

## **FACTORS BESCANVIADORS DE NUCLEÒTIDS DE GUANINA I LES SEVES IMPLICACIONS EN PATOLOGIA**

JOSÉ LUIS ROSA I CRISTINA CRUZ

*Departament de Ciències Fisiològiques. Universitat de Barcelona.*

Adreça per a la correspondència: Departament de Ciències Fisiològiques II. Campus de Bellvitge. Universitat de Barcelona. Pavelló Central, 4a planta. Feixa Llarga, s/n. 08907 L'Hospitalet de Llobregat. Adreça electrònica: [rosa@bellvitge.bvg.ub.es](mailto:rosa@bellvitge.bvg.ub.es).

### **RESUM**

La superfamília Ras de proteïnes que uneixen nucleòtids de guanina està involucrada en el control d'una extensa varietat de funcions cel·lulars. Aquestes proteïnes estan activades per factors bescanviadors específics de nucleòtids de guanina (GEF). El nombre d'aquests GEF s'incrementa constantment, cosa que permet agrupar-los en famílies o subfamílies relacionades estructuralment i funcional. Aquesta revisió resumeix el coneixement sobre els GEF coneguts de les famílies Ras, Rho, Ran i d'altres proteïnes relacionades amb Ras, i analitza les seves implicacions en diferents processos cel·lulars i malalties.

### **SUMMARY**

The Ras superfamily of guanine-nucleotide binding proteins are involved in the control of a wide variety of cellular functions. These proteins are activated by specific guanine nucleotide exchange factors (GEF). The number of these GEFs is fastly increasing and this has led to group them in families or subfamilies based on their structural and functional homologies. This review summarizes our knowledge about GEFs for Ras, Rho, Ran and other Ras-related proteins, and discusses their implications in different cell processes and diseases.

*Keywords: Ras/ Rho/ GEF/ proliferation/ transformation.*

## INTRODUCCIÓ

La superfamília Ras està constituïda per més de cinquanta proteïnes (30-55 % identitat aminoacídica) que es caracteritzen per unir i hidrolitzar GTP (GTPases). Les podem classificar en diferents famílies segons la seva estructura primària. Aquestes famílies serien: Ras, Rho, Rab, Ran, Ral, Rap, Rad i Arf (Bourne *et al.*, 1990; Boguski i McCormick, 1993; Kahn *et al.*, 1996). Totes aquestes proteïnes regulen una extensa varietat de processos cel·lulars, entre els quals es troben la proliferació cel·lular i diferenciació (Ras, Rho, Ral), el transport vesicular (Rab i Arf), l'organització del citoesquelet (Rho) i el transport nucleotoplasmàtic (Ran) (Pfeffer, 1994; Görlich i Matraj, 1996; Rush *et al.*, 1996; Rothman i Wieland, 1996; Symons 1996; Hunter, 1997; Lacal, 1997; Novick i Zerial, 1997; Tapon i Hall, 1997).

Les proteïnes de la superfamília Ras funcionen com a interruptors moleculars que oscil·len entre un estat actiu, quan tenen unit GTP, i un estat inactiu, quan tenen unit GDP. El balanç entre el GDP i el GTP unit en aquestes proteïnes està determinat per les velocitats de bescanvi de nucleòtids de guanina i d'hidròlisi de GTP. Aquestes velocitats estan molt controlades, fonamentalment per dues classes de molècules reguladores. Per una banda, els factors bescanviadors de nucleòtids de guanina (GEF: *guanine nucleotide exchange factors*) que actuen com a reguladors positius que promouen l'alliberament del GDP i la unió del GTP; per altra banda, les proteïnes que activen la velocitat d'hidròlisi de GTP (GAP: *GTPase activating proteins*) que actuen com a reguladors negatius i permeten tornar les GTPases a l'estat inactiu amb GDP unit i, d'aquesta manera, el cicle es completa (figura 1). Existeix un tercer tipus de molècula reguladora d'aquest cicle GDP/GTP per les proteïnes Rho i Rab que afecta la dissociació dels nucleòtids de guanina i que bloqueja l'acció dels GAP: són els anomenats inhibi-

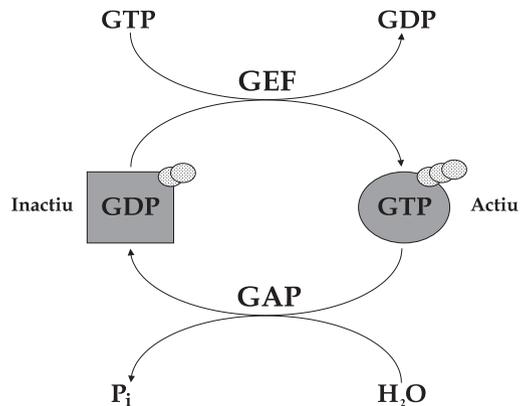


FIGURA 1. Reguladors del cicle GDP/GTP de Ras. Ras i proteïnes relacionades amb Ras cicleu entre una forma activa amb GTP unit i una inactiva amb GDP unit. Aquests estats són una conseqüència de les accions de les proteïnes GEF i GAP. Mireu el text per a més detalls.

dors de la dissociació dels nucleòtids de guanina (GDI: *guanine nucleotide dissociation inhibitors*). A excepció de Ran, l'ancoratge d'aquestes GTPases de la superfamília Ras a diferents membranes cel·lulars és crític per a la seva funció, i aquesta unió a membrana està regulada pels enzims del tipus preniltansferases (Boguski i McCormick, 1993; Macara *et al.*, 1996).

