



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**



**PARTICIPACION DE H-RAS EN EL
CONTROL DE LA TRANSICION G2/M
DEL CICLO CELULAR**

T E S I S

Que para obtener el grado de :

**Doctora de Ciencias
(Biomédicas)**

Presenta:

Carla Santana Torres

Tutor: Dr. Alejandro García Carrancá

Ciudad Universitaria

Marzo 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

INDICE GENERAL

	Página:
INDICE DE FIGURAS.....	5
GLOSARIO Y ABREVIATURAS.....	6
RESUMEN	7
ABSTRACT.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
• Punto de restricción G2/M del ciclo celular.....	11
• Punto de control de G2 en respuesta al daño al ADN.....	16
• Participación de Ras en la transducción de señales extracelulares.....	20
• Ras y el ciclo celular: Participación de ras en el punto de restricción G2/M.....	24
• Participación de p53 en el punto de restricción G2/M.....	28
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	32
HIPÓTESIS.....	32
OBJETIVOS.....	33
MATERIAL Y METODOS.....	34
• Cultivos celulares y Tratamientos.....	34
• Secuenciación del producto de PCR.....	34
• Análisis del Ciclo Celular por Citofluorometría de flujo.....	35
• Extracción de ARN y Análisis de Northern blot.....	35
• Retrotranscripción, PCR y corte con la enzima de restricción Nae I.....	36
• Extractos celulares y Análisis por Western blot.....	37
• Tinción celular e inmunofluorescencia.....	38
• Inmunoprecipitación y Ensayos de cinasa <i>in vitro</i>	38
• Transfección transitoria y Ensayo de actividad de luciferasa.....	39
RESULTADOS.....	40
• I. Caracterización de las células HeLa transfectadas con el oncogen H-ras.....	40
• II. H-ras induce la expresión de la ciclina B1 y regula al complejo ciclina B1/cdc2 a través de una vía independiente de p53.....	46
• III. El aumento de la ciclina B1 nuclear inducido por H-ras provoca alteraciones en la cinética de actividad del complejo ciclina B1/cdc2.....	55
• IV. El oncogen H-ras induce alteraciones en la respuesta al daño al ADN.....	61
DISCUSION.....	71
CONCLUSIONES.....	84
PERSPECTIVAS.....	85
BIBLIOGRAFIA.....	86
ANEXO I: Artículo Publicado.....	98

INDICE DE FIGURAS

Figura :	Página:
1. Esquema del ciclo celular con las ciclinas y las cdks más importantes.....	10
2. Regulación del complejo ciclina B1/cdc2.....	14
3. Regulación del complejo ciclina B1/cdc2 después del daño al ADN.....	19
4. Estados conformacionales de Ras.....	22
5. Cascada de las MAP cinasas regulada por Ras.....	25
6. Las células HeLa tienen el gen H-ras normal y las células transfectadas expresan el oncogen.....	41
7. Las células que expresan el oncogen H-ras salen antes del arresto en G1/S.....	43
8. Alteración en los niveles de las proteínas fra, fos y β -catenina en las células que expresan el oncogen H-ras.....	45
9. El oncogen H-ras incrementa los niveles de la proteína ciclina B1.....	47
10. El oncogen H-ras incrementa los niveles de la ciclina B1 por célula.....	48
11. El oncogen H-ras incrementa los niveles del mensajero de la ciclina B1.....	48
12. El oncogen H-ras aumenta la expresión del gen de la ciclina B1 por una vía independiente de p53.....	50
13. El oncogen H-ras incrementa los niveles del complejo ciclina B1/cdc2.....	52
14. El oncogen H-ras induce un aumento en la actividad del complejo ciclina B1/cdc2.....	54
15. El oncogen H-ras incrementa los niveles de la ciclina B1 nuclear.....	56
16. El oncogen H-ras induce un aumento en los niveles de la ciclina B1 nuclear por célula.....	57
17. H-ras oncogénico provoca que la actividad del complejo ciclina B1/cdc2 se recupere más rápidamente después del daño al ADN.....	59
18. En las primeras 12 horas, después de la exposición a etopósido, no se observan diferencias en la distribución de las fases del ciclo celular.....	60
19. En las primeras 6 horas, después de la exposición a etopósido, no se observan diferencias en la cantidad del complejo ciclina B1/cdc2.....	62
20. En las primeras 6 horas, después de la exposición a etopósido, no se observan diferencias en la cantidad de la ciclina B1.....	63
21. La expresión del oncogen H-ras induce la liberación prematura del arresto en G2 provocado por etopósido.....	65
22. La expresión del oncogen H-ras induce la liberación prematura del arresto en G2 en cultivos sincrónicos.....	66
23. Una mayor actividad del complejo ciclina B1/cdc2 demuestra la liberación prematura del arresto en G2 provocada por el oncogen H-ras.....	67
24. Las alteraciones nucleares provocadas por la exposición a etopósido son potenciadas por el oncogen H-ras.....	70

GLOSARIO Y ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
AP1	complejo formado por proteínas de la familia Fos y Jun
AP2	factor de transcripción
ARN	ácido ribonucleico
ATM	cinasa
Cdc2	CDK
Cdc25	fosfatasa de cdc2
CDK	cinasa dependiente de ciclina
CDKI	inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas
Chk	cinasa
CRS	señal de retención citoplásmica
E2F	factor de transcripción
Erk1	factor de transcripción
ETS	factor de transcripción
FOS	factor de transcripción
GAP	proteína activadora de GTPasas
GEF	factor intercambiador de guanín-nucleótidos
Grb	proteína adaptadora que se une a receptores
JUN	factor de transcripción
MAP	proteína activada por mitógenos
MAX	factor de transcripción
MEK	cinasa de MAP
MYC	proto-oncogen con función de factor de transcripción
Myt1	cinasa de cdc2
NÉO	neomicina
NES	señal de exportación nuclear
NF-Y	factor de transcripción
NLS	señal de localización nuclear
p16/INK4	CDKI
p19/ARF	CDKI
p21/WAF	CDKI
p27/KIP1	CDKI
p53	gen supresor de tumores
PCNA	antígeno nuclear de proliferación celular
Plk	cinasa similar a las proteínas Polo
Raf	MAP cinasa
Rb	retinoblastoma
JNK	cinasa de jun amino-terminal
Sos	GEF de la proteína ras
SP1	factor de transcripción
SV40	virus de simio 40
USF	factor de transcripción
VPH	virus del papiloma humano
Wee	cinasa de cdc2

RESUMEN

Las proteínas Ras participan en la regulación de las transiciones de una fase a otra del ciclo celular, principalmente en el punto de control de G1/S. Sin embargo, hay datos que sugieren que también juegan un papel importante en el control de la transición G2/M. Por otro lado, se ha reportado la importancia de p53 en la regulación del punto de control de G2, al reprimir la transcripción de la ciclina B1 e impedir su localización nuclear. Sin embargo, existen evidencias que indican que vías independientes de p53 también participan en este punto de control. Se sabe que el complejo ciclina B1/cdc2 es el regulador clave en la transición G2/M del ciclo celular y su actividad es regulada por la fosforilación /desfosforilación de la cinasa cdc2, así como por la cantidad y la localización de la ciclina B1. Con el objetivo de evaluar si H-ras regula el punto de control de G2 a través de una vía independiente de p53 se determinó si H-ras modula la expresión y localización de la ciclina B1 y por tanto la actividad del complejo ciclina B1/cdc2 en células deficientes de p53. Se observó, en la presencia del oncogen H-ras, una inducción en la actividad del promotor de la ciclina B1 en células SW480, que contienen los dos alelos nulos de p53. Mientras que las células HeLa, que expresan al oncogen E6 del VPH18 que inactiva a p53, presentaron mayores niveles de la proteína ciclina B1 y de su mensajero al transfectarlas con el oncogen H-ras. Los niveles elevados de la expresión de la ciclina B1 correlacionan con mayores niveles en la cantidad y actividad del complejo ciclina B1/cdc2, los cuales no se inhiben después de inducir un daño al ADN con etopósido. Se encontró mayor cantidad de la ciclina B1 nuclear en las células que expresan el oncogen H-ras, incluso después de inducir un daño al ADN. Las células que expresan el oncogen H-ras exhibieron un arresto menor en G2 después de tratarlas con etopósido. Estos datos sugieren que H-ras participa en vías independientes de p53 que regulan la expresión y localización de la ciclina B1 y por tanto controlan en el punto de restricción de G2/M.

ABSTRACT

Ras proteins regulate cell-cycle phase transitions, mainly the G1/S checkpoint. Some data suggest that they could also play an important role in the control of the G2/M transition. On the other side, the role of p53 in controlling the G2 checkpoint, in part by repressing cyclin B1 transcription and its nuclear localization, has been well established. However accumulating evidence indicate that p53-independent pathways may also play an important role. Cyclin B1/cdc2 complex is the key regulator controlling the G2/M checkpoint, it is regulated by the phosphorylation state of cdc2 and by the amount and localization of cyclin B1. We were interested in addressing whether the H-ras oncogene could participate in the G2 checkpoint by regulating cyclin B1 expression and cyclin B1/cdc2 activity in a p53-independent manner. We observed an induction of cyclin B1 promoter activity in the presence of H-ras oncogene in SW480 cells, which contain null p53 alleles. In addition, HeLa cells known to express the HPV18 *E6* oncogene that inactivates p53, exhibited increased levels of cyclin B1 mRNA and protein when transfected with the H-ras oncogene. Higher expression of cyclin B1 correlated with enhanced levels of cyclin B1/cdc2 complex and kinase activity that, interestingly, showed no inhibition after DNA damage. We found more nuclear cyclin B1 protein in cells expressing oncogenic H-ras, even after DNA damage. We observed that HeLa cells expressing oncogenic H-ras exhibited a reduced delay in the G2 phase when treated with etoposide. These data suggest that H-Ras participates in pathways that regulate cyclin B1 expression and localization and therefore controls the G2/M checkpoint in a p53-independent manner.

INTRODUCCION

El ciclo celular se divide en cuatro fases. La fase G1, es el periodo durante el cual las células crecen de tamaño y sintetizan los componentes necesarios para una adecuada replicación. Durante la fase S ocurre la replicación del ADN. La fase G2, separa el final de la fase S de la mitosis o fase M, para asegurar que se ha completado la síntesis de ADN antes de la división celular. Finalmente, la mitosis que se divide en dos, la cariocinesis en donde se separan los cromosomas y la citocinesis en donde se separan las dos células hijas. La división celular debe ocurrir de manera coordinada para asegurar que la célula dé origen a dos células hijas con el material genético completo. Esto se logra gracias a la existencia de puntos de control que determinan la progresión o no en el ciclo, a través de mecanismos complejos en los que participan moléculas que promueven la transición de una fase a otra del ciclo celular. Las moléculas más importantes están constituidas principalmente por complejos integrados por una ciclina, la subunidad reguladora, y una cinasa dependiente de ciclina (cdk) (Figura 1). La activación e inactivación de estos complejos depende de una serie de señales externas e internas a la célula, en las que participan diversas proteínas, para asegurar la adecuada regulación del ciclo celular.

Los mecanismos de control de la proliferación celular se encuentran regulados en las células y la desregulación de los mismos debido a múltiples alteraciones genéticas forman parte de los procesos de la transformación celular. Los mecanismos de transducción de señales aseguran que se den respuestas adecuadas al ambiente externo que rodea a la célula y al estado interno de las mismas. Estas vías de transducción y monitoreo utilizan tanto proto-oncogenes como genes supresores de tumores, así como proteínas que participan en la regulación de los puntos de control dentro del ciclo celular.

