación de los cambios de expresión detectados en microarrays mediante PCR cuantitativa. Los datos procedentes de las validaciones por PCR cuantitativa están representados por las barras grises, mientras que las barras negras corresponden a los valores obtenidos en los microarrays. Los valores de la gráfica corresponden al \log_2 del *Fold* (ratio de expresión *ko/control*). **(A)** Resultados obtenidos para los 24 genes seleccionados en el contraste *ko-Sos1 vs Control*. **(B)** Resultados obtenidos para los 12 genes seleccionados en el contraste *ko-Sos2 vs Control*.

1.3.2 Validación de los cambios de expresión proteica

Con el objetivo de comprobar si los cambios de expresión detectados en los microarrays se corresponden con variaciones similares en la cantidad de proteína, seleccionamos varios grupos de genes dependiendo de su posición en la lista de significación estadística, de la función descrita, y de la disponibilidad de anticuerpos en el mercado. Escogimos un primer conjunto de genes con cambios significativos asumiendo un FDR de 0,0075 en el contraste *ko-Sos1 vs Control* (**Figura 19-A**) (**Tabla 6**). El segundo grupo, correspondiente al mismo análisis, fue seleccionado en base a su función biológica y su posible participación en rutas de señalización y procesos celulares de interés en nuestro modelo. Los cambios de expresión en este segundo grupo quedan fuera de la estricta significación estadística empleada con el primero (**Figura 19-B**). Por último, para la validación de los resultados del contraste

ko-Sos2 vs Control con un FDR de 0,522 (**Tabla 7**) seleccionamos un tercer grupo de genes incluidos en esa lista, cuya función estuviera relacionada con nuestro estudio (**Figura 19-C**).

Para determinar los cambios de expresión proteica realizamos Western blot utilizando lisados celulares de una línea *wt* (Control) y dos líneas de cada genotipo *ko* en crecimiento activo (las dos líneas *ko* procedentes de embriones distintos). Los resultados obtenidos para las proteínas del primer grupo confirmaron los resultados de los microarrays en la mayoría de los casos (**Figura 19-A**). Así, comprobamos la disminución de expresión de *Ccng1*, *p21^{CIP1}*, *Pitpnm1*, *Pttg1*, *Edg3*, y en menor medida *Vrk2*, así como el aumento de la

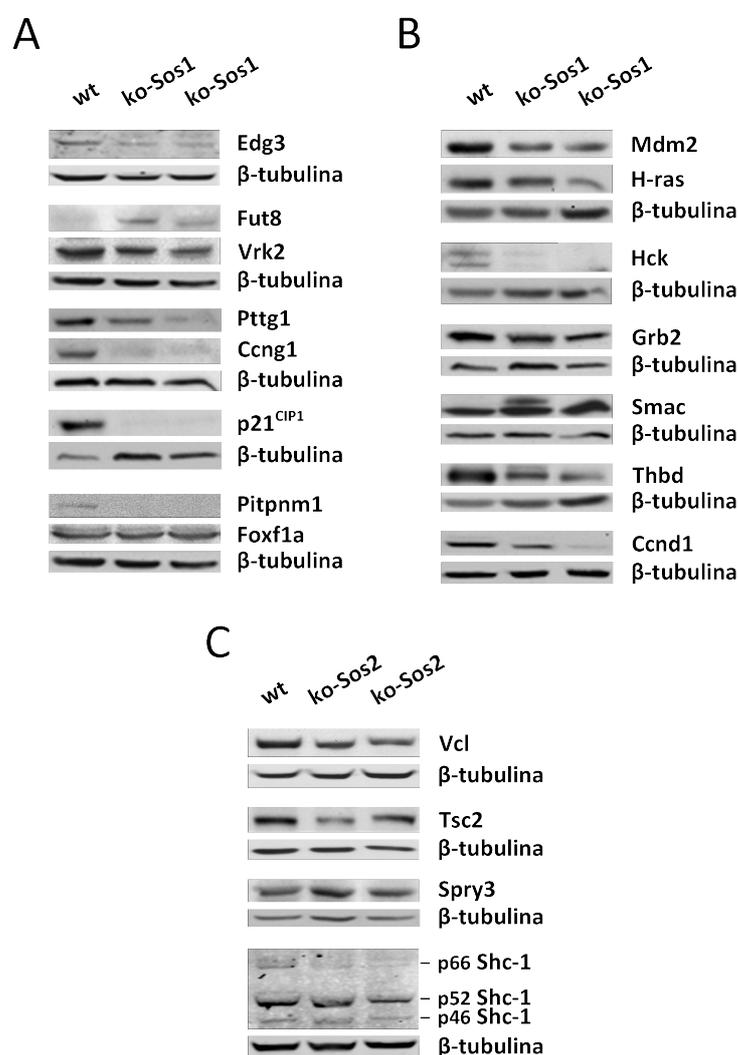


Figura 19. Validación de los cambios de expresión detectados en microarrays mediante Western Blot. (A) Las proteínas seleccionadas para su validación en el primer grupo corresponden a genes con cambios de expresión significativos en las líneas *ko-Sos1* con un FDR de 0,0075. (B) Las proteínas de este grupo también pertenecen al contraste *ko-Sos1 vs Control*, pero con un FDR mayor que el grupo anterior. Fueron seleccionadas por su relación funcional con nuestro estudio y la disponibilidad de anticuerpos. (C) Este grupo representa las proteínas analizadas para el contraste con las líneas *ko-Sos2*, incluidas en la lista obtenida con un FDR de 0,522.

proteína Fut8. Por el contrario, el aumento de expresión observado para Foxf1a no se confirmó con un aumento de la proteína correspondiente. Entre las proteínas del segundo grupo, también pudimos confirmar los cambios de expresión en la mayoría de ellas, excepto Grb2, cuya disminución no queda totalmente clara (**Figura 19-B**).

Por último, a pesar de la baja significación estadística que obtuvimos en el análisis con las líneas *ko-Sos2*, pudimos confirmar el cambio de expresión de algunas proteínas, como Vcl y Tsc2 (**Figura 19-C**). Cabe resaltar que varios anticuerpos comerciales empleados en este estudio no detectaron las proteínas para los que eran específicos (por ejemplo, Igfbp6, Pax3, Mgp y Adamts1). En la **Tabla 4** se detalla la información de todos los anticuerpos utilizados en este trabajo (Materiales y Métodos, pág. 57).

1.4 Análisis funcional de los resultados obtenidos con los microarrays de expresión.

1.4.1 Clasificación y enriquecimiento funcional basado en categorías GO

El análisis funcional de los resultados de los microarrays se llevó a cabo utilizando el programa bioinformático DAVID (Dennis et al., 2003; Huang da et al., 2009), disponible en la dirección web <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>. Este programa analiza la sobrerrepresentación o enriquecimiento de términos funcionales GO en la lista de transcritos significativos, y lo evalúa estadísticamente asociando un p-valor a cada término enriquecido. Recientemente, DAVID ha incluido una aplicación nueva que supone una mejora sustancial en la organización e interpretación de los datos. Esta aplicación consiste en la clasificación de los términos GO enriquecidos con cierto grado de redundancia en un mismo grupo funcional, basándose en la coincidencia de los genes asociados a cada término. Aquellos con los mismos genes anotados se consideran redundantes, agrupándose juntos.

Los resultados obtenidos están representados gráficamente en la **Figura 20**. La **Figura 20-A** corresponde al análisis funcional de 325 transcritos significativos (FDR de 0,025) en el contraste *ko-Sos1 vs Control*, y la **Figura 20-B** representa el análisis de 73 transcritos significativos (FDR de 0,522) en el contraste *ko-Sos2 vs Control*. Las barras indican el porcentaje de genes que aumentan (en rojo) y que disminuyen (en azul) en cada grupo de GO redundantes generado por DAVID (el porcentaje está calculado respecto al número total de genes utilizados en el análisis). Estos grupos son anónimos, de manera que para facilitar su referencia se han denominado de forma coherente a los términos GO incluidos en ellos. En la figura también se incluyen algunos de los términos GO con mejores p-valores que DAVID no incluyó en ningún grupo.

Las tablas con los resultados del programa DAVID se encuentran en el CD adjunto, con el nombre: “**Tabla_8_DAVID_ko-Sos1**” y “**Tabla_9_DAVID_ko-Sos2**”. En estas tablas se pueden consultar los términos GO que constituyen cada grupo de GO redundantes, aquellos GO que no han sido agrupados pero que también están enriquecidos en la lista, sus p-value asociados, y los genes anotados a cada término funcional.

- Análisis funcional del perfil de expresión diferencial obtenido para los fibroblastos *ko-Sos1*:

Los grupos funcionales con mayor porcentaje de genes anotados corresponden a funciones relacionadas con el metabolismo celular, regulación de procesos biológicos, expresión génica y desarrollo y diferenciación celular (**Figura 20-A**). En el grupo de metabolismo celular, aunque algunos genes se encuentran sólo en este grupo, por ejemplo *Stbd1* (implicado en el metabolismo del glucógeno y sobreexpresado en células *ko-Sos1*) (Jiang et al., 2010), la mayoría están a su vez incluidos en otros grupos funcionales. Entre ellos podemos destacar genes reprimidos cuyo producto proteico participa en el metabolismo del colesterol y ácidos grasos (*Insig1* y *Dnaja4*), atribuyendo a *Sos1* un papel en la regulación positiva de la síntesis de colesterol; y genes que regulan el metabolismo de ácidos orgánicos (*Ptgis* y *Glul*, cuya expresión disminuye, y *Amacr* y *Adh7*, que aumentan). *Amacr* codifica una enzima de la beta-oxidación de ácidos grasos y es uno de los marcadores de diagnóstico del cáncer de próstata. Curiosamente, *SOS1* está sobreexpresado en cáncer de próstata, y se ha descrito una correlación entre niveles reducidos de *Amacr* y mal pronóstico en este tipo de tumores (Barry et al., 2012; Timofeeva et al., 2009). Estos datos sugieren que *Sos1* podría regular negativamente la expresión de *Amacr* y que este mecanismo puede ser importante en el cáncer de próstata más agresivo.

Al igual que ocurre con el metabolismo celular, el grupo funcional de regulación de procesos biológicos está formado por términos GO muy generales, por lo que la mayoría de genes están incluidos en otros procesos más específicos. No obstante, encontramos un grupo importante de genes implicados en señalización intracelular, algunos sobreexpresados (*Sh2b3*, *Ahrr*), pero la mayoría reprimidos (*Sh3bp5*, *Plekhm1*, *Gpcr5b*, *Rgs12*, *Rgs2*, *Arhgap24*, *Arnt2*, *Pde10a*, *Cish*, *Grb2* y el propio *Sos1*) (**Figura 20-A; Tabla 8**). La interacción de *Grb2* con *Sos*, y su papel en la translocación del mismo a la membrana ha sido comentado repetidamente en la introducción. No obstante, hay que recordar que la expresión proteica de *Grb2* en líneas *ko-Sos1* no mostró un descenso muy claro (**Figura 19-B**).

Asimismo, y estrechamente relacionados con la señalización intracelular, destacamos varios genes que codifican quinasas implicadas en transducción de señales (*Camkk2*, *Mylk*, *Mapkapk5*, que presentaron un aumento en su expresión, y *Mapkapk3*, *Tec*, *Tgfbr2*, *Vrk2*, que presentaron una reducción), anotados además al grupo de metabolismo del fósforo; e igualmente, genes que codifican fosfatasas implicadas en señalización (*Ptpla*, *Ptplb*, *Ppp2r2d* y *Ppp1r15b*, los dos primeros sobreexpresados y los dos últimos reprimidos). Estos resultados sugieren una alteración en diversas rutas de señalización intracelular cuyo efecto es difícil de predecir pues tanto la disminución como el aumento de expresión afecta tanto a activadores como a reguladores negativos.

En los grupos funcionales transcripción y expresión génica, regulación negativa de la expresión génica, y regulación positiva de la expresión génica, encontramos varios factores de transcripción que aumentan (*Gsc*, *Pax3*, *Foxd1*, *Glis2*, *Sox12* y *Mnat1*) y que disminuyen (*Lhx8*, *Hoxd8*, *Meis1* y *Notch1*). Además de los factores de transcripción, en este grupo están incluidos genes cuyo producto proteico desempeña otras funciones reguladoras de la expresión génica, como el control de la calidad del mRNA, el splicing, o el modelado de la estructura de la cromatina (*Upf1*, *Sap18*, *Setd8*, *Snpc1*, *Supt4h1*) (Centore et al., 2010; Hogg and Goff, 2010; Singh et al., 2010).

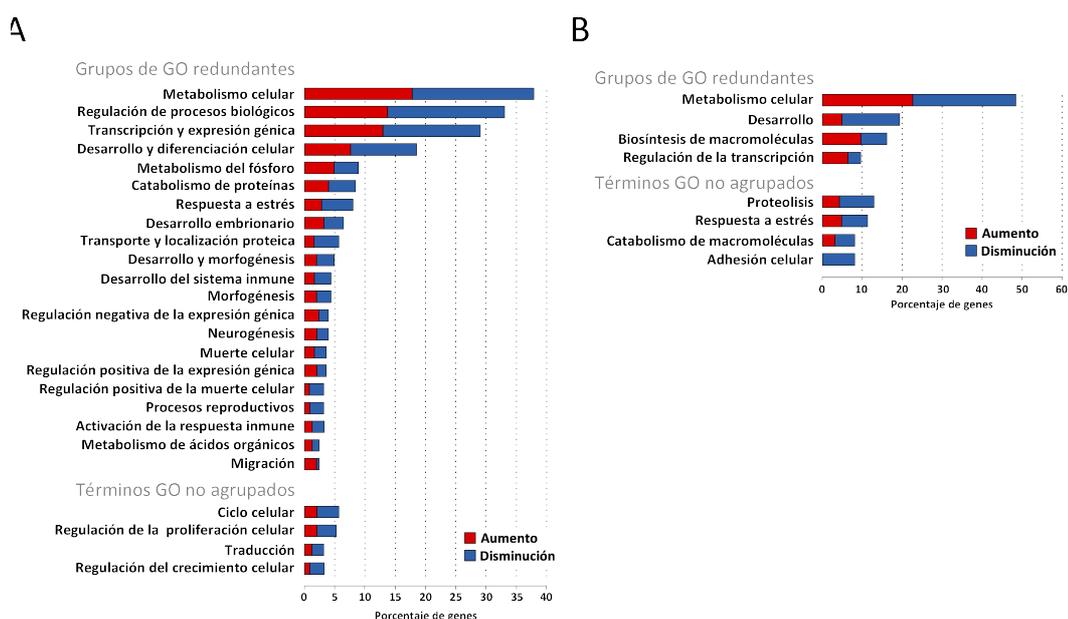


Figura 20. Análisis de enriquecimiento funcional con la aplicación bioinformática DAVID. El análisis de enriquecimiento funcional del programa DAVID clasifica los términos GO enriquecidos en grupos de GO redundantes y términos GO no agrupados. Cada barra representa el porcentaje de genes que aumentan (rojo) y que disminuyen (azul) dentro de un grupo o término funcional. El porcentaje está calculado respecto al número de genes utilizados en el análisis. **(A)** Enriquecimiento funcional de la lista de 325 transcritos (FDR 0.025) para las líneas *ko-Sos1*. **(B)** Enriquecimiento funcional de la lista de 73 transcritos (FDR 0,522) para las líneas *ko-Sos2*. El nombre de los genes anotados y los valores de significación estadística de cada grupo funcional pueden consultarse en las **Tablas 8 y 9**, respectivamente (disponibles en el CD adjunto).

Muchos de los factores de transcripción anotados en el grupo anterior tienen un papel importante en el desarrollo embrionario (*Hoxb2*, *Hoxb3*, *Hoxd8*, *Pax3*, *Gsc*, *Meis1*, *Foxd1*, *Glis2*), otra de las funciones enriquecidas en el análisis (**Figura 20-A; Tabla 8**). De hecho, el programa DAVID clasificó los términos GO relacionados con este proceso en cuatro grupos distintos, que denominamos: desarrollo y morfogénesis, desarrollo embrionario, morfogénesis, y desarrollo y diferenciación celular. Una buena parte de los genes anotados son comunes en los cuatro grupos, que además de los factores de transcripción mencionados, contiene otros genes también implicados en morfogénesis, organogénesis y diferenciación

celular (*Notch1*, *Col11a1*, *Lama5*, *Cck*, *Anxa4*, *Nid1*, *Adam19*). Estos resultados apoyan los datos obtenidos en los animales *ko*, reforzando la idea de un papel esencial de *Sos1* en el desarrollo embrionario (Qian et al., 2000; Wang et al., 1997). Adicionalmente, el análisis reveló un enriquecimiento del grupo funcional neurogénesis, al que están anotados varios de los genes ya mencionados en los grupos de desarrollo (*Notch1*, *Cck*, *Lama5*, *Pax3*, *Lhx8*, *Foxd1*, *Meis1*).

Otros de los grupos enriquecidos en el análisis corresponden a funciones relacionadas con el catabolismo de proteínas (*Usp1*, *Ube2e2*, *Ube2l3* y *Otub2*, cuya expresión aumenta, y *Derl2*, *Uba5*, *Cish*, *Fah*, *Fancl*, y *Adam19*, cuya expresión disminuye), transporte y localización proteica, (con sobreexpresión en los genes *Timm9* y *Rabgef1*, y descenso en la expresión de *Pitpnm1*, *Snf8*, *Dopey1*, *Slco2a1*, *Sec61g*, *Exoc1* y *Exoc4*), y migración, un grupo en que la mayoría de los genes anotados aumentan (*Fut8*, *Lama5*, *Cd34*, *Pax3*, *Foxd1*, excepto *Cck* que disminuye). Adicionalmente, obtuvimos enriquecimiento del grupo procesos reproductivos, el cual presenta la mayor parte de genes reprimidos (*Fancl*, *Notch1*, *Zfp105*, *Rgs2*, *Tgfbr2*, *Lhx8*), a excepción de *Cadm1* e *Ift81*, éste último esencial para la maquinaria de biogénesis y mantenimiento de estructuras ciliares (Lucker et al., 2005).

El análisis también reveló un enriquecimiento de funciones relacionadas con la respuesta a estrés y la muerte celular (**Figura 20-A**). En el grupo de respuesta a estrés, la mayoría de los genes están reprimidos (*Trp53inp1*, *Cdkn1a*, *Pml*, *Cd55*, *Phlda3*, *Ppp1r15b*, *Fancl*, *Derl2*, y *Tpfi*), aunque también observamos algunos que aumentan su expresión (*Gtf2h3*, *Eif2b1*, *Asha1*). Entre los genes reprimidos se encuentran varias dianas de p53 (*Trp53inp1*, *Cdkn1a*, *Phlda3*), indicando que su actividad transcripcional puede estar reducida en las células deficientes en *Sos1*. Como era de esperar, muchos de los genes anteriores están también anotados en los grupos muerte celular y regulación positiva de la muerte celular, por ejemplo, los genes pro-apoptóticos *Trp53inp1*, *Cdkn1a*, *Phlda3*, *Pml*, cuya expresión disminuye. Además de estos, observamos otros genes que también regulan positivamente la muerte celular, tales como *Rnf130*, *Mnt* (ambos reprimidos), y *Eaf2*, *Cadm1*, *Dnaja3*, *Cd59b* (sobreexpresados), lo que sugiere que la regulación de la muerte celular podría estar afectada de alguna manera en ausencia de *Sos1* (**Figura 20-A; Tabla 8**). Es interesante destacar que puede existir una relación importante entre *Eaf2* y *Sos1*, pues entre otras razones que explicaremos más adelante (**discusión**, pág. 118-119), *Eaf2* es un supresor de tumores que se encuentra reprimido en cáncer de próstata, en los que también se ha descrito sobreexpresión de *SOS1* (Xiao et al., 2003). Puesto que *Eaf2* está sobreexpresado en células deficientes en *Sos1*, puede que la relación entre ambos sea importante en cáncer de próstata.

Interesantemente, de acuerdo con la participación de *Sos1* en el desarrollo de linfocitos T (Kortum et al., 2011; Roose et al., 2007), el perfil de expresión de células *ko-Sos1* está enriquecido en funciones relacionadas con el desarrollo del sistema inmune (*Cd55*, *Hoxb3*, *Il4ra*, *Meis1*, *H2-T9*, *H2-T10* y *Pml*, todos reprimidos, y *Cd34*, *Cadm1*, *Dnaja3*, sobreexpresados).

sados) y la activación de la respuesta inmune (*Cd38*, *Cd55*, *Il4ra*, cuya expresión disminuye, y *Cd59b*, *Cadm1*, *Dnaja3*, que aumentan), reforzando la idea de que *Sos1* ejerce un papel importante como regulador del desarrollo y la activación de células T (**Figura 20-A; Tabla 8**).

Por último, el análisis funcional mostró enriquecimiento en varios términos GO (no agrupados), incluyendo ciclo celular, regulación de la proliferación celular, regulación del crecimiento celular y traducción. La mayoría de genes anotados a los términos funcionales regulación de la proliferación (GO:0042127) y ciclo celular (GO:0007049) están reprimidos (*Ccng1*, *Pttg1*, *Taf10*, *Numa1*, *Rgs2*, *Notch1*, *Cdkn1a*, *Timp2*, *Syce2*), indicando posibles alteraciones en la proliferación y la progresión del ciclo en los fibroblastos *ko-Sos1*. Íntimamente relacionado con los términos anteriores, encontramos también enriquecidos los términos GO regulación del crecimiento celular (GO:0040008) y traducción (GO:0006412) (**Figura 20-A; Tabla 8**). En estos grupos observamos genes que aumentan su expresión (*Atxn2*, *Rps4y2*, *Eif2b1*, *Mrlp39*), si bien la mayor parte presenta un descenso en su expresión (*Creg1*, *Igfbp6*, *Eif4g3*, *Eif3f*, *Ppp1r15b*, *Dhx29*, *Rps13*, *Rps17*).

- Análisis funcional del perfil de expresión diferencial obtenido para los fibroblastos *ko-Sos2*:

El análisis funcional realizado con el perfil de expresión diferencial de fibroblastos deficientes en *Sos2*, mostró un enriquecimiento en términos funcionales asociados al metabolismo celular, biosíntesis de macromoléculas, regulación de la transcripción, y desarrollo embrionario. Asimismo, los resultados mostraron un fuerte enriquecimiento en términos GO no agrupados, como proteólisis (GO:0006508), respuesta a estrés (GO:0006950), catabolismo de macromoléculas (GO:0009057) y adhesión celular (GO:0007155) (**Figura 20-B**).

El grupo de metabolismo celular es el que presenta mayor porcentaje de genes anotados, de los cuales la mayor parte están incluidos en el resto de grupos funcionales. Sin embargo, encontramos varios genes asociados exclusivamente en este grupo, cuya expresión aumenta (*Dusp10*, *Moxd1* y *Pfkfb3*) o disminuye (*Lpr10*, *Dhrs1*, *Aga*). Los genes anotados en el grupo de biosíntesis de macromoléculas están incluidos también en el grupo de metabolismo celular. En este grupo funcional observamos disminución en genes cuyo producto proteico interviene en la biosíntesis de proteoglicanos, gangliósidos, aminoácidos, etc (*Ndst2*, *B4galnt1*, *Ass1*, *Pigyl*), así como en la síntesis de proteínas (*Mrpl43* y *Mrrf*), ambos aumentados (**Figura 20-B; Tabla 9**).

Al igual que en fibroblastos *ko-Sos1*, en líneas *ko-Sos2* también encontramos enriquecimiento en funciones asociadas con el desarrollo embrionario. Este grupo incluye en su mayoría genes que disminuyen (*Bmp1*, *Mmp14*, *Shc1*, *Tsc2*, *Dad1*, *Ero1l*, *Col8a1*), pero también alguno que aumenta (*Ptk2*, *Pcsk9*, *P2rx3*). Además, observamos un conjunto de genes (formado por genes anotados en varios grupos funcionales, incluido el desarrollo embrionario) implicados en rutas de señalización intracelular. Entre ellos, mostraron una disminución

en su expresión los genes *Bmp1*, *Tsc2*, *Shc1*, *Rap2b*, y *Lime1*, mientras que presentaron un aumento los genes *Ptk2*, *Dusp10*, y *Il18rap* (**Figura 20-B; Tabla 9**). Entrando un poco más en detalle, *Lime1* e *Il18rap* participan en la señalización intracelular de linfocitos, sugiriendo que también *Sos2* puede tener un papel en el sistema inmune.

Por otra parte, el enriquecimiento en funciones asociadas a la regulación de la transcripción está basado en el aumento de expresión de genes como *Crebzf* y *Srebf2*, que codifican factores de transcripción, así como de otros genes reguladores del metabolismo de los ácidos nucleicos (*Mnd1*, *Mcts2*). El factor de transcripción *Srebf2* regula la expresión de genes implicados en la síntesis de colesterol y ácidos grasos, contribuyendo a la homeostasis de lípidos (Shimano et al., 1997). Este dato, junto con otros genes también implicados en la homeostasis de lípidos (*Dhrs1*, *Pcsk9*), sugiere una función de *Sos2* en la regulación del metabolismo lipídico (Maxfield and van Meer, 2010).

Los términos GO enriquecidos proteólisis (GO:0006508) y catabolismo de macromoléculas (GO:0009057) comparten muchos de los genes anotados, de los cuales algunos aumentan su expresión (*Rnf11*, *Pcsk9*, *Htra3*), y otros por el contrario, disminuyen (*Ube2e2*, *Ube2e1*, *Mmp14* y *Bace1*) (**Figura 20-B; Tabla 9**). *Bace1* codifica una proteasa de ácido aspártico denominada Beta secretasa 1, cuya actividad contribuye a la formación de las placas amiloides típicas en la enfermedad de Alzheimer. A este respecto, como ya comentamos en la introducción (**sección 4.2.4.**), se ha publicado un estudio de genes de susceptibilidad a Alzheimer donde se encontró una asociación significativa entre polimorfismos en *SOS2* y la susceptibilidad a padecer esta enfermedad (Hamilton et al., 2007).

Por último, señalar también el enriquecimiento en los términos GO adhesión celular (GO:0007155) y respuesta a estrés (GO:0006950). Todos los genes anotados en adhesión celular se encuentran reprimidos (*Pcdhb4*, *Vcl*, *Col8a1*, *Cgref1*, *Shc1*), indicando que la adhesión en células *ko-Sos2* puede estar alterada. Respecto a los genes anotados a la respuesta a estrés, observamos un aumento de expresión en los genes *Il18rap*, *P2rx3* y *Pcsk9*, y una disminución en *Ero1l* y *Sod2*, ambos inducidos en condiciones de estrés (**Figura 20-B; Tabla 10**).

Para finalizar el análisis funcional de los fibroblastos deficientes en *Sos2*, es importante destacar el gen *Glipr1* (GLI pathogenesis-related 1), pues encabeza la lista de genes diferenciales en las líneas *ko-Sos2* (siendo de hecho el único gen significativo con un FDR de 0.206) y se encuentra entre los 200 primeros genes diferenciales en las líneas *ko-Sos1* (**Tablas 8 y 9**). Sin embargo, no está incluido en el análisis con DAVID. Por eso, consideramos interesante comentar brevemente su función. *Glipr1* fue identificado en líneas celulares de glioblastoma y también en líneas de cáncer de próstata como una nueva diana de p53 (Ren et al., 2002). En contraste con su papel oncogénico en glioma, se ha demostrado su función pro-apoptótica y supresora de tumores en líneas celulares de múltiples tumores. Por ejemplo, en cáncer de próstata la expresión de *Glipr1* está reprimida principalmente

por metilación del promotor (Ren et al., 2004). Además, se ha descrito que *Glipr1* tiene actividad supresora de la angiogénesis asociada a tumores y de la proliferación de células endoteliales (Thompson, 2010).

1.4.2 Análisis de las funciones y rutas de señalización canónicas alteradas en fibroblastos *ko-Sos1* mediante el programa IPA de Ingenuity

En segundo lugar, analizamos los resultados de los microarrays con otra aplicación, el análisis IPA (Ingenuity Pathway Analysis) de Ingenuity® Systems. Este programa, de forma similar a DAVID, realiza un análisis de enriquecimiento sobre la lista de genes del usuario utilizando información bibliográfica almacenada en el mismo. Pero además, este programa contiene una base de datos con multitud de rutas de señalización canónicas. IPA compara la lista de genes con esta base de datos aplicando un algoritmo, mediante el cual decide si la contribución de genes procedentes de tu lista en la ruta canónica tiene o no significación biológica. Para este estudio decidimos utilizar la lista de 325 transcritos diferencialmente expresados (FDR 0,025) en las líneas *ko-Sos1*. Este análisis no se realizó con los genes diferenciales de las líneas *ko-Sos2* debido a la escasa significación estadística de los mismos.

El resultado obtenido confirmó en su mayor parte los datos conseguidos con DAVID. El enriquecimiento en “Funciones moleculares y celulares” del análisis IPA mostró los mejores valores de significación estadística (p-values) en procesos como ciclo celular, crecimiento y proliferación celular, expresión génica, desarrollo y muerte celular (**Figura 21-A**).

La segunda parte del estudio mostró que las rutas canónicas con mayor significación biológica en relación con los genes analizados fueron rutas de señalización asociadas con el crecimiento celular y la síntesis de proteínas, como la ‘ruta de EIF2’ y ‘regulación de eIF4 y p70^{S6K}’ (que incluyen los genes *Grb2*, *Eif3f*, *Sos1*, *Eif2b1*, y *Eif4g3*), y otras rutas como la ‘señalización de TGF-β’ (que incluye *Tgfbr2*, *Gsc*, *Grb2*, *Sos1* e *Inhbb*), y la ‘ruta de Jak-Stat’ (que contiene los genes *Grb2*, *Cdkn1a*, *Sos1* y *Cish*) (**Figura 21-B**). Otras rutas canónicas identificadas por IPA fueron la ‘ruta de señalización de p53’, ‘señalización en leucemia mieloide crónica’, ‘ensamblaje del complejo de la RNA polimerasa II’, ‘señalización del receptor de estrógenos’, etc (**Figura 21-B**). Coincidiendo nuevamente con los resultados de DAVID, la significación hallada en las rutas de la leucemia mieloide crónica y de Jak-Stat, reflejan la conexión entre el perfil diferencial de las líneas *ko-Sos1* y el sistema inmune. En este contexto, podemos añadir la ruta de ‘señalización del GM-CSF’ y la ‘señalización de la IL-4’, que se encuentran cerca de la significación estadística (**Figura 21-B**).

A

Función molecular y celular	p-value
Ciclo celular	9,35 E-04
Desarrollo	9,35 E-04
Crecimiento y proliferación celular	1,54 E-03
Expresión génica	2,45 E-03
Muerte celular	3,54 E-03

B

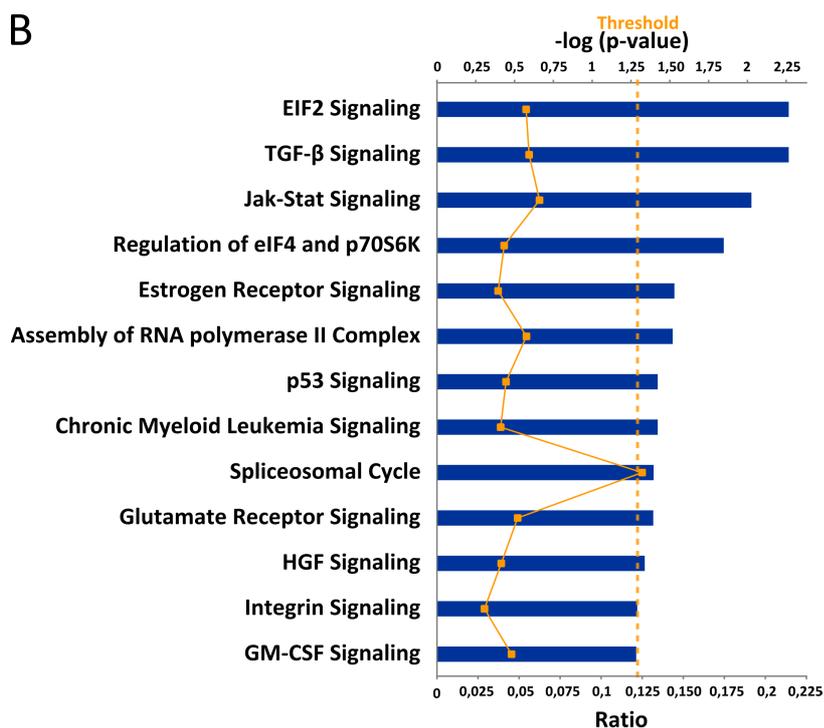


Figura 21. Resultado del análisis funcional mediante el programa IPA de Ingenuity. (A) Principales funciones enriquecidas en el perfil de expresión diferencial de las líneas *ko-Sos1* con un FDR de 0,025. **(B)** Rutas de señalización canónicas asociadas significativamente al perfil diferencial de fibroblastos *ko-Sos1*. Las barras del histograma representan el valor de significación de cada ruta expresado en $-\log(p\text{-value})$. El umbral considerado significativo ($p\text{-valor} < 0,05$) está representado con la línea punteada de color naranja. El programa también proporciona valores de Ratio para cada ruta (cuadrados naranjas), calculado como la razón entre el número de genes de la lista diferencial presentes en la ruta canónica respecto al número total de genes que componen la ruta según la base de datos de Ingenuity.

2. CONTRIBUCIÓN DE SOS1 Y SOS2 EN LAS PRINCIPALES RUTAS DE SEÑALIZACIÓN MEDIADAS POR RAS

Paralelamente al estudio del perfil transcripcional asociado a la deficiencia de *Sos1* y *Sos2*, este trabajo tenía como objetivo la caracterización funcional de estas líneas celulares. Además, los cambios observados en la expresión génica, así como los datos del análisis funcional de los microarrays, deben ser evaluados experimentalmente. En este capítulo analizamos el fenotipo de los MEFs carentes de *Sos1* o *Sos2*, y la significación biológica de algunos de los cambios encontrados en sus perfiles transcripcionales.

2.1 Efecto de *Sos1* y *Sos2* sobre la capacidad proliferativa en cultivo

Como indicamos en la introducción, las proteínas *Sos* funcionan como GEF activadores de *Ras*, cuyas rutas efectoras constituyen importantes reguladores de la proliferación celular, entre otros procesos. Teniendo esto en cuenta, y puesto que los resultados de los microarrays mostraron un elevado número de genes relacionados con este proceso, el primer paso en la caracterización funcional de las líneas *ko-Sos1* y *ko-Sos2* consistió en analizar la capacidad proliferativa de las mismas.

La curva de crecimiento de cada línea celular se realizó sembrando el mismo número inicial de células (día 0) y contando las mismas cada 24 horas durante los 5 días siguientes. El experimento se realizó en varias líneas de cada genotipo (*wt*, *ko-Sos1* y *ko-Sos2*). Una vez representadas gráficamente pudimos observar que la ausencia de cualquiera de las isoformas de *Sos* produce una reducción en la tasa proliferativa, siendo ésta más acusada en los MEFs *ko-Sos2*. Estos resultados sugieren que ambas isoformas poseen un papel estimulador de la proliferación, al menos en fibroblastos embrionarios (**Figura 22-A**).

El cálculo del 'tiempo de duplicación', asociado a este tipo de experimentos, se realizó con los datos obtenidos en las curvas de crecimiento. Proporciona una idea clara y rápida de la diferencia que existe en la capacidad proliferativa entre estos 3 genotipos. Así, comprobamos que los MEFs *wt* duplican el número de células en cultivo en 27 horas, mientras que los fibroblastos *ko-Sos1* y *ko-Sos2* poseen tiempos de duplicación de 32 y 37 horas, respectivamente (**Figura 22-B**).

2.2. Estudio de la contribución de *Sos1* y *Sos2* a la activación de *Ras* y sus rutas efectoras

Teniendo en cuenta la función molecular de las proteínas *Sos*, las diferencias observadas en proliferación podrían ser debidas a alteraciones en la activación de *Ras* y sus rutas efectoras. A continuación, decidimos explorar el estado de activación de estas rutas de señalización en las líneas celulares *ko-Sos1* y *ko-Sos2*. La utilización de ambas líneas *ko* proporcionará información sobre la especificidad o redundancia funcional de las proteínas *Sos* en este contexto.

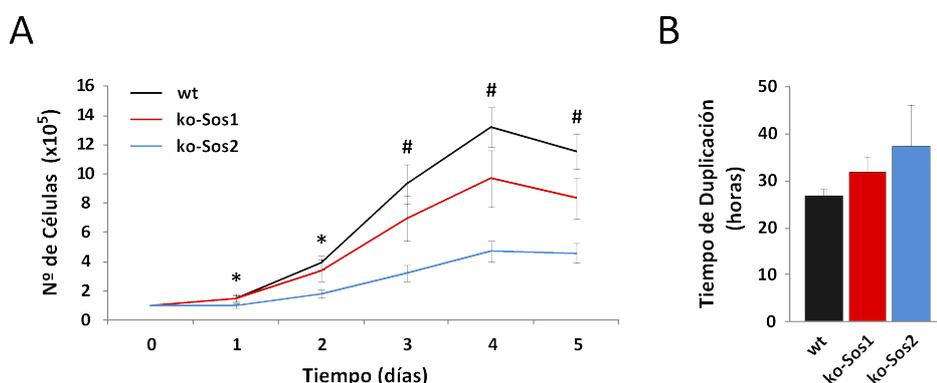


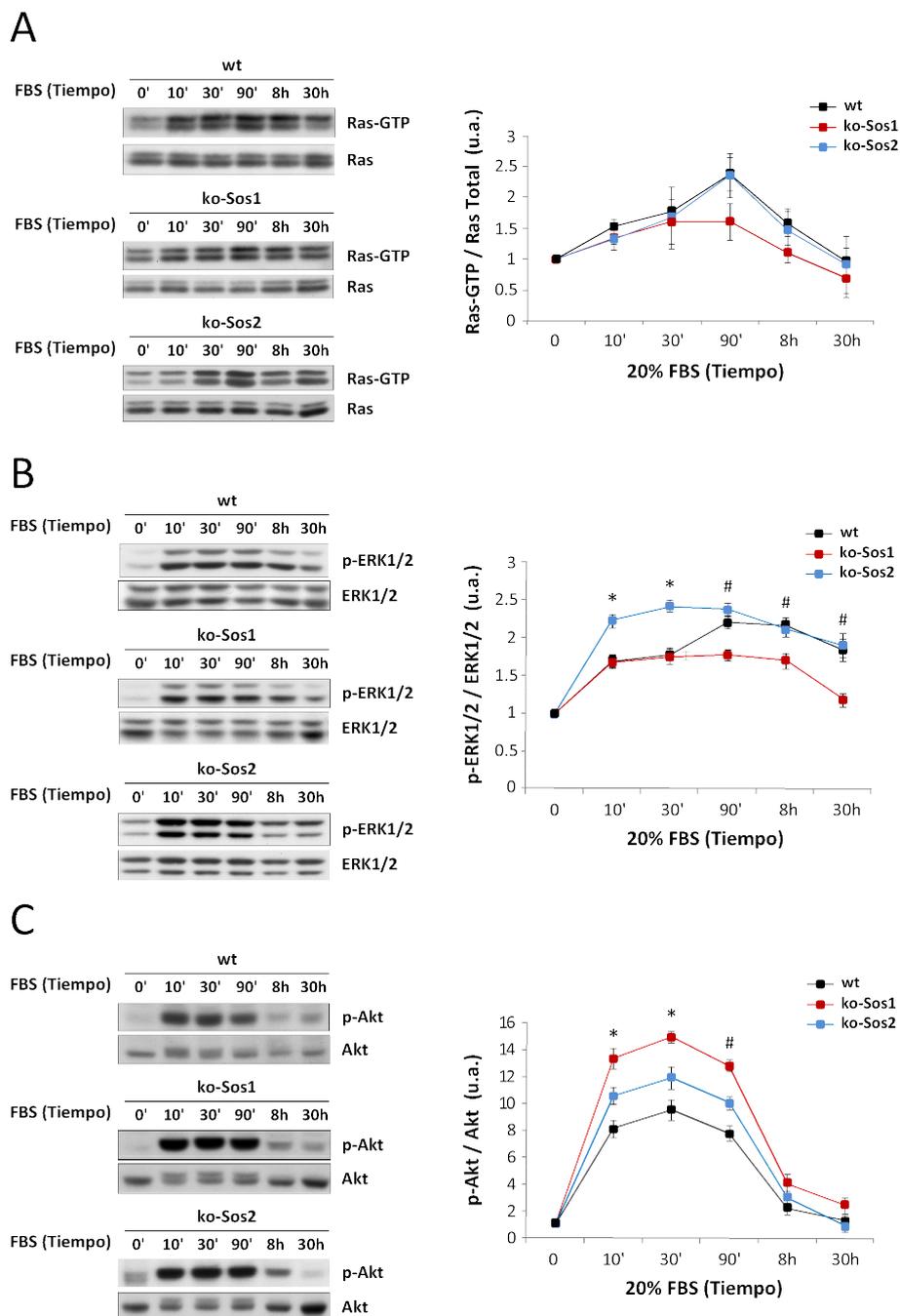
Figura 22. Curvas de crecimiento de MEFs *wt*, *ko-Sos1* y *ko-Sos2*. (A) Un número inicial de 100.000 células de cada genotipo fueron sembradas en el día 0, contándose cada 24h durante 5 días de cultivo. Los valores en cada punto de la curva representan la media \pm SEM de 5 experimentos independientes para *wt* y 3 para cada línea *ko*, cada uno de ellos con duplicados. Para cada genotipo se utilizaron al menos 2 líneas procedentes de embriones diferentes ($wt=3$, $ko=2$). (B) Estimación del tiempo de duplicación para cada genotipo. Las barras del diagrama representan la media + SEM de los datos obtenidos en el apartado (A) entre los días 2-4, cuando la tasa de crecimiento es prácticamente constante en todos los casos. *, $p < 0,05$ en la comparación *ko-Sos2* vs *wt*; #, $p < 0,05$ en las comparaciones de ambas líneas *ko* vs *wt*.

2.2.1 Papel de *Sos1* y *Sos2* en la activación de Ras, ERK1/2 y Akt

La proliferación celular está regulada por múltiples rutas de señalización activadas por señales mitogénicas extracelulares. En este sentido, las principales rutas efectoras de Sos y Ras que controlan este proceso son la ruta Ras/ERK y la ruta PI3K/Akt, ambas activadas por la estimulación con factores de crecimiento (Figuras 8 y 9). Para analizar la cinética de activación de estas rutas en las líneas *ko-Sos1* y *ko-Sos2*, decidimos determinar la cantidad de Ras-GTP (Ras activo) y el nivel de fosforilación de los efectores ERK1/2 (Tyr204) y Akt (Ser473), considerándolos indicadores del estado de activación de las rutas Ras/ERK y PI3K/Akt, respectivamente.