## MECANISME DELS GEF

Per facilitar el bescanvi de nucleòtids de guanina, els GEF en primer lloc s'associen amb les GTPases que tenen unit GDP. El GEF promou la ràpida dissociació del GDP i resta un complex entre el GEF i la GTPasa buida. A continuació, la GTPasa uneix GTP citosòlic, molt més abundant que el GDP, s'allibera el GEF i resta la GTPasa en la seva forma activada. Ara aquest GEF alliberat pot dissociar i activar GTPases addicionals. Segons aquest esquema, hauria d'existir un complex estable i amb una vida mitjana curta entre el GEF i la GTPasa en absència de nucleòtid. Com a

mínim per a tres GTPases (Ras, Ran i Rho), aquest complex amb els seus corresponents GEF (Cdc25, RCC1, Lbc) s'ha pogut demostrar (Bischoff and Poustongl, 1991b; Lai *et al.*, 1993; Glaven *et al.*, 1996). En aquests casos, tant el GDP com el GTP van ésser igualment efectius en dissociar el complex *in vitro*, encara que *in vivo* la major concentració de GTP asseguraria que la dissociació fos realitzada pel GTP, que s'uniria a la GTPasa (que restaria en la seva forma activada), i es produiria l'alliberament del GEF. Aquest mecanisme seria anàleg al descrit entre els receptors hormonals i les proteïnes G heterotrimèriques, i entre els factors d'elongació EF-Ts i EF-Tu (Boguski and McCormick, 1993; Feig, 1994; Quilliam *et al.*, 1995).

## RAS-GEF: LA FAMÍLIA CDC25 I CÀNCER

Les GTPases de la família Ras han estat intensament estudiades pel fet que formes mutades d'aquestes proteïnes s'han trobat en tumors humans. La seva situació en el cor de les rutes de transducció de senyals que uneixen canvis en l'expressió gènica i la morfologia cel·lular amb receptors de la superfície cel·lular a través d'una cascada de proteïnes quinases, ajuda a entendre el seu important paper en el control del creixement cel·lular. Les rutes de senyalització dependents de Ras són nombroses i això explica la complexitat de les interaccions que s'estableix entre Ras i un nombre creixent de proteïnes. Així, Ras és activat per receptors tirosina quinasa i per receptors acoblats a proteïnes G heterotrimèriques, i ell mateix interactua amb diferents efectors com Raf, RalGDS o fosfatidilinositol 3-quinasa i activa múltiples rutes de MAP quinases i/o altres proteïnes de la superfamília Ras com Rac i Rho (Macara *et al.*, 1996; Katz i McCormick, 1997).

El primer GEF per a Ras (Ras-GEF) es va identificar en llevat. Aquesta proteïna, denominada CDC25, posseeix un mínim domini catalític funcional d'aproximadament 450 aminoàcids que posteriorment es va trobar en altres proteïnes de llevats (SDC25, Ste6) i de mamífers (GRF/CDC25<sup>Mm</sup>, Sos, C3G, RalGDS, RGL, Rgf, Rlf, Rgr, GRP) i que es va anomenar domini d'homologia amb CDC25 (figura 2). Fora d'aquest domini comú trobem poca homologia entre aquests Ras-GEF, fet que suggereix una regulació diferencial. Alguns d'aquests dominis estan involucrats en la interacció amb altres proteïnes, com són les regions riques en prolines i els dominis SH3, o en la interacció amb lípids, com és el domini homòleg a pleckstrina o el domini d'unió de diacilglicerols (Quilliam *et al.*, 1995; D'Adamo *et al.*, 1997; Ebinu *et al.*, 1998). En els darrers anys, l'especificitat d'aquests GEF s'ha anat analitzant. Així, GRF/CDC25<sup>Mm</sup>, Sos i GRP semblen específics per a Ras (Chardin *et al.*, 1993; Jones i Jackson, 1998; Ebinu *et al.*, 1998); C3G i Rgf per a Rap (Hermann *et al.*, 1996; van den Berghe *et al.*, 1997), i RalGDS, RGL i Rgr per a Ral (D'Adamo *et al.*, 1997; Katz i McCormick, 1997; Murai *et al.*, 1997).

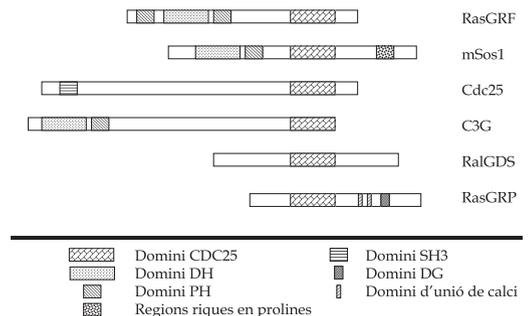


FIGURA 2. Domini conservat en els Ras-GEF. Representació estructural dels Ras-GEF i alineament segons el domini CDC25. Altres dominis funcionals són també indicats: DH, homòleg a Dbl; PH, homòleg a pleckstrina; SH3, homòleg al domini 3 de Src; DG, domini d'unió de diacilglicerol. Modificada de Quilliam *et al.* (1995) i Ebinu *et al.* (1998).

Les proteïnes de la família Ras tenen un paper clau en el control del creixement cel·lular i en l'aparició de càncers; algun dels tres membres de la subfamília (H-Ras, K-Ras o N-Ras) es troba mutat en un 30 % de tots els tumors humans. Aquesta freqüència varia d'un tipus de càncer a un altre: entre 50-90 % en càncer de pàncreas, 50 % en carcinomes de còlon, 40 % en seminomes, 30 % en adenocarcinomes de pulmó i síndromes mielodisplàstiques, 25 % en carcinomes de tiroide, i 20 % en melanomes. En carcinomes de mama, ovari i estómac la freqüència és inferior al 5 % (Muñoz, 1997). Aquests mutants de Ras tenen la característica de posseir una deficiència en la seva activitat d'hidrolitzar GTP estimulada per GAP, de manera que es troben en un estat activat amb GTP unit. Aquestes formes trobades en els tumors també poden transformar fibroblasts NIH3T3 actuant, per tant, com a oncògens. Sembla obvi pensar que els GEF o GAP que actuen sobre Ras poden estar també involucrats en tumorigènesi. Això s'ha pogut observar en la neurofibromina, el producte del gen supressor de tumors NF1 que funciona com una GAP per a Ras i es troba mutat en la neurofibromatosi tipus 1. La pèrdua de neurofibromina condueix a nivells basals elevats de Ras-GTP en schwannomes (neurilemmomes) derivats de NF1 (De Clue *et al.*, 1992). Respecte als Ras-GEF, fins ara aquests no s'han trobat mutats en tumors humans, tot i que s'ha pogut demostrar que expressions aberrants o truncades dels Ras-GEF produeixen transformació i formació de focus en cèl·lules NIH3T3 (Quilliam *et al.*, 1995).

