



03062
16
1 eje

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO DEL CCH

“DETECCION DE MUTACIONES PUNTUALES EN LOS
GENES RAS y p53, EN LINEAS CELULARES
DERIVADAS DE CANCER HUMANO”

TESIS

TRABAJO DE INVESTIGACION

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMÉDICA BÁSICA
PRESENTA:

Q.B.P. ELVA MAYRA TOLEDO CUEVAS

CD. UNIVERSITARIA **TESIS CON FALLA DE ORIGEN** AGOSTO 1994



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LAB DEL DR. ALEJANDRO GARCIA CARRANCA, DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM Y CON LA COLABORACION DEL INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA; BAJO LA SUPERVISION DEL DR. ALEJANDRO GARCIA CARRANCA.

GRACIAS ALEX POR COMPARTIR
CONMIGO TUS EXPERIENCIAS Y
POR EL APOYO QUE ME HAS
BRINDADO PARA REALIZAR ESTE
TRABAJO.

A MI DIOS:

POR QUE PESE AL TAMBALEO DE MI FE,
SU MISERICORDIA Y AMOR SE HAN EXTENDIDO
EN PLENITUD A LA LARGO DE ESTE SENDERO,
TANTO EN SUS CIMAS COMO EN SUS VALLES.
PARA Y POR LA GLORIA DE SU NOMBRE.
GRACIAS POR LA VIDA Y POR LO QUE CON ELLA
VENGA.

A ESA GRAN AMIGA...MAMA:

POR ESE EJEMPLO CONSTANTE DE TENACIDAD

POR VIVIR. POR SER ESE REFUGIO SEGURO DE

AMOR, APOYO Y COMPRENSIÓN.

GRACIAS POR HABER PUESTO TU ILUSIÓN DE

VIVIR EN NUESTRA REALIZACIÓN Y FELICIDAD.

POR TÍ VA ESTE NUEVO ÉXITO.

A PAPA:

GRACIAS POR QUE SOBRE TODAS LAS

COSAS, NOS AMAS. GRACIAS POR TU

PRESENCIA EN TODO ESTE CAMINO.

GRACIAS POR SACRIFICAR TUS SUEÑOS

POR AYUDAR A LA REALIZACIÓN DE LOS

NUESTROS.

AHORA ES TU TURNO.

A MIS MUY ENTRAÑABLES Y QUERIDOS HERMANOS:

POR QUE SU SOLA EXISTENCIA ME LLENA Y DA

FUERZAS PARA SEGUIR ADELANTE.

ROBERTO: GRACIAS POR TU BRILLANTE Y ADMIRABLE

EJEMPLO QUE SIEMPRE ME IMPULSA. GRACIAS POR

HABER SIDO UN PILAR ESCENCIAL DE NUESTRA CASA

Y LA SEGURIDAD Y APOYO NUESTRO. QUE SEAS FELIZ.

MIGUEL: POR LA GENEROSA ENTREGA DE

TU SER PARA CONMIGO, QUE ME HA SERVIDO

PARA RECOMENZAR MI CAMINO. QUE ESTO

TE MOTIVE A SEGUIRTE SUPERANDO CON

TODAS CAPACIDADES.

HUGO: POR LA CONSTANCIA DE TU AMOR Y LAS
MANIFESTACIONES DE TU CARÍÑO QUE SIEMPRE
HAN CALENTADO MI CORAZÓN, SIGUE ADELANTE
Y SE FELIZ.

A MI PEQUEÑA CLARISE: A QUIEN ME
ENCUENTRO ESPECIALMENTE LIGADA
AFECTIVAMENTE. POR TODAS LAS COSAS
BELLAS QUE HEMOS COMPARTIDO, POR SER
MI MEJOR COMPAÑERA Y AMIGA.
A TÍ TAMBIÉN DEDICO ESTE TRABAJO CON
TODO EL AMOR CON EL QUE DESEO
INUNDARTE.

A TODOS MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DEL LABO:
MIRIAM, MARCE, LUPY, VERO, LAURIS, RONIT,
CARLA, OLGA, HUMBERTO, MANUEL, NÉSTOR,
CÉSAR Y ENRIQUE. POR HACER DE NUESTRO LUGAR
DE TRABAJO UN MUY PLACENTERO SEGUNDO HOGAR
Y UN SITIO DONDE SIEMPRE SE AÑORA SU PRESENCIA.

A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE POR SU
AMISTAD Y CARÍÑO ME AYUDARON A
TERMINAR ESTA META:

A JORGE Y PEPE (FOTOGRAFÍA), A RAFAEL
(DIBUJO), PEPE (ALMACÉN), SR FELIPE NAJERA
Y JUAN LUIS (COMPRAS), EMA Y BRAULIO
(BIBLIOTECA), A JUAN Y A OTROS QUE SIN
QUERER HAYA OMITIDO.

A TI ERNESTO:

POR QUE A PESAR DE LA PEQUEÑA CANTIDAD
DE TIEMPO HAS HECHO CON LA CALIDAD ALGO
MUY BELLO. GRACIAS POR EL ENORME APOYO
Y ALTRUISTA DONACIÓN EN ESTA ETAPA TAN DIFÍCIL.

A TODOS MIS AMIGOS:
QUE DE ALGUNA U OTRA FORMA HAN
COLABORADO EN ESTA NUEVA REALIZACIÓN
PERSONAL. EN ESPECIAL A TÍ HUGO.

CONTENIDO

	PAG.
I. INTRODUCCION	1
I.1. RAS: UN PROTOONCOGEN CLASICO.	4
I.2. P53: UN EJEMPLO DE GEN SUPRESOR.	14
I.3. PAPILOMAVIRUS: UN FACTOR MAS EN EL DESARROLLO DE ALGUNOS CANCERES HUMANOS.	25
II. PUNTOS DE PARTIDA DEL TRABAJO.	27
III. OBJETIVOS.	28
IV. MATERIAL Y METODOS.	28
V. RESULTADOS.	37
V.1. DETECCION DE MUTACIONES EN LOS GENES RAS EN LINEAS CELULARES DERIVADAS DE TUMORES HUMANOS.	40
V.2. DETECCION DE MUTACIONES EN P53 EN LINEAS CELULARES DERIVADAS DE TUMORES HUMANOS.	41
V.3. DETECCION DE HPV.	54
VI. DISCUSION.	55
VII. REFERENCIAS.	59

LISTA DE FIGURAS

PAG.

FIGURA 1. FUNCIONAMIENTO DE LA PROTEÍNA RAS NORMAL.	6
FIGURA 2. CASCADA DE TRANSMISIÓN DE SEÑALES A TRAVÉS DE RAS.	9
FIGURA 3. LAS PROTEÍNAS RAS MUTADAS TRANSMITEN DE MANERA CONTINUA LAS SEÑALES DE CRECIMIENTO.	12
FIGURA 4. REPRESENTACIÓN DE LA PROTEÍNA P53 Y DE LOS SITIOS DE MAYOR FRECUENCIA DE MUTACIONES.	23
FIGURA 5. DETECCIÓN DE MUTACIONES PUNTUALES MEDIANTE POLIMORFISMOS CONFORMACIONALES DE PRODUCTOS DE PCR.	33
FIGURA 6. ANÁLISIS DE PCR-SSCP PARA EL EXON 1 DEL GEN H-RAS.	42
FIGURA 7. ANÁLISIS DE LOS EXONES 1 Y 2 DEL GEN K-RAS.	43
FIGURA 8. ANÁLISIS DE LOS EXONES 1 Y 2 DEL GEN N-RAS.	44
FIGURA 9. DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL EXON 5 DE P53 HUMANO.	46
FIGURA 10. ANÁLISIS DEL EXON 6 DE P53.	47

	PAG.
FIGURA 11. ANÁLISIS DEL EXON 7 DE P53.	48
FIGURA 12. DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL EXON 8 DEL GEN P53	49.
FIGURA 13. NATURALEZA Y LOCALIZACIÓN DE ALGUNAS MUTACIONES EN EL EXÓN 6 DEL GEN P53.	53

LISTA DE TABLAS

	PAG.
TABLA I. CARACTERÍSTICAS DE LAS LÍNEAS CELULARES UTILIZADAS.	29
TABLA II. OLIGONUCLEÓTIDOS USADOS PARA AMPLIFICAR FRAGMENTOS DE LOS TRES GENES RAS HUMANOS.	35
TABLA III. OLIGONUCLEÓTIDOS USADOS PARA AMPLIFICAR ALGUNOS EXONES DEL GEN P53 HUMANO.	36
TABLA IV. CONDICIONES UTILIZADAS EN LAS REACCIONES DE AMPLIFICACIÓN DE DIVERSOS EXONES DE LOS TRES GENES RAS Y P53 HUMANOS.	39
TABLA V. RESUMEN DE LAS ALTERACIONES DETECTADAS EN LOS GENES RAS Y P53 EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE DIVERSOS TUMORES HUMANOS.	51
TABLA VI. MUTACIONES CONFIRMADAS POR SECUENCIACIÓN.	54
TABLA VII. REPORTE DEL ESTADO DEL GEN H-RAS EN ALGUNAS DE LAS LÍNEAS CELULARES CON ALTERACIÓN REPORTADA EN LA REGIÓN CROMOSÓMICA 11P15.	57

RESUMEN

El cáncer en todas sus formas es una enfermedad donde su patogénesis se conoce poco, pero que es de gran importancia por su alto índice de morbi/mortalidad a nivel mundial. Entender los mecanismos que llevan a su desarrollo es importante para mejorar el diagnóstico y tratamiento. Actualmente se sabe que el cáncer es resultado de una acumulación de daños a genes celulares clave que regulan la proliferación, el crecimiento, la diferenciación y la muerte celular.

La identificación de los genes involucrados en el desarrollo de cáncer viene de estudios donde se encontró que algunos virus (que producían cáncer en las aves) poseían una versión alterada (oncogenes), pero altamente homóloga a la de ciertos genes celulares. De aquí se obtuvo la conclusión de que la alteración de genes celulares específicos (protooncogenes) podía contribuir al proceso de carcinogénesis.

Posteriormente se encontró también que la pérdida de cierta información genética podía participar en el desarrollo del cáncer. De esta forma se identificó a los denominados genes supresores, responsables de regular negativamente el crecimiento celular.

Así, el crecimiento celular normal es regulado por el equilibrio entre las señales promotoras del crecimiento (protooncogenes) y las inhibitorias (genes supresores). La pérdida de estos controles por alteraciones a ambos grupos de genes son eventos críticos en la carcinogénesis. Otro evento de relevancia para el cáncer es la infección con virus oncogénicos como los papilomavirus humanos (HPV). Estos participan importantemente en el desarrollo del cáncer anogenital como el de cérvix, y al parecer también juegan algún papel en el cáncer de piel y de las vías aerodigestivas superiores.

El objetivo de este trabajo fue el conocer la frecuencia con la que se encuentran alterados los genes ras y p53 en diversas líneas celulares derivadas de cáncer humano. Esto con la finalidad de establecer la importancia que juegan las alteraciones a estos genes en el desarrollo de algunos tumores. También se hizo la detección de genomas de HPV y se trató de establecer la posible relación con los eventos mutacionales en los genes mencionados. En el trabajo se realizó la estandarización de una metodología para detectar alteraciones mínimas en la secuencia de DNA, en forma rápida y con una alta sensibilidad.

Los resultados obtenidos son que: los genes ras y p53 se encuentran alterados con una muy alta frecuencia en las líneas celulares analizadas; la presencia de HPV se correlaciona con la ausencia de alteraciones en p53; al parecer puede haber una correlación entre las mutaciones en p53 y ras para el proceso de carcinogénesis.

I. INTRODUCCION.

El cáncer es una enfermedad multifactorial producida fundamentalmente por la acumulación de daños en genes claves que regulan procesos celulares vitales como son: el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y la muerte celular.

Los primeros estudios que sugirieron alteraciones genéticas en las células cancerosas vinieron del análisis de los cromosomas. En 1914 el zoólogo Theodor Boveri observó anomalías cromosómicas (como translocaciones) en las células tumorales y propuso que estas alteraciones podrían ser importantes para el desarrollo del cáncer. Sin embargo no fue hasta 1960 que se descubrieron por primera vez cambios no azarosos en las células malignas (ver Schawb, 1989).

La definición molecular de los genes alterados en las células cancerosas comenzó alrededor de 1976. En ese año se descubrió que las células eucariotas acarrean genes homólogos (**protooncogenes celulares**) a los oncogenes de los retrovirus (para revisiones ver Bishop, 1985; Varmus, 1984).

Los **protooncogenes** son versiones celulares normales que codifican para factores de crecimiento, receptores, transductores de señales y factores de transcripción. De esta forma participan en la regulación de los procesos de crecimiento y proliferación celular.

Los protooncogenes se convierten en **oncogenes** por alteraciones que involucran mecanismos como: inserción viral, amplificación, mutación y/o translocación cromosómica, entre otros. Estas alteraciones los activan porque provocan la desregulación de su actividad normal. Los oncogenes son dominantes ya que la alteración de uno solo de los alelos es suficiente para inducir la transformación celular (Bishop, 1985). La importancia de los protooncogenes en la carcinogénesis humana se refleja en la alta frecuencia con la que se encuentran

alterados en muchos tipos de tumores.

Además de las alteraciones cromosómicas que activan a los oncogenes, también se ha observado la pérdida de regiones cromosómicas en diferentes tipos de tumores. Sin embargo, la entidad molecular que es eliminada no fue definida sino hasta recientemente, cuando se encontró que los oncogenes no están involucrados en estas pérdidas de información sino un grupo de genes distintos, actualmente conocidos como **genes supresores**. La existencia de los genes supresores ha sido apoyada a través de varias líneas de investigación. Una de ellas está fundamentada en el hallazgo de pérdida de regiones cromosómicas en algunos cánceres hereditarios. En particular, el retinoblastoma está asociado a la pérdida de la región 13q14. Esta región fue precisada por Cavenee y col (1983, 1985) usando los polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLPs). Ellos mostraron que varios marcadores de la región 13q se encontraban en forma heterocigota en las células normales de los pacientes, mientras que en los tumores de estos mismos individuos se encontraban en forma homocigota. A este suceso se le denominó "**pérdida de heterocigocidad**", y se le relacionó con la pérdida de un gen responsable de la supresión del fenotipo maligno.

