

RasGRP1 promueve la activación de la vía PDK-1/AKT/mTOR independientemente de su actividad.

Marta Marina Arroyo^{1, 2}, Javier Arranz-Nicolás², Raquel Arcos², Antonia Ávila-Flores², Isabel Mérida^{2, a}

1. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. 2. Departamento de Inmunología y Oncología, Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 28049 Madrid, España.

a. i.merida@cnb.csic.es

Palabras clave: RasGRP1; ERK; mTOR; señalización; linfocitos T

Resumen

RasGRP1 es un factor intercambiador de nucleótidos de Ras con un papel crucial en la activación de ERK a través del receptor de células T (TCR). RasGRP1 participa en la selección positiva de timocitos y en la activación de células T en periferia. La vía de ERK es la ruta canónica en la que está implicado RasGRP1, sin embargo, estudios recientes sugieren que RasGRP1 puede participar en la activación de otras cascadas de señalización. En este trabajo hemos estudiado el papel de RasGRP1 en la señalización basal de linfocitos T utilizando dos mutantes de la variante silvestre de RasGRP1. Uno contiene una mutación en el dominio catalítico, R271E, que provoca la pérdida de su actividad catalítica. La otra mutación está situada en el dominio de unión a calcio, E521A, y provoca un cambio estructural que no afecta la actividad catalítica. Los mutantes se transfectaron en células Jurkat y se determinó su efecto en la señalización basal y en combinación con distintos tratamientos farmacológicos. Nuestros resultados indican que RasGRP1 está implicado en la activación del eje PDK-1/AKT/mTOR independientemente de su actividad catalítica.

Cita: Marina Arroyo, Marta; Arranz-Nicolás, Javier; Arcos, Raquel; Ávila-Flores, Antonia; Mérida, Isabel (2017) RasGRP1 promueve la activación de la vía PDK-1/AKT/mTOR independientemente de su actividad. *dianas* 6 (2): e20170902. ISSN 1886-8746 journal.dianas.e20170902. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: © Marina-Arroyo M, Arranz-Nicolás J, Arcos R, Ávila-Flores A, Mérida I. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Introducción

La señalización vía receptor de linfocitos T (TCR) es un paso fundamental para el correcto desarrollo y funcionalidad del sistema inmune ya que tiene como efectos finales la producción de citoquinas y la proliferación y diferenciación de los linfocitos T [1]. La interacción del TCR con un antígeno, presentado por el complejo mayor de histocompatibilidad de una célula presentadora (APC), desencadena la activación de proteínas tirosina quinasa citosólicas de la familia Src, como Lck, que es específica de linfocitos [2]. Lck fosforila los dominios intracelulares del TCR (ITAMS) [3], generando sitios para el reclutamiento al TCR de una serie de proteínas adaptadoras y otras tirosina quinasas [4]. La fosfolipasa C- γ 1 (PLC- γ 1) [5] es reclutada y activada en estos complejos.

La PLC- γ 1 metaboliza el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂), generando diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃). El IP₃ aumenta la concentración de calcio citoplasmático, que estimula la fosfatasa activada por calcio calcineurina y la activación del factor de transcripción NFAT (factor nuclear de células T activadas) [6]. El DAG es imprescindible para la activación de varias cascadas de señalización entre las que destaca la activación de la GTPasa Ras. Ras se encuentra en la membrana plasmática en un equilibrio entre la forma inactiva (Ras-GDP) y la activa (Ras-GTP). Este equilibrio se regula por las proteínas intercambiadoras de guanina (GEFs) y por las proteínas aceleradoras de la actividad GTPasa (GAPs). La familia de las proteínas RasGRP1 son GEFs de Ras con expresión selectiva en cerebro y tejido hematopoyético. RasGRP1 se expresa en linfocitos T, donde tiene un papel fundamental en la activación de la vía de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK). Los ratones deficientes en la expresión de RasGRP1 tienen afectada la diferenciación tímica y presentan un importante déficit en las poblaciones de linfocitos T maduros [7, 8, 9].

RasGRP1, como los otros tres miembros de la familia, contiene un motivo de intercambio de Ras (REM)-Cdc25 que cataliza el intercambio de GDP por GTP en Ras. Al dominio catalítico de RasGRP1 le sigue un dominio de unión a calcio con dos manos de calcio (EF), un dominio C1, un segmento C-terminal y una hélice superenrollada (CC) (Fig. 1). El dominio C1 une DAG, y a sus análogos sintéticos como el PMA (forbol-12-miristato-13-acetato). La unión a este lípido permite el anclaje de RasGRP1 a la

membrana, donde se localiza su sustrato, Ras. Se conoce poco de cómo los dominios reguladores de RasGRP1 controlan su actividad [10]. Estudios recientes han descrito que RasGRP1 se mantiene en un estado de autoinhibición, y la unión de una molécula de calcio al primer EF provoca un cambio conformacional en la proteína facilitando su activación [11].

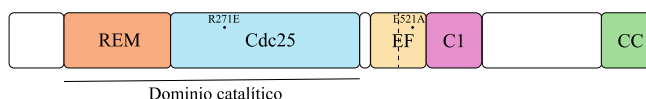


Figura 1.- Estructura de RasGRP1. Con un * se muestran las mutaciones presentes en los dos mutantes que se utilizaron en este trabajo. La mutación del residuo arginina (R) en la posición 271 por glutámico genera una forma de RasGRP1 sin actividad catalítica (kinase dead, KD). La mutación en el aminoácido glutámico 521 por una alanina se encuentra en una de las manos de unión de calcio.

En linfocitos T, el DAG producido tras la activación del TCR activa la vía RasGRP1/Ras/ERK, lo que lleva a la activación del factor de transcripción AP-1 (proteína activadora-1) y la expresión de varios genes, incluyendo el de la proteína de superficie CD69. El DAG también activa miembros de la familia de la proteína quinasa C (PKC) que cooperan con RasGRP1 en el control de la activación de ERK e inciden

también en la activación de otras rutas. En presencia de señales de coestimulación, la PKC θ es crucial para la activación del factor nuclear κ B (NF κ B) y coopera además con las rutas de señalización dependientes de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), que inciden en la quinasa dependiente de fosfoinosítidos (PDK-1) y en AKT [12,13,14]. Las rutas de señalización activadas por el TCR y por la coestimulación se integran también en la proteína diana de rapamicina en mamíferos (mTOR), una quinasa maestra que controla el crecimiento, la proliferación y diferenciación celulares. Estudios en leucemias, como la linfoblástica aguda (T-ALL), han revelado que RasGRP1 no sólo responde al DAG generado vía PLC- γ , sino que también es sensible al DAG basal disponible en la célula. Esto facilita que en estas células Ras promueva la señalización por citoquinas hacia el eje PI3K/AKT/mTOR (Fig. 2) [15].