### RHO-GEF: LA FAMÍLIA DBL I LA TRANSFORMACIÓ CEL·LULAR

La família Rho està constituïda com a mínim per onze membres en mamífers, els

quals es poden subdividir en cinc grups agrupats per homologia de seqüència i funció. Aquests grups serien: 1) RhoA, RhoB i RhoC; 2) Rac1, Rac2 i RhoG; 3) Cdc42 i TC10; 4) RhoD, i 5) RhoE i TTF. Homòlegs d'aquestes proteïnes s'han trobat en organismes inferiors, des dels llevats fins a la mosca de la fruita. Aquestes GTPases controlen importants aspectes de la cèl·lula com la forma, l'adhesió, el moviment i el creixement. Rho, Rac i Cdc42 controlen tres rutes diferents de transducció de senyals: Rho regula l'acoblament de les fibres d'estrès d'actina i els complexos d'adhesió focal; Rac controla la formació de lamel·lipodis i el plegament de les membranes (*ruffling*) estimulant la polimerització de l'actina perifèrica i l'acoblament de complexos d'integrines; Cdc42 induïx la formació de fil·lopodis rics en actina, els quals alhora estan també associats amb complexos d'integrines (Nobes i Hall, 1995). A més del seu paper en la regulació del citoesquelet d'actina, aquestes GTPases estan involucrades en la regulació del creixement cel·lular i estan adquirint una importància creixent en oncogènesi. La microinjecció de formes activades de Rho, Rac i Cdc42 en fibroblasts estimula la progressió del cicle cel·lular i condueix a síntesi de DNA. D'altra banda, els tres tipus de GTPases són necessàries per a la resposta mitogènica dels fibroblasts estimulats per sèrum (Olson *et al.*, 1995). Les proteïnes de la família Rho són també necessàries per a la transformació amb mediació de Ras. Una de les dianes de les proteïnes Ras requerides per a transformació és Rac, un membre de la família Rho. Rac *per se* té una modesta activitat transformadora quan la Gly12 és mutada a Val, però coopera en la transformació amb Raf1 activat, i el mutant dominant negatiu de Rac (Asn17) bloqueja la transformació per Ras (Hunter, 1997). La importància de la família Rho en transformació és emfasitzada pel gran nombre de Rho-GEF

trobat mutats i activats que posseeixen activitat transformadora en fibroblasts. El primer exemple va ésser Dbl, una proteïna aïllada d'un limfoma de cèl·lules B difús (Dbl: *Difusse B-cell lymphoma*) que actuava com una oncoproteïna a causa d'una truncació artefactual que va ocórrer durant la transfecció (Eva i Aaronson, 1985). Altres exemples són: Vav, Tiam1, Tim, Ost, Ect2, Lbc, Lfc, Lsc, Bcr, Abr i FGD1 (Quilliam *et al.*, 1995; Glaven *et al.*, 1996; Hunter, 1997). La funció d'aquests múltiples Rho-GEF no és del tot coneguda, però tots tenen en comú una regió d'aproximadament 350 aminoàcids on es troben dos dominis conservats: un domini d'homologia amb Dbl (DH) d'aproximadament 250 aminoàcids, i un altre domini d'homologia amb pleckstrina (PH) d'aproximadament 100 aminoàcids,

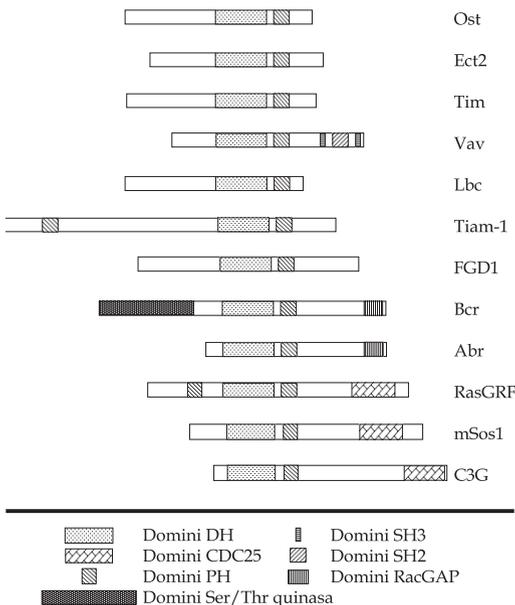


FIGURA 3. Domini conservat en els Rho-GEF. Representació estructural de membres de la família dels Rho-GEF i alineament segons el domini DH. Altres dominis funcionals són també indicats: DH, homòleg a Dbl; PH, homòleg a pleckstrina; SH3, homòleg al domini 3 de Src; SH2, homòleg al domini 2 de Src. Modificada de Quilliam *et al.* (1995).

situat a l'extrem carboxílic del DH (figura 3) (Quilliam *et al.*, 1995). El domini DH és el domini catalític, mentre que el domini PH és necessari per a la transformació cel·lular (Zheng *et al.*, 1996a). L'especificitat d'aquests GEF per als membres de la família Rho s'ha analitzat. Així, sembla que Ost activaria Rho i Cdc42; Ect-2, Lbc, Lfc i Lsc actuarien sobre Rho; en canvi Vav, Tiam1, Bcr i Abr serien específics per Rac, i Dbl i FGD1 per Cdc42 (Boguski i McCormick, 1993; Hori *et al.*, 1994; Olson *et al.*, 1996; Glaven *et al.*, 1996; Zheng *et al.*, 1996b; Crespo *et al.*, 1997; Hordijk *et al.*, 1997). El nombre de Rho-GEF continua creixent i així, en els darrers anys, s'han descrit dos Rho-GEF estructuralment relacionats: Trio i Duo (Debant *et al.*, 1996; Colomer *et al.*, 1997). Trio conté en la seva estructura dos dominis DH funcionals amb diferents especificitats (per Rac1 i RhoA), i és l'únic membre dels Rho-GEF que té aquesta peculiaritat (Debant *et al.*, 1996; Bellanger *et al.*, 1997). En canvi Duo únicament presenta un domini DH que sembla específic per a Rac1 (Colomer *et al.*, 1997). Interessantment els Ras-GEF: Ras-GRF, Sos i C3G també posseeixen dominis DH i PH; això suggereix que podrien actuar a la vegada com a Ras- i Rho-GEF i d'aquesta manera regular coordinadament dues rutes de senyalització.