Debido a la importancia de este hallazgo se buscó el mismo fenómeno en otros tipos tumorales. El estudio mostró que la pérdida de información se presentaba en muchos locus cromosómicos, en varios de los cuales se ha ya identificado a los genes supresores involucrados (para revisión ver Stanbridge, 1990). Así pues, se reporta una frecuente pérdida de heterocigocidad en marcadores del brazo corto del cromosoma 11 en varios tipos tumorales (Fearon et al, 1985; Ali et al, 1987; Atkin & Baker, 1988; Wang & Rogler, 1988), y particularmente de un alelo del gen Ha-ras en la región 11p15.5 en cánceres de mama (Theillet et al, 1986). Esto refleja posiblemente la inestabilidad genética de esta región,

producida por la presencia de sitios frágiles entre las regiones cromosómicas 11p13 y 11p15.1 (Yunis & Soreng, 1984).

La pérdida somática de heterocigocidad ha sido considerada como el segundo evento necesario para la inactivación de los genes supresores. Es decir, de acuerdo a la hipótesis de Knudson, se requerirían dos eventos para la inactivación de un gen supresor: el primero sería la mutación de uno de los alelos (evento germinal en los cánceres hereditarios y somático en los cánceres esporádicos), y el segundo evento podría ser la mutación del alelo normal restante (evento más probable en los cánceres hereditarios), o bien la pérdida del alelo normal con o sin duplicación del alelo mutado (más frecuente en los cánceres esporádicos). Esta pérdida del alelo normal se manifiesta como una pérdida de heterocigocidad de las regiones adyacentes al gen supresor.

El estudio sobre la formación de híbridos celulares también apoyó fuertemente la existencia de los genes supresores. Harris, Klein y colaboradores (1969, 1971) inicialmente formaron híbridos entre fibroblastos normales de ratón y células tumorigénicas de humano, y demostraron que las células resultantes tenían supresión total del fenotipo tumorigénico. La tumorigenicidad celular era recuperada por la segregación de cromosomas particulares. Sin embargo, debido a la inestabilidad de esas fusiones los datos no fueron concluyentes hasta después de la obtención de híbridos no tumorigénicos derivados de la cruce de células humanas transformadas y normales. Con estos híbridos se confirmó que la supresión de la tumorigenicidad era el resultado de la introducción de cierta información genética de las células normales a las malignas, con lo que se suplía una función ausente en éstas últimas, esencial para la tumorigenicidad (Stanbridge, 1990). Los estudios fueron fortalecidos finalmente al observar que la introducción de cromosomas únicos específicos, como el cromosoma 11 a células de carcinoma

cérvico-uterino y de rhabdomyosarcoma (Srivatsan et al, 1986; Saxon et al, 1986), suprimían la tumorigenicidad de estas células malignas.

Las funciones hasta ahora atribuibles a los genes supresores de tumores son: la de reguladores negativos de la proliferación normal de las células, la de proveer la capacidad de responder a un estímulo adecuado inductor de diferenciación, y la de reguladores de la apoptosis y el ciclo celular. Los genes supresores, a diferencia de los oncogenes, son recesivos ya que se requiere de la inactivación de ambos alelos por mecanismos como eliminaciones, rearrreglos, o mutaciones. Sin embargo, existen alteraciones que tienen un fenotipo dominante negativo que solo requieren, al igual que para los oncogenes, de un solo evento mutacional para la transformación.

Para la mayoría de los cánceres, tanto hereditarios como esporádicos, los genes más frecuentemente mutados son los genes supresores. La mayoría de los cánceres hereditarios dominantes son atribuibles a mutaciones germinales heterocigotas, que en la mayoría de los casos pueden encontrarse en los genes supresores.

I.1. RAS: UN PROTOONCOGEN CLASICO.

Las proteínas ras forman parte de una gran superfamilia de GTPasas que juegan papeles críticos en el crecimiento normal y transformado, razón por lo cual han sido de las proteínas más estudiadas desde la década pasada. Participan en el control de una extraordinaria variedad de procesos celulares como son: el flujo de señales de crecimiento y proliferación, la regulación del tráfico de moléculas a través de membranas entre varios compartimentos, y el control del citoesqueleto.

Con base en las secuencias nucleotídicas, la superfamilia ha sido dividida en tres grandes grupos cuyos miembros tienen características funcionales semejantes: **Familia ras**, que incluye a las verdaderas proteínas ras, participan en la transducción de señales; **Familia Rho/ Rac**, involucradas en la organización del citoesqueleto y **Familia Rab**, proteínas que regulan el tráfico membranal, es decir, el transporte de vesículas entre diferentes compartimentos intracelulares (Boguski & McCormick, 1993).

La **Familia ras** (con miembros clasificados como **protooncogenes**) está conformada, entre otros, por los tres genes verdaderos funcionales: **N-ras** (cromosoma 1), **H-ras1** (cromosoma 11, región p15.5), y **K-ras2** (cromosoma 12), y dos pseudogenes: **H-ras2** y **K-ras1** (Marshall, 1985). Estos genes contienen 4 exones con baja similitud en su secuencia, pero que codifican para una proteína altamente homóloga de 21 kd conocida como p21. La región carboxilo es la menos conservada entre estas proteínas por lo que se cree que podría ser la que esté involucrada en determinar sus especificidades funcionales (para revisiones ver Barbacid, 1987; Marshall, 1988)

Las proteínas ras se encuentran ancladas en el lado interno de la membrana plasmática donde participan en la transducción de señales de crecimiento y diferenciación celular (para revisión ver Barbacid, 1987). Unen GTP o GDP con alta afinidad (Scholnick et al, 1979), lo que las hace oscilar entre los estados activo e inactivo respectivamente. Presentan además una baja actividad de GTPasa (Manne et al, 1985). La tasa de hidrólisis del GTP es incrementada en casi cien veces por la proteína activadora de la GTPasa "**GAP**" (Trahey & McCormick, 1987). Se postula que la hidrólisis del GTP por p21 participa en el paso de las señales celulares (para revisión ver Feig, 1993). (Ver Fig.1)

RAS NORMAL

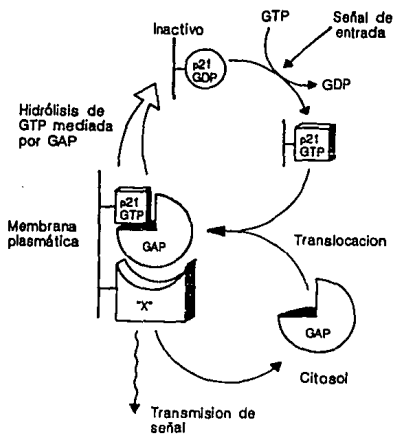


FIG. 1. Funcionamiento de la proteína RAS normal.

Ras(p21) oscila entre los estados activo e inactivo por su unión a GTP ó GDP, respectivamente.

Cuando ciertos receptores son activados, transmiten una señal de entrada que causa la transición de ras a su estado unido a GTP.

La transmisión de la señal se lleva a cabo através de la hidrólisis del GTP unido a p21. Esto es mediado por la proteína GAP que incrementa la actividad de GTPasa de p21.

De esta forma ras regresa a su estado inactivo unido a GDP.

La actividad de las proteínas ras es regulada por dos mecanismos: 1) por un incremento en su actividad intrínseca de GTPasa produciendo la forma inactiva unida a GDP, y 2) por un incremento, posterior a un estímulo, en la tasa de recambio del GDP que produce la forma activa unida a GTP. El ciclamiento entre la forma activa y la inactiva es influenciado por tres diferentes clases de proteínas: las que activan a ras, es decir, que promueven el intercambio de los nucleótidos de guanina de GDP a GTP, las que inhiben este intercambio (inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina), y las que estimulan la actividad intrínseca de GTPasa (GAP, proteínas activadoras de la GTPasa). Entre estas últimas se encuentran GAP y NF1, que promueven el aumento en la velocidad de la actividad intrínseca de GTPasa de ras. Cada una de estas proteínas regulatorias median a su vez una variedad de otras funciones, algunas de las cuales afectan a otras GTPasas involucradas en otras vías regulatorias.

La velocidad de intercambio del nucleótido de guanina GDP es regulada por al menos tres familias diferentes de proteínas: GRF, mSOS, y GDS. Las proteínas mSOS son ubicuas y pueden activar a las tres proteínas ras. GRF también actúa en todas las proteínas ras, pero sólo se encuentra en extractos de cerebro. GDS actúa en Ki-ras y otras proteínas relacionadas con ras, pero no afecta a Ha-ras ni a N-ras.

El flujo de información desde un receptor tirosin cinasa hacia ras es llevado a cabo por interacciones específicas proteína-proteína. La activación de un receptor, por ejemplo el de EGF (receptor al factor de crecimiento epidermal), es llevada a cabo por la unión de un factor de crecimiento, que enciende su actividad enzimática produciendo su autofosforilación. La fosforilación hace accesible un segmento interno del receptor con el que se une a la primera de la proteínas de esta vía de transducción, Grb2 (a través del dominio SH2), que sirve como adaptador para la

siguiente proteína, mSos (por su dominio SH3). mSos es el activador de ras que induce el intercambio del GDP a GTP, transformando a ras del estado inactivo al activo (Fig.2).

Algunas proteínas con dominios homólogos a la proteína src (SH2 y SH3) tienen la capacidad de interactuar con muchas otras a través de regiones conservadas. Así mismo, la existencia de proteínas adaptadoras, como Grb2, permite entender como una variedad de tirosin cinasas (receptores y no) y posiblemente otros activadores, tales como receptores acoplados a proteínas G, puedan converger todos al mismo camino de transducción por ras (McCormick, 1993; Marx, 1993; Moodie & Wolfman, 1994).

La función de las proteínas ras es conservada en diferentes niveles de evolución. En una gran variedad de células eucariotas las proteínas ras regulan diferenciación, proliferación y respuestas inmunológicas. En todos estos sistemas las proteínas ras son reguladas por los homólogos de las proteínas GAP/NF1 y de las mSOS de mamíferos. La conservación evolutiva de la regulación arriba de ras sugiere que la señalización hacia abajo de ras-GTP también podría estar conservada.

El flujo de la información posterior a la proteína ras ha sido muy estudiado en los últimos años. Ahora se tiene un esquema que involucra la activación de algún miembro de la familia de proteínas Raf, (serin/treonin cinasas). Este al ser activado enciende a su vez una cascada de cinasas de la familia MAP (proteínas activadas por mitógenos): MEKK y MAPK, cuya señal puede ser translocada al núcleo y regular la actividad de factores de transcripción a través de ciclinas, cinasas dependientes de ciclinas, etc. (Ver Fig 2)

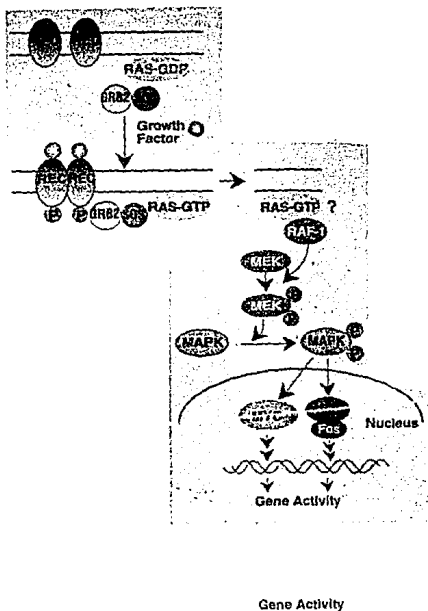


FIGURA 2. CASCADA DE TRANSMISION DE SEÑALES A TRAVES DE RAS.

Las señales de crecimiento son transmitidas inicialmente por la interacción directa del receptor y las proteínas Grb2 y sos. Posteriormente la proteína ras es activada, conduciendo ahora las señales a través de una cascada de fosforilaciones. Los blancos finales de esta señalización son factores de transcripción específicos, cuya actividad es modulada por la fosforilación, trayendo como consecuencia cambios en la expresión genética.

Parece ser que la mayoría de los eventos de señalización de ras fluyen a través de algún miembro específico de las tres proteínas ras, de las tres proteínas Raf y de las diferentes isoformas de los miembros de la familia de las cinasas MAP, con las combinaciones que puedan existir. Más aún, parece ser que existen vías alternas que son independientes de Raf o que utilizan otras proteínas en lugar de Grb2 y mSos para activar a ras. Una posible explicación de que haya múltiples sistemas de señalización dependientes de ras podría ser que en diferentes estadios del ciclo celular fueran requeridas diferentes señales generadas por sistemas efectores específicos (Marx, 1993; Moodie & Wolfman, 1994).

Dada la importancia de los eventos que son regulados por los miembros de la familia ras, es fácil entender que alteraciones en estos genes tienen un papel importante en la carcinogénesis humana. La alta frecuencia de mutaciones en estos genes, presentes en una gran proporción de tumores humanos, confirma esta hipótesis. Las alteraciones más frecuentemente observadas en estos genes son las mutaciones puntuales localizadas principalmente en los codones específicos 12, 13 y 61 (Bos, 1988). Los aminoácidos de estas posiciones se encuentran localizados en la región de interacción de los nucleótidos de guanina (para revisión ver Marshall, 1988). Casi cualquier aminoácido, excepto la prolina, que sea sustituido por la glicina 12 ó 13 transforma en oncogénica a la proteína. Varias sustituciones de la glutamina 61 activan a la proteína, de las cuales los cambios a arginina, histidina o leucina parecen ser los más prevalentes. El efecto de estas mutaciones es una disminución en su actividad catalítica intrínseca de GTPasa, aunque por distintos mecanismos (McGrath et al, 1984), manteniendo a la proteína en su estado unido a GTP. Algunas mutaciones en la glicina 12 interfieren con la configuración activa, por ejemplo, tomando el lugar del H₂O necesaria para la hidrólisis del GTP (Krengel et al, 1990).

A pesar de que la mayoría de las proteínas mutadas se unen con una mayor afinidad a la proteína GAP no son, sin embargo, convertidas en su forma unida a GDP. Esta insensibilidad a la estimulación de la hidrólisis de GTP, es probablemente otra de las causas de que permanezcan activas en forma permanente (Trahey M & McCormick F 1987) Ver figura 3.