El control de los niveles de DAG en linfocitos T tanto en estado basal como en respuesta a la estimulación antigénica, es por lo tanto crítico para la correcta activación de RasGRP1. Las diacilglicerol quinazas (DGK) catalizan la transformación de DAG en ácido fosfatídico (PA) [16]. En linfocitos T se expresan dos isoformas de esta familia, la DGK α y la DGK ζ , que, al consumir el DAG presente en la célula, limitan la activación del eje de Ras/ERK y de las PKC [17]. La función de estas dos isoformas no es redundante; estudios recientes indican que la regulación negativa de DAG por DGK ζ modula la activación basal de ERK así como la activación de la PKC θ y del eje PDK-1/AKT durante la coestimulación [18]. Estos estudios correlacionan con análisis previos que han descrito que los linfocitos deficientes en DGK ζ presentan una activación de mTOR [19].

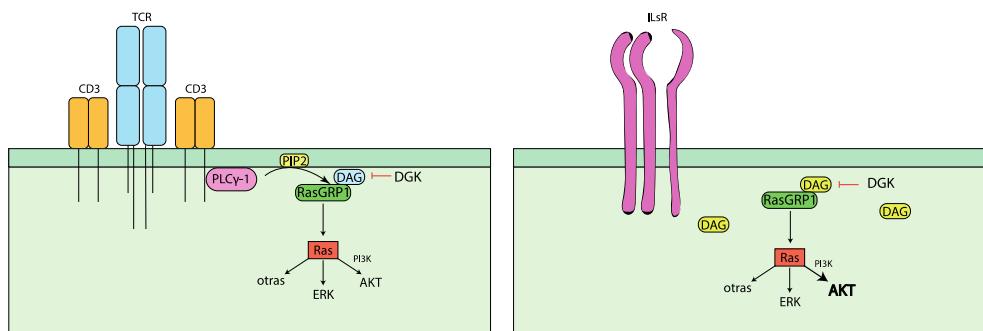


Figura 2.- Representación de la señalización en linfocitos T. A la izquierda, señalización desencadenada por el TCR. A la derecha, representación de la señalización promovida por el receptor de interleuquinas (ILsR).

Mediante el control del DAG, DGK ζ regularía la activación de Ras por RasGRP1, modulando, tanto la activación del eje Ras/ERK como la vía de PI3K/PDK-1/AKT. Estudios bioquímicos sugieren que el rápido intercambio de GDP/GTP catalizado por RasGRP1 es fundamental para su función en el control de estos dos ejes [15]. En este contexto, sin embargo, otros estudios sugieren que RasGRP1 puede promover la activación de mTOR independientemente de su función como activador de Ras/ERK. La variante RasGRP1^{Anaaef} presenta una mutación en las manos de calcio y es muy poco eficiente en la activación del eje Ras/ERK. Sin embargo, esta variante actúa sobre mTOR aumentando su actividad, lo que resulta en un aumento en la fosforilación de rpS6 y en la expresión del gen diana de mTOR, CD44 [20], aunque genes diana de Ras como CD69 se expresan a niveles normales en células T. Esto parece indicar la existencia de una vía de señalización no canónica por debajo de RasGRP1 hacia mTOR, y que no requeriría de la activación de Ras pero sí del reconocimiento del DAG [18]. Para entender mejor la relación entre la actividad de RasGRP1 y su control sobre mTOR, en este trabajo determinamos el efecto

de ganancia de función sobre la activación de mTOR del eje PDK-1/AKT mediante la sobreexpresión tanto de la forma silvestre de RasGRP1 como de dos mutantes en dos dominios. Para ello utilizamos células Jurkat, una línea celular inmortalizada de linfocitos T humanos como modelo de trabajo, y determinamos los niveles de activación de ERK, mTOR, PDK-1/AKT, y del marcador CD69, tanto en estado basal como tras la estimulación del TCR. Nuestros resultados sugieren que RasGRP1 tiene una función adaptadora, independiente de su actividad, sobre mTOR.

Materiales y métodos

Reactivos y anticuerpos

Para citometría utilizamos anticuerpo de ratón anti-CD69-PE (BD Pharmigen), anticuerpo de cabra anti-FC-PE de IgG de ratón (Southern), anticuerpo policlonal anti-pERK y anticuerpo anti-pS6 (Cell Signaling). Para western blot se usaron los siguientes anticuerpos: monoclonal anti-Lck de conejo (Pharmigen), policlonal anti-pERK de ratón, monoclonal anti-pAKT sustratos de conejo (Cell Signaling), monoclonal anti-GFP de ratón (Invitrogen), monoclonal anti- α -tubulina de ratón (Sigma), monoclonal anti-pS6 de ratón (Cell Signaling). Todos los inhibidores utilizados fueron de Sigma.

Western Blot

Los geles se transfirieron a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF), y se incubaron toda la noche a 4° C con los anticuerpos indicados disueltos en TBST (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween X-100) con un 5% de albúmina de suero bovino. Después de la incubación con el anticuerpo secundario (1h, temperatura ambiente), las membranas se visualizaron usando ECL (Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Las películas se analizaron con el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). Para determinar la cantidad de carga los valores obtenidos tras el análisis cuantitativo se normalizaron respecto al control de carga en todos los casos (tubulina o GADPH),

Citometría de flujo

Para el análisis de CD69, las muestras se tiñeron con un anticuerpo anti-CD69 acoplado al fluoróforo PE (ficoeritrina) y se fijaron con paraformaldehído 2% (PFA). La expresión de CD69 se determinó en grupos de células vivas y, de estas, tanto en las que habían incorporado GFP como las que no. Las células se analizaron en un citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Para detectar pERK y pS6 intracelular las células (2×10^6), se fijaron primero con PFA 2%. Tras la fijación se permeabilizaron con metanol 90% y se tiñeron con un anticuerpo anti-pERK o anti-pS6 primero y posteriormente con un anticuerpo de cabra anti-FC-PE de IgG de ratón.

Líneas celulares, condiciones de cultivo y transfección.

Células T Jurkat leucémicas humanas se mantuvieron en medio RPMI (Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (Invitrogen), 2 mM L-glutamina (BioWhittaker) y 1% Hepes (Sigma) (37 °C, 5% CO₂). Células T JCAM (células mutantes derivadas de la línea celular Jurkat que son deficientes en la proteína Lck) se cultivaron en las mismas condiciones. Las células Jurkat y JCAM se transfectaron con 6, 15 ó 20 μ g dependiendo del plásmido por electroporación (270 mV, 975 μ F; Bio-Rad). El plásmido conteniendo el cDNA para RasGRP1 fue un regalo del Dr James Stone de la Universidad de Alberta, Canadá. El cDNA de RasGRP1 se subclonó en el vector de expresión pEGFP (Clontech) de forma que la proteína expresada contiene GFP en el extremo N-terminal. Los mutantes RasGRP1 KD (R271E) o RasGRP1 EF (E521A) se generaron en el laboratorio empleando el Quickchange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) y oligos específicos.