L'estimulació de les proteïnes de la família Rho pels GEF de la família Dbl provoca alteracions del citoesquelet, de l'adhesió cel·lular i de l'expressió gènica. El gen *FGD1* va ésser identificat per clonatge posicional com el *locus* genètic responsable de la displàsia faciogenital o síndrome d'Aarskog-Scott, una malaltia del desenvolupament multisistèmic que inclou els sistemes urogenital i esquelètic (Pasteris *et al.*, 1994). En aquests pacients s'han detectat mutacions de *FGD1*, causades per translocació cromosòmica o per inserció d'un parell de bases, que produeixen una terminació prema-

tura de la traducció dins del domini DH. La pèrdua de *FGD1* és associada amb les anomalies característiques i específiques de l'esquelet trobades en aquests pacients i que afecten l'embriogènesi i alteren la mida dels ossos petits i els elements del cartílag a la cara, extremitats distals i vèrtebres (Grier *et al.*, 1983; Fryns, 1992; Olson *et al.*, 1996). Recentment s'ha demostrat que Cdc42 i Rac estan també involucrades en la transformació de les cèl·lules epitelials en carcinomes invasius mitjançant l'activació de la fosfatidilinositol-3-quinasa (Keely *et al.*, 1997). Això podria explicar, per exemple, la capacitat que té el Rac-GEF Tiam-1 d'induir metàstasi (Habets *et al.*, 1994; Michiels *et al.*, 1995; Hordijk *et al.*, 1997). Malgrat el constant increment del nombre d'oncogens de la família Dbl i la seva relació amb proliferació, transformació i metàstasi, fins ara no s'ha pogut detectar l'activació oncogènica de cap d'aquests gens en càncers humans.

## RAN-GEF: LA FAMÍLIA RCC1 I LA RETINITIS PIGMENTOSA

*RCC1* (*regulator of chromosome condensation*) és un gen identificat com a responsable de la condensació prematura dels cromosomes en una línia cel·lular mutada d'hàmsster (Nishimoto *et al.*, 1978). *RCC1* codifica una proteïna nuclear de 45 kDa amb un domini estructural característic que consisteix en una seqüència d'aproximadament uns seixanta aminoàcids repetits set vegades consecutives i que anomenarem domini RCC1 (Dasso, 1993). Durant la purificació per cromatografia d'afinitat de la proteïna *RCC1* es va trobar una proteïna associada de 25 kDa que posteriorment es va identificar com una GTPasa de la superfamília de Ras anomenada inicialment TC4 i actualment Ran (Ran: *Ras-related nuclear protein*) (Bischoff and Ponstingl, 1991b). Aquest ma-

teix grup va demostrar que *RCC1* estimula el bescanvi de nucleòtids de guanina en Ran i, per tant, funcionava com un Ran-GEF (Bischoff i Ponstingl, 1991a). A diferència dels altres membres de la superfamília de Ras, Ran no presenta cap modificació lipídica coneguda en la seva estructura, cosa que explica que no es trobi associada a membrana sinó fluctuant entre el citoplasma i el nucli. Aquesta localització entre citoplasma i nucli de Ran, i la localització del seu Ran-GEF (*RCC1*) en el nucli i de la seva Ran-GAP en el citoplasma explica el paper regulador d'aquestes proteïnes en el transport nucleocitoplasmàtic de proteïnes i RNA (Görlich and Mattaj, 1996).

*RCC1* no presenta homologia estructural amb els Ras-GEF o Rho-GEF esmentats prèviament. Aquest Ran-GEF sembla, doncs, formar part d'una nova família de GEF que tenen en comú el domini *RCC1* (Rosa i Barbacid, 1997). Aquest domini ha estat recentment cristal·litzat i la seva estructura consisteix en una hèlix de set fulles  $\beta$  (Renault *et al.*, 1998). Aquesta estructura en hèlix és similar a la descrita pels dominis WD-40 de la subunitat  $\beta$  de les proteïnes G heterotrimèriques (Sondek *et al.*, 1996).

Durant els darrers anys, tres nous gens humans (*D25215*, *RPGR* i *p532*) que codifiquen proteïnes amb el domini *RCC1* s'han identificat i constitueixen l'anomenada família *RCC1* (figura 4). El primer descrit va ésser el gen *D25215* (nom de referència del GeneBank), que es va identificar durant un *screening* a l'atzar. Aquest gen d'expressió ubiqua com els altres membres de la família *RCC1* no s'ha caracteritzat bioquímicament (Nomura *et al.*, 1994). En 1996 dos grups independents, Meindl *et al.* i Roepman *et al.*, van identificar el gen *RPGR* com el responsable de la retinitis pigmentosa 3 (RP3). La retinitis pigmentosa és el nom genèric donat a un grup de degeneracions hereditàries de la retina que presenten una sèrie de carac-

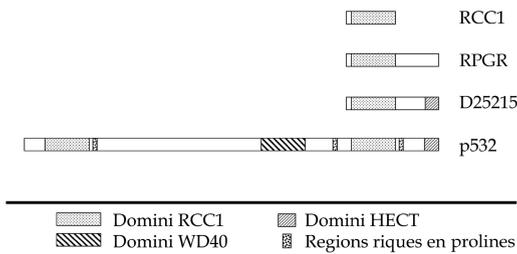


FIGURA 4. La família RCC1. Representació dels dominis estructurals dels membres d'aquesta família (RCC1, D25215, RPGR i p532) alineats segons el domini RCC1. Altres dominis funcionals són també indicats: WD40, homòleg a la subunitat  $\beta$  de les proteïnes G heterotrimeriques; HECT, homòleg al domini carboxiterminal de la proteïna E6-AP amb activitat E3-ubiquitina ligasa.