Para el diseño experimental tuvimos en cuenta las diferencias en señalización a corto y largo plazo para *Sos1* y *Sos2* sugeridas en el estudio de Qian et al, 2000 (Qian et al., 2000), en el que además, utilizaron el mismo tipo celular (MEFs inmortalizados). Así, decidimos aplicar un marco temporal de estimulación que abarca puntos a corto (10 y 30 minutos) y medio-largo plazo (90 minutos, 8 horas y 30 horas) con el objetivo añadido de poder comprobar los cambios observados en dicho estudio. Para ello, cultivos subconfluentes de los 3 genotipos fueron privados de suero toda la noche y posteriormente estimulados con 20% FBS durante los tiempos indicados. Los niveles de Ras activado (Ras-GTP) fueron determinados bioquímicamente mediante ensayos de precipitación por afinidad o ensayos de *pull down* (Figura 23-A). Paralelamente, lisados celulares procedentes de los mismos experimentos se utilizaron para determinar el nivel de fosforilación de ERK1/2 y Akt me-

diente Western blot (**Figura 23-B y C**). Se emplearon varias líneas celulares de cada genotipo, y los resultados se cuantificaron con el programa Image J. El nivel de fosforilación fue normalizado respecto a la cantidad de proteína total presente en el lisado (ratio señal de fosforilación/señal de proteína total). Los datos están representados en términos relativos, donde el valor de todos los puntos de tiempo está calculado respecto al tiempo 0 (Basal) de cada genotipo, que corresponde a la condición de privación de suero (**Figura 23**).



En estas condiciones experimentales, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la activación de Ras entre los distintos genotipos, aunque observamos una tendencia en las líneas *ko-Sos1* a una menor activación de Ras a largo plazo (a partir de 90 minutos) (**Figura 23-A**). Sin embargo, en la cinética de fosforilación de ERK1/2, los MEFs *ko-Sos2* presentan niveles de fosforilación mayores que los fibroblastos *wt* y *ko-Sos1* a corto plazo, equiparándose de nuevo a los *wt* a largo plazo. Adicionalmente, y en consonancia con los resultados de Qian et al, 2000, la deficiencia de Sos1 en periodos de tiempo mayores de 30 minutos provoca una disminución en la fosforilación de ERK1/2 comparado con MEFs *wt* y *ko-Sos2* (**Figura 23-B**). Por último, la cinética de fosforilación de Akt muestra que la ausencia de Sos1 o Sos2 produce un aumento de la fosforilación de este efector, llegando a ser casi el doble en los MEFs *ko-Sos1* respecto a los *wt* (**Figura 23-C**).

2.2.2 Papel de Sos1 y Sos2 sobre efectores de ERK y Akt

Los resultados del análisis funcional de los microarrays pusieron de manifiesto la posible alteración en rutas de señalización intracelular que controlan la proliferación, el crecimiento celular y la síntesis de proteínas (**Figuras 20 y 21**). Además, hemos observado experimentalmente que existen diferencias en la capacidad proliferativa y en la activación de las quinasas ERK1/2 y Akt en las líneas *ko-Sos1* y *ko-Sos2*.

Como explicamos en la introducción, la ruta PI3K-Akt controla estos procesos mediante la regulación de diversos efectores (Marone et al., 2008). Con el objetivo de profundizar en

Figura 23. Efecto de la eliminación de Sos1 o Sos2 sobre la activación de Ras y sus rutas efectoras. Cultivos subconfluentes de cada genotipo fueron privados de suero toda la noche y estimulados después con 20% FBS durante los tiempos indicados. **(A)** Efecto sobre la activación de Ras. La medida del nivel de activación de Ras se realizó mediante ensayos de *pull-down*, analizados posteriormente por Western blot. El panel de la izquierda muestra un experimento representativo de cada genotipo. La gráfica de la derecha representa la cuantificación de los resultados de *pull-down*, donde la cantidad de Ras-GTP fue normalizada respecto a la cantidad total de Ras presente en los lisados celulares totales. Los resultados se expresaron tomando como referencia el tiempo 0 (Basal) al que se asignó arbitrariamente el valor 1. Los datos de la gráfica corresponden a la media \pm SEM de 4 experimentos independientes expresados en unidades arbitrarias (u.a.). **(B)** Efecto sobre la fosforilación de ERK1/2. El nivel de fosforilación de ERK1/2 se analizó mediante Western Blot utilizando anticuerpos específicos para ERK1/2 total y fosforilado en Tyr204. El panel de la izquierda muestra un experimento representativo de cada genotipo. La gráfica de la derecha representa la cuantificación de los resultados, donde el nivel de fosforilación de ERK1/2 se calculó utilizando el ratio entre la señal de p-ERK y ERK total (pERK/ERK) presente en los lisados celulares totales. Los resultados se expresaron tomando como referencia el tiempo 0 (Basal) al que se asignó arbitrariamente el valor 1. Los datos de la gráfica corresponden a la media \pm SEM de 13 experimentos independientes expresados en unidades arbitrarias (u.a.). *, $p < 0,05$ en la comparación *ko-Sos2* vs *wt*; #, $p < 0,05$ en la comparación *ko-Sos1* vs *wt*. **(C)** Efecto sobre la activación de Akt. El nivel de fosforilación de Akt se analizó mediante Western Blot utilizando anticuerpos específicos para Akt total y fosforilado en Ser-473. El panel de la izquierda muestra un experimento representativo de cada genotipo, y la gráfica de la derecha representa la cuantificación de los resultados, donde el nivel de fosforilación de Akt se calculó utilizando el ratio entre la señal de p-Akt y Akt total (pAkt/Akt) presente en los lisados celulares totales. Los resultados se expresaron tomando como referencia el tiempo 0 (Basal) al que se asignó arbitrariamente el valor 1. Los datos de la gráfica corresponden a la media \pm SEM de al menos 6 experimentos independientes expresados en unidades arbitrarias (u.a.). *, $p < 0,05$ en la comparación de *ko-Sos1* vs *wt*; #, $p < 0,05$ en las comparaciones de ambas líneas *ko* vs *wt*.

la señalización mediada por esta ruta, quisimos analizar el estado de fosforilación de alguna de las dianas de Akt. Entre sus múltiples sustratos, consideramos que las quinasas GSK3 β , mTOR y p70^{S6K} eran candidatos interesantes por su implicación en la regulación de la síntesis proteica, el crecimiento celular y la proliferación. Aunque ya hablamos de ellas en la introducción, cabe señalar algún detalle sobre los sitios de fosforilación específicos que regulan la actividad de estas proteínas y sus funciones más interesantes en este contexto:

GSK3 β es fosforilada por Akt en la serina 9 (GSK3 β -Ser9), inhibiendo su actividad quinasa. La fosforilación de Ccnd1 por GSK3 β induce la ubiquitinación y posterior degradación de la misma (Diehl et al., 1998). Por tanto, la estimulación con factores de crecimiento favorece la estabilidad proteica de Ccnd1 a través de Akt. Además, GSK3 β inactiva al factor de iniciación de la traducción eIF2B mediante fosforilación, inhibiendo la síntesis proteica necesaria para la proliferación celular (Welsh et al., 1998).

La serina/treonina quinasa **mTOR** tiene un papel esencial en la regulación del crecimiento celular, coordinando la síntesis proteica con estímulos procedentes de factores de crecimiento, la disponibilidad de nutrientes y el nivel energético (Wullschleger et al., 2006). La fosforilación de mTOR en serina 2448 (mTOR-Ser2448) es dependiente de la señalización por PI3K-Akt (Nave et al., 1999; Wullschleger et al., 2006) y la quinasa p70^{S6K} parece ser la encargada de fosforilar este residuo *in vivo* (Chiang and Abraham, 2005; Holz and Blenis, 2005).

p70^{S6K} es a su vez, uno de los principales efectores de mTOR en la regulación de la síntesis proteica. La actividad serina/treonina quinasa de p70^{S6K} está regulada por un patrón de fosforilación complejo que afecta a varios residuos en diferentes dominios (Dennis et al., 1998; Fenton and Gout, 2011). Todos estos sitios de fosforilación contribuyen diferencialmente a la activación de p70^{S6K}, y aunque aún no está totalmente demostrado, existen evidencias de que quinasas de la familia MAPKs y también Cdk1 (cyclin-dependent kinase 1) pueden participar en este evento (Berven and Crouch, 2000; Mukhopadhyay et al., 1992). Los residuos treonina 421 y serina 424 (Thr421/Ser424) forman parte de aquellos presumiblemente regulados por MAPKs. La fosforilación en estos residuos, induce un cambio de conformación que permite la fosforilación de p70^{S6K} en la treonina 389 (Thr389) por quinasas de la ruta PI3K-Akt, principalmente mTOR (Burnett et al., 1998; Nojima et al., 2003). Este último evento de fosforilación permite a la quinasa constitutivamente activa PDK1, fosforilar la treonina 229 (Thr229), lo que confiere la actividad completa a p70^{S6K} (Alessi et al., 1998; Pullen et al., 1998).

Con esta información, decidimos analizar el nivel de fosforilación de GSK3 β -Ser9, mTOR-Ser2448 y p70^{S6K}-Thr389 en MEFs *wt*, *ko-Sos1* y *ko-Sos2*. Teniendo en cuenta que habíamos obtenido una mayor fosforilación de ERK1/2 en líneas *ko-Sos2*, determinamos además el grado de fosforilación de p70^{S6K} en Thr421/Ser424.

Con el propósito de comprobar qué proporción de la fosforilación de estos residuos depende de la actividad de PI3K optamos por añadir un duplicado del experimento en presencia de wortmanina, un inhibidor de la actividad de las PI3Ks (Arcaro and Wymann, 1993). En todas las réplicas experimentales el tratamiento con wortmanina inhibió completamente la fosforilación de Akt-Ser473, no así la fosforilación de ERK1/2, que se mantuvo sin cambios significativos tras el tratamiento con este inhibidor (**Figura 24**). Al igual que en los experimentos de Ras, ERK1/2 y Akt, los resultados están representados en términos relativos, donde el valor en los puntos de estimulación (10 y 30 minutos) están calculados respecto al tiempo 0 (Basal) de cada genotipo. En este caso además, el valor de las muestras tratadas con wortmanina está calculado respecto al tiempo 0 de cada genotipo tratado con DMSO.

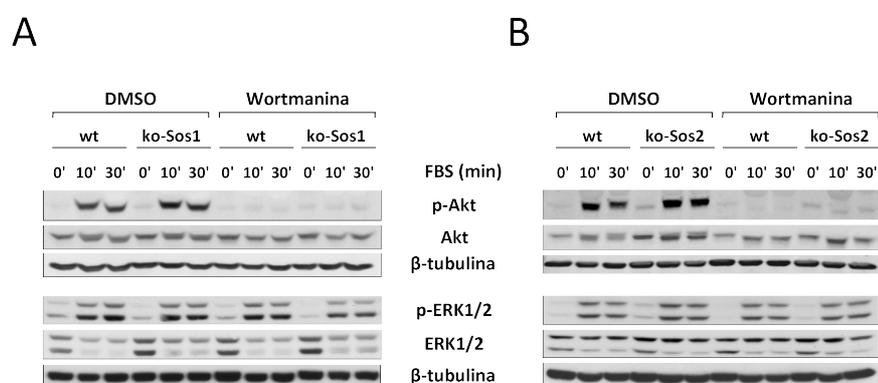


Figura 24. Inhibición de la ruta PI3K-Akt. Cultivos subconfluentes de cada genotipo fueron privados de suero durante toda la noche, posteriormente tratados con Wortmanina 100nM o DMSO durante 1 hora, y por último estimuladas con 20% FBS durante 10 y 30 minutos. La inhibición de la actividad enzimática de PI3K se comprobó analizando el nivel de fosforilación de Akt en Ser-473 mediante Western blot. También se analizó el efecto de este inhibidor sobre la fosforilación de las MAPKs ERK1/2 en Tyr204 como se puede observar en los paneles inferiores. **(A)** Western blot representativo de los experimentos realizados con fibroblastos *wt* y *ko-Sos1*. **(B)** Western blot representativo de los experimentos realizados con fibroblastos *wt* y *ko-Sos2*.

GSK3β-Ser9: al contrario de lo que esperábamos, la fosforilación de GSK3β-Ser9 no presentó ningún cambio en las líneas *ko-Sos1* ni *ko-Sos2* respecto a los MEFs *wt* (**Figura 25-A y B**). El nivel de fosforilación de GSK3β-Ser9 está expresado como el ratio entre la cantidad de GSK3β-Ser9 y la cantidad de GSK3β total ($p\text{-GSK3}\beta/\text{GSK3}\beta$) (**Figura 25-B**). En las muestras tratadas con wortmanina observamos una disminución estadísticamente significativa de la fosforilación de GSK3β-Ser9 en todas las condiciones, aproximándose al nivel de fosforilación basal de las muestras con DMSO (**Figura 25-A y B**). Esta disminución indica que Akt es responsable de la mayor parte de la fosforilación de GSK3β en Ser9.

Los resultados que obtuvimos con los microarrays sugerían un pequeño aumento de GSK3β en líneas *ko-Sos1*, aunque fuera de los cortes de significación estadística aplicados. Para

comprobarlo, analizamos la cantidad de GSK3 β en cada genotipo utilizando la expresi3n de β -tubulina como control de la carga total de prote3na. Las cuantificaciones mostraron que GSK3 β aumenta ligeramente pero de forma significativa en las l3neas *ko-Sos1* respecto a las l3neas *wt* (esto no ocurre en l3neas *ko-Sos2*) (**Figura 25-C**). Este dato puede explicar, en parte, que no se observen diferencias al normalizar la se3al de GSK3 β -Ser9 con GSK3 β total. De hecho, al representar gr3ficamente la cantidad de GSK3 β -Ser9 respecto a la expresi3n de β -tubulina (ratio p-GSK3 β / β -tubulina), los resultados mostraron un aumento de GSK3 β -Ser9 en *ko-Sos1* (aunque no es estad3sticamente significativo) (**Figura 25-D**). Los datos en esta 3ltima gr3fica no se relativizaron al tiempo 0 (Basal), sino que cada barra representa el ratio p-GSK3 β / β -tubulina.

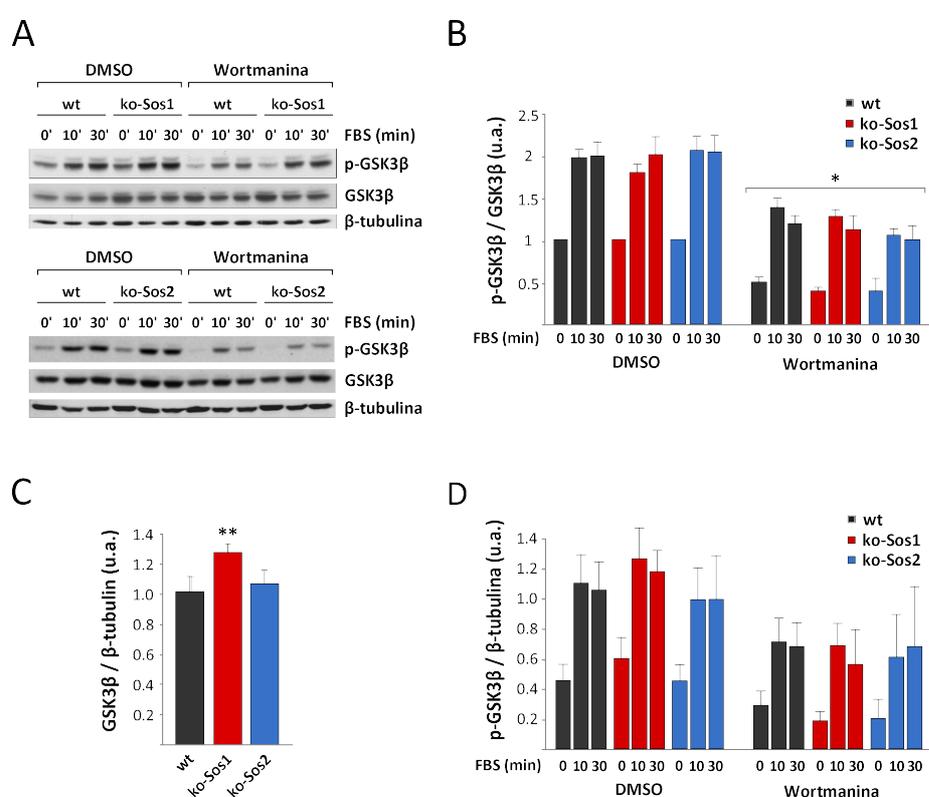


Figura 25. Efecto de la eliminaci3n de Sos1 y Sos2 sobre la fosforilaci3n de GSK3 β . (A) Cultivos subconfluentes de cada genotipo fueron privados de suero durante toda la noche, tratados una hora con DMSO o con wortmanina 100nM, y estimulados despu3s con 20% FBS durante 10 y 30 minutos. Los niveles de GSK3 β fosforilada en Ser-9 y de GSK3 β total en el lisado celular fueron detectados por Western blot con anticuerpos espec3ficos. Se muestra un experimento representativo para cada l3nea *ko*. (B) Cuantificaci3n del nivel de fosforilaci3n de GSK3 β respecto a la cantidad total de GSK3 β en el lisado celular (ratio pGSK3 β /GSK3 β). Los resultados est3n expresados tomando como referencia el tiempo 0 (Basal) en el tratamiento con DMSO para cada genotipo, al que se asign3 arbitrariamente el valor 1. Los datos del diagrama de barras corresponden a la media \pm SEM en unidades arbitrarias (u.a.) de 11, 7 y 4 experimentos independientes procedentes de las l3neas *wt*, *ko-Sos1* y *ko-Sos2*, respectivamente. *, $p < 0,05$ respecto a las muestras con DMSO. (C) An3lisis del nivel de expresi3n de GSK3 β en cada genotipo mediante el ratio GSK3 β / β -tubulina. Los datos representan la media \pm SEM en unidades arbitrarias (u.a.) de 5, 5, y 2 experimentos independientes de las l3neas *wt*, *ko-Sos1* y *ko-Sos2*, respectivamente. **, $p < 0,01$ respecto a los MEFs *wt*. (D) Cuantificaci3n del nivel de fosforilaci3n de GSK3 β tras el tratamiento con wortmanina o DMSO, usando la expresi3n de β -tubulina como control de la carga total de prote3na.

mTOR-Ser2448: tampoco encontramos diferencias significativas en el nivel de fosforilación de mTOR-Ser2448 al comparar los 3 genotipos. No obstante, se puede apreciar una tendencia al alza en ambas líneas *ko* respecto a *wt*, especialmente a los 30 minutos de estimulación con suero (**Figura 26**). El tratamiento con wortmanina redujo débilmente la fosforilación de mTOR-Ser2448, pero tras aplicar el análisis estadístico la fosforilación de mTOR-Ser2448 a los 30 minutos de estimulación disminuyó significativamente sólo en las líneas *ko-Sos2* tratadas con wortmanina (**Figura 26**).

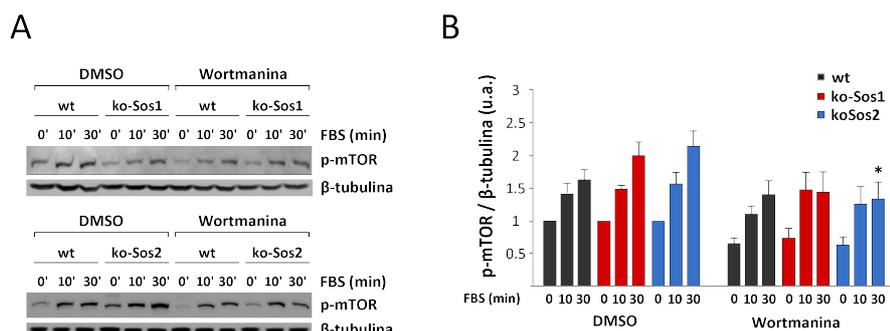


Figura 26. Efecto de la eliminación de Sos1 y Sos2 sobre la fosforilación de mTOR. (A) Cultivos subconfluentes de cada genotipo fueron privados de suero durante toda la noche, tratados una hora con DMSO o con Wortmanina 100nM, y estimulados después con 20% FBS durante 10 y 30 minutos. Los niveles de mTOR fosforilado en Ser-2448 y el nivel de expresión de β -tubulina en el lisado celular fueron detectados por Western blot con anticuerpos específicos. Se muestra un experimento representativo para cada línea *ko*. (B) Cuantificación del nivel de mTOR-Ser2448 usando la expresión de β -tubulina como control de carga. El ratio p-mTOR/ β -tubulina fue calculado para cada punto, tomando como referencia el tiempo 0 (Basal) tratado con DMSO para cada genotipo, al que se asignó arbitrariamente el valor 1. Los datos del diagrama de barras corresponden a la media \pm SEM en unidades arbitrarias (u.a.) de 9, 5 y 4 experimentos independientes procedentes de las líneas *wt*, *ko-Sos1* y *ko-Sos2*, respectivamente. *, $p < 0,05$ respecto al mismo tiempo con DMSO.

p70^{S6K}-Thr421/Ser424 y p70^{S6K}-Thr389: el estudio de la fosforilación de p70^{S6K} en estos dos residuos dio los siguientes resultados: por un lado, las líneas *ko-Sos2* mostraron un aumento de la fosforilación en Thr421/Ser424 (aplicando el ratio p-p70^{S6K}/ β -tubulina) tras 30 minutos de estimulación, estadísticamente significativo respecto a las líneas *wt* (**Figura 27-A y B**). En *ko-Sos1*, sin embargo, observamos una ligera disminución en la fosforilación de Thr421/Ser424, pero sin diferencias significativas. Por otra parte, como era de esperar según la teoría de que las MAPKs son responsables de la fosforilación de estos residuos, el tratamiento con wortmanina no afectó significativamente a la fosforilación en Thr421/Ser424, con la excepción de las líneas *ko-Sos2*, que tras 30 minutos de estimulación presentaron una disminución estadísticamente significativa respecto a *wt* (**Figura 27-A y B**). Finalmente, los Western blots realizados para averiguar el nivel de fosforilación de p70^{S6K}-Thr389 no mostraron grandes cambios, sin embargo, existe un ligero aumento a los 30 minutos en ambas líneas *ko* respecto a *wt* (**Figura 27-C**). El tratamiento con wortmanina inhibió considerablemente la fosforilación de este residuo, a diferencia del efecto sobre

Thr421/Ser424, donde la inhibición fue mucho más débil. Esto encaja con el hecho de que la fosforilación en Thr389 depende de la actividad de PI3K (**Figura 27-C**).

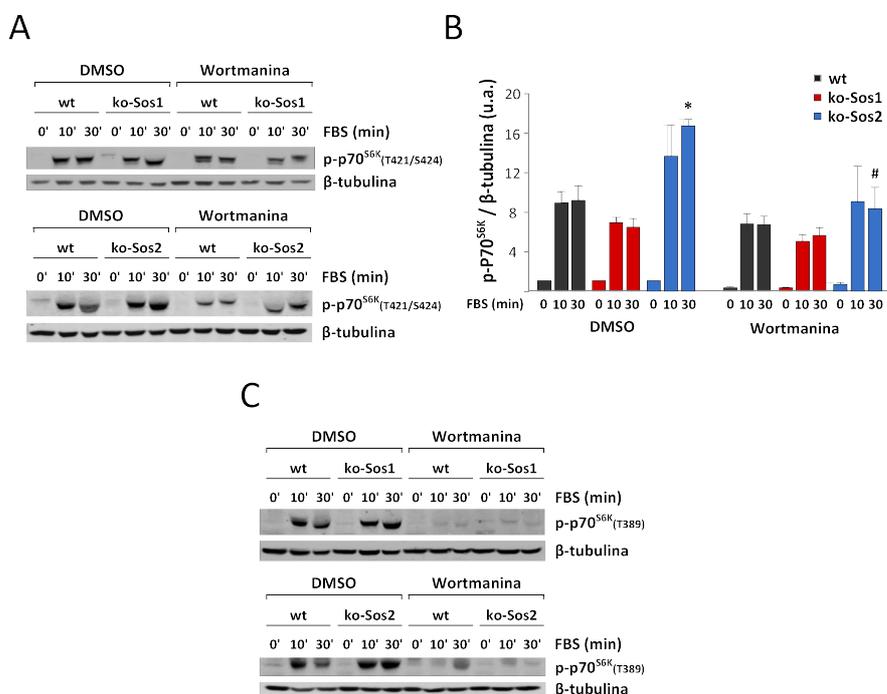


Figura 27. Efecto de la eliminación de Sos1 y Sos2 sobre la fosforilación de p70^{S6K}. (A) Cultivos subconfluentes de cada genotipo fueron privados de suero durante toda la noche, tratados una hora con DMSO o con Wortmanina 100nM, y estimulados después con 20% FBS durante 10 y 30 minutos. El nivel de p70^{S6K} fosforilado en Thr421/Ser424 y el nivel de expresión de β-tubulina en el lisado celular fueron detectados por Western blot con anticuerpos específicos. Se muestra un experimento representativo para cada línea *ko*. (B) Cuantificación del nivel de fosforilación de p70^{S6K} en Thr421/Ser424 usando la expresión de β-tubulina como control de carga. El ratio p-p70^{S6K}/β-tubulina fue calculado para cada punto, y el tiempo 0 (Basal) tratado con DMSO para cada genotipo fue utilizado como referencia, asignándole arbitrariamente el valor 1. Los datos del diagrama de barras corresponden a la media ± SEM en unidades arbitrarias (u.a.) de 10, 8 y 3 experimentos independientes procedentes de las líneas *wt*, *ko-Sos1* y *ko-Sos2*, respectivamente; *, $p < 0,05$ respecto a MEFs *wt*; #, $p < 0,05$ respecto al mismo tiempo con DMSO. (C) Nivel de fosforilación de p70^{S6K} en Thr389 en las mismas condiciones que en el apartado (A). Western blot representativo de 2 experimentos independientes con resultados similares.

2.3 Estudio del ciclo celular en fibroblastos *wt*, *ko-Sos1* y *ko-Sos2*

Dado que las líneas *ko-Sos1* y *ko-Sos2* presentan una menor tasa de crecimiento, y que las GTPasas Ras regulan la progresión del ciclo celular a través de sus rutas efectoras Ras/ERK y PI3K-Akt (Gille and Downward, 1999; Taylor and Shalloway, 1996), decidimos analizar el perfil del ciclo celular por citometría de flujo. La distribución de las poblaciones celulares a lo largo de las fases del ciclo se puede cuantificar mediante la tinción con IP. Para ello, utilizamos cultivos en crecimiento exponencial procedentes de los 3 genotipos. Los resultados obtenidos mediante esta aproximación revelaron que los fibroblastos *ko-Sos2* poseen un mayor porcentaje de células en la fase G1 en comparación con *ko-Sos1* y *wt*. Sin em-

bargo, tal y como se aprecia en la figura (**Figura 28-A y B**), los perfiles de los fibroblastos *wt* y *ko-Sos1* mostraron una distribución similar.

Las ciclinas tipo D son importantes reguladores de la progresión de la fase G1 del ciclo celular. Esta regulación la llevan a cabo mediante su interacción con CDK4/6, encargadas de fosforilar e inactivar a RB (inhibidora de la transición G1-S del ciclo celular) (Lee and Yang, 2003; Peeper et al., 1997; Pruitt and Der, 2001). Como explicamos en la introducción, la señalización a través de las rutas efectoras de Ras, PI3K/Akt y Ras/ERK, induce la expresión de este tipo de ciclinas (Lavoie et al., 1996; Takuwa et al., 1999; Torii et al., 2006). Por este motivo, quisimos determinar el nivel de expresión de las ciclinas *Ccnd1* y *Ccnd2* en las líneas celulares utilizadas en el análisis del ciclo celular (**Figura 28-C**). De esta manera pudimos comprobar una clara disminución de la expresión de *Ccnd1* y *Ccnd2* en los fibroblastos *ko-Sos1* respecto a fibroblastos *wt*, mientras que sólo la *Ccnd1* disminuyó en células *ko-Sos2*. La expresión de β -tubulina fue utilizada como control de carga (**Figura 28-C**).

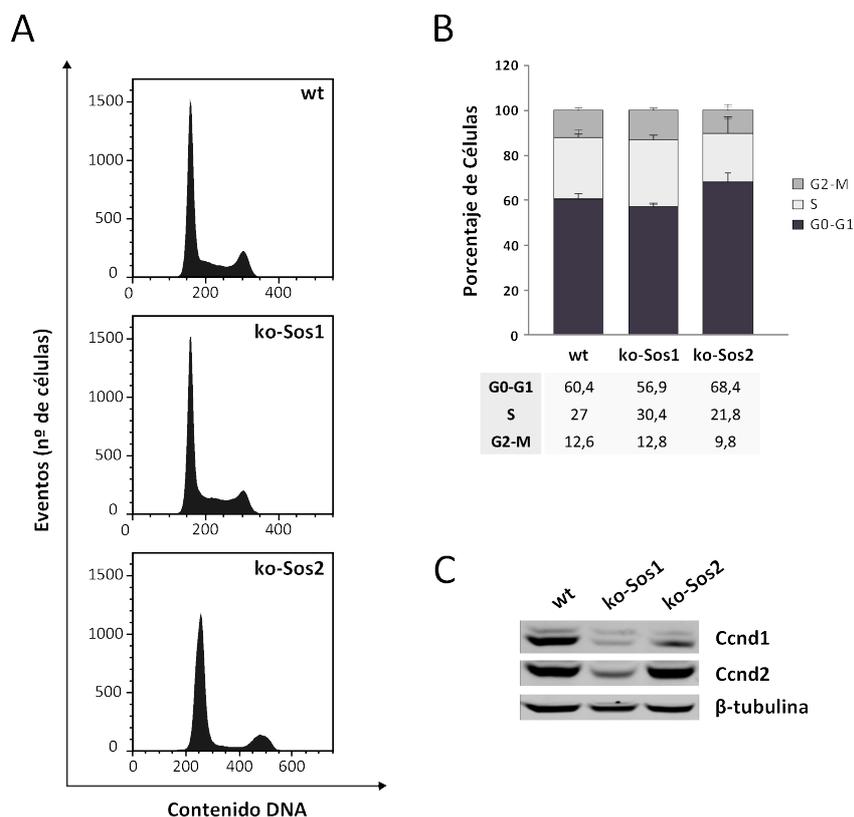


Figura 28. Análisis del ciclo celular de MEFs *wt*, *ko-Sos1* y *ko-Sos2*. (A) Perfiles representativos del ciclo celular de fibroblastos *wt*, *ko-Sos1* y *ko-Sos2* en crecimiento activo. El eje X corresponde a la intensidad de fluorescencia del yoduro de propidio incorporado, reflejando el contenido en DNA de la población celular. El eje Y representa el número de células analizadas. (B) Cuantificación de los resultados procedentes de 5 (*wt*), 5 (*ko-Sos1*), y 2 (*ko-Sos2*) experimentos independientes (cada uno con duplicados). El diagrama de barras representa la media + SEM del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular. La tabla inferior muestra los porcentajes medios de todos los experimentos. (C) Expresión de la ciclina D1 (*Ccnd1*), ciclina D2 (*Ccnd2*) y el control de carga β -tubulina en las líneas *wt*, *ko-Sos1* y *ko-Sos2* utilizadas para el análisis del ciclo celular.

Es importante mencionar que el estudio del ciclo celular no se realizó con la totalidad de líneas disponibles para cada genotipo. En experimentos preliminares que incluían todas las líneas descubrimos la existencia de poliploidías en algunas de ellas. Los perfiles de distribución extraídos de las líneas poliploides, concretamente tetraploides, impiden distinguir el porcentaje de células diploides en fase G2/M de las tetraploides en fase G1, pues contienen la misma cantidad de DNA. Finalmente, la batería de líneas celulares utilizadas se redujo a 2 líneas *wt*, una línea de *ko-Sos1* y una de *ko-Sos2*. Los Western blot de *Ccnd1* y *Ccnd2* (**Figura 28-C**) se llevaron a cabo con lisados de estas líneas, aunque también se realizaron para el resto de líneas y los resultados fueron similares en el caso de *ko-Sos1*, mientras que en el caso de *ko-Sos2* no se confirmó la disminución de *Ccnd1*.

2.4 Estudio de la muerte celular inducida por tBHP en líneas *wt*, *ko-Sos1* y *ko-Sos2*

Algunos de los grupos enriquecidos en el análisis funcional de los microarrays indicaban alteraciones en la respuesta a estrés y la muerte celular (**Figuras 20 y 21**). Varios genes pro-apoptóticos anotados a estas funciones estaban reprimidos (*Trp53inp1*, *Phlda3*, *Rnf130*, *Cdkn1a*), y otros sobreexpresados (*Eaf2*, *Cadm1*) (**Tabla 8**). Las rutas de señalización reguladas por Ras promueven la proliferación y la supervivencia celular (Duronio, 2008), de hecho, estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que la expresión de N-ras regula negativamente la muerte celular por apoptosis, a través de la señalización de ERK y p38 (Castellano et al., 2009). Sin embargo, en determinadas circunstancias y dependiendo del estímulo y el tipo celular, la estimulación aberrante de estas rutas efectoras puede mediar diferentes tipos de muerte celular (Cagnol and Chambard, 2010). Por ejemplo, cambios en la duración e intensidad de la activación de ERK, así como en su localización subcelular determinan la respuesta de supervivencia o muerte (Cagnol and Chambard, 2010).

Por tanto, con el objeto de averiguar si la ausencia de *Sos1* o *Sos2* tiene un efecto estimulador o protector frente a la muerte inducida en condiciones de estrés, decidimos evaluar la viabilidad celular (por incorporación de 7-AAD) tras el tratamiento con el agente oxidante hidróperóxido de terbutilo o tBHP. Para ello, cultivos subconfluentes de cada genotipo fueron tratados con tBHP 100 μ M durante 2 horas, tras las cuales el tratamiento fue retirado y sustituido por medio de cultivo fresco. Aproximadamente 20-22 horas después, las células tratadas con tBHP y los controles sin tratar fueron marcadas con 7-AAD y Anexina V, y posteriormente analizadas por citometría de flujo.

Los resultados revelaron que las líneas *ko-Sos1* eran significativamente más resistentes a la muerte celular inducida por tBHP que las líneas *wt* y *ko-Sos2*. Sin embargo, no encontramos diferencias en la proporción de células positivas para Anexina V (**Figura 29**). Es necesario señalar, que los datos de Anexina V recogidos 20 horas después del tratamiento deben ser interpretados con cautela, teniendo en cuenta que este marcaje identifica una fase temprana-intermedia del proceso apoptótico. Por tanto, suponiendo que las células

murieran por apoptosis tras el tratamiento con tBHP (aunque la duración del proceso apoptótico varía en función del tipo celular), es posible que perdiéramos parte de las células positivas en tiempos anteriores, donde podrían detectarse diferencias; Sin embargo, no fuimos capaces de detectar fragmentación de DNA ni caspasa 3 activada en ninguna de las muestras, dos eventos tardíos en el proceso apoptótico (datos no mostrados). Estos datos apuntan a la posibilidad de que el tratamiento con tBHP en nuestro modelo celular induzca apoptosis sólo en una pequeña proporción de la población, y que el resto sufra otro tipo de muerte, como la muerte celular por necrosis. De hecho, varios trabajos demuestran que el tratamiento con tBHP puede inducir tanto apoptosis como necrosis, dependiendo principalmente del tipo celular y también de la concentración y el tiempo de exposición al tBHP (Long et al., 2004; Piret et al., 2004; Sardao et al., 2007). De cualquier modo, estos experimentos muestran que la muerte celular inducida tras el tratamiento con tBHP es significativamente menor en fibroblastos *ko-Sos1* respecto a fibroblastos *wt* y *ko-Sos2*.

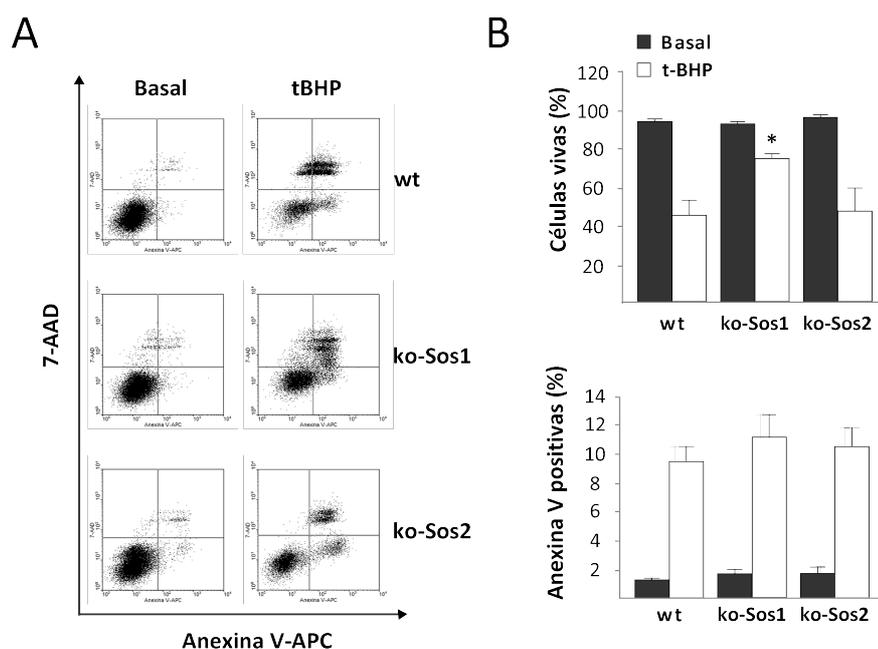


Figura 29. Muerte celular inducida por tBHP en MEFs *wt*, *ko-Sos1* y *ko-Sos2*. Cultivos subconfluentes de cada genotipo fueron tratados con tBHP 100 μ M durante 2 horas, tras las cuales se reemplazó el tratamiento por medio fresco. 20-22 horas después las células fueron marcadas con anexina V + 7-AAD y analizadas por FACS. **(A)** Dotplots representativos mostrando las poblaciones celulares marcadas con anexina V-APC (eje X) y 7-AAD (eje Y) de muestras sin tratar (Basal) y tratadas con tBHP para cada genotipo. **(B)** Cuantificación del porcentaje de viabilidad celular correspondiente a las células negativas para ambos marcadores (diagrama de barras superior), y del porcentaje de células positivas sólo para AnexV (diagrama de barras inferior). Ambas gráficas representan la media + SEM de 9, 8, y 4 experimentos independientes procedentes de líneas *wt*, *ko-Sos1* y *ko-Sos2*, respectivamente. *, p < 0,05 respecto a MEFs *wt* y *ko-Sos2*.

3. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE SOS1 Y SOS2 MEDIANTE SILENCIAMIENTO ESTABLE DE SU EXPRESIÓN EN FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS DE RATÓN.

Comparativa con los resultados anteriores en modelos knockout

La inmortalización de fibroblastos embrionarios es una estrategia ampliamente utilizada, especialmente útil desde el hallazgo de los modelos *knockout*. En los dos capítulos anteriores hemos utilizado como modelo líneas inmortalizadas de fibroblastos embrionarios *ko* para *Sos1* y *Sos2*. La caracterización del fenotipo de estas líneas nos ha proporcionado información sobre el papel de las proteínas *Sos* en importantes procesos celulares, sin embargo, en algunos casos los datos son contradictorios y difíciles de interpretar. Teniendo en cuenta que el proceso de inmortalización fue posterior a la ausencia de dichas proteínas en la célula, los cambios ocurridos en dicho proceso pueden modificar parte del fenotipo, dificultando la distinción entre alteraciones debidas exclusivamente a la ausencia de *Sos* de aquellas producidas por mecanismos de compensación secundarios. Durante los últimos años, la delección de un gen mediante estrategias de recombinación genética, o el silenciamiento del mismo mediante técnicas de RNA de interferencia han llegado a constituir una herramienta prácticamente indispensable en el estudio de la función génica. Por estos motivos, y con el objetivo de contrastar y confirmar los resultados obtenidos hasta ahora, decidimos analizar la función de las proteínas *Sos* en fibroblastos inhibiendo su expresión mediante interferencia estable con shRNA. Esta estrategia nos permite estudiar los efectos primarios de la ausencia de *Sos1* y *Sos2*, aunque a diferencia de las líneas *ko*, la inhibición de la proteína no es total.

3.1 Generación de clones con inhibición estable: *shSos1* y *shSos2*

La generación de clones con silenciamiento estable de *Sos1* y *Sos2* fue realizada a partir de las líneas MEFs *wt* utilizadas en el capítulo anterior, con el objetivo de mantener un fondo genético homogéneo. Para la inhibición estable de la expresión de las proteínas *Sos* infectamos cultivos de líneas *wt* con partículas lentivirales portadoras de construcciones de shRNA dirigidas específicamente contra los transcritos de cada uno de los loci. Asimismo, las células fueron infectadas con la construcción de shRNA control (*non-targeting control*), que contiene una secuencia capaz de disparar la actividad de 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. Tras la infección, se generaron clones procedentes de una sola célula (con una integración única de la construcción shRNA en el genoma celular), cuyo grado de silenciamiento de *Sos1* o *Sos2* fue evaluado por Western blot. Tras comprobar la eficacia de estos clones, seleccionamos los dos mejores de cada construcción (*shSos1*, *shSos2* y *shControl*). Por último, señalar que los mejores clones en el silenciamiento de *Sos1* y *Sos2* proceden de líneas *wt* diferentes, por lo que el material

de trabajo consistió finalmente en: dos clones de *shSos1* y *shControl* procedentes de una línea celular, y dos clones de *shSos2* y *shControl* de otra línea (todas MEFs).

En la **Figura 30** se puede comprobar el grado de silenciamiento de Sos1 y Sos2 respecto a los niveles de mRNA (**Figura 30-A**) y a la cantidad de proteína (**Figura 30-B**), en las líneas *shSos1* y *shSos2* comparado con los clones *shControl*. Los resultados mostrados en este capítulo generalmente representan una media de los dos clones *knockdown* distintos (#1 y #2) para cada proteína Sos, salvo en el estudio de los reguladores del ciclo celular y los ensayos para la detección del ROS intracelular y del potencial de membrana mitocondrial, que se realizaron con el clon que presentaba mayor silenciamiento para cada proteína.