Rap1A, también conocido como K-rev1, es miembro de una subfamilia de las proteínas ras verdaderas, con un 53% de identidad con ellas. K-rev1 se localiza en el cromosoma 1p13.3, y probablemente este sea el gen responsable de la actividad supresora asociada al cromosoma 1 humano. K-rev fue descubierto como un gen cuyo producto inducía la reversión de la tumorigenicidad a células NIH3T3 transformadas con v-Ki-ras. Tres observaciones adicionales del antagonismo de k-rev a la acción de ras son: la maduración de ovocitos de Xenopus sp inducida por ras es inhibida por la co-microinyección de rap 1B; la sobreexpresión de genes endógenos inducida por la transfección de ras activado a células NIH3T3 es inhibida por la sobreexpresión de K-rev1; la mutación activante del gen RAS2 o la introducción del gen Ha-ras a células de Saccharomyces sp les confiere respuesta de estrés térmico, que es disminuida por la entrada de K-rev1. Sin embargo, la sobreexpresión de la proteína rap 1B en células swiss 3T3, al igual que k-ras activado, provoca la inducción de la síntesis de DNA, lo que sugiere que hay vías entrecruzadas. La alta conservación de varios residuos de aminoácidos entre los miembros de la familia ras y rap sugiere funciones comunes para estas proteínas. Esto llama mucho la atención ya que como hemos mencionado, ambas tienen funciones opuestas. Al parecer la región de Ha-ras involucrada en la actividad de hidrólisis del GTP (residuos del 59 al 65) es la misma región involucrada en la actividad biológica de K-rev. El dominio de más alta homología entre K-rev y ras se encuentra entre los residuos 32-40, conocido como dominio efector.

RAS MUTADO

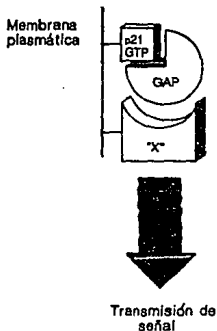


FIG. 3. Las proteínas RAS mutadas transmiten de manera continua las señales

Las mutaciones en las proteínas RAS producen la pérdida de su capacidad de hidrolizar al GTP, además de volverse insensibles a la acción de GAP. Estos eventos impiden que RAS regrese a su estado inactivo por lo que se considera que permanece transmitiendo continuamente las señales.

Mutaciones en estos sitios para ambos grupos de proteínas acarrearán pérdida de su actividad. Este dominio es necesario para la interacción de GAP con ras y con K-rev. Sin embargo, GAP no es capaz de estimular la actividad intrínseca de GTPasa de K-rev. Por esto se considera que K-rev sirve como un inhibidor competitivo de la interacción entre ras-GTP y GAP y/o de otros efectores de ras, actuando como un regulador negativo de la transmisión de señales de ras.

Disminuciones en los niveles de K-rev fueron detectadas en varios tipos de sarcomas, coincidiendo con la hipótesis de que si K-rev estuviera involucrado en la regulación de la señalización mediada por ras, la inactivación de K-rev podría contribuir a la carcinogénesis. Se tienen varios sistemas experimentales de como la sobreexpresión de K-rev en varias líneas celulares derivadas de diversos tumores suprime su crecimiento y/o tumorigenicidad (para revisión ver Noda, 1993).

La región carboxilo hipervariable de las proteínas ras especifica a cada miembro de las familias y probablemente juega un papel importante en determinar sus especificidades funcionales. Lo que hasta ahora se sabe de esta región es que en ella se lleva a cabo la modificación postranscripcional, la localización subcelular y la interacción con otras proteínas regulatorias. Estos fenómenos son importantes para la actividad supresora. Parece ser que la modificación de isoprenilación en el extremo carboxilo terminal, contribuye a determinar su localización subcelular; mientras que la naturaleza de sus interacciones con otros componentes subcelulares contribuye a la determinación de su especificidad funcional.

I.2. p53: UN EJEMPLO DE GEN SUPRESOR.

p53 es el gen supresor más estudiado. Su producto fue identificado en 1979, como una proteína asociada al antígeno T en células de roedores transformadas por el virus SV40 (Lane & Crawford, 1979; Kinzer & Levine, 1979). Se describió inicialmente como una proteína oncogénica ya que podía immortalizar cultivos primarios (Jenkins et al, 1984), y cooperar con el oncogen ras para transformar fibroblastos primarios de embrión de rata (Eliyahu et al, 1984; Parada et al, 1984). Posteriormente se comprobó que estas funciones eran propias de la forma mutante de la proteína y que la proteína normal actuaba bloqueando la transformación celular mediada por oncogenes (Finlay, 1989; Baker et al, 1990). Otros datos que mostraron el papel de la proteína normal fueron: que la sobreexpresión de p53 provocaba un arresto del crecimiento (citado en Michalovitz et al, 1991) y disminuía la tumorigenicidad de líneas celulares humanas (Chen et al, 1990), y que también inducía la diferenciación celular. El resultado final observado dependía del tipo celular y de los niveles de p53 (para revisión ver Donehower & Bradley, 1993).

El gen p53 parece estar restringido a las especies de vertebrados. La organización génica de p53 (al menos en las especies en las que se ha secuenciado: humano, ratón y *X. laevis*) consiste de 11 exones interrumpidos por 10 intrones. La región promotora no contiene secuencias consenso como las presentes en la mayoría de los promotores eucariotes, tales como las cajas CAAT, TATA, y secuencias ricas en G/C (Soussi et al, 1990).

Las funciones de la proteína p53 que se conocen hasta la fecha son las de regular la replicación del DNA, de ser un factor de transcripción y de inducir diferenciación. También es un componente integral del control del ciclo celular

(cuando hay daño al DNA o bajo ciertas señales externas como privación de nutrientes), y de la vía hacia la muerte celular programada (apoptosis). A continuación hablaré más en detalle de estas funciones.

La proteína p53 es un factor de transcripción que tiene la capacidad de activar o suprimir la transcripción de genes específicos. Estas actividades son llevadas a cabo por mecanismos diferentes. p53 suprime a una gran variedad de genes que carecen de sitios específicos de unión a p53 como: c-fos, c-jun, retinoblastoma, interleucina 6, PCNA y p53 mismo. La supresión es aparentemente dependiente de la unión de p53 a la proteína TBP (TATA -binding protein) o a otros factores de transcripción. Esto reduce la eficiencia de iniciación transcripcional por interferir con algún aspecto de ésta o por bloquear a otros factores. El mecanismo de supresión no es generalizado, ya que la expresión de muchos otros genes que carecen también de sitios específicos de unión para p53 no es modificada. Ejemplos de esto son el promotor del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) y Ha-ras1. Las proteínas p53 mutadas no se unen a TBP ni efectúan esta inhibición de la expresión (Seto et al, 1992).

La activación de genes por p53 es llevada a cabo a través de su unión a una secuencia específica en el DNA, en la región promotora de ciertos genes como el de la creatin cinasa muscular, GADD45, MDM2 y WAF1/Cip1.

El producto de p53 participa en la respuesta al daño celular. Las células de mamíferos que han sufrido daño al DNA inician una rápida inhibición del curso del ciclo celular, tanto en la fase G1 como en la G2. Varios experimentos han demostrado que p53 está involucrado en la interrupción al ciclo en la fase G1, como respuesta a daños al DNA causados por la exposición a agentes como las radiaciones gamma, las UV, la actinomicina D, etc. Estos agentes producen un incremento en los niveles de la proteína p53 y de su actividad de unión al DNA.

que coincide con la inhibición del ciclo en G1 y la consiguiente inhibición de la síntesis de DNA. Estos fenómenos no son observados cuando las células tienen p53 mutado, ni cuando los tratamientos son con agentes que no dañan al DNA, como el arabinósido de citosina (que es un antimetabolito). La interrupción del ciclo celular le da tiempo a la célula para reparar el daño antes de iniciar la replicación del DNA. Por consiguiente las células con p53 inactivo (que han perdido el punto de control en G1), al no detener su ciclo celular, replican su DNA dañado y permiten de esta forma la transmisión de los daños que se incorporan al genoma y que resultan en un incremento de eventos potenciales para la transformación celular. La capacidad de p53 para sensar los daños al DNA y prevenir su transmisión son la base por la cual ha sido denominado "el guardián del genoma" (Kastan et al, 1991; Lane, 1992).

El incremento en los niveles de p53 en respuesta al daño parece ser un efecto postranscripcional por incremento en su vida media, aunque no se descarta que se requiera síntesis de novo de p53 o que se requiera la síntesis de otro producto involucrado en la inducción o estabilización de p53 através de fosforilaciones, unión a otras proteínas u oligomerización de p53 (Kastan et al, 1991; Price & Calderwood, 1993; Fritsche et al, 1993).

La inhibición del ciclo celular en la fase G1 inducida por p53, puede resultar de la activación de genes que detengan el crecimiento y/o de la represión de genes promotores del ciclo celular. Los blancos potenciales para el primer caso incluyen los genes GADD45, WAF-1/CIP-1, y MDM2.

El gen Cip1/WAF1, localizado en el cromosoma 6p21.2, codifica para una proteína de 21 kd. Esta proteína participa como mediador de la interrupción al ciclo celular inducida por p53 como respuesta al daño en el genoma.

La transcripción de Cip1/WAF1 es inducida, posterior al daño celular, por el producto de p53 normal, al unirse a una secuencia específica en la región promotora de Cip1.

La proteína Cip1 forma complejos con las ciclinas y las CDKs (quinasas dependientes de ciclinas), fundamentales para el progreso y regulación del ciclo celular. Cip1 se une e inhibe la actividad de las CDKs. Esto evita la fosforilación de sustratos críticos para el ciclo celular, con el consiguiente bloqueo de éste. Las células con p53 inactivo carecen de esta vía, y presentan por tanto un crecimiento desregulado (El-Deiry et al, 1993). La pérdida de función de Cip1, por mutación o por expresión alterada, podría contribuir a la proliferación celular en presencia de señales de crecimiento negativas (Xiong et al, 1993; Harper et al, 1993).

El gen MDM2 codifica para una fosfoproteína nuclear de 54 KDa que es sobreexpresada en un 30-40% de los sarcomas. Su producto forma complejos con la forma normal y mutada de la proteína p53, inhibiendo así su función como factor de transcripción, y su unión específica al DNA. La proteína MDM2, por lo tanto, se comporta como un modulador negativo de la actividad transcripcional de p53. Al igual que para Cip1, el producto de p53 produce la activación transcripcional de MDM2, posterior al daño celular, a través de un sitio de reconocimiento específico en la región promotora. Esto sugiere que el incremento de los niveles de MDM2, seguido del daño al DNA, puede ser parte de un sistema regulatorio negativo designado para terminar la respuesta de inhibición del curso del ciclo celular mediada por p53 (Price & Park, 1994).

En las células normales de los pacientes con la enfermedad autosómica conocida como **ataxia telangiectasia** no se observa aumento en los niveles de p53 normal como respuesta a la irradiación, así como tampoco hay un aumento en los niveles de MDM2 o GADD45. Esto refleja una falta de respuesta al daño celular

en estos pacientes que puede ser una de las explicaciones de su elevada sensibilidad al desarrollo de cáncer en edades tempranas (Kastan et al, 1992).

La inhibición del curso del ciclo celular en G1, inducida por p53, se ve también asociada con una disminución en los niveles de los transcritos de la histona H3 asociada a la fase S, de PCNA (componente de la maquinaria de replicación), B-myb, y la DNA pol alfa. Pero no se sabe si es un efecto directo represivo de p53 o un efecto indirecto debido al bloqueo del ciclo celular. Esta implicación de p53 en la expresión de componentes de la replicación, así como la interacción directa con sus proteínas, sugieren su participación en la duplicación del DNA (para revisión ver Donehower & Bradley, 1993).

Actualmente se ha descrito la participación de p53 en una de las vías hacia la apoptosis, que es inducida por radiación o por tratamiento con agentes quimioterapéuticos o agentes que dañan al DNA, entre otros.

La apoptosis, inicialmente definida alrededor de 1970, se describe como una muerte celular fisiológica. Es activada por un programa determinado genéticamente, con la participación de los productos de varios genes celulares. Este fenómeno es parte central en el desarrollo normal de un individuo, ya que participa en procesos tales como la organogénesis y la homeostasis tisular. Sin embargo, así como es inducida por procesos para el control del desarrollo, así también puede ser inducida por daños a las células, en particular al DNA.

Se sugiere que la muerte celular inducida por p53 no representa un evento secundario o una secuela de la inhibición del crecimiento también inducida por p53, sino que es una activación directa de esta vía. Esto significa que p53 puede interactuar con blancos específicos en G1, que en ciertas circunstancias generan un bloqueo en la progresión del ciclo celular, y en otras activan el programa suicida (cuando el daño al genoma es muy grande para poder ser reparado) por la

activación de genes requeridos para la inducción de la apoptosis, o por la represión de genes (como bcl-2) cuyos productos suprimen el proceso apoptótico (Yonish-Rouach et al, 1993).

Lowe y otros investigadores estudiaron el papel de p53 "in vivo" en un sistema clásico: la inducción de la apoptosis en los timocitos. Las células T inmaduras son de vida media muy corta y altamente susceptibles a la apoptosis. Este fenómeno es estimulado por las radiaciones ionizantes y tratamientos con agentes que dañan al DNA, entre otros. Los investigadores mostraron que p53 es necesario para la apoptosis inducida por la radiación, y no para todas las formas de apoptosis (Lowe et al, 1993).

Merritt, et al. han reportado recientemente que p53 está también involucrado en la respuesta al daño por radiación en células epiteliales de intestino. Ellos mostraron que en las células de colon, la radiación no induce una elevación muy considerable en los niveles de p53, lo que coincide con una tasa de apoptosis baja o nula. Este fenómeno explica en parte la mayor susceptibilidad de esta región del intestino para el desarrollo de cáncer que con respecto al intestino delgado, donde la apoptosis mediada por el incremento en los niveles de p53 es más importante (Merritt et al, 1994).

Por lo tanto vemos que la ausencia de p53 en las células las hace incapaces de encender el programa de muerte en respuesta a señales ambientales. Estos pueden ser agentes que causen daño celular como: la privación de mitógenos, la alta densidad celular, la limitación de precursores para la síntesis de DNA o un cambio en el microambiente celular. Por ejemplo, p53 es necesario para la respuesta de interrupción al ciclo celular inducido por condiciones de crecimiento subóptimas para mantener la integridad cromosómica. Esto se demostró en experimentos utilizando PALA (que reduce los niveles intracelulares de UTP, CTP,

dCTP, dGTP, y TTP) o en condiciones de carencia de factores de crecimiento parácrinos provenientes de las células vecinas en cultivos celulares (para revisión ver Donehower & Bradley, 1993).

De esta forma, la inactivación de p53 favorece la tumorigenesis por permitir la acumulación de mutaciones oncogénicas (debido a la pérdida del punto de control en G1), y por fallar en la eliminación de células que han sido dañadas importantemente en su DNA. Así, permite la selección de células con ventajas para la transformación neoplásica (Lane, 1993).

La ausencia de p53 además lleva a un incremento dramático en la resistencia celular a agentes quimioterapéuticos. Esta puede ser la explicación molecular de al menos algunas de las resistencias tumorales a los tratamientos contra el cáncer (Lowe* et al, 1993).