Estimulación celular y lisis

Para los experimentos de estimulación del TCR, las células T Jurkat se recogieron en crecimiento exponencial y se lavaron dos veces con medio completo. Las células se estimularon con anti-CD3 (10^7 células/ml, 1 μ g μ l⁻¹ de anticuerpo) durante 5 minutos, 37° C. Después de la estimulación, las células se centrifugaron y suspendieron en buffer de lisis p70 (10 mM HEPES, pH 7.5, 15 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10% glicerol, 1% Nonidet P-40, 1 mM ditiotretitol) o buffer de lisis PKC (50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100) con inhibidores de proteasas (50 mM NaF, 10 mg ml⁻¹ leupeptina y aprotinina, 1 mM PMSF, 1 mM ortovanadato de sodio y 20 mM glicerofosfato). Las células se lisaron por incubación (20 min, 4 °C, en agitación). Los lisados se centrifugaron (12000 rpm, 15 min, 4 °C) y los sobrenadantes con las proteínas se cuantificaron para su posterior análisis por Western Blot de los lisados totales. Para los experimentos con células T Jurkat y JCAM en condiciones basales y los experimentos de inhibición con las mismas células, el procedimiento seguido fue el mismo.

Resultados

RasGRP1 promueve la activación de mTOR independientemente de su actividad.

Estudios anteriores indican que RasGRP1 controla no solo el eje de Ras/ERK sino también la activación de la ruta AKT/mTOR. Mientras que el control que ejerce RasGRP1 sobre la vía de ERK es claramente dependiente de su actividad catalítica, es decir, de su capacidad para generar RasGTP, si el control sobre mTOR requiere de esta actividad catalítica y/o bien la funcionalidad de otros de los dominios no se conoce (Figura 3A). Por ello en primer lugar comparamos el efecto de una versión silvestre de RasGRP1 (RasGRP1 WT) con el de una versión de la proteína con una mutación en el dominio catalítico, R271E (RasGRP1 KD, kinase dead).

Transfectamos células T Jurkat con construcciones que codificaban para GFP (usado como control), RasGRP1 WT o RasGRP1 KD, y tras 24 h analizamos las células por inmunoblot y citometría de flujo. Como RasGRP1 necesita de su actividad para promover el eje de Ras/ERK confirmamos primero el efecto de las distintas transfectantes sobre la activación de ERK. La sobreexpresión de RasGRP1 WT aumentó la cantidad de ERK fosforilado respecto al control (GFP). Sin embargo, en las células que sobreexpresan RasGRP1 KD, ERK permaneció igual que el control e incluso en algunos casos mostró una disminución respecto a las células control (Fig. 3B). La disminución en la fosforilación de ERK se debe a la pérdida de actividad GEF de RasGRP1, lo que sugiere que este mutante no sólo pierde la capacidad de activar Ras, sino que además de eso tiene un efecto dominante negativo, impidiendo el correcto funcionamiento del RasGRP1 endógeno.

CD69 es un receptor de lectina tipo C expresado en la membrana que se induce rápidamente tras la activación del TCR y cuyos niveles se correlacionan con la intensidad de la activación del eje RasGRP1/Ras/ERK [21]. La detección de la expresión de CD69 en la superficie de las células T por citometría de flujo permite correlacionar la expresión de CD69 con el nivel de expresión de RasGRP1 que se expresa como una proteína de fusión con GFP. El análisis del diagrama biparamétrico para la expresión de GFP y CD69 muestra una expresión equivalente de CD69 tanto en las células Jurkat negativas (CD69⁻GFP⁻) como positivas (CD69⁺GFP⁺) para la expresión de GFP. (Fig. 3C, izquierda). Cuando sobreexpresamos RasGRP1 WT en células Jurkat, se observa cómo la mayor expresión de GFP correlaciona con mayor expresión de CD69 (Figura 3C, centro). Esta correlación entre expresión de RasGRP1 WT y CD69 se pierde cuando se sobreexpresa RasGRP1 KD, como corresponde a la falta de actividad de este mutante (Fig. 3C, derecha). De acuerdo con los resultados del inmunoblot de pERK, el porcentaje de células transfectadas con el mutante KD que expresan CD69 es menor que para las que sobreexpresan RasGRP1 WT (Fig. 3D, izquierda). La intensidad media de fluorescencia (MFI), que refleja la cantidad de CD69 expresado por célula, fue también menor en el caso de la variante KD (Fig. 3C, derecha). Este valor está analizado dentro de la población positiva para GFP, empleado como marcador para poder detectar las células que se han transfectado correctamente.

Para determinar el efecto de sobreexpresar RasGRP1 en la ruta de AKT, empleamos un anticuerpo comercial que reconoce la secuencia Arg/Lys-X-Arg/Lys-X-X-fosfo-Ser/fosfo-Thr, característica de los sustratos de AKT. Observamos que la sobreexpresión de RasGRP1 WT inducía un claro aumento en el perfil de fosforilación (Fig. 3E). La sobreexpresión de RasGRP1 KD, a pesar de que no alcanza el mismo nivel de fosforilación que la forma activa, sí aumentaba la fosforilación en ciertas proteínas y fue en general mucho mayor que el control. Estos resultados sugieren que un aumento en la expresión de RasGRP1, independientemente de su actividad, se traduce en mayor fosforilación de sustratos de AKT.

Aunque el uso de anticuerpos de sustratos fosforilados no permite la identificación de proteínas específicas, la sobreexpresión de RasGRP1 WT indujo un aumento en la fosforilación de proteínas cercanas a los 30 kDa (Fig. 3E). A diferencia de lo observado en proteínas con alto peso molecular, el mutante sin actividad no reproducía el mismo efecto que la versión silvestre. En este peso molecular está comprendido el de la proteína rpS6, que es uno de los componentes finales de la vía de mTORC1 [22]. La proteína rpS6 presenta diferentes sitios susceptibles de fosforilación localizados en su extremo C-terminal, entre ellos los residuos Ser235/236 en la secuencia RRLssLR y que responden a la activación del TCR [23]. Utilizamos un anticuerpo específico contra estos residuos para determinar el efecto de RasGRP1, y observamos que ambas construcciones de RasGRP1 elevaron la fosforilación de rpS6 aunque, como en el caso de sustratos de AKT, el efecto fue más alto con la proteína silvestre (Fig. 3F). Para correlacionar el nivel de expresión de RasGRP1 con la fosforilación de ERK y de rpS6 por citometría de flujo se realizaron diferentes tinciones intracelulares de estas dos fosfoproteínas. Sin embargo, esta metodología no resultó lo suficientemente sensible como para detectar las diferencias en fosforilación inducidas por las diferentes versiones de RasGRP1 (datos no mostrados).