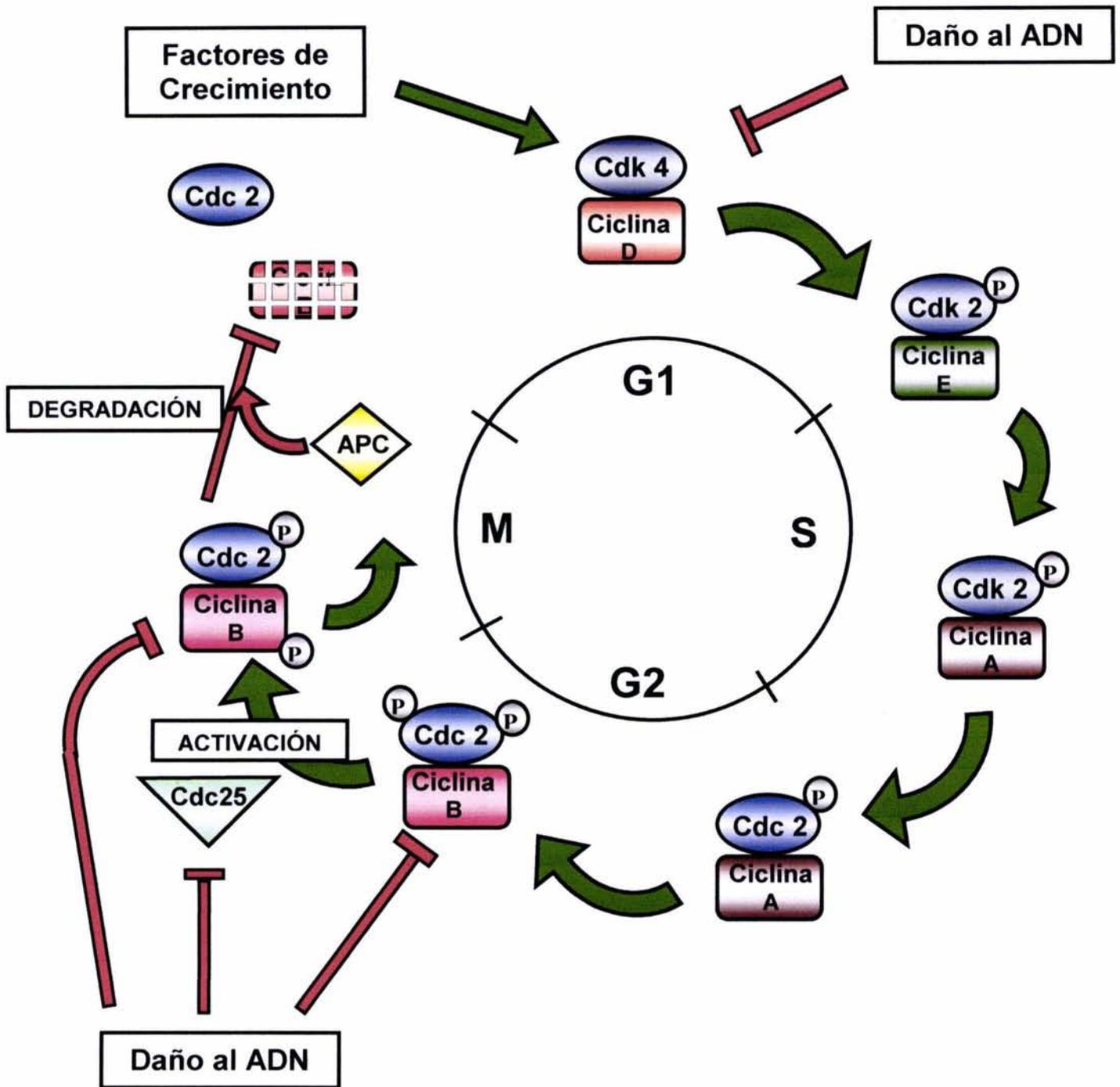


Figura 1.- Esquema del ciclo celular con las ciclinas y las cdk's más importantes. Las moléculas que promueven la transición de una fase a otra del ciclo celular están constituidas principalmente por complejos integrados por una ciclina y una cdk. El complejo ciclina D/cdk4 es el responsable de la progresión en G1 y el complejo ciclina E/cdk2 es esencial para la transición G1/S. Los complejos ciclina A/cdk2 y ciclina A/cdc2 son requeridos en S para la eficiente replicación del ADN y la entrada a G2. La entrada a la mitosis está marcada por la activación del complejo ciclina B1/cdc2 y es importante para que se lleve a cabo la división celular. Se requiere de la destrucción de la ciclina B1 para la entrada a la citocinesis y que se complete adecuadamente el ciclo celular. La activación de cada complejo depende en parte del complejo anterior y está regulada por una serie de señales externas e internas a la célula, en las que participan diversas proteínas celulares. Las flechas verdes indican activación y las rojas inhibición.

Muchos de estos componentes aparentemente no son necesarios cuando las condiciones de crecimiento son óptimas pero son vitales cuando la célula se encuentra en condiciones de estrés. Los defectos en los componentes de los puntos de control están asociados a un aumento en el número de mutaciones así como a una inestabilidad cromosómica. Las células en proliferación normalmente responden a daños al ADN o a condiciones de estrés mediante el arresto en los puntos de transición G1/S y G2/M así como en la síntesis de ADN. Este arresto le permite a las células ganar tiempo para reparar las lesiones mutagénicas o letales antes de que el genoma se altere de manera irreversible durante la replicación del ADN o la segregación mitótica.

Punto de restricción G2/M del ciclo celular

En las células eucariontes, el complejo ciclina B1/cdc2 es el regulador clave de la transición G2/M del ciclo celular. La actividad de este complejo es regulada tanto por la acumulación de la ciclina B1 como por el estado de fosforilación de cdc2 (una cdk). Se sabe que los niveles de la cinasa cdc2 se mantienen constantes a lo largo del ciclo celular mientras que los de la ciclina B1 se incrementan a finales de la fase S. En S tardía, se observa tanto un aumento en la actividad del promotor de la ciclina B1 como en la estabilidad de su ARN mensajero. Por lo tanto los niveles de proteína de la ciclina B1 son bajos en G1 y estos aumentan al final de la fase S, con un pico en G2/M (Pines & Hunter, 1989; Maity et al., 1995; Piaggio et al., 1995). Se ha reportado que existen dos transcritos de la ciclina B1 que difieren por 65 pares de bases debido a la presencia de dos sitios alternativos de inicio de la transcripción. El transcrito más largo se expresa constitutivamente a niveles muy bajos, mientras que el transcrito corto es ciclo-dependiente y solo se expresa en la fase G2/M del ciclo celular. Se ha demostrado que el promotor se encuentra

inactivo en células quiescentes y en la fase G1, y se activa a finales de S aumentando su actividad tras la entrada a G2 (Cogswell et al., 1995; Hwang et al., 1995; Piaggio et al., 1995; Hwang et al., 1998). El promotor de la ciclina B1 no tiene una caja TATA y presenta dos elementos CCAAT a los cuales se une el factor de transcripción NF-Y; al parecer, estos elementos son importantes para la inducción del promotor a su máxima actividad en las fases S y G2 (Cogswell et al., 1995; Piaggio et al., 1995; Katula et al., 1997; Farina et al., 1999). Se ha descrito que el promotor de la ciclina B1 es activado por los complejos ciclina D1/cdk4, ciclina E /cdk2 y ciclina A /cdk2 a través de los dos elementos CCAAT y que esta activación depende del factor NF-Y. Interesantemente, el factor NF-Y presenta un posible sitio de fosforilación por los complejos ciclina /cdk (Katula et al., 1997). Además se han identificado los sitios de unión de los factores de transcripción E2F, SP1, AP2 y una caja E a la cual se le unen los factores de transcripción USF y Max, activando y reprimiendo respectivamente la actividad del promotor (Cogswell et al., 1995; Piaggio et al., 1995; Farina et al., 1996; Taylor et al., 1999).

La entrada a la mitosis está controlada por la activación del complejo ciclina B1/cdc2, a través de eventos de fosforilación /desfosforilación de la cdk, siendo estos altamente regulados. El complejo ciclina B1/cdc2 se mantiene inactivo por las cinasas Wee1 y Myt1, que fosforilan a cdc2 en los residuos Thr-14 y Tyr-15 hasta la entrada a la mitosis, cuando este es activado por acción de las fosfatasas cdc25B y cdc25C. El balance entre estas dos vías modula la función de cdc2, permitiendo el arresto o el avance a la mitosis (Krek & Nigg, 1991; Kumagai & Dunphy, 1991; Strausfeld et al., 1991; Parker & Piwnicka-Worms, 1992; McGowan & Russell, 1993; Hoffman & Karsenti, 1994; King, 1994; Mueller et al., 1995; Gabrielli et al., 1996). Es importante señalar que cdc25 es a su vez un substrato específico del complejo ciclina B1/cdc2, el cual la fosforila induciendo su actividad de fosfatasa. Este mecanismo de retroalimentación positiva permite que el complejo ciclina B1/cdc2 se active rápidamente para entrar a mitosis y permite la auto-amplificación de la

actividad del complejo (Figura 2) (Hoffman et al., 1993; Gabrielli et al., 1996). Muchas líneas celulares derivadas de tumores activan al complejo ciclina B1/cdc2 independientemente del estado del ADN y por lo tanto entran a mitosis con daños en el mismo, al parecer por un defecto en la regulación de la fosforilación de cdc2. El defecto puede encontrarse en una inhibición de la cinasas Wee1/Myt1 o en una estimulación constante de las fosfatasas cdc25B/cdc25C. Cabe mencionar que en la fase G2 del ciclo celular, la cinasa Wee1 y la fosfatasa cdc25C son proteínas que se encuentran principalmente en el núcleo, mientras que Myt1 y cdc25B se encuentran en el citoplasma (Millar et al., 1991; Girard et al., 1992; Heald et al., 1993; McGowan & Russell, 1995; Mueller et al., 1995; Gabrielli et al., 1996). La función de ambas cinasas o fosfatasas no parece ser redundante (Liu, et al., 1997; Karlsson et al., 1999) y como veremos más adelante la regulación de la localización intracelular también es muy importante para el control de la actividad del complejo ciclina B1/cdc2.

La actividad del complejo ciclina B1/cdc2 es regulada también por la localización del complejo a través de fosforilaciones de la ciclina B1. Se sabe que durante la interfase del ciclo celular, la ciclina B1 se acumula en el citoplasma debido a que la importación nuclear es contrarrestada por una exportación nuclear más rápida. Este evento es mediado por un sitio hidrofóbico atípico de señal de exportación nuclear (NES), localizado dentro de la secuencia de retención al citoplasma (CRS) en la ciclina B1, que se une al factor exportina1/CRM1 para su translocación al citoplasma (Pines & Hunter, 1994; Hagting et al., 1998; Toyoshima et al., 1998; Yang, et al., 1998). En la fase G2 tardía, la ciclina B1 es fosforilada en 4 residuos de serina que se encuentran dentro de la región CRS para su rápida translocación al núcleo y el inicio de la mitosis. Se ha observado que una mutante de la ciclina B1 no fosforilable (cambio de Ser a Ala en las 4 posiciones) se acumula en el citoplasma con una alta velocidad de exportación nuclear, mientras que una mutante que asemeja al estado fosforilado (cambio de Ser a Glu) se transloca