Parece también ser que el estado de p53 es un buen indicador pronóstico. Formas alteradas de la proteína correlacionan con una mayor agresividad de los tumores, metástasis y una sobrevida de menos de 5 años.

La inactivación de p53 parece también estar asociada con la inestabilidad genómica que puede generar alteraciones genéticas múltiples conducentes al desarrollo de cáncer.

Sin embargo, p53 no sólo participa en la regulación negativa del crecimiento, sino también promueve el crecimiento celular en ciertos contextos, como la estimulación por suero. Esto es congruente con el hallazgo de niveles elevados de p53 en células no diferenciadas o con altos índices de proliferación (para revisión ver Mercer, 1992).

En base a las diferentes funciones ejercidas por p53, Donehower (1993) propuso un modelo en el que p53 estaría oscilando en tres estados; uno inactivo, caracterizado por multímeros grandes de p53 sin modificaciones en la región

carboxilo terminal; y dos activos: uno de supresor que mediaría la inhibición del curso del ciclo celular en G1, y otro de promotor que estimularía el crecimiento. De acuerdo a este modelo, las células ciclarían en forma normal cuando p53 está en el estado inactivo. En respuesta a un estrés por daño al DNA, las cinasas activarían el estado de supresor de p53 al fosforilarlo, induciendo así la inhibición en el ciclo celular en G1. Cuando el estrés hubiera sido removido o el daño reparado, las fosfatasas removerían el fosfato C-terminal y junto con otros componentes, activarían el estado promotor de crecimiento de p53, característico de las proteínas mutantes oncogénicas.

Los análisis de la estructura secundaria potencial y de la distribución de carga revelan que la proteína de p53 puede ser dividida en tres regiones (ver Fig 4): la **amino terminal**, acídica, que contiene la región activadora de la transcripción; la **región central**, hidrofóbica, que contiene dominios altamente conservados en la evolución (del II al V) y que están involucrados en la conformación de la proteína; y la **región carboxilo terminal**, hidrofílica, básica con una alta densidad de carga, que contiene las secuencias de oligomerización y localización nuclear (Soussi et al, 1990; para revisión ver Prives & Manfredi, 1993).

El gen p53 está altamente mutado (Nigro et al, 1989; Hollstein et al, 1991). Se estima que de los 6.5 millones de personas diagnosticadas con cáncer cada año en el mundo, cerca del 50% tienen mutaciones en p53 (Harris, 1993).

Aproximadamente el 90% de las mutaciones en p53 encontradas en los tumores humanos se localizan en la región central de la proteína (ver Fig 4). Las alteraciones en esta zona modifican su conformación e incrementan la estabilidad de la proteína, lo que hace comprensible el que la función de p53 como factor de transcripción, su unión secuencia específica, y la interacción con proteínas celulares

y virales, se vean afectadas. (Soussi et al, 1990, Harris, 1993). La unión al DNA de p53 parece ser regulada por su capacidad de adoptar distintas conformaciones. De esta forma, las mutaciones podrían tener cualquiera de los siguientes efectos: alterar su estructura terciaria modificando totalmente su función, o bien, estabilizar a la proteína en uno solo de los dos estados conformacionales que fisiológicamente podría adoptar, sin permitir los cambios de conformación y por tanto anulando su actividad (Halazonetis et al, 1993).

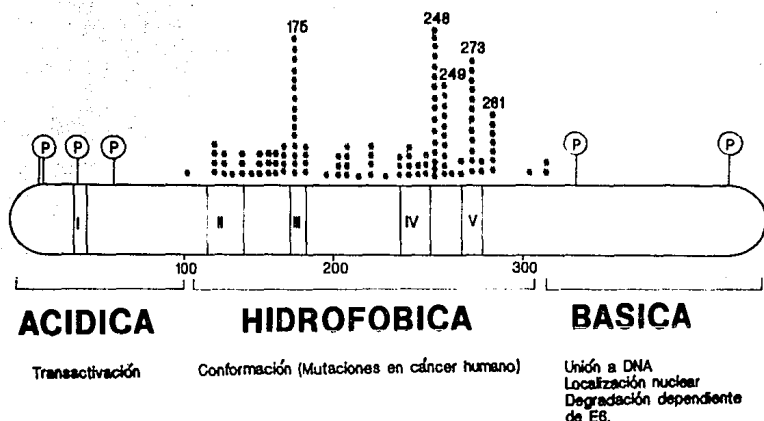


FIGURA 4. REPRESENTACION DE LA PROTEINA p53 Y DE LOS SITIOS DE MAYOR FRECUENCIA DE MUTACIONES.

Se muestra un esquema de la proteína p53 indicando algunas características de los dominios funcionales, así como los sitios de fosforilación. Se encuentran marcados con números romanos las regiones conservadas a través de la evolución. Los asteriscos representan los sitios donde las mutaciones detectadas en los tumores humanos se encuentran con mayor frecuencia y cuales son los codones de más alta incidencia.

En los tumores humanos se encuentra con frecuencia mutaciones en uno de los alelos de p53, mientras que el otro es eliminado o rearrreglado. Sin embargo, existe una mayor tendencia a la coexpresión del alelo mutado junto con el normal. Esto se explica por la característica de dominancia negativa de la proteína mutante que puede bloquear la función de la proteína normal.

Se reporta que más del 90% de las alteraciones que afectan a p53 son mutaciones que cambian el aminoácido en vez de crear codones de término. El hecho de que exista una presión selectiva en los cánceres humanos a la expresión de proteínas mutantes más que a la ausencia de expresión por mutaciones inactivantes (como en el caso de Rb y el de APC), lleva a postular la hipótesis de que las mutaciones contribuyen a la ganancia de alguna función que potencie la desregulación del crecimiento, y no sólo sean una mera inactivación de la actividad normal (para revisión ver Prives & Manfredi, 1993).

Junto con los mecanismos de inactivación de p53 de los que hemos hablado (mutación, eliminación o rearrreglo), la proteína también puede ser inactivada por el producto del gen mdm2 (que regula negativamente su actividad), por la incapacidad para ser transportada al núcleo y por la degradación inducida por la oncoproteína viral E6 de los papilomavirus humanos de alto riesgo.

La inactivación de p53 por cualquiera de los mecanismos anteriores produce la pérdida celular del mecanismo que evita la división cuando ha habido daños en el DNA. Esto vuelve a las células menos estables genéticamente y permite la acumulación de alteraciones y rearrreglos cromosómicos en una elevada tasa, lo cual lleva a la selección de clones malignas. Estos fenómenos explican fácilmente el porqué los ratones que carecen de p53 desarrollan tumores a temprana edad y con una alta frecuencia (Donehower et al, 1992). También explica la inestabilidad genética de las células no cancerosas de los pacientes con síndrome de Li-Fraumeni (Lane, 1992). Esta es una enfermedad genética autosómica dominante, con desarrollo de diversas neoplasias mesenquimales y epiteliales en múltiples sitios. La enfermedad se caracteriza por una alta predisposición al desarrollo de cáncer que puede ser resultado de las mutaciones heterocigotas heredadas en p53, que representan alteraciones genéticas tempranas (Srivastava et al, 1990).

I.3. PAPILOMAVIRUS: UN FACTOR MAS EN EL DESARROLLO DE ALGUNOS CANCERES HUMANOS

Pese a las importantes funciones que se han revisado de los genes ras y p53, en el desarrollo del cáncer no sólo participan alteraciones a genes celulares, sino que también hay una contribución viral como es el caso de la infección con los papilomavirus humanos.

Estudios *in vitro* han demostrado que el DNA de los papilomavirus humanos (HPV) coopera con los oncogenes ras para transformar algunos tipos celulares en cultivos primarios (Matlashewski et al, 1987).

Los papilomavirus son virus pequeños de DNA que pertenecen a la familia papovaviridae. Son epiteliotrópicos e infectan a una gran variedad de especies de mamíferos, incluyendo al hombre (para revisión ver Schlegel, 1990). Su genoma, de aproximadamente 8 kb, contiene una región control y una codificadora. Esta última contiene la información para proteínas estructurales de cápside y para proteínas involucradas en la replicación, la regulación de la transcripción viral y la inmortalización celular.

Los HPV son clasificados en dos grupos: los que infectan los epitelios secos (piel) y los que infectan las mucosas (orales y genitales). Estos últimos pueden ser nuevamente divididos en los de bajo riesgo de conversión maligna y los de alto riesgo (para revisión ver Schlegel, 1990). La clasificación está basada en el potencial que tenga el DNA de los HPV de inducir inmortalización, aneuploidias y reducción de requerimientos a factores de crecimiento en cultivos celulares primarios, (Schlegel et al, 1988; Pecoraro et al, 1989; Storey et al, 1988), entre otras características.

Actualmente los HPV han sido reconocidos como agentes implicados en la génesis de diversos cánceres en humanos, particularmente los del cérvix, la región anogenital, algunos de la piel, las vías respiratorias altas y el tracto digestivo (para revisiones ver Arends et al, 1990; zur Hausen, 1991). Sin embargo, sólo en el cáncer de cérvix existe una sólida relación entre su desarrollo y la presencia de ciertos tipos de HPVs.

En general, los HPV tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52 y 56 se encuentran en casos de displasia severa y moderada de cérvix y en carcinomas invasivos, por lo que constituyen los tipos de alto riesgo (para revisión ver Vousden, 1989). Específicamente los HPV 16 y 18 se encuentran en una frecuencia muy alta en estos tumores (más del 90%) y en las líneas celulares derivadas de ellos (Reid et al, 1984; Kurman et al, 1983).

Los genes virales implicados en la inmortalización y transformación celular son **E6 y E7**, y por ésto es que son clasificados como **oncogenes** (Münger et al, 1989). En las células tumorales el DNA viral se encuentra integrado al genoma de forma tal que E6 y E7 se expresan activamente, debido con frecuencia, a la pérdida de genes virales reguladores de su expresión tales como E2 y E1 (Dürst et al 1985; Lehn et al, 1985; Choo et al, 1987; Schwarz et al, 1985). Las proteínas expresadas por los genes E6 y E7 de los HPV de alto riesgo interactúan con los productos de dos genes celulares supresores de tumores; **E6 se une a la proteína p53** y promueve su degradación, mientras que **E7 se une a la proteína de retinoblastoma (Rb)** y forma un complejo inactivo con ella (Werness et al, 1990; Dyson et al, 1989; Gage et al, 1990; Scheffner et al, 1990; Münger* et al, 1989; Schlegel, 1990; Münger et al, 1992). Con esto se argumenta que la interacción específica de las oncoproteínas virales con proteínas reguladoras críticas de la célula tiene efectos clave en el desarrollo de ciertos tipos de cáncer.

Existen dos líneas de evidencia para el papel de **p53** en el desarrollo del **carcinoma cervical**. La primera, basada en el análisis de los especímenes de cáncer cervical que muestran frecuentes anomalías (Atkin & Baker, 1988) en el brazo corto del cromosoma 17 (donde se encuentra localizado p53). La segunda, basada en que la proteína E6 transformante de los papilomavirus oncogénicos se une y promueve la degradación de p53 (Scheffner et al, 1990; Werness et al, 1990), eliminando su función (Mietz et al, 1992). De esta forma, la inactivación de p53 en el cáncer del cérvix puede ocurrir, ya sea por mutaciones en el gen de p53 o por unión de la proteína con E6 y consecuente degradación.

Sin embargo, cuando se analizan los datos de varios estudios con tumores de cáncer cervical, se observa que la proporción total de mutaciones de p53 en carcinomas positivos para HPV es de 3% únicamente; mientras que es del 15% para los tumores HPV negativos. Esta proporción es mucho más baja que la hipotetizada por Crook T, et al (1992), donde se sugería que todos los cánceres HPV negativos eran provocados por la disfunción de p53 debido a mutaciones. De este estudio se sugiere que otros factores y mecanismos debieran estar implicados en la génesis del cáncer cervical (Park et al, 1994).

II. PUNTOS DE PARTIDA DEL TRABAJO.

Resumiendo la información citada, tenemos algunos puntos importantes a resaltar para este trabajo:

1) Los productos de los genes ras son claves en la transducción de señales y por lo tanto, en el control del crecimiento, proliferación y diferenciación celular. Las alteraciones en estos genes son eventos importantes para el desarrollo del cáncer humano. Estos se encuentran alterados con muy alta incidencia en diferentes tipos de tumores.

2) La proteína p53 juega papeles cruciales en la vigilancia y control del daño al genoma al inhibir el curso del ciclo celular hasta la reparación de los daños para evitar su transmisión. Además induce la muerte celular cuando los daños son muy extensos o en condiciones de privación de nutrientes. Debido a estas importantes funciones, se puede entender que la inactivación de p53 es un evento fundamental en el proceso de carcinogénesis, porque implica la pérdida de un punto de control celular clave. p53 es el gen más frecuentemente alterado en todos los tipos de tumores humanos.

3) Los papilomavirus humanos son también un factor relevante para el desarrollo de ciertos cánceres. Participa, fundamentalmente, inactivando el producto de dos genes celulares supresores con funciones esenciales para la célula, entre los que se encuentra p53. Por esto, la presencia de los HPV constituye, entre otras cosas, uno de los mecanismos de inactivación de p53.

4) Los oncogenes ras cooperan, al igual que p53, con HPV para transformar células en cultivo. Esto podría reflejar la posible interrelación de estos factores en la génesis de ciertos tipos de tumores.

HIPOTESIS

La frecuencia de alteraciones en los genes ras y p53 se espera sea elevada en líneas celulares, así como sucede en los tumores de las que se derivan.

Se espera que el gen p53 este alterado en las células sin secuencias de HPV, ya que su producto no es inactivado por la degradación inducida por la proteína E6 de los HPVs de alto riesgo.

III. OBJETIVOS

-GENERALES

Establecer la frecuencia con que se presentan alteraciones en los genes ras y p53 en algunas de las líneas celulares derivadas de diversos tumores humanos más utilizadas.

Establecer si existe alguna relación entre las mutaciones en estos genes y la presencia de HPV.

-PARTICULARES

Estandarizar la metodología de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla de ácidos nucleicos (SSCP), para la detección de alteraciones puntuales (mutaciones) en genes humanos.

Caracterizar molecularmente el estado de los genes ras y p53 en algunas de las líneas celulares más utilizadas en los estudios de cáncer.

IV. MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron 14 líneas celulares, de las cuales, 6 son de origen cervical. Se enlistan a continuación en la tabla I junto con algunas de sus características.

Las células utilizadas en este estudio fueron cultivadas básicamente en tres tipos de medios: Medio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM), medio RPMI, y medio McCoy, suplementados con suero fetal (SF) o suero neonato (SN).