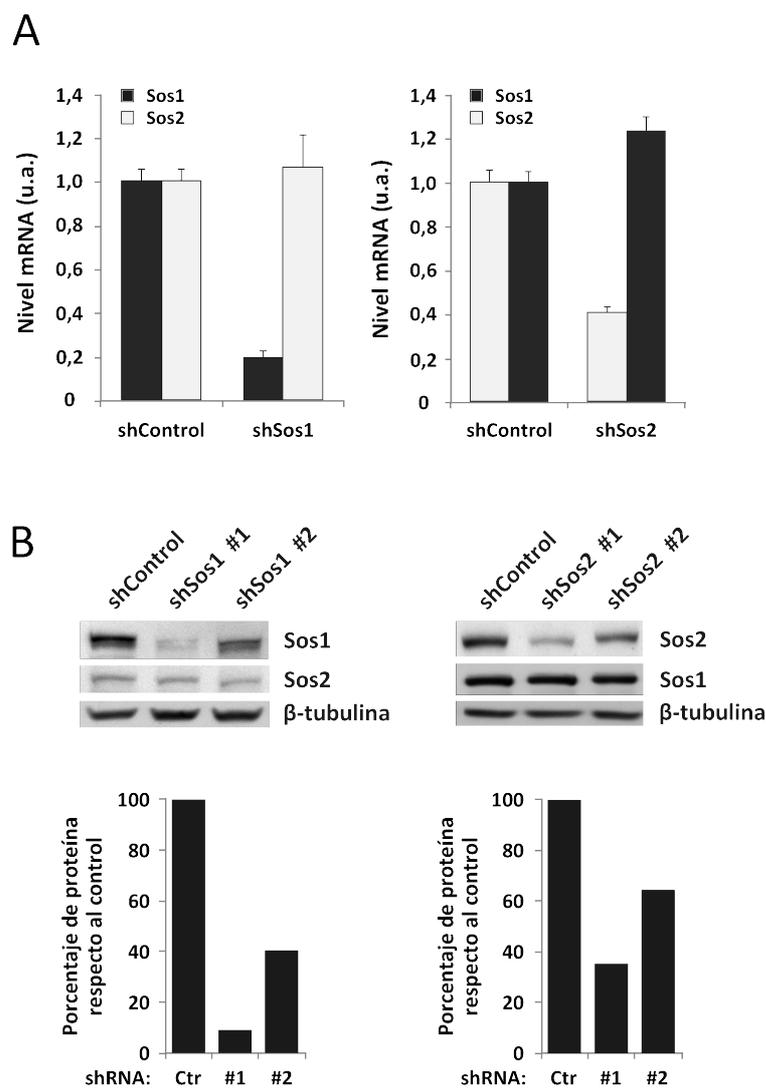


Figura 30. Silenciamiento de Sos1 y Sos2 en fibroblastos embrionarios mediante interferencia estable con shRNA. (A) La inhibición de Sos1 y Sos2 a nivel de mRNA fue analizada mediante PCR cuantitativa. Los diagramas de barras representan el nivel de mRNA de Sos1 y Sos2 en los clones *shSos1* (izquierda) y *shSos2* (derecha) respecto a células *shControl* (considerado valor 1). (B) La disminución de la expresión proteica de Sos1 y Sos2 fue comprobada por Western blot (paneles superiores) y cuantificada con el software ImageJ (gráficas inferiores). Se analizaron dos clones diferentes de *shSos1* y *shSos2*.

3.2 Confirmación de los cambios transcripcionales observados en las líneas *ko-Sos1* y *ko-Sos2*

Una vez seleccionados los clones con mayor silenciamiento de *Sos1* y *Sos2* quisimos comprobar si los cambios de expresión observados con los microarrays se reproducían al inhibir la expresión de *Sos1* o *Sos2* mediante RNA de interferencia. Teniendo en cuenta las diferencias entre ambos modelos, escogimos un grupo de genes con cambios de expresión grandes, pues éstos serían detectados más fácilmente si son una consecuencia directa de la eliminación de *Sos1* o *Sos2*. Por el contrario, si esos cambios son una consecuencia secundaria de la immortalización de los MEFs es posible que no se confirmen.

Seleccionamos 8 genes diferencialmente expresados en cada contraste analizado (*ko-Sos1* vs *Control* y *ko-Sos2* vs *Control*). La expresión de dichos genes en los clones *shSos1* y *shSos2* se analizó mediante PCR cuantitativa (**Figura 31**), y los resultados se compararon con los datos obtenidos para los mismos genes, también por PCR cuantitativa, en fibroblastos *ko-Sos1* y *ko-Sos2*. Los resultados confirmaron la represión de *Igfbp6*, o el aumento de *Foxf1a* y *Rps4y2* en fibroblastos deficientes en *Sos1*, y la disminución de *Crlf1* o el aumento de

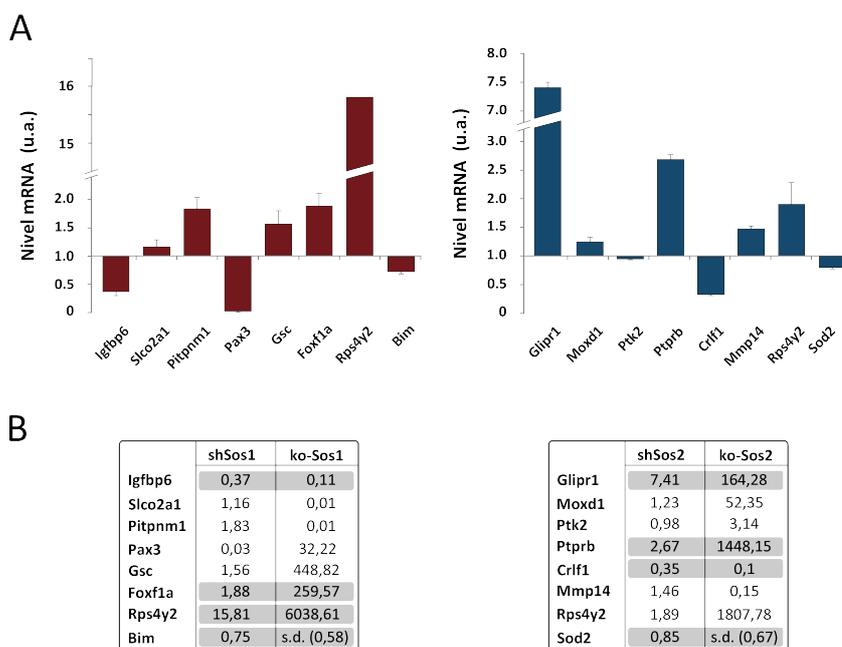


Figura 31. Confirmación de los cambios de expresión observados en líneas *ko-Sos1* y *ko-Sos2* en clones *shSos1* y *shSos2*. (A) El nivel de expresión de genes con cambios significativos en las líneas *ko-Sos1* y *ko-Sos2* fue comprobado por PCR cuantitativa en muestras procedentes de los clones *shSos1*, *shSos2* y sus respectivos controles *shControl*. Los diagramas de barras representan el cambio en el nivel de mRNA (en unidades arbitrarias, u.a.) de clones *shSos1* (izquierda) o *shSos2* (derecha) respecto a sus clones *shControl* (al que se asignó valor 1), procedentes de 2 experimentos independientes. (B) Las tablas inferiores muestran la comparativa del nivel de cambio obtenido para cada gen mediante PCR cuantitativa, en ambos modelos celulares: MEFs *ko* y clones *shRNA*. Se puede observar que los cambios de expresión de algunos genes coinciden en ambos modelos (sombreado gris), mientras que otros cambios no se confirman. (s.d: sin dato)

Glipr1 y *Ptprb*, entre otros, en células deficientes en *Sos2*. Sin embargo, el aumento de *Pax3* o la disminución de *Pitpnm1* y *Slco2a1* no se confirman en clones *shSos1*, y el aumento de *Ptk2* o la disminución de *Mmp14* tampoco se validan en células *shSos2*. En conjunto, más de la mitad de los genes examinados se confirman en ambos modelos.

3.3 Efecto del silenciamiento estable de *Sos1* y *Sos2* en la activación de Ras y sus rutas efectoras

Los resultados obtenidos anteriormente en la señalización mediada por Ras utilizando los fibroblastos *ko-Sos1* y *ko-Sos2* fueron en cierto modo, inesperados, pues no encontramos diferencias significativas en la activación de Ras (aunque se observa una tendencia a menor activación en las líneas *ko-Sos1*), pero sí en la activación de sus efectores. Para comprobar estos resultados en los clones *shSos1* y *shSos2* realizamos experimentos de estimulación con suero a distintos tiempos, similares a los que presentamos en el capítulo anterior.

3.3.1 Activación de Ras en clones *shSos1* y *shSos2*

Para poder comparar estos resultados con los datos de señalización anteriores decidimos comenzar los experimentos estimulando nuevamente con FBS. Para ello, cultivos subconfluentes de los clones *shSos1*, *shSos2* y sus respectivos controles fueron privados de suero 4 horas, y posteriormente estimulados con 20% FBS durante 5, 10 y 30 minutos. Incluimos el tiempo de 5 minutos ante la posibilidad de que existieran diferencias en la activación de Ras a tiempos muy cortos que no pudimos detectar en los experimentos anteriores. Si bien, datos previos de nuestro grupo mostraban que no existen diferencias en la activación de Ras tras 5 minutos de estimulación con EGF en líneas *ko-Sos1* respecto a *wt* (Qian et al., 2000).

Como detallamos en el capítulo anterior, la activación de Ras fue determinada mediante ensayos de *pull down* y posterior cuantificación de la cantidad de Ras-GTP y Ras total por Western blot. Los datos están representados tomando como referencia el tiempo 0 (Basal) al que se asignó el valor 1, que corresponde a la condición de privación de suero. A diferencia de los resultados anteriores (**Figura 23-A**), el silenciamiento de *Sos1* con shRNA disminuye significativamente la activación de Ras tras 10 y 30 minutos de estimulación con FBS, mientras que el silenciamiento de *Sos2* en las mismas condiciones no parece afectar a la activación de Ras de forma significativa (**Figura 32**, página siguiente).

3.3.2 Activación de ERK1/2 y Akt en clones *shSos1* y *shSos2*

A continuación, manteniendo el mismo diseño experimental, analizamos el nivel de fosforilación de ERK1/2 en Tyr204 (**Figura 33**) y de Akt en Ser473 (**Figura 34**) en las líneas *shSos1*, *shSos2* y en sus respectivas líneas *shControl*. Los resultados de estos experimentos mostraron que no existen cambios significativos en la fosforilación de ERK1/2 en los clones si-

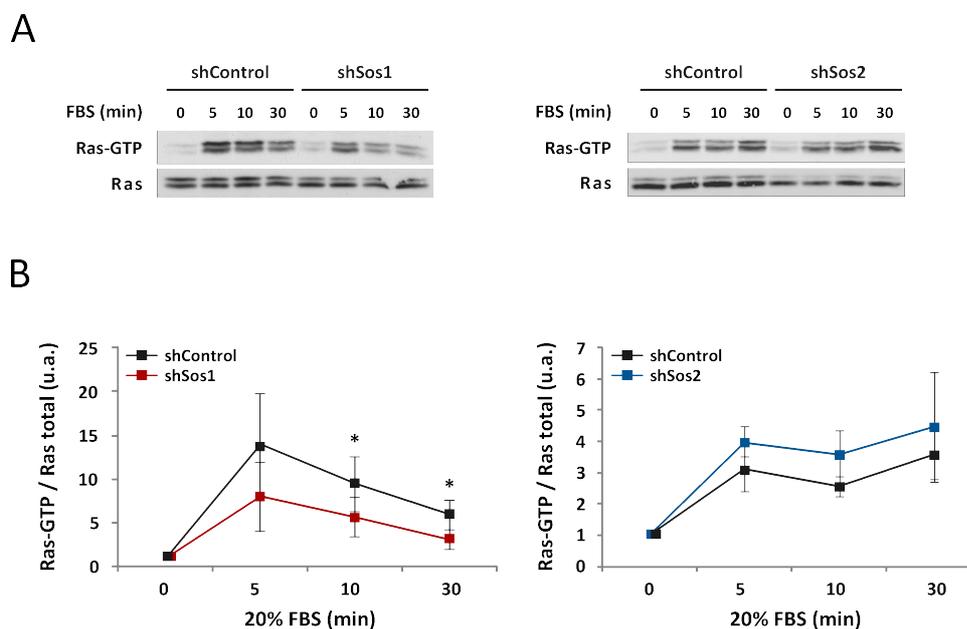


Figura 32. Activación de Ras en células *shSos1* y *shSos2*. Cultivos subconfluentes de fibroblastos *shSos1*, *shSos2* y sus respectivos *shControl* fueron privados de suero durante 4 horas y estimulados después con 20% FBS durante los tiempos indicados. **(A)** La medida de la activación de Ras se realizó mediante ensayos de *pull-down* seguidos de Western blot. Se muestra un experimento representativo de la activación de Ras en células *shSos1* (izquierda) y *shSos2* (derecha) respecto a sus controles. **(B)** La cantidad de Ras-GTP en cada punto de tiempo fue normalizada respecto a la cantidad de Ras total presente en los lisados celulares. Los resultados se expresaron tomando como referencia el tiempo 0 (Basal) al que se asignó arbitrariamente el valor 1. Los valores de las gráficas corresponden a la media \pm SEM en unidades arbitrarias (u.a.) de al menos 3 experimentos independientes. *, $p < 0,05$ en la comparación con *shControl* (t-test).

lenciados *shSos1* o *shSos2* respecto a sus respectivos controles (**Figura 33**, pág. siguiente). No obstante, en los clones *shSos2* la tendencia parece inclinarse hacia un ligero aumento de la fosforilación (coincidiendo con los datos de las líneas *ko-Sos2*, **Figura 23-C**).

Por otra parte, pudimos comprobar que el aumento en la fosforilación de Akt coincidía con los datos obtenidos en fibroblastos *ko-Sos1*. Sin embargo, esto no ocurría en los clones *shSos2* cuyos resultados no presentaban diferencias significativas cuando eran comparados con sus controles (**Figura 34**, pág. 98). En conjunto, los resultados obtenidos en ambos modelos indican que la ausencia de las proteínas Sos, al contrario de lo que cabría esperar, provoca un aumento en la señalización efectora de Ras, especialmente en la ruta PI3K/Akt

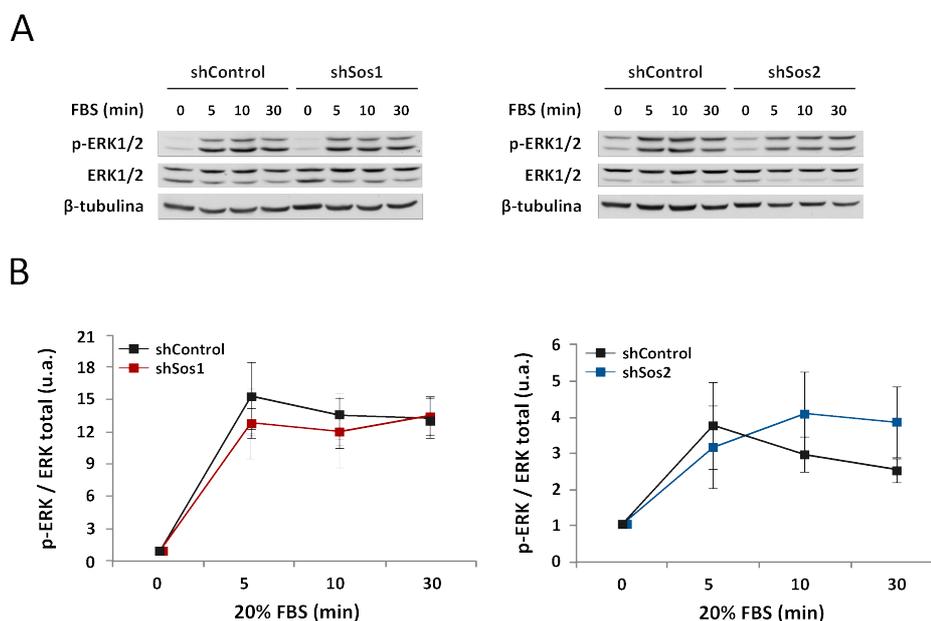


Figura 33. Fosforilación de ERK1/2 en células *shSos1* y *shSos2*. Cultivos subconfluentes de fibroblastos *shSos1*, *shSos2* y sus respectivos clones *shControl* fueron privados de suero durante 4 horas y estimulados después con 20% FBS durante los tiempos indicados. **(A)** Western blot representativos mostrando el nivel de fosforilación de ERK1/2 en clones *shSos1* (izquierda) y *shSos2* (derecha) respecto a sus controles. Los Western blot se realizaron utilizando anticuerpos específicos para ERK1/2 total y ERK1/2 fosforilado en Tyr204. **(B)** Cuantificación del nivel de fosforilación de ERK1/2. La cantidad de p-ERK1/2 (Tyr204) detectada en cada punto de tiempo fue normalizada respecto a la cantidad de ERK1/2 total presente en los lisados celulares. Los resultados se expresaron tomando como referencia el tiempo 0 (Basal) al que se asignó arbitrariamente el valor 1. Los valores de las gráficas corresponden a la media \pm SEM en unidades arbitrarias (u.a.) de al menos 3 experimentos independientes. No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tiempos estudiados (t-test).

3.3.3 Efecto del silenciamiento de *Sos1* y *Sos2* sobre la fosforilación de GSK3 β y p70^{S6K} tras la estimulación con FBS, PDGF y EGF

Continuando en la línea de los experimentos realizados en el capítulo anterior, y teniendo en cuenta la coincidencia de los resultados obtenidos hasta el momento (el aumento de p-Akt en células deficientes en *Sos1*, y el posible aumento de p-ERK1/2 en ausencia de *Sos2*), decidimos examinar algunos de los efectores de estas quinasas. En concreto, para poder comparar con los resultados previos, examinamos el nivel de fosforilación de GSK3 β en Ser9 (p-GSK3 β) y de p70^{S6K} en Thr421/Ser424 (p-p70^{S6K}-S424).

Como esperábamos, los clones *shSos1* presentaron niveles de p-GSK3 β mayores que en células *shControl*, incluso en condiciones basales (ausencia de suero), mientras que el nivel de fosforilación en p70^{S6K}-S424 no presentó ningún cambio (**Figura 35-A, panel izquierdo**). Adicionalmente, de acuerdo con los datos hallados para Akt en los clones *shSos2*, el nivel

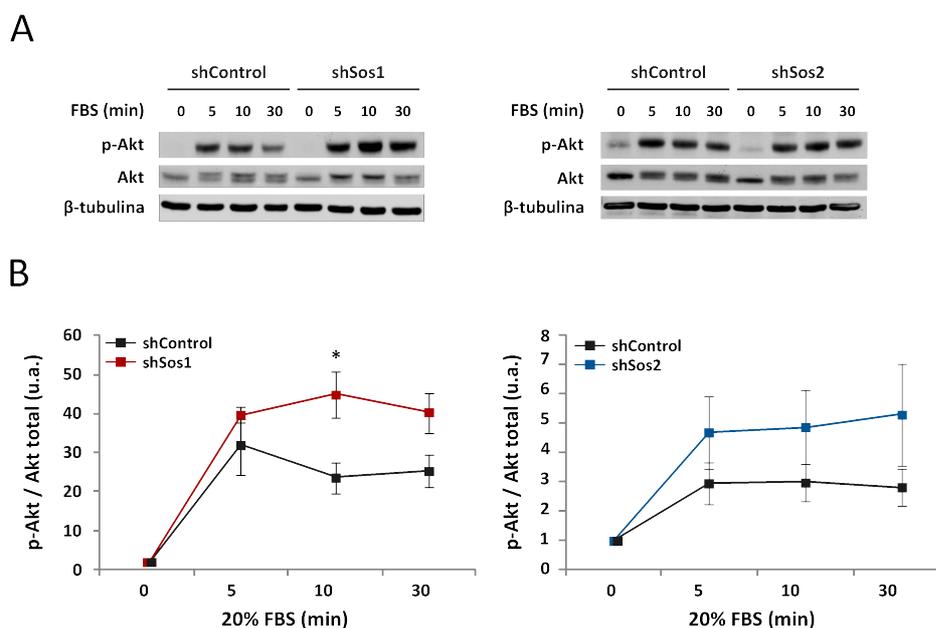


Figura 34. Fosforilación de Akt en células *shSos1* y *shSos2*. Cultivos subconfluentes de fibroblastos *shSos1*, *shSos2* y sus respectivos clones *shControl* fueron privados de suero durante 4 horas y estimulados después con 20% FBS durante los tiempos indicados. **(A)** Western blot representativos mostrando el nivel de fosforilación de Akt en clones *shSos1* (izquierda) y *shSos2* (derecha) respecto a sus respectivos controles. Los Western blot se realizaron utilizando anticuerpos específicos para Akt total y Akt fosforilado en Ser473. **(B)** Cuantificación del nivel de fosforilación de Akt. La cantidad de p-Akt (Ser473) detectada en cada punto de tiempo fue normalizada respecto a la cantidad de Akt total presente en los lisados celulares. Los resultados se expresaron tomando como referencia el tiempo 0 (Basal) al que se asignó arbitrariamente el valor 1. Los valores de las gráficas corresponden a la media \pm SEM en unidades arbitrarias (u.a.) de al menos 3 experimentos independientes. *, $p < 0,05$ en la comparación con *shControl* (t-test).

de p-GSK3 β no presentó cambios respecto a células *shControl*, y la fosforilación de p70^{S6K}-S424 mostró un ligero aumento principalmente a 30 minutos (**Figura 35-A, panel derecho**), coincidiendo con los resultados anteriores de las líneas *ko* (**Figuras 25 y 27**).

El FBS es una combinación compleja de factores de crecimiento, hormonas, citoquinas, etc, que estimulan diversos receptores y desencadenan la activación de múltiples rutas de señalización, cuyo efecto neto puede ser difícil de evaluar. Por este motivo, decidimos estimular con factores de crecimiento específicos, y analizar la fosforilación de los efectores de Ras estudiados hasta ahora. La estimulación con FBS en clones *shSos1*, pero no en *shSos2*, mostró cambios significativos en la ruta de PI3K/Akt, por lo que decidimos realizar estos experimentos en dichos clones.

Para ello, realizamos experimentos de estimulación con EGF (50ng/ml) y PDGF (50ng/ml) durante 5, 10 y 30 minutos, después de 4 horas privadas de suero (**Figura 36-A y B**). Tras la estimulación con PDGF, observamos que efectivamente, existía un claro aumento de la

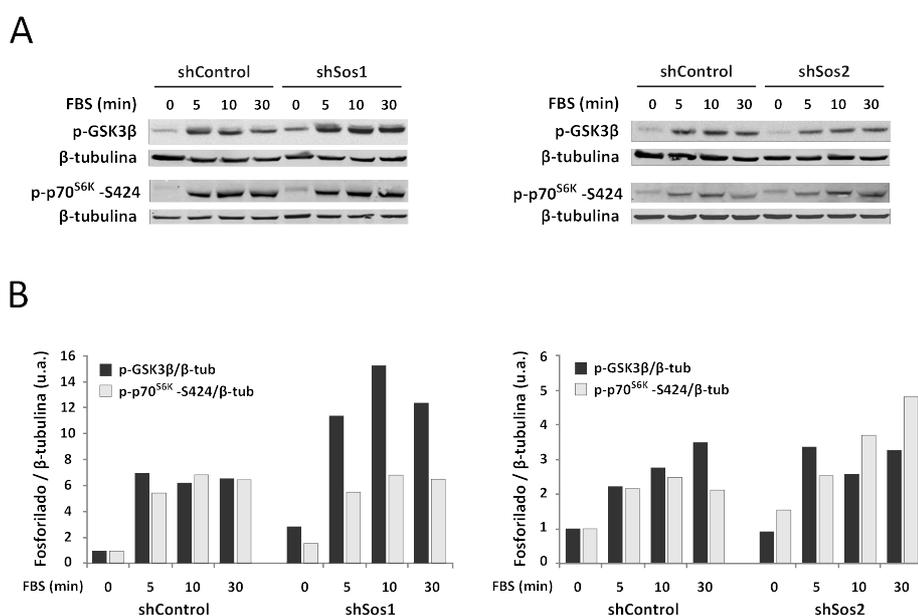


Figura 35. Fosforilación de los efectores GSK3 β y p70^{S6K} en fibroblastos *shSos1* y *shSos2* tras la estimulación con FBS. Cultivos subconfluentes de fibroblastos *shSos1*, *shSos2* y sus respectivos clones *shControl* fueron privados de suero durante 4 horas y estimulados después con 20% FBS durante los tiempos indicados. **(A)** Western blot representativos mostrando el nivel de fosforilación de GSK3 β (Ser9) y p70^{S6K} (Thr421/Ser424) tras la estimulación con 20% FBS en clones *shSos1* (izquierda) y *shSos2* (derecha) respecto a sus controles. **(B)** Los diagramas de barras corresponden a la cantidad de proteína fosforilada (GSK3 β y p70^{S6K}) normalizada respecto a los niveles de β -tubulina y en unidades arbitrarias (u.a.). Se representan los valores obtenidos en un experimento representativo (n=2 con resultados similares).

fosforilación de Akt, GSK3 β , y p70^{S6K}-Thr389 en células *shSos1*. Sin embargo, no detectamos grandes diferencias en la fosforilación de ERK1/2 y p70^{S6K}-S424 en estas mismas condiciones (**Figura 36-A**). Asimismo, la estimulación con EGF de los clones *shSos1* y *shControl* resultó en niveles de fosforilación similares para ERK1/2 y p70^{S6K}-S424, aunque en la mayoría de los casos (para ambos factores EGF y PDGF) detectamos un ligero aumento de p-ERK1/2 en células *shSos1* respecto a *shControl* (**Figura 36-B**). Curiosamente, la estimulación con EGF en este tipo celular no provocó la fosforilación de Akt en Ser473, obteniéndose niveles de p-Akt apenas detectables. A pesar de ello, encontramos un aumento en los niveles de fosforilación de GSK3 β y p70^{S6K}-Thr389 en clones *shSos1*, indicando que en estas células, otras quinasas diferentes a Akt deben estar fosforilando estas proteínas tras la estimulación con EGF (**Figura 36-B**).

Cabe resaltar además, que incluso en condiciones basales (sin estimulación con factores de crecimiento), el nivel de fosforilación de proteínas como GSK3 β y p70^{S6K}-Thr389 en células *shSos1*, alcanza niveles comparables a los observados en células *shControl* tras ser estimuladas (**Figura 36**). Esto sugiere que la inhibición de Sos1 podría generar un desequilibrio en la fosforilación de estas proteínas. En conjunto, estos datos indican que la ausencia

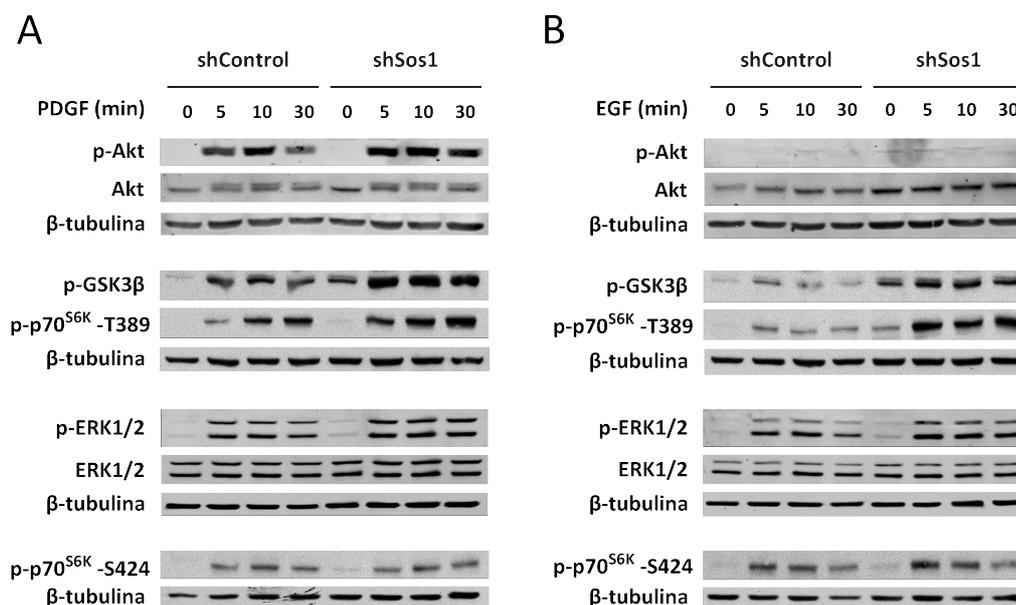


Figura 36. Fosforilación de Akt, ERK1/2, GSK3β y p70^{S6K} en fibroblastos *shSos1* y *shControl* tras la estimulación con PDGF y EGF. Cultivos subconfluentes de fibroblastos *shSos1* y *shControl* fueron privados de suero durante 4 horas y estimulados después con PDGF (50ng/mL) (A) y EGF (50ng/mL) (B) durante los tiempos indicados. Se muestran los Western blot representativos de los niveles de fosforilación de Akt (Ser473), GSK3β (Ser9), ERK1/2 (Tyr204) y p70^{S6K} (Ser421/Thr424 y Thr389) en las condiciones descritas (n=2 con resultados similares).

de *Sos1*, pese a inducir una menor activación de Ras, resulta en un aumento de la fosforilación de muchos de sus efectores, tales como Akt, GSK3β y p70^{S6K}-T389, e incluso levemente, ERK1/2. Este último dato se intuye especialmente en los experimentos de estimulación con los factores de crecimiento EGF y PDGF, que generan un contexto de transducción de señales más limpio y definido que la estimulación con suero.

3.4 Análisis de la capacidad proliferativa en clones *shSos1* y *shSos2*

El estudio de la activación de Ras y sus efectores realizado en las líneas deficientes en *Sos1* de ambos modelos, ha mostrado una mayor fosforilación de estas proteínas en muchos de los casos. La activación de dichas proteínas regula positivamente la proliferación celular, y sin embargo, los resultados obtenidos con las líneas ko revelaron un menor crecimiento respecto a las líneas *wt*. Con el propósito de resolver esta contradicción utilizamos este modelo de inhibición interferente para un análisis alternativo.

3.4.1 Efecto del silenciamiento de *Sos1* y *Sos2* sobre la proliferación en cultivo

Los datos previos en las líneas *ko-Sos1* y *ko-Sos2* mostraban una tasa de crecimiento menor en comparación con sus controles *wt* (Figura 22, pág 81). Para comprobar si estos cambios

se repetían en los clones *shSos1* y *shSos2*, realizamos ensayos de proliferación midiendo la incorporación de MTT. Este ensayo permite estimar indirectamente la tasa de crecimiento basándose en la actividad mitocondrial de las células que están proliferando. Tras el análisis de los resultados comprobamos una clara reducción de la tasa de crecimiento en los clones *shSos1* respecto al *shControl* (Figura 37, gráfica izquierda), mientras que la diferencia proliferativa entre los clones *shSos2* y su *shControl* fue mucho más atenuada (Figura 37, gráfica derecha).

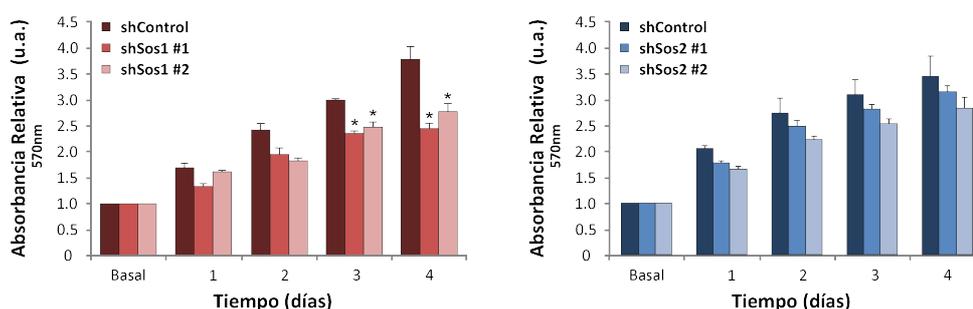


Figura 37. Medida de la proliferación celular en clones *shSos1* y *shSos2*. La medida de la tasa de proliferación se realizó mediante el ensayo de incorporación de MTT. Se sembraron cantidades diferentes de células (para que no alcanzasen la confluencia durante el ensayo) procedentes de 2 clones distintos de *shSos1* y *shSos2*, además de sus respectivos controles *shControl*. 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 12 horas después de la siembra (Basal). Los diagramas de barras representan la media \pm SD de la absorbancia relativa de cuadruplicados para cada punto temporal, en clones *shSos1* (izquierda) y *shSos2* (derecha).

3.4.2 Expresión de las ciclinas tipo D en clones *shSos1* y *shSos2*

Uno de los resultados más significativos asociado a los defectos en proliferación fue el hallazgo de la reducción de ciclinas tipo D en las líneas *ko* (Figura 28, pág 89). Las rutas de señalización mediadas por Ras estimulan la expresión de estas proteínas de varias formas; por un lado, ambas rutas Ras/ERK y PI3K/Akt inducen la síntesis de mRNA de estas ciclinas mediante la regulación de diversos factores de transcripción (Aktas et al., 1997; Lavoie et al., 1996; Schmidt et al., 2002; Takuwa et al., 1999). Por otra parte, estas rutas inducen la inhibición de proteínas encargadas de degradarlas (Diehl et al., 1998).

Para comprobar si la reducción en la tasa proliferativa observada en el ensayo MTT puede asociarse a una disminución de estas ciclinas (y confirmar así los resultados anteriores), decidimos analizar la expresión de las 3 ciclinas tipo D (*Ccnd1*, *Ccnd2* y *Ccnd3*) estudiando su nivel de mRNA y de proteína. Además, si las ciclinas D estuvieran reprimidas, la distinción entre defectos en la transcripción de las mismas o alteraciones en el control de su estabilidad proteica, nos proporcionaría pistas interesantes sobre los procesos afectados.

La expresión de los mRNAs de *Ccnd1*, *Ccnd2*, y *Ccnd3* fue determinada por PCR cuantitativa (**Figura 38-A**). Los resultados mostraron una disminución de más del 50% en la expresión de *Ccnd1* y *Ccnd2* en clones *shSos1*, y de *Ccnd2* en clones *shSos2*. Además, observamos una represión cercana al 30% en la expresión de *Ccnd1* en clones *shSos2* (**Figura 38-A**).

Por el contrario, la *Ccnd3* no presentó cambios en ninguno de los clones analizados. Los niveles proteicos de *Ccnd1* y *Ccnd2*, analizados por Western blot, presentaron una buena correlación con los datos de mRNA (**Figura 38-B**); en células con silenciamiento de *Sos1* observamos un descenso de *Ccnd1* y *Ccnd2*, mientras que el silenciamiento de *Sos2* afectó principalmente a la expresión de *Ccnd2*.

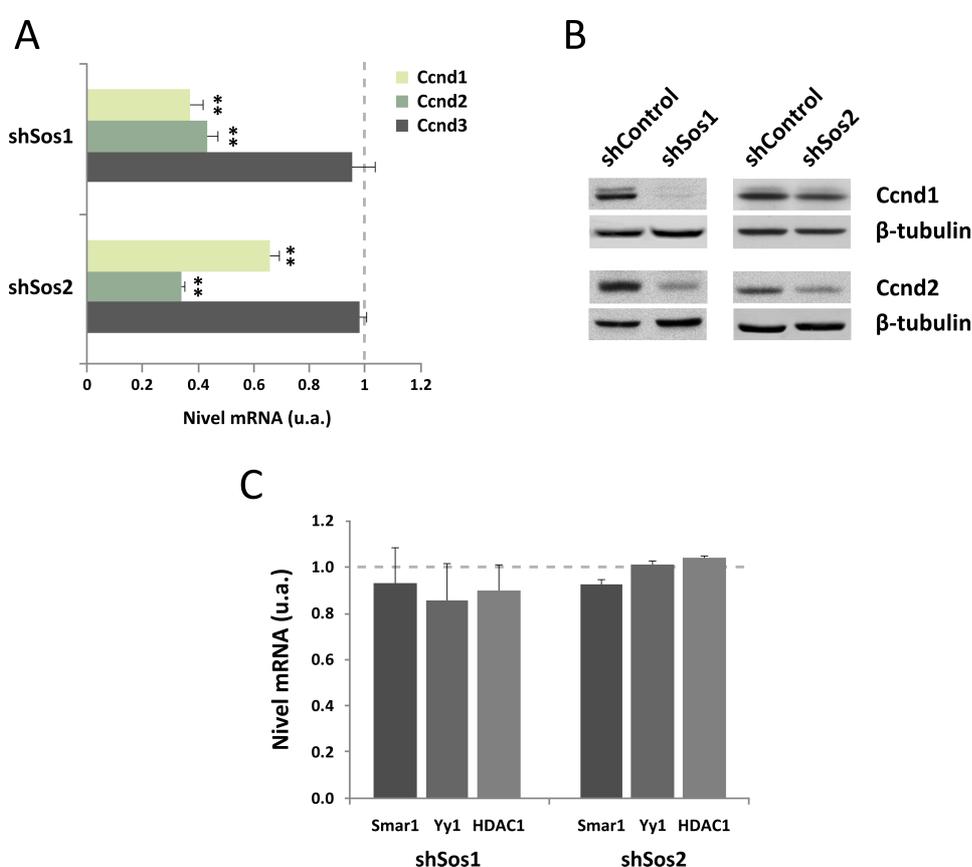


Figura 38. Nivel de expresión de ciclinas tipo D y de represores de la *Ccnd1* en clones *shSos1* y *shSos2*. (A) Determinación del mRNA de las ciclinas *Ccnd1*, *Ccnd2* y *Ccnd3* mediante PCR cuantitativa. El diagrama de barras representa la media \pm SD del nivel de mRNA en clones *shSos1* y *shSos2* respecto a sus respectivos clones *shControl* (considerado valor 1, línea gris discontinua) en unidades arbitrarias y procedentes de 2 experimentos independientes. Los datos obtenidos fueron normalizados respecto a la expresión de *Gapdh*. **, $p < 0,01$ respecto a *shControl* (t-test). (B) Expresión proteica de *Ccnd1* y *Ccnd2* en clones *shSos1*, *shSos2* y sus respectivos controles analizada por Western blot. La expresión de β -tubulina fue utilizada como control de carga. (C) Análisis de la expresión de los represores transcripcionales de *Ccnd1*: *Smar1*, *Yy1* y *Hdac1* mediante PCR cuantitativa. El diagrama de barras representa el nivel de mRNA en unidades arbitrarias tomando como referencia el valor en *shControl*, al que se asignó el valor 1 (línea gris discontinua). No se encontraron diferencias significativas (t-test).

Adicionalmente, con el objetivo de investigar posibles mecanismos implicados en la disminución de la transcripción de estas ciclinas (además de su regulación por las rutas mitogénicas Ras/ERK y PI3K/Akt), encontramos varias proteínas involucradas en la represión de las mismas. Exploramos el perfil de expresión diferencial obtenido con los microarrays y descubrimos que los genes *Banp/Smar1* (Btg3-associated nuclear protein), *Yy1* (Yin Yang 1 transcription factor) y *Hdac1* (Histone deacetylase 1) aumentaban moderadamente su expresión en las líneas *ko-Sos1*. *Smar1* reprime la transcripción de *Ccnd1* a través del reclutamiento de HDAC1 a su promotor (Malonia et al., 2011; Rampalli et al., 2005). De forma similar, el factor de transcripción *Yy1* también reprime la expresión de *Ccnd1* mediante su interacción con HDAC1 (Cicatiello et al., 2004; Malonia et al., 2011). Por tanto, quisimos confirmar el aumento de expresión de estos genes en los clones *shSos1* y *shSos2* analizando los niveles de mRNA por PCR cuantitativa. Al comparar la expresión de estos genes en células *shSos1*, *shSos2* y sus respectivos controles, ninguno de ellos mostró cambios significativos (**Figura 38-C**).

3.4.3 Análisis del ciclo celular en clones *shSos1* y *shSos2*

Hasta el momento, hemos comprobado que los fibroblastos deficientes en *Sos1* (en ambos modelos) presentan un retraso proliferativo y una disminución de las ciclinas tipo D: *Ccnd1* y *Ccnd2*. En los fibroblastos deficientes en *Sos2* hemos confirmado la reducción de *Ccnd2*, pero los datos de proliferación en ambos modelos no coinciden. Dado que la represión de estas ciclinas podría provocar alteraciones en la progresión G1-S del ciclo celular, decidimos examinar el perfil del ciclo en los clones *shSos1* y *shSos2*. Realizamos los experimentos siguiendo el mismo protocolo descrito en el capítulo anterior y en Materiales y Métodos. Efectivamente, tras el análisis de los datos encontramos una acumulación de células en la fase G0/G1 (un 15% aproximadamente) en los clones *shSos1*. Por el contrario, y en concordancia con los datos de proliferación, los clones *shSos2* presentaron un ciclo celular similar al del *shControl* (**Figura 39-A**).

La disminución de *Ccnd1* y *Ccnd2* podría estar provocando una reducción en la actividad de los complejos Ciclina-CDK, y por tanto, una menor fosforilación de RB. Para comprobarlo, examinamos el nivel de fosforilación de la misma en el residuo Ser780 (fosforilado por el complejo CDK4/6-Ciclina D). Además, en este contexto analizamos la expresión de proteínas clave en la progresión G1-S, tales como *CcnE* y *Pcna* (**Figura 39-B**). Empleamos el mismo diseño que en los experimentos de señalización (estimulando con FBS durante 5, 10 y 30 minutos), con el objetivo de facilitar una interpretación conjunta. Los resultados obtenidos mostraron un menor grado de fosforilación de RB (Ser780) en clones *shSos1*; en el Western blot de p-RB en células *shControl* se pueden observar dos bandas correspondientes a la proteína RB hiperfosforilada (por la actividad quinasa de los complejos CDK4/6-CcnD y CDK2-CcnE). Sin embargo, en células *shSos1* observamos una única banda, indicando un menor nivel de fosforilación (**Figura 39-B**). Asimismo, la expresión de la proteína *Pcna*, un

marcador de entrada en fase S (expresado principalmente en la fase de replicación del DNA) (Moldovan et al., 2007), era claramente menor en clones *shSos1*. Por último, la expresión de CcnE también parecía estar ligeramente reducida (**Figura 39-B**).