terístiques clíniques comunes com són: la ceguera nocturna, la reducció progressiva del camp visual i un anormal fons d'ull «pigmentat». La retinitis pigmentosa és deguda a una degeneració gradual de les cèl·lules fotoreceptores que comença en la perifèria i progressa a la regió central de la retina. Els pacients amb retinitis pigmentosa presenten generalment formes autosomals recessives (~80 %), tot i que aproximadament un 10 % tenen formes autosomals dominants o associades al cromosoma X. Com a mínim tres *loci* diferents estan involucrats en la retinitis pigmentosa severa associada al cromosoma X; la RP3 és la més freqüent (Haim, 1993; Dryja i Li, 1995). El gen *RPGR* pot codificar dues proteïnes que comparteixen una regió comuna de 506 aminoàcids on es troba un domini RCC1 (Meindl *et al.*, 1996; Roepman *et al.*, 1996). El darrer membre conegut de la família RCC1 és *p532*. *p532* ha estat identificat com un component d'un oncogen humà provinent de DNA de tumor de mama activat durant l'assaig de transferència gènica. Aquest gen es troba sobreexpressat en línies cel·lulars derivades de tumors humans (Rosa *et al.*, 1996). Per homologia amb *RCC1*, es va hipotetitzar que les proteïnes de la família RCC1

actuarien com GEF per Ran o algun altre membre de la superfamília de Ras, raó per la qual s'havia donat el nom de *RPGR* (per *Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator*) al gen responsable de la retinitis pigmentosa RP3. En l'actualitat, només s'ha pogut demostrar aquesta hipòtesi per *p532*, el qual actua com un GEF pel factor d'ADP-ribosilació 1 (ARF1) i per les proteïnes de la família Rab (Rab3A i Rab5), ambdues subfamílies involucrades en el trànsit intracel·lular (Rosa *et al.*, 1996).

El fet que en el domini RCC1 de *RPGR* es trobin totes les mutacions descrites en pacients amb retinitis pigmentosa tipus RP3 suggereix que les altres proteïnes relacionades estructuralment amb *RPGR*, la família *RCC1*, puguin estar també involucrades en algun tipus de retinitis pigmentosa. Interessantment, la localització cromosòmica dels gens *RCC1*, *p532* i *D25215* en els cromosomes 1 (Ohtsubo *et al.*, 1987), 15 (Rosa *et al.*, manuscrit en preparació) i 4 (Nomura *et al.*, 1994), respectivament, és coincident amb *loci* descrits prèviament de retinitis pigmentosa (Dryja i Li, 1995). A més, l'associació de la degeneració retinal amb proteïnes reguladores de GTPases de la superfamília Ras ha estat prèviament demostrada pel cas de la coroïderèmia (Seabra *et al.*, 1993). La coroïderèmia es produeix per una degeneració del coroïde que condueix a una degeneració de la retina. El gen responsable d'aquesta malaltia hereditària associada al cromosoma X codifica una geranilgeraniltransferasa, un enzim regulador de GTPases de la família Rab involucrades en el trànsit vesicular (Seabra *et al.*, 1993). Aquesta relació entre trànsit vesicular i retinitis pigmentosa assenjala en especial *p532* com un possible candidat a estar involucrat en aquest tipus de malaltia, posat que a més d'esser un regulador de GTPases involucrades en el trànsit intracel·lular (ARF1 i Rab) presenta el domini RCC1 relacionat amb *RPGR* trobat

mutat en la retinitis pigmentosa RP3. Interessantment, estudis recents del nostre laboratori utilitzant la tècnica d'hibridació *in situ* per fluorescència (FISH) localitzen el gen *p532* en la regió q22 del cromosoma 15 (Rosa *et al.*, manuscrit en preparació); aquesta localització cromosòmica coincideix amb el *locus* de retinitis pigmentosa que s'observa en pacients amb la síndrome de Bardet-Biedl (Dryja i Li, 1995).

## ALTRES GEF

El nombre de GEF està creixent contínuament; hem de pensar que possiblement existeix com a mínim un GEF per cada GTPasa coneguda i el nombre d'aquestes supera actualment la cinquantena tan sols en mamífers. A mesura que es van descrivint nous GEF i se n'analitza l'estructura i especificitat, es van agrupant en famílies o subfamílies relacionades estructuralment i funcional. Així, per exemple, tenim la família Ral-GEF formada per RalGDS, RGL (RalGDS-like), Rlf (RalGDS-like factor) i Rgr (RalGDS related) (D'Adamo *et al.*, 1997; Katz i McCormick, 1997). Aquestes proteïnes formarien una subfamília dels Ras-GEF ja que, tot i que contenen el domini amb homologia a CDC25, presenten una especificitat de substrat per la GTPasa Ral i no per Ras. A més, en el cas de RalGDS, la seva activitat Ral-GEF s'activa per interacció amb Ras activat (Ras-GTP), cosa que produeix un increment dels nivells de Ral-GTP i indica que funciona com una molècula transductora del senyal de Ras (Katz i McCormick, 1997). Aquests Ral-GEF s'han associat a tumorigènesi ja que formes truncades o fusionades poden generar tumors en ratolins (D'Adamo *et al.*, 1997).

En els darrers anys, s'han identificat també GEF per a les famílies de proteïnes Rab i ARF, com són les proteïnes Mss4,

Rab3GEP i Rabex per a la família Rab (Burton *et al.*, 1993; Horiuchi *et al.*, 1997; Wada *et al.*, 1997), Citohesina i ARNO per a la família ARF (Hemming, 1997; Frank *et al.*, 1998), i *p532* per a les dues famílies (Rosa *et al.*, 1996). Amb excepció d'ARNO i Citohesina, les diferències estructurals entre aquests GEF no permeten una agrupació en famílies. Aquests GEF semblen tenir un paper important en el trànsit intracel·lular de proteïnes amb la regulació de l'endocitosi i exocitosi cel·lular. A més, la fosfolipasa D (PLD) és activada sinèrgicament per les proteïnes ARF i Rho i implica els seus respectius GEF en la regulació del creixement cel·lular (Shome *et al.*, 1997; Lacal, 1997). Malgrat algunes d'aquestes evidències, el possible paper d'aquests ARF-GEF i Rab-GEF en processos de proliferació i transformació i en diferents malalties, encara s'ha de demostrar.