CITOPLASMA

NUCLEO

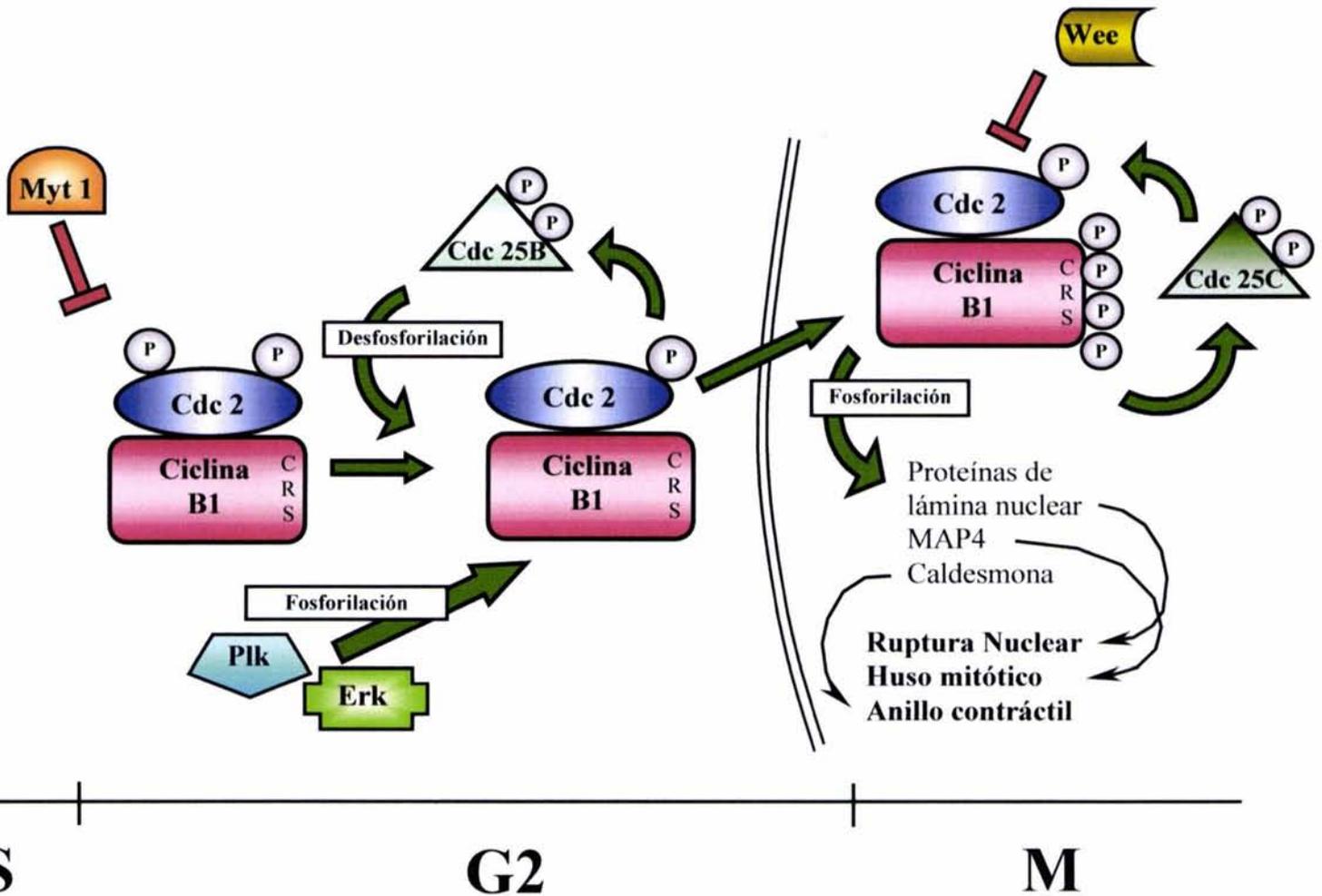


Figura 2.- Regulación del complejo ciclina B1/cdc2. La entrada a la mitosis está controlada por la activación del complejo ciclina B1/cdc2, el cual se mantiene inactivo por las cinasas Wee1 y Myt1, que fosforilan a cdc2 en los residuos Thr-14 y Tyr-15 hasta el inicio de la mitosis, cuando este es activado por acción de las fosfatasas cdc25B y cdc25C. Cdc25 es a su vez un sustrato específico del complejo ciclina B1/cdc2, el cual la fosforila induciendo su actividad de fosfatasa. La actividad del complejo es regulada también por la localización celular. Durante la interfase del ciclo celular, la ciclina B1 se acumula en el citoplasma y en G2 es fosforilada en 4 residuos de serina que se encuentran dentro de la región CRS, creándose un sitio de NLS que induce su rápida translocación al núcleo y el inicio de la mitosis. Las cinasas que se sabe, fosforilan a la ciclina B1 son Plx1/Plk1 y Erk (una MAP cinasa). Las flechas verdes indican una regulación positiva y las rojas una regulación negativa.

rápidamente al núcleo (Izumi & Maller, 1991; Pines & Hunter, 1991, Li et al., 1995; Jin et al., 1996, Li et al., 1997; Yang et al., 1998). Se ha propuesto que la fosforilación de uno de los residuos de serina en la región CRS de la ciclina B1 reduce la velocidad de exportación nuclear al inhibir la unión de la ciclina a la proteína exportina1/CRM1, ya que una mutante constitutivamente fosforilada (Glu) no se une a este factor (Yang et al., 1998; Yang et al., 2001). Datos más recientes demuestran que la fosforilación coordinada de los 4 residuos de serina en el sitio CRS aumentan la importación nuclear al crearse un sitio de señal de localización nuclear (NLS) en la ciclina B1 que induce su rápida translocación (Hagting et al., 1999; Yang et al., 2001) (Figura 2).

Las cinasas que fosforilan a la ciclina B1 durante G2 no se han identificado totalmente, pero se ha reportado que tanto en *Xenopus* como en células de mamífero, por lo menos uno de los residuos de serina es fosforilado por la cinasa Plx1/Plk1, que pertenece a la familia de las cinasas semejantes a las POLO, inhibiendo su exportación nuclear al prevenir la unión de la ciclina B1 al factor CRM1 y provocando su acumulación en el núcleo (Toyoshima et al., 2001; Yang et al., 2001; Yuan et al., 2002; Walsh et al., 2003). Mientras que la fosforilación de los residuos Ser-94 y Ser-96 en *Xenopus* o Ser-126 y Ser-128 en mamífero son fosforilados por Erk, una MAP cinasa (proteínas activadas por mitógenos) (Izumi & Maller, 1991; Yuan et al., 2002; Walsh et al., 2003)

Se han identificado muchos substratos del complejo ciclina B1/cdc2, además de las proteínas de la lámina nuclear, láminas B y C, se ha visto que fosforila proteínas que unen actina, como la caldesmona, y proteínas asociadas a microtúbulos, como MAP4. La ciclina B se ha encontrada asociada a los centrosomas (Peter et al., 1990; Yamashiro et al., 1990; Bailly et al., 1992; Ookata et al., 1995). Además, otro de sus substratos es la fosfatasa cdc25C, que es la que activa al mismo complejo ciclina B1/cdc2, por lo que se da un asa de retroalimentación positiva. Esto pareciera indicar que la ciclina B no solo regula la

entrada a mitosis sino que participa en los eventos necesarios para que ésta pueda llevarse a cabo. Así, participa en la reorganización del citoesqueleto de actina que provoca que las células se redondeen para poder dividirse, en la reorganización de los microtúbulos para la formación del huso mitótico y en la ruptura nuclear para la segregación de los cromosomas.

Punto de control de G2 en respuesta al daño al ADN.

Para mantener su estabilidad genómica, las células normales deben de garantizar que la replicación del ADN se complete totalmente antes de entrar a mitosis, a través de mecanismos complejos que operan en el punto de transición G2/M (Norbury & Nurse, 1992). Los agentes que causan daño al ADN inducen, entre otras cosas, un arresto en G1 y en G2 para permitir que las células reparen las lesiones en el ADN antes de entrar a mitosis (Lock & Ross, 1990; Tsao et al., 1992; O'Connor et al., 1993; Tounekti et al., 1993; Bernhard et al., 1994). Como se dijo al inicio, muchos estudios indican que el complejo ciclina B1/cdc2 es un elemento clave en el punto de control de G2.

El estado de fosforilación de cdc2 representa un paso limitante para controlar la entrada a la mitosis después del daño al ADN (Krek & Nigg, 1991b). Se sabe que la exposición al agente citotóxico, etopósido, inhibe la actividad del complejo al inducir la fosforilación de cdc2 en el residuo de Tyr-15 (Lock & Ross, 1990a; Lock, 1992; Tsao et al., 1992), y las metilxantinas, como la cafeína, potencian la citotoxicidad al evitar el arresto inicial en G2, ya que inducen la desfosforilación de cdc2 y por tanto la activación del complejo (Lock, et. al. 1994). Los mecanismos que regulan la fosforilación de cdc2 después del daño al ADN están mediados en parte por la cinasa ATM que fosforila y activa a la cinasa Chk1/Chk2, la cual fosforila a cdc25C creando un sitio de unión a la proteína 14-3-3. La proteína 14-3-3 secuestra a cdc25C en el citoplasma e impide que desfosforile y active a cdc2 en el núcleo

(Figura 3). Es importante mencionar que al parecer la actividad de la fosfatasa no se ve alterada tras la unión a la proteína 14-3-3 (Peng et al., 1997; Sánchez et al., 1997; Cliby et al., 1998; Matsuoka et al., 1998; López-Girona et al., 1999; Liu et al., 2000). Mientras que la fosfatasa cdc25B se acumula en el núcleo tras el daño al ADN, impidiendo así que desfosforile a cdc2 en el citoplasma (Gabrielli et al., 1997).

Sin embargo, se ha observado que la transfección de mutantes de cdc2 que no pueden ser fosforiladas en los sitios inhibitorios, no elimina completamente el arresto en G2 inducido por daño al ADN, aunque presentan una elevada actividad de cinasa del complejo ciclina B1/cdc2; esto indica que existen otros mecanismos de control (Heald, 1993; Jin et al., 1996; Jin et al., 1998). Existen evidencias que indican que los niveles de la ciclina B1 juegan un papel muy importante en esta respuesta. La radiación de células HeLa, de cultivos sincronizados en la fase S, inhibe transitoriamente la expresión de la ciclina B1 (Muschel et al., 1991; Muschel et al., 1993; Maity et al., 1995). La inhibición en la transcripción del promotor de la ciclina B1 tras daño al ADN al parecer esta mediada por los elementos CCAAT y el factor de transcripción NF-Y (Manni et al., 2001). Por otro lado, se ha reportado que en células que sobre-expresan la ciclina B1 se observa una reducción en el arresto en G2 inducido por radiación (Kao et al., 1997; Jin et al., 1998), siendo este efecto más dramático cuando se co-expresa una mutante de cdc2 incapaz de ser fosforilada en los residuos Thr-14 y Tyr-15 (Jin et al., 1998).

Además, la retención de la ciclina B1 en el citoplasma parece ser otro mecanismo redundante que asegura que las células se queden arrestadas en G2 después de un daño al ADN. Se ha demostrado que la ciclina B1 permanece en el citoplasma en células arrestadas que han sufrido daño al ADN (Jin et al., 1996; Gabrielli et al., 1997) y que una mutante constitutivamente dirigida al núcleo, a través de un sitio de señal de transporte nuclear, parcialmente contrarresta el arresto en G2 (Jin et al., 1998). Por otro lado en células, que expresan la ciclina B1

con el sitio de exportación nuclear mutado, tratadas con cafeína se reduce significativamente el arresto en G2 inducido por la exposición a etopósido (Toyoshima, et al., 1998). La proteína 14-3-3 σ está involucrada en el secuestro de la ciclina B1 en el citoplasma, después de inducir daño al ADN las células 14-3-3 σ -/- son incapaces de mantener el arresto en G2 y mueren por catástrofe mitótica debido a que no pueden evitar que el complejo ciclina B1/cdc2 entre al núcleo (Figura 3) (Chan et al., 1999). También se ha reportado que la cinasa Myt1 pueda estar jugando un papel importante en el secuestro del complejo ciclina B1/cdc2 en el citoplasma tras el daño al ADN (Liu, et al., 1999). Estos mecanismos de regulación tienen como fin último mantener a las células arrestadas el tiempo necesario para que se reparen las lesiones en el ADN. Existen diferentes agentes citotóxicos que dependiendo del tipo de daño activan diferentes vías de transducción de señales.

Por otro lado, se sabe que el etopósido induce cortes en el ADN de cadena sencilla o doble, al formar un complejo estable con la topoisomerasa II unida al ADN (Liu, 1989). Exposiciones cortas (1 hora) al etopósido y a bajas dosis provocan principalmente cortes de cadena sencilla. Aunque las lesiones al ADN son rápidamente reparadas al retirarse el etopósido, las células se mantienen arrestadas en G2 por tiempos largos (48 a 72 hrs.), indicando que el complejo formado entre el etopósido, la enzima y el ADN inducen inmediatamente la activación de los mecanismos de supervivencia que previenen de una catástrofe mitótica (Lock & Ross, 1990b; Lock, 1992). Sin embargo, se observa después del tratamiento, una fracción de células que son liberadas prematuramente del arresto y por tanto mueren por muerte mitótica (Lock et al., 1994). La exposición a bajas concentraciones de cafeína (1mM), después de haber tratado a las células con etopósido, acelera significativamente la velocidad de aparición de las células gigantes y multinucleadas, además de aumentar la incidencia de muerte mitótica. Las metilxantinas, como la cafeína y la pentoxifilina, potencian la citotoxicidad de