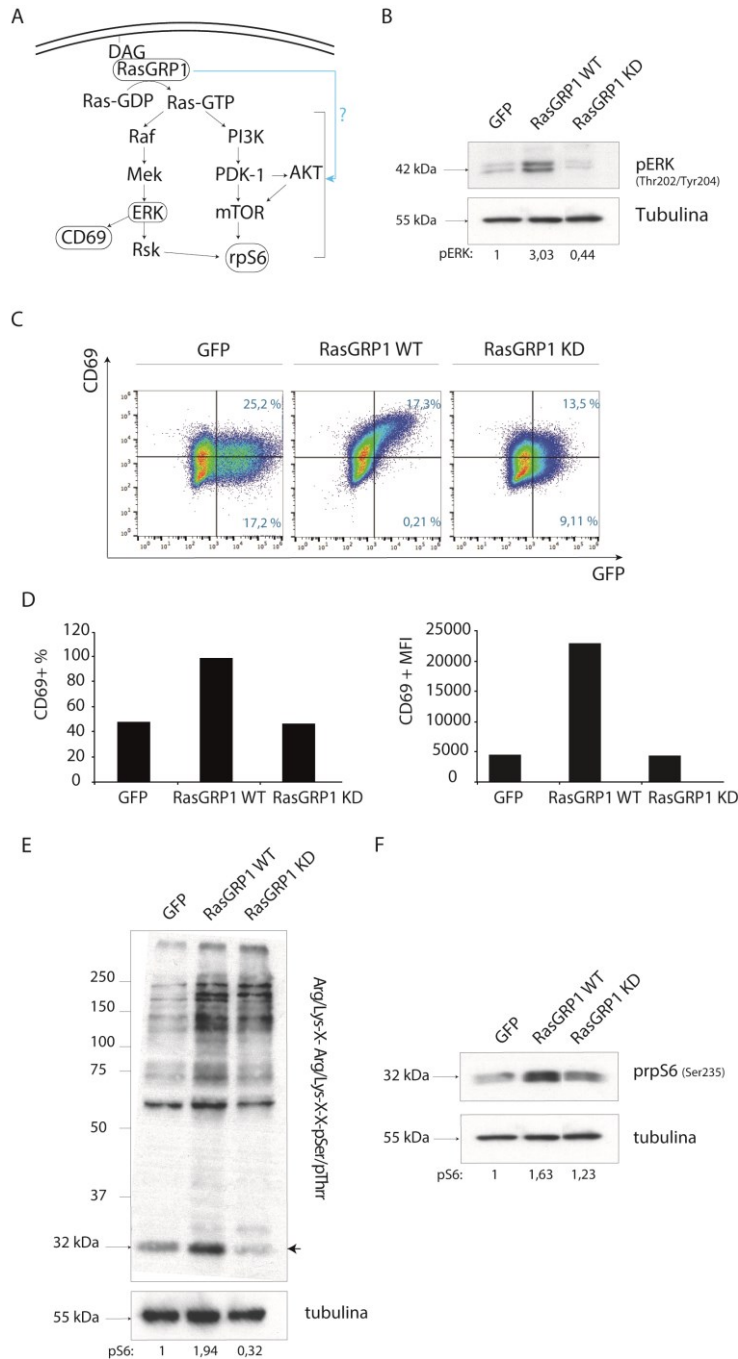


Figura 3.- Efecto de la actividad de GEF de RasGRP1 KD en la fosforilación de ERK y rpS6. A) Esquema de señalización de RasGRP1 en linfocitos T. Se indican la vía canónica y la adicional, objeto de estudio de este trabajo (en azul). Células Jurkat se transfectaron con GFP, RasGRP1 WT o RasGRP1 KD y 24 h después se analizaron por western blot o citometría de flujo. B) Western blot de pERK de las células transfectadas. C) Diagrama biparamétrico del porcentaje de GFP, en el eje X, y el de CD69 en el eje Y. D) Diagrama de barras que representan el porcentaje (izquierda) y la intensidad media de fluorescencia (derecha) de CD69 en las células GFP positivas. E) Western blot de sustratos de pAKT con un anticuerpo que reconoce la secuencia indicada. F) Western Blot de rpS6 de Jurkat. En B, E, F, los valores mostrados debajo del blot indican el grado de fosforilación de la proteína indicada después de normalizar frente al control de carga (tubulina)

RasGRP1 promueve la fosforilación de rpS6 de una forma dependiente de PDK-1

La regulación de la fosforilación de rpS6 en células T es compleja. rpS6 se activa por debajo del eje de mTORC1/S6K, que está regulado por la activación de las vías de PI3K/AKT y Ras/MEK/ERK [18]. Los experimentos previos sugieren que es RasGRP1 y no la activación del eje Ras/ERK quien tiene un efecto regulador positivo en la activación de AKT y la fosforilación de rpS6 (Fig. 4A). Para determinar el efecto de la sobreexpresión de RasGRP1 en la activación del eje PDK-1/AKT/mTOR, transfectamos células Jurkat con las mismas construcciones que en el experimento anterior y las tratamos durante 20 h con diferentes inhibidores, el inhibidor GSK (GSK 2334470) con alta especificidad por PDK-1 [24], el inhibidor específico de mTORC1 rapamicina [25], y el inhibidor de AKT (AKTi; AKT inhibitor VIII). A

diferencia de los dos primeros inhibidores que eliminan la actividad catalítica de PDK-1 y mTOR, AKTi actúa impidiendo la localización de AKT a la membrana y su activación por PDK-1 [26]. El inhibidor de PDK-1 disminuyó en gran medida el nivel de fosforilación empleando el anticuerpo de sustratos de AKT, en todos los casos, confirmando su participación en la activación de esta ruta. Por su parte, los otros fármacos empleados mantuvieron en gran medida el patrón de sustratos fosforilados. El mayor efecto sobre a fosforilación de rpS6 lo observamos al tratar las células con rapamicina, que es un inhibidor selectivo de mTOR, la quinasa responsable de la activación de p70S6K que es el principal modulador de rpS6 (Fig 4A). El tratamiento con AKTi mimetizó el de rapamicina, con un efecto preferencial sobre la fosforilación de rpS6 aunque parcial. Esto sugiere que los sustratos detectados en el perfil de fosforilación o bien corresponden a la actividad de AKT en sitios diferentes a la membrana plasmática, o bien corresponden a sustratos de otras quinasas que reconocen secuencias similares a las que reconoce AKT, muy probablemente quinasas de la familia AGC. Las células sobreexpresando RasGRP1 KD no alcanzan el mismo nivel de fosforilación de rpS6, pero se comportan igual ante el tratamiento con el inhibidor de PDK-1 (Fig. 4B)