Las condiciones particulares para cada línea celular son:

Hela (DMEM, 10% SN), MS751 (DMEM, 10% SF), SiHa (DMEM, 10% SF), CaSki (DMEM, 10% SF), MRH-I-186 (RPMI, 10% SF), C33-A (DMEM, 10% SF), SW13 (DMEM, 10% SF), A-204 (McCoy, 10% SF), Sk-MEL-2 (DMEM, 10% SF), HepG2 (DMEM, 10% SF), SW480 (RPMI, 10% SF). Para cada una se crecieron hasta confluencia aproximadamente 10 cajas de 100 mm².

TABLA I. CARACTERISTICAS DE LAS LINEAS CELULARES UTILIZADAS

	ORIGEN	TIPO	No. DE CATALOGO EN EL ATCC
MS751	CERVIX	CARCINOMA EPIDERMOIDE	HTB34
SiHa	CERVIX	CARCINOMA ESCAMOSO	HTB35
HeLa	CERVIX	ADENOCARCINOMA	CCL2
CaSki	CERVIX	CARCINOMA EPIDERMOIDE	CRL1550
MRH-I-186	CERVIX	CARCINOMA	
C-33A	CERVIX	CARCINOMA INDIFERENCIADO	HTB31
SW13	CORTEZA ADRENAL	ADENOCARCINOMA	CCL105
A-204	MUSCULO LISO	SARCOMA	HTB82
Sk-mel-28	PIEL	MELANOMA	HTB72
HepG2	HIGADO	ADENOCARCINOMA	HB8065
SW480	COLON	ADENOCARCINOMA	CCL228
BL113	NODULOS LINFOIDES	BURKITT	
DAUDI	NODULOS LINFOIDES	BURKITT	CCL213
MC116	NODULOS LINFOIDES	INDIFERENCIADO	CRL1650

EXTRACCION DNA

La metodología empleada es una modificación de la técnica descrita por Bowtell en 1987.

Las cajas de cultivo se colocan en una charola con hielo. El medio de cultivo se retira por decantación, y la monocapa celular se enjuaga con TD pH 7.5 (NaCl 137.9 mM, KCl 5.1 mM, Na₂HPO₄ 0.7 mM, Tris base 24.8 mM) a temperatura ambiente para eliminar el medio de cultivo residual. Se adiciona 2 ml de TD frío y las células se raspan con una espátula. La suspensión celular se recupera con una pipeta y se coloca en tubos falcón previamente enfriados. Se centrifuga por 2 minutos a 2500 rpm para empastillar las células desechando el sobrenadante. Posteriormente se adiciona de 2 a 5 ml de PBS (NaCl, 137 mM; KCl, 3 mM; Na₂HPO₄, 8 mM; KH₂PO₄, 2 mM) a temperatura ambiente, dependiendo de la cantidad de pastilla celular. Se resuspende perfectamente y se cuentan las células en una cámara de Neubauer. Posteriormente, se vuelve a centrifugar por 2 minutos a 2500 rpm para empastillar las células y se decanta nuevamente el sobrenadante.

Se agrega 1.5 ml de hidrocloreuro de guanidina 6M por cada 10⁷ células, y se ajusta la concentración final de acetato de sodio 3M, pH 5.5 para que sea 0.1 M, y el volumen de buffer EN (10 mM EDTA y 10 mM NaCl) sea una décima parte del volumen final (es decir el total del volumen de guanidina y de acetato de sodio). Se incuba con rotación durante 1 hr a temperatura ambiente y se adiciona proteinasa K (10mg/ml) y sarkosyl (10%) de forma tal que la concentración final sea de 100 ug/ml y de 1%, respectivamente. Se incuba toda la noche con agitación a 37°C. El DNA se precipita con la adición de 2.5 ml de etanol absoluto (-20°C). Se mezcla suavemente para formar la malla de DNA, la que se recupera con la ayuda de una varilla de vidrio. Se deja secar un poco y se le hacen lavados exhaustivos con etanol al 70% frío para finalmente resuspender en TE 1X pH 7.5

(Tris-HCl ultrapuro 10 mM, pH 7.5; EDTA 1mM). Posteriormente el DNA se extrae con fenol, fenol:cloroformo-isoamílico y cloroformo:isoamílico y se reprecipita con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M y 2.5 vol. de etanol absoluto frío. Con la extracción se observa una mayor eficiencia en las amplificaciones con PCR.

DETECCION DE HPV EN LOS TUMORES

La detección de HPV en los tumores humanos se llevó a cabo con la técnica de PCR y el uso de los oligonucleótidos universales, GP5 y GP6, descritos por Van den Brule (1990). Estos reconocen un fragmento de la región L1 de todos los papilomavirus humanos. GP5, TTTGTTACTGTGGTAGATAC; GP6, GAAAAATAAACTGTAAATCA.

Los productos obtenidos de la PCR se analizan en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. Estos tienen un tamaño entre 139 a 154 pb dependiendo del tipo de HPV de que traté.

DETECCION DE MUTACIONES EN p53 Y RAS POR SSCP-PCR.

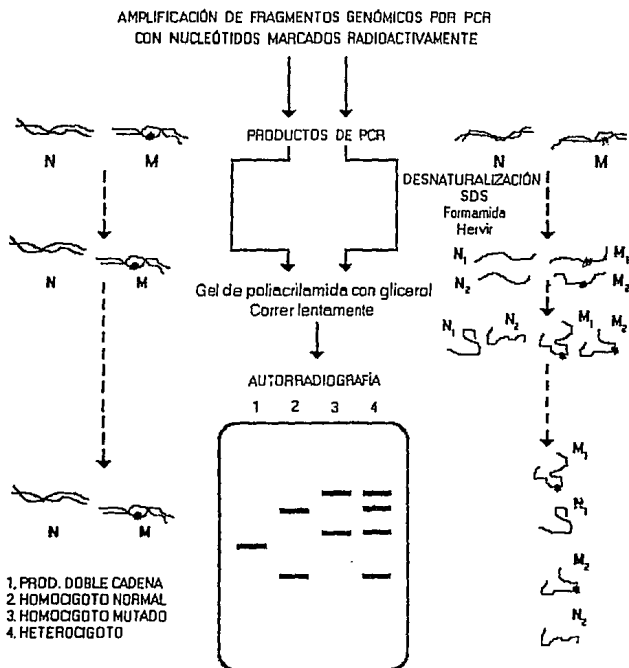
El análisis de las mutaciones puntuales se llevó a cabo con la técnica de SSCP-PCR, descrita por Orita, et al (1989) y modificada por Gaidano, et al (1991).

La técnica de SSCP permite la detección de cambios en la secuencia de DNA como son las mutaciones puntuales, las eliminaciones y adiciones. La detección tiene su fundamento en que las variaciones en la secuencia nucleotídica cambian la conformación de las moléculas de cadena sencilla de DNA. Esto produce distintas

movilidades de las moléculas al ser migradas en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes. La conformación adquirida por las cadenas sencillas de DNA es dependiente de las interacciones intracadena establecidas, y por consiguiente es el resultado de la secuencia nucleotídica. De esta forma, cambios en la secuencia de nucleótidos resultan en la modificación de la conformación de la molécula, lo que produce migraciones diferentes.

Para esta metodología se amplifican por PCR regiones discretas (100 a 300 pb) de los genes a analizar, usando oligonucleótidos específicos (ver Fig 5). Se usan 2 uCi de dCTP marcado con ^{32}P , para cada reacción. Las concentraciones de DNA, oligonucleótidos y enzima que se emplean son constantes para todos los fragmentos analizados: 600 ng, 10 pmoles, y 1.5 U, respectivamente; se adiciona una décima del volumen final de reacción del buffer 10X Taq [BSA 1mg/ml; Triton X-100 1%; Tris 700 mM, pH 8.8; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 200 mM] en un volumen final de 10 ul.

**Fig 6. DETECCIÓN DE MUTACIONES PUNTALES MEDIANTE
POLIMORFISMOS CONFORMACIONALES DE PRODUCTOS DE PCR**



Se muestra un diagrama de flujo del método empleado para detectar mutaciones en los genes analizados.

El programa de PCR que se corre es: 95 ° C para la desnaturalización, 63* ° C para la alineación y 72 ° C para la extensión, por 1.30, 1 y 1 minutos, respectivamente; 28 ciclos de desnaturalización, alineación y extensión por 0.5, 0.5 y 1 minutos respectivamente; y un ciclo de desnaturalización, alineación y extensión por 0.5, 0.5 y 5 minutos.

Al final de la reacción de PCR, una alícuota de cada muestra se desnaturaliza de acuerdo al siguiente procedimiento: Se diluyen 2ul del producto de PCR en 48 ul de SE (SDS 0.1 %, EDTA 10 mM). Se toman 2 ul de esta mezcla y se adicionan 2 ul de solución colorante (Formamida 95%, Xilencianol FF, 0.05%; Azul de bromofenol, 0.05%; EDTA 20mM, pH 8.0). Se mezcla y hierve por 15 minutos. Las muestras se colocan inmediatamente en hielo y se cargan 2 ul en geles de poliacrilamida de un determinado porcentaje dependiendo del fragmento a analizar. El gel se migra a no más de 10 W a temperatura ambiente y a no más de 18 W a 4°C para evitar que se caliente y se pierda la conformación de las moléculas de cadena sencilla de DNA. Esto es para evitar el calentamiento de los geles que traería como consecuencia la pérdida de la conformación adquirida por las moléculas. La distancia de migración se establece experimentalmente para hacer más evidentes los cambios en la movilidad de los fragmentos y poder detectar las alteraciones.

Las migraciones a 4 °C se realizan en un tiempo aproximado de 3 a 8 horas, mientras que las de temperatura ambiente toman de 12 a 18 ó 24 hrs, dependiendo del tamaño de los fragmentos. Esta diferencia se debe a que a 4 °C las migraciones se pueden realizar a más watts sin que haya calentamiento de los geles. El gel se seca y se autorradiografía, usando pantalla intensificadora, a -70°C, por un período variable de tiempo. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de cada fragmento y la longitud de estos últimos se muestran en las tablas II y III.

TABLA II.- OLIGONUCLEOTIDOS USADOS PARA AMPLIFICAR FRAGMENTOS DE LOS TRES GENES RAS HUMANOS.

FRAGMENTO AMPLIFICADO			OLIGONUCLEOTIDO	
CODONES	TAMAÑO (pb)	NOMBRE	SECUENCIA 5' -- 3'	
Ha-ras1	12 y 13	108	ras	CAGGCCCTGAGGAGCGATG
			ras2	CGTCCACAAAATGGTTCTGG
Ha-ras1	61	194	ras3	TCCTGCAGGATTCTACCGG
			ras4	GGTTCACCTGTACTGGTGGA
Ki-ras2	12 y 13	162	K1A	GGCCTGCTGAAAATGACTGA
			K1B	GTCTGCACCAGTAATATGC
Ki-ras2	61	128	K2A	TTCTACAGGAAGCAAGTAG
			K2B	CACAAAGAAAGCCCTCCCCA
N-ras	12 y 13	118	N1A	GACTGAGTACAACTGGTGG
			N1B	GGGCCTCACCTCTATGGTG
N-ras	61	103	N2A	GGTGAAACCCTGTTTGGTGG
			N2B	ATACACAGAGGAAGCTTCG

(Suzuki et al, 1990; Neri et al, 1988)

TABLA III.- OLIGONUCLEOTIDOS USADOS PARA AMPLIFICAR ALGUNOS EXONES DEL GEN p53 HUMANO.

FRAGMENTO AMPLIFICADO		OLIGONUCLEOTIDOS	
EXONES	TAMAÑO	NOMBRE	SECUENCIA
			5' -- 3'
5	245	p53,5,3'	ACCCTGGGCAACCAGCCCTGT
		p53,5,5'	TTCCTCTTCTGCAGTACTC
6	184	p53,6,3'	AGTTGCAAACCAGACCTCAG
		p53,6,5'	ACAGGGCTGGTTGCCAGGGT
7	188	p53,7,3'	GTCAGAGGCAAGCAGAGGCT
		p53,7,5'	GTGTTGTCTCCTAGGTTGGC
8	213	p53,8,3'	AGGTGAATCTGAGGCATAAC
		p53,8,5'	TATCCTGAGTAGTGGAATC

(Gaidano et al, 1991)

SECUENCIACION DIRECTA

Las muestras que mostraron un patrón compatible de mutación en el análisis de SSCP, se secuenciaron para confirmar la mutación y determinar el tipo de alteración.

La secuenciación se realiza directamente de los productos de amplificaciones sin marca radioactiva. Los fragmentos se purifican migrándolos en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Estos se electrotransfieren a membranas de DEAE y se recuperan con una solución con alta concentración de sal. Se extraen con fenol, y fenol-cloroformo. Los fragmentos se precipitan con 10 ug de tRNA de levadura como acarreador, y con 2.5 volúmenes de etanol frío. Se utiliza el kit Amplitaq de secuencia de Perkin Elmer. El oligonucleótido se marca en el extremo 5' con gama ^{32}P -ATP. La secuencia se realiza por una reacción cíclica en presencia de desoxinucleótidos (dNTPs) y el dideoxinucleótido (ddNTP) particular. Las reacciones se migran en geles de poliacrilamida al 8% con 7 M de urea y TBE 1X.

V. RESULTADOS

El análisis de las alteraciones en los genes Ha-ras y p53 se realizó por la técnica de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla de moléculas de DNA (Single-Strand Conformational Polymorphisms, SSCP), desarrollada por Orita, et al (1989) y modificada por Gaidano, et al (1991).

La alta sensibilidad, especificidad y sencillez de esta metodología la hacen ideal para el análisis de alteraciones genéticas en un gran número de muestras y permite la detección de cambios pequeños en el DNA, como son las mutaciones puntuales.

Gaidano, et al (1991) reportan que el método de SSCP tiene una sensibilidad que permite detectar menos del 1% de moléculas con mutaciones. Igualmente, Hayashi (1991) reporta que la sensibilidad del PCR-SSCP es del 99 y del 89%, cuando los fragmentos están comprendidos entre los 100 y 300pb y entre 300 a 400 pb, respectivamente.

Para la utilización de esta metodología se requirió la estandarización de todas las condiciones de las reacciones de amplificación y de migración electroforética, de forma tal que los cambios en la movilidad pudieran ser más evidentes.