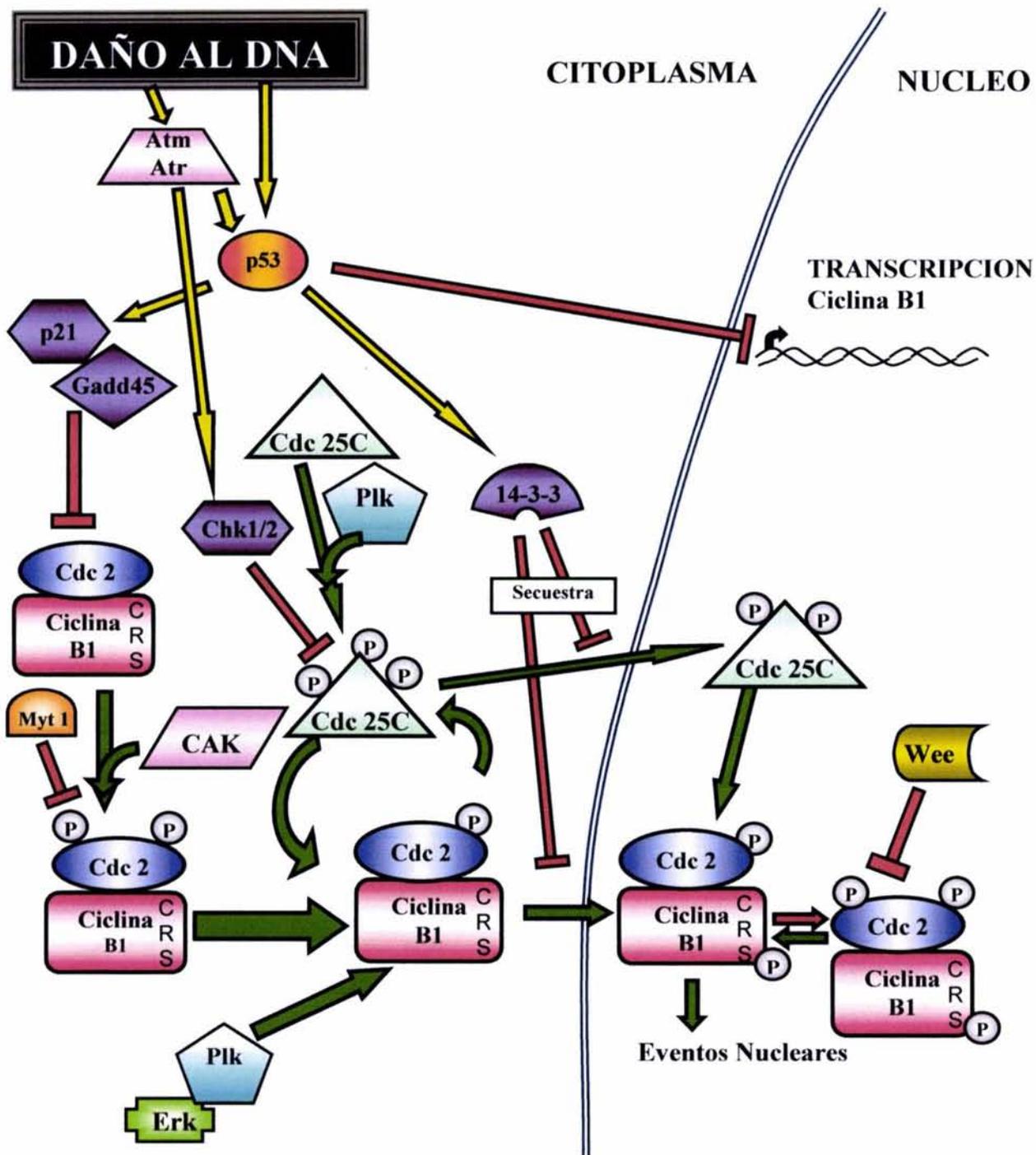


Figura 3.- Regulación del complejo ciclina B1/cdc2 después del daño al ADN. Los mecanismos que regulan la fosforilación de cdc2 después del daño al ADN están mediados en parte por la cinasa ATM que fosforila y activa a la cinasa Chk1/Chk2, la cual fosforila a cdc25C creando un sitio de unión a la proteína 14-3-3; ésta secuestra a cdc25C en el citoplasma e impide que desfosforile y active a cdc2. Por otro lado, después del daño al ADN, p53 reprime la transcripción del promotor de la ciclina B1 e induce la transcripción de la proteína 14-3-3 σ , la cual se une y secuestra a la ciclina B1 en el citoplasma. La actividad del complejo ciclina B1/cdc2 también es regulada por p53 a través de las proteínas p21 y Gadd45, las cuales se unen al complejo ciclina B1/cdc2 y lo inactivan. Las flechas verdes indican activación, las rojas indican inhibición y las amarillas indican activación de proteínas que inducen una inhibición.

agentes que dañan el DNA, como el etopósido, al evitar el arresto inicial en G2, probablemente permitiendo menos tiempo para reparar las lesiones del DNA causadas por el agente.

La muerte mitótica fue descrita por primera vez en células tratadas con bajas dosis de radiación ionizante. La radiación ionizante y diversos agentes, como las epipodofilotoxinas (etopósido) o agentes radio-miméticos como la bleomicina, provocan daño en el DNA y citotoxicidad en células de mamífero. Estos eventos al parecer culminan en dos diferentes manifestaciones de muerte celular: a) apoptosis o b) muerte mitótica; dependiendo de la dosis de radiación ionizante, del agente citotóxico o de la duración del tratamiento (Chang et al., 1991; Tounekti, et. al. 1993; Lock, et. al. 1994). Los eventos moleculares que controlan la muerte mitótica aún se desconocen. Al parecer es un proceso lento, dependiente de la actividad mitótica, en donde las células después de dos o tres ciclos de duplicación mueren. Se caracteriza por un arresto inicial y transitorio en G2 y la subsiguiente liberación de dicho arresto que provoca la aparición de células multinucleadas, micronúcleos y un aumento del tamaño celular.

Participación de Ras en la transducción de señales extracelulares.

Las proteínas ras participan en la transducción de señales involucradas en procesos de proliferación, transformación, diferenciación celular y apoptosis o envejecimiento. Estas proteínas pertenecen a una familia extensa de GTPasas, que participan en el control de una gran variedad de procesos celulares. Este gran grupo de proteínas, la familia de proteínas G, incluye además de la súper-familia ras, proteínas involucradas en síntesis de proteínas, como factores de iniciación y elongación, y las proteínas G heterotriméricas (Boguski, & McCormick, 1993).

La subfamilia Ras, en los seres humanos, está conformada por tres genes funcionales: H-ras-1 (localizado en el brazo corto del cromosoma 11), K-ras-2

(brazo corto del cromosoma 12) y N-ras (brazo corto del cromosoma 1) los tres genes codifican para proteínas homólogas de un peso molecular de 21 kDa. Existen además dos pseudogenes ras: H-ras-2 (localizado en el cromosoma X) y K-ras-1 (cromosoma 6) (Ellis et. al., 1981; Santos et. al., 1982; McGrath et. al., 1983; Barbacid, 1987).

Las proteínas ras, como todas las GTPasas, son moléculas que unen GTP y tienen la capacidad de hidrolizarlo, funcionando como un interruptor con dos estados conformacionales: GDP-unido, estado inactivo, y GTP-unido, estado activo. El estado activo perdura hasta que el GTP es hidrolizado. La función básica del interruptor molecular es regular cíclicamente la transmisión de una señal a un efector, que se encuentra abajo en la cascada de señalización (Bourne, et. al. 1990). Cuando recibe una señal extracelular se intercambia GDP, estado inactivo, por GTP, estado activo, adquiriendo entonces un estado conformacional diferente que le permite interactuar con el efector; esta interacción termina cuando se da la hidrólisis del GTP (Figura 4) (Downward, 1990; Bourne, et. al. 1990; Hall, 1994). El ciclaje entre la forma activa e inactiva de la GTPasa, se encuentra regulado principalmente por tres diferentes clases de proteínas: proteínas activadoras de GTPasas (GAPs), factores intercambiadores de guanin-nucleótidos (GEFs) e inhibidores de la disociación de guanin-nucleótidos (GDIs), (Boguski, & McCormick, 1993; Feig, 1994; McCormick, 1994; Quilliam, et. al. 1995)

Las formas oncogénicas de ras rompen con el equilibrio entre la forma inactiva y la activa de la proteína, pues la estabilizan en su estado activo, unido a GTP, provocando un flujo continuo de la señal estimuladora, lo cual resulta en la transformación maligna de las células. Las proteínas ras adquieren la propiedad de inducir transformación por una única mutación puntual. Las mutaciones que se encuentran en tumores humanos se localizan en los codones 12, 13, 59 o 61, siendo la más común en el codón 12. Aunque en el codón 12 la sustitución con cualquier aminoácido transforma la proteína en oncogénica, generalmente se da el cambio

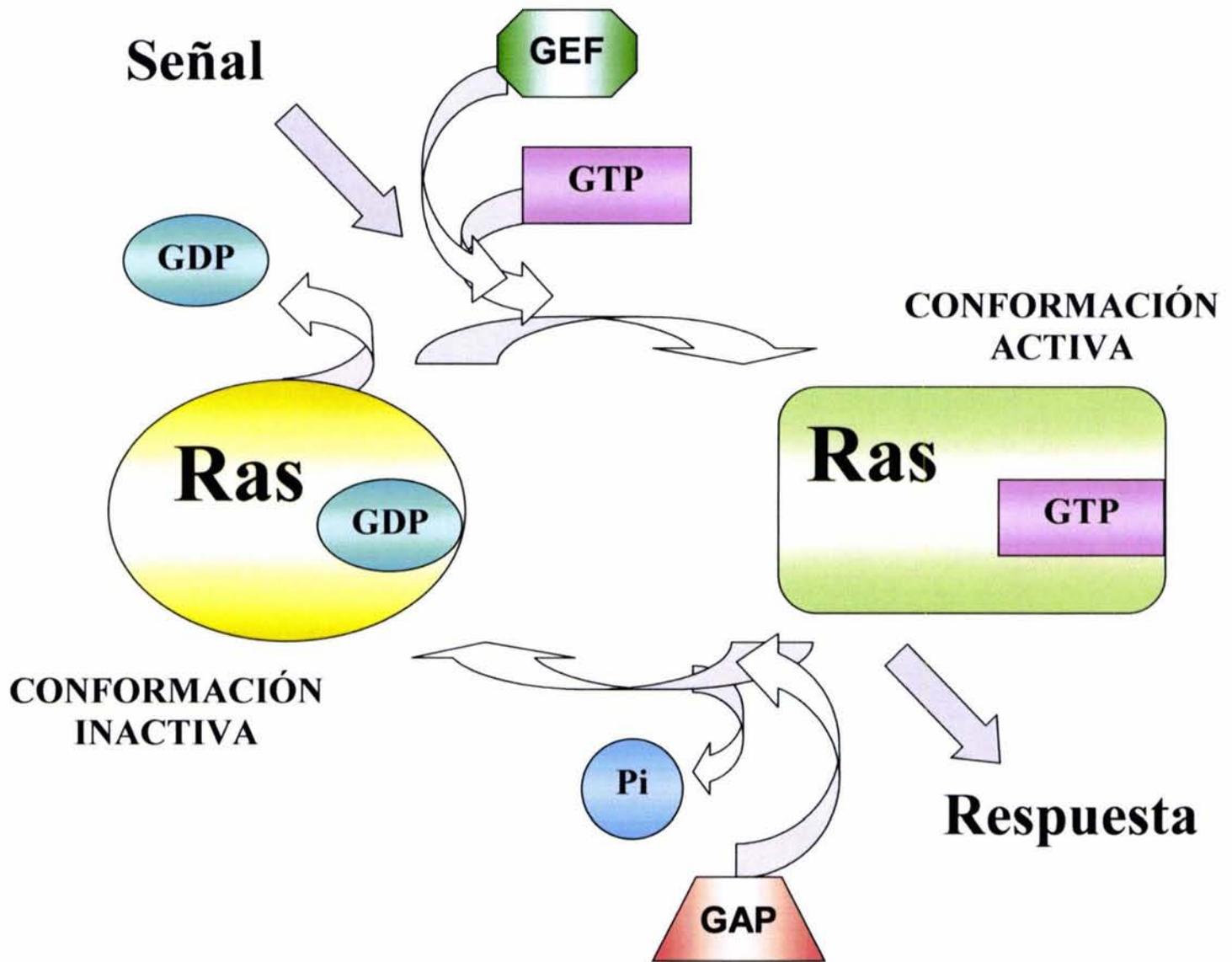


Figura 4.- Estados conformacionales de Ras. Las proteínas Ras pertenecen a una familia extensa de GTPasas, son moléculas que unen GTP y tienen la capacidad de hidrolizarlo, funcionando como un interruptor con dos estados conformacionales: GDP-unido, estado inactivo, y GTP-unido, estado activo. El estado activo perdura hasta que el GTP es hidrolizado. La función básica del interruptor molecular es regular cíclicamente la transmisión de una señal a un efector, que se encuentra abajo en la cascada de señalización. El ciclaje entre la forma activa e inactiva de la GTPasa, se encuentra regulado principalmente por las proteínas activadoras de GTPasas (GAPs) y por los factores intercambiadores de guanin-nucleótidos (GEFs).

de una glicina por una valina (Reddy, et. al. 1982; Tabbin, et. al. 1982; Seeburg, et. al. 1984; Der, et. al. 1986; Barbacid, 1987).