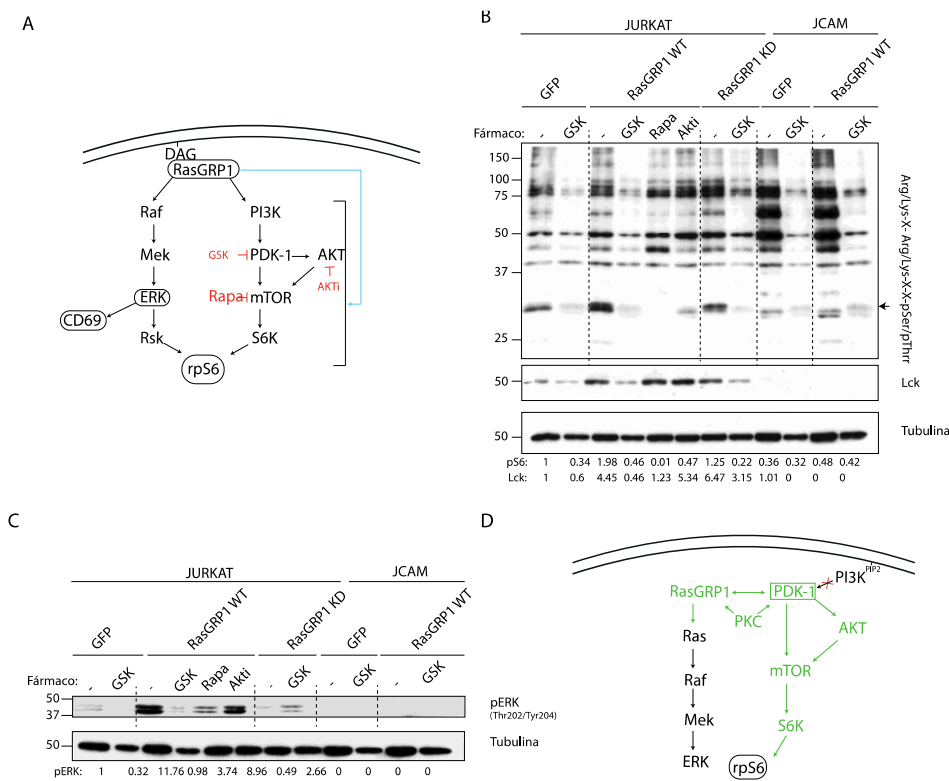


Figura 4.- Efecto de RasGRP1 KD en la vía ERK y la fosforilación de rpS6. A) Reorganización del esquema de señalización inicial situando a RasGRP1 como elemento central tras analizar los resultados obtenidos. B) Western blot de los sustratos de pAKT utilizando un anticuerpo que reconoce la secuencia indicada en células Jurkat tras haber sido tratadas o no farmacológicamente durante 20 h. GSK (GSK 2334470, 10 μ M), Rapa (Rapamicina 10 μ M, AKTi (AKT inhibitor VIII, 1 μ M). C) Western blot de pERK de células Jurkat tras haber sido tratadas igual que en B. B, C) Los valores mostrados debajo del blot correspondiente están normalizados frente a la tubulina, utilizada como control de carga. D) Modelo propuesto de la vía de señalización que sitúa a PDK-1 como elemento central en el control de estas rutas.

PDK-1 es una proteína quinasa que fosforila quinasas de la familia de PKA, PKG y PKC (AGC quinasa) regulando múltiples procesos que incluyen el control de la traducción, supervivencia y metabolismo. Durante el curso de los experimentos comprobamos que la inhibición de PDK-1 correlacionaba con una disminución en los niveles de Lck (Fig. 4B), elemento indispensable para la correcta activación de la cascada de señalización dependiente del TCR. Por otro lado, la sobreexpresión de RasGRP1 en su forma activa e inactiva inducía aumentos en la expresión de Lck por un mecanismo dependiente de PDK-1. Para estudiar si el aumento en la fosforilación de sustratos de AGC quinasas inducidos por RasGRP1 era dependiente de Lck, investigamos el efecto de transfectar la forma activa e inactiva de RasGRP1 en el patrón de fosforilación de sustratos y la fosforilación de rpS6 en la variante de células Jurkat JCAM, deficientes en Lck (Fig. 4B). Al igual que las células Jurkat, el tratamiento con el inhibidor de GSK inhibe la fosforilación de sustratos de AGC quinasas. Sin embargo, el aumento de fosforilación tras la transfección con RasGRP1 WT, en particular el correspondiente a rpS6, fue mucho menor que el observado en las células Jurkat. Estos resultados sugieren que RasGRP1 promueve la fosforilación de sustratos mediante un mecanismo que es PDK-1 dependiente y que requiere en cierta medida de Lck.

Para investigar en más detalle la regulación mutua entre los distintos ejes de activación, también analizamos el efecto de cada una de las transfecciones y el tratamiento con los inhibidores sobre la fosforilación de ERK (Fig. 4C). El tratamiento con el inhibidor de PDK-1 redujo la fosforilación de ERK en células transfectadas con GFP y con RasGRP1 WT sugiriendo que la actividad de PDK-1 es indispensable para la activación del eje Ras/ERK por RasGRP1. Las células transfectadas con la forma catalíticamente inactiva de RasGRP1 no indujeron activación de ERK. La transfección de RasGRP1 WT tampoco indujo fosforilación de ERK en las células JCAM, sugiriendo de nuevo que Lck es imprescindible para la correcta función de RasGRP1 en la ruta de Ras/ERK.

Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de RasGRP1 facilita la fosforilación de sustratos de AGC quinasas independientemente de su actividad catalítica. En particular, RasGRP1 potencia la activación del eje PDK-1/AKT/mTOR por un mecanismo que requiere de Lck. Por otro lado nuestros datos sugieren que la actividad de PDK-1 es indispensable para la correcta función de RasGRP1 en la activación del eje Ras/ERK. Por tanto, nuestra hipótesis sitúa a PDK-1 y a RasGRP1 como elementos esenciales que se regulan entre sí (Fig. 4D).