Las condiciones para la reacción de PCR, para cada uno de los fragmentos analizados, se determinaron primero con amplificaciones sin marca radioactiva y análisis de los productos en minigeles de acrilimida teñidos con bromuro de etidio. Se estandarizaron las concentraciones óptimas de cada componente de la reacción: DNA, oligonucleótidos, enzima, magnesio y dNTPs; para obtener mayor especificidad y rendimiento. Para el caso del magnesio las concentraciones variaron entre los límites de 0.5 y 3.5 mM. La concentración final de dCTPs fue menor para que posteriormente no compitiera con el dCTP marcado en el análisis de SSCP. Estas estandarizaciones se realizaron haciendo curvas de concentración para cada componente, para después ir conjuntando las concentraciones óptimas de cada uno.

De igual forma se estableció la temperatura óptima de alineación para cada par de oligonucleótidos (tomando como base su T_m), realizando las amplificaciones a distintas temperaturas. Se eligió la condición en la que la especificidad y rendimiento fueran mayores. En la tabla IV se resumen las condiciones óptimas utilizadas para cada fragmento amplificado.

Las condiciones de migración óptimas para cada una de las muestras se establecieron también experimentalmente. Se migraron las muestras en distintas

concentraciones de poliacrilamida, con o sin de glicerol. Se realizaron migraciones con distintos tiempos para cada fragmento a analizar, dependiendo de su tamaño. Esto se realizó con la finalidad de que las alteraciones se hicieran más evidentes y pudiera detectarse la mayoría de ellas.

TABLA IV. CONDICIONES UTILIZADAS EN LAS REACCIONES DE AMPLIFICACION DE DIVERSOS EXONES DE LOS TRES GENES RAS Y p53 HUMANOS

	p53				H-ras		K-ras		N-ras	
EXONES	5	6	7	8	1	2	1	2	1	2
Mg ²⁺ (mM)	11.5	1	1		2	1.5	2	2	1.5	2
dA,G,T (uM)	100	2.5	2.5	25	10	100	100	100	100	100
dC (uM)	10	2.5	2.5	10	10	10	10	10	10	10
Temperatura de alineación (° C)	63	63	62	58	60	61	60	58	60	59

V.1. DETECCION DE MUTACIONES EN LOS GENES RAS EN LINEAS CELULARES DERIVADAS DE TUMORES HUMANOS.

La búsqueda de mutaciones en los genes ras se realizó únicamente en fragmentos de los exones 1 y 2 para las 14 líneas celulares, ya que es en éstos donde se encuentran los sitios de mayor frecuencia de alteraciones observadas en los cánceres humanos: codones 12, 13 y 61 (Bos, 1988).

Los codones 12 y 13 de H-ras (exón 1) fueron analizados utilizando los oligonucleótidos ras 1 y 2; y el codón 61 (exón 2), con los oligonucleótidos ras 3 y ras 4.

De las catorce líneas celulares analizadas para H-ras, siete mostraron un patrón compatible con mutaciones en los codones 12 y/o 13. El cambio en la movilidad que muestran los alelos mutados se indica con flechas en la figura 6.

Cinco de las siete líneas celulares que mostraron mutación en estos codones son de origen cervical: HeLa, C-33A, MRH-I-186, SiHa y CasKi.

Sin embargo, los cambios observados para este fragmento no siempre lograron ser tan contundentes, por lo que se buscó confirmarlos por secuenciación.

Respecto del fragmento del exón 2 de H-ras, ninguna de las líneas celulares analizadas mostraron alteraciones.

También fueron analizados fragmentos de los exones 1 y 2 en los genes K-ras y N-ras usando los siguientes pares de oligonucleótidos para las amplificaciones: K1A y K1B, K2A y K2B, N1A y N1B, N2A y N2B.

En el análisis de exón 2 de K-ras (codón 61) se detectó una mutación en la línea celular C33A. Para el exón 1 se confirmó la mutación en el codón 12 de la línea SW480 que ya había sido reportada anteriormente (Bos, 1988). Estos resultados se observan en la figura 7.

En el caso del gen N-ras se detectó una mutación en el exón 2 en la línea celular HepG2. Todas las otras líneas celulares presentaron un patrón compatible con los alelos normales para ambos exones. Los resultados se muestran en la figura 8.

Los resultados obtenidos del análisis de los tres genes ras se resumen en la Tabla V.

V.2. DETECCION DE MUTACIONES EN p53 EN LINEAS CELULARES DERIVADAS DE TUMORES HUMANOS.

Los exones 5 al 8 del gen p53 fueron examinados por el método de SSCP-PCR, utilizando las condiciones óptimas para cada fragmento reportadas por Gaidano, et al (1991). Estos fragmentos fueron analizados porque en ellos se concentran el 90% de las mutaciones detectadas en los cánceres humanos (Nigro et al, 1989; Hollstein et al, 1991).

El uso de esta metodología permitió la detección de ocho alteraciones en las líneas celulares analizadas; cuatro de estas localizadas en el exon 6 y las restantes distribuidas en los demás exones.

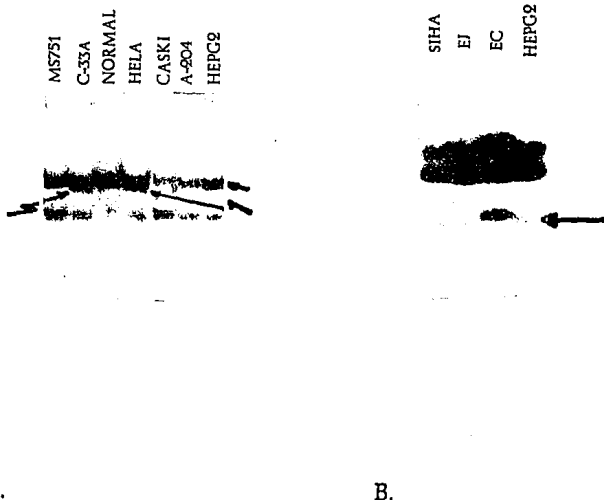


FIGURA 6. ANALISIS DE PCR-SSCP DEL EXON 1 DEL GEN H-RAS.

Este fragmento incluye los codones 12 y 13. Los productos fueron separados en geles de poliacrilamida A) al 8% sin glicerol migrado a 4 ° C y B) al 6% con glicerol migrado a temperatura ambiente. Se utilizaron estas dos condiciones para tratar de hacer más evidentes los cambios de movilidad entre los alelos normal y mutado. Las flechas muestran las bandas que corresponden a los fragmentos de DNA mutados.

EC y EJ se utilizaron como controles negativo y positivo de mutación, respectivamente. Estos son plásmidos poseen la versión normal y mutada (Gly -- Val 12) del gen H-ras, respectivamente.

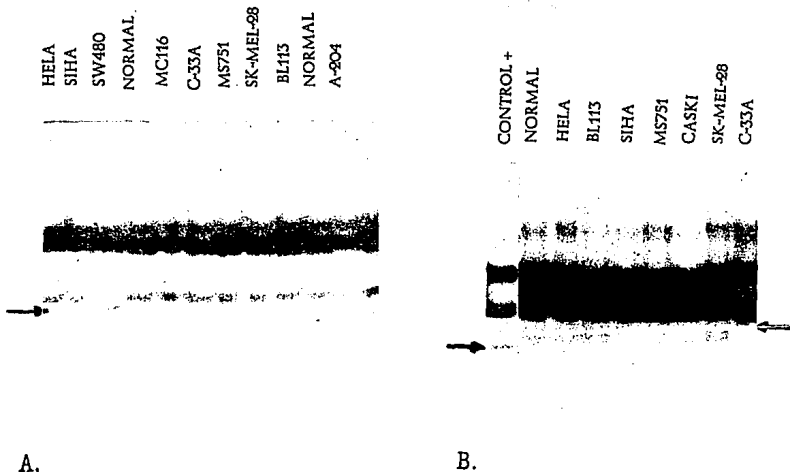


FIGURA 7. ANALISIS DE LOS EXONES 1 y 2 DEL GEN K-RAS.

En la figura A se muestra es patrón de corrimiento de los fragmentos correspondientes al exón 1 del gen K-ras que incluye los codones 12 y 13. La figura B muestra los fragmentos para el exón 2 que incluye al codón 61.

Los productos desnaturalizados se migraron en geles de poliacrilamida al 6% con 10% de glicerol y a temperatura ambiente.

Las bandas correspondientes a los alelos mutados se indican con flechas.

Control +: Control positivo de mutación.

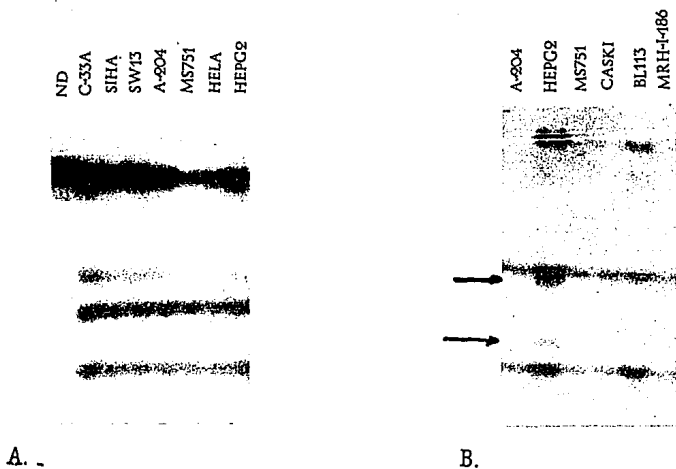


FIGURA 8. ANALISIS DE LOS EXONES 1 y 2 DEL GEN N-RAS.

La figura A muestra los fragmentos del exón 1 del gen N-ras que incluye los codones 12 y 13. Los productos se migraron en geles de poliacrilamida al 6% con 10% de glicerol y a temperatura ambiente. En la figura B se encuentran los fragmentos del exón 2 que incluye al codón 61. En este caso las muestras se migraron en un gel de poliacrilamida con 10% de glicerol, a temperatura ambiente. Estas condiciones permitieron la mejor resolución de las diferencias entre los alelos normal y mutado.

ND: Muestra no desnaturalizada.

La flecha indica la banda correspondiente al alelo mutado.

Cuatro de estas alteraciones no habían sido reportadas anteriormente y se trata de las mutaciones en el exón 6 de: C33A, A-204 y SW13; y de la alteración en el exón 5 de la línea Sk-mel-28. Las otras cuatro mutaciones confirman reportes anteriores de alteraciones en el exón 6 de la línea DAUDI, en el exón 7 de MC116, y en el exón 8 de BL113 y C-33A.

La figura 9 muestra algunos ejemplos de los patrones de movilidad obtenidos para el exon 5 de p53. Las mutaciones fueron detectadas como cambios en la migración de las bandas y son indicadas por flechas. El exón 5 abarca los codones 126 al 186. Sk-mel-28 fue la única línea celular que mostró alteraciones en este exón, y se trata de una mutación homocigota. Además se muestra la mutación heterocigota ya reportada de la línea ST486 que se usó como control positivo de mutación.

En la figura 10 se muestran algunos patrones de migración del fragmento que comprende el exon 6 de p53, que incluye los codones 187 al 225. Cuatro de las catorce líneas celulares estudiadas mostraron un patrón compatible con mutación en este exon, que corresponden a las líneas DAUDI, A-204, SW13 y C-33A. Las mutaciones encontradas en las líneas SW13 y C-33A son homocigotas, en contraste con las mutaciones heterocigotas de A-204 y DAUDI. La alteración para esta última línea celular ya había sido reportada anteriormente.

Las figuras 11 y 12 muestran algunos ejemplos de los análisis para los exones 7 y 8, respectivamente. El exón 7 abarca los codones 226 al 260 y el exón 8 del 261 al 306. Las líneas celulares que mostraron alteraciones en estas regiones fueron MC116 (en el exón 7) y C-33A y BL113, en el exón 8. En estos casos se trata de alteraciones anteriormente reportadas. La mutación de MC116 es homocigota, mientras que las de C33A y BL113 son heterocigotas. Ninguna de las otras líneas celulares estudiadas presentaron alteraciones en los exones analizados.

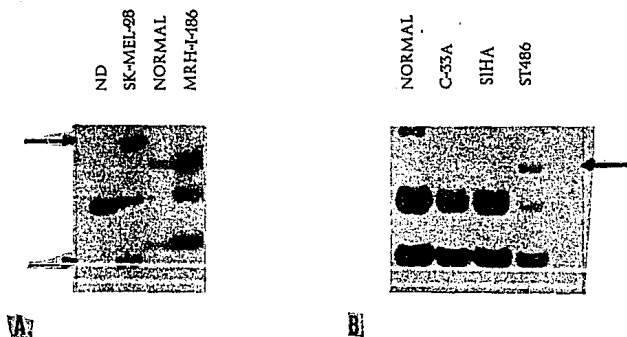
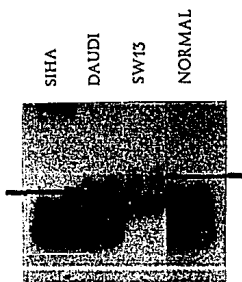


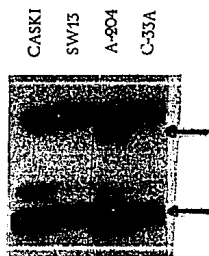
FIGURA 9. DETECCION DE MUTACIONES EN EL EXON 5 DE p53 HUMANO.

El exón 5 abarca los codones 126 al 186. En la figura se muestran dos gels distintos con fragmentos normales y mutados para este exón. Los productos de PCR fueron desnaturalizados y separados en gels de poliacrilamida al 6% con 10% de glicerol, a temperatura ambiente.

ND. Es la migración de los fragmentos no desnaturalizados. Las flechas muestran las bandas de los fragmentos mutados.



A.



B.

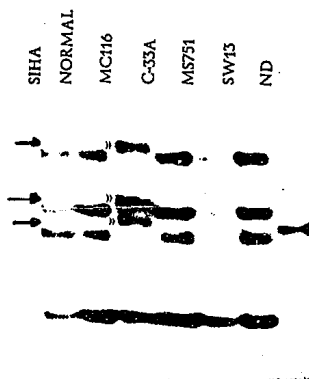


FIGURA 11. ANALISIS DEL EXON 7 DE p53.

Los productos de PCR desnaturalizados fueron separados en geles de poliacrilamida al 6% con 10% de glicerol y migrados a temperatura ambiente. El exón 7 incluye los codones 226 al 260.

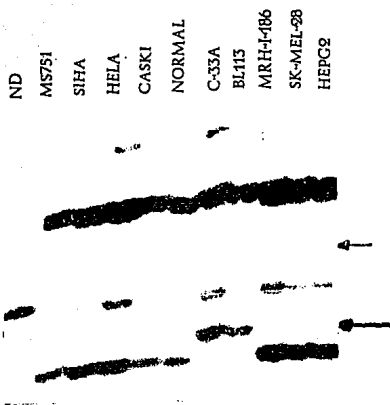


FIGURA 12. DETECCION DE MUTACIONES EN EL EXON 8 DEL GEN p53.