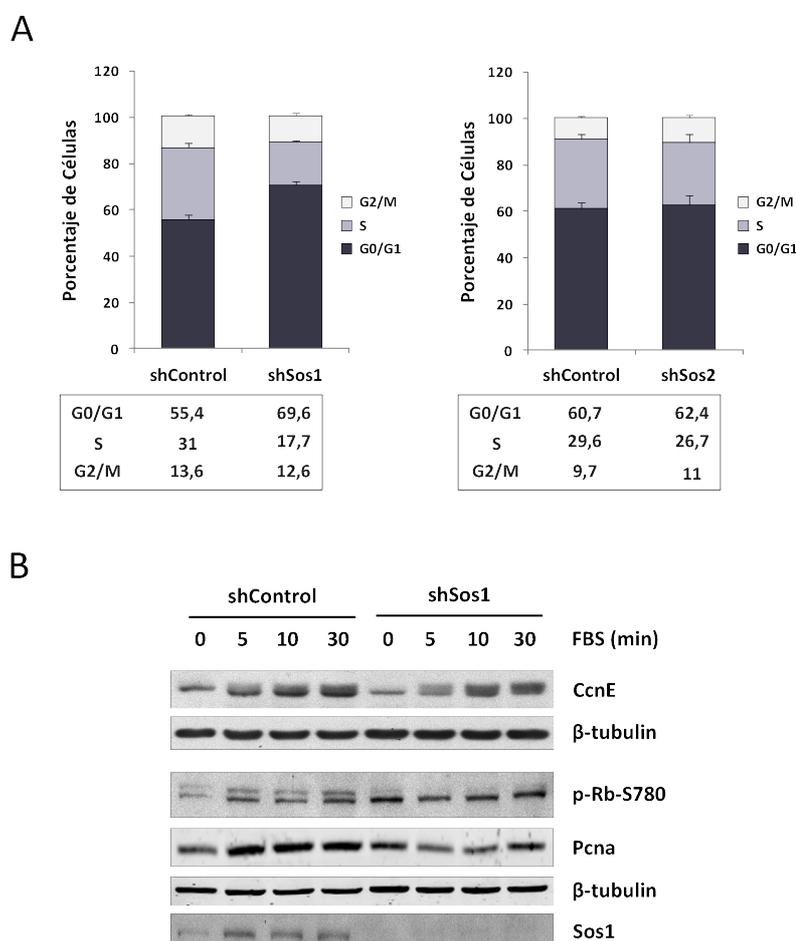


Figura 39. Estudio del ciclo celular y reguladores de la transición G1-S en ausencia de proteínas Sos. (A) El perfil del ciclo celular de clones *shSos1*, *shSos2* y sus respectivos controles *shControl* en crecimiento activo fue analizado por citometría de flujo. Los diagramas de barras representan la media \pm SEM del porcentaje de células presentes en cada fase del ciclo celular. Las tablas inferiores muestran los porcentajes medios de 8 (*shSos1*) y 5 (*shSos2*) experimentos independientes, cada uno con duplicados técnicos. (B) Cultivos subconfluentes de fibroblastos *shSos1*, *shSos2* y sus respectivos *shControl* fueron privados de suero durante 4 horas y estimulados después con 20% FBS durante los tiempos indicados. El panel de Western blot muestra el nivel de fosforilación de Rb (Ser780) y la expresión de ciclina E (CcnE), PcnA, y Sos1 tras la estimulación con 20% FBS en clones *shSos1* y *shControl*.

Por otra parte, el estricto control del ciclo celular y concretamente de la transición G1-S, es llevado a cabo también por reguladores negativos, tales como los inhibidores CKIs p21^{CIP1} y p27^{KIP1} (Sherr and Roberts, 1999), entre otros. Como explicamos en la introducción, el nivel de expresión de estas proteínas está controlado por varios mecanismos, entre ellos, la señalización a través de las vías efectoras Ras/ERK y PI3K/Akt (Aktas et al., 1997; Cheng

et al., 1998; Mirza et al., 2004). Teniendo en cuenta el estado de activación de estas rutas en nuestro modelo, decidimos comprobar si existían alteraciones en la expresión de p21^{CIP1} y p27^{KIP1} que pudieran contribuir al fenotipo de retraso proliferativo. Para ello, analizamos la expresión de estos inhibidores en células *shSos1*, *shSos2* y sus respectivos controles mediante Western blot. Los resultados demostraron que, al menos en condiciones de crecimiento activo, los niveles de expresión de p21^{CIP1} son similares en los clones *shSos1* y *shSos2* comparado con sus respectivos controles (**Figura 40**). Sin embargo, los niveles de p27^{KIP1} disminuyen en los clones *shSos1*, y aumentan en células *shSos2* respecto a sus controles *shControl* (**Figura 40**).

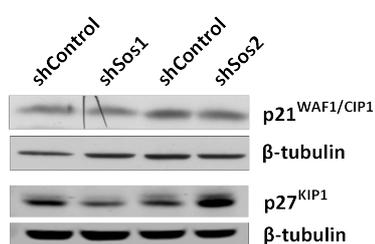


Figura 40. Expresión de los inhibidores de CDKs p21^{CIP1} y p27^{KIP1} en clones *shSos1* y *shSos2*. Determinación de los niveles proteicos de p21^{CIP1} y p27^{KIP1} mediante Western blot, en clones *shSos1*, *shSos2* y sus respectivos controles en crecimiento activo. La expresión de β-tubulina fue utilizada como control de carga.

3.5 Muerte celular y estrés oxidativo en células silenciadas para *Sos1* o *Sos2*

Como comentamos en la sección 2.4. del capítulo 2, son varios los argumentos que justifican el estudio de la muerte celular en fibroblastos deficientes en las proteínas *Sos*. Por ejemplo, la implicación de las rutas mediadas por *Ras* en la regulación de la supervivencia y la muerte celular, así como los resultados del análisis funcional de los microarrays (genes alterados con funciones asociadas a la muerte celular y la respuesta a estrés). En el capítulo anterior analizamos la viabilidad celular tras el tratamiento con el agente oxidante tBHP, con el fin de averiguar si la ausencia de *Sos1* o *Sos2* alteraba esta respuesta. Para corroborar los resultados obtenidos, realizamos los mismos experimentos en clones *shSos1* y *shSos2*.

3.5.1 Estudio de la muerte inducida por tBHP en clones *shSos1* y *shSos2*

Según los datos obtenidos, las líneas *ko-Sos1* presentaron un aumento estadísticamente significativo en la supervivencia tras el tratamiento con tBHP en comparación con las líneas *wt* y *ko-Sos2* (**Figura 29**). Para verificar este resultado, evaluamos la viabilidad celular (por incorporación de 7-AAD) en las mismas condiciones. Para ello, cultivos subconfluentes de los clones *shSos1*, *shSos2* y sus respectivos clones *shControl*, fueron tratados con tBHP 50μM (para *shSos1* y su control) y 300μM (para *shSos2* y su control) durante 2 horas, tras las cuales el tratamiento fue retirado y sustituido por medio de cultivo fresco. Después de 20-22 horas, las células tratadas y los controles sin tratar se marcaron con 7-AAD y Anexina

V-APC y se analizaron por citometría de flujo. Los resultados obtenidos fueron opuestos a los anteriores, pues los cultivos de fibroblastos *shSos1* presentaron porcentajes de células vivas significativamente inferiores a los de *shControl* (**Figura 41-A**). Los clones *shSos2* exhibieron también un aumento de la sensibilidad al tratamiento con tBHP respecto a sus controles (menor porcentaje de células vivas tras el tratamiento), si bien este aumento no es estadísticamente significativo pese a que todas las réplicas ofrecieron el mismo resultado (**Figura 42**, pág. 108).

En cuanto a los datos del marcaje con Anexina V, no encontramos diferencias significativas en ninguno de los casos, aunque se aprecia un ligero aumento en el porcentaje de células positivas en los clones *shSos1* y *shSos2* respecto a sus controles (**Figura 41 y 42**). Como explicamos en el capítulo anterior, los resultados del marcaje con Anexina V tras 20 horas pueden resultar controvertidos (pág. 90-91). Con el objetivo de aportar luz a estos interrogantes realizamos varias pruebas, para las cuales seleccionamos los clones *shSos1* (y su control) por su mayor susceptibilidad al tratamiento con tBHP:

- Analizamos el contenido en DNA (mediante el marcaje con IP) de los cultivos *shSos1* y *shControl* tratados con tBHP 50 μ M en las mismas condiciones anteriores para detectar células con fragmentación del DNA, un evento característico del proceso apoptótico. Los histogramas obtenidos no mostraron ningún pico de fluorescencia por debajo de la fase G0/G1 del ciclo celular, indicando que no existía fragmentación típica de la apoptosis. Además, el tratamiento con tBHP resultó en una parada del ciclo fundamentalmente en fase S (**Figura 41-B**).

- Por otro lado, estudiamos el efecto del tratamiento con tBHP a tiempos más cortos, con el objetivo de encontrar activación de caspasas en alguno de los tiempos ensayados (**Figura 41-C**). Para ello, tratamos las células *shSos1* y *shControl* con tBHP 50 μ M durante 2 horas, y transcurrido este tiempo, tomamos muestras al terminar el tratamiento (2 horas), y 4, 6, y 10 horas desde el inicio del tratamiento. Posteriormente, se determinó la cantidad de caspasa 3 activa mediante Western blot. Los resultados demostraron que no existía caspasa 3 activa en ninguno de los tiempos y en ninguna de las líneas celulares (**Figura 41-C**).

- Por último, examinamos el porcentaje de células marcadas con Anexina V-APC y 7-AAD en clones *shSos1*, 4 horas después del tratamiento con tBHP 50 μ M (2 horas de tratamiento + 4 horas). El porcentaje de células marcadas con 7-AAD fue relevante 4 horas después del tratamiento, mientras que un porcentaje mínimo de células se marcaron sólo con Anexina V (**Figura 41-D**). Este resultado sugiere que las células marcadas con 7-AAD tras 4 horas de tratamiento no proceden de un proceso apoptótico.

En conjunto, todos estos resultados apuntan a que el tratamiento con tBHP en estas líneas celulares induce una muerte celular distinta a la apoptosis dependiente de caspasas, que puede tratarse de muerte por necrosis, al menos en la mayoría de la población (sin descartar la existencia de una pequeña proporción de apoptosis).

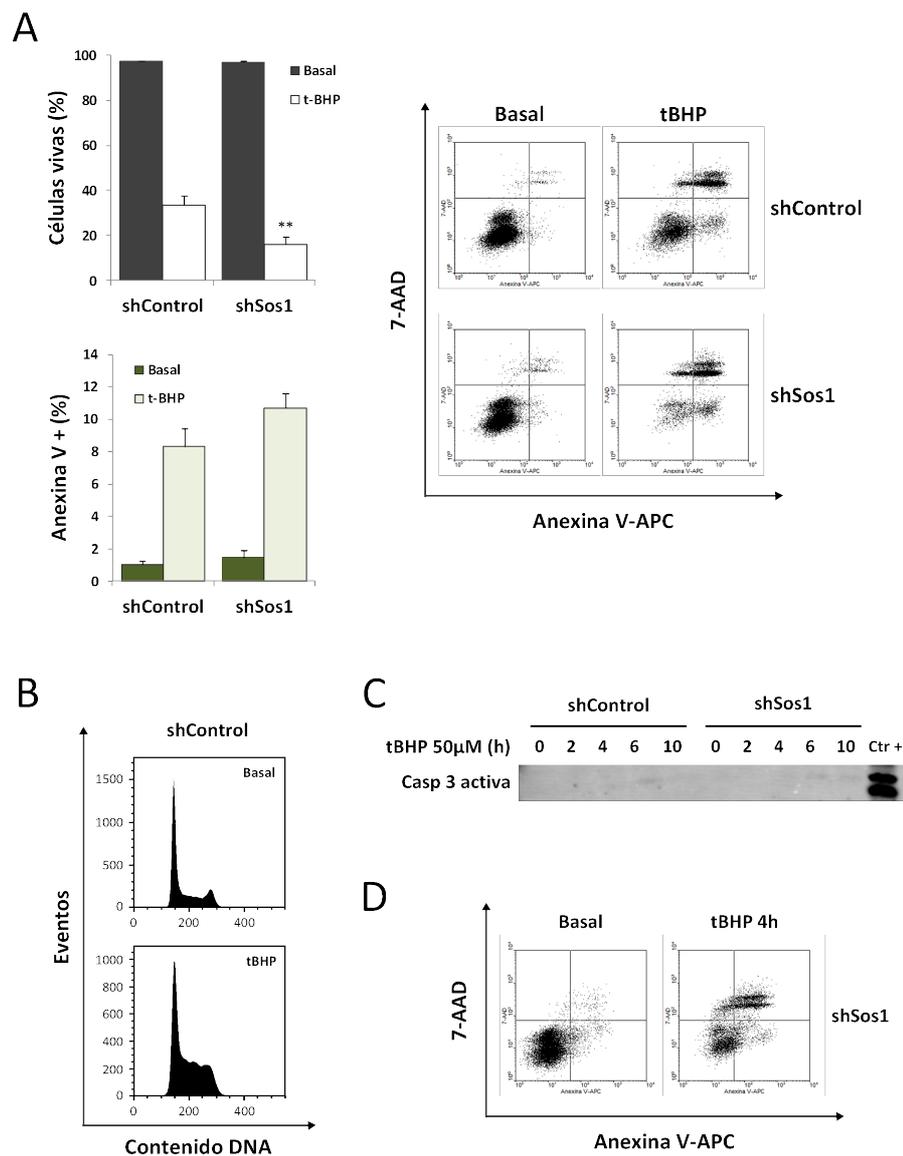


Figura 41. Muerte celular inducida por tBHP en clones *shSos1*. (A) Cultivos subconfluentes de clones *shSos1* y *shControl* fueron tratados con tBHP 50 μ M durante 2 horas, tras las cuales se reemplazó el tratamiento por medio fresco. 20-22 horas después las células fueron marcadas con anexina V-APC + 7-AAD y analizadas por citometría de flujo. Los diagramas de barras representan la cuantificación del porcentaje de viabilidad celular correspondiente a las células negativas para ambos marcadores (diagrama de barras superior), y del porcentaje de células positivas sólo para AnexV (diagrama de barras superior), y del porcentaje de células positivas sólo para Anexina V-APC (diagrama de barras inferior). Ambas gráficas representan la media \pm SEM de 5 experimentos independientes, cada uno con duplicados técnicos. **, $p < 0,01$ respecto al *shControl* (t-test). El panel de la derecha contiene los dotplots representativos de las poblaciones celulares de *shSos1* y *shControl* marcadas con Anexina V-APC (eje X) y 7-AAD (eje Y), tanto de muestras sin tratar (Basal) como tratadas con tBHP. (B) Análisis del contenido de DNA (mediante marcaje con IP) en clones *shControl*, sin tratar y tratados con tBHP en las mismas condiciones que (A). La fragmentación del DNA debería observarse por debajo del pico de G1 (primer pico). (C) Análisis del procesamiento de caspasa 3 (activa) en clones *shControl* y *shSos1* mediante Western blot. Cultivos subconfluentes de cada línea fueron tratados con tBHP 50 μ M durante 2 horas, tras las cuales se reemplazó el tratamiento por medio fresco. Se recogieron las células transcurridas 2, 4, 6, y 10 horas desde inicio del tratamiento. Se añadió una muestra con caspasa 3 activa como control positivo (Ctr +). (D) Dotplots de poblaciones celulares marcadas con Anexina V-APC (eje X) y 7-AAD (eje Y) de clones *shSos1* sin tratar (Basal) y tratados con tBHP 50 μ M durante 2 horas, recogidas 4 horas después del tratamiento y analizadas por citometría de flujo.

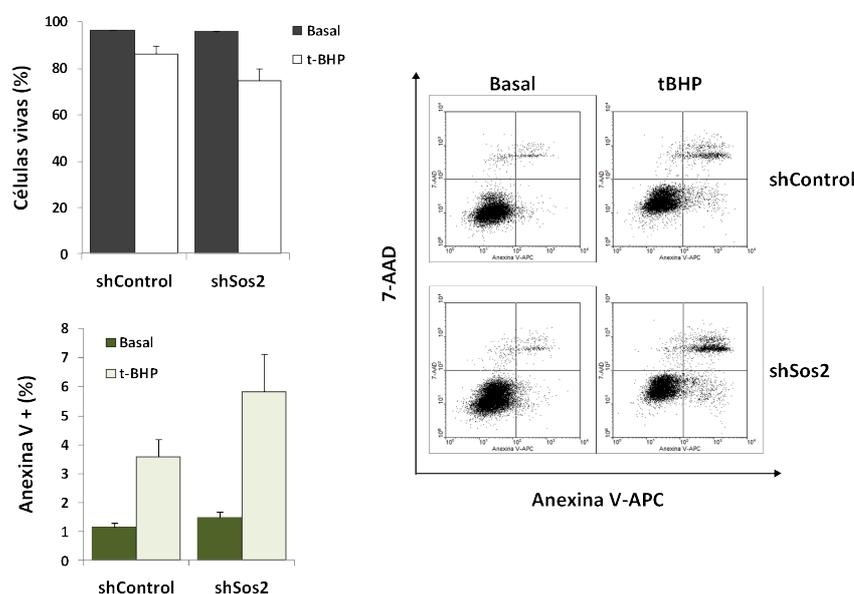


Figura 42. Muerte celular inducida por tBHP en clones *shSos2*. Cultivos subconfluente de clones *shSos2* y *shControl* fueron tratados con tBHP 300 μ M durante 2 horas, tras las cuales se reemplazó el tratamiento por medio fresco. 20-22 horas después las células fueron marcadas con anexina V-APC y 7-AAD, y analizadas por citometría de flujo. Los diagramas de barras representan la cuantificación de la viabilidad celular (%) correspondiente a las células negativas para ambos marcadores (diagrama de barras superior), y del porcentaje de células positivas sólo para Anexina V-APC (diagrama de barras inferior). Ambas gráficas representan la media \pm SEM de 5 experimentos independientes, cada uno con duplicados técnicos. El panel de la izquierda contiene los dotplots representativos de las poblaciones celulares de *shSos2* y *shControl* marcadas con Anexina V-APC (eje X) y 7-AAD (eje Y), procedentes de muestras sin tratar (Basal) y tratadas con tBHP.

3.5.2 Análisis del potencial de membrana mitocondrial y del nivel de ROS intracelular en condiciones basales y de estrés oxidativo

Los resultados de viabilidad celular obtenidos tras el tratamiento con tBHP sugieren que la respuesta al estrés oxidativo está alterada en células *shSos1* y *shSos2*. Este defecto puede estar asociado a alteraciones en la regulación de la muerte celular, a una deficiencia en la neutralización del exceso de ROS generado por el tratamiento, o bien, a un aumento de la generación del ROS intracelular de la célula. Para profundizar en la capacidad de respuesta de las células *shSos1* y *shSos2* ante el estrés oxidativo, quisimos determinar los niveles de ROS intracelular antes y después del tratamiento con tBHP en estas células. Asimismo, puesto que la mitocondria es uno de los principales orgánulos implicados en la regulación de este tipo de estrés y de la muerte celular, decidimos evaluar el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) en las mismas condiciones.

Para analizar estos parámetros, empleamos cultivos subconfluentes de clones *shSos1*, *shSos2* y sus respectivos controles, en condiciones normales (Basal) y tras el tratamiento con tBHP durante 4 horas. Las células se marcaron con DiOC₆ para determinar el $\Delta\Psi_m$, y DHE para detectar los niveles de ROS intracelular (preferencialmente el anión superóxido). La intensidad de fluorescencia de los distintos marcadores fue analizada por citometría de flujo (**Figura 43**, pág. siguiente).

Resultados con DiOC₆ (determinación del potencial de membrana mitocondrial):

En condiciones basales, las células *shSos1* mostraron un aumento significativo del $\Delta\Psi_m$ respecto a células *shControl*. En cambio, los clones *shSos2* no presentaron esta hiperpolarización de la membrana en ausencia de estímulos oxidantes (**Figura 43-B**).

En condiciones de estrés oxidativo (tras el tratamiento con tBHP), se produjo una pérdida del $\Delta\Psi_m$ en todos los clones analizados; las células *shSos1* y *shSos2* mostraron una reducción del $\Delta\Psi_m$ equivalente a sus respectivos controles (**Figura 43-B**).

Resultados con DHE (fluorescencia procedente del DHE oxidado por el ROS intracelular):

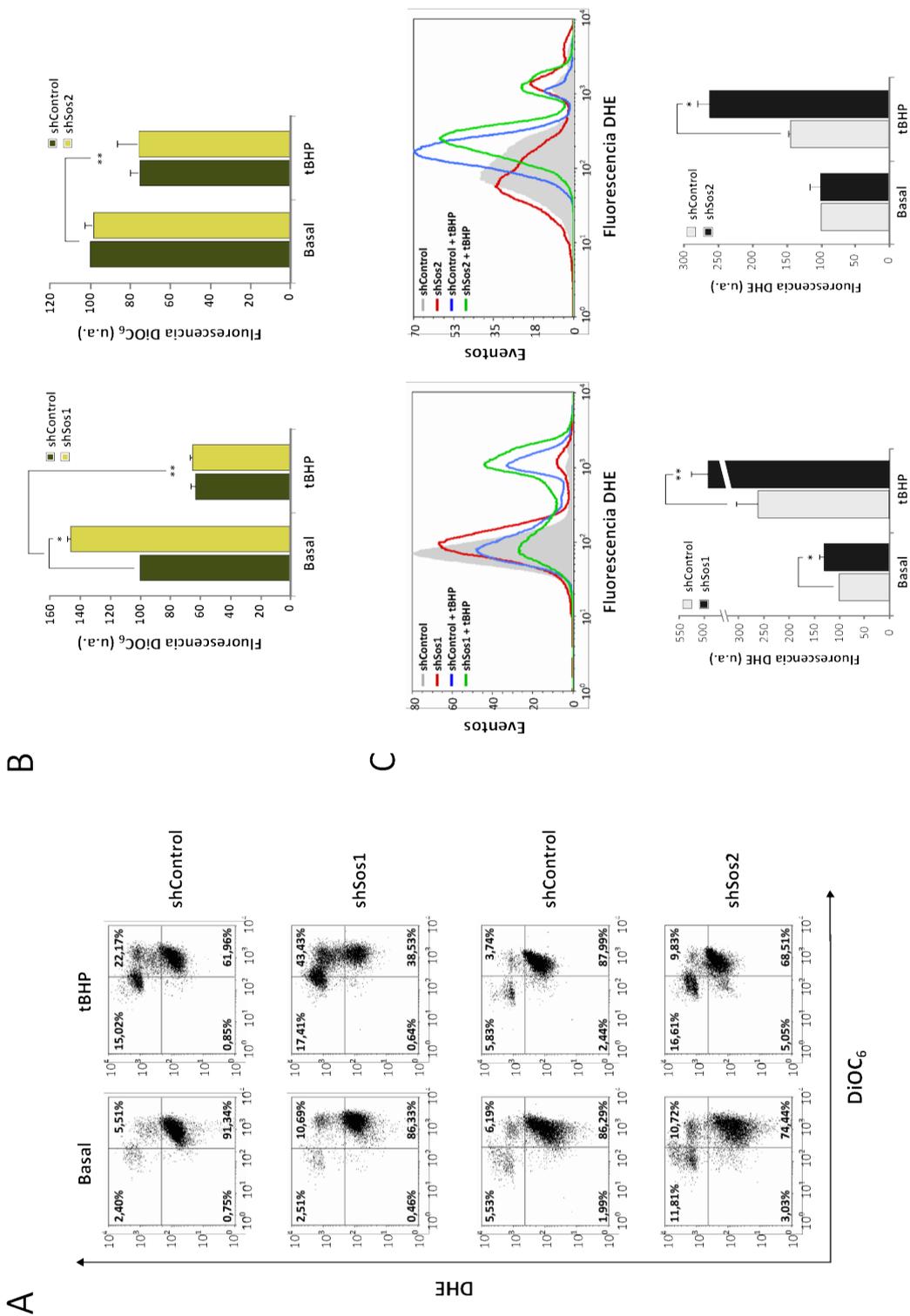
Sorprendentemente, en condiciones basales observamos un aumento significativo del nivel de ROS en fibroblastos *shSos1* (**Figura 43-C**), sugiriendo que en estas células puede existir un defecto en la detoxificación del ROS procedente del metabolismo celular. Por el contrario, no encontramos diferencias en el nivel de ROS intracelular en clones *shSos2* y *shControl*.

En condiciones de estrés oxidativo, los datos del marcaje con DHE demostraron que tanto las células *shSos1* como las *shSos2* alcanzan niveles de ROS superiores a sus respectivos controles tras el tratamiento con tBHP (**Figura 43-C**).

En conjunto, estos experimentos han puesto de manifiesto una alteración en la respuesta al estrés oxidativo de las células *shSos1* y *shSos2*, puesto que no son capaces de neutralizar el aumento de ROS (provocado por el tratamiento con tBHP) con la misma eficiencia que sus respectivos controles. Pero más significativo aún, es el hecho de que en células *shSos1* exista un incremento de los niveles de ROS intracelular en ausencia de estímulos oxidantes (en comparación con sus controles), sugiriendo que en estas células existe un incremento en la generación de ROS intracelular, o un defecto en la detoxificación del ROS procedente del propio metabolismo celular (**Figura 42**).

3.5.3 Expresión de Sod2 en clones con silenciamiento de Sos1 y Sos2

A la vista de los experimentos anteriores, nos planteamos la posibilidad de que estas alteraciones en el estado redox celular tuvieran su origen en un sistema antioxidante deficiente o insuficiente. Teniendo en cuenta que el DHE detecta preferencialmente el anión superóxido (Bindokas et al., 1996), y que la mitocondria es una de las principales fuentes de generación de éste y otras especies de ROS en la célula, decidimos estudiar la expresión de una enzima antioxidante con función en la mitocondria, como la enzima Sod2 (Supero-



xide dismutase 2) (Balaban et al., 2005). Cabe señalar además, como se muestra en la **Figura 31** (pág. 94), que éste fue uno de los genes analizados para comprobar los cambios de expresión obtenidos en los microarrays, cuya disminución fue confirmada en los clones *shSos2*. Asimismo, estudios de expresión con microarrays realizados en nuestro laboratorio utilizando fibroblastos NIH3T3 con silenciamiento de *Sos1*, mostraron una reducción en la expresión de esta proteína (datos no mostrados).

La familia de proteínas Sod (Superoxide dismutases) desempeñan una importante función en la defensa contra los efectos tóxicos del ROS generado por el metabolismo celular. Estas enzimas catalizan la conversión del radical superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), cuya transformación posterior en las moléculas inocuas O_2 y H_2O es catalizada por la enzima catalasa, entre otras (Miao and St Clair, 2009). La respiración mitocondrial es una de las principales fuentes de radicales superóxido, y la isoforma Sod2 localizada específicamente en la mitocondria constituye la primera línea de defensa ante la generación de ROS en este orgánulo (Balaban et al., 2005). El tratamiento con tBHP genera estrés oxidativo, por lo que posibles alteraciones en la expresión de Sod2 podrían explicar la susceptibilidad al tratamiento con tBHP y el aumento del ROS intracelular y del $\Delta\Psi_m$ observados en clones *shSos1* en condiciones basales.

Para comprobar esta hipótesis, analizamos el nivel de expresión del mRNA de Sod2 mediante PCR cuantitativa, en clones *shSos1*, *shSos2* y sus respectivos clones *shControl*. Los resultados demostraron una reducción del 40% del mRNA de Sod2 en células *shSos1*, y del 15% en células *shSos2*, ambos estadísticamente significativos (**Figura 44-A**). A continuación, para verificar los cambios a nivel transcripcional, examinamos los niveles proteicos de Sod2 mediante Western blot. Los resultados sin embargo, mostraron una leve disminución de Sod2 en los fibroblastos *shSos1*, mientras que en el caso de células *shSos2* observamos in-

Figura 43. Determinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y el nivel de ROS intracelular en clones *shSos1* y *shSos2* en condiciones basales y de estrés oxidativo. Cultivos subconfluentes de clones *shSos1*, *shSos2* y sus respectivos controles fueron tratados con tBHP (50 μ M para *shSos1* y 300 μ M para *shSos2*) durante 2 horas, tras las cuales el tratamiento fue sustituido por medio fresco; 2 horas después, tanto los cultivos sin tratar como los tratados con tBHP, se marcaron durante 40 minutos a 37°C con 20 nM de DiOC₆(3) (3,3'-dihexyloxacarboyanine iodide) para evaluar el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y 2 μ M DHE (dihydroethidium) para detectar el nivel de ROS intracelular. La fluorescencia de ambos marcadores fue analizada por citometría de flujo. **(A)** Dotplots representativos de las poblaciones celulares de *shSos1*, *shSos2* y sus respectivos controles marcadas con DiOC₆(3) (eje X) y DHE (eje Y) de muestras sin tratar (Basal) y tratadas con tBHP. **(B)** Cuantificación de la fluorescencia media de DiOC₆(3) para cada muestra en **(A)**, tomando como referencia la señal de fluorescencia obtenida en *shControl* (al que se asignó un valor arbitrario de 100%). Los histogramas representan la media \pm SD en unidades arbitrarias (u.a.) de los triplicados de 1 experimento representativo. Se realizaron 3 experimentos independientes con resultados similares. *, $p < 0,05$ respecto a *shControl* (t-test). **, $p < 0,01$ respecto a condición Basal (t-test). **(C)** Histogramas de la fluorescencia de DHE detectada en clones *shSos1*, *shSos2* y sus controles, en condiciones basales y tratados con tBHP, procedentes del experimento mostrado en **(A)**. Los diagramas de barras inferiores representan la media \pm SD en unidades arbitrarias (u.a.) de la fluorescencia media de DHE en un experimento representativo (experimento realizado con triplicados). Los valores del *shControl* en condiciones basales se tomaron como referencia (se le asignó un valor arbitrario de 100%). Se realizaron 3 experimentos independientes con resultados similares. *, $p < 0,05$ respecto a *shControl* (t-test). **, $p < 0,01$ respecto al *shControl* (t-test).

cluso un ligero incremento de la proteína (**Figura 44-B**). Por tanto, la correspondencia entre los resultados de mRNA y proteína se confirma, en parte, para los clones *shSos1* pero no para los clones *shSos2*.

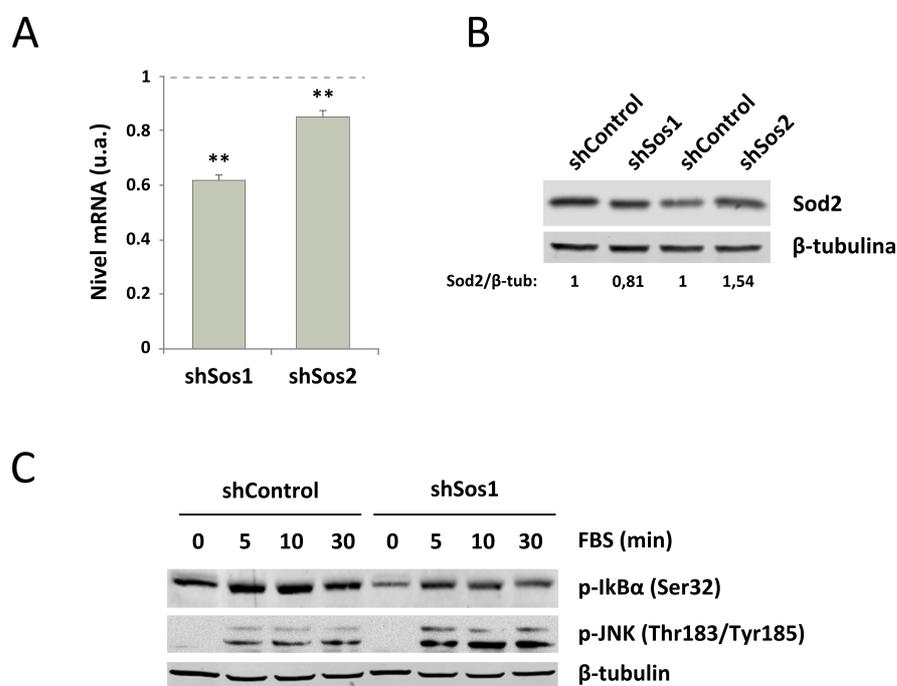


Figura 44. Expresión de Sod2 en clones *shSos1* y *shSos2*. (A) Determinación de los niveles de mRNA de Sod2 mediante PCR cuantitativa en las células silenciadas para Sos1 o Sos2. El diagrama de barras representa la media \pm SD del nivel de mRNA de clones *shSos1* y *shSos2* respecto a sus respectivos clones *shControl*, al que se asignó el valor 1 (línea discontinua), en unidades arbitrarias (u.a.) y procedentes de 3 experimentos independientes. Los datos obtenidos fueron normalizados respecto a la expresión de *Gapdh*. **, $p < 0,01$ respecto a *shControl* (t-test). (B) Niveles proteicos de Sod2 en clones *shSos1*, *shSos2* y sus respectivos controles analizados por Western blot. La expresión de β -tubulina fue utilizada como control de carga. Debajo de la imagen se muestra el ratio Sod2/ β -tubulina para cada línea. (C) Cultivos subconfluentes de clones *shSos1* y *shControl* fueron estimulados con 20% FBS durante los tiempos indicados tras 4 horas privadas de suero. El nivel de fosforilación de I κ B α (Ser32) y JNK (Thr183/Tyr185) fue determinado mediante Western blot y la expresión de β -tubulina fue utilizada como control de carga.

Finalmente, como comentamos en la introducción, NF- κ B es uno de los principales factores de transcripción de Sod2. Aunque la bajada de la proteína Sod2 sea pequeña y la significación funcional de dicho cambio sea cuestionable, quisimos comprobar si la reducción del mRNA de Sod2 en fibroblastos *shSos1* podía relacionarse con una menor activación de NF- κ B. La activación de NF- κ B requiere la fosforilación y consiguiente degradación de la proteína que lo mantiene inactivo, I κ B α . Por tanto, el nivel de fosforilación de esta proteína aporta información sobre el estado de activación de NF- κ B de forma indirecta. Para averiguarlo, analizamos la fosforilación de I κ B α en Ser32 utilizando lisados procedentes de los

estudios de señalización (estimulados con suero durante 5, 10 y 30 minutos) realizados con células *shSos1* y *shControl*. El resultado reveló una menor fosforilación de I κ B α en los fibroblastos *shSos1* comparados con *shControl*, indicando que la degradación de I κ B α era menor en estas células. Este resultado sugiere de forma indirecta y preliminar, que una proporción menor de NF- κ B está activa en las células *shSos1* (**Figura 44-C**).

Por último, dada la situación de estrés oxidativo (al menos, de mayores niveles de ROS intracelular) en las células *shSos1* en condiciones basales, quisimos conocer la fosforilación de las MAPKs de la familia JNK, pues estas MAPKs son activadas principalmente por estímulos de estrés (Turjanski et al., 2007). De hecho, varios estudios han descrito un aumento de la fosforilación de JNK en condiciones de estrés oxidativo (Kamata et al., 2005; Martindale and Holbrook, 2002). Para comprobar este dato, en los mismos lisados anteriores examinamos la fosforilación de JNK en Thr183/Tyr185 mediante Western blot. Efectivamente, y de acuerdo con el aumento de ROS intracelular observado en células *shSos1* en condiciones basales, encontramos una mayor fosforilación de JNK (Thr183/Tyr185) en clones *shSos1* respecto a *shControl* (**Figura 44-C**).

Discusión

Los datos publicados hasta el momento no son suficientes para clarificar y precisar las diferencias funcionales entre Sos1 y Sos2. Sabemos que estas proteínas, ambas con un patrón de expresión ubicuo y con una estructura de dominios funcionales muy parecida, actúan como conectores de los RTKs y las GTPasas Ras en las rutas de señalización intracelular. Los datos acerca de su función apuntan a la especificidad, sobre todo teniendo en cuenta las diferencias en el fenotipo de los ratones *ko-Sos1* y *ko-Sos2* (Esteban et al., 2000; Qian et al., 2000; Wang et al., 1997). En este trabajo hemos intentado aportar información acerca de la redundancia o especificidad funcional entre ambas proteínas, realizando un estudio comparativo in vitro en un modelo de fibroblastos embrionarios inmortalizados procedentes de dichos ratones *ko*. Además, la eliminación de la expresión de Sos1 y Sos2 la hemos abordado mediante dos estrategias distintas, cuyas diferencias principales consisten en el momento en que sucede el proceso de inmortalización (antes o después de la eliminación de Sos), y en el grado de inhibición de la expresión de Sos (total o parcial). La caracterización genómica y funcional de los fibroblastos embrionarios deficientes en Sos1 y Sos2 ha revelado algunas diferencias entre ambas proteínas Sos en procesos fundamentales a nivel celular, y ha puesto de manifiesto la importancia relativa de Sos1 respecto a Sos2 en determinados procesos, siendo la participación de Sos1 (al menos en este tipo celular) más relevante en la mayoría de los casos.

1. Perfiles transcripcionales asociados a la ausencia de Sos1 y Sos2: especificidad funcional frente a redundancia

Basándonos en los conocimientos previos acerca de la función de las proteínas Sos, el primer objetivo de este trabajo consistió en averiguar si éstas pueden asociarse a un perfil de expresión génica específico, y quizá también, encontrar respuesta a diferentes aspectos

de la biología de cada isoforma. Para ello, analizamos el transcriptoma de MEFs *wt*, *ht*, y *ko* para *Sos1* y *Sos2* mediante la hibridación con microarrays de expresión de Affymetrix.

El análisis de los datos de los microarrays reveló en primer lugar, que la eliminación de *Sos1* tiene un efecto mucho mayor sobre la expresión génica en la célula que la ausencia de *Sos2* (**Figura 17**). Apenas observamos cambios de expresión en las líneas *ko-Sos2* si consideramos un FDR relativamente bajo (2 transcritos significativos para un FDR de 0,28), mientras que la eliminación de *Sos1* tiene un mayor impacto en el transcriptoma provocando la alteración de, por ejemplo, 740 transcritos con un FDR de 0,066 (**Tabla 5**). Estos resultados ponen de manifiesto la influencia de *Sos1* en la regulación de la expresión génica, y la incapacidad de *Sos2* para compensar su ausencia en este contexto. Es inevitable comparar estos resultados con el fenotipo de los ratones *ko* para cada una de las proteínas *Sos* (los embriones *ko-Sos1* mueren en el desarrollo embrionario y ratones *ko-Sos2* no presentan fenotipo aparente), haciéndose más evidente la importancia de *Sos1* y la dispensabilidad de *Sos2* en determinados procesos como el desarrollo embrionario, tanto en ratón como en humanos (Tartaglia et al., 2007).

Los efectos en la expresión génica ocasionados por la eliminación de *Sos1* podrían ser debidos a su capacidad para señalar a corto y largo plazo, manteniendo la activación de ERK1/2 necesaria para la expresión de determinados genes (Balmanno and Cook, 1999; Murphy and Blenis, 2006; Murphy et al., 2004). En este sentido, la incapacidad de *Sos2* para transmitir señales a largo plazo, como hemos comprobado en el estudio de fosforilación de ERK1/2 en MEFs *ko-Sos1* (**Figura 23-B**), puede explicar que no tenga especial influencia en la expresión génica, y que su ausencia no produzca cambios importantes en el transcriptoma. Adicionalmente, varios trabajos han demostrado que *Sos1* posee un potencial transformante superior al de *Sos2* (que prácticamente carece de él), y que su expresión es necesaria para la transformación inducida por oncogenes como v-*Src* y EGFR (Nielsen et al., 1997; Qian et al., 2000). De hecho, han argumentado que el requerimiento de *Sos1* para la transformación mediada por estos oncogenes (que señalizan de forma constitutiva) puede explicarse por la capacidad de *Sos* para mediar la continua señalización oncogénica (Qian et al., 2000). Por tanto, podemos relacionar estos datos con la participación de *Sos1* en el control de la expresión génica, ya que su habilidad para mediar la transformación celular puede estar asociada a su vez con su regulación sobre el transcriptoma.

En relación con esta idea, en el análisis funcional de los genes diferencialmente expresados en líneas *ko-Sos1*, encontramos varios genes relacionados con la maquinaria de transcripción, por ejemplo, componentes del complejo de preiniciación (PIC) asociado con la RNA polimerasa (*Taf10*, *Supt4h1*, *Snapc1*, *Sap18*, *Gtf2h3*, etc), además de diversos factores de transcripción previamente comentados (**Resultados**, pág 74). Los cambios en estos genes pueden ser a su vez, responsables de la alteración que observamos en el transcriptoma de

fibroblastos *ko-Sos1*, en comparación con células *ko-Sos2*. No obstante, en ausencia de *Sos2* también encontramos sobreexpresados los factores de transcripción *Crebzf* y *Srebzf2*.

(i) Relevancia del papel de *Sos1* frente a *Sos2* en el desarrollo

Como hemos explicado en los resultados y de acuerdo con la función esencial de *Sos1* en el desarrollo embrionario, muchos de los genes alterados participan en procesos de morfogénesis y diferenciación celular en el desarrollo embrionario (*Lhx8*, *Gsc*, *Meis1*, *Hoxb2*, *Hoxb3*, *Hoxd8*, *Pax3*). Aunque en mucha menor proporción, también observamos genes de desarrollo en ausencia de *Sos2*, pero el fenotipo del ratón *ko* sugiere que la función de *Sos2* en este proceso es dispensable (Esteban et al., 2000). De todas formas, la utilización de fibroblastos embrionarios en este trabajo puede condicionar de alguna manera el perfil transcripcional, añadiendo genes procedentes de su condición embrionaria. Reflejo de la importancia de *Sos1* en el desarrollo embrionario, en comparación con *Sos2*, se han descrito diversas mutaciones de *SOS1* en la línea germinal que son responsables del síndrome de Noonan, mientras que no se ha encontrado ninguna mutación de este tipo en *SOS2* (Roberts et al., 2007; Tartaglia et al., 2007).

Igualmente, la eliminación de las proteínas *Sos* (tanto *Sos1* como *Sos2*), provoca cambios de expresión en genes relacionados con el desarrollo del sistema inmune y con la activación de la respuesta inmunitaria, sobre todo en ausencia de *Sos1* (**Tabla 8 y 9**). Recientemente se han publicado varios trabajos que demuestran la implicación de *Sos1* en el desarrollo y activación de linfocitos T (Kortum et al., 2011; Roose et al., 2007). El papel de *Sos2* sin embargo, no está claro, pero parece que su función podría ser importante después de *Sos1* en la maduración del linfocito T (Kortum et al., 2011). Resultados recientes de nuestro laboratorio apuntan a una función esencial de *Sos1* en la maduración de las células T dobles negativas, y un posible papel de *Sos2* en las células B (datos no mostrados). En conjunto, la información obtenida hasta el momento en relación al papel de *Sos1* y *Sos2* en el sistema inmune, apunta a la especificidad funcional.

Además del ratón *ko* para *Sos1* descrito por Qian y colaboradores (Qian et al., 2000), la eliminación de muchos otros genes también es letal en embriogénesis debido a defectos en el desarrollo de la placenta (principalmente problemas en la formación del laberinto y los espongiotrofoblastos, alterando la vasculogénesis de la misma). Muchos de estos genes, al igual que *Sos1*, participan en rutas de señalización mediadas por RTKs y MAPKs (*Raf-1*, *Mek1*, *Erk2*, *Ets2*, *Gab1*, *p38 α* , *JunB*, etc) (Hatano et al., 2003; Rossant and Cross, 2001; Wojnowski et al., 1998). Teniendo en cuenta estos defectos en la placenta y su vascularización, hemos encontrado un grupo de genes alterados en MEFs *ko-Sos1* implicados en angiogénesis y desarrollo de la placenta. Algunos de ellos están reprimidos (*Notch1*, *Thbs2*, *Arhgap24*, *Timp2*, *Tfpi*, *Arnt2*) y otros sobreexpresados (*Elf2*, *Mfn2* y *Eaf2*). Por comentar algunos ejemplos, entre los genes pro-angiogénicos podemos destacar el factor de trans-

cripción codificado por *Elf2*, que se expresa en endotelio y promueve la angiogénesis a través de la inducción de Tie-2 (receptor de la angiopoietina 1) (Iljin et al., 1999). Aunque solamente se ha descrito en su homólogo humano, la proteína con actividad RhoGAP codificada por *Arhgap24/p73RhoGap*, tiene un papel esencial en la estimulación de la angiogénesis y se expresa casi exclusivamente en células endoteliales (Su et al., 2004). El gen *Mfn2* codifica la mitofusina 2, cuya función es importante en angiogénesis, esencial en el desarrollo de la placenta, y participa en la fusión mitocondrial regulando la homeostasis de la misma (Lugus et al., 2011). Entre los genes con actividad anti-angiogénica, destacamos el gen *Eaf2*, que codifica un supresor de tumores frecuentemente reprimido en cáncer de próstata (Xiao et al., 2003; Xiao et al., 2008). La inhibición de *Eaf2* promueve la angiogénesis mediada por Hif1 α (Hypoxia inducible factor 1, α subunit), puesto que *Eaf2* estabiliza los niveles de VHL (Von Hippel Lindau protein), implicada en la ruta de degradación de Hif1 α (Xiao et al., 2009). Por último, destacar la reducción del gen *Thbs2*, que codifica la proteína anti-angiogénica trombospondina 2. La alteración de todos estos genes apoya la implicación de *Sos1* en la correcta formación de la placenta y en la estimulación de procesos angiogénicos, proporcionando posibles candidatos que participen en el mecanismo responsable del fenotipo de los embriones *ko-Sos1*.