Se considera también que la sobre-expresión de los genes normales de ras pueden inducir transformación celular. Altos niveles de la proteína ras normal producen suficientes moléculas en estado activo unido a GTP, sin afectar el equilibrio entre las formas activas e inactivas de la proteína normal. Una expresión elevada de ras puede lograrse por alteraciones en las secuencias reguladoras o por amplificación de genes (Barbacid, 1987). La unión de un elemento de control de retrovirus (LTR) al lado 5' del gen ras normal o cualquier promotor fuerte, los cuales provocan una expresión elevada del gen, inducen la transformación maligna de células NIH3T3 (Chang, et. al. 1982; McKay, et. al. 1986). Resultados similares se han obtenido cuando se integran al genoma múltiples copias del gen H-ras-1 normal, por lo que la amplificación del gen ras normal es capaz de desarrollar transformación (Pulciani, et. al. 1985). Estas células tumorigénicas expresan de 30 a 100 veces más el gen normal que las células normales o bien que células transformadas con el oncogen ras. Sin embargo, en términos generales las propiedades neoplásicas inducidas por la sobre-expresión del proto-oncogen ras son más limitadas que las inducidas por las mutaciones alélicas puntuales (Barbacid, 1987). En resultados obtenidos en el laboratorio por Miranda et al., 1996, se encontró que si bien la expresión permanente del gen H-ras, ya sea normal o mutado, induce alteraciones morfológicas considerables (células gigantes multinucleadas con micronúcleos), las clonas que expresan el gen mutado producen significativamente un número mayor de células multinucleadas que aquellas transfectadas con la forma normal del gen. Se observó también que las clonas transfectadas con el gen H-ras oncogénico son más sensibles a la ausencia de factores de crecimiento presentes en el suero.

Las proteínas ras funcionan como componentes críticos en la cascada de transducción de señales iniciada por la estimulación de diversos receptores. El complejo Grb2/Sos está presente en el citosol en células no estimuladas. Cuando

las células se estimulan, este complejo se une al receptor activado a través de Grb2 (por un dominio SH2), reclutando a Sos a la membrana plasmática, lo cual provoca la activación de ras ya que Sos promueve el intercambio de GDP por GTP (McCormick 1993; Quilliam et al., 1995). Una vez que ras ha sido activada por Sos, ésta enciende una cascada de seril/treonil cinasas conocida como la cascada de las cinasas MAP, siendo la primera Raf (Moodie, et al., 1993; Avruch, et. al. 1994; Lewis et al., 1998). Lo que resulta en la fosforilación y activación de diversos cinasas como la p90rsk, Erk-1 y la fosfolipasa A2 (citosólica), y de factores de transcripción como c-Myc, c-Fos y c-Jun (Marx, 1993; Marshall, 1994). Además de Raf, se sabe que existen otros efectores de ras, MEKK-1 que activa a la vía SEK/JNK, p120-GAP, los miembros de la familia RalGEF (RalGDS, Rlf y Rgl), que conectan a Ras con la subfamilia Ral, y la fosfatidilinositol-3-OH cinasa (PI(3)K) la cual activa la cinasa de serina/treonina Akt que tiene propiedades anti-apoptóticas (Feig & Schaffhausen, 1994; Minden et al., 1994; Rodríguez-Viciano et al., 1994; Campbell et al., 1998; Downward, 1998). Se ha demostrado que se requiere de la activación por ras tanto de la vía de Raf como de la de PI(3)K para inducir transformación celular (Rodríguez-Viciano et al., 1997) (Figura 5). Existen diversas evidencias que indican que las proteínas Ras se comunican con las proteínas Rho/Rac a través de las proteínas reguladoras GEFs y GAPs, controlando así tanto las señales mitogénicas como las de reorganización del citoesqueleto (Khosravi-Far et al., 1998).

Ras y el ciclo celular: Participación de ras en el punto de restricción G2/M

Diversos efectos inducidos por ras se deben a que primero activa diferentes vías de transducción de señales, segundo existen diferencias en la duración de la activación de ras y tercero el contexto celular determina como la señal mediada por ras es interpretada. Se sabe que la función de ras es requerida en diferentes puntos

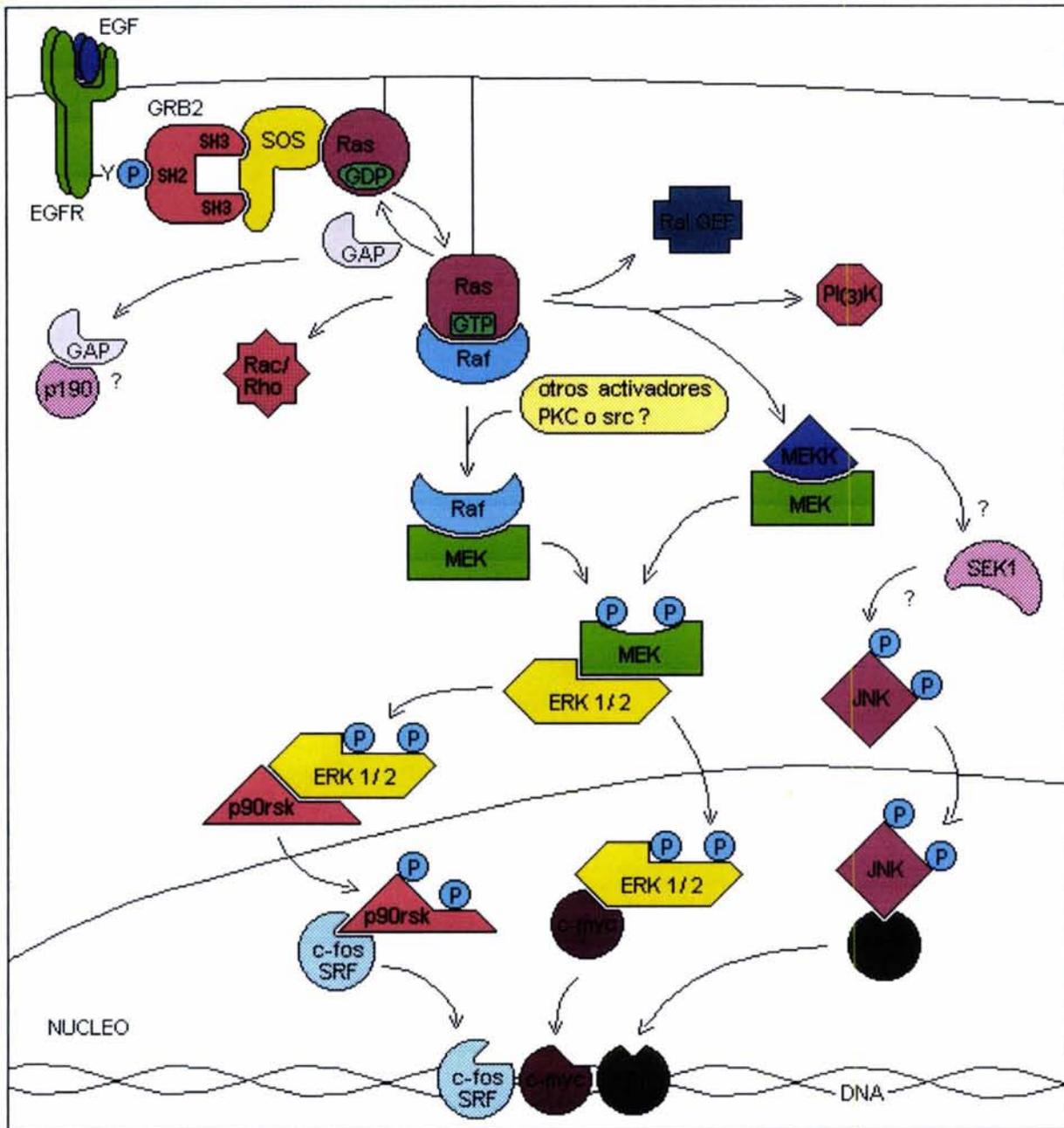


Figura 5.- Cascada de las MAP cinasas regulada por Ras. Las proteínas Ras funcionan como componentes críticos en la cascada de transducción de señales iniciada por la estimulación de diversos receptores. El complejo Grb2/Sos está presente en el citosol en células no estimuladas; cuando las células se estimulan, este complejo se une al receptor activado a través de Grb2 (por un dominio SH2), reclutando a Sos a la membrana plasmática. Este evento provoca la activación de Ras, ya que Sos es un GEF. Una vez que Ras ha sido activada por Sos, ésta enciende una cascada de seril/treonil cinasas conocida como la cascada de las cinasas MAP, siendo la primera Raf. Lo que resulta en la fosforilación y activación de cinasas como p90rsk y Erk-1, y de factores de transcripción como c-Myc, c-fos y c-Jun. Además de Raf, se sabe que existen otros efectores de Ras, como MEKK-1 que activa a la vía SEK/JNK, p120-GAP, los miembros de la familia RalGEF, los de la de Rho/Rac y la fosfatidilinositol-3-OH cinasa (PI(3)K). El anclaje de la proteína Ras a la membrana determina la localización intracelular de la GTPasa; este se da mediante una prenilación de un grupo farnesilo a un residuo de cisteína en el extremo carboxilo terminal.

de control del ciclo celular. En la salida de G₀, la microinyección de H-ras a células quiescentes NIH-3T3 provoca la transición a G₁ y el inicio de la replicación del ADN; en la entrada a S, la microinyección de anticuerpos anti-ras bloquea la respuesta mitogénica de células NIH-3T3 al suero, ya que éstas no entran a la fase S del ciclo celular (Feramisco, et. al. 1984; Mulcahy, et. al. 1985). La expresión de mutantes dominantes negativas de ras, que impiden el intercambio de GDP por GTP al secuestrar al GEF, inhiben el crecimiento celular evitando la entrada a S, debido a que impiden la inducción de la expresión de la ciclina D1 y la inhibición de la expresión de p27/kip1, ambos eventos mediados por ras (Feig & Cooper, 1988; Farnsworth & Feig, 1991; Jung et. al., 1994; Aktas et al., 1997). Además, se ha descrito que el oncogen ras induce la sobre-expresión de la ciclina D1 al incrementar la transcripción de su promotor a través de sitios AP1 y Ets (Filmus et al., 1994; Albanese et al., 1995).

También, se ha reportado su participación en la salida del ciclo celular para entrar a diferenciación, ya que la microinyección del oncogen ras induce la diferenciación de la línea celular de feocromocitoma (PC12) a neuronas (Bar-Sagi & Feramisco, 1985; Satoh et al., 1987). Además se ha descrito que ras puede inducir arresto celular e inclusive apoptosis y envejecimiento. Estos efectos inhibitorios del crecimiento celular están mediados por la activación de ras de las proteínas CDKI p21/Cip1 y p16/ink4 y p19/ARF. Esta activación mediada por ras depende de p53 funcional. Se sabe que p19/ARF activa a p53 al neutralizar a la proteína mdm2 y al interaccionar directamente con p53 (Lloyd et al., 1997; Serrano et al., 1997; Downward, 1998; Palmero et al., 1998; Pomerantz et al., 1998)

Muchos de los estudios se han concentrado en los puntos de restricción antes mencionados, pero cada vez existen más evidencias que indican que la transición G₂/M es otro punto de regulación importante en ciclo celular, y que ras juega un papel importante en este punto. En oocitos de *Xenopus*, arrestados en G₂ de la primera división meiótica, la introducción del oncogen ras induce maduración

meiótica con una alta actividad del complejo ciclina B1/cdc2 (Barrett et al., 1990; Daar et. al. 1991; Nebreda et al., 1993; Pomerance et al., 1992; Pomerance et. al. 1996). En células de mamífero existen también evidencias que indican que las proteínas ras participan en la regulación del punto de transición G2/M. Se ha demostrado que en células NRK se requiere de la expresión de K-ras para entrar a mitosis. La inactivación de un gen v-K-ras termosensible en células que se encuentran en la fase S del ciclo celular provoca su arresto en G2, bloqueo que únicamente se puede revertir con la reactivación de la proteína ras (Durkin & Whitfield, 1987). Por otro lado, se ha reportado que la sobre-expresión del oncogen H-ras induce un arresto celular en G2 tanto en fibroblastos de embrión de rata como en células de Schwann (Hirakawa & Ruley, 1988; Ridley et al., 1988). En fibroblastos de embrión de rata transformados con c-myc y H-ras se observa un arresto en G2 al exponer a radiación, lo cual no ocurre en presencia solo de c-myc (Bernhard et al., 1994; McKenna et al., 1996). En diversas líneas celulares deficientes de p53 la transfección del oncogen ras disminuye considerablemente el arresto en G2 inducido por el daño al ADN (Agapova et al., 1999). Además, estudios realizados en el laboratorio por Miranda, et al., 1996, muestran que la expresión inapropiada de H-ras induce la aparición de células gigantes multinucleadas con alteraciones morfológicas como son la presencia de micronúcleos y poliploidía que culminan en muerte mitótica. Esta inestabilidad cromosómica provocada por la expresión de ras oncogénico, como es la acumulación de células poliplóides con cromosomas aberrantes y la presencia de micronúcleos, y el aumento de dichas alteraciones tras inducir daño al ADN, han sido también reportados por diversos grupos (Denko et al., 1994; Parshad et al., 1994; Denko et al., 1995; Agapova et al., 1999; Bulavin et al., 1999)

Participación de p53 en el punto de restricción G2/M

Se sabe que p53 juega un papel importante no solo en el punto de restricción G1/S sino también en el de G2/M del ciclo celular. La sobre-expresión de p53 induce un arresto en G2 (Agarwal et al., 1995; Stewart, et al., 1995), mientras que su inactivación por las proteínas E6 del VPH o el antígeno grande de SV40, así como la disrupción de ambos alelos de p53 atenúa el arresto en G2 inducido por el daño al ADN (Kaufmann et al., 1995; Chang et al., 1997; Thompson et al., 1997, Bunz et al., 1998; Flatt et al., 2000). Por otro lado en células deficientes de p53, supresores del punto de control en G2, como la cafeína, inhiben de manera más efectiva el arresto en G2 inducido por el daño al ADN (Powell et al., 1995; Fan et al., 1995).