## AGRAÏMENTS

Els autors agraeixen als Drs. Ramon Bartrons i Francesc Ventura els comentaris, la paciència i l'ànim en l'elaboració d'aquesta revisió. Cristina Cruz gaudeix d'una beca FI/FIAP de la Generalitat de Catalunya. Els estudis realitzats per aquest grup estan subvencionats per la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (SAF98-0129).

## BIBLIOGRAFIA

- BELLANGER, J. M.; J. B. LAZARO; S. DIRIONG; A. FERNANDEZ; N. LAMB; A. DEBANT (1997). «The two guanine nucleotide exchange factor domains of Trio link the Rac1 and the RhoA pathways in vivo». *Oncogene*, núm. 16, pàg. 147-152.
- BISCHOFF, F. R.; H. PONSTINGL (1991a). «Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1». *Nature*, núm. 354, pàg. 80-82.
- BISCHOFF, F. R.; H. PONSTINGL (1991b). «Mitotic regulator protein RCC1 is complexed with a nuclear ras-rela-

- ted polypeptide». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 88, pàg. 10830-10834.
- BOGUSKI, M. S.; F. McCORMICK (1993). «Proteins regulating Ras and its relatives». *Nature*, núm. 366, pàg. 643-654.
- BOURNE, H. R.; D. A. SANDERS; F. McCORMICK (1990). «The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism». *Nature*, núm. 349, pàg. 117-126.
- BURTON, J.; D. ROBERTS; M. MONTALDI; P. NOVICK; P. DE CAMILLI (1993). «A mammalian guanine-nucleotide-releasing protein enhances function of yeast secretory protein Sec4». *Nature*, núm. 361, pàg. 464-467.
- CHARDIN, P.; J. H. CAMONIS; N. GALE; L. VAN AESLT; J. SCHLESINGER; M. H. WIGLER; D. BAR-SAGI (1993). «Human Sos-1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to Grb2». *Science*, núm. 260, pàg. 1338-1343.
- COLOMER, V.; S. ENGELENDER; A. H. SHARP; K. DUAN; J. K. COOPER; A. LANAHAN; G. LYFORD; P. WORLEY; C. A. ROSS (1997). «Huntingtin-associated protein (HAP1) binds to a Trio-like polypeptide, with a rac1 guanine nucleotide exchange factor domain». *Hum. Mol. Genet.*, núm. 6, pàg. 1519-1525.
- CRESPO, P.; K. E. SCHUEBEL; A. A. OSTROM; J. S. GUTKIND; X. R. BUSTELO (1997). «Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product». *Nature*, núm. 385, pàg. 169-172.
- D'ADAMO, D. R.; S. NOVICK; J. M. KAHN; P. LEONARDI; A. PELLICER (1997). «Rsc: a novel oncogene with structural and functional homology with the gene family of exchange factors for Ral». *Oncogene*, núm. 14, pàg. 1295-1305.
- DASSO, M. (1993). «RCC1 in the cell cycle: the regulator of chromosome condensation takes on new roles». *Trends-Biochem.-Sci.*, núm. 18, pàg. 96-101.
- DEBANT, A.; C. SERRA-PAGÈS; K. SEIPEL; S. O'BRIEN; M. TANG; S. H. PARK (1996). «The multidomain protein Trio binds the LAR transmembrane tyrosine phosphatase, contains a protein kinase domain, and has separate rac-specific and rho-specific guanine nucleotide exchange factor domains». *Proc. Natl.; Acad. Sci. USA*, núm. 93, pàg. 5466-5471.
- DECLUE, J. E.; A. G. PAPAGEORGE; J. A. FLETCHER; S. R. DIEHL; N. RATNER; W. C. VASS; D. R. LOWY (1992). «Abnormal regulation of mammalian p21ras contributes to malignant tumor growth in von Recklinghausen (type1) neurofibromatosis». *Cell*, núm. 69, pàg. 265-273.
- DRYJA, T. P.; T. LI (1995). «Molecular genetics of retinitis pigmentosa». *Human Molecular Genetics*, núm. 4, pàg. 1739-1743.
- EBINU, J. O.; D. E. BOTTORFF; E. Y. W. CHAN; S. L. STANG; R. J. DUNN; J. C. STONE (1998). «RasGRP, a Ras guanyl nucleotide-releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs». *Science*, núm. 280, pàg. 1082-1086.
- EVA, A.; S. A. AARONSON (1985). «Isolation of a new human oncogene from a diffuse B-cell lymphoma». *Nature*, núm. 316, pàg. 273-275.
- FEIG, L. A. (1994). «Guanine nucleotide exchange factors: a family of positive regulators of Ras and related GTPases». *Curr. Op. Cell Biol.*, núm. 6, pàg. 204-211.
- FRANK, S.; S. UPENDER; S. H. HANSEN; J. CASANOVA (1998). «ARNO is a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factor 6». *J. Biol. Chem.*, núm. 273, pàg. 23-27.
- FRYNS, J. P. (1992). «Aarskog syndrome: the changing phenotype with age». *Am. J. Med. Genet.*, núm. 43, pàg. 420-427.
- GLAVEN, J. A.; I. P. WHITEHEAD; T. NOMANBHOY; R. KAY; R. A. CERIONE (1996). «Lfc and Lsc oncoproteins represent two new guanine nucleotide exchange factors for the Rho GTP-binding protein». *J. Biol. Chem.*, núm. 271, pàg. 27374-27381.
- GÖRLICH, D.; I. W. MATTAJ (1996). «Nucleocytoplasmic transport». *Science*, núm. 271, pàg. 1513-1518.
- GRIER, R. E.; F. H. FARRINGTON; R. KENDING; P. MAMUNES (1983). «Autosomal dominant inheritance of the Aarskog syndrome». *Am. J. Med. Genet.*, núm. 15, pàg. 39-46.
- HABETS, G. G. M.; E. H. M. SCHOLTES; D. ZUYDGEEST; R. A. VAN DER KAMMEN; J. C. STAM; A. BERNIS; J. G. COLLARD (1994). «Identification of an invasion-inducing gene, Tiam-1, that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rho-like proteins». *Cell*, núm. 77, pàg. 537-549.
- HAIM, M. (1993). «Retinitis pigmentosa: problems associated with genetic classification». *Clin. Genet.*, núm. 44, pàg. 62-70.
- HEMMINGS, B. A. (1997). «PH domains-A universal membrane adapter». *Science*, núm. 275, pàg. 1899.
- HERMANN, C.; G. HORN; M. SPAARGAREN; A. WITTINGHOFER (1996). «Differential interaction of the ras family GTP-binding proteins H-Ras, Rap1A, and R-Ras with the putative effector molecules Raf kinase and Ral-guanine nucleotide exchange factor». *J. Biol. Chem.*, núm. 271, pàg. 6794-6800.
- HORDIJK, P. L.; J. P. TEN-KLOOSTER; R. A. VAN DER KAMMEN; F. MICHELS; L. C. OOMEN; J. G. COLLARD (1997). «Inhibition of invasion of epithelial cells by Tiam1-Rac signaling». *Science*, núm. 278, pàg. 1464-1466.
- HORII, Y.; J. F. BEELER; K. SAKAGUCHI; M. TACHIBANA; T. MIKI (1994). «A novel oncogene, Ost, encodes a guanine nucleotide exchange factor that potentially links Rho and Rac signaling pathways». *EMBO J.*, núm. 13, pàg. 4776-4786.
- HORIUCHI, H.; R. LIPPE; H. M. MCBRIDE; M. RUBINO; P. WOODMAN; H. STENMARK; V. RYBIN; M. WILM; K. ASH-