Asimismo, teniendo en cuenta que los embriones *ko* para *Sos1* descritos por Wang y colaboradores mueren por defectos cardiovasculares (Wang et al., 1997), y que el fenotipo del ratón transgénico para el mutante *Sos1*^{E846K} (utilizado como modelo animal del NS) sufre hipertrofia cardíaca y patología cardiovascular severa (Chen et al., 2010b), encontramos un conjunto de genes implicados en el desarrollo y fisiología del corazón (*Notch1*, *Atp2a2*, *Atp5j*, *Dnaja3*, *Mapkapk5*, *Ccng1*, *Mnf2* y *Mnat1*). La mayoría presentan un aumento en su expresión (con la excepción de *Notch1* y *Ccng1*), sugiriendo que *Sos1* regula negativamente a estos genes o que la ausencia de *Sos1* induce indirectamente la expresión de los mismos. Curiosamente, los cardiomiocitos deficientes en *Mfn2* (comentado previamente por su implicación en angiogénesis) sufren hipertrofia, al igual que aquellos con *SOS1* hiperactivo (Papanicolaou et al., 2011). También el ratón *ko* para *Dnaja3*, que codifica una chaperona mitocondrial altamente expresada en corazón y esencial en la biogénesis de la mitocondria, presenta un fenotipo de miocardiopatía dilatada y muere antes de las diez semanas de edad (Hayashi et al., 2006). La ausencia de *Dnaja3* en las mitocondrias de los cardiomiocitos provoca una deficiencia de la cadena respiratoria y su sobreexpresión produce hipertrofia en el corazón (Hayashi et al., 2006). De la misma manera, el ratón *ko* para *Eaf2* también presenta un fenotipo de hipertrofia cardíaca (Xiao et al., 2008). Puesto que los datos sugieren que *Sos1* regula negativamente la expresión de *Mfn2*, *Dnaja3*, y *Eaf2*, el mecanismo molecular responsable de la hipertrofia cardiovascular en los mutantes de *SOS1* podría estar relacionado con estas proteínas, pues la eliminación de todas ellas provoca hipertrofia en el corazón.

Eaf2 es, por varias razones, uno de los genes más interesantes alterados en líneas *ko-Sos1*. Su implicación en angiogénesis y en la homeostasis cardiaca lo relaciona directamente con el fenotipo de los ratones *ko-Sos1* y con el síndrome de Noonan. Por otro lado, se sabe que *Eaf2* es un gen de respuesta a andrógenos en tejido prostático normal, y que funciona como un supresor de tumores, pues su eliminación induce la aparición de varios tipos de cáncer, entre ellos el de próstata (Xiao et al., 2008). De hecho, se ha comprobado que está reprimido en cáncer de próstata avanzado debido a una disminución de la expresión, o bien por pérdida alélica, por metilación del promotor o por delección homocigota (Xiao et al., 2003). Como ya hemos comentado varias veces, SOS1 está sobreexpresado en este tipo de cáncer en hombres afro-americanos respecto a europeo-americanos (Timofeeva et al., 2009), algo que también ocurre con el cáncer de mama en mujeres afroamericanas, donde SOS1 está igualmente sobreexpresado (Field et al., 2011). Además, hemos encontrado otros genes implicados de alguna manera en cáncer de próstata, reforzando el papel de *Sos1* en este tipo de cáncer y revelando más pistas acerca del posible mecanismo por el que *Sos1* está vinculado al cáncer de próstata agresivo. Entre ellos encontramos genes reprimidos (*Rgs2*, *Cd82*, *Insig1*) (Cao et al., 2006; Jackson et al., 2003) y otros aumentados en células *ko-Sos1* (*Eaf2*, *Amacr* y *Glipr1*) pero que generalmente están reprimidos en cáncer de próstata. Ya comentamos en la introducción que la reducción de la expresión de *Amacr* correlaciona con mal pronóstico en este tipo de tumores (Barry et al., 2012). Igualmente, *Glipr1* está silenciado en cáncer de próstata (Ren et al., 2004), y la sobreexpresión de esta proteína, identificada como una nueva diana de p53, induce apoptosis en líneas celulares de este tipo de cáncer y de otros (Li et al., 2008; Thompson, 2010). Se ha descrito que *Glipr1* funciona como un supresor de tumores, tal y como refleja la menor supervivencia y la mayor predisposición a desarrollar tumores que presentan los ratones deficientes en *Glipr1* (Li et al., 2008). Nuestros datos indican que tanto *Sos1* como *Sos2* ejercen un control negativo sobre la expresión de *Glipr1*, pues está sobreexpresado en MEFs *ko-Sos1* y *ko-Sos2*, siendo en estos últimos el gen que presenta el cambio más grande. Además, estos datos indican que *Sos1* y *Sos2* contribuyen a la regulación de *Glipr1* por separado, pues la presencia de sólo una de las isoformas no es suficiente para mantener los niveles de *Glipr1* controlados.

(ii) Efecto predominante de *Sos1* en otras funciones

Adicionalmente, hemos observado cambios en varios genes diana de p53 en MEFs *ko-Sos1*. La mayoría están reprimidos (*Trp53inp1*, *Cdkn1a*, *Mdm2*, *Ccng1*, *Phlda3* y *Pml*), pero otros se encuentran aumentados (*Glipr1* y *Btg3*). Esta información parece indicar que parte de la actividad transcripcional de p53 podría estar reducida respecto a MEFs *wt*. Curiosamente, varios genes que codifican proteínas reguladoras de la actividad de p53 también están alterados en estas células, tales como *Ube2I3*, *Mapkapk5* y *Dnaja3*, cuya expresión aumenta, o *Vrk2* y *Mdm2*, que disminuyen. La enzima conjugadora de ubiquitina codificada por el

gen *Ube2l3* actúa sobre p53 induciendo su degradación (Reyes-Hernandez et al., 2010), lo que sugiere que quizá p53 está siendo degradado en mayor proporción en células *ko-Sos1*, explicando la menor expresión de sus dianas transcripcionales. Además, el aumento de fosforilación de Akt observado en líneas *ko-Sos1* (**Figura 23-C**), puede inducir la translocación de Mdm2 al núcleo y consecuentemente contribuir a la disminución de la actividad transcripcional de p53 en ausencia de Sos1 (Mayo and Donner, 2001). Sin embargo, hay que tener en cuenta que p53 es activado en condiciones de estrés y daño al DNA, mientras que en condiciones normales la expresión y actividad de éste suele ser baja (Oren, 2003). Teniendo en cuenta que el estudio está realizado en células inmortalizadas, la posible relevancia de una alteración de p53 en nuestro modelo es discutible, y por tanto, sería necesario confirmar estos resultados mediante un estudio de la actividad de p53 en células deficientes en Sos1, preferiblemente en cultivos primarios.

Por otra parte, apenas se han publicado estudios acerca de los mecanismos implicados en la regulación de la expresión de Sos. Hasta el momento, sólo la activación del factor de transcripción citosólico Ahr ha sido relacionada con la inducción de *SOS1* (Pierre et al., 2011). Diversos contaminantes ambientales (la mayoría cancerígenos), como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (benzopirenos, dioxinas, etc), funcionan como ligandos de este receptor. Una vez activado, Ahr transloca al núcleo e interacciona con Arnt (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator), formando un heterodímero que induce la expresión de genes que contienen sitios XRE (Xenobiotic Response Element) en su promotor (Barouki et al., 2007). Estos genes están implicados en respuestas de detoxificación y metabolismo, por ejemplo genes de la familia CYP (Cytochrome P450). Asimismo, genes como *Ahrr* (Aryl hydrocarbon receptor repressor) y *Ube2l3*, que presentan un aumento de su expresión en MEFs *ko-Sos1*, también son dianas de Ahr (Mimura et al., 1999; Reyes-Hernandez et al., 2010), sugiriendo que la ausencia de Sos1 induce un incremento de la actividad transcripcional del Ahr. Esto quizá sea debido a un mecanismo de retroalimentación, en el que la ausencia de Sos1 resulta en la estimulación del Ahr para inducir su propia expresión. Por otra parte, hay que tener en cuenta que además del aumento del represor *Ahrr*, la expresión de *Arnt2* está disminuida. Ambos eventos conducirían a una inhibición de la actividad del Ahr, sin embargo, los datos apuntan a una mayor actividad transcripcional del mismo. Probablemente, la presencia de la proteína Arnt pueda compensar la disminución de Arnt2.

También hemos encontrado genes alterados cuya función está relacionada con procesos reproductivos (en concreto gametogénesis), o que presentan expresión exclusiva o muy abundante en tejidos sexuales (*FancL*, *Lhx8*, *Rgs2*, *Eif4g3*, *Rps4y2*, *Cd59b*, *Cadm1*, *Zfp105* y *Itf81*), sugiere que este proceso puede estar afectado. Recientemente, se ha publicado un estudio con microarrays en el que han encontrado que la expresión de *SOS1* y *RAF-1* está disminuida en sujetos con criptorquidia (Hadziselimovic et al., 2010). El estudio de la

capacidad reproductiva en modelos animales inducibles para la eliminación de *Sos1*, podría revelar la existencia de alteraciones en la fertilidad.

Finalmente, a pesar del escaso número de genes expresados diferencialmente en las líneas *ko-Sos2*, algunos resultan particularmente interesantes. Es el caso de la disminución de *Bace1*, que codifica una enzima implicada en la formación de placas amiloides presentes en la enfermedad de Alzheimer. Como ya comentamos previamente, un estudio descubrió polimorfismos en *SOS2* asociados significativamente a la susceptibilidad de padecer esta enfermedad (Hamilton et al., 2007). Además, este estudio fue precedido por otro que buscaba genes de susceptibilidad a desarrollar diabetes tipo II (Barroso et al., 2003), en el que se identificó a *SOS1* como uno de los genes de susceptibilidad candidatos. Interesantemente, uno de los genes reprimidos en MEFs *ko-Sos1* es *Ube2e2*, al que recientemente se ha asociado con la diabetes tipo II (Yamauchi et al., 2010).

2. Modelo de MEFs knockout inmortalizados

En conjunto, la caracterización funcional de los fibroblastos deficientes en *Sos1* y *Sos2* usando como modelo MEFs inmortalizados ha mostrado que ambas líneas *ko-Sos1* y *ko-Sos2* presentan una reducción de la capacidad proliferativa y alteraciones en la señalización efectora que participa en la regulación de la misma. Adicionalmente, las líneas *ko-Sos1*, pero no las *ko-Sos2*, presentaron una mayor supervivencia a la muerte inducida por estrés oxidativo, lo cual podría estar relacionado con el aumento de la activación de rutas de supervivencia celular observada en estas células. A continuación discutiremos este fenotipo con más detalle.

(i) Capacidad proliferativa en ausencia de las proteínas Sos

Las proteínas Ras regulan diversos procesos fundamentales en la célula, entre ellos la proliferación, crecimiento celular y supervivencia. Como ya sabemos, la activación de estas GTPasas por las proteínas Sos induce la estimulación de rutas efectoras que regulan estas respuestas biológicas, entre ellas, la ruta Ras/MAPKs y PI3K/Akt. Por este motivo, y teniendo en cuenta los resultados de los microarrays, la mayor parte de los experimentos presentados en este trabajo se han dirigido a evaluar el efecto de las proteínas Sos en estos procesos celulares.

Los resultados obtenidos en la caracterización funcional mostraron, en primer lugar, una disminución de la capacidad proliferativa en las líneas *ko-Sos1* y *ko-Sos2* (**Figura 22-A**). De acuerdo con estos resultados, las líneas *ko-Sos2* mostraron un mayor porcentaje de células en la fase G1 del ciclo celular, mientras que el perfil de distribución de los MEFs *ko-Sos1* resultó prácticamente igual que los controles (MEFs *wt*) (**Figura 28**). Este último dato, teniendo en cuenta que las células *ko-Sos1* crecieron más lentamente que los controles, po-

dría explicarse por un tránsito más lento a través de cada fase del ciclo celular, sin que la menor velocidad afectara al porcentaje relativo de células en cada fase. Adicionalmente, el descenso de la expresión de *Ccnd1* (y también *Ccnd2* en células *ko-Sos1*) puede contribuir al descenso en la proliferación de ambas líneas *ko*.

La contribución de las proteínas Sos a la proliferación y crecimiento celular ha sido evaluada en varias ocasiones. En consonancia con nuestros resultados, la inhibición de la actividad de Sos mediante el dominante negativo Δ Sos1 (mutante que carece del dominio catalítico) provocó un descenso considerable de la tasa proliferativa en células CHO-IR/ Δ SOS (una línea celular que además sobreexpresa el receptor de la insulina IR) tras ser estimuladas con insulina (Sakaue et al., 1995). La utilización de dominantes negativos como Δ Sos1, no sólo está desplazando a *Sos1 wt* de su asociación con Grb2, sino que probablemente también lo hace con *Sos2*, por lo que en principio, parece lógico que apenas se detecte formación de Ras-GTP y que la proliferación esté disminuida en presencia de Δ Sos1 (Sakaue et al., 1995). Asimismo, otros trabajos realizados también con MEFs derivados de embriones *ko-Sos1* observaron datos contradictorios, pues uno de los estudios presentaba una menor proliferación de fibroblastos *ko-Sos1* respecto a *wt* (Qian et al., 2000), mientras que en el otro no observaron diferencias en el crecimiento respecto a MEFs *ht-Sos1* y *wt*, indicando que la expresión de *Sos2* podía sustituir a *Sos1* en los requerimientos proliferativos de estos MEFs (Wang et al., 1997).

Por otro lado, también se ha evaluado la capacidad transformante de Sos, utilizando la proteína *wt* sobreexpresada (Egan et al., 1993; Nielsen et al., 1997; Rojas et al., 1999), formas asociadas constitutivamente a la membrana (Aronheim et al., 1994; Quilliam et al., 1994), y también usando mutantes truncados de la proteína sin el dominio C-terminal (Aronheim et al., 1994; Wang et al., 1995). En este sentido, se ha sugerido en varias ocasiones que *Sos1* puede tener un potencial transformante superior a *Sos2* (Nielsen et al., 1997). Las formas de Sos que carecen de la región C-terminal y además presentan una localización constitutiva en la membrana son las que exhiben mayor potencial oncogénico, como demuestra la formación de papilomas en el ratón transgénico para *SOS-F* expresado específicamente en queratinocitos (Sibilia et al., 2000). Igualmente, el mutante de *SOS1* detectado en la fibromatosis gingival (HGF1), que carece de gran parte de la región C-terminal, induce un aumento de la proliferación en las células de la gingiva, y la inhibición de este mutante por siRNA reduce la tasa proliferativa (Jang et al., 2007). También, algunos tipos de cáncer presentan sobreexpresión de *SOS1* (Field et al., 2011; Timofeeva et al., 2009).

Todos estos datos, junto con los resultados de este trabajo, confirman que las proteínas Sos participan en la regulación positiva de la proliferación celular. No obstante, el caso de *Sos2* no está tan claro, pues por un lado, no hemos encontrado estudios específicos de *Sos2* en proliferación, y por otro lado, nuestros resultados en este primer modelo sugieren

un papel estimulador del crecimiento (**Figura 22**), pero como veremos más adelante, el silenciamiento estable de Sos2 no afecta a la tasa proliferativa del cultivo (**Figura 37**).

(ii) Las rutas de señalización mediadas por Ras en ausencia de Sos

En el capítulo 2 hemos analizado la activación de Ras tras la estimulación con 20% FBS, a corto (10 y 30 minutos), medio (90 minutos) y largo plazo (8 y 30 horas), con el objetivo de analizar esta cinética en ausencia de Sos1 o Sos2 (**Figura 23-A**). Pese a que no hemos encontrado diferencias significativas entre los genotipos, podemos apreciar una tendencia a menor activación en *ko-Sos1* a partir de 90 minutos. En consonancia con los resultados de Qian y colaboradores, en los que observaron la misma proporción de Ras-GTP en MEFs *wt* y *ko-Sos1* tras 5 minutos de estimulación con EGF, la activación de Ras a tiempos cortos fue prácticamente igual en todos los genotipos (Qian et al., 2000) (**Figura 23-A**). Por el contrario, en células CHO-IR que expresan el dominante negativo Δ mSos, la activación de Ras queda bloqueada casi por completo tras 5 minutos de estimulación con insulina (Sakaue et al., 1995). Pensamos que este resultado no es comparable con los nuestros porque, como ya hemos comentado, este mutante probablemente inhibe la actividad de ambas proteínas Sos (Sakaue et al., 1995). Adicionalmente, puesto que la cinética de activación de Ras obtenida en este trabajo podría resultar inusual o atípica, queríamos hacer referencia a otros trabajos que han mostrado una cinética parecida. Por ejemplo, en estudios realizados con fibroblastos Swiss3T3 tras la estimulación con FBS y EGF se puede observar un pico de Ras-GTP a los pocos minutos (que en nuestro caso probablemente hemos perdido al escoger 10 minutos como primer punto de ensayo), seguido de una activación menor pero mantenida incluso durante horas (Satoh et al., 1990a; Satoh et al., 1990b). De hecho, ya hemos comentado que tras la estimulación mitogénica, existen dos olas de activación de Ras en la fase G1 del ciclo, una al inicio de la fase G1 y otra a mitad de la misma (Gille and Downward, 1999; Jones and Kazlauskas, 2001b; Taylor and Shalloway, 1996).

Asimismo, se ha descrito una activación bifásica de ERK1/2 en el transcurso del ciclo celular (Kahan et al., 1992; Meloche and Pouyssegur, 2007). La cinética de fosforilación de ERK1/2 y Akt obtenida en este trabajo resultó en su mayor parte inesperada. Por un lado, los MEFs *ko-Sos2* presentaron un incremento en la fosforilación de ERK1/2 (p-ERK1/2) a corto plazo, en un contexto en el que Ras no se encuentra más activo (**Figura 23-B**). Este resultado es difícil de explicar, pues además desconocemos qué ocurre con la activación de Ras antes de 10 minutos. Por ese motivo, cabe la posibilidad de que ésta sea mayor en células *ko-Sos2*, justificando el aumento de p-ERK1/2. Alternativamente, teniendo en cuenta que la estimulación con FBS activa multitud de rutas, la fosforilación de ERK1/2 podría estar alterada por otras vías independientes de Ras. También, se ha sugerido que Sos1 posee mayor potencia biológica que Sos2 (Nielsen et al., 1997), lo cual podría apoyar estas diferencias. Por otra parte, la ausencia de Sos1 provoca una reducción de p-ERK1/2 a medio y largo

plazo (**Figura 23-B**), indicando que Sos2 no puede compensarlo durante ese tiempo. Estos resultados apoyan la idea de que Sos1 participa en la señalización a corto y largo plazo, mientras que Sos2 sólo es capaz de hacerlo a tiempos cortos (Qian et al., 2000). Así, podemos relacionar la menor activación de Ras en *ko-Sos1* a medio y largo plazo (aunque no presente significación estadística) con la disminución de p-ERK1/2 en ese mismo periodo de tiempo (**Figura 23-A y B**). En contraste con nuestros datos, trabajos previos han mostrado una disminución considerable de p-ERK1/2 en MEFs *ko-Sos1* tras 5 minutos de estimulación con EGF (Wang et al., 1997). Probablemente, las discrepancias se deban a que estos MEFs son primarios y a que fueron estimulados con EGF. También en desacuerdo con nuestros resultados, la expresión de Δ Sos en células CHO-IR provoca una disminución casi total de la actividad quinasa de ERK1/2 tras la estimulación con insulina (Sakaue et al., 1995), seguramente por la inhibición de ambas isoformas. Sin embargo, tras la estimulación con 10% FBS durante 5 minutos, no presentan disminución de p-ERK1/2, en consonancia con nuestros datos (Park et al., 2000).

Sorprendentemente, observamos un incremento en los niveles de fosforilación de Akt (p-Akt) en ambas líneas *ko*, aún cuando no existen diferencias en la activación de Ras y su tendencia, al menos a partir de 90 minutos, es a disminuir (**Figura 23-C**). En relación con estos resultados, la expresión del mutante Δ Sos produce un incremento significativo en la activación de la ruta PI3K/Akt (Park et al., 2000), aunque únicamente se hace mención a los datos, sin mostrar ninguna figura. Este resultado, que además coincide en los dos modelos utilizados en este trabajo, podría deberse a una mayor actividad de PI3K. La ausencia de Sos puede ocasionar un desequilibrio estequiométrico en los complejos multi-proteicos que se unen al receptor activado, provocando que PI3K sea reclutada en mayor proporción a la membrana. Este mayor reclutamiento, induciría un aumento en la señalización dependiente de PI3K. Por otro lado, en los datos de los microarrays hemos observado que la subunidad catalítica (*Ppp2ca*) y una de las subunidades reguladoras (*Ppp2r2d*) de la fosfatasa PP2A se encuentran disminuídas en MEFs *ko-Sos1*. Este resultado puede explicar también el aumento de p-Akt, puesto que varios trabajos han demostrado que PP2A es capaz de actuar sobre Akt (Ivaska et al., 2002; Sato et al., 2000). Asimismo, teniendo en cuenta los resultados obtenidos posteriormente en nuestro estudio (**Figura 43**), otra posible explicación (en relación con la anterior), puede estar asociada con un aumento del ROS intracelular, que conduciría a una disminución de la actividad fosfatasa en la célula (Meng et al., 2002; Wright et al., 2009). No obstante, esta hipótesis la explicaremos más adelante, en la discusión del modelo de shRNA, donde se analizaron los niveles de ROS intracelular. Por último, la expresión de *Phlda3*, un competidor específico de Akt en la interacción con la membrana a través del dominio PH (Kawase et al., 2009), está disminuida en MEFs *ko-Sos1*, pudiendo contribuir al aumento de fosforilación de Akt.

A pesar del aumento de p-Akt en ambas líneas *ko*, los resultados obtenidos en la fosforilación de sus efectores no mostraron las diferencias esperadas. Así, en líneas *ko-Sos1*, sólo la fosforilación de p70^{S6K} (Thr389) presentó un ligero aumento tras 30 minutos de estimulación con FBS (**Figura 27-C**), coincidiendo con el pico de p-Akt observado en la **Figura 23-C**. En las muestras tratadas con wortmanina esta fosforilación fue prácticamente indetectable, de acuerdo con su dependencia de la ruta PI3K-Akt (**Figura 27-C**). Por el contrario, la fosforilación de p70^{S6K} en Thr421/ser424, los residuos presuntamente fosforilados por MAPKs (Fenton and Gout, 2011; Ferrari et al., 1992; Mukhopadhyay et al., 1992), p-GSK3 β (Ser9) y p-mTOR (Ser2448), mostraron niveles parecidos a los MEFs *wt* (**Figura 27-A y B**). No obstante, pudimos comprobar que el aumento de expresión de GSK3 β en fibroblastos *ko-Sos1* compensaba la existencia de un pequeño aumento también de p-GSK3 β en estas células (probablemente consecuencia del aumento de p-Akt) (**Figura 25**). Curiosamente, el tratamiento con wortmanina apenas redujo la fosforilación de mTOR en Ser2448 (**Figura 26**), en desacuerdo con algunos trabajos que proponen que este residuo es directamente fosforilado por Akt, y sensible al tratamiento con wortmanina (Nave et al., 1999; Sekulic et al., 2000). En contra de esta idea, otros estudios han demostrado que la fosforilación de mTOR en este residuo aumenta tras la estimulación con factores de crecimiento y nutrientes, es sensible al tratamiento con rapamicina, y es realizada por p70^{S6K} (Chiang and Abraham, 2005; Holz and Blenis, 2005). En cualquier caso, la diferencia entre los genotipos es muy pequeña, indicando que la eliminación de *Sos1* en estas células no parece tener un efecto importante en la fosforilación de mTOR (Ser2448), de GSK3 β (Ser9), ni de p70^{S6K} (Thr421/ser424).

En las líneas *ko-Sos2*, sin embargo, observamos un aumento significativo de p-p70^{S6K} (Thr421/Ser424) tras 30 minutos de estimulación con FBS (**Figura 27-A y B**), coincidiendo con el incremento de p-ERK1/2 en este genotipo. Según el modelo de activación de p70^{S6K}, la fosforilación en los residuos Thr421/Ser424, localizados en su dominio autoinhibitorio, induce un cambio de conformación que permite la posterior fosforilación en Thr389, lo que provoca la activación de esta quinasa (Fenton and Gout, 2011). De hecho, la mayoría de estudios publicados consideran la fosforilación en Thr389 reflejo del estado de activación de p70^{S6K}. En concordancia con el aumento de p-Akt, las líneas *ko-Sos2* también presentan un ligero aumento de p-p70^{S6K} en Thr389 tras 30 minutos de estimulación con FBS (**Figura 27-C**). La inhibición tras el tratamiento con wortmanina fue mucho menor en Thr421/Ser424 que en Thr389 (**Figura 27-C**), reforzando la idea de que ambos residuos están regulados por quinasas diferentes. Estos datos proponen que las MAPKs ERK1/2 (o sus quinasas efectoras), podrían participar en la fosforilación de p70^{S6K} en Thr421/Ser424. Si bien, hay que tener en cuenta que el tratamiento con wortmanina también redujo la fosforilación en estos residuos, indicando que además de las MAPKs, la actividad de la PI3K también parece regular esta fosforilación. Por último, los niveles de p-GSK3 β (Ser9) y p-

mTOR (Ser2448) en *ko-Sos2* fueron comparables a los MEFs *wt* (**Figura 25 y 26**), señalando que la ausencia de *Sos2* tampoco altera la fosforilación de estas proteínas.

La convergencia, y al mismo tiempo el antagonismo, que caracteriza la interacción entre las rutas de las MAPKs y PI3K/Akt, hace complicada la interpretación de estos resultados. Como comentamos en la introducción, además de que ambas rutas comparten muchas de sus proteínas efectoras, como GSK3 β , p70^{S6K} y mTOR, éstas interactúan entre sí añadiendo más complejidad a la regulación de las mismas (Mendoza et al., 2011). Asimismo, la estimulación con FBS, que puede activar múltiples rutas de señalización, redundante en el ruido y complica la observación de una consecuencia más o menos directa de la ausencia de *Sos1*. De hecho, si observamos los resultados del capítulo 3, aunque el aumento de p-Akt tras la estimulación con FBS (**Figura 34**) es incluso mayor que con PDGF (**Figura 36**), el incremento en las fosforilaciones de proteínas efectoras (como GSK3 β) es mayor con PDGF, quizá por la reducción de posibles compensaciones. Es probable que el efecto neto de la estimulación con FBS sobre la fosforilación de estos efectores compense o atenúe las diferencias observadas en p-Akt. De hecho, la posición de estos efectores en la ruta favorece la integración de señales de diversa procedencia sobre la fosforilación de los mismos. Considerando todas las opciones, también es posible que el aumento de p-Akt no sea suficiente para inducir un incremento proporcional en sus efectores, si bien, este argumento no es demasiado sólido teniendo en cuenta los resultados obtenidos con EGF y PDGF en células *shSos1* (**Figura 36**). Por último, la detección de cambios pequeños cuando se utilizan varias líneas distintas de un mismo genotipo es complicado, pues la variabilidad biológica puede ocultar fácilmente las diferencias.

El principal problema que plantean todos estos resultados en conjunto es la controversia entre los datos proliferativos y el estado de fosforilación de las rutas mediadas por Ras. En ambas líneas *ko* hemos observado un retraso de la proliferación, que en fibroblastos *ko-Sos2* no podemos explicar con ninguno de los cambios observados en las rutas de señalización, ya que todas presentan un nivel de fosforilación mayor o igual que las células control. En este contexto, hay que recordar además, que el descenso de la *Ccnd1* no se confirmó en una de las líneas (**Figura 28**). Estos resultados, junto con la oposición que suponen los obtenidos en el análisis proliferativo de clones *shSos2* (**Figura 37**), apuntan a la posibilidad de que el crecimiento de las líneas *ko-Sos2* constituya una característica intrínseca más que una consecuencia de la eliminación de *Sos2*. Aún así, no podemos descartar que realmente sea un efecto de la ausencia de *Sos2*, ni que muchos otros factores que no hemos analizado en este trabajo puedan explicar el retraso proliferativo. Evidentemente, la utilización de un sistema de eliminación inducible sería uno de los mejores escenarios para confirmar el fenotipo debido a la ausencia de una proteína.

Respecto a los resultados en *ko-Sos1*, la señalización a través de las MAPKs ERK1/2 parece estar reducida sólo a largo plazo (seguramente como consecuencia de una menor activa-

ción de Ras que no hemos conseguido demostrar con claridad en este capítulo), mientras que en la ruta de PI3K el incremento de p-Akt no parece transmitirse a sus efectores (con la excepción de p-p70^{S6K} (Thr389) a los 30 minutos de estimulación). La integración de estos resultados con los datos proliferativos resulta más coherente en este caso. Así, se ha descrito que la activación sostenida de ERK es necesaria para la progresión de la fase G1 del ciclo celular (Torii et al., 2006). Esta activación de ERK mantenida en el tiempo es esencial para la expresión de la *Ccnd1* (Balmanno and Cook, 1999; Lavoie et al., 1996; Weber et al., 1997), entre otros genes, y recordemos que los MEFs *ko-Sos1* mostraron un descenso notable de *Ccnd1* y *Ccnd2* (**Figura 28**). Por tanto, estos resultados sugieren que la disminución de *Ccnd1/2*, probablemente debida a la reducción en la activación sostenida de ERK, podría explicar el retraso proliferativo en ausencia de *Sos1*. En relación con este mecanismo de regulación transcripcional, mencionar que no hemos encontrado cambios de expresión significativos en la mayoría de IEGs descritos (Fambrough et al., 1999), consolidando la idea de que la activación de ERK a tiempos cortos no está afectada en células *ko-Sos1*. Sin embargo, la inducción de otros genes de expresión más tardía que requieren la activación sostenida de ERK, como es el caso de *Ccnd1*, se encuentra reducida. En el caso de células *ko-Sos2*, la expresión de estos IEGs tampoco presentó cambios significativos, indicando que en estos MEFs el aumento de p-ERK a corto plazo no tiene un efecto importante sobre la expresión génica.

(iii) Efecto de la eliminación de *Sos* en la muerte celular inducida por estrés oxidativo

Los cambios de expresión en genes implicados en muerte celular y respuesta a estrés en líneas *ko-Sos1* y *ko-Sos2* (detallados en análisis funcional de los microarrays, pág. 75) nos llevaron a preguntarnos si la ausencia de *Sos* podría alterar estos procesos. Los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad celular revelaron por un lado, que no existía muerte celular en ninguna de las líneas *ko* en condiciones normales de crecimiento, por lo que la ausencia de *Sos1* o *Sos2* per sé no afecta a la supervivencia en estas células. Por otro lado, mostraron que la muerte de fibroblastos *ko-Sos1* tras el tratamiento con tBHP, y por tanto en condiciones de estrés oxidativo, era significativamente menor que la de MEFs *wt* y *ko-Sos2* (cuyos resultados fueron muy similares) (**Figura 29**). Lógicamente, el incremento en la fosforilación de Akt detectado en líneas *ko-Sos1* (cerca del doble respecto a MEFs *wt*), y además superior al aumento de p-Akt en *ko-Sos2*, podría estar relacionado con esta mayor supervivencia al estrés oxidativo. Sin embargo, si nos fijamos en los datos de estos mismos experimentos en el modelo de shRNA, observamos el resultado contrario. La fosforilación de Akt aumenta igualmente, pero la muerte celular inducida por tBHP es significativamente mayor en los clones *shSos1* (**Figura 41**). Aunque se discutirá más adelante, creemos que en este caso, los resultados procedentes de un modelo en el que la reducción de *Sos* es posterior al proceso de immortalización, son más fiables, pues la sensibilidad al estrés oxidativo pudo haber sido superada por el proceso de immortalización que dio lugar a las líneas estables.

De todas formas, no podemos descartar otras causas del incremento en la supervivencia de las líneas *ko-Sos1*, como por ejemplo, un defecto en los mecanismos que inducen la muerte celular (más que una mayor señalización de supervivencia). Como comentamos en la discusión del análisis funcional, varios indicios apuntan a una menor actividad de p53 en células *ko-Sos1*. La reducción de varias de sus dianas transcripcionales, y el aumento de expresión de genes implicados en la degradación del mismo (*Ube2I3*), sugieren que las células deficientes en *Sos1* podrían tener problemas para inducir la muerte celular ante estímulos de estrés.

3. Modelo de inhibición estable mediante shRNA

La generación de los clones *shSos1*, *shSos2*, y sus respectivos *shControl*, se realizó con el objetivo de comparar y validar los resultados obtenidos con los MEFs *ko-Sos1* y *ko-Sos2*. Algunos de los resultados obtenidos con estas líneas fueron contradictorios y/o difíciles de interpretar en base a la literatura previa. El hecho de que estos fibroblastos estén inmortalizados, y de que hayamos utilizado varias líneas del mismo genotipo (aunque esto a su vez aporta un valor biológico y estadístico necesario), puede haber influido en el grado de variabilidad, y en determinados casos de incoherencia, obtenido en algunos de los experimentos. Por estas razones, decidimos utilizar una estrategia alternativa, inhibiendo la expresión de *Sos* mediante silenciamiento estable con shRNA en las líneas MEFs *wt* utilizadas previamente (intentando mantener un fondo genético comparable). Este modelo ofrece la ventaja de poder observar los efectos directos de la inhibición de *Sos*, pues no existe un proceso posterior de “selección natural” que pueda modificar el fenotipo. De hecho, varios trabajos han descrito modificaciones en el fenotipo tras la inmortalización de MEFs primarios (derivados de ratones *ko*), por ejemplo, cambios en la tasa de crecimiento de los cultivos (Barriere et al., 2007; Zhang et al., 2010).

(i) Especificidad funcional: papel de *Sos1* en la proliferación y la señalización intracelular

El análisis de la proliferación en clones *shSos1* y *shSos2* reveló que, a diferencia de los MEFs *ko-Sos2*, los fibroblastos *shSos2* no presentaban una reducción en el crecimiento (**Figura 37**). De acuerdo con esto, tampoco observamos diferencias en los perfiles del ciclo celular (**Figura 39-A**). Lógicamente, un 60% de inhibición en clones *shSos2*, no es comparable con la ausencia total de los MEFs *ko-Sos2*, planteando que sólo la pérdida completa de esta proteína podría tener un efecto proliferativo evidente. Sin embargo, si nos fijamos en el resto de resultados obtenidos en ambos modelos (principalmente la activación de las rutas efectoras de Ras), éstos se ajustan mejor al fenotipo de las células *shSos2*, pues es más probable que no existan defectos de crecimiento en un contexto en el que la señalización proliferativa es similar a los controles. Además, una disminución del 60% podría ser suficiente para detectar una reducción en la tasa proliferativa, como demuestra el clon *shSos1*

#2 (**Figura 37**). Por otra parte, la menor proliferación de los clones *shSos1* coincide con el resultado obtenido en células *ko-Sos1*, apoyando la idea de que *Sos1* participa en el control de la proliferación celular. De hecho, tanto el perfil del ciclo celular (incremento del % de células en G1), como la disminución de PCNA y del nivel de fosforilación de RB (Ser780), indican que la inhibición de *Sos1* produce un retraso en la progresión de la fase G1 del ciclo (**Figura 39**). Asimismo, la disminución de las ciclinas *Ccnd1* y *Ccnd2* en clones *shSos1* (tanto a nivel transcripcional como proteico) puede explicar, al menos en parte, el fenotipo proliferativo que observamos en estas células. De acuerdo con estos datos, experimentos realizados en líneas HGF1 (portadoras del mutante hiperactivo de *SOS1*) han demostrado que el incremento en la actividad de *SOS1* resulta en una mayor tasa proliferativa, y en un aumento de la expresión de *Ccnd1*, *Ccnd2*, *CcnE*, PCNA, y de RB fosforilado (Jang et al., 2007). Todos estos datos, junto con la disminución de *Ccnd1* y *Ccnd2* observada también en MEFs *ko-Sos1*, refuerzan el papel de *Sos1* en el control de la expresión de estas ciclinas.

La activación sostenida de ERK1/2 es esencial para la acumulación de la *Ccnd1* durante la fase G1 del ciclo (Balmanno and Cook, 1999; Weber et al., 1997). En el modelo anterior observamos una menor fosforilación de ERK1/2 a largo plazo, y sugerimos que podría ser la responsable de la reducción de *Ccnd1*. En este modelo, no conocemos el nivel de p-ERK1/2 a largo plazo, si bien, dado que el resto de resultados de señalización no pueden explicar esta disminución, y a la vista de las coincidencias en ambos modelos, pensamos que esta hipótesis es probable. En los clones *shSos2*, la presencia de *Ccnd1* probablemente puede compensar la reducción de *Ccnd2*, explicando que no existan cambios en la progresión del ciclo celular (**Figura 38 y 39**).

Continuando con este problema, el efecto de la inhibición de *Sos* sobre la activación de *Rac1* puede ser relevante por varios motivos. Esta GTPasa también regula la expresión génica, y en fibroblastos, favorece la progresión del ciclo celular mediante la inducción de la *Ccnd1* a través de NF- κ B (Joyce et al., 1999), y también independientemente del mismo (Klein et al., 2007; Westwick et al., 1997). A favor de esta idea, como comentamos en la introducción, la activación de PI3K por integrinas en células endoteliales estimula la actividad GEF de *Sos* sobre *Rac1*, cuya activación promueve la progresión del ciclo mediante la expresión de *Ccnd1* (Mettouchi et al., 2001). Además, varios estudios han demostrado que en fibroblastos, NF- κ B regula directamente la inducción de *Ccnd1* tras la estimulación con FBS (Guttridge et al., 1999; Hinz et al., 1999). Por estas razones, aunque la determinación de p-I κ B α (Ser32) no es un análisis directo de la actividad de NF- κ B, y que responder a esa pregunta requiere experimentos adicionales, el resultado obtenido sugiere una disminución de la actividad de NF- κ B en células *shSos1* respecto a *shControl* (**Figura 44-C**). Este dato también podría explicar la reducción del 60% en el mRNA de *Ccnd1* (**Figura 38-A**). Por tanto, sería interesante analizar la activación de *Rac* en fibroblastos deficientes en *Sos1* y *Sos2*, e igualmente comprobar si la activación de NF- κ B por *Rac* tras la estimulación mitogénica es relevante en la progresión del ciclo y la expresión de *Ccnd1* en estas células.

Por otro lado, el análisis de los inhibidores de ciclo $p27^{KIP1}$ y $p21^{CIP1}$, cuyos niveles proteicos también están regulados por las vías de señalización estudiadas, no ha aportado pistas importantes al panorama proliferativo (**Figura 40**). De hecho, aunque el aumento de $p27^{KIP1}$ en células *shSos2* es obvio, no parece tener un efecto evidente en la tasa de crecimiento ni en el perfil del ciclo celular. Sin embargo, la ligera disminución de sus niveles en células *shSos1*, quizá es una consecuencia del aumento en la señalización de la ruta PI3K-Akt, sin que haya llegado a revertir (al menos completamente) el retraso en la progresión de la fase G1.

(ii) Hipótesis del efecto del estrés oxidativo sobre la señalización intracelular

En el estudio de las rutas de señalización, detectamos una clara disminución de Ras activado en células *shSos1*, frente a los resultados previos con MEFs *ko-Sos1*. Además, confirmando los resultados anteriores, observamos niveles de p-ERK similares a los controles y un incremento considerable en la fosforilación de Akt (**Figuras 32, 33 y 34**). La discrepancia en los niveles de activación de Ras podría explicarse porque los MEFs *ko-Sos1* se hayan adaptado en el proceso de immortalización, o porque la variabilidad de las distintas líneas hace que no existan diferencias. Por su parte, los clones *shSos2* presentan en todos los casos niveles de activación semejantes a los controles, indicando que *Sos1* está compensando la ausencia de *Sos2*. Si bien, podemos destacar una tendencia a mayor fosforilación sobre todo en ERK1/2, Akt, y p- $p70^{S6K}$ (Thr421/Ser424), similar a los datos de *ko-Sos2*, y que en ambos casos podría estar relacionada con una mayor potencia biológica de *Sos1* respecto a *Sos2*.

Uno de los aspectos que más nos llamó la atención en los estudios de señalización en clones *shSos1*, fue que prácticamente todas las proteínas analizadas estaban consistentemente más fosforiladas que en las células *shControl*. La excepción la encontramos en p- $p70^{S6K}$ (Thr421/Ser424) tras la estimulación con FBS, cuyo resultado (sin cambios respecto al control) concuerda con los datos obtenidos para ERK1/2, e igualmente con los que observamos en MEFs *ko-Sos1* para los mismos residuos de ERK1/2 y $p70^{S6K}$ (**Figura 35**). Así, observamos un incremento en la fosforilación de Akt, $p70^{S6K}$ (Thr389), GSK3 β (Ser9), y también en JNK (Thr183/Tyr185) tras la estimulación con FBS, que en casi todos los casos se hace más acusado si las células son estimuladas con factores de crecimiento específicos. En estas condiciones (tras la estimulación con PDGF y EGF), incluso la fosforilación de ERK1/2 y $p70^{S6K}$ (Thr421/Ser424) parece mostrar un ligero aumento en clones *shSos1* (**Figura 36-A y B**).