RasGRP1 EF no mimetiza los efectos observados con el mutante RasGRP1^{AnaeF}

Estudios cristalográficos de RasGRP1 han aportado nueva información y una mayor comprensión de los procesos que controlan su activación. Estos estudios revelaron que RasGRP1 se encuentra en un estado de autoinhibición formando un dímero. La unión de calcio provoca un cambio conformacional que libera a RasGRP1 de este estado y permite la unión a DAG por su dominio C1 y al bolsillo catalítico de Ras. El mutante de RasGRP1, RasGRP1^{AnaeF}, presenta una mutación en el segundo módulo de unión a calcio en la posición 519. La expresión de este mutante en timocitos de ratón produce una disminución de la señalización canónica de ERK, dado que reduce su fosforilación. Sin embargo, aumenta la expresión del marcador de superficie CD44 y que parece ser es un indicador de la actividad de mTOR [11].

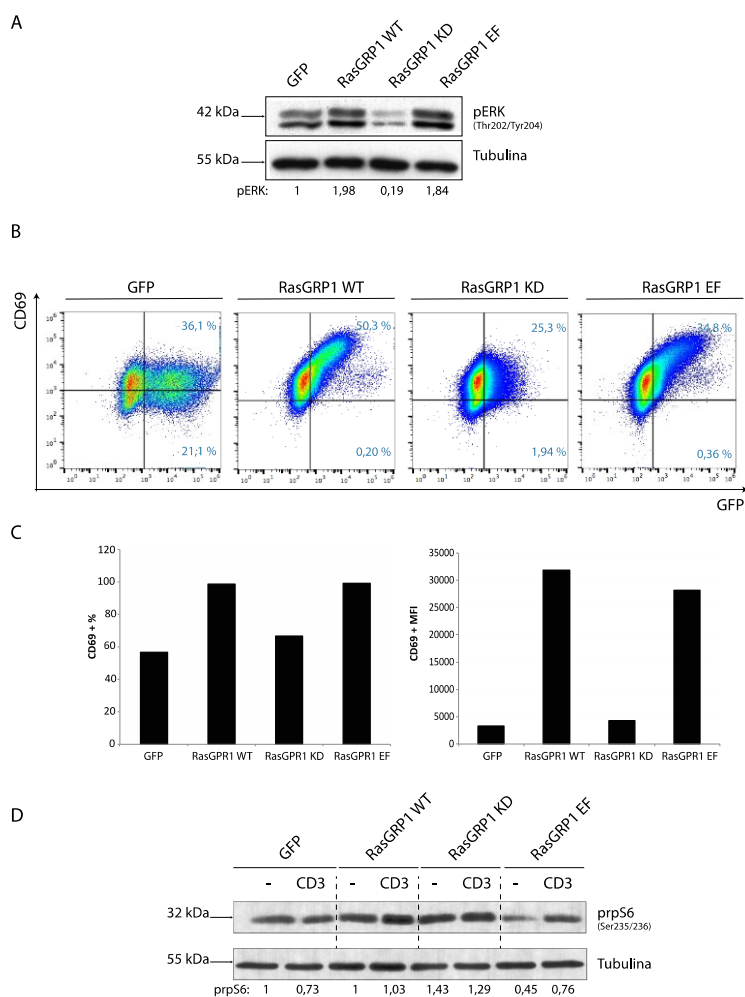


Figura 5.- Efecto de RasGRP1 EF en la vía ERK y la fosforilación de rpS6. A) Western blot de pERK de células Jurkat. B) Diagrama biparamétrico. Los ejes representan la intensidad de fluorescencia, en el eje X la de GFP y en el Y la de CD69. C) Diagrama de barras que representan el porcentaje (izquierda) y la intensidad media de fluorescencia (derecha) de células CD69 +. D) Western blot de rpS6 de células Jurkat en estado basal (-) o estimuladas (CD3). A, D) Los valores mostrados debajo del blot correspondiente están normalizados frente a la tubulina, utilizada como control de carga. Las células Jurkat están transfectadas con GFP, RasGRP1 WT, RasGRP1 KD o RasGRP1 EF.

En el laboratorio disponíamos de un mutante de RasGRP1 en una posición muy cercana a la que presenta el variante RasGRP1^{Anaef}, en este caso en la posición 521 (E521A; RasGRP1 EF). Para estudiar el efecto de este mutante sobre la vía canónica de RasGRP1/Ras/ERK y el eje de estudio, el eje PDK-1/AKT/mTOR, transfectamos células Jurkat con construcciones que codificaban para GFP, RasGRP1 WT, RasGRP1 KD y RasGRP1 EF. Tras 24h analizamos las células por inmunoblot y citometría de flujo. En este caso observamos que el mutante RasGRP1 EF promovía la fosforilación de ERK a niveles similares al de la proteína silvestre (Fig. 5A).

Para correlacionar la intensidad de activación del eje RasGRP1/Ras con la sobreexpresión del mutante RasGRP1 EF medimos la expresión de CD69 por citometría de flujo. El diagrama biparamétrico muestra la expresión de GFP y CD69 (Fig. 5B). En el diagrama correspondiente a las células con la construcción que codifica para RasGRP1 EF se observa una tendencia hacia el cuadrante de las dobles positivas (CD69⁺GFP⁺). Esto quiere decir que las células que son positivas para GFP y que, por tanto, sobreexpresan el mutante, son positivas también para CD69. Estos resultados junto con los del inmunoblot y el análisis del porcentaje de células CD69⁺ y de la intensidad media de fluorescencia (Fig. 5C) sugieren que esta mutación no afecta a la actividad GEF observándose el mismo efecto activador de la forma silvestre sobre la vía de ERK.

Por último, analizamos la contribución de RasGRP1 EF sobre el eje PDK-1/AKT/mTOR así como el efecto de la estimulación del TCR con un anticuerpo anti-CD3 de humano. Cuando las células Jurkat sobreexpresan RasGRP1 EF se observa una disminución en la fosforilación de rpS6 en estado basal (Fig. 5D). Además, la estimulación del TCR de las células Jurkat con las distintas construcciones parece no tener mucho efecto sobre este eje, obteniéndose niveles de fosforilación de rpS6 similares (Fig. 5D), por lo que este eje parece se mantiene activo con el DAG que contiene la célula en estado basal y no tanto por

el DAG generado por PLC- γ 1 tras la activación del TCR. Los resultados obtenidos no logran mimetizar lo observado con el mutante RasGRP1^{Anaef}. Esto sugiere que el intercambio de un residuo glutámico por una alanina en nuestro mutante podría estar generando una estructura distinta que impida a RasGRP1 llevar a cabo la función del mutante RasGRP1^{Anaef} y que no afecta a su actividad catalítica.