Datos recientes indican que p53 regula el punto de control de G2 en respuesta al daño al ADN, reprimiendo la transcripción de la ciclina B1 e inhibiendo su localización en el núcleo. La expresión de p53 exógeno provoca una disminución en los niveles de la proteína ciclina B1 y atenúa la actividad de su promotor. Aunque no existe un elemento de unión de p53 ya determinado, se encontró que se requiere de la región de -123 a -287 del promotor la cual contiene sitios de unión a SP1, USF y E2F (de Toledo et al., 1998; Innocente et al., 1999; Taylor et al., 1999). También se ha reportado que los elementos CCAAT son importantes y que involucran al factor NF- κ B el cual parece ser regulado por p53 cuando hay daño al ADN (Manni et al., 2001). Se ha demostrado que p53 tras el daño al ADN induce la transcripción de la proteína 14-3-3 σ , la cual se une y secuestra a la ciclina B1 en el citoplasma. (Hermeking, et al., 1997; Chan et al., 1999; Taylor et al., 1999).

Se ha reportado que la actividad del complejo ciclina B1/cdc2 también es regulada por p53 a través de las proteínas p21 y Gadd45, la activación constitutiva del complejo ciclina B1/cdc2 elimina el arresto en G2 inducido por p53 (Park et al., 2000). Se sabe que p53 induce la expresión de p21, el cual es un inhibidor de las cdk2 al unirse directamente al complejo; si bien los estudios se han enfocado en la inhibición de la cdk2 y el arresto en G1 (Xiong et al., 1993; Deng et al., 1995;

Waldman et al., 1995), se ha observado que p21 juega un papel importante también en G2 y que es regulado por p53 (Agarwal et al., 1995; Bates et al., 1998; Bunz et al., 1998; de Toledo et al., 1998). En células p21-/-, si bien se observa un arresto inicial en G2 después de irradiarlas, este arresto no se mantiene y la actividad del complejo ciclina B1/cdc2 se encuentra elevada a diferencia de las células con p21 funcional donde se ve una inhibición del complejo después del daño al ADN (Bunz et al., 1998). Al igual que con las cdks de G1, p21 se une al complejo ciclina B1/cdc2 y lo inactiva, sin embargo existen evidencias de que p21 también puede disminuir los niveles de la ciclina B1 y de su mensajero probablemente a través de PCNA (de Toledo et al., 1998; Taylor et al., 1999; Flatt et al., 2000; Taylor & Stark, 2001). Por otro lado, la sobre-expresión de la proteína Gadd45 induce un arresto en G2 solo en células con p53 funcional, y células gadd45-/- no se arrestan en G2 después de tratarlas con radiación ultravioleta (Wang et al., 1999). Gadd45 se asocia directamente con cdc2 e inhibe la actividad del complejo; *in vitro* Gadd45 es capaz de disociar al complejo ciclina B1/cdc2 y la sobre-expresión de la ciclina B1 inhibe el arresto en G2 inducido por Gadd45 exógeno (Figura 3) (Wang et al., 1999; Zhan et al., 1999).

Sin embargo, el papel de p53 en el control del punto de restricción de G2 no es todavía muy claro, ya que existen evidencias que indican que vías independientes de p53 también juegan un papel importante. Si bien los trabajos, que reportan que en células deficientes de p53 la cafeína inhibe más eficazmente el arresto en G2, apoyan la participación de p53 en el punto de control de G2. También apoyan la participación de vías independientes de p53, ya que las células deficientes de p53 presentan un arresto en G2 después del daño al ADN y se requiere de la adición de cafeína para atenuar dicho arresto (Powell et al., 1995; Fan et al., 1995). Igualmente, se ha demostrado que diversas líneas celulares deficientes de p53 funcional muestran un arresto normal en G2 después de inducir un daño al ADN (Paules et al., 1995; Donner et al., 1996; Thompson et al., 1997; Agapova et al.,

1999; Passalaris et al., 1999; Atar et al., 2000). Cabe mencionar que en los primeros pases de cultivos de estas células, deficientes de p53 (tanto de pacientes con el síndrome de Li-Fraumeni, de ratones p53^{-/-} o debido a la transfección de E6 del VPH), se observa una inestabilidad genómica después de inducir un daño al ADN, aunque presenten un arresto en G2 con una inhibición del complejo ciclina B1/cdc2. Mientras que, en los pases tardíos o después de una crisis celular, se observa una disminución en el arresto en G2 con un complejo ciclina B1/cdc2 activo. Esto apoya la idea de que deben de existir otras vías redundantes de regulación del punto de control de G2/M independientes de p53, que muy probablemente se alteran después de varios pases debido a la ya conocida inestabilidad genómica inducida por la falta del gen supresor (Paules et al., 1995; Donner et al., 1996; Passalaris et al., 1999).

Por otro lado, se ha reportado que la proteína Rb también participa en el punto de control de G2, ya que se encuentra la forma hipofosforilada (activa) de Rb en células arrestadas en G2. La inactivación de Rb induce la salida prematura del arresto en G2 inducido por daño al ADN y la sobre-expresión de Rb induce arresto en G2 de manera independiente a p53 (Karantza et al., 1993; Yen & Sturgill, 1998; Flatt et al., 2000). Además, las células de cultivos en pases iniciales, de pacientes con Ataxia telangiectasia que tienen alterado el gen supresor ATM, no se arrestan en G2 después del daño al ADN y tienen el complejo ciclina B1/cdc2 activo. La proteína ATM se sabe regula no solo a p53 sino a otras proteínas como Chk1 antes mencionada, por lo tanto controla a más de una vía de señalización, apoyando lo antes mencionado (Paules et al., 1995; Canman et al., 1998; Lakin & Jackson, 1999; Graves et al., 2000).

Como se señaló anteriormente si bien se ha reportado la importancia de p53 en la regulación del punto de control de G2, al reprimir la transcripción de la ciclina B1 e impedir su localización nuclear, existen evidencias que indican que vías independientes de p53 también participan en este punto de control. Se sabe

que las proteínas Ras participan en la regulación de las transiciones de una fase a otra del ciclo celular. Principalmente se ha reportado su papel en el punto de control de G1/S. Sin embargo, como ya se mencionó, hay datos que sugieren que también juegan un papel importante en el control de la transición G2/M. Puesto que el complejo ciclina B1/cdc2 es el regulador clave en la transición G2/M del ciclo celular y su actividad es regulada por el estado de fosforilación de la cinasa cdc2 y por la cantidad y la localización de la ciclina B1; se evaluó si H-ras regula el punto de control de G2 al modular la expresión de la ciclina B1 y por tanto la actividad del complejo ciclina B1/cdc2 a través de vías independientes de p53.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

- Existen evidencias que sugieren la participación de Ras en el control de la transición G2/M del ciclo celular, sin embargo no se ha determinado como se lleva a cabo dicha regulación.
- El complejo ciclina B1/cdc2 es un componente clave en el punto de transición G2/M del ciclo celular y está regulado por diferentes vías de señalización.
- Se ha establecido que la regulación de la expresión y localización de la ciclina B1 es importante para modular la actividad del complejo ciclina B1/cdc2 pero no se conocen bien las proteínas involucradas en dicha regulación.
- Las células con p53 no funcional al sufrir daño en el ADN se arrestan en G2, por lo tanto deben de existir otras vías de regulación independientes de p53.
- La respuesta al daño al ADN depende de más de un mecanismo de control, sin embargo no están del todo determinados.

HIPOTESIS

Tomando en cuenta las evidencias anteriormente descritas se propone la siguiente hipótesis:

Ras regula el punto de restricción G2/M al modular al complejo ciclina B1/cdc2 de manera independiente a p53.

OBJETIVOS

General:

- Determinar si H-ras participa en el control de la fase G₂/M del ciclo celular.

Particulares:

- Determinar si H-ras regula a la ciclina B1 y al complejo ciclina B1/cdc2:
 - Determinar si en la presencia del oncogen H-ras existen alteraciones en la expresión de la ciclina B1, en la cantidad de su mensajero y de la proteína, y en su localización intracelular.
 - Determinar si en la presencia del oncogen H-ras existen alteraciones en la cantidad y actividad del complejo ciclina B1/cdc2.
- Definir si esta regulación es independiente de la proteína p53.
 - Evaluar el efecto de H-ras en líneas celulares que no tienen p53 funcional.
- Caracterizar la participación de H-ras en el control del punto de restricción G₂/M mediante la utilización de sustancias como el etopósido y la cafeína.
 - Determinar si en la presencia del oncogen H-ras existen alteraciones en la cinética de la actividad del complejo ciclina B1/cdc2 después del daño al ADN.
 - Evaluar la respuesta al daño al ADN mediante el análisis de las fases del ciclo celular para determinar arresto celular.
 - Determinar si se inducen alteraciones en la cromatina.

MATERIAL Y METODOS

Cultivos celulares y Tratamientos

Se utilizaron células HeLa, provenientes de un adenocarcinoma cérvico-uterino, transfectadas establemente con el oncogen H-ras (Val12) unido al gen de resistencia a neomicina (neo) o el gen neo solo (Miranda et al., 1996), y células SW480, línea celular humana de cáncer de colon. Las células se crecieron a 37°C y 5% de CO₂ en D-MEM (Medio Dulbecco modificado por Eagle) complementado con suero de neonato de bovino al 10% para las células HeLa y con suero fetal bovino al 10% para las células SW480, más antibióticos.

Las células se sembraron 24hrs antes de ser tratadas con etopósido o sincronizadas parcialmente en la fase S del ciclo celular con 2mM de timidina (Gibco). Las células se sincronizaron con la timidina por 24hr y después se crecieron en medio libre por diferentes periodos de tiempo antes de agregar el etopósido, 8hrs para las células control transfectadas con neo y 6hrs para las células transfectadas con H-ras oncogénico. Las células se trataron con 10µM de etopósido por 1hr (Maity et al., 1996), se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron en medio libre de etopósido por diferentes periodos de tiempo. En donde se indica, las células también se expusieron a cafeína (Sigma), ésta se adicionó después del tratamiento con etopósido a una concentración de 1mM (Lock et. al.,1994) Para obtener células en metafase, éstas se incubaron con nocodazol (Sigma) 0.1µg/ml por 18hrs (Jordan et al., 1992), después de haber retirado el etopósido.

Secuenciación del producto de PCR

Se extrajo el ADN genómico de las células HeLa mediante la técnica de SDS-proteinasa K (Sambrook et al., 1989). Se amplificó por la técnica de Reacción en

Cadena de la Polimerasa (PCR) un fragmento de 110pb del exón 1 del gen H-ras (que contiene los codones 12 y 13), para ello se realizaron 35 ciclos a una temperatura de hibridación de 55°C. Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: H1A 5'-CAGGCCCTGAGGAGCGATG-3' y H1B 5'-TTCGTCCACAAAATGGTTCT-3'. La secuenciación de los productos de PCR, purificados en geles de agarosa de bajo punto de fusión se realizó con el estuche de AmpliTaq DNA Cycle Sequencing System (Perkin Elmer). Para cada reacción se utilizó aproximadamente 20ng de cada producto de PCR y 2μCi (α -³²P)-dCTP. Los productos fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% con Urea 7M. Para verificar las mutaciones de H-ras, se secuenciaron ambas cadenas de ADN.