Hasta ese momento, suponíamos que el incremento de p-Akt era el responsable del aumento de p-GSK3 β y p- $p70^{S6K}$ (Thr389). Inesperadamente, la estimulación con EGF en estas células no indujo activación de Akt, indicando que otra/s quinasas debían ser las responsables del incremento en las fosforilaciones de las proteínas efectoras tras la estimulación con EGF. Una posible candidata sería la quinasa SGK, pues es activada por PI3K y pertenece

a la familia de quinasas AGC, pudiendo compartir muchos de los sustratos de esta familia de quinasas (Mendoza et al., 2011; Vivanco and Sawyers, 2002). Sin embargo, existe un dato quizá más relevante, que nos hizo plantearnos otra hipótesis diferente. Curiosamente, en condiciones de privación de suero, en las que no existen señales mitogénicas extracelulares, observamos niveles de fosforilación en proteínas como GSK3 β y p70^{S6K} (Thr389), que en algunos casos llegaban a superar los niveles de fosforilación de las células control estimuladas con factores de crecimiento (**Figura 36-B**, ver fosforilación basal de GSK3 β). Estos resultados no podíamos interpretarlos como una consecuencia del aumento en la actividad de PI3K o de una mayor activación de Akt, sino que más bien apuntaban a un mecanismo distinto. En este sentido, habíamos descubierto que en condiciones normales, las células *shSos1* presentaban un incremento de los niveles de ROS intracelular respecto a *shControl* (**Figura 43-C**). Diversos trabajos han demostrado que un aumento de ROS puede provocar la oxidación e inactivación reversible de diversas fosfatasa celulares, provocando un aumento de la señalización intracelular (Meng et al., 2002; Whisler et al., 1995). Esta idea podría explicar que la mayoría de proteínas se encuentren en un estado de mayor fosforilación incluso en ausencia de un estímulo extracelular. Adicionalmente, los resultados de los microarrays mostraron una reducción de la expresión de PP2A, que también podría contribuir a este aumento de la fosforilación.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son generadas durante el metabolismo oxidativo mitocondrial y también en respuesta a citoquinas, compuestos xenobióticos y agentes infecciosos. Estas especies funcionan como moléculas señalizadoras, y regulan la proliferación y la supervivencia celular mediante su efecto sobre rutas de señalización intracelular, como las MAPKs y PI3K/Akt (Guyton et al., 1996; Martindale and Holbrook, 2002; Ray et al., 2012; Wang et al., 2000). Así, se ha demostrado que JNK y p38 pueden ser activadas por un aumento de ROS a través de la activación de ASK1 (Gotoh and Cooper, 1998; Tobiume et al., 2001), y que la ruta PI3K/Akt es estimulada en condiciones de estrés oxidativo (Van der Kaay et al., 1999; Wang et al., 2000). Igualmente, uno de los principales mecanismos por los que ROS estimula la señalización intracelular es a través de la inhibición de fosfatasa (Meng et al., 2002; Wright et al., 2009). Por ejemplo, la inhibición de MKPs por un aumento de ROS provoca la activación sostenida de JNK (Kamata et al., 2005). Asimismo, se ha descrito que las MAPKs JNK, p38 y ERK1/2, pueden ser activadas en condiciones de estrés oxidativo por la inhibición de las fosfatasa PP2A y PP5 (Chen et al., 2009). De la misma manera, se ha demostrado que la generación de ROS tras la estimulación con insulina activa la ruta PI3K/Akt mediante la inactivación de PTEN (Seo et al., 2005). En consonancia con estos datos, la fosforilación de JNK en Thr183/Tyr185 es superior en células *shSos1* respecto a *shControl*, apoyando la hipótesis de que el aumento de ROS intracelular genere una situación de estrés oxidativo en células silenciadas para *Sos1*. Del mismo modo, sería importante analizar la activación de p38 en estas células, y comprobar mediante el uso de antioxidantes como la N-acetilcisteína (NAC) que tanto ésta como JNK son activadas por ROS.

El estrés oxidativo puede ser resultado de un aumento en la generación de ROS intracelular (debido a alteraciones en la mitocondria, a un incremento de la tasa metabólica, etc) o de un defecto en los mecanismos antioxidantes. En la sección de resultados, comentamos que la actividad de las enzimas SOD suponen un mecanismo muy importante en la defensa antioxidante de la célula (Miao and St Clair, 2009). En este contexto, el análisis de la muerte celular inducida por tBHP demostró que las células con silenciamiento de *Sos1*, pero no de *Sos2*, eran significativamente más susceptibles al estrés oxidativo que sus respectivos controles (**Figuras 41 y 42**). Dado que los fibroblastos *shSos1* presentaban una hiperpolarización de la membrana mitocondrial y un aumento de ROS intracelular en condiciones normales, analizamos la inducción transcripcional de *Sod2*, pues su función es clave en la detoxificación del ROS mitocondria (Balaban et al., 2005; Miao and St Clair, 2009). Pese a que el mRNA de *Sod2* en células *shSos1* y *shSos2* se encontraba reducido (si bien en *shSos2* la reducción era muy pequeña), los niveles proteicos resultaron en cierto modo, inesperados. Así, observamos que la reducción de *Sod2* en células *shSos1* era sólo del 20%, un descenso que en principio, parece insuficiente para explicar el aumento de ROS intracelular y la hipersensibilidad al estrés oxidativo. Si bien, no podemos descartar que esta pequeña disminución pueda contribuir al fenotipo, ni tampoco que sea suficiente a nivel local (en la mitocondria) para provocar estas alteraciones. En cambio, en células *shSos2* observamos incluso un incremento en la cantidad de *Sod2* respecto a su control (**Figura 44**). Este aumento puede explicar por un lado, que en estas células el nivel de ROS intracelular (en condiciones normales) se mantenga constante respecto a células *shControl*, y que además, no se encuentren diferencias significativas en la muerte inducida por tBHP (**Figura 42**). Por otro lado, sugiere que los niveles proteicos de *Sod2* están siendo regulados por otros mecanismos adicionales, que finalmente resultan en un aumento de la misma (**Figura 44-A y B**).

A pesar de que la reducción en la viabilidad de los clones *shSos2* tras el tratamiento con tBHP no fue significativa estadísticamente, todos los experimentos realizados presentaron un ligero aumento de la muerte en clones *shSos2* respecto a su control (**Figura 42**). En relación con esta valoración, es evidente que ninguno de los clones (*shSos1* o *shSos2*) es capaz de neutralizar el aumento de ROS provocado por el tBHP, pues se detectaron niveles muy superiores de ROS intracelular en estos clones respecto a sus respectivos controles (**Figura 43-A y C**). Esta menor capacidad de defensa probablemente contribuye al aumento de la susceptibilidad a la muerte celular, especialmente en células *shSos1*. En conjunto, todos estos resultados apuntan un defecto en el sistema de defensa antioxidante más que un aumento en la generación de ROS. De hecho, las células *shSos2* también acumulan un exceso de ROS respecto a células *shControl* tras el tratamiento con tBHP, pese a no mostrar alteraciones en los niveles de ROS en condiciones normales.

Por otra parte, aunque no existan cambios importantes en los niveles proteicos de Sod2, hemos observado que en células *shSos1* la inducción de su actividad transcripcional es significativamente menor. Varios estudios han demostrado que NF- κ B es uno de los principales factores de transcripción que inducen la expresión de Sod2 (Bernard et al., 2002; Kiningham et al., 2001; Pahl, 1999), y como hemos comentado anteriormente, aunque el análisis de p-I κ B α (Ser32) evalúa indirectamente la actividad de NF- κ B, el resultado sugiere una disminución de la actividad de NF- κ B en células *shSos1* (**Figura 44-C**), que podría explicar la reducción del 40% en el mRNA de *Sod2*. No obstante, como se ha sugerido previamente, la confirmación de estas hipótesis necesita experimentos adicionales para comprobar que la inducción de *Sod2* y *Ccnd1* mediada por NF- κ B es menor.

La expresión de muchas enzimas antioxidantes es inducible, por lo que aumenta considerablemente en condiciones de estrés oxidativo. Tal vez éste es el caso de Sod2, y en condiciones de estrés oxidativo (tratamiento con tBHP), las células *shSos1* no son capaces de inducir la expresión de Sod2 (mediante NF- κ B u otros factores de transcripción) necesaria para neutralizar el exceso de ROS, en comparación con los controles. Si analizamos la expresión proteica de Sod2 y su inducción transcripcional en condiciones de estrés oxidativo podríamos averiguar el grado de contribución de esta enzima al fenotipo de las células *shSos1* y *shSos2*. No obstante, es ineludible la necesidad de analizar la expresión y actividad de otras enzimas antioxidantes y otros mecanismos de defensa ante el estrés oxidativo.

Por último, el análisis del $\Delta\Psi_m$ en condiciones normales reveló la existencia de una hiperpolarización de la membrana mitocondrial en células *shSos1* (**Figura 43-A y B**). A la vista de estos resultados, es interesante señalar que varios genes diferencialmente expresados en MEFs *ko-Sos1* están implicados de alguna manera en la función mitocondrial y/o el estrés oxidativo, y que curiosamente, están todos sobreexpresados. Entre ellos, destacamos *Oxr1* (implicado en la protección frente al estrés oxidativo) (Jaramillo-Gutierrez et al., 2010), y un grupo de genes cuyos productos están localizados en la mitocondria (*Dnaja3*, *Timm9*, *Mfn2*, *Mrlp39*, *Mnat1*). La mayoría de ellos codifican proteínas con un papel esencial en la homeostasis mitocondrial, y algunos ya los hemos comentado previamente por su función en las mitocondrias de cardiomiocitos y por tanto, su relevancia en el desarrollo cardíaco (*Dnaja3*, *Mfn2*).

En resumen, la eliminación de *Sos1* disminuye la tasa de proliferación en cultivo, probablemente por la reducción de *Ccnd1* y *Ccnd2*. La disminución de estas proteínas puede deberse a la menor actividad de factores de transcripción regulados directa o indirectamente por *Sos1*; éstos podrían ser aquellos controlados por la activación sostenida de ERK1/2 (como AP-1) o también regulados por Rac1, como NF- κ B. Al mismo tiempo, en contra de lo esperado tras la eliminación de un GEF de Ras, hemos observado un aumento generalizado en la fosforilación de varias proteínas efectoras de las rutas de PI3K/Akt y MAPKs.

Este aumento en la fosforilación puede ser debido al incremento de ROS intracelular en células *shSos1*, pues éste afecta a las fosfatasas celulares inhibiendo reversiblemente su actividad. Asimismo, el incremento de ROS intracelular está asociado a una hiperpolarización de la membrana mitocondrial, si bien no es posible concluir cuál de las dos alteraciones es el origen de la otra con los experimentos presentados en este trabajo. El daño en las mitocondrias podría estar relacionado con la alteración de la expresión génica asociada con la homeostasis de la misma y/o con un defecto en la inducción de la enzima antioxidante mitocondrial Sod2. Ambas situaciones podrían desencadenar un aumento del ROS intracelular. Alternativamente, el aumento de *Glpr1* tras la eliminación de *Sos1* también podría explicar el aumento de ROS (Li et al., 2008) y éste provocar la alteración mitocondrial.

Conclusiones

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en ambas aproximaciones hemos llegado a las siguientes conclusiones:

- 1.** La eliminación de *Sos1* produce un mayor impacto sobre el transcriptoma celular que la eliminación de *Sos2*, cuya ausencia apenas produce cambios en la expresión génica.
- 2.** El perfil de expresión diferencial de células *ko-Sos1* sugiere una implicación de éste en varios aspectos del metabolismo celular, la regulación de la expresión génica, el desarrollo embrionario, el sistema inmune, y también en procesos como la angiogénesis y la homeostasis del sistema cardiovascular. Además, también hemos encontrado cambios de expresión en diversos genes asociados al crecimiento y la proliferación celular, así como la respuesta a estrés y la muerte celular.
- 3.** Las líneas deficientes en *Sos1* presentan una disminución de la tasa proliferativa, mientras que en ausencia de *Sos2* no hemos obtenido resultados concluyentes. Asimismo, la ausencia de *Sos1* provoca una fuerte reducción en los niveles de mRNA y proteína de *Ccnd1* y *Ccnd2*.
- 4.** La activación de Ras y la fosforilación de ERK1/2 a largo plazo están reducidas en los MEFs *ko-Sos1*.
- 5.** En contra de lo esperado, la ausencia de las proteínas Sos produce un aumento de la señalización intracelular. Así, la eliminación de *Sos1* genera un incremento en la fosforilación de diversas proteínas de la señalización efectora, principalmente Akt, GSK3 β y p70^{S6K} (Thr389), mientras que la ausencia de *Sos2* produce un ligero aumento en la fosforilación de ERK1/2 y p70^{S6K} en los residuos Thr421/Ser424.

6. El silenciamiento de Sos1 genera un incremento en los niveles de ROS intracelular y en el potencial de membrana mitocondrial en condiciones normales. En este sentido, hemos observado un aumento en la susceptibilidad al estrés oxidativo en ausencia de las proteínas Sos, más acusado en el caso de Sos1.

7. En conjunto, los resultados presentados en este trabajo apoyan la idea de la especificidad funcional entre Sos1 y Sos2, con especial relevancia del papel de Sos1 en la regulación de la señalización intracelular, la expresión génica, la progresión del ciclo celular, y por último, la función mitocondrial y el control del estado redox celular.

Apéndice

Tabla 6. Transcritos expresados diferencialmente en fibroblastos *ko-Sos1* respecto al grupo Control. El FDR (False discovery rate) en este análisis es de 0,0075. El d-valor representa la consistencia en la diferencia de expresión. El Log₂ Fold corresponde al log2 del ratio entre la expresión del transcritos en *ko-Sos1* y en el grupo Control. La última columna incluye el cambio de expresión obtenido en la validación por PCR cuantitativa, y un asterisco cuando el cambio fue validado por Wester blot (*).

Ensembl ID	Símbolo	Descripción	d-valor	Log ₂ Fold	Validación RT-PCR & WB
ENSMUST00000049658	Pitpnm1	phosphatidylinositol transfer protein, membrane-associated 1 Gene	-15,2	-3,23	-6,06
ENSMUST00000021513	Gsc	goosecoid homeobox Gene	12,2	1,94	8,81
ENSMUST00000111131	Cd59b	CD59b antigen Gene	10,7	2,28	
ENSMUST00000058159	Cnrip1	cannabinoid receptor interacting protein 1 Gene	-10,4	-2,25	-3,84
ENSMUST00000051667	Zfp105	zinc finger protein 105 Gene	-9,3	-1,58	-3,11
ENSMUST00000050684	Foxf1a	forkhead box F1a Gene	9,2	1,42	8,02
ENSMUST00000048731	2610034B18Rik	RIKEN cDNA 2610034B18 Gene	-8,8	-2,05	
ENSMUST00000040865	Tmem98	transmembrane protein 98 Gene	-8,4	-1,46	
ENSMUST00000098351	AC124170.2	Putative uncharacterized protein	8,4	1,71	
ENSMUST00000011400	Adam19	a disintegrin and metallopeptidase domain 19 (meltrin beta) Gene	-8	-2,05	-2,74
ENSMUST00000066496	Nudcd3	NudC domain containing 3 Gene	-7,3	-0,96	-0,64
ENSMUST00000087086	Pax3	paired box gene 3 Gene	7,2	1,47	5,01
ENSMUST00000038743	Tmc4	transmembrane channel-like gene family 4 Gene	-7,1	-1,23	
ENSMUST00000094769	9930104L06Rik	RIKEN cDNA 9930104L06 Gene	7,1	0,60	
ENSMUST00000028288	Notch1	Notch gene homolog 1 (Drosophila) Gene	-7	-1,15	-1,18
ENSMUST00000021171	1110005A03Rik	RIKEN cDNA 1110005A03 Gene	-7	-1,38	
ENSMUST00000031004	Crmp1	collapsin response mediator protein 1 Gene	-7	-2,07	
ENSMUST00000043836	MacroD2	MACRO domain containing 2 Gene	7	1,11	
ENSMUST00000004994	Pax3	paired box gene 3 Gene	7	1,53	
ENSMUST00000062804	Fut8	fucosyltransferase 8 Gene	6,9	1,25	2,69
ENSMUST00000111417	Zfp664	zinc finger protein 664 Gene	6,8	0,69	1,88
ENSMUST00000073302	Arhgap24	Rho GTPase activating protein 24 Gene	-6,7	-1,33	-0,23
ENSMUST00000006814	Abhd1	abhydrolase domain containing 1 Gene	6,6	1,77	
ENSMUST00000075946	Eaf2	ELL associated factor 2 Gene	6,5	0,97	2,88
ENSMUST00000031410	Mapkapk5	MAP kinase-activated protein kinase 5 Gene	6,5	0,76	1,42

Apéndice

Ensembl ID	Símbolo	Descripción	d-valor	Log ₂ Fold	Validación RT-PCR & WB
ENSMUST00000114281	Rgs12	regulator of G-protein signaling 12 Gene	-6,4	-1,14	-0,43
ENSMUST00000033804	Zcchc18	zinc finger, CCHC domain containing 18 Gene	-6,4	-1,30	
ENSMUST00000017332	Ccdc56	coiled-coil domain containing 56 Gene	-6,3	-0,88	
ENSMUST00000008878	Gprc5b	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member B Gene	-6,3	-1,89	
ENSMUST00000023807	Igfbp6	insulin-like growth factor binding protein 6 Gene	-6,3	-3,45	-3,19
ENSMUST00000087978	Edg3	sphingosine-1-phosphate receptor 3 Gene	-6,3	-2,19	-1,69
ENSMUST00000038096	BC032265	Ketosamine-3-kinase (Fructosamine-3-kinase-related protein)	6,3	2,23	
ENSMUST00000052529	Ppp1r15b	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15b Gene	-6,2	-0,97	
ENSMUST00000042869	1500031L02Rik	RIKEN cDNA 1500031L02 Gene	6,2	0,59	
ENSMUST00000029852	Lhx8	LIM homeobox protein 8 Gene	-6,1	-3,37	-5,64
ENSMUST00000072719	2310004I24Rik	RIKEN cDNA 2310004I24 Gene	-6	-0,62	
ENSMUST00000059206	Pstpip1	proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 1 Gene	-6	-0,66	
ENSMUST00000114280	Rgs12	regulator of G-protein signaling 12 Gene	-6	-1,12	
ENSMUST00000088172	Hs6st2	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 2 Gene	-6	-1,56	
ENSMUST00000061826	B3galnt1	UDP-GalNAc:betaGlcNAc beta 1,3-galactosaminyltransferase, polypeptide 1 Gene	-6	-1,21	
ENSMUST00000002924	Tmem39a	transmembrane protein 39a Gene	6	0,68	
ENSMUST00000034183	4933436C20Rik	RIKEN cDNA 4933436C20 Gene	6	0,77	
ENSMUST00000111787	Mapkapk5	MAP kinase-activated protein kinase 5 Gene	6	0,77	
ENSMUST00000055096	Ttc12	tetratricopeptide repeat domain 12 Gene	-5,9	-1,38	
ENSMUST00000038570	Nipsnap1	4-nitrophenylphosphatase domain and non-neuronal SNAP25-like protein (homoellegans) Gene	-5,9	-1,29	
ENSMUST00000020741	Drg1	developmentally regulated GTP binding protein 1 Gene	-5,9	-0,64	-0,18
ENSMUST00000045970	Gpc1	glypican 1 Gene	5,9	1,24	
ENSMUST00000068714	Sos1	Son of sevenless homolog 1 (Drosophila) Gene	-5,8	-0,99	*
ENSMUST00000033342	Eif3f	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit F Gene	-5,8	-0,56	
ENSMUST00000035194	Mapkapk3	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3 Gene	-5,8	-1,84	-2,74
ENSMUST00000066983	Abhd10	abhydrolase domain containing 10 Gene	5,8	0,74	
ENSMUST00000058762	Pam	peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase Gene	-5,7	-1,35	
ENSMUST00000084852	Numa1	nuclear mitotic apparatus protein 1 Gene	-5,7	-0,65	
ENSMUST00000096255	Ubxn1	UBX domain protein 1 Gene	-5,7	-0,72	
ENSMUST00000106546	Iqck	IQ motif containing K Gene	-5,7	-1,07	
ENSMUST00000022059	Ahrr	aryl-hydrocarbon receptor repressor Gene	5,7	1,50	

Ensembl ID	Símbolo	Descripción	d-valor	Log ₂ Fold	Validación RT-PCR & WB
ENSMUST00000036411	Abhd10	abhydrolase domain containing 10 Gene	5,7	0,74	
ENSMUST00000051950	Atxn2	ataxin 2 Gene	5,7	0,58	
ENSMUST00000032865	Fah	fumarylacetoacetate hydrolase Gene	-5,6	-1,50	
ENSMUST00000070070	Dnaja4	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 4 Gene	-5,6	-0,86	
ENSMUST00000054556	Taf10	TAF10 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor Gene	-5,6	-0,83	
ENSMUST00000050952	Stbd1	starch binding domain 1 Gene	5,6	1,73	
ENSMUST00000041648	Tbc1d4	TBC1 domain family, member 4 Gene	5,6	0,87	
ENSMUST00000110795	Tbc1d4	TBC1 domain family, member 4 Gene	5,6	0,84	
ENSMUST00000023829	Cdkn1a	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21) Gene	-5,5	-2,65	*
ENSMUST00000020576	Ccng1	cyclin G1 Gene	-5,5	-2,41	*
ENSMUST00000084214	Eif4g3	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 3 Gene	-5,5	-1,08	
ENSMUST00000068264	Meis1	Meis homeobox 1 Gene	-5,5	-1,74	
ENSMUST00000035148	Slco2a1	solute carrier organic anion transporter family, member 2a1 Gene	-5,5	-2,46	-7,06
ENSMUST00000105098	Foxd1	forkhead box D1 Gene	5,5	1,42	
ENSMUST00000108523	Derl2	Der1-like domain family, member 2 Gene	-5,4	-0,83	
ENSMUST00000023054	Apobec3	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 3 Gene	-5,4	-0,83	
ENSMUST00000001187	Anxa4	annexin A4 Gene	-5,4	-1,15	
ENSMUST00000029865	Trp53inp1	transformation related protein 53 inducible nuclear protein 1 Gene	-5,3	-1,55	
ENSMUST00000037678	Dak	dihydroxyacetone kinase 2 homolog (yeast) Gene	-5,3	-0,56	
ENSMUST00000095396	Gm4799	NA	-5,3	-0,84	
ENSMUST00000027606	Rgs2	regulator of G-protein signaling 2 Gene	-5,3	-1,41	
ENSMUST00000004120	Fancl	Fanconi anemia, complementation group L Gene	-5,3	-0,54	
ENSMUST00000019749	Hoxd8	homeo box D8 Gene	-5,3	-2,34	
ENSMUST00000021523	Mnat1	menage a trois 1 Gene	5,3	0,55	
ENSMUST00000026390	Rabgef1	RAB guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1 Gene	5,3	0,72	
ENSMUST00000108782	Gm2348	NA	5,3	0,98	
ENSMUST00000024858	Galnt14	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 14 Gene	5,3	1,10	
ENSMUST00000028801	Spef1	sperm flagellar 1 Gene	5,3	0,52	
ENSMUST00000033158	Ubf1	ubiquitin family domain containing 1 Gene	-5,2	-0,82	
ENSMUST00000018586	Derl2	Der1-like domain family, member 2 Gene	-5,2	-0,82	
ENSMUST00000078362	Vrk2	vaccinia related kinase 2 Gene	-5,2	-0,72	

Apéndice

Ensembl ID	Símbolo	Descripción	d-valor	Log2 Fold	Validación RT-PCR & WB
ENSMUST00000096251	1810009A15Rik	RIKEN cDNA 1810009A15 Gene	-5,1	-0,77	
ENSMUST00000017839	Rnf135	ring finger protein 135 Gene	-5,1	-1,18	
ENSMUST00000109504	Vrk2	vaccinia related kinase 2 Gene	-5,1	-0,70	
ENSMUST00000020685	Pttg1	pituitary tumor-transforming 1 Gene	-5,1	-1,47	
ENSMUST00000078482	Dchs1	dachsous 1 (Drosophila) Gene	-5,1	-2,06	
ENSMUST00000114384	Gm1673	gene model 1673, (NCBI) Gene	-5,1	-0,76	
ENSMUST00000115805	Ntan1	N-terminal Asn amidase Gene	5,1	0,70	
ENSMUST00000114193	Atp5j	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial FO complex, subunit F Gene	5,1	0,37	
ENSMUST00000114191	Atp5j	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial FO complex, subunit F Gene	5,1	0,37	
ENSMUST00000071745	Rps4y2	ribosomal protein S4, Y-linked 2 Gene	5,1	2,74	12,56
ENSMUST00000023608	Atp5j	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial FO complex, subunit F Gene	5,1	0,37	
ENSMUST00000023362	Ntan1	N-terminal Asn amidase Gene	5,1	0,65	
ENSMUST00000048116	Slc7a1	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 1 Gene	5,1	0,64	
ENSMUST00000086090	Sec61g	SEC61, gamma subunit	-5	-0,41	
ENSMUST00000038945	Phlda3	pleckstrin homology-like domain, family A, member 3 Gene	-5	-1,11	
ENSMUST00000041623	Enc1	ectodermal-neural cortex 1 Gene	-5	-1,05	
ENSMUST00000037649	Rab3gap1	RAB3 GTPase activating protein subunit 1 Gene	-5	-0,52	
ENSMUST00000038574	Dhx29	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 29 Gene	-5	-0,55	
ENSMUST00000066778	Pi4k2a	phosphatidylinositol 4-kinase type 2 alpha Gene	-5	-0,39	
ENSMUST00000070000	Arhgap24	Rho GTPase activating protein 24 Gene	-5	-0,68	
ENSMUST00000064831	Entpd4	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 4 Gene	5	1,03	
ENSMUST00000022918	Oxr1	oxidation resistance 1 Gene	5	1,71	
ENSMUST00000046426	Tpcn1	two pore channel 1 Gene	5	0,87	
ENSMUST00000031423	Atp2a2	ATPase, Ca++ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2 Gene	5	0,42	
ENSMUST00000080817	Rnf169	ring finger protein 169 Gene	-4,9	-1,03	
ENSMUST00000096253	AI462493	Uncharacterized protein C11orf83 homolog Precursor	-4,9	-0,58	
ENSMUST00000102573	Trim44	tripartite motif-containing 44 Gene	-4,9	-1,24	
ENSMUST00000112177	Sfmbt1	Scm-like with four mbt domains 1 Gene	-4,9	-0,62	
ENSMUST00000035651	Lrrc17	leucine rich repeat containing 17 Gene	-4,9	-0,97	
ENSMUST00000033004	Il4ra	interleukin 4 receptor, alpha Gene	-4,9	-0,90	
ENSMUST00000020687	Pttg1	pituitary tumor-transforming 1 Gene	-4,9	-1,24	
ENSMUST00000042750	2810432L12Rik	RIKEN cDNA 2810432L12 gene Gene	-4,9	-1,08	

Ensembl ID	Símbolo	Descripción	d-valor	Log ₂ FOLD	Validación RT-PCR & WB
ENSMUST00000033383	Usp11	ubiquitin specific peptidase 11 Gene	-4,9	-1,74	
ENSMUST00000005532	Nid1	Nidogen 1	-4,9	-0,89	
ENSMUST00000023570	Btg3	B-cell translocation gene 3	4,9	0,61	
ENSMUST00000059737	Gm6816	NA	4,9	2,61	
ENSMUST00000026485	Hdhd2	haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 2	4,9	0,51	
ENSMUST00000112591	Galnt14	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 14 Gene	4,9	0,87	

Tabla 7. Transcritos expresados diferencialmente en fibroblastos *ko-Sos2* respecto al grupo Control. El FDR (False discovery rate) en este análisis es de 0,52. El d-valor representa la consistencia en la diferencia de expresión. El Log₂ Fold corresponde al log2 del ratio entre la expresión del transcritos en *ko-Sos1* y en el grupo Control. La última columna incluye el cambio de expresión obtenido en la validación por PCR cuantitativa, y un asterisco cuando el cambio fue validado por Western blot (*)

Ensembl ID	Símbolos	Descripción	d-valor	Log ₂ FOLD	Validación RT-PCR & WB
ENSMUST00000074805	Glipr1	GLI pathogenesis-related 1 (glioma) Gene	11,3	2,66	7,36
ENSMUST00000010751	Pigyl	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class Y-like Gene	9,2	0,55	
ENSMUST00000030947	Mxra8	matrix-remodelling associated 8	-7,6	-0,95	
ENSMUST00000095784	Moxd1	monooxygenase, DBH-like 1 Gene	7,4	2,89	5,71
ENSMUST00000031597	1300012G16Rik	RIKEN cDNA 1300012G16 Gene	-7,4	-0,64	
ENSMUST00000034591	Bace1	beta-site APP cleaving enzyme 1	-7,2	-0,93	
ENSMUST00000039876	Phr1	MYC binding protein 2 Gene	-7	-0,68	
ENSMUST00000111613	P2rx3	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 3 Gene	6,6	1,23	
ENSMUST00000102840	Ass1	argininosuccinate synthetase 1	-6,3	-1,90	
ENSMUST00000097715	Mrpl43	mitochondrial ribosomal protein L43 Gene	6,2	0,33	
ENSMUST00000047368	Mnd1	meiotic nuclear divisions 1 homolog (S. cerevisiae) Gene	6,2	1,46	
ENSMUST00000053865	NR_002687.1	NA	-6,2	-1,88	
ENSMUST00000027237	Il18rap	interleukin 18 receptor accessory protein Gene	6,1	1,08	
ENSMUST00000033010	Jmjd5	jumonji domain containing 5 Gene	6,1	0,30	
ENSMUST00000049509	Al427515	vesicle amine transport protein 1 homolog-like (T. californica) Gene	5,9	0,92	
ENSMUST00000035116	Pccb	propionyl Coenzyme A carboxylase, beta polypeptide Gene	-5,9	-0,70	
ENSMUST00000022781	Dad1	defender against cell death 1	-5,9	-0,78	
ENSMUST00000031051	Cgref1	cell growth regulator with EF hand domain 1 Gene	-5,9	-1,55	-2,00
ENSMUST00000057684	Ptk2	PTK2 protein tyrosine kinase 2	5,8	1,05	1,65
ENSMUST00000076133	Ube2e2	ubiquitin-conjugating enzyme E2E 2 (UBC4/5 homolog, yeast) Gene	-5,7	-1,39	-0,96
ENSMUST00000028114	Pfkfb3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3 Gene	5,6	0,85	
ENSMUST00000002403	Dhrs1	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 1 Gene	-5,5	-0,90	
ENSMUST00000049507	Pcsk9	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 Gene	5,5	1,03	
ENSMUST00000100393	Srebf2	sterol regulatory element binding factor 2 Gene	5,5	1,09	
ENSMUST00000022550	Extl3	exostosins (multiple)-like 3 Gene	-5,4	-0,66	
ENSMUST00000022310	Ngly1	N-glycanase 1 Gene	-5,4	-1,20	
ENSMUST00000023100	Srebf2	sterol regulatory element binding factor 2 Gene	5,4	1,00	
ENSMUST00000048655	Dusp10	dual specificity phosphatase 10	5,3	0,90	2,43
ENSMUST00000051484	Mageh1	melanoma antigen, family H, 1	-5,3	-1,07	
ENSMUST00000029105	Lime1	zinc finger, CCCH-type with G patch domain Gene	-5,3	-0,47	
ENSMUST00000042564	Ghitm	growth hormone inducible transmembrane protein Gene	-5,2	-0,63	

Ensembl ID	Símbolos	Descripción	d-valor	Log ₂ FOLD	Validación RT-PCR & WB
ENSMUST00000008032	Crif1	cytokine receptor-like factor 1 Gene	-5,2	-3,02	-3,35
ENSMUST000000050569	R3hcc1	R3H domain and coiled-coil containing 1 Gene	-5,2	-0,66	
ENSMUST000000022369	Vcl	vinculin Gene	-5,2	-0,56	
ENSMUST000000022782	Lrp10	low-density lipoprotein receptor-related protein 10 Gene	-5,2	-0,48	
ENSMUST000000048393	9430023L20Rik	RIKEN cDNA 9430023L20 Gene	5,1	0,47	
ENSMUST000000006632	Zdhhc24	zinc finger, DHHC domain containing 24 Gene	-5	-0,29	
ENSMUST000000047490	Ndst2	N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 2 Gene	-5	-0,61	
ENSMUST000000039803	Ubac2	ubiquitin associated domain containing 2 Gene	-5	-0,39	
ENSMUST000000034558	4833427G06Rik	RIKEN cDNA 4833427G06 Gene	-5	-1,80	
ENSMUST000000022296	Ube2e1	ubiquitin-conjugating enzyme E2E 1, UBC4/5 homolog (yeast) Gene	-5	-0,60	
ENSMUST000000088420	Tsc2	tuberous sclerosis 2 Gene	-5	-0,69	
ENSMUST000000087629	Htra3	HtrA serine peptidase 3 Gene	5	0,95	
ENSMUST000000022377	Txndc16	thioredoxin domain containing 16	-5	-1,75	
ENSMUST000000036877	Dennd2a	DENN/MADD domain containing 2A	-4,9	-1,33	
ENSMUST000000089688	Mmp14	matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted) Gene	-4,9	-1,65	-2,71
ENSMUST000000033805	Psmc10	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 10 Gene	4,9	0,43	
ENSMUST000000056700	Hspa14	Putative uncharacterized protein	4,9	0,36	
ENSMUST000000039110	Shc1	src homology 2 domain-containing transforming protein C1 Gene	-4,9	-0,63	
ENSMUST000000038612	C78409	solute carrier family 26, member 10	-4,8	-1,38	
ENSMUST000000006914	B4galnt1	beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 1 Gene	-4,8	-1,39	
ENSMUST000000028250	Mrrf	mitochondrial ribosome recycling factor Gene	4,7	0,61	
ENSMUST000000033920	Aga	aspartylglucosaminidase Gene	-4,7	-0,66	
ENSMUST000000063272	Tmem175	transmembrane protein 175 Gene	-4,7	-0,74	
ENSMUST000000061767	Crebzf	CREB/ATF bZIP transcription factor	4,7	0,79	
ENSMUST000000091002	Fhdc1	FH2 domain containing 1 Gene	-4,7	-1,00	
ENSMUST000000022693	Bmp1	bone morphogenetic protein 1	-4,7	-1,00	
ENSMUST000000062148	Mcts2	malignant T cell amplified sequence 2 Gene	4,7	0,77	
ENSMUST000000064167	Rnf11	ring finger protein 11 Gene	4,7	0,34	
ENSMUST000000047652	Tspan14	tetraspanin 14 Gene	-4,6	-1,11	
ENSMUST000000022378	Ero1l	ERO1-like (<i>S. cerevisiae</i>) Gene	-4,6	-0,94	
ENSMUST000000089332	Col8a1	collagen, type VIII, alpha 1 Gene	-4,6	-2,55	
ENSMUST000000044107	Sestd1	SEC14 and spectrin domains 1 Gene	4,6	0,38	
ENSMUST000000049064	Rap2b	RAP2B, member of RAS oncogene family Gene	-4,6	-0,31	
ENSMUST000000043441	2900008C10Rik	BCL6 interacting corepressor Gene	4,6	0,30	
ENSMUST000000007012	Sod2	superoxide dismutase 2, mitochondrial Gene	-4,6	-0,57	
ENSMUST000000056712	Pcdhb4	protocadherin beta 4 Gene	-4,6	-0,43	
ENSMUST000000019723	D17Wsu104e	UPF0556 protein C19orf10 homolog Precursor (Stromal cell-derived growth factF20)	-4,6	-0,75	
ENSMUST000000079772	Tnfrsf11b	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)	-4,5	-3,78	-3,70

Bibliografía

Adams, P. D. (2001). Regulation of the retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin/cdks. *Biochimica et biophysica acta* 1471, M123-133.

Aktas, H., Cai, H. & Cooper, G. M. (1997). Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27KIP1. *Mol Cell Biol* 17, 3850-3857.

Albanese, C., Johnson, J., Watanabe, G., Eklund, N., Vu, D., Arnold, A. & Pestell, R. G. (1995). Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. *J Biol Chem* 270, 23589-23597.

Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P. & Hemmings, B. A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 15, 6541-6551.

Alessi, D. R., Gomez, N., Moorhead, G., Lewis, T., Keyse, S. M. & Cohen, P. (1995). Inactivation of p42 MAP kinase by protein phosphatase 2A and a protein tyrosine phosphatase, but not CL100, in various cell lines. *Curr Biol* 5, 283-295.

Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B. & Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Curr Biol* 7, 261-269.

Alessi, D. R., Kozlowski, M. T., Weng, Q. P., Morrice, N. & Avruch, J. (1998). 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase in vivo and in vitro. *Curr Biol* 8, 69-81.

Anderson, K. E., Coadwell, J., Stephens, L. R. & Hawkins, P. T. (1998). Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. *Curr Biol* 8, 684-691.

- Andjelkovic, M., Alessi, D. R., Meier, R., Fernandez, A., Lamb, N. J., Frech, M., Cron, P., Cohen, P., Lucocq, J. M. & Hemmings, B. A.** (1997). Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem* 272, 31515-31524.
- Anjum, R., Roux, P. P., Ballif, B. A., Gygi, S. P. & Blenis, J.** (2005). The tumor suppressor DAP kinase is a target of RSK-mediated survival signaling. *Curr Biol* 15, 1762-1767.
- Aoki, Y., Niihori, T., Kawame, H., Kurosawa, K., Ohashi, H., Tanaka, Y., Filocamo, M., Kato, K., Suzuki, Y., Kure, S. & Matsubara, Y.** (2005). Germline mutations in HRAS proto-oncogene cause Costello syndrome. *Nat Genet* 37, 1038-1040.
- Aoki, Y., Niihori, T., Narumi, Y., Kure, S. & Matsubara, Y.** (2008). The RAS/MAPK syndromes: novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders. *Hum Mutat* 29, 992-1006.
- Arcaro, A. & Wymann, M. P.** (1993). Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochem J* 296 (Pt 2), 297-301.
- Aronheim, A., Engelberg, D., Li, N., al-Alawi, N., Schlessinger, J. & Karin, M.** (1994). Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway. *Cell* 78, 949-961.
- Avraham, H., Park, S. Y., Schinkmann, K. & Avraham, S.** (2000). RAFTK/Pyk2-mediated cellular signalling. *Cellular signalling* 12, 123-133.
- Balaban, R. S., Nemoto, S. & Finkel, T.** (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120, 483-495.
- Balmanno, K. & Cook, S. J.** (1999). Sustained MAP kinase activation is required for the expression of cyclin D1, p21Cip1 and a subset of AP-1 proteins in CCL39 cells. *Oncogene* 18, 3085-3097.
- Barberis, L., Wary, K. K., Fiucci, G., Liu, F., Hirsch, E., Brancaccio, M., Altruda, F., Tarone, G. & Giancotti, F. G.** (2000). Distinct roles of the adaptor protein Shc and focal adhesion kinase in integrin signaling to ERK. *J Biol Chem* 275, 36532-36540.
- Barkett, M. & Gilmore, T. D.** (1999). Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6910-6924.
- Barouki, R., Coumoul, X. & Fernandez-Salguero, P. M.** (2007). The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Lett* 581, 3608-3615.
- Barriere, C., Santamaria, D., Cerqueira, A., Galan, J., Martin, A., Ortega, S., Malumbres, M., Dubus, P. & Barbacid, M.** (2007). Mice thrive without Cdk4 and Cdk2. *Mol Oncol* 1, 72-83.

- Barroso, I., Luan, J., Middelberg, R. P., Harding, A. H., Franks, P. W., Jakes, R. W., Clayton, D., Schafer, A. J., O'Rahilly, S. & Wareham, N. J.** (2003). Candidate gene association study in type 2 diabetes indicates a role for genes involved in beta-cell function as well as insulin action. *PLoS Biol* 1, E20.
- Barry, M., Dhillon, P. K., Stampfer, M. J., Perner, S., Ma, J., Giovannucci, E., Kurth, T., Mucci, L. A. & Rubin, M. A.** (2012). alpha-Methylacyl-CoA racemase expression and lethal prostate cancer in the Physicians' Health Study and Health Professionals Follow-up Study. *Prostate* 72, 301-306.
- Baxevanis, A. D., Arents, G., Moudrianakis, E. N. & Landsman, D.** (1995). A variety of DNA-binding and multimeric proteins contain the histone fold motif. *Nucleic Acids Res* 23, 2685-2691.
- Bentires-Alj, M., Kontaridis, M. I. & Neel, B. G.** (2006). Stops along the RAS pathway in human genetic disease. *Nat Med* 12, 283-285.
- Bernard, D., Monte, D., Vandebunder, B. & Abbadie, C.** (2002). The c-Rel transcription factor can both induce and inhibit apoptosis in the same cells via the upregulation of MnSOD. *Oncogene* 21, 4392-4402.
- Bernards, A. & Settleman, J.** (2004). GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol* 14, 377-385.
- Berven, L. A. & Crouch, M. F.** (2000). Cellular function of p70S6K: a role in regulating cell motility. *Immunol Cell Biol* 78, 447-451.
- Bindokas, V. P., Jordan, J., Lee, C. C. & Miller, R. J.** (1996). Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci* 16, 1324-1336.
- Boguski, M. S. & McCormick, F.** (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366, 643-654.
- Bonfini, L., Karlovich, C. A., Dasgupta, C. & Banerjee, U.** (1992). The Son of sevenless gene product: a putative activator of Ras. *Science* 255, 603-606.
- Bonni, A., Brunet, A., West, A. E., Datta, S. R., Takasu, M. A. & Greenberg, M. E.** (1999). Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286, 1358-1362.
- Bos, J. L., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Verlaan-de Vries, M., van Boom, J. H., van der Eb, A. J. & Vogelstein, B.** (1987). Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 327, 293-297.

Bos, J. L., Rehmann, H. & Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 129, 865-877.

Boulton, T. G., Nye, S. H., Robbins, D. J., Ip, N. Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S. D., DePinho, R. A., Panayotatos, N., Cobb, M. H. & Yancopoulos, G. D. (1991). ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65, 663-675.

Bowtell, D., Fu, P., Simon, M. & Senior, P. (1992). Identification of murine homologues of the *Drosophila* son of sevenless gene: potential activators of ras. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 6511-6515.

Boykevisch, S., Zhao, C., Sondermann, H., Philippidou, P., Halegoua, S., Kuriyan, J. & Bar-Sagi, D. (2006). Regulation of ras signaling dynamics by Sos-mediated positive feedback. *Curr Biol* 16, 2173-2179.

Bozulic, L., Surucu, B., Hynx, D. & Hemmings, B. A. (2008). PKBalpha/Akt1 acts downstream of DNA-PK in the DNA double-strand break response and promotes survival. *Mol Cell* 30, 203-213.

Broek, D., Toda, T., Michaeli, T., Levin, L., Birchmeier, C., Zoller, M., Powers, S. & Wigler, M. (1987). The *S. cerevisiae* CDC25 gene product regulates the RAS/adenylate cyclase pathway. *Cell* 48, 789-799.

Brognard, J., Sierrecki, E., Gao, T. & Newton, A. C. (2007). PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Mol Cell* 25, 917-931.

Brondello, J. M., Pouyssegur, J. & McKenzie, F. R. (1999). Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation. *Science* 286, 2514-2517.

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J. & Greenberg, M. E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.

Brunet, A., Roux, D., Lenormand, P., Dowd, S., Keyse, S. & Pouyssegur, J. (1999). Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *EMBO J* 18, 664-674.

Buday, L. & Downward, J. (1993). Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* 73, 611-620.