Discusión

RasGRP1 tiene una función central en la correcta activación de los linfocitos T en respuesta a un antígeno. Estudios recientes han revelado la importancia de alteraciones en la función y/o expresión de RasGRP1 en el desarrollo de diferentes enfermedades, como algunas inmunodeficiencias primarias y la leucemia linfoblástica aguda (T-ALL). Mientras que la función canónica de RasGRP1 como promotor de la fosforilación de ERK en respuesta al TCR está involucrada en parte de los síntomas de las inmunodeficiencias primarias, el estudio de esta enfermedad y las T-ALL indican que RasGRP1 participa en otras rutas en adición a la vía de ERK. La deficiencia de RasGRP1 da lugar a una inmunodeficiencia primaria donde, además de los defectos en la activación de la ruta Ras/ERK se describen defectos que impiden la actividad citotóxica de las células natural killer (NK). La deficiencia de RasGRP1 Correlaciona con profundas alteraciones en el citoesqueleto de las células del sistema inmune durante la formación de la sinapsis inmune [28]. La sobreexpresión de RasGRP1, por otro lado, contribuye al desarrollo de T-ALL, en ausencia de mutaciones activadoras de las distintas isoformas de Ras [27]. En las células derivadas de T-ALL, RasGRP1 promueve la señalización hacia la vía PI3K/AKT en respuesta a citoquinas y a los niveles basales de DAG de una forma independiente a la estimulación del TCR y la producción de DAG por PLC- γ 1 [15].

Por otra parte la generación de la variante Anaef [20] sugiere que la señalización de RasGRP1 en células T parece no limitarse a la activación de Ras y la vía de ERK. Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con estos estudios e indican que la función de RasGRP1 va más allá de ser una GEF de Ras y que participa en vías no canónicas, o diferentes a las del TCR. La ruta de señalización canónica tras la unión a DAG de RasGRP1 en células T Jurkat le sitúa como un elemento central a partir del cual parten dos ejes principales: Ras/MEK/ERK y PI3K/PDK-1/mTOR. El mantenimiento de la fosforilación de rpS6 con la variante sin actividad catalítica de RasGRP1 sugiere que esta vía no depende de Ras-GTP (Fig. 3A) y que RasGRP1 podría estar actuando como una proteína adaptadora. Estos resultados están de acuerdo con datos de proteómica que han descrito la cadena ligera de dineína como un interactor de RasGRP1 durante la remodelación de citoesqueleto [28].

Nuestros datos indican que la sobreexpresión de RasGRP1 favorece la fosforilación de rpS6 independiente de su actividad catalítica. rpS6 es un componente clave en la maquinaria de traducción en células eucariotas y es también esencial en la biogénesis ribosomal. Sin embargo, el mecanismo por el que el TCR induce la fosforilación de rpS6 y su papel en la respuesta de células T no se conoce muy bien. Como ya se ha mencionado, rpS6 es una proteína que se fosforila en muchos residuos y por muchas quinasas [22-23]. Una de ellas es RSK, activada por la vía de las MAPK, encargada de la fosforilación en el residuo Ser235. Por tanto, si esta fosforilación, entre otras, es RSK-dependiente, cabe esperar que los niveles de rpS6 fluctúen a la par que pERK. En el caso de RasGRP1 KD, el menor nivel de fosforilación

de rpS6 podría deberse a la menor activación de RSK al ser este mutante incapaz de activar la vía de ERK. La menor fosforilación basal de rpS6 en el caso del mutante EF sugiere que la función adaptadora de RasGRP1 requiere de un dominio EF intacto

El tratamiento farmacológico con inhibidores de distintas proteínas que actúan en diferentes puntos de la vía de señalización parece indicar que la fosforilación de rpS6 está controlada por un eje compuesto por PDK-1/RasGRP1/AKT/mTOR. El tratamiento de células Jurkat con GSK también altera la vía de ERK lo que sugiere que existe una retroalimentación entre PDK-1 y RasGRP1. Un posible mecanismo por el que se produce una disminución de la fosforilación de ERK al inhibir PDK-1 sería por la falta de activación de PKC por PDK-1, impidiendo la fosforilación de RasGRP1 por esta quinasa en el residuo T184 [21], crucial para la activación de la vía de ERK por RasGRP1. Los resultados obtenidos sobre el efecto de RasGRP1 en el eje PDK-1/AKT/mTOR cuando sobre-expresamos el mutante sin actividad catalítica parecen indicar que RasGRP1 desempeña otras funciones en la célula independientes de Ras y, por consiguiente, de su actividad. RasGRP1 podría estar actuando como una proteína adaptadora en este eje existiendo un bucle de retroalimentación entre RasGRP1 y PDK-1, lo que establece una unión entre niveles basales de DAG y RasGRP1 en la vía PDK-1/AKT/mTOR.

Resultados sobre la fosforilación de ERK con el mutante en el dominio de unión a calcio muestran niveles similares respecto al RasGRP1 silvestre por lo que esta mutación parece no tener efecto en la capacidad de RasGRP1 para activar Ras. Sin embargo, si observamos diferencias en el nivel de fosforilación de rpS6. Teniendo en cuenta la estructura de RasGRP1 (Fig. 1), contiguo al dominio de unión a calcio está el dominio C1, cuya función es la unión de DAG. Estudios recientes describen que RasGRP1 se encuentra en un estado de autoinhibición mantenido por la estructura del dominio de unión a calcio. La mutación en este dominio de RasGRP1 EF podría estar dificultando el mantenimiento de este estado de autoinhibición y, por tanto, estaría dejando más expuesto el dominio C1 de unión a DAG, lo que explicaría que tenga un mismo comportamiento que la forma silvestre. En resumen, el estudio de RasGRP1 con distintos mutantes arroja nueva luz sobre la complejidad de los mecanismos regulados por RasGRP1, sugiriendo que se trata de un elemento importante que regula varios ejes de señalización en función de los niveles de DAG.

La creciente implicación de RasGRP1 en el desarrollo de diversas patologías incluyendo inmunodeficiencias y cáncer convierte a RasGRP1 en una potencial diana terapéutica frente a la que actuar. Un mejor conocimiento de los mecanismos regulados por esta proteína resulta indispensable para iniciar destinados a manipular su función.