Este exón abarca los codones 261 al 306. Los productos de amplificación fueron separados a temperatura ambiente en gels de poliácridamida al 6% con 10% de glicerol.

ND corresponde a la migración de los productos sin desnaturalizar.

Las flechas señalan las bandas correspondientes a las cadenas mutadas.

Los resultados obtenidos para los diferentes exones de p53 se encuentra en la Tabla V, donde también se concentran los datos para los distintos exones de los tres genes ras.

TABLA V. RESUMEN DE LAS ALTERACIONES DETECTADAS EN LOS GENES RAS Y p53 EN LINEAS CELULARES DERIVADAS DE DIVERSOS TUMORES HUMANOS

		p53				H-ras		K-ras		N-ras	
EXONES		5	6	7	8	1	2	1	2	1	2
	TIPO DE HPV										
MS751	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HeLa	18	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
MRH-I-186	16	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
SiHa	16	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
CaSki	16	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
C-33A	-	-	+/-	-	+	+	-	-	+	-	-
A-204	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
SW13	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Sk-mel-28	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HepG2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
SW480	-	-	-	-	-	-	-	+	*	-	-
BL113	-	-	-	-	+	*	-	-	-	-	-
MC116	-	-	-	+	*	-	-	-	-	-	-
DAUDI	-	-	+	*	-	-	-	-	-	-	-

- ALELO NORMAL

+ ALELO MUTADO

+* ALELO MUTADO (REPORTADO ANTERIORMENTE)

+/- DATOS NO CONCLUYENTES

Con la finalidad de confirmar las mutaciones en los genes ras y p53 detectadas por SSCP, se realizó la secuenciación directa de los productos de PCR, usando el kit de secuenciación directa de Perkin Elmer.

La figura 13 presenta ejemplos de la secuencia obtenida por esta metodología para el exón 6 de dos de las líneas celulares que mostraron un patrón de mutación en el análisis de SSCP-PCR, A-204 y SW13. La secuencia confirmó la mutación detectada y ayudó a localizarla e identificarla. Para A-204 la mutación ocurrió en el codon 199 y para SW13 en el 194. En ambos casos la mutación produjo un cambio del aminoácido codificado; Glu por Gly para A-204 y His por Tyr para SW13.

EXON 6

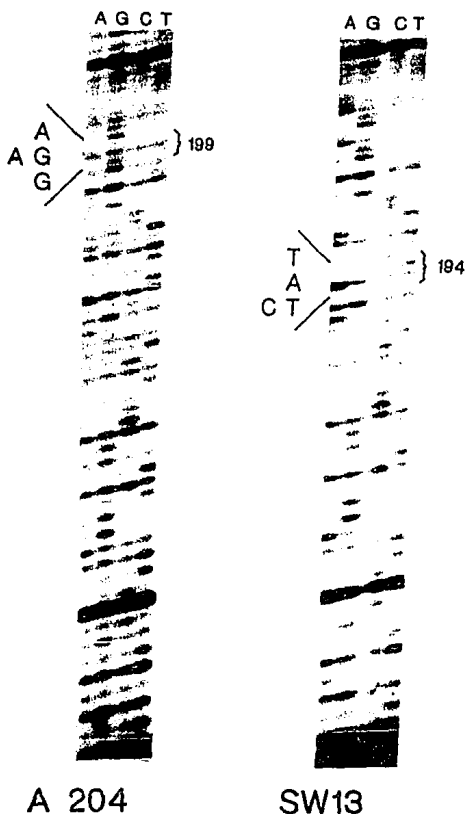


FIG 13. Naturaleza y localización de algunas mutaciones en el exon 6 del gen p53.

Las mutaciones detectadas en el exon 6 de las líneas A-204 y SW13 fueron confirmadas por secuenciación directa de los productos de PCR. En la figura se muestran los cambios en los nucleótidos y las posiciones en que se encuentran.

La tabla VI resume algunas de las mutaciones que pudieron ser detectadas por secuenciación, así como la localización y tipo de alteración que se produjo.

TABLA VI. MUTACIONES CONFIRMADAS POR SECUENCIACION

LINEA	GEN	CODON	MUTACION	AMINOACIDO SUSTITUIDO
HeLa	H-ras/exón1	12	GGC -- GTC	GLY -- VAL
SiHa	H-ras/exón1	12	GGC -- GTC	GLY -- VAL
C-33A	H-ras/exón1	12	GGC -- GTC	GLY -- VAL
A-204	p53/exón6	199	GAA -- GGA	GLU -- GLY
SW13	p53/exón6	194	CAT -- TAT	HIS -- TYR

V.3. DETECCION DE HPV

Se realizó la detección de HPV mediante la amplificación de la región L1 conservada para todos los papilomavirus humanos. Se usaron los oligonucleótidos descritos por Van den Brule (1990). Las muestras que se analizaron fueron aquellas líneas celulares donde HPV no había sido descrito.

En ninguna de las líneas analizadas (A-204, SW13, Sk-mel-28, HepG2, SW480, BL113, MC116 y DAUDI) se detectaron secuencias de HPV. Esto coincide con lo esperado debido al tipo de tejido del cual estas líneas son derivadas que no pertenece al específico del virus, es decir, los epitelios.

VI. DISCUSION

Con este trabajo se logró la estandarización de la metodología de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP) para detectar mutaciones puntuales. Con esta finalidad se realizó la estandarización de diversos parámetros para la amplificación de cada fragmento. Estos fueron: las concentraciones óptimas de DNA, magnesio, dNTPs, enzima, y oligonucleótidos, así como las condiciones de migración (la concentración de poliacrilamida, la adición o no de glicerol y el tiempo de corrida).

El hecho de estandarizar una metodología con la sensibilidad y especificidad para detectar todo tipo de alteraciones en la secuencia del DNA, en particular, mutaciones puntuales, y que sea, por su accesibilidad, una prueba tamiz que permita la fácil detección de alteraciones en un gran número de muestras, ha permitido a otros investigadores (de este y otros campos) su empleo con resultados muy satisfactorios.

Los resultados obtenidos en este trabajo se encuentran resumidos en la tabla V. En las catorce líneas celulares analizadas se puede observar que la frecuencia de alteraciones en el gen p53 es elevada (7/14). Esto coincide con lo reportado en la literatura de ser un gen muy altamente alterado en los cánceres humanos (Nigro et al, 1989; Hollstein et al, 1991).

Se corroboraron los datos de la ausencia de mutaciones en el gen p53 en las líneas celulares derivadas de cáncer cérvico-uterino con secuencias de HPV de alto riesgo (Crook et al, 1991; Scheffner et al, 1991).

La proteína oncogénica E6 de estos HPV se une a p53 promoviendo su degradación. Como p53 es un gen con funciones claves para importantes procesos de la regulación celular, la inactivación de éste, ya sea por mutación o por degradación inducida por la proteína E6 de los HPV, es un paso crítico para la carcinogénesis. Esto sugiere que la presencia de HPV en una célula tendría el mismo efecto anulador en la función de p53 que las mutaciones en el gen (Crook et al, 1991; Scheffner et al, 1991). Por esta razón podrían ser excluyentes.

Siete de las ocho líneas celulares que no son de origen cervical y que no muestran secuencias de HPV, tuvieron alteraciones en el gen p53. Esto apoya la idea anterior y confirma la alta frecuencia de alteraciones para este gen en los cánceres humanos, y en las líneas celulares estudiadas. También apoya las hipótesis base de este trabajo.

De las ocho mutaciones detectadas en los diversos exones de p53, cuatro son mutaciones no reportadas, aunque requieren de ser confirmadas por secuenciación. Una de ellas es la detectada en el exón 6 de la línea C-33A; por lo que al parecer

esta línea celular presenta alteraciones tanto en el exón 6 como en el 8. Las restantes confirman los datos reportados anteriormente en la literatura.

El análisis de los exones del 5 al 8 cubre la región donde se encuentran el 90% de las alteraciones reportadas en los tumores humanos. Esto justifica el que el estudio se haya restringido sólo a esta región.

En relación al gen H-ras, se pudo observar una frecuencia muy alta de mutaciones en los codones 12 ó 13 (7/14) en las líneas celulares analizadas. Para los otros genes ras (K y N-ras) se detectaron tres mutaciones en las líneas celulares estudiadas. Parecer ser que la línea celular C-33A presenta alteraciones en los genes H-ras y K-ras; y la línea HepG2 en H y N-ras. La alteración en el codón 12 de K-ras de la línea SW480 ya había sido reportada.

De estos resultados se pueden realizar dos análisis interesantes. El primero está basado en la alta frecuencia de mutaciones en H-ras en las líneas derivadas de cáncer de cérvix que fue detectada en este trabajo. Cinco de seis presentaron un patrón compatible con mutaciones en los codones 12 y/o 13 de Ha-ras. Llama nuestra atención la alta proporción de alteraciones en un tipo de cáncer donde se reportaba que las mutaciones en este gen no eran importantes para su desarrollo. A pesar de que los datos de alta frecuencia de alteraciones en las líneas celulares no son fácilmente extrapolables a muestras tumorales (por que pueden ser el resultado de alteraciones adquiridas durante el establecimiento de las líneas), este hallazgo sugiere fuertemente que las alteraciones en el gen ras podrían ser importantes para la carcinogénesis del cérvix.

El segundo análisis es en relación a una hipótesis existente de que el gen Ha-ras fuera un gen supresor. Esta se basa en los siguientes antecedentes:

*Se reporta una alta frecuencia de pérdida de heterocigocidad (LOH) en el brazo corto del cromosoma 11 en algunos tumores humanos (Fearon et al, 1985; Ali et al, 1987; Atkin & Baker, 1988; Wang & Rogler, 1988). De igual forma se reporta este fenómeno, en el carcinoma de mama, en la región cromosómica 11p15.5 que es donde se encuentra localizado Ha-ras (Theillet et al, 1986). Más aún, se tienen también reportes de la LOH de Ha-ras en varios tipos tumorales (Santos et al 1984; Krontiris et al; 1985; Yokota et al; 1986). La pérdida de heterocigocidad es un fenómeno que frecuentemente se relaciona la posible existencia de un gen supresor en esa región.

*El producto del gen Krev-1 tiene actividad de gen supresor. Este posee una alta homología (50%) con H-ras, principalmente en el dominio efector (Kitayama et al, 1989).

*La expresión de la proteína normal Ha-ras puede suprimir el fenotipo transformado y tumorigénico de las células transformadas con genes ras mutados oncogénicos. Al parecer H-ras puede actuar como gen supresor o como oncogen dependiendo del contexto celular (Spandidos & Wilkie, 1988).

En la tabla VII podemos ver que de las siete líneas celulares donde se había reportado pérdida de heterocigocidad en la región cromosómica 11p15.5 (Stanbridge, 1990; Santos et al, 1984), seis mostraron mutaciones, por SSCP-PCR, en los codones 12 ó 13 del alelo residual de Ha-ras. La línea celular donde la pérdida de heterocigocidad se presentaba en cualquier otro locus cromosómico (Sk-mel-28) no mostró alteraciones en el gen H-ras. De las siete líneas restantes, de las cuales no existen reportes acerca de la pérdida de información en algún sitio, únicamente dos casos mostraron alteraciones en el gen ras.

El hallazgo de que en el 85% de los casos donde se perdió uno de los alelos de ras, el alelo restante está alterado, puede constituir una evidencia más en apoyo a la hipótesis de la identidad de Ha-ras como un gen supresor.

TABLA VII. REPORTE DEL ESTADO DEL GEN H-RAS EN ALGUNAS DE LAS LINEAS CELULARES CON ALTERACION REPORTADA EN LA REGION CROMOSOMICA 11p15.

LINEA CELULAR	Ha-ras1
MS751	NORMAL
SiHa	MUTADO
HeLa	MUTADO
CaSki	MUTADO
C-33A	MUTADO
A-204	MUTADO
HepG2	MUTADO

(Citado en Stanbridge, 1990).

Los resultados obtenidos en este trabajo aportan información relevante sobre el estado de los genes ras y p53 (genes muy importantes en la carcinogénesis de muchos tumores humanos) en algunas de las líneas celulares más utilizadas en los estudios de cáncer. Esto amplía el conocimiento de las características de estas líneas celulares, y sirve para enriquecer o interpretar resultados de estudios futuros.

VII. REFERENCIAS

- Ali, I.U., Lidereau, R., Theillet, C., Callahan, R.** (1987) Reduction to homozygosity of genes on chromosome 11 in human breast neoplasia. *Science* 238: 185-188.
- Arends, M.J., Wyllie, A.H., Bird, C.C.** (1990) Papillomaviruses and human cancer. *Human Pathology* 21: 686-698.
- Atkin, N.B., Baker, M.C.** (1988) Deficiency of all or part of chromosome 11 in several types of cancer: significance of a reduction in the number of normal chromosomes 11. *Cytogenet Cell Genet.* 47: 106-107.
- Baker, S.J., Markowitz, S., Fearon, E.R., Willson, J.V., Vogelstein, B.** (1990) Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 249: 912-915.
- Barbacid, M.** (1987) Ras genes. *Ann Rev. Biochem.* 56: 779-827.
- Bishop, J.M.** (1985) Viral Oncogenes. *Cell* 42: 23-28.
- Boguski, M.S., McCormick, F.** (1993) Proteins regulating ras and its relatives. *Nature* 366, 643-654.
- Bos, J.** (1988) The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutation Res.* 195: 255-271.
- Bos, J.L.** (1989) ras oncogenes in human cancer: A review. *Cancer Res.* 49: 4682-4689.
- Bowtell, D.D.L.** (1987) Rapid isolation of eukaryotic DNA. *Analytical Bioch.* 162: 463-465.
- Brown, R., Marshall, C.J., Pennie, S.G., Hall, A.** (1984) Mechanism of activation of an N-ras gene in the human fibrosarcoma cell line HT1080. *EMBO J.* 3: 1321-1326.

Chen, P.L., Chen, Y., Bookstein, R., Lee, W. (1990) Genetic mechanism of tumour suppression by the human p53 gene. *Science* 250: 1576-1580.

Choo, K-B., Pan, C-C., Han, S-H. (1987) Integration of human papillomavirus type 16 into cellular DNA of cervical carcinoma: preferential deletion of the E2 gene and invariable retention of the long control region and E6/E7 open reading frames. *Virology*, 161: 259-261.