- Buday, L. & Downward, J.** (2008). Many faces of Ras activation. *Biochimica et biophysica acta* 1786, 178-187.
- Burnett, P. E., Barrow, R. K., Cohen, N. A., Snyder, S. H. & Sabatini, D. M.** (1998). RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 1432-1437.
- Byrne, J. L., Paterson, H. F. & Marshall, C. J.** (1996). p21Ras activation by the guanine nucleotide exchange factor Sos, requires the Sos/Grb2 interaction and a second ligand-dependent signal involving the Sos N-terminus. *Oncogene* 13, 2055-2065.
- Cagnol, S. & Chambard, J. C.** (2010). ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death—apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J* 277, 2-21.
- Cai, H., Szeberenyi, J. & Cooper, G. M.** (1990). Effect of a dominant inhibitory Ha-ras mutation on mitogenic signal transduction in NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 10, 5314-5323.
- Calvo, F., Agudo-Ibanez, L. & Crespo, P.** (2010). The Ras-ERK pathway: understanding site-specific signaling provides hope of new anti-tumor therapies. *Bioessays* 32, 412-421.
- Cao, X., Qin, J., Xie, Y., Khan, O., Dowd, F., Scofield, M., Lin, M. F. & Tu, Y.** (2006). Regulator of G-protein signaling 2 (RGS2) inhibits androgen-independent activation of androgen receptor in prostate cancer cells. *Oncogene* 25, 3719-3734.
- Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., Frisch, S. & Reed, J. C.** (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282, 1318-1321.
- Cargnello, M. & Roux, P. P.** (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 75, 50-83.
- Carriere, A., Romeo, Y., Acosta-Jaquez, H. A., Moreau, J., Bonneil, E., Thibault, P., Fingar, D. C. & Roux, P. P.** (2011). ERK1/2 phosphorylate Raptor to promote Ras-dependent activation of mTOR complex 1 (mTORC1). *J Biol Chem* 286, 567-577.
- Castellano, E., Guerrero, C., Nunez, A., De Las Rivas, J. & Santos, E.** (2009). Serum-dependent transcriptional networks identify distinct functional roles for H-Ras and N-Ras during initial stages of the cell cycle. *Genome Biol* 10, R123.
- Cawthon, R. M., Weiss, R., Xu, G. F., Viskochil, D., Culver, M., Stevens, J., Robertson, M., Dunn, D., Gesteland, R., O'Connell, P. & et al.** (1990). A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations. *Cell* 62, 193-201.

- Centore, R. C., Havens, C. G., Manning, A. L., Li, J. M., Flynn, R. L., Tse, A., Jin, J., Dyson, N. J., Walter, J. C. & Zou, L.** (2010). CRL4(Cdt2)-mediated destruction of the histone methyltransferase Set8 prevents premature chromatin compaction in S phase. *Mol Cell* 40, 22-33.
- Chambard, J. C., Lefloch, R., Pouyssegur, J. & Lenormand, P.** (2007). ERK implication in cell cycle regulation. *Biochimica et biophysica acta* 1773, 1299-1310.
- Chang, C., Hopper, N. A. & Sternberg, P. W.** (2000). Caenorhabditis elegans SOS-1 is necessary for multiple RAS-mediated developmental signals. *EMBO J* 19, 3283-3294.
- Chang, L. & Karin, M.** (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37-40.
- Chardin, P., Camonis, J. H., Gale, N. W., van Aelst, L., Schlessinger, J., Wigler, M. H. & Bar-Sagi, D.** (1993). Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science* 260, 1338-1343.
- Cheatham, B., Vlahos, C. J., Cheatham, L., Wang, L., Blenis, J. & Kahn, C. R.** (1994). Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol* 14, 4902-4911.
- Chen, H., Suzuki, M., Nakamura, Y., Ohira, M., Ando, S., Iida, T., Nakajima, T., Nakagawara, A. & Kimura, H.** (2006). Aberrant methylation of RASGRF2 and RASSF1A in human non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 15, 1281-1285.
- Chen, H., Wu, X., Pan, Z. K. & Huang, S.** (2010). Integrity of SOS1/EPS8/ABI1 tri-complex determines ovarian cancer metastasis. *Cancer Res* 70, 9979-9990.
- Chen, L., Liu, L., Yin, J., Luo, Y. & Huang, S.** (2009). Hydrogen peroxide-induced neuronal apoptosis is associated with inhibition of protein phosphatase 2A and 5, leading to activation of MAPK pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 1284-1295.
- Chen, P. C., Wakimoto, H., Conner, D., Araki, T., Yuan, T., Roberts, A., Seidman, C. E., Bronson, R., Neel, B. G., Seidman, J. G. & Kucherlapati, R.** (2010). Activation of multiple signaling pathways causes developmental defects in mice with a Noonan syndrome-associated Sos1 mutation. *J Clin Invest* 120, 4353-4365.
- Chen, R. H., Abate, C. & Blenis, J.** (1993). Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 10952-10956.
- Chen, R. H., Corbalan-Garcia, S. & Bar-Sagi, D.** (1997). The role of the PH domain in the signal-dependent membrane targeting of Sos. *EMBO J* 16, 1351-1359.

- Cheng, M., Olivier, P., Diehl, J. A., Fero, M., Roussel, M. F., Roberts, J. M. & Sherr, C. J.** (1999). The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J* 18, 1571-1583.
- Cheng, M., Sexl, V., Sherr, C. J. & Roussel, M. F.** (1998). Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 1091-1096.
- Cherniack, A. D., Klarlund, J. K., Conway, B. R. & Czech, M. P.** (1995). Disassembly of Son-of-sevenless proteins from Grb2 during p21ras desensitization by insulin. *J Biol Chem* 270, 1485-1488.
- Cherniack, A. D., Klarlund, J. K. & Czech, M. P.** (1994). Phosphorylation of the Ras nucleotide exchange factor son of sevenless by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 269, 4717-4720.
- Chiang, G. G. & Abraham, R. T.** (2005). Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase. *J Biol Chem* 280, 25485-25490.
- Cicatiello, L., Addeo, R., Sasso, A., Altucci, L., Petrizzi, V. B., Borgo, R., Cancemi, M., Caporali, S., Caristi, S., Scafoglio, C., Teti, D., Bresciani, F., Perillo, B. & Weisz, A.** (2004). Estrogens and progesterone promote persistent CCND1 gene activation during G1 by inducing transcriptional derepression via c-Jun/c-Fos/estrogen receptor (progesterone receptor) complex assembly to a distal regulatory element and recruitment of cyclin D1 to its own gene promoter. *Mol Cell Biol* 24, 7260-7274.
- Cohen, P. & Frame, S.** (2001). The renaissance of GSK3. *Nature reviews* 2, 769-776.
- Corbalan-Garcia, S., Margarit, S. M., Galron, D., Yang, S. S. & Bar-Sagi, D.** (1998). Regulation of Sos activity by intramolecular interactions. *Mol Cell Biol* 18, 880-886.
- Corbalan-Garcia, S., Yang, S. S., Degenhardt, K. R. & Bar-Sagi, D.** (1996). Identification of the mitogen-activated protein kinase phosphorylation sites on human Sos1 that regulate interaction with Grb2. *Mol Cell Biol* 16, 5674-5682.
- Coso, O. A., Chiariello, M., Yu, J. C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Miki, T. & Gutkind, J. S.** (1995). The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* 81, 1137-1146.
- Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M. & Hemmings, B. A.** (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-789.

- Daksis, J. I., Lu, R. Y., Facchini, L. M., Marhin, W. W. & Penn, L. J.** (1994). Myc induces cyclin D1 expression in the absence of de novo protein synthesis and links mitogen-stimulated signal transduction to the cell cycle. *Oncogene* 9, 3635-3645.
- Das, B., Shu, X., Day, G. J., Han, J., Krishna, U. M., Falck, J. R. & Broek, D.** (2000). Control of intramolecular interactions between the pleckstrin homology and Dbl homology domains of Vav and Sos1 regulates Rac binding. *J Biol Chem* 275, 15074-15081.
- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. & Greenberg, M. E.** (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.
- Deak, M., Clifton, A. D., Lucocq, L. M. & Alessi, D. R.** (1998). Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J* 17, 4426-4441.
- Denayer, E., de Ravel, T. & Legius, E.** (2008). Clinical and molecular aspects of RAS related disorders. *J Med Genet* 45, 695-703.
- Dennis, G., Jr., Sherman, B. T., Hosack, D. A., Yang, J., Gao, W., Lane, H. C. & Lempicki, R. A.** (2003). DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* 4, P3.
- Dennis, P. B., Jaeschke, A., Saitoh, M., Fowler, B., Kozma, S. C. & Thomas, G.** (2001). Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science* 294, 1102-1105.
- Dennis, P. B., Pullen, N., Pearson, R. B., Kozma, S. C. & Thomas, G.** (1998). Phosphorylation sites in the autoinhibitory domain participate in p70(s6k) activation loop phosphorylation. *J Biol Chem* 273, 14845-14852.
- Dhillon, A. S. & Kolch, W.** (2002). Untying the regulation of the Raf-1 kinase. *Arch Biochem Biophys* 404, 3-9.
- Di Fulvio, M., Lehman, N., Lin, X., Lopez, I. & Gomez-Cambronero, J.** (2006). The elucidation of novel SH2 binding sites on PLD2. *Oncogene* 25, 3032-3040.
- Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F. & Sherr, C. J.** (1998). Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 12, 3499-3511.
- Dijkers, P. F., Medema, R. H., Pals, C., Banerji, L., Thomas, N. S., Lam, E. W., Burgering, B. M., Raaijmakers, J. A., Lammers, J. W., Koenderman, L. & Coffey, P. J.** (2000). Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(KIP1). *Mol Cell Biol* 20, 9138-9148.

- Dikic, I., Tokiwa, G., Lev, S., Courtneidge, S. A. & Schlessinger, J.** (1996). A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature* 383, 547-550.
- Dobrowolski, S., Harter, M. & Stacey, D. W.** (1994). Cellular ras activity is required for passage through multiple points of the G0/G1 phase in BALB/c 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 14, 5441-5449.
- Dong, C., Waters, S. B., Holt, K. H. & Pessin, J. E.** (1996). SOS phosphorylation and disassociation of the Grb2-SOS complex by the ERK and JNK signaling pathways. *J Biol Chem* 271, 6328-6332.
- Dougherty, M. K., Muller, J., Ritt, D. A., Zhou, M., Zhou, X. Z., Copeland, T. D., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Lu, K. P. & Morrison, D. K.** (2005). Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. *Mol Cell* 17, 215-224.
- Douville, E. & Downward, J.** (1997). EGF induced SOS phosphorylation in PC12 cells involves P90 RSK-2. *Oncogene* 15, 373-383.
- Dufner, A. & Thomas, G.** (1999). Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Exp Cell Res* 253, 100-109.
- Duronio, V.** (2008). The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *Biochem J* 415, 333-344.
- Ebinu, J. O., Bottorff, D. A., Chan, E. Y., Stang, S. L., Dunn, R. J. & Stone, J. C.** (1998). RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science* 280, 1082-1086.
- Eblen, S. T., Slack-Davis, J. K., Tarcsafalvi, A., Parsons, J. T., Weber, M. J. & Catling, A. D.** (2004). Mitogen-activated protein kinase feedback phosphorylation regulates MEK1 complex formation and activation during cellular adhesion. *Mol Cell Biol* 24, 2308-2317.
- Egan, S. E., Giddings, B. W., Brooks, M. W., Buday, L., Sizeland, A. M. & Weinberg, R. A.** (1993). Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature* 363, 45-51.
- Esteban, L. M., Fernandez-Medarde, A., Lopez, E., Yienger, K., Guerrero, C., Ward, J. M., Tessarollo, L. & Santos, E.** (2000). Ras-guanine nucleotide exchange factor sos2 is dispensable for mouse growth and development. *Mol Cell Biol* 20, 6410-6413.
- Fambrough, D., McClure, K., Kazlauskas, A. & Lander, E. S.** (1999). Diverse signaling pathways activated by growth factor receptors induce broadly overlapping, rather than independent, sets of genes. *Cell* 97, 727-741.

- Fenton, T. R. & Gout, I. T.** (2011). Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases. *Int J Biochem Cell Biol* 43, 47-59.
- Feramisco, J. R., Gross, M., Kamata, T., Rosenberg, M. & Sweet, R. W.** (1984). Microinjection of the oncogene form of the human H-ras (T-24) protein results in rapid proliferation of quiescent cells. *Cell* 38, 109-117.
- Fernandez-Medarde, A. & Santos, E.** (2011). Ras in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer* 2, 344-358.
- Fernandez-Medarde, A. & Santos, E.** (2011). The RasGrf family of mammalian guanine nucleotide exchange factors. *Biochimica et biophysica acta* 1815, 170-188.
- Ferrari, S., Bannwarth, W., Morley, S. J., Totty, N. F. & Thomas, G.** (1992). Activation of p70s6k is associated with phosphorylation of four clustered sites displaying Ser/Thr-Pro motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 7282-7286.
- Field, L. A., Love, B., Deyarmin, B., Hooke, J. A., Shriver, C. D. & Ellsworth, R. E.** (2011). Identification of differentially expressed genes in breast tumors from African American compared with Caucasian women. *Cancer*.
- Franke, T. F.** (2008). PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* 27, 6473-6488.
- Franke, T. F., Kaplan, D. R. & Cantley, L. C.** (1997). PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 88, 435-437.
- Franke, T. F., Yang, S. I., Chan, T. O., Datta, K., Kazlauskas, A., Morrison, D. K., Kaplan, D. R. & Tsichlis, P. N.** (1995). The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* 81, 727-736.
- Freedman, T. S., Sondermann, H., Friedland, G. D., Kortemme, T., Bar-Sagi, D., Marqusee, S. & Kuriyan, J.** (2006). A Ras-induced conformational switch in the Ras activator Son of sevenless. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 16692-16697.
- Fujita, N., Sato, S. & Tsuruo, T.** (2003). Phosphorylation of p27Kip1 at threonine 198 by p90 ribosomal protein S6 kinases promotes its binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *J Biol Chem* 278, 49254-49260.
- Gale, N. W., Kaplan, S., Lowenstein, E. J., Schlessinger, J. & Bar-Sagi, D.** (1993). Grb2 mediates the EGF-dependent activation of guanine nucleotide exchange on Ras. *Nature* 363, 88-92.

- Gao, T., Furnari, F. & Newton, A. C.** (2005). PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell* 18, 13-24.
- Gardai, S. J., Hildeman, D. A., Frankel, S. K., Whitlock, B. B., Frasch, S. C., Borregaard, N., Marrack, P., Bratton, D. L. & Henson, P. M.** (2004). Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils. *J Biol Chem* 279, 21085-21095.
- Gille, H. & Downward, J.** (1999). Multiple ras effector pathways contribute to G(1) cell cycle progression. *J Biol Chem* 274, 22033-22040.
- Gille, H., Kortenjann, M., Thoma, O., Moomaw, C., Slaughter, C., Cobb, M. H. & Shaw, P. E.** (1995). ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *EMBO J* 14, 951-962.
- Gingras, A. C., Kennedy, S. G., O'Leary, M. A., Sonenberg, N. & Hay, N.** (1998). 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev* 12, 502-513.
- Gotoh, T., Niino, Y., Tokuda, M., Hatase, O., Nakamura, S., Matsuda, M. & Hattori, S.** (1997). Activation of R-Ras by Ras-guanine nucleotide-releasing factor. *J Biol Chem* 272, 18602-18607.
- Gotoh, Y. & Cooper, J. A.** (1998). Reactive oxygen species- and dimerization-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in tumor necrosis factor-alpha signal transduction. *J Biol Chem* 273, 17477-17482.
- Graham, S. M., Vojtek, A. B., Huff, S. Y., Cox, A. D., Clark, G. J., Cooper, J. A. & Der, C. J.** (1996). TC21 causes transformation by Raf-independent signaling pathways. *Mol Cell Biol* 16, 6132-6140.
- Graves, L. M., Guy, H. I., Kozlowski, P., Huang, M., Lazarowski, E., Pope, R. M., Collins, M. A., Dahlstrand, E. N., Earp, H. S., 3rd & Evans, D. R.** (2000). Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase. *Nature* 403, 328-332.
- Guerrero, I., Rojas, J. M., Chedid, M., Esteban, L. M., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C., Font de Mora, J. & Santos, E.** (1996). Expression of alternative forms of Ras exchange factors GRF and SOS1 in different human tissues and cell lines. *Oncogene* 12, 1097-1107.
- Gureasko, J., Galush, W. J., Boykevich, S., Sondermann, H., Bar-Sagi, D., Groves, J. T. & Kuriyan, J.** (2008). Membrane-dependent signal integration by the Ras activator Son of sevenless. *Nature structural & molecular biology* 15, 452-461.
- Gureasko, J., Kuchment, O., Makino, D. L., Sondermann, H., Bar-Sagi, D. & Kuriyan, J.** (2010). Role of the histone domain in the autoinhibition and activation of the Ras activator

Son of Sevenless. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 3430-3435.

Guttridge, D. C., Albanese, C., Reuther, J. Y., Pestell, R. G. & Baldwin, A. S., Jr. (1999). NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 19, 5785-5799.

Guyton, K. Z., Liu, Y., Gorospe, M., Xu, Q. & Holbrook, N. J. (1996). Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* 271, 4138-4142.

Hadziselimovic, N. O., de Geyter, C., Demougin, P., Oakeley, E. J. & Hadziselimovic, F. (2010). Decreased expression of FGFR1, SOS1, RAF1 genes in cryptorchidism. *Urol Int* 84, 353-361.

Hakkinen, L. & Csiszar, A. (2007). Hereditary gingival fibromatosis: characteristics and novel putative pathogenic mechanisms. *J Dent Res* 86, 25-34.

Hamilton, G., Proitsi, P., Jehu, L., Morgan, A., Williams, J., O'Donovan, M. C., Owen, M. J., Powell, J. F. & Lovestone, S. (2007). Candidate gene association study of insulin signaling genes and Alzheimer's disease: evidence for SOS2, PCK1, and PPARgamma as susceptibility loci. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B, 508-516.

Hanafusa, H., Torii, S., Yasunaga, T. & Nishida, E. (2002). Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nature cell biology* 4, 850-858.

Hancock, J. F. (2007). PA promoted to manager. *Nature cell biology* 9, 615-617.

Harbour, J. W. & Dean, D. C. (2000). Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nature cell biology* 2, E65-67.

Hart, T. C., Zhang, Y., Gorry, M. C., Hart, P. S., Cooper, M., Marazita, M. L., Marks, J. M., Cortelli, J. R. & Pallos, D. (2002). A mutation in the SOS1 gene causes hereditary gingival fibromatosis type 1. *Am J Hum Genet* 70, 943-954.

Hatano, N., Mori, Y., Oh-hora, M., Kosugi, A., Fujikawa, T., Nakai, N., Niwa, H., Miyazaki, J., Hamaoka, T. & Ogata, M. (2003). Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development. *Genes Cells* 8, 847-856.

Hayashi, M., Imanaka-Yoshida, K., Yoshida, T., Wood, M., Fearn, C., Tataka, R. J. & Lee, J. D. (2006). A crucial role of mitochondrial Hsp40 in preventing dilated cardiomyopathy. *Nat Med* 12, 128-132.

- Hill, M. M., Feng, J. & Hemmings, B. A.** (2002). Identification of a plasma membrane Raft-associated PKB Ser473 kinase activity that is distinct from ILK and PDK1. *Curr Biol* 12, 1251-1255.
- Hinz, M., Krappmann, D., Eichten, A., Heder, A., Scheidereit, C. & Strauss, M.** (1999). NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol* 19, 2690-2698.
- Hogg, J. R. & Goff, S. P.** (2010). Upf1 senses 3'UTR length to potentiate mRNA decay. *Cell* 143, 379-389.
- Holgado-Madruga, M., Emlet, D. R., Moscatello, D. K., Godwin, A. K. & Wong, A. J.** (1996). A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling. *Nature* 379, 560-564.
- Holt, K. H., Kasson, B. G. & Pessin, J. E.** (1996). Insulin stimulation of a MEK-dependent but ERK-independent SOS protein kinase. *Mol Cell Biol* 16, 577-583.
- Holz, M. K. & Blenis, J.** (2005). Identification of S6 kinase 1 as a novel mammalian target of rapamycin (mTOR)-phosphorylating kinase. *J Biol Chem* 280, 26089-26093.
- Huang da, W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A.** (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4, 44-57.
- Hughes, D. A., Fukui, Y. & Yamamoto, M.** (1990). Homologous activators of ras in fission and budding yeast. *Nature* 344, 355-357.
- Hwang, H. S., Hwang, S. G., Cho, J. H., Chae, J. S., Yoon, K. W., Cho, S. G. & Choi, E. J.** (2011). CIIA functions as a molecular switch for the Rac1-specific GEF activity of SOS1. *The Journal of cell biology* 195, 377-386.
- Iavarone, C., Catania, A., Marinissen, M. J., Visconti, R., Acunzo, M., Tarantino, C., Carlomagno, M. S., Bruni, C. B., Gutkind, J. S. & Chiariello, M.** (2003). The platelet-derived growth factor controls c-myc expression through a JNK- and AP-1-dependent signaling pathway. *J Biol Chem* 278, 50024-50030.
- Iljin, K., Dube, A., Kontusaari, S., Korhonen, J., Lahtinen, I., Oettgen, P. & Alitalo, K.** (1999). Role of ets factors in the activity and endothelial cell specificity of the mouse Tie gene promoter. *FASEB J* 13, 377-386.
- Innocenti, M., Frittoli, E., Ponzanelli, I., Falck, J. R., Brachmann, S. M., Di Fiore, P. P. & Scita, G.** (2003). Phosphoinositide 3-kinase activates Rac by entering in a complex with Eps8, Abi1, and Sos-1. *The Journal of cell biology* 160, 17-23.

- Innocenti, M., Tenca, P., Frittoli, E., Faretta, M., Tocchetti, A., Di Fiore, P. P. & Scita, G.** (2002). Mechanisms through which Sos-1 coordinates the activation of Ras and Rac. *The Journal of cell biology* 156, 125-136.
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J. & Guan, K. L.** (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature cell biology* 4, 648-657.
- Irizarry, R. A., Bolstad, B. M., Collin, F., Cope, L. M., Hobbs, B. & Speed, T. P.** (2003). Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* 31, e15.
- Irizarry, R. A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y. D., Antonellis, K. J., Scherf, U. & Speed, T. P.** (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4, 249-264.
- Isotani, S., Hara, K., Tokunaga, C., Inoue, H., Avruch, J. & Yonezawa, K.** (1999). Immuno-purified mammalian target of rapamycin phosphorylates and activates p70 S6 kinase alpha in vitro. *J Biol Chem* 274, 34493-34498.
- Ivaska, J., Nissinen, L., Immonen, N., Eriksson, J. E., Kahari, V. M. & Heino, J.** (2002). Integrin alpha 2 beta 1 promotes activation of protein phosphatase 2A and dephosphorylation of Akt and glycogen synthase kinase 3 beta. *Mol Cell Biol* 22, 1352-1359.
- Jackson, P., Ow, K., Yardley, G., Delprado, W., Quinn, D. I., Yang, J. L. & Russell, P. J.** (2003). Downregulation of KAI1 mRNA in localised prostate cancer and its bony metastases does not correlate with p53 overexpression. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 6, 174-181.
- Jang, S. I., Lee, E. J., Hart, P. S., Ramaswami, M., Pallos, D. & Hart, T. C.** (2007). Germ line gain of function with SOS1 mutation in hereditary gingival fibromatosis. *J Biol Chem* 282, 20245-20255.
- Jaramillo-Gutierrez, G., Molina-Cruz, A., Kumar, S. & Barillas-Mury, C.** (2010). The *Anopheles gambiae* oxidation resistance 1 (OXR1) gene regulates expression of enzymes that detoxify reactive oxygen species. *PLoS One* 5, e111168.
- Jiang, S., Heller, B., Tagliabracci, V. S., Zhai, L., Irimia, J. M., DePaoli-Roach, A. A., Wells, C. D., Skurat, A. V. & Roach, P. J.** (2010). Starch binding domain-containing protein 1/genethonin 1 is a novel participant in glycogen metabolism. *J Biol Chem* 285, 34960-34971.
- Johnson, G. L. & Lapadat, R.** (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-1912.
- Jones, S. M. & Kazlauskas, A.** (2001). Growth-factor-dependent mitogenesis requires two distinct phases of signalling. *Nature cell biology* 3, 165-172.

- Jones, S. M. & Kazlauskas, A.** (2001). Growth factor-dependent signaling and cell cycle progression. *FEBS Lett* 490, 110-116.
- Jones, S. M., Klinghoffer, R., Prestwich, G. D., Toker, A. & Kazlauskas, A.** (1999). PDGF induces an early and a late wave of PI 3-kinase activity, and only the late wave is required for progression through G1. *Curr Biol* 9, 512-521.
- Jorge, R., Zarich, N., Oliva, J. L., Azanedo, M., Martinez, N., de la Cruz, X. & Rojas, J. M.** (2002). HSos1 contains a new amino-terminal regulatory motif with specific binding affinity for its pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* 277, 44171-44179.
- Joyce, D., Bouzahzah, B., Fu, M., Albanese, C., D'Amico, M., Steer, J., Klein, J. U., Lee, R. J., Segall, J. E., Westwick, J. K., Der, C. J. & Pestell, R. G.** (1999). Integration of Rac-dependent regulation of cyclin D1 transcription through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway. *J Biol Chem* 274, 25245-25249.
- Kahan, C., Seuwen, K., Meloche, S. & Pouyssegur, J.** (1992). Coordinate, biphasic activation of p44 mitogen-activated protein kinase and S6 kinase by growth factors in hamster fibroblasts. Evidence for thrombin-induced signals different from phosphoinositide turnover and adenylcyclase inhibition. *J Biol Chem* 267, 13369-13375.
- Kamata, H., Honda, S., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H. & Karin, M.** (2005). Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* 120, 649-661.
- Karlovich, C. A., Bonfini, L., McCollam, L., Rogge, R. D., Daga, A., Czech, M. P. & Banerjee, U.** (1995). In vivo functional analysis of the Ras exchange factor son of sevenless. *Science* 268, 576-579.
- Karnoub, A. E. & Weinberg, R. A.** (2008). Ras oncogenes: split personalities. *Nature reviews* 9, 517-531.
- Kawada, M., Yamagoe, S., Murakami, Y., Suzuki, K., Mizuno, S. & Uehara, Y.** (1997). Induction of p27Kip1 degradation and anchorage independence by Ras through the MAP kinase signaling pathway. *Oncogene* 15, 629-637.
- Kawase, T., Ohki, R., Shibata, T., Tsutsumi, S., Kamimura, N., Inazawa, J., Ohta, T., Ichikawa, H., Aburatani, H., Tashiro, F. & Taya, Y.** (2009). PH domain-only protein PHLDA3 is a p53-regulated repressor of Akt. *Cell* 136, 535-550.
- Kazlauskas, A. & Cooper, J. A.** (1990). Phosphorylation of the PDGF receptor beta subunit creates a tight binding site for phosphatidylinositol 3 kinase. *EMBO J* 9, 3279-3286.
- Keyse, S. M.** (1998). Protein phosphatases and the regulation of MAP kinase activity. *Semin Cell Dev Biol* 9, 143-152.

Khattar, E. & Kumar, V. (2010). Mitogenic regulation of p27(Kip1) gene is mediated by AP-1 transcription factors. *J Biol Chem* 285, 4554-4561.

Kim, A. H., Khursigara, G., Sun, X., Franke, T. F. & Chao, M. V. (2001). Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol* 21, 893-901.

Kim, J. H., Shirouzu, M., Kataoka, T., Bowtell, D. & Yokoyama, S. (1998). Activation of Ras and its downstream extracellular signal-regulated protein kinases by the CDC25 homology domain of mouse Son-of-sevenless 1 (mSos1). *Oncogene* 16, 2597-2607.

Kiningham, K. K., Xu, Y., Daosukho, C., Popova, B. & St Clair, D. K. (2001). Nuclear factor kappaB-dependent mechanisms coordinate the synergistic effect of PMA and cytokines on the induction of superoxide dismutase 2. *Biochem J* 353, 147-156.

Klarlund, J. K., Cherniack, A. D. & Czech, M. P. (1995). Divergent mechanisms for homologous desensitization of p21ras by insulin and growth factors. *J Biol Chem* 270, 23421-23428.

Klein, E. A. & Assoian, R. K. (2008). Transcriptional regulation of the cyclin D1 gene at a glance. *J Cell Sci* 121, 3853-3857.

Klein, E. A., Yang, C., Kazanietz, M. G. & Assoian, R. K. (2007). NFkappaB-independent signaling to the cyclin D1 gene by Rac. *Cell Cycle* 6, 1115-1121.

Kodaki, T., Woscholski, R., Hallberg, B., Rodriguez-Viciana, P., Downward, J. & Parker, P. J. (1994). The activation of phosphatidylinositol 3-kinase by Ras. *Curr Biol* 4, 798-806.

Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., Finkenzeller, G., Marme, D. & Rapp, U. R. (1993). Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* 364, 249-252.

Kontaridis, M. I., Swanson, K. D., David, F. S., Barford, D. & Neel, B. G. (2006). PTPN11 (Shp2) mutations in LEOPARD syndrome have dominant negative, not activating, effects. *J Biol Chem* 281, 6785-6792.

Kops, G. J. & Burgering, B. M. (1999). Forkhead transcription factors: new insights into protein kinase B (c-akt) signaling. *J Mol Med* 77, 656-665.

Kortum, R. L., Sommers, C. L., Alexander, C. P., Pinski, J. M., Li, W., Grinberg, A., Lee, J., Love, P. E. & Samelson, L. E. (2011). Targeted Sos1 deletion reveals its critical role in early T-cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 12407-12412.

Kouhara, H., Hadari, Y. R., Spivak-Kroizman, T., Schilling, J., Bar-Sagi, D., Lax, I. & Schlesinger, J. (1997). A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell* 89, 693-702.

- Kratz, C. P., Niemeyer, C. M., Thomas, C., Bauhuber, S., Matejas, V., Bergstrasser, E., Flotho, C., Flores, N. J., Haas, O., Hasle, H., van den Heuvel-Eibrink, M. M., Kucherlapati, R. S., Lang, P., Roberts, A. E., Stary, J., Strahm, B., Swanson, K. D., Trebo, M., Zecca, M., Neel, B., Locatelli, F., Loh, M. L. & Zenker, M. (2007). Mutation analysis of Son of Sevenless in juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia* 21, 1108-1109.
- Kubiseski, T. J., Chook, Y. M., Parris, W. E., Rozakis-Adcock, M. & Pawson, T. (1997). High affinity binding of the pleckstrin homology domain of mSos1 to phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate. *J Biol Chem* 272, 1799-1804.
- Kuiperij, H. B., van der Horst, A., Raaijmakers, J., Weijzen, S., Medema, R. H., Bos, J. L., Burgering, B. M. & Zwartkruis, F. J. (2005). Activation of FoxO transcription factors contributes to the antiproliferative effect of cAMP. *Oncogene* 24, 2087-2095.
- Kuo, Y. C., Huang, K. Y., Yang, C. H., Yang, Y. S., Lee, W. Y. & Chiang, C. W. (2008). Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55alpha regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt. *J Biol Chem* 283, 1882-1892.
- Kyriakis, J. M., App, H., Zhang, X. F., Banerjee, P., Brautigan, D. L., Rapp, U. R. & Avruch, J. (1992). Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 358, 417-421.
- LaBaer, J., Garrett, M. D., Stevenson, L. F., Slingerland, J. M., Sandhu, C., Chou, H. S., Fattaey, A. & Harlow, E. (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* 11, 847-862.
- Lambert, J. M., Lambert, Q. T., Reuther, G. W., Malliri, A., Siderovski, D. P., Sonddek, J., Collard, J. G. & Der, C. J. (2002). Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3)K-independent mechanism. *Nature cell biology* 4, 621-625.
- Langlois, W. J., Sasaoka, T., Saltiel, A. R. & Olefsky, J. M. (1995). Negative feedback regulation and desensitization of insulin- and epidermal growth factor-stimulated p21ras activation. *J Biol Chem* 270, 25320-25323.
- Lavoie, J. N., L'Allemain, G., Brunet, A., Muller, R. & Pouyssegur, J. (1996). Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem* 271, 20608-20616.
- Lee, E. J., Jang, S. I., Pallos, D., Kather, J. & Hart, T. C. (2006). Characterization of fibroblasts with Son of Sevenless-1 mutation. *J Dent Res* 85, 1050-1055.
- Lee, M. H. & Yang, H. Y. (2003). Regulators of G1 cyclin-dependent kinases and cancers. *Cancer Metastasis Rev* 22, 435-449.

- Lee, Y. J., Cho, H. N., Soh, J. W., Jhon, G. J., Cho, C. K., Chung, H. Y., Bae, S., Lee, S. J. & Lee, Y. S.** (2003). Oxidative stress-induced apoptosis is mediated by ERK1/2 phosphorylation. *Exp Cell Res* 291, 251-266.
- Legius, E., Schrandt-Stumpel, C., Schollen, E., Pulles-Heintzberger, C., Gewillig, M. & Fryns, J. P.** (2002). PTPN11 mutations in LEOPARD syndrome. *J Med Genet* 39, 571-574.
- Lemmon, M. A. & Ferguson, K. M.** (2000). Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem J* 350 Pt 1, 1-18.
- Lemmon, M. A., Ferguson, K. M. & Schlessinger, J.** (1996). PH domains: diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface. *Cell* 85, 621-624.
- Ley, R., Balmano, K., Hadfield, K., Weston, C. & Cook, S. J.** (2003). Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim. *J Biol Chem* 278, 18811-18816.
- Li, B., Subleski, M., Fusaki, N., Yamamoto, T., Copeland, T., Princler, G. L., Kung, H. & Kamata, T.** (1996). Catalytic activity of the mouse guanine nucleotide exchanger mSOS is activated by Fyn tyrosine protein kinase and the T-cell antigen receptor in T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 1001-1005.
- Li, B. Q., Subleski, M., Shalloway, D., Kung, H. F. & Kamata, T.** (1993). Mitogenic activation of the Ras guanine nucleotide exchange factor in NIH 3T3 cells involves protein tyrosine phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 8504-8508.
- Li, L., Abdel Fattah, E., Cao, G., Ren, C., Yang, G., Goltsov, A. A., Chinault, A. C., Cai, W. W., Timme, T. L. & Thompson, T. C.** (2008). Glioma pathogenesis-related protein 1 exerts tumor suppressor activities through proapoptotic reactive oxygen species-c-Jun-NH2 kinase signaling. *Cancer Res* 68, 434-443.
- Li, W., Nishimura, R., Kashishian, A., Batzer, A. G., Kim, W. J., Cooper, J. A. & Schlessinger, J.** (1994). A new function for a phosphotyrosine phosphatase: linking GRB2-Sos to a receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 14, 509-517.
- Liang, J. & Slingerland, J. M.** (2003). Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle* 2, 339-345.
- Liang, J., Zubovitz, J., Petrocelli, T., Kotchetkov, R., Connor, M. K., Han, K., Lee, J. H., Ciarrallo, S., Catzavelos, C., Beniston, R., Franssen, E. & Slingerland, J. M.** (2002). PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med* 8, 1153-1160.

- Lin, L. L., Wartmann, M., Lin, A. Y., Knopf, J. L., Seth, A. & Davis, R. J.** (1993). cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 72, 269-278.
- Liu, B. X., Wei, W. & Broek, D.** (1993). The catalytic domain of the mouse *sos1* gene product activates Ras proteins in vivo and in vitro. *Oncogene* 8, 3081-3084.
- Liu, Y., Martindale, J. L., Gorospe, M. & Holbrook, N. J.** (1996). Regulation of p21WAF1/CIP1 expression through mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Cancer Res* 56, 31-35.
- Long, A. C., Colitz, C. M. & Bomser, J. A.** (2004). Apoptotic and necrotic mechanisms of stress-induced human lens epithelial cell death. *Exp Biol Med (Maywood)* 229, 1072-1080.
- Lopez-Illasaca, M., Crespo, P., Pellici, P. G., Gutkind, J. S. & Wetzker, R.** (1997). Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma. *Science* 275, 394-397.
- Lowenstein, E. J., Daly, R. J., Batzer, A. G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E. Y., Bar-Sagi, D. & Schlessinger, J. *The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling* 70 thesis, (1992).
- Lucker, B. F., Behal, R. H., Qin, H., Siron, L. C., Taggart, W. D., Rosenbaum, J. L. & Cole, D. G.** (2005). Characterization of the intraflagellar transport complex B core: direct interaction of the IFT81 and IFT74/72 subunits. *J Biol Chem* 280, 27688-27696.
- Lugus, J. J., Ngoh, G. A., Bachschmid, M. M. & Walsh, K.** (2011). Mitofusins are required for angiogenic function and modulate different signaling pathways in cultured endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 51, 885-893.
- Lundberg, A. S. & Weinberg, R. A.** (1998). Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol* 18, 753-761.
- Ma, L., Chen, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Pandolfi, P. P.** (2005). Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* 121, 179-193.
- Malonia, S. K., Sinha, S., Lakshminarasimhan, P., Singh, K., Jalota-Badwar, A., Rampalli, S., Kaul-Ghanekar, R. & Chattopadhyay, S.** (2011). Gene regulation by SMAR1: Role in cellular homeostasis and cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1815, 1-12.
- Malumbres, M. & Barbacid, M.** (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 222-231.

- Malumbres, M. & Barbacid, M.** (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 3, 459-465.
- Manning, B. D. & Cantley, L. C.** (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261-1274.
- Marais, R., Light, Y., Paterson, H. F. & Marshall, C. J.** (1995). Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *EMBO J* 14, 3136-3145.
- Marais, R., Wynne, J. & Treisman, R.** (1993). The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell* 73, 381-393.
- Margarit, S. M., Sondermann, H., Hall, B. E., Nagar, B., Hoelz, A., Pirruccello, M., Bar-Sagi, D. & Kuriyan, J.** (2003). Structural evidence for feedback activation by Ras.GTP of the Ras-specific nucleotide exchange factor SOS. *Cell* 112, 685-695.
- Marone, R., Cmiljanovic, V., Giese, B. & Wymann, M. P.** (2008). Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy. *Biochimica et biophysica acta* 1784, 159-185.
- Marshall, C. J.** (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80, 179-185.
- Martindale, J. L. & Holbrook, N. J.** (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 192, 1-15.
- Martinez-Quiles, N., Ho, H. Y., Kirschner, M. W., Ramesh, N. & Geha, R. S.** (2004). Erk/Src phosphorylation of cortactin acts as a switch on-switch off mechanism that controls its ability to activate N-WASP. *Mol Cell Biol* 24, 5269-5280.
- Matsuda, M., Hashimoto, Y., Muroya, K., Hasegawa, H., Kurata, T., Tanaka, S., Nakamura, S. & Hattori, S.** (1994). CRK protein binds to two guanine nucleotide-releasing proteins for the Ras family and modulates nerve growth factor-induced activation of Ras in PC12 cells. *Mol Cell Biol* 14, 5495-5500.
- Maxfield, F. R. & van Meer, G.** (2010). Cholesterol, the central lipid of mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol* 22, 422-429.
- Mayo, L. D. & Donner, D. B.** (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 11598-11603.
- McCollam, L., Bonfini, L., Karlovich, C. A., Conway, B. R., Kozma, L. M., Banerjee, U. & Czech, M. P.** (1995). Functional roles for the pleckstrin and Dbl homology regions in the Ras exchange factor Son-of-sevenless. *J Biol Chem* 270, 15954-15957.

- McKay, M. M. & Morrison, D. K.** (2007). Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* 26, 3113-3121.
- Medema, R. H., Kops, G. J., Bos, J. L. & Burgering, B. M.** (2000). AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* 404, 782-787.
- Meloche, S. & Pouyssegur, J.** (2007). The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 26, 3227-3239.
- Mendoza, M. C., Er, E. E. & Blenis, J.** (2011). The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci* 36, 320-328.
- Meng, T. C., Fukada, T. & Tonks, N. K.** (2002). Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol Cell* 9, 387-399.
- Merchant, J. L., Du, M. & Todisco, A.** (1999). Sp1 phosphorylation by Erk 2 stimulates DNA binding. *Biochem Biophys Res Commun* 254, 454-461.
- Mettouchi, A., Klein, S., Guo, W., Lopez-Lago, M., Lemichez, E., Westwick, J. K. & Giancotti, F. G.** (2001). Integrin-specific activation of Rac controls progression through the G(1) phase of the cell cycle. *Mol Cell* 8, 115-127.
- Miao, L. & St Clair, D. K.** (2009). Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med* 47, 344-356.
- Milanini-Mongiat, J., Pouyssegur, J. & Pages, G.** (2002). Identification of two Sp1 phosphorylation sites for p42/p44 mitogen-activated protein kinases: their implication in vascular endothelial growth factor gene transcription. *J Biol Chem* 277, 20631-20639.
- Miller, B. S., Shankavaram, U. T., Horney, M. J., Gore, A. C., Kurtz, D. T. & Rosenzweig, S. A.** (1996). Activation of cJun NH2-terminal kinase/stress-activated protein kinase by insulin. *Biochemistry* 35, 8769-8775.
- Mimura, J., Ema, M., Sogawa, K. & Fujii-Kuriyama, Y.** (1999). Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev* 13, 20-25.
- Minden, A., Lin, A., Claret, F. X., Abo, A. & Karin, M.** (1995). Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* 81, 1147-1157.
- Minella, D., Wannenes, F., Biancolella, M., Amati, F., Testa, B., Nardone, A., Bueno, S., Fabbri, A., Lauro, D., Novelli, G. & Moretti, C.** (2011). SOS1 over-expression in genital skin fibroblasts from hirsute women: a putative role of the SOS1/RAS pathway in the pathogenesis of hirsutism. *J Biol Regul Homeost Agents* 25, 615-626.

- Mirza, A. M., Gysin, S., Malek, N., Nakayama, K., Roberts, J. M. & McMahon, M.** (2004). Cooperative regulation of the cell division cycle by the protein kinases RAF and AKT. *Mol Cell Biol* 24, 10868-10881.
- Mitin, N., Rossman, K. L. & Der, C. J.** (2005). Signaling interplay in Ras superfamily function. *Curr Biol* 15, R563-574.
- Modzelewska, K., Elgort, M. G., Huang, J., Jongeward, G., Lauritzen, A., Yoon, C. H., Sternberg, P. W. & Moghal, N.** (2007). An activating mutation in sos-1 identifies its Dbl domain as a critical inhibitor of the epidermal growth factor receptor pathway during *Caenorhabditis elegans* vulval development. *Mol Cell Biol* 27, 3695-3707.
- Moldovan, G. L., Pfander, B. & Jentsch, S.** (2007). PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* 129, 665-679.
- Mukhopadhyay, N. K., Price, D. J., Kyriakis, J. M., Pelech, S., Sanghera, J. & Avruch, J.** (1992). An array of insulin-activated, proline-directed serine/threonine protein kinases phosphorylate the p70 S6 kinase. *J Biol Chem* 267, 3325-3335.
- Murphy, L. O. & Blenis, J.** (2006). MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci* 31, 268-275.
- Murphy, L. O., MacKeigan, J. P. & Blenis, J.** (2004). A network of immediate early gene products propagates subtle differences in mitogen-activated protein kinase signal amplitude and duration. *Mol Cell Biol* 24, 144-153.
- Murphy, L. O., Smith, S., Chen, R. H., Fingar, D. C. & Blenis, J.** (2002). Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nature cell biology* 4, 556-564.
- Nava, C., Hanna, N., Michot, C., Pereira, S., Pouvreau, N., Niihori, T., Aoki, Y., Matsubara, Y., Arveiler, B., Lacombe, D., Pasmant, E., Parfait, B., Baumann, C., Heron, D., Sigaudy, S., Toutain, A., Rio, M., Goldenberg, A., Leheup, B., Verloes, A. & Cave, H.** (2007). Cardiofacio-cutaneous and Noonan syndromes due to mutations in the RAS/MAPK signalling pathway: genotype-phenotype relationships and overlap with Costello syndrome. *J Med Genet* 44, 763-771.
- Nave, B. T., Ouwens, M., Withers, D. J., Alessi, D. R. & Shepherd, P. R.** (1999). Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem J* 344 Pt 2, 427-431.