Análisis del Ciclo Celular por Citofluorometría de flujo

Las células se sembraron a una densidad de 5×10^5 células por caja p100. Las células fueron sincronizadas cuando se indica y las células asincrónicas o sincronizadas en la fase S, a diferentes tiempos se lavaron con PBS y se lisaron en la caja con Tween 20 0.5% y ácido cítrico 0.1M, se fijaron con etanol al 70% y se incubaron con DAPI (2,4-diamidino-2-fenilindola.2HCl) 2.5μg/ml en amortiguador de Tris pH 8.0 con MgCl₂ 0.5M (Hacker et. al., 1980). La distribución del ciclo celular de 10,000 núcleos se analizó en un citofluorómetro de flujo Partec CA-II (GmbH, Germany). Se obtuvieron los histogramas que muestran el número de núcleos en función de su contenido de ADN.

Extracción de ARN y Análisis por Northern blot

El ARN total se extrajo utilizando el método de tiocinato de guanidina/fenol (Chomczynski & Sacchi, 1987). Las células se crecieron a un 80% de confluencia, se lavaron 2 veces con PBS y se les agregó 200μl de la solución de tiocinato de

guanidina (tiocinato de guanidina 4M, N-lauroilsarcosil de Na 0.5%, Citrato de Na 25mM pH 7, 2-mercaptoetanol 0.1M, EDTA 25mM pH 7, filtrado por membrana de 0.45µm) por caja. Se hizo una extracción fenol-cloroformo, utilizando fenol saturado con H₂O. Se precipitó el ARN con 0.025 volúmenes de ácido acético 1M y 0.5 volúmenes de etanol absoluto a -20°C toda la noche, se recuperó la pastilla por centrifugación y se resuspendió en H₂O tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). 30µg de ARN total se separaron en un gel de agarosa 1% -formaldehído 1.1M, posteriormente se hizo la transferencia por capilaridad a membrana de nylon en seco para el análisis de Northern blot (Sambrook et. al. 1989). Las sondas de cADN de la ciclina B1 o GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa humana) se marcaron mediante el método de oligonucleótidos al azar con digoxigenina-dUTP como indica el fabricante (Boehringer Mannheim). La hibridación se hizo a 42°C. Las membranas se lavaron con una astringencia de SSC 0.5%, SDS 0.1% a 65°C. La detección se hizo utilizando un ensayo inmunoenzimático con anti-digoxigenina-fosfatasa alcalina y revelando con un sustrato quimioiluminicente CSPD[®] (Boehringer Mannheim). Los tiempos de exposición fueron de 30min a 1 hora.

Retrotranscripción-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) y Corte con la enzima de restricción NaeI.

El ARN total se extrajo como se indica arriba utilizando el método de tiocinato de guanidina/fenol (Chomczynski y Sacchi, 1987). Para la retrotranscripción se utilizaron 10µg de ARN, del cADN se amplificó un fragmento de 110pb del exón 1 del gen H-ras, para ello se realizaron 35 ciclos a una temperatura de hibridación de 55°C. Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: H1A 5'-CAGGCCCTGAGGAGCGATG-3' y el H1B 5'-TTCGTCCACAAAATGGTTCT-3'. Los productos de PCR purificados por geles de agarosa de bajo punto de fusión se digirieron con la enzima de restricción NaeI y se separaron en geles de acrilamida

al 6%. La enzima NaeI reconoce la secuencia 5'-GCC↓GGC-3', por tanto corta al gen normal pero no al mutado.

Extractos celulares y Análisis por Western blot

Las células se lavaron dos veces con TBS (Tris 10mM, NaCl 150mM, pH 7.2) y se lisaron directamente en la caja con RIPA (Tris 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, NP40 1%, deoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1%), con los inhibidores de proteasas: antipaina, aprotinina, quimostatina, leupeptina, pepstatina A (cada uno a 5µg/ml), 1mM de PMSF y AEBSF (0.1mg/ml); e inhibidores de fosfatasas NaF 50mM y Na₃VO₄ 1mM. Los lisados se incubaron en hielo por 10 min. y se centrifugaron a 4°C por 10 min. Los sobrenadantes se recuperaron y se guardaron a -70°C. Para los extractos nucleares, las células se incubaron primero con un amortiguador de lisis suave (Tris 50 mM (pH 8), NP40 0.5%, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, glicerol 10%) por 20 min., centrifugadas a 5000rpm por 5 minutos a 4°C para recuperar los núcleos en la pastilla y los extractos citoplásmicos en el sobrenadante. Los núcleos fueron lisados con RIPA como se describe arriba. La concentración de proteína se estimó por el método DC (Biorad). Para el análisis por Western blot, 20-40µg de proteínas totales se separaron por electroforesis en geles de acrilamida-SDS al 10% y se transfirieron a papel de nitrocelulosa. La membrana se bloqueó con TBS/Tween 20 0.05%, BSA 1% y leche 1%. Se incubó toda la noche con 1µg del primer anticuerpo anti- p34cdc2 (Boehringer Mannheim), ciclina B1, ciclina A, p53, c-fos, fra, β-catenina (Santa Cruz, Inc.) o actina (Zymed). A continuación se incubaron con un segundo anticuerpo anti-ratón o anti-conejo unido a peroxidasa (Sigma) por 90 min. a temperatura ambiente. Para la detección se utilizan reactivos quimioiluminicentes (ECL de Amersham). Los tiempos de exposición autoradiográficos fueron en el rango de 30s a 2min.

Tinción celular e Inmunofluorescencia

Las células se crecieron en cubreobjetos, y se fijaron con metanol a -20°C por 10 minutos. Para la tinción con hematoxilina-eosina se utilizó hematoxilina de Harris (hematoxilina 0.5%, sulfato de aluminio y amonio 10%, óxido rojo de mercurio 0.25%, etanol absoluto 5%) por 1 min. y con eosina Y al 1% en etanol al 75% por 15 segundos (Bancroft & Stevens, 1990). Las muestras se fotografiaron en un microscopio de luz Nikon 100x, Para observar la estructura de la cromatina, las células se tiñeron con $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$ de DAPI o con $4\mu\text{g}/\text{ml}$ de Bromuro de Etidio por 15 minutos. Las células fueron analizadas en un microscopio Nikon con epifluorescencia.

Para la inmunofluorescencia, las células se incubaron por 2 horas con el anticuerpo monoclonal anti-ciclina B1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a una concentración de $3\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS con BSA 1% en una cámara húmeda a temperatura ambiente. El conjugado anti-ratón-FITC (isotiocinato de fluoresceína) se incubó por 90 min., a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se montaron con solución antifade (100mg de p-fenilendiamina diclorada se disuelven en 10 ml de PBS, se ajusta el pH a 8 con amortiguador de bicarbonatos 0.5M (0.42g de Na_2CO_3 en 10ml de H_2O pH9 con NaOH), y examinados en un microscopio confocal (Nikon).

Inmunoprecipitación y Ensayos de cinasa *in vitro*

Las células se lisaron en diferentes periodos de tiempo con RIPA (más un inhibidor adicional iodacetamida 10mM) como se describe arriba. Para la inmunoprecipitación, $150\mu\text{g}$ (para el ensayo de cinasa) y $400\mu\text{g}$ (para el Western blot) de lisado total se preincubaron 1hr con proteína A/G-sefarosa y después se

incubaron toda la noche con 1µg del anticuerpo monoclonal anti-ciclina B1 (Santa Cruz Inc) acoplado a proteína A/G-sefarosa a 4°C. Los inmunoprecipitados se lavaron 2 veces con Tris-Cl 100mM, pH 7.5, NaCl 150mM, EDTA 1mM, NP40 0.05%, y tritón x100 0.25% y una vez con el mismo amortiguador sin detergentes. Para el Western blot se resuspendieron en el amortiguador de muestra SDS-PAGE y para el ensayo de cinasa se lavaron una vez con el amortiguador de ensayo (Tris-Cl 50mM pH7.5, NaCl 75mM, MgCl₂ 10mM, DTT 1mM) y se resuspendieron en 30µl del mismo amortiguador más un inhibidor de cinasas dependientes de cAMP 1µM (Sigma), histona H1 50µg/ml (Boehringer Mannheim) y 3µCi de (γ³²P) ATP (Amersham, actividad específica 5000Ci/mmol). El ensayo se llevó a cabo a 37°C por 20 min., se detuvo la reacción agregando 25µl de amortiguador de muestra 2x; 25µl de la mezcla se separaron en geles de SDS- acrilamida al 12%. La fosforilación de la histona H1 se visualizó por autoradiografía, y el tiempo de exposición fue de 1hr. El análisis densitométrico se realizó en un densitómetro GS365W (Hoeffer)

Transfección transitoria y Ensayo de actividad de Luciferasa

Las células SW480 se transfectaron con 3µg de Lipofectamina Plus (Gibco BRL) como indica el fabricante. Las células se sembraron a una densidad de 4x10⁵ en cajas Petri de 30mm, 24hrs antes de la transfección. Se co-transfectaron 3µg del plásmido pEJ (que contiene el oncogen H-ras Val12) (Chang et al., 1982) o pCDNA3, junto con 0.5µg del plásmido pCycB(-287)-Luc (que incluye 287pb del promotor de la ciclina B1) (Katula et al., 1997) o pE.18-Luc (que contiene dos sitios de unión Ets2 sobrelapados) (Galang et al., 1994). Las células se lisaron 48hrs después de la transfección con el amortiguador de lisis (Promega) y se analizaron como indica el fabricante, con el amortiguador de ensayo de Luciferasa para determinar la actividad de luciferasa (Promega).

RESULTADOS

I. Caracterización de las células HeLa transfectadas con el oncogen H-ras.

Con el objeto de evaluar la participación de Ras en el punto de restricción G2/M del ciclo celular, se utilizaron células HeLa transfectadas establemente con el oncogen H-ras y como control se utilizaron células transfectadas con el vector que contiene el gen de resistencia a neomicina (neo) (Miranda et al., 1996). Se caracterizaron parcialmente las células transfectadas para corroborar que el oncogen H-ras se expresaba adecuadamente e inducía la expresión de proteínas que se sabe son reguladas por este gen.

Las células HeLa tienen el gen H-ras normal y las células transfectadas expresan el oncogen.

Como se mencionó en la Introducción, el oncogen H-ras presenta generalmente una mutación puntal en el codón 12 (GGC→GTC) o en ocasiones en el codón 13 (GGT→TGT o CGT). Para determinar si las células HeLa tienen o no mutado el gen H-ras, se decidió secuenciar un fragmento del exón 1 que contiene los codones 12 y 13 del gen H-ras. Como se puede observar en la Figura 6A, las células HeLa que se utilizaron para la transfección no tienen mutado el gen H-ras en el codón 12 o 13.

Para corroborar que las células HeLa transfectadas con H-ras oncogénico realmente están expresándolo, se realizó un RT-PCR del ARN de las células transfectadas; posteriormente el fragmento amplificado de 110pb se cortó con la enzima de restricción NaeI. Esta enzima corta en el codón 12 al gen ras normal, pero no al mutado, generando dos fragmentos de aproximadamente 50pb. Se observó que, el fragmento amplificado de H-ras del de las células transfectadas con el oncogen no se corta totalmente, a diferencia de las células control transfectadas

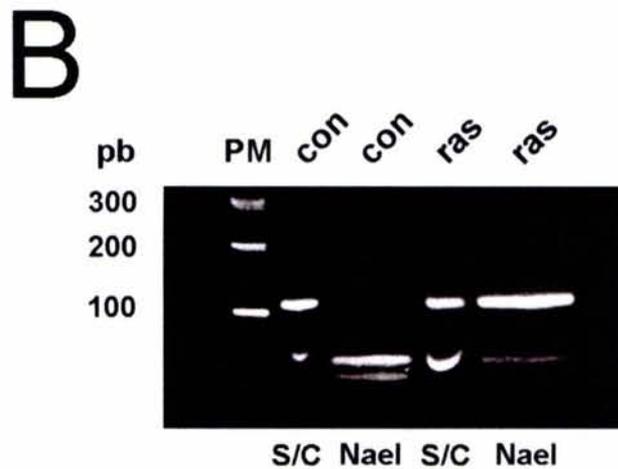
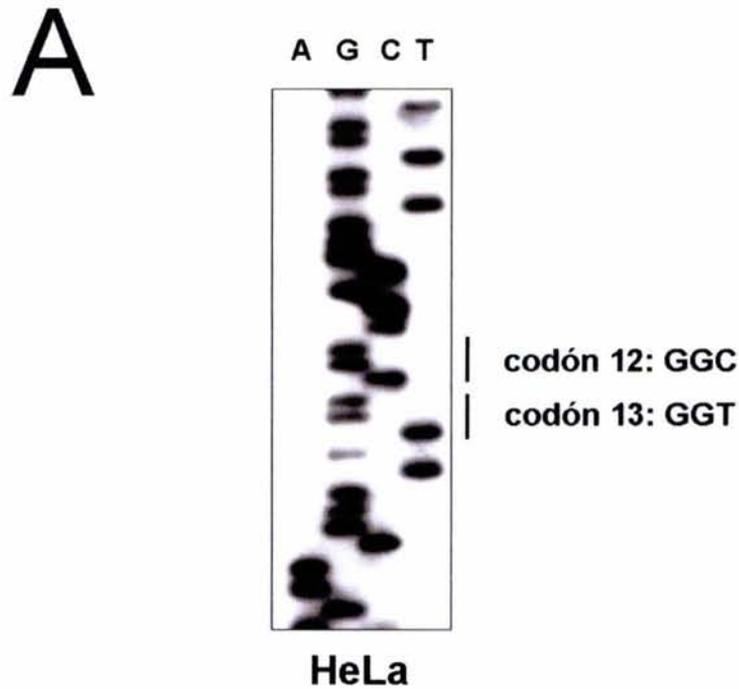