Crook, T., Wrede, D., Vousden, K.H. (1991) p53 point mutation in HPV negative human cervical carcinoma cell lines. *Oncogene* 6: 873-875.

Crook, T., Wrede, D., Tidy, J.A. Mason, W.P., Evans, D.J., Vousden, K.H. (1992) Clonal p53 mutation in primary cervical cancer: association with human-papillomavirus-negative tumours. *Lancet*, 339, 1070-1073.

Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, Jr, C.A., Butel, J.S., Bradley, A. (1992) Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356: 215-221.

Donehower, L.A., Bradley, A. (1993) The tumor suppressor p53. *Biochem.Biophys.Acta* 1155: 181-205.

Dürst, M., Kleinheinz, A., Hotz, M., Gissmann, L. (1985) The physical state of human papillomaviruses type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *J Gen Virol.* 66: 1515-1522.

Dyson, N., Howley, P.M., Munger, K., Harlow, E. (1989) The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243: 934-937.

El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825.

Eliyahu, D., Raz, A., Gruss, P., Givol, D., Oren, M. (1984) Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 312: 646-649

- Fearon, E.R., Feinberg, A.P., Hamilton, S.H., Vogelstein, B. (1985)** Loss of genes on the short arm of chromosome 11 in bladder cancer. *Nature* 318: 377-380.
- Feig, L.A. (1993)** The many roads that lead to ras. *Science* 260: 767-768.
- Finlay, C.A., Hinds, P.H., Levine, A.J. (1989)** The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57: 1083-1093.
- Fritsche, M., Haessler, C., Brandner, G. (1993)** Induction of nuclear accumulation of the tumour-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene* 8: 307-318.
- Gage, J.R., Meyers, C., Wettstein, F.O. (1990)** The E7 proteins of nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *J. Virol.* 64: 723-730.
- Gaidano, G., Ballerini, P., Gong, J. Z, Inghirami, G., Neri, A., Newcob, E.W. Magrath, I.T., Knowles, D.M., Dalla-Favera, R. (1991)** p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *PNAS* 88: 5413-5417.
- Halazonetis, T.D., Davis, L.J., Kandil, A.N. (1993)** Wild-type p53 adopts a "mutant"-like conformation when bound to DNA. *EMBO J.* 12: 1021-28.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., Elledge, S.J. (1993)** The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805-816.
- Harris, C.C. (1993)** p53: At the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. *Science* 262: 1980-81.
- Hollstein., M., Sidransky, D., Vogelstein, B., Harris, C.C. (1991)** p53 mutations in human cancers. *Science* 253:49-53.
- Jenkins, J.R., Rudge, K., Currie, G.A. (1984)** Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature* 312: 651-654.

Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., Craig, R.W. (1991) Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 51, 6304-6311.

Kastan, M.B., Zhang, Q., El-Deiry, W.S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W.V., Plunkett, B.S., Vogelstein, B., Fornace, A.J. (1992) A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in Ataxia-Telangiectasia. *Cell* 71: 587-597.

Kitayama, H., Sugimoto, Y., Matsuzaki, T., Ikawa, Y., Noda, M. (1989). A ras-related gene with transformation suppressor activity. *Cell* 56: 77-84.

Krengel, U., Schlichting, I., Scherer, A., Schumann, R., Frech, M., John, J., Kabsch, W., Pai, E.F., Wittlinghofer, A. (1990) Three-dimensional structures of H-ras p21 mutants: Molecular basis for their inability to function as signal switch molecules. *Cell* 62: 539-548.

Krontiris, T.G., DiMartino, N.A., Colb, M., Parkinson, D.R. (1985) Unique allelic restriction fragments of the human Ha-ras locus in leukocyte and tumour DNAs of cancer patients. *Nature* 313: 369-374.

Kurman, R.J., Jermon, A.B., Lancaster, W.A. (1983) Papillomavirus infection of the cervix. Relation to intraepithelial neoplasia based on the presence of specific viral structural proteins. *Am J Surg Pathol.* 7:39-44.

Lane, D.P., Crawford, L.V. (1979) T-Antigen is bound to host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278: 261-263.

Lane, D.P. (1992) p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15-16.

Lane, D.P. (1993) A death in the life of p53. *Nature* 362, 786-787.

Lehn, H., Krieg, P., Sauer, G. (1985) Papillomavirus genomes in human cervical tumours: Analysis of their transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 5540-5544.

- Linzer, D.I.H., Levine, A.J.** (1979) Characterization of a 54 KDa cellular SV40 tumor antigen present in SV40 transformed cells and untransformed embryonal carcinoma cells. *Cell* 17: 43-52.
- Lowe, S.W., Schmitt, E.M., Smith, S.W., Osborne, B.A., Jacks, T.** (1993) p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362, 847-849.
- Lowe*, S.W., Ruley, H.E., Jacks, T., Housman, D.E.** (1993) p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74: 957-67.
- Manne, V., Bekesi, E., Kung, H-F.** (1985) Ha-ras proteins exhibit GTPase activity: point mutations that activate Ha-ras gene products result in decreased GTPase activity. *PNAS*. 82: 376-380.
- Marshall, C.J.** (1985) Human oncogenes. In: R.Weiss, N. Teich, H. Varmus, J. Coffin (eds). *RNA tumor viruses*, second edition. Cold Spring Harbor, N.Y. pp 487-558.
- Marshall, C.J.** (1988) The ras oncogenes. *J Cell Sci. Suppl* 10: 157-169.
- Marx, J.** (1993) Forging a path to the nucleus. *Science* 260, 1588-1590.
- Matlashewski, G., Schneider, J., Banks, L., Nicholas, J., Murray, A., Crawford, L.** (1987) Human papillomavirus type 16 DNA cooperates with activated ras in transforming primary cells. *EMBO J* 6: 1741-1746.
- McCormick, F.** (1993) How receptors turn Ras on. *Nature* 363, 15-16.
- McGrath, J.P., Capon, D.J., Goeddel, D.V., Levinson, A.D.** (1984) Comparative biochemical properties of normal and activated human ras p21 protein. *Nature* 310: 644-649.
- Mercer, W.E.** (1992) Cell cycle regulation and the p53 tumor suppressor protein. *Critical reviews in eucariotyc gene expression*. 2: 251-263.

Merritt, A.J., Potten, C.S., Kemp, C.J., Hickman, J.A., Balmain, A., Lane, D.P., Hall, P.A. (1994) The role of p53 in spontaneous and radiation-induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal and p53-deficient mice. *Cancer Res.* 54, 614-617.

Michalowitz, D., Halevy, O., Oren, M. (1991) p53 mutations: Gains or losses? *J Cell Biochem* 45: 22-29.

Mietz, J.A., Unger, T., Huibregtse, J.M., Howley, P.M. (1992) The transcriptional transactivation function of the wild-type p53 is inhibited by SV40 large T-antigen and by HPV-16 E6 oncoprotein. *EMBO J.* 11, 5013-5020.

Moodie, S.A., Wolfman, A. (1994) The 3Rs of Life: Ras, Raf and Growth Regulation. *TIG* 10 (2), 44-48.

Münger, K., Phelps, W.C., Bubb, V., Howley, P.M., Schlegel, R. (1989) The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol.* 63: 4417-4421.

Münger*, K., Werness, B.A., Dyson, N., Phelps, W.C., Harlow, E., Howley, P.M. (1989) Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J* 8: 4099-4105.

Münger, K., Scheffner, M., Huibregtse, J.M., Howley, P.M. (1992) Interactions of HPV E6 y E7 oncoproteins with tumour suppressor gene products. *Cancer Surveys* 12: Tumour Suppressor Genes, the Cell Cycle and Cancer: 197-217.

Neri, A., Knowles, D.M., Greco, A., McCormick, F. (1988) Analysis of RAS oncogene mutations in human lymphoid malignancies. *PNAS* 85: 9268-9272.

Nigro, J.M., Baker, S.J., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., Hostetter, R., Cleary, K., Bigner, S. H., Davidson, N., Baylin, S., Devilee, P., Glover, T., Collins, F.S., Weston, A., Modali, R., Harris, C.C., and Vogelstein, B. (1989) Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature*, 342: 705-708.

Noda, M. (1993) Structures and functions of K-rev-1 transformation suppressor gene and its relatives. *Biochem Bioph. Acta* 1155: 97-109.

Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K. and Sekiya, T. (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *PNAS*, 86: 2766-2770.

Parada, L.F., Land, H., Weinberg, R., Wolf, D., Rotter, V. (1984) Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature* 312: 649-651.

Park, D.J., Wilczynski, S.P., Paquette, R.L., Miller, C.W., Koeffler, H.P. (1994) p53 mutations in HPV-negative cervical carcinoma. *Oncogene* 9:205-210.

Pecoraro, G., Morgan, D., Defendi, V. (1989) Differential effects of human papillomavirus type 6, 16 and 18 DNAs on immortalization and transformation of human cervical epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 563-567.

Price, B.D., Park, S.J. (1994) DNA damage increases the levels of MDM2 messenger RNA in wtp53 human cells. *Cancer Res* 54: 896-899.

Price, B.D. & Calderwood, S.K. (1993) Increased sequence-specific p53-DNA binding activity after DNA damage is attenuated by phorbol esters. *Oncogene* 8:3055-3062.

Prives, C., & Manfredi, J.J. (1993) The p53 tumor suppressor protein: meeting review. *Genes & Dev.* 7: 529-34.

Reid, R., Crum, CP., Herschman, B.R., Fu, Y.S., Braun, L., Shah, K.V., Agronow, S.J., Stanhope, C.R. (1984) Genital warts and cervical cancer. III subclinical papillomaviral infection and cervical neoplasia are linked by a spectrum of continuous morphologic and biologic change. *Cancer* 53: 943-953.

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 a normal tissue of the same patient. *Science* 223: 661-664.

- Saxon, J.P., Srivatsan, E.S., Stanbridge, E.J. (1986)** Introduction of human chromosome 11 via microcell transfer controls tumorigenic expression of HeLa cells. *EMBO J* 5: 3461-3466.
- Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levin, A.J., Howley, P.M. (1990)** The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63: 1129-1136.
- Scheffner, M., Münger, K., Byrne, J.C., Howley, P.M. (1991)** The state of p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *PNAS* 88: 5523-5527.
- Schlegel, R., Phelps, W.C., Zhang, Y-L., Barbosa, M. (1988)** Quantitative keratinocyte assay detects two biological activities of human papillomavirus DNA and identifies viral types associated with cervical carcinoma. *EMBO J* 7: 3181-3187.
- Schlegel, R. (1990)** Papillomaviruses and human cancer. *Seminars in Virology* 1: 297-306.
- Scholnick, E.M., Papageorge, A. G., Shih, T.Y. (1979)** Guanine nucleotide binding activity as an assay for the src protein of rat-derived murine sarcoma viruses. *PNAS* 76: 5355-5359.
- Schwab, M. (1989)** Genetic principles of tumor suppression. *Bioch Biophys Acta* 989: 49-64.
- Schwarz, E., Freese, U.K., Gissman, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A., zur Hausen, H. (1985)** Structure and transcription of human papillomaviruses sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 314: 111-114.
- Seto, E., Usheva, A., Zambetti, G.P., Momand, J., Horikoshi, N., Weinmann, R., Levine, A.J., Shenk, T. (1992)** Wild-type p53 binds to the TATA-binding protein and represses transcription. *PNAS* 89: 12028-12032.
- Soussi, T., Caron de Fromental, C., May, P. (1990)** Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* 5: 945-52.

- Spandidos, A., Wilkie, N.M.** (1988). The normal human H-ras1 gene can act as an onco-suppressor. *Br J Cancer* 58: 67-71.
- Srivatsan, E.S., Benedict, W.F., Stanbridge, E.J.** (1986) Implication of chromosome 11 in the suppression of neoplastic expression in human cell hybrids. *Cancer Res* 46: 6174-6179.
- Srivastava, S., Zou, Z., Pirollo, K., Blattner, W., Chang, E.H.** (1990) Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature* 348: 747-749.
- Stanbridge, E.J.** (1990) Human tumor suppressor genes. *Annu Rev Genet* 24: 615-657.
- Storey, A., Pim, D., Murray, A., Osborn, K., Banks, L., Crawford, L.** (1988) Comparison of the in vitro transforming activities of human papillomavirus types. *EMBO J* 7: 1815-1820.
- Suzuki, Y., Orita, M., Shiraishi, M., Hayashi, K., and Sekiya, T.** (1990) Detection of ras gene mutations in human lung cancers by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. *Oncogene* 5: 1037-1043.
- Theillet, C., Lidereau, R., Escot, C., Hutzell, P., Brunet, M., Gest, J., Scholm, J., Callahan, R.** (1986) Loss of c-H-ras1 allele and aggressive human primary breast carcinomas. *Cancer Res* 46: 4776-4781.
- Trahey, M. & McCormick, F.** (1987) Cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase but does not affect oncogenic mutants. *Science* 238: 542-545.
- Van den Brule, A.J.C., Snijders, P.J.F., Gordijn, R.L.J., Bleker, O.P., Meijer, C.J.L.M., Walboomers, J.M.M.** (1990) General primer-mediated polymerase chain reaction permits the detection of sequenced and still unsequenced human papillomavirus genotypes in cervical scrapes and carcinomas. *Int J Cancer* 45: 644-649.
- Varmus, H.E.** (1984) The molecular genetics of cellular oncogenes. *Annu Rev Genet* 18: 553-612.

Vousden, K.H. (1989) Human papillomaviruses and cervical carcinoma. *Cancer Cells* 1(2): 43-50.

Wang, H.P., Rogler, C.E. (1988) Deletions in human chromosome arms 11p and 13q in primary hepatocellular carcinomas. *Cytogenet Cell Genet* 48: 72-78.

Werness, B.A., Levine, A.J., Howley, P.M. (1990) Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248: 76-79.

Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., Beach, D. (1993) p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366: 701-704.

Yokota, J., Tsunetsugu-Yokota, Y., Batiffora, H., LeFevre, C., Cline, M.J. (1986) Alterations of myc, myb and ras^H proto-oncogenes in cancers are frequent and show clinical correlation. *Science* 231: 261-265.

Yonish-Rouach, E., Grunwald, D., Wilder, S., Kimchi, A., May, E., Lawrence, J.J., May, P., Oren, M. (1993) p53-mediated cell death: relationship to cell cycle control. *Mol Cell Biol* 13: 1415-23.

Yunis, J.J., Soreng, A.L. (1984) Constitutive fragile sites and cancer. *Science* 226: 1199-1204.

zur Hausen, H. (1991) Viruses in human cancers. *Science* 254: 1167-72.