- MAN; M. MANN; M. ZERIAL (1997). «A novel Rab5GDP/GTP exchange factor complexed to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function». *Cell*, núm. 90, pàg. 1149-1159.
- HUNTER, T. (1997). «Oncoproteins networks». *Cell*, núm. 88, pàg. 333-346.
- JONES, M. K.; J. H. JACKSON (1998). «Ras-GRF activates Ha-Ras, but not N-Ras or K-Ras 4B, protein in vivo». *J. Biol. Chem.*, núm. 273, pàg. 1782-1787.
- KAHN, C. R.; D. VICENT; A. DORIAH (1996). «Genetics of non-insulin-dependent (type-II) diabetes mellitus». *Annu. Rev. Med.*, núm. 47, pàg. 509-31
- KATZ, M. E.; F. McCORMICK (1997). «Signal transduction from multiples Ras effectors». *Curr. Op. Gen. Dev.*, núm. 7, pàg. 75-79.
- KEELY, P. J.; J. K. WESTWICK; I. P. WHITEHEAD; C. J. DER; L. V. PARISE (1997). «Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K». *Nature*, núm. 390, pàg. 632-636.
- LACAL, J. C. (1997). «Regulation of proliferation and apoptosis by Ras and Rho GTPases through specific phospholipid-dependent signaling». *FEBS Lett.*, núm. 410, pàg. 73-77.
- LAI, C. C.; D. BROEK; S. POWERS (1993). «Influence of guanine nucleotides on complex formation between Ras and CDC25 proteins». *Mol. Cell. Biol.*, núm. 13, pàg. 1345-1352.
- MACARA, I. G.; K. M. LOUNSBURY; S. A. RICHARDS; C. McKIERNAN; D. BAR-SAGI (1996). «The Ras superfamily of GTPases». *FASEB J.*, núm. 10, pàg. 625-630.
- MEINDL, A.; K. DRY; K. HERRMANN; F. MANSONH; A. CICCOCICOLA; A. EDGAR; M. R. S. CARVALHO; H. ACHATZ; H. HELLEBRAND; A. LENNON; C. MIGLIACCIO; K. PORTER; E. ZRENNER; A. BIRD; M. JAY; B. LORENZ; B. WITTEWER; M. D'URSO; T. MEITINGER; A. WRIGHT (1996). «A gene (RPGR) with homology to the RCC1 guanine nucleotide exchange factor is mutated in X-linked retinitis pigmentosa (RP3)». *Nature Genet.*, núm. 13, pàg. 35-42.
- MICHIELS, F.; G. G. M. HABETS; J. C. STAM; R. A. VAN DER KAMMEN; J. G. COLLARD (1995). «A role for Rac in Tiam1-induced membrane ruffling and invasion». *Nature*, núm. 375, pàg. 338-340.
- MUÑOZ, A. (1997). *Cáncer*. Madrid: Ed. Hélice.
- MURAL, H.; M. IKEDA; S. KISHIDA; O. ISHIDA; M. OKAZAKI-KISHIDA; Y. MATSUURA; A. KIKUCHI (1997). «Characterization of Ral GDP dissociation stimulator-like (RGL) activities to regulate c-fos promoter and the GDP/GTP exchange of Ral». *J. Biol. Chem.*, núm. 272, pàg. 10483-10490.
- NISHIMOTO, T.; E. EILEN; C. BASILICO (1978). «Premature chromosome condensation in a ts DNA- mutant of BHK cells». *Cell*, núm. 15, pàg. 475-483.
- NOBES, C. D.; A. HALL (1995). «Rho, Rac and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia and filopodia». *Cell*, núm. 81, pàg. 1-20.
- NOMURA, N.; N. MIYAJIMA T. SAZUKA; A. TANAKA; Y. KAWARABAYASI; S. SATO; T. NAGASE; N. SEKI; K. ISHIKAWA; S. TABATA (1994). «Prediction of the coding sequences of unidentified human genes.I. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0001-KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1». *DNA Res.*, núm. 1, pàg. 27-35.
- NOVICK, P.; M. ZERIAL (1997). «The diversity of Rab proteins in vesicle transport». *Curr. Op. Cell Biol.*, núm. 9, pàg. 496-504.
- OLSON, M. F.; A. ASHWORTH; A. HALL (1995). «An essential role for rho, rac and cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1». *Science*, núm. 269, pàg. 1270-1272.
- OLSON, M. F.; N. G. PASTERIS; J. L. GORSKI; A. HALL (1996). «Faciogenital dysplasia protein (FGD1) and Vav, two related proteins required for normal embryonic development, are upstream regulators of Rho GTPases». *Curr. Biol.*, núm. 6, pàg. 1628-1633.
- OHISUBO, M.; R. KAI; N. FURUNO; T. SEKIGUCHI; M. SEKIGUCHI; H. HAYASHIDA; K. KUMA; T. MIYATA; S. FUKUSHIGE; T. MUROTSU; K. MATSUBARA; T. NISHIMOTO (1987). «Isolation and characterization of the active cDNA of the human cell cycle gene (RCC1) involved in the regulation of onset of chromosome condensation». *Genes & Develop.*, núm. 1, pàg. 585-593
- PASTERIS, N. G.; A. CADLE; L. J. LOGIE; M. E. M. PORTEOUS; C. E. SCHWARTZ; R. E. STEVENSON; T. W. GLOVER; R. S. WILROY; J. L. GORSKI (1994). «Isolation and characterization of the faciogenital dysplasia (Aarskog-Scott syndrome) gene: a putative Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor». *Cell*, núm. 79, pàg. 669-678.
- PFEFFER, S. R. (1994). «Rab GTPases: master regulators of membrane trafficking». *Curr. Op. Cell Biol.*, núm. 6, pàg. 522-526.
- QUILLIAM, L. A.; R. KHOSRAVI-FAR; S. Y. HUFF; C. J. DER (1995). «Guanine nucleotide exchange factors: activators of the Ras superfamily of proteins». *BioEssays*, núm. 17, pàg. 395-404.
- RENAULT, L.; N. NASSAR; I. VETTER; J. BECKER; C. KLEBE; M. ROTH; A. WITTINGHOFFER (1998). «The 1.7 Å crystal structure of the regulator of chromosome condensation (RCC1) reveals a seven-bladder propeller». *Nature*, núm. 392, pàg. 97-101.
- ROEPMAN, R.; G. VAN DUJNHOFEN; T. ROSENBERG; A. J. L. PINCKERS; L. M. BLEEKER-WAGEMAKERS; A. A. B. BERGEN; J. POST; A. BECK; R. REINHARDT; H. H. ROPERS; F. P. M. CREMERS; W. BERGER (1996). «Positional cloning of the gene for X-linked retinitis pigmentosa 3: homology with the guanine nucleotide-exchange factor RCC1». *Human Molecular Genetics*, núm. 5, pàg. 1035-1041.