Bibliografía

1. Alberola-Ila, J., Takaki, S., Kerner, JD. and Perlmutter, RM. 1997. Differential signaling by lymphocyte antigen receptors. *Annu Rev Immunol.* 15:125-154. [\[1\]](#)
2. Van Oers, NSC., Killeen, N. and Weiss, A. 1996. Lck regulates the tyrosine phosphorylation of the T cell receptor subunits and ZAP-70 in murine thymocytes. *J Exp Med.* 183:1053-1062.
3. Neumeister, E., Shaw, AS. and Allen, PM. 1998. Fidelity of T cell activation through multistep T cell receptor ζ phosphorylation. *Science.* 281:572-575.
4. Beach, D., Gonen, R., Bogin, Y., Reischl, IG. and Yablonski, D. 2007. Dual role of SLP-76 in mediating T cell receptor-induced activation of phospholipase C-gamma1. *J Biol Chem.* 282:2937-2946.
5. Smith-Garvin, JE., Koretzky, GA. and Jordan, MS. 2009. T Cell Activation. *Annu Rev Immunol.* 27: 591-619.
6. Crabtree, GR. 1989. Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science.* 243:355-361. [\[1\]](#)
7. Fuller, DM., Zhu, M., Song, X., Ou-Yang, C., Sullivan, SA., Stone, JC. and Zhang, W. 2012. Regulation of RasGRP1 function in T cell development and activation by its unique tail domain. *PLoS ONE* 7(6): e38796.
8. Dower, NA., Stang, SL., Bottorff, DA., Ebinu, JO., Dickle, P., Ostergaard, HL. and Stone, JC. 2000. RasGRP is essential for mouse thymocyte differentiation and TCR signaling. *Nat Immunol.* 1(4):317-321.
9. Coughlin, JJ., Stang, SL., Dower, NA. and Stone, JC. 2006. The role of RasGRPs in regulation of lymphocyte proliferation. *Immunol Lett.* 105:77-82. [\[1\]](#)
10. Ksionda, O., Limnander, A. and Roose, JP. 2013. RasGRP Ras guanine nucleotide exchange factors in cancer. *Front. Biol.* 8(5): 508-532.

11. Iwig, JS., Vercoulen, Y., Das, R., Barros, T., Limnander, A., Che, Y., Pelton, JG., Wemmer, DE. and Roose, JP. et al. 2013. Structural analysis of autoinhibition in the Ras-specific exchange factor RasGRP1. *eLIFE*. 1-28.
12. Tognon, CE., Kirk, HE., Passmore, LA., Whitehead, IP., Der, CJ. and Kay, RJ. 1998. Regulation of RasGRP via a phorbol ester-responsive C1 domain. *Mol Cell Biol*. 18:6995–7008. ^[1]_[SEP]
13. Quann, EJ., Liu, X., Altan-Bonnet, G. and Huse, M. 2011. A cascade of protein kinase C isozymes promotes cytoskeletal polarization in T cells. *Nat Immunol*. 12:647–654. ^[1]_[SEP]
14. Spitaler, M., Emslie, E., Wood, CD. and Cantrell D. 2006. Diacylglycerol and protein kinase D localization during T lymphocyte activation. *Immunity*. 24:535–546. ^[1]_[SEP]
15. Ksionda, O., Melton, AA., Bache, J., Tenhagen, M., Bakker, J., Harvey, R., Winter, SS., Rubio, I. and Roose, JP. 2016. RasGRP1 overexpression in T-ALL increases basal nucleotide exchange on Ras rendering the Ras/PI3K/AKT pathway responsive to protumorigenic cytokines. *Oncogene*. 35:3658-3668.
16. Mérida, I., Torres-Ayuso, P., Ávila-Flores, A., Arranz-Nicolás, J., Andrada, E., Tello-Lafoz, M., Liébana R. and Arcos, R. 2017. Diacylglycerol kinases in cancer. *Adv Biol Regul*. 63:22-31.
17. Carrasco, S. and Mérida, I. 2004. Diacylglycerol-dependent binding recruits PKC θ and RasGRP1 C1 domains to specific subcellular localizations in living T lymphocytes. *Mol Biol Cell*. 15(6): 2932-2942.
18. Ávila-Flores, A., Arranz-Nicolás, J., Andrada, E., Soutar, D. and Mérida, I. 2017. Predominant contribution of DGK ζ over DGK α in the control of PKC/PDK-1-regulated functions in T cells. *Immunol Cell Biol*. 1-15.
19. Gorentia, BK., Wan, CK. and Zhong, XP. 2011. Negative regulation of mTOR activation by diacylglycerol kinases. *Blood*. 117(15):4022-4031.
20. Daley, SR., Coakley, KM., Hu, DY., Randall, KL., Jenne, CN., Limnader, A., Myers, DR., Polakos, NK., Enders, A., Roots, C., Andrews, TD., Whittle, B., Barnes, SW., Walker, JR., Cyster, JG., Goodnow, CC. and Roose, JP. 2013. Rasgrp1 mutation increases naïve T-cell CD44 expression and drives mTOR- dependent accumulation of Helios+ T cells and autoantibodies. *eLIFE*. 1-26.
21. Roose, JP., Mollenauer, M., Gupta, VA., Stone, JC. and Weiss, A. 2005. A diacylglycerol-protein kinase C-RasGRP1 pathway directs Ras activation upon antigen receptor stimulation of T cells. *Mol Cell Biol*. 25: 4426–4441.
22. Salmond, RJ., Emery, J., Okkenhaug, K. and Zamoyska, R. 2009. MAPK, phosphatidylinositol 3-kinase, and mammalian target of rapamycin pathways converge at the level of ribosomal protein S6 phosphorylation to control metabolic signaling in CD8 T cells. *J Immunol*. 183(11):7388-97.
23. Biever, A., Valjent, E. and Puighermanal, E. 2015. Ribosomal Protein S6 Phosphorylation in the Nervous System: From Regulation to Function. *Front Mol Neuro*. 8:75.
24. Najafov, A., Sommer, EM., Axten, JM., DeYoung, MP. and Alessi, DR. 2011. Characterization of GSK2334460, a novel and highly specific inhibitor of PDK-1. *Biochem J*. 433:357-369.
25. Dumont, FJ. and Su, Q. 1996. Mechanism of action of the immunosuppressant rapamycin. *Life Sci*. 58:373–395.
26. Barnett, ST., Defeo-Jones, D., Fu, Hancock, PJ., Haskell, KM., S., Jones, RE., Kahana, JA., Kral, AM., Leander, K., Lee, LL., Malinowski, J., McAvoy, EM., Nahas, DD., Robinson, RG. and Huber, HE. 2005. Identification and characterization of pleckstrin-homology-domain-dependent and isozyme-specific AKT inhibitors. *Biochem J*. 385:399-408.
27. Hobbs, GA., Der, CJ. and Rossman, KL. 2016. RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *J Cell Sci*. 129(7):1287-92.
28. Salzer, E., Cagdas, D., Hons, M., Mace, EM., Garncarz ,W., Petronczki, ÖY., Platzer, R., Pfajfer, L., Bilic, I., Ban, SA., Willmann, KL., Mukherjee, M., Supper, V., Hsu, HT., Banerjee, PP., Sinha, P., McClanahan, F., Zlabinger GJ., Pickl, WF., Gribben, JG., Stockinger, H., Bennett, KL., Huppa, JB., Dupré, L., Sanal, O., Jäger, U., Sixt, M., Tezcan, I., Orange, JS. and Boztug, K. 2016. RasGRP1 deficiency causes immunodeficiency with impaired cytoskeletal dynamics. *Nat Immunol*. 17(12):1352-1360.