- Nielsen, K. H., Papageorge, A. G., Vass, W. C., Willumsen, B. M. & Lowy, D. R.** (1997). The Ras-specific exchange factors mouse Sos1 (mSos1) and mSos2 are regulated differently: mSos2 contains ubiquitination signals absent in mSos1. *Mol Cell Biol* 17, 7132-7138.
- Niihori, T., Aoki, Y., Narumi, Y., Neri, G., Cave, H., Verloes, A., Okamoto, N., Hennekam, R. C., Gillesen-Kaesbach, G., Wieczorek, D., Kavamura, M. I., Kurosawa, K., Ohashi, H., Wilson, L., Heron, D., Bonneau, D., Corona, G., Kaname, T., Naritomi, K., Baumann, C., Matsumoto, N., Kato, K., Kure, S. & Matsubara, Y.** (2006). Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Nat Genet* 38, 294-296.
- Nimnual, A. & Bar-Sagi, D.** (2002). The two hats of SOS. *Sci STKE* 2002, pe36.
- Nimnual, A. S., Yatsula, B. A. & Bar-Sagi, D.** (1998). Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos. *Science* 279, 560-563.
- Nojima, H., Tokunaga, C., Eguchi, S., Oshiro, N., Hidayat, S., Yoshino, K., Hara, K., Tanaka, N., Avruch, J. & Yonezawa, K.** (2003). The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *J Biol Chem* 278, 15461-15464.
- Noonan, J. A.** (2006). Noonan syndrome and related disorders: alterations in growth and puberty. *Rev Endocr Metab Disord* 7, 251-255.
- Ohba, Y., Mochizuki, N., Yamashita, S., Chan, A. M., Schrader, J. W., Hattori, S., Nagashima, K. & Matsuda, M.** (2000). Regulatory proteins of R-Ras, TC21/R-Ras2, and M-Ras/R-Ras3. *J Biol Chem* 275, 20020-20026.
- Oh-hora, M., Johmura, S., Hashimoto, A., Hikida, M. & Kurosaki, T.** (2003). Requirement for Ras guanine nucleotide releasing protein 3 in coupling phospholipase C-gamma2 to Ras in B cell receptor signaling. *J Exp Med* 198, 1841-1851.
- Okada, S. & Pessin, J. E.** (1996). Interactions between Src homology (SH) 2/SH3 adapter proteins and the guanylnucleotide exchange factor SOS are differentially regulated by insulin and epidermal growth factor. *J Biol Chem* 271, 25533-25538.
- Olivier, J. P., Raabe, T., Henkemeyer, M., Dickson, B., Mbamalu, G., Margolis, B., Schlessinger, J., Hafen, E. & Pawson, T.** (1993). A Drosophila SH2-SH3 adaptor protein implicated in coupling the sevenless tyrosine kinase to an activator of Ras guanine nucleotide exchange, Sos. *Cell* 73, 179-191.
- Oren, M.** (2003). Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* 10, 431-442.

Osterop, A. P., Medema, R. H., vd Zon, G. C., Bos, J. L., Moller, W. & Maassen, J. A. (1993). Epidermal-growth-factor receptors generate Ras.GTP more efficiently than insulin receptors. *Eur J Biochem* 212, 477-482.

Ouwens, D. M., de Ruiter, N. D., van der Zon, G. C., Carter, A. P., Schouten, J., van der Burgt, C., Kooistra, K., Bos, J. L., Maassen, J. A. & van Dam, H. (2002). Growth factors can activate ATF2 via a two-step mechanism: phosphorylation of Thr71 through the Ras-MEK-ERK pathway and of Thr69 through RalGDS-Src-p38. *EMBO J* 21, 3782-3793.

Ozes, O. N., Mayo, L. D., Gustin, J. A., Pfeffer, S. R., Pfeffer, L. M. & Donner, D. B. (1999). NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 401, 82-85.

Pages, G., Lenormand, P., L'Allemain, G., Chambard, J. C., Meloche, S. & Pouyssegur, J. (1993). Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 8319-8323.

Pahl, H. L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6853-6866.

Pandit, B., Sarkozy, A., Pennacchio, L. A., Carta, C., Oishi, K., Martinelli, S., Pogna, E. A., Schackwitz, W., Ustaszewska, A., Landstrom, A., Bos, J. M., Ommen, S. R., Esposito, G., Lepri, F., Faul, C., Mundel, P., Lopez Sigüero, J. P., Tenconi, R., Selicorni, A., Rossi, C., Mazzanti, L., Torrente, I., Marino, B., Digilio, M. C., Zampino, G., Ackerman, M. J., Dallapiccola, B., Tartaglia, M. & Gelb, B. D. (2007). Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 39, 1007-1012.

Papanicolaou, K. N., Khairallah, R. J., Ngoh, G. A., Chikando, A., Luptak, I., O'Shea, K. M., Riley, D. D., Lugus, J. J., Colucci, W. S., Lederer, W. J., Stanley, W. C. & Walsh, K. (2011). Mitofusin-2 maintains mitochondrial structure and contributes to stress-induced permeability transition in cardiac myocytes. *Mol Cell Biol* 31, 1309-1328.

Parada, L. F., Tabin, C. J., Shih, C. & Weinberg, R. A. (1982). Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature* 297, 474-478.

Park, D., Pandey, S. K., Maksimova, E., Kole, S. & Bernier, M. (2000). Akt-dependent antiapoptotic action of insulin is sensitive to farnesyltransferase inhibitor. *Biochemistry* 39, 12513-12521.

Park, J., Leong, M. L., Buse, P., Maiyar, A. C., Firestone, G. L. & Hemmings, B. A. (1999). Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. *EMBO J* 18, 3024-3033.

- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K. & Cobb, M. H.** (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22, 153-183.
- Peeper, D. S., Upton, T. M., Ladha, M. H., Neuman, E., Zalvide, J., Bernard, R., DeCaprio, J. A. & Ewen, M. E.** (1997). Ras signalling linked to the cell-cycle machinery by the retinoblastoma protein. *Nature* 386, 177-181.
- Perucho, M., Goldfarb, M., Shimizu, K., Lama, C., Fogh, J. & Wigler, M.** (1981). Human-tumor-derived cell lines contain common and different transforming genes. *Cell* 27, 467-476.
- Pfaffl, M. W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- Pham, N., Cheglakov, I., Koch, C. A., de Hoog, C. L., Moran, M. F. & Rotin, D.** (2000). The guanine nucleotide exchange factor CNrasGEF activates ras in response to cAMP and cGMP. *Curr Biol* 10, 555-558.
- Pierre, S., Bats, A. S., Chevallier, A., Bui, L. C., Ambolet-Camoit, A., Garlatti, M., Aggerbeck, M., Barouki, R. & Coumoul, X.** (2011). Induction of the Ras activator Son of Sevenless 1 by environmental pollutants mediates their effects on cellular proliferation. *Biochem Pharmacol* 81, 304-313.
- Piret, J. P., Arnould, T., Fuks, B., Chatelain, P., Remacle, J. & Michiels, C.** (2004). Mitochondria permeability transition-dependent tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis in hepatoma HepG2 cells. *Biochem Pharmacol* 67, 611-620.
- Porfiri, E., Evans, T., Chardin, P. & Hancock, J. F.** (1994). Prenylation of Ras proteins is required for efficient hSOS1-promoted guanine nucleotide exchange. *J Biol Chem* 269, 22672-22677.
- Porfiri, E. & McCormick, F.** (1996). Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by phosphorylation of the ras exchange factor hSOS1. *J Biol Chem* 271, 5871-5877.
- Pruitt, K. & Der, C. J.** (2001). Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis. *Cancer Lett* 171, 1-10.
- Pullen, N., Dennis, P. B., Andjelkovic, M., Dufner, A., Kozma, S. C., Hemmings, B. A. & Thomas, G.** (1998). Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science* 279, 707-710.
- Pumiglia, K. M. & Decker, S. J.** (1997). Cell cycle arrest mediated by the MEK/mitogen-activated protein kinase pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 448-452.

Qian, X., Esteban, L., Vass, W. C., Upadhyaya, C., Papageorge, A. G., Yienger, K., Ward, J. M., Lowy, D. R. & Santos, E. (2000). The Sos1 and Sos2 Ras-specific exchange factors: differences in placental expression and signaling properties. *EMBO J* 19, 642-654.

Qian, X., Vass, W. C., Papageorge, A. G., Anborgh, P. H. & Lowy, D. R. (1998). N terminus of Sos1 Ras exchange factor: critical roles for the Dbl and pleckstrin homology domains. *Mol Cell Biol* 18, 771-778.

Quilliam, L. A., Castro, A. F., Rogers-Graham, K. S., Martin, C. B., Der, C. J. & Bi, C. (1999). M-Ras/R-Ras3, a transforming ras protein regulated by Sos1, GRF1, and p120 Ras GTPase-activating protein, interacts with the putative Ras effector AF6. *J Biol Chem* 274, 23850-23857.

Quilliam, L. A., Huff, S. Y., Rabun, K. M., Wei, W., Park, W., Broek, D. & Der, C. J. (1994). Membrane-targeting potentiates guanine nucleotide exchange factor CDC25 and SOS1 activation of Ras transforming activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 8512-8516.

Quilliam, L. A., Rebhun, J. F. & Castro, A. F. (2002). A growing family of guanine nucleotide exchange factors is responsible for activation of Ras-family GTPases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 71, 391-444.

Raman, M., Chen, W. & Cobb, M. H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26, 3100-3112.

Rameh, L. E., Arvidsson, A., Carraway, K. L., 3rd, Couvillon, A. D., Rathbun, G., Crompton, A., VanRenterghem, B., Czech, M. P., Ravichandran, K. S., Burakoff, S. J., Wang, D. S., Chen, C. S. & Cantley, L. C. (1997). A comparative analysis of the phosphoinositide binding specificity of pleckstrin homology domains. *J Biol Chem* 272, 22059-22066.

Rampalli, S., Pavithra, L., Bhatt, A., Kundu, T. K. & Chattopadhyay, S. (2005). Tumor suppressor SMAR1 mediates cyclin D1 repression by recruitment of the SIN3/histone deacetylase 1 complex. *Mol Cell Biol* 25, 8415-8429.

Rauch, B. H., Weber, A., Braun, M., Zimmermann, N. & Schror, K. (2000). PDGF-induced Akt phosphorylation does not activate NF-kappa B in human vascular smooth muscle cells and fibroblasts. *FEBS Lett* 481, 3-7.

Raught, B., Peiretti, F., Gingras, A. C., Livingstone, M., Shahbazian, D., Mayeur, G. L., Polakiewicz, R. D., Sonenberg, N. & Hershey, J. W. (2004). Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *EMBO J* 23, 1761-1769.

Ray, P. D., Huang, B. W. & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling*.

- Rayasam, G. V., Tulasi, V. K., Sodhi, R., Davis, J. A. & Ray, A.** (2009). Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake. *Br J Pharmacol* 156, 885-898.
- Ren, C., Li, L., Goltsov, A. A., Timme, T. L., Tahir, S. A., Wang, J., Garza, L., Chinault, A. C. & Thompson, T. C.** (2002). mRTPV-1, a novel p53 target gene with proapoptotic activities. *Mol Cell Biol* 22, 3345-3357.
- Ren, C., Li, L., Yang, G., Timme, T. L., Goltsov, A., Ji, X., Addai, J., Luo, H., Ittmann, M. M. & Thompson, T. C.** (2004). RTPV-1, a tumor suppressor inactivated by methylation in prostate cancer. *Cancer Res* 64, 969-976.
- Repasky, G. A., Chenette, E. J. & Der, C. J.** (2004). Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends Cell Biol* 14, 639-647.
- Reyes-Hernandez, O. D., Mejia-Garcia, A., Sanchez-Ocampo, E. M., Cabanas-Cortes, M. A., Ramirez, P., Chavez-Gonzalez, L., Gonzalez, F. J. & Elizondo, G.** (2010). Ube2I3 gene expression is modulated by activation of the aryl hydrocarbon receptor: implications for p53 ubiquitination. *Biochem Pharmacol* 80, 932-940.
- Rivera, V. M., Miranti, C. K., Misra, R. P., Ginty, D. D., Chen, R. H., Blenis, J. & Greenberg, M. E.** (1993). A growth factor-induced kinase phosphorylates the serum response factor at a site that regulates its DNA-binding activity. *Mol Cell Biol* 13, 6260-6273.
- Roberts, A. E., Araki, T., Swanson, K. D., Montgomery, K. T., Schiripo, T. A., Joshi, V. A., Li, L., Yassin, Y., Tamburino, A. M., Neel, B. G. & Kucherlapati, R. S.** (2007). Germline gain-of-function mutations in SOS1 cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 39, 70-74.
- Robinson, L. C., Gibbs, J. B., Marshall, M. S., Sigal, I. S. & Tatchell, K.** (1987). CDC25: a component of the RAS-adenylate cyclase pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 235, 1218-1221.
- Rodriguez-Viciano, P., Tetsu, O., Tidyman, W. E., Estep, A. L., Conger, B. A., Cruz, M. S., McCormick, F. & Rauen, K. A.** (2006). Germline mutations in genes within the MAPK pathway cause cardio-facio-cutaneous syndrome. *Science* 311, 1287-1290.
- Rodriguez-Viciano, P., Warne, P. H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M. J., Waterfield, M. D. & Downward, J.** (1994). Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 370, 527-532.
- Rodriguez-Viciano, P., Warne, P. H., Khwaja, A., Marte, B. M., Pappin, D., Das, P., Waterfield, M. D., Ridley, A. & Downward, J.** (1997). Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell* 89, 457-467.

Rodriguez-Viciano, P., Warne, P. H., Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M. D. & Downward, J. (1996). Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. *EMBO J* 15, 2442-2451.

Rogge, R. D., Karlovich, C. A. & Banerjee, U. (1991). Genetic dissection of a neurodevelopmental pathway: Son of sevenless functions downstream of the sevenless and EGF receptor tyrosine kinases. *Cell* 64, 39-48.

Rojas, J. M., Coque, J. J., Guerrero, C., Aroca, P., Font de Mora, J., de la Cruz, X., Lorenzi, M. V., Esteban, L. M. & Santos, E. (1996). A 15 amino acid stretch close to the Grb2-binding domain defines two differentially expressed hSos1 isoforms with markedly different Grb2 binding affinity and biological activity. *Oncogene* 12, 2291-2300.

Rojas, J. M., Subleski, M., Coque, J. J., Guerrero, C., Saez, R., Li, B. Q., Lopez, E., Zarich, N., Aroca, P., Kamata, T. & Santos, E. (1999). Isoform-specific insertion near the Grb2-binding domain modulates the intrinsic guanine nucleotide exchange activity of hSos1. *Oncogene* 18, 1651-1661.

Romashkova, J. A. & Makarov, S. S. (1999). NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 401, 86-90.

Roose, J. P., Mollenauer, M., Ho, M., Kurosaki, T. & Weiss, A. (2007). Unusual interplay of two types of Ras activators, RasGRP and SOS, establishes sensitive and robust Ras activation in lymphocytes. *Mol Cell Biol* 27, 2732-2745.

Rossant, J. & Cross, J. C. (2001). Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat Rev Genet* 2, 538-548.

Rossig, L., Jadidi, A. S., Urbich, C., Badorff, C., Zeiher, A. M. & Dimmeler, S. (2001). Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. *Mol Cell Biol* 21, 5644-5657.

Rothe, G. & Valet, G. (1990). Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *J Leukoc Biol* 47, 440-448.

Roux, P. P., Ballif, B. A., Anjum, R., Gygi, S. P. & Blenis, J. (2004). Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 13489-13494.

Roux, P. P., Shahbazian, D., Vu, H., Holz, M. K., Cohen, M. S., Taunton, J., Sonenberg, N. & Blenis, J. (2007). RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *J Biol Chem* 282, 14056-14064.

Rozakis-Adcock, M., Fernley, R., Wade, J., Pawson, T. & Bowtell, D. (1993). The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature* 363, 83-85.

Rozakis-Adcock, M., McGlade, J., Mbamalu, G., Pelicci, G., Daly, R., Li, W., Batzer, A., Thomas, S., Brugge, J., Pelicci, P. G. & et al. (1992). Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature* 360, 689-692.

Rozakis-Adcock, M., van der Geer, P., Mbamalu, G. & Pawson, T. (1995). MAP kinase phosphorylation of mSos1 promotes dissociation of mSos1-Shc and mSos1-EGF receptor complexes. *Oncogene* 11, 1417-1426.

Rozen, S. & Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132, 365-386.

Ruderman, N. B., Kapeller, R., White, M. F. & Cantley, L. C. (1990). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 1411-1415.

Saitoh, M., Pullen, N., Brennan, P., Cantrell, D., Dennis, P. B. & Thomas, G. (2002). Regulation of an activated S6 kinase 1 variant reveals a novel mammalian target of rapamycin phosphorylation site. *J Biol Chem* 277, 20104-20112.

Sakaue, M., Bowtell, D. & Kasuga, M. (1995). A dominant-negative mutant of mSOS1 inhibits insulin-induced Ras activation and reveals Ras-dependent and -independent insulin signaling pathways. *Mol Cell Biol* 15, 379-388.

Santos, E., Martin-Zanca, D., Reddy, E. P., Pierotti, M. A., Della Porta, G. & Barbacid, M. (1984). Malignant activation of a K-ras oncogene in lung carcinoma but not in normal tissue of the same patient. *Science* 223, 661-664.

Santos, E. & Nebreda, A. R. (1989). Structural and functional properties of ras proteins. *FASEB J* 3, 2151-2163.

Santos, E., Tronick, S. R., Aaronson, S. A., Pulciani, S. & Barbacid, M. (1982). T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes. *Nature* 298, 343-347.

Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. & Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098-1101.

Sardao, V. A., Oliveira, P. J., Holy, J., Oliveira, C. R. & Wallace, K. B. (2007). Vital imaging of H9c2 myoblasts exposed to tert-butylhydroperoxide—characterization of morphological features of cell death. *BMC Cell Biol* 8, 11.

Sarkozy, A., Carta, C., Moretti, S., Zampino, G., Digilio, M. C., Pantaleoni, F., Scioletti, A. P., Esposito, G., Cordeddu, V., Lepri, F., Petrangeli, V., Dentici, M. L., Mancini, G. M., Selicorni, A., Rossi, C., Mazzanti, L., Marino, B., Ferrero, G. B., Silengo, M. C., Memo, L., Stanzial, F., Faravelli, F., Stuppia, L., Puxeddu, E., Gelb, B. D., Dallapiccola, B. & Tartaglia, M. (2009). Germline BRAF mutations in Noonan, LEOPARD, and cardiofaciocutaneous syndromes: molecular diversity and associated phenotypic spectrum. *Hum Mutat* 30, 695-702.

Sato, S., Fujita, N. & Tsuruo, T. (2000). Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 10832-10837.

Satoh, T., Endo, M., Nakafuku, M., Akiyama, T., Yamamoto, T. & Kaziro, Y. (1990). Accumulation of p21ras.GTP in response to stimulation with epidermal growth factor and oncogene products with tyrosine kinase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 7926-7929.

Satoh, T., Endo, M., Nakafuku, M., Nakamura, S. & Kaziro, Y. (1990). Platelet-derived growth factor stimulates formation of active p21ras.GTP complex in Swiss mouse 3T3 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 5993-5997.

Satoh, T., Nakafuku, M. & Kaziro, Y. (1992). Function of Ras as a molecular switch in signal transduction. *J Biol Chem* 267, 24149-24152.

Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211-225.

Schmidt, A. & Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* 16, 1587-1609.

Schmidt, M., Fernandez de Mattos, S., van der Horst, A., Klompmaker, R., Kops, G. J., Lam, E. W., Burgering, B. M. & Medema, R. H. (2002). Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D. *Mol Cell Biol* 22, 7842-7852.

Schubbert, S., Zenker, M., Rowe, S. L., Boll, S., Klein, C., Bollag, G., van der Burgt, I., Musante, L., Kalscheuer, V., Wehner, L. E., Nguyen, H., West, B., Zhang, K. Y., Siermans, E., Rauch, A., Niemeyer, C. M., Shannon, K. & Kratz, C. P. (2006). Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 38, 331-336.

Scita, G., Nordstrom, J., Carbone, R., Tenca, P., Giardina, G., Gutkind, S., Bjarnegard, M., Betsholtz, C. & Di Fiore, P. P. (1999). EPS8 and E3B1 transduce signals from Ras to Rac. *Nature* 401, 290-293.

Scita, G., Tenca, P., Arces, L. B., Tocchetti, A., Frittoli, E., Giardina, G., Ponzanelli, I., Sini, P., Innocenti, M. & Di Fiore, P. P. (2001). An effector region in Eps8 is responsible for the

activation of the Rac-specific GEF activity of Sos-1 and for the proper localization of the Rac-based actin-polymerizing machine. *The Journal of cell biology* 154, 1031-1044.

Seger, R., Ahn, N. G., Posada, J., Munar, E. S., Jensen, A. M., Cooper, J. A., Cobb, M. H. & Krebs, E. G. (1992). Purification and characterization of mitogen-activated protein kinase activator(s) from epidermal growth factor-stimulated A431 cells. *J Biol Chem* 267, 14373-14381.

Sekulic, A., Hudson, C. C., Homme, J. L., Yin, P., Otterness, D. M., Karnitz, L. M. & Abraham, R. T. (2000). A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer Res* 60, 3504-3513.

Seo, J. H., Ahn, Y., Lee, S. R., Yeol Yeo, C. & Chung Hur, K. (2005). The major target of the endogenously generated reactive oxygen species in response to insulin stimulation is phosphatase and tensin homolog and not phosphoinositide-3 kinase (PI-3 kinase) in the PI-3 kinase/Akt pathway. *Mol Biol Cell* 16, 348-357.

Seth, A., Gonzalez, F. A., Gupta, S., Raden, D. L. & Davis, R. J. (1992). Signal transduction within the nucleus by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 267, 24796-24804.

Sewing, A., Wiseman, B., Lloyd, A. C. & Land, H. (1997). High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol* 17, 5588-5597.

Shahbazian, D., Roux, P. P., Mieulet, V., Cohen, M. S., Raught, B., Taunton, J., Hershey, J. W., Blenis, J., Pende, M. & Sonenberg, N. (2006). The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *EMBO J* 25, 2781-2791.

Shannon, K. & Bollag, G. (2007). Sending out an SOS. *Nat Genet* 39, 8-9.

Shaw, R. J. & Cantley, L. C. (2006). Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 441, 424-430.

Sherr, C. J. & Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13, 1501-1512.

Shields, J. M., Pruitt, K., McFall, A., Shaub, A. & Der, C. J. (2000). Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'. *Trends Cell Biol* 10, 147-154.

Shimano, H., Shimomura, I., Hammer, R. E., Herz, J., Goldstein, J. L., Brown, M. S. & Horton, J. D. (1997). Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene. *J Clin Invest* 100, 2115-2124.

- Shin, I., Yakes, F. M., Rojo, F., Shin, N. Y., Bakin, A. V., Baselga, J. & Arteaga, C. L. (2002).** PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med* 8, 1145-1152.
- Shinohara, N., Ogiso, Y., Tanaka, M., Sazawa, A., Harabayashi, T. & Koyanagi, T. (1997).** The significance of Ras guanine nucleotide exchange factor, son of sevenless protein, in renal cell carcinoma cell lines. *The Journal of urology* 158, 908-911.
- Shou, C., Farnsworth, C. L., Neel, B. G. & Feig, L. A. (1992).** Molecular cloning of cDNAs encoding a guanine-nucleotide-releasing factor for Ras p21. *Nature* 358, 351-354.
- Sibilia, M., Fleischmann, A., Behrens, A., Stingl, L., Carroll, J., Watt, F. M., Schlessinger, J. & Wagner, E. F. (2000).** The EGF receptor provides an essential survival signal for SOS-dependent skin tumor development. *Cell* 102, 211-220.
- Simon, M. A., Bowtell, D. D., Dodson, G. S., Lavery, T. R. & Rubin, G. M. (1991).** Ras1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the sevenless protein tyrosine kinase. *Cell* 67, 701-716.
- Simon, M. A., Dodson, G. S. & Rubin, G. M. (1993).** An SH3-SH2-SH3 protein is required for p21Ras1 activation and binds to sevenless and Sos proteins in vitro. *Cell* 73, 169-177.
- Singh, K. K., Erkelenz, S., Rattay, S., Dehof, A. K., Hildebrandt, A., Schulze-Osthoff, K., Schaal, H. & Schwerk, C. (2010).** Human SAP18 mediates assembly of a splicing regulatory multiprotein complex via its ubiquitin-like fold. *RNA* 16, 2442-2454.
- Sini, P., Cannas, A., Koleske, A. J., Di Fiore, P. P. & Scita, G. (2004).** Abl-dependent tyrosine phosphorylation of Sos-1 mediates growth-factor-induced Rac activation. *Nature cell biology* 6, 268-274.
- Skolnik, E. Y., Lee, C. H., Batzer, A., Vicentini, L. M., Zhou, M., Daly, R., Myers, M. J., Jr., Backer, J. M., Ullrich, A., White, M. F. & et al. (1993).** The SH2/SK3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS1 and Shc: implications for insulin control of ras signalling. *EMBO J* 12, 1929-1936.
- Soisson, S. M., Nimnual, A. S., Uy, M., Bar-Sagi, D. & Kuriyan, J. (1998).** Crystal structure of the Dbl and pleckstrin homology domains from the human Son of sevenless protein. *Cell* 95, 259-268.
- Soloaga, A., Thomson, S., Wiggin, G. R., Rampersaud, N., Dyson, M. H., Hazzalin, C. A., Mahadevan, L. C. & Arthur, J. S. (2003).** MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *EMBO J* 22, 2788-2797.
- Sondermann, H., Nagar, B., Bar-Sagi, D. & Kuriyan, J. (2005).** Computational docking and solution x-ray scattering predict a membrane-interacting role for the histone domain of

the Ras activator son of sevenless. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 16632-16637.

Sondermann, H., Soisson, S. M., Bar-Sagi, D. & Kuriyan, J. (2003). Tandem histone folds in the structure of the N-terminal segment of the ras activator Son of Sevenless. *Structure* 11, 1583-1593.

Sondermann, H., Soisson, S. M., Boykevich, S., Yang, S. S., Bar-Sagi, D. & Kuriyan, J. (2004). Structural analysis of autoinhibition in the Ras activator Son of sevenless. *Cell* 119, 393-405.

Stacey, D. W. & Kung, H. F. (1984). Transformation of NIH 3T3 cells by microinjection of Ha-ras p21 protein. *Nature* 310, 508-511.

Stefanovsky, V. Y., Pelletier, G., Hannan, R., Gagnon-Kugler, T., Rothblum, L. I. & Moss, T. (2001). An immediate response of ribosomal transcription to growth factor stimulation in mammals is mediated by ERK phosphorylation of UBF. *Mol Cell* 8, 1063-1073.

Stokoe, D., Macdonald, S. G., Cadwallader, K., Symons, M. & Hancock, J. F. (1994). Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science* 264, 1463-1467.

Stokoe, D., Stephens, L. R., Copeland, T., Gaffney, P. R., Reese, C. B., Painter, G. F., Holmes, A. B., McCormick, F. & Hawkins, P. T. (1997). Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science* 277, 567-570.

Su, Z. J., Hahn, C. N., Goodall, G. J., Reck, N. M., Leske, A. F., Davy, A., Kremmidiotis, G., Vadas, M. A. & Gamble, J. R. (2004). A vascular cell-restricted RhoGAP, p73RhoGAP, is a key regulator of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 12212-12217.

Sun, H., Charles, C. H., Lau, L. F. & Tonks, N. K. (1993). MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell* 75, 487-493.

Swanson, K. D., Winter, J. M., Reis, M., Bentires-Alj, M., Greulich, H., Grewal, R., Hruban, R. H., Yeo, C. J., Yassin, Y., Iartchouk, O., Montgomery, K., Whitman, S. P., Caligiuri, M. A., Loh, M. L., Gilliland, D. G., Look, A. T., Kucherlapati, R., Kern, S. E., Meyerson, M. & Neel, B. G. (2008). SOS1 mutations are rare in human malignancies: implications for Noonan Syndrome patients. *Genes Chromosomes Cancer* 47, 253-259.

Takai, Y., Sasaki, T. & Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81, 153-208.

Takuwa, N., Fukui, Y. & Takuwa, Y. (1999). Cyclin D1 expression mediated by phosphatidylinositol 3-kinase through mTOR-p70(S6K)-independent signaling in growth factor-stimulated NIH 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* 19, 1346-1358.

Takuwa, N. & Takuwa, Y. (1997). Ras activity late in G1 phase required for p27kip1 down-regulation, passage through the restriction point, and entry into S phase in growth factor-stimulated NIH 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* 17, 5348-5358.

Tartaglia, M., Mehler, E. L., Goldberg, R., Zampino, G., Brunner, H. G., Kremer, H., van der Burgt, I., Crosby, A. H., Ion, A., Jeffery, S., Kalidas, K., Patton, M. A., Kucherlapati, R. S. & Gelb, B. D. (2001). Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 29, 465-468.

Tartaglia, M., Pennacchio, L. A., Zhao, C., Yadav, K. K., Fodale, V., Sarkozy, A., Pandit, B., Oishi, K., Martinelli, S., Schackwitz, W., Ustaszewska, A., Martin, J., Bristow, J., Carta, C., Lepri, F., Neri, C., Vasta, I., Gibson, K., Curry, C. J., Sigüero, J. P., Digilio, M. C., Zampino, G., Dallapiccola, B., Bar-Sagi, D. & Gelb, B. D. (2007). Gain-of-function SOS1 mutations cause a distinctive form of Noonan syndrome. *Nat Genet* 39, 75-79.

Tartaglia, M., Zampino, G. & Gelb, B. D. (2010). Noonan syndrome: clinical aspects and molecular pathogenesis. *Mol Syndromol* 1, 2-26.

Taylor, S. J. & Shalloway, D. (1996). Cell cycle-dependent activation of Ras. *Curr Biol* 6, 1621-1627.

Thompson, T. C. (2010). Glioma pathogenesis-related protein 1: tumor-suppressor activities and therapeutic potential. *Yonsei Med J* 51, 479-483.

Tidyman, W. E. & Rauen, K. A. (2009). The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation. *Curr Opin Genet Dev* 19, 230-236.

Timofeeva, O. A., Zhang, X., Ressom, H. W., Varghese, R. S., Kallakury, B. V., Wang, K., Ji, Y., Cheema, A., Jung, M., Brown, M. L., Rhim, J. S. & Dritschilo, A. (2009). Enhanced expression of SOS1 is detected in prostate cancer epithelial cells from African-American men. *Int J Oncol* 35, 751-760.

Tobiume, K., Matsuzawa, A., Takahashi, T., Nishitoh, H., Morita, K., Takeda, K., Minowa, O., Miyazono, K., Noda, T. & Ichijo, H. (2001). ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep* 2, 222-228.

Tognon, C. E., Kirk, H. E., Passmore, L. A., Whitehead, I. P., Der, C. J. & Kay, R. J. (1998). Regulation of RasGRP via a phorbol ester-responsive C1 domain. *Mol Cell Biol* 18, 6995-7008.

- Toker, A. & Newton, A. C.** (2000). Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J Biol Chem* 275, 8271-8274.
- Torii, S., Yamamoto, T., Tsuchiya, Y. & Nishida, E.** (2006). ERK MAP kinase in G cell cycle progression and cancer. *Cancer Sci* 97, 697-702.
- Turjanski, A. G., Vaque, J. P. & Gutkind, J. S.** (2007). MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene* 26, 3240-3253.
- Tusher, V. G., Tibshirani, R. & Chu, G.** (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 5116-5121.
- Ueki, K., Matsuda, S., Tobe, K., Gotoh, Y., Tamemoto, H., Yachi, M., Akanuma, Y., Yazaki, Y., Nishida, E. & Kadowaki, T.** (1994). Feedback regulation of mitogen-activated protein kinase kinase activity of c-Raf-1 by insulin and phorbol ester stimulation. *J Biol Chem* 269, 15756-15761.
- Van der Kaay, J., Beck, M., Gray, A. & Downes, C. P.** (1999). Distinct phosphatidylinositol 3-kinase lipid products accumulate upon oxidative and osmotic stress and lead to different cellular responses. *J Biol Chem* 274, 35963-35968.
- Vemuri, G. S. & Rittenhouse, S. E.** (1994). Wortmannin inhibits serum-induced activation of phosphoinositide 3-kinase and proliferation of CHR-288 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 202, 1619-1623.
- Vivanco, I. & Sawyers, C. L.** (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 489-501.
- Vojtek, A. B. & Der, C. J.** (1998). Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *J Biol Chem* 273, 19925-19928.
- Vuori, K., Hirai, H., Aizawa, S. & Ruoslahti, E.** (1996). Introduction of p130cas signaling complex formation upon integrin-mediated cell adhesion: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol* 16, 2606-2613.
- Wan, Y., Kurosaki, T. & Huang, X. Y.** (1996). Tyrosine kinases in activation of the MAP kinase cascade by G-protein-coupled receptors. *Nature* 380, 541-544.
- Wang, D. Z., Hammond, V. E., Abud, H. E., Bertonecello, I., McAvoy, J. W. & Bowtell, D. D.** (1997). Mutation in Sos1 dominantly enhances a weak allele of the EGFR, demonstrating a requirement for Sos1 in EGFR signaling and development. *Genes Dev* 11, 309-320.

Wang, W., Fisher, E. M., Jia, Q., Dunn, J. M., Porfiri, E., Downward, J. & Egan, S. E. (1995). The Grb2 binding domain of mSos1 is not required for downstream signal transduction. *Nat Genet* 10, 294-300.

Wang, X., McCullough, K. D., Franke, T. F. & Holbrook, N. J. (2000). Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival. *J Biol Chem* 275, 14624-14631.

Waskiewicz, A. J., Flynn, A., Proud, C. G. & Cooper, J. A. (1997). Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J* 16, 1909-1920.

Watanabe, T., Shinohara, N., Moriya, K., Sazawa, A., Kobayashi, Y., Ogiso, Y., Takiguchi, M., Yasuda, J., Koyanagi, T., Kuzumaki, N. & Hashimoto, A. (2000). Significance of the Grb2 and son of sevenless (Sos) proteins in human bladder cancer cell lines. *IUBMB life* 49, 317-320.

Waters, S. B., Holt, K. H., Ross, S. E., Syu, L. J., Guan, K. L., Saltiel, A. R., Koretzky, G. A. & Pessin, J. E. (1995). Desensitization of Ras activation by a feedback disassociation of the SOS-Grb2 complex. *J Biol Chem* 270, 20883-20886.

Waters, S. B., Yamauchi, K. & Pessin, J. E. (1995). Insulin-stimulated disassociation of the SOS-Grb2 complex. *Mol Cell Biol* 15, 2791-2799.

Weber, J. D., Raben, D. M., Phillips, P. J. & Baldassare, J. J. (1997). Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G1 phase. *Biochem J* 326 (Pt 1), 61-68.

Wei, W., Das, B., Park, W. & Broek, D. (1994). Cloning and analysis of human cDNAs encoding a 140-kDa brain guanine nucleotide-exchange factor, Cdc25GEF, which regulates the function of Ras. *Gene* 151, 279-284.

Welham, M. J., Duronio, V., Leslie, K. B., Bowtell, D. & Schrader, J. W. (1994). Multiple heparin-binding growth factors, with the exception of interleukin-4, induce modification of Shc and mSos1, but not their translocation. *J Biol Chem* 269, 21165-21176.

Welsh, G. I., Miller, C. M., Loughlin, A. J., Price, N. T. & Proud, C. G. (1998). Regulation of eukaryotic initiation factor eIF2B: glycogen synthase kinase-3 phosphorylates a conserved serine which undergoes dephosphorylation in response to insulin. *FEBS Lett* 421, 125-130.

Wennerberg, K., Rossman, K. L. & Der, C. J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 118, 843-846.

Westwick, J. K., Lambert, Q. T., Clark, G. J., Symons, M., Van Aelst, L., Pestell, R. G. & Der, C. J. (1997). Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple, PAK-independent pathways. *Mol Cell Biol* 17, 1324-1335.

- Whisler, R. L., Goyette, M. A., Grants, I. S. & Newhouse, Y. G.** (1995). Sublethal levels of oxidant stress stimulate multiple serine/threonine kinases and suppress protein phosphatases in Jurkat T cells. *Arch Biochem Biophys* 319, 23-35.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B. & Johnson, G. L.** (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79, 143-180.
- Winston, L. A. & Hunter, T.** (1996). Intracellular signalling: putting JAKs on the kinase MAP. *Curr Biol* 6, 668-671.
- Wojnowski, L., Stancato, L. F., Zimmer, A. M., Hahn, H., Beck, T. W., Larner, A. C., Rapp, U. R. & Zimmer, A.** (1998). Craf-1 protein kinase is essential for mouse development. *Mech Dev* 76, 141-149.
- Woods, D., Parry, D., Cherwinski, H., Bosch, E., Lees, E. & McMahon, M.** (1997). Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol* 17, 5598-5611.
- Wright, V. P., Reiser, P. J. & Clanton, T. L.** (2009). Redox modulation of global phosphatase activity and protein phosphorylation in intact skeletal muscle. *J Physiol* 587, 5767-5781.
- Wullschleger, S., Loewith, R. & Hall, M. N.** (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124, 471-484.
- Xiao, W., Ai, J., Habermacher, G., Volpert, O., Yang, X., Zhang, A. Y., Hahn, J., Cai, X. & Wang, Z.** (2009). U19/Eaf2 binds to and stabilizes von hippel-lindau protein. *Cancer Res* 69, 2599-2606.
- Xiao, W., Zhang, Q., Habermacher, G., Yang, X., Zhang, A. Y., Cai, X., Hahn, J., Liu, J., Pins, M., Doglio, L., Dhir, R., Gingrich, J. & Wang, Z.** (2008). U19/Eaf2 knockout causes lung adenocarcinoma, B-cell lymphoma, hepatocellular carcinoma and prostatic intraepithelial neoplasia. *Oncogene* 27, 1536-1544.
- Xiao, W., Zhang, Q., Jiang, F., Pins, M., Kozlowski, J. M. & Wang, Z.** (2003). Suppression of prostate tumor growth by U19, a novel testosterone-regulated apoptosis inducer. *Cancer Res* 63, 4698-4704.
- Yadav, K. K. & Bar-Sagi, D.** (2010). Allosteric gating of Son of sevenless activity by the histone domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 3436-3440.
- Yam, J. W., Jin, D. Y., So, C. W. & Chan, L. C.** (2004). Identification and characterization of EBP, a novel EEN binding protein that inhibits Ras signaling and is recruited into the nucleus by the MLL-EEN fusion protein. *Blood* 103, 1445-1453.

Yamamoto, T., Ebisuya, M., Ashida, F., Okamoto, K., Yonehara, S. & Nishida, E. (2006). Continuous ERK activation downregulates antiproliferative genes throughout G1 phase to allow cell-cycle progression. *Curr Biol* 16, 1171-1182.

Yamauchi, T., Hara, K., Maeda, S., Yasuda, K., Takahashi, A., Horikoshi, M., Nakamura, M., Fujita, H., Grarup, N., Cauchi, S., Ng, D. P., Ma, R. C., Tsunoda, T., Kubo, M., Watada, H., Maegawa, H., Okada-Iwabu, M., Iwabu, M., Shojima, N., Shin, H. D., Andersen, G., Witte, D. R., Jorgensen, T., Lauritzen, T., Sandbaek, A., Hansen, T., Ohshige, T., Omori, S., Saito, I., Kaku, K., Hirose, H., So, W. Y., Beury, D., Chan, J. C., Park, K. S., Tai, E. S., Ito, C., Tanaka, Y., Kashiwagi, A., Kawamori, R., Kasuga, M., Froguel, P., Pedersen, O., Kamatani, N., Nakamura, Y. & Kadowaki, T. (2010). A genome-wide association study in the Japanese population identifies susceptibility loci for type 2 diabetes at UBE2E2 and C2CD4A-C2CD4B. *Nat Genet* 42, 864-868.

Yang, S. S., Van Aelst, L. & Bar-Sagi, D. (1995). Differential interactions of human Sos1 and Sos2 with Grb2. *J Biol Chem* 270, 18212-18215.

Yoon, S. & Seger, R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24, 21-44.

Zarich, N., Oliva, J. L., Jorge, R., Santos, E. & Rojas, J. M. (2000). The isoform-specific stretch of hSos1 defines a new Grb2-binding domain. *Oncogene* 19, 5872-5883.

Zarich, N., Oliva, J. L., Martinez, N., Jorge, R., Ballester, A., Gutierrez-Eisman, S., Garcia-Vargas, S. & Rojas, J. M. (2006). Grb2 is a negative modulator of the intrinsic Ras-GEF activity of hSos1. *Mol Biol Cell* 17, 3591-3597.

Zhang, Y., Zhang, H. M., Shi, Y., Lustgarten, M., Li, Y., Qi, W., Zhang, B. X. & Van Remmen, H. (2010). Loss of manganese superoxide dismutase leads to abnormal growth and signal transduction in mouse embryonic fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 49, 1255-1262.

Zhao, C., Du, G., Skowronek, K., Frohman, M. A. & Bar-Sagi, D. (2007). Phospholipase D2-generated phosphatidic acid couples EGFR stimulation to Ras activation by Sos. *Nature cell biology* 9, 706-712.

Zhao, H., Li, Y. Y., Fucini, R. V., Ross, S. E., Pessin, J. E. & Koretzky, G. A. (1997). T cell receptor-induced phosphorylation of Sos requires activity of CD45, Lck, and protein kinase C, but not ERK. *J Biol Chem* 272, 21625-21634.

Zheng, Y. & Quilliam, L. A. (2003). Activation of the Ras superfamily of small GTPases. Workshop on exchange factors. *EMBO Rep* 4, 463-468.

Zhou, B. P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M. H. & Hung, M. C. (2001). Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nature cell biology* 3, 245-252.