- ROSA, J. L.; R. P. CASAROLI-MARANO; A. J. BUCKLER; S. VILARÓ; M. BARBACID (1996). «p619, a giant protein related to the chromosome condensation regulator RCC1, stimulates guanine nucleotide exchange on ARF1 and Rab proteins». *EMBO J.*, núm. 15, pàg. 4262-4273; 5738.
- ROSA, J. L.; M. BARBACID (1997). «A giant protein that stimulates guanine nucleotide exchange on ARF1 and Rab proteins forms a cytosolic ternary complex with clathrin and Hsp70». *Oncogene*, núm. 15, pàg. 1-6.
- ROTHMAN, J. E.; F. T. WIELAND (1996). «Protein sorting by transport vesicles». *Science*, núm. 272, pàg. 227-234.
- RUSH, M. G.; G. DRIVAS; P. D'EUSTACHIO (1996). «The small nuclear GTPase Ran: how much does it run?». *Bioessays*, núm. 18, pàg. 103-112
- SEABRA, M. C.; M. S. BROWN; J. L. GOLDSTEIN (1993). «Retinal degeneration in choroideremia: deficiency of rab geranylgeranyl transferase». *Science*, núm. 259, pàg. 377-381.
- SHOME, K.; C. VASUDEVAN; G. ROMERO (1997). «ARF proteins mediate insulin-dependent activation of phospholipase D». *Curr. Biol.*, núm. 7, pàg. 387-396.
- SONDEK, J.; A. BOHM; D. G. LAMBRIGHT; H. E. HAMM; P. B. SIGLER (1996). «Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1A resolution». *Nature*, núm. 379, pàg. 297-299.
- SYMONS, M. (1996). «Rho family GTPases: the cytoskeleton and beyond». *TIBS*, núm. 21, pàg. 178-180.
- TAPON, N.; A. HALL (1997). «Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton». *Curr. Opin. Cell Biol.*, núm. 9, pàg. 86-92.
- VAN DEN BERGHE, N.; R. H. COOL; G. HORN; A. WITTINGHOFFER (1997). «Biochemical characterization of C3G: an exchange factor that discriminates between Rap1 and Rap2 and is not inhibited by Rap1A(S17N)». *Oncogene*, núm. 15, pàg. 845-850.
- WADA, M.; H. NAKANISHI; A. SATOH; H. HIRANO; H. OBAISHI; Y. MATSUURA; Y. TAKAI (1997). «Isolation and characterization of a GDP/GTP exchange protein specific for the Rab3 subfamily small G proteins». *J. Biol. Chem.*, núm. 272, pàg. 3875-3878.
- ZHENG, Y.; D. ZANGRILLI; R. A. CERIONE; A. EVA (1996a). «The pleckstrin homology domain mediates transformation by oncogenic dbl through specific intracellular targeting». *J. Biol. Chem.*, núm. 271, pàg. 19017-19020.
- ZHENG, Y.; D. J. FISCHER; M. F. SANTOS; G. TIGYI; N. G. PASTERIS; J. L. GORSKI; Y. XU (1996b). «The faciogenital dysplasia gene product FGD1 functions as a Cdc42Hs-specific guanine-nucleotide exchange factor». *J. Biol. Chem.*, núm. 271, pàg. 33169-33172.