Figura 6.- Las células HeLa tienen el gen H-ras normal y las células transfectadas expresan el oncogen. A, Secuenciación de ADN de células HeLa, se utilizaron oligonucleótidos iniciadores que amplifican un fragmento que contiene los codones 12 y 13 del exón 1 del gen H-ras, después de la PCR se secuenció el fragmento amplificado. Está indicado el orden de las bases y los codones que corresponden al 12 y 13 del gen. **B, RT-PCR** y corte con la enzima de restricción NaeI, se crecieron por 24h las células transfectadas establemente con el oncogen H-ras (Val12) unido a un gen de resistencia a neomicina (neo) o con el gen neo solamente y se extrajo el ARN como se indica en Material y Métodos, después del RT-PCR, los productos amplificados sin cortar (S/C) o cortados con la enzima (NaeI) fueron separados en un gel de poliacrilamida. (PM) Marcadores de peso molecular, células transfectadas con el vector (con) o H-ras oncogénico (ras).

con el gen neo (Figura 6B); indicando que las primeras están expresando tanto la forma oncogénica como al gen endógeno normal de H-ras. La banda de aproximadamente 50pb que se observa, en los carriles de los productos de PCR no purificados ni cortados con la enzima, corresponde a los oligonucleótidos no incorporados durante la amplificación.

Las células que expresan el oncogen H-ras salen antes del arresto en G1/S.

Se trabajó principalmente con cultivos asincrónicos; sin embargo, consideramos necesario corroborar algunos datos experimentales en cultivos sincrónicos que nos permitieran determinar con mayor precisión las diferencias en la cantidad y localización de ciclina B1 entre las células que expresan H-ras oncogénico y las células control, y que dichas diferencias no pudieran atribuirse a diferencias en la distribución de las fases del ciclo celular.

Se sincronizaron las células en la fase G1/S con timidina 2mM con un solo bloqueo por 24h, como se describe en Material y Métodos. En la Introducción se mencionó que, Ras regula el punto de control de G1/S (Filmus et al., 1994) y como era de suponerse, se observó que las células que expresan el oncogen H-ras salen del arresto más rápidamente que las células neo control después de retirar la timidina. Mientras que 6 horas después del bloqueo las primeras se encuentran en S tardía y a las 8 horas la mayoría ya está en G2/M; las segundas se encuentran todavía en S temprana y hasta las 8 horas llegan a S tardía. Por lo que entre las dos líneas celulares hay un desfase de aproximadamente dos horas (Figura 7).

Para los experimentos con cultivos sincrónicos se utilizaron las células sincronizadas con un solo bloqueo de 24h con timidina 2mM, con el fin de que ambos tipos celulares se encontrarán en S tardía cuando fuesen expuestas al etopósido. Las células que expresan H-ras oncogénico se trataron con etopósido 6 horas y las células control 8 horas después del bloqueo con timidina. Con este

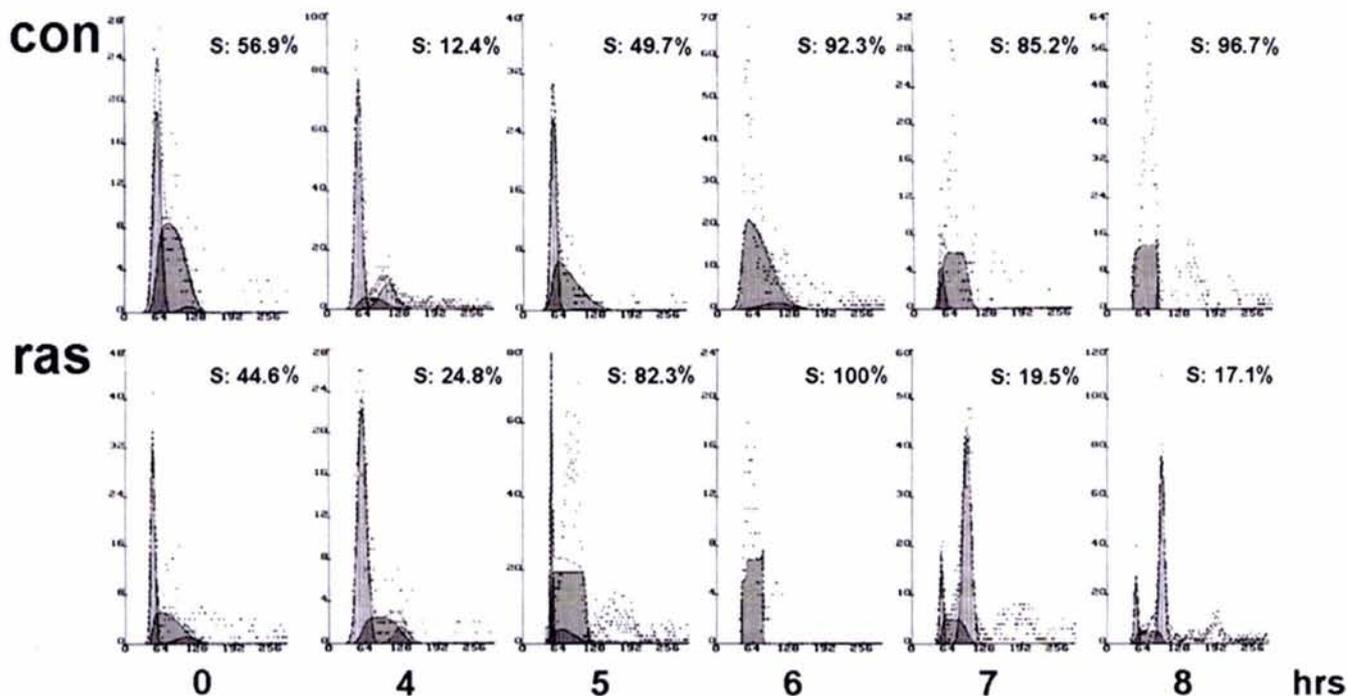


Figura 7.- Las células que expresan el oncogen H-ras salen antes del arresto en G1/S. **Citofluorometría de flujo**, Las células HeLa transfectadas establemente fueron incubadas con timidina por 24h y en los tiempos indicados después de haber retirado la timidina, fueron procesadas como se indica en Material y Métodos para el análisis de la distribución de las fases del ciclo celular por **Citofluorometría de flujo**; los histogramas muestran el número de núcleos en función de su contenido de ADN. Células transfectadas con el vector (**con**) o el oncogen H-ras (**ras**). Se indica en cada histograma el porcentaje de células en la fase S del ciclo celular (S).

procedimiento se obtuvo un 85% o más de células en la fase S tardía en ambas líneas celulares (Figura 7). Es importante recalcar que, salvo que se indique que las células fueron sincronizadas con timidina, los cultivos utilizados son asincrónicos.

Alteración en los niveles de las proteínas fra, fos y β -catenina en las células que expresan el oncogen H-ras.

Con el fin de caracterizar las células HeLa transfectadas con el oncogen H-ras se analizaron los niveles de las proteínas fra, fos y β -catenina, los cuales se sabe que están regulados por ras. Existen reportes que indican que la presencia del oncogen ras provoca una disminución en la expresión de c-fos y un aumento de expresión de la proteína fra (Mechta et al., 1997; Cook et al., 1999; Kukushkin et al., 2002; Casalino et al., 2003), e induce la estabilidad de la proteína β -catenina (Espada et al., 1999). Se realizaron Western blots contra cada proteína de lisados celulares tanto de cultivos asincrónicos (AS) como de cultivos sincronizados en la fase S (S). Para las tres proteínas se encontró lo esperado; las células HeLa que expresan H-ras oncogénico presentan menor cantidad de la proteína fos y un aumento en los niveles de las proteínas fra y β -catenina respecto a las células control (Figura 8). No se observaron diferencias entre las células asincrónicas y las sincronizadas en la fase S. Se analizaron también los niveles de la proteína ciclina A, la cual no se ha reportado que sea regulada por ras, y no encontramos diferencias en la cantidad de la ciclina A entre las células control y las que expresan el oncogen H-ras. Cabe mencionar, que la ciclina A tiene su mayor expresión en la fase S tardía del ciclo celular y como se puede observar se ve claramente una mayor expresión de la proteína en las células sincronizadas en S con respecto a las células de cultivos asincrónicos (Figura 8). Se utilizó actina como control para verificar que se cargó la misma cantidad de proteína total en cada carril del gel.

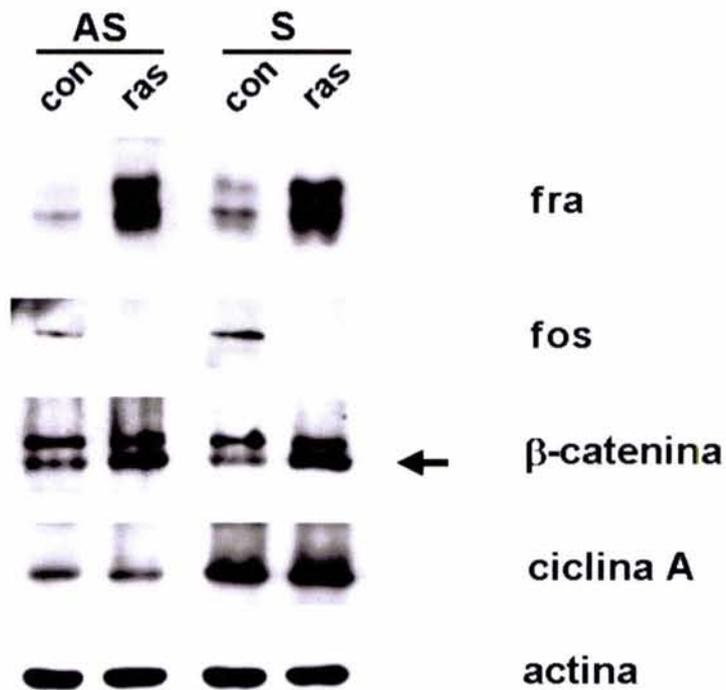


Figura 8.- Alteración en los niveles de las proteínas fra, fos y β -catenina en las células que expresan el oncogen H-ras. Las células HeLa transfectadas establemente se crecieron por 24hrs y en el caso indicado se sincronizaron con timidina y se lisaron como se describe en Material y Métodos. Se realizó un **Western blot** de las proteínas: fra, fos, β -catenina, ciclina A y actina. La flecha indica la banda que corresponde a β -catenina. Cultivos asincrónicos (**AS**) o sincronizados en la fase S (**S**). Células transfectadas con el vector (**con**) o el oncogen H-ras (**ras**).

II. H-ras induce la expresión de la ciclina B1 y regula al complejo ciclina B1/cdc2, a través de una vía independiente de p53.

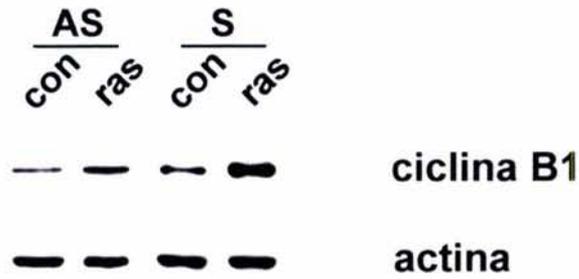
Los siguientes datos fueron publicados por Santana et al., 2002 en "Mutation Research" y a continuación se describen con detalle (Anexo I).

El oncogen H-ras incrementa los niveles de la ciclina B1.

Para determinar la posible participación de H-ras en la regulación de la transición G2/M del ciclo celular, se evaluó si la expresión del oncogen H-ras en las células HeLa induce cambios en la cantidad de la ciclina B1. Para ello se analizaron los niveles de la proteína ciclina B1 mediante Western blot, en lisados totales de células HeLa que expresan el oncogen H-ras o el gen neo. Se encontró 4 veces más proteína ciclina B1 (se determinó la intensidad de la banda con respecto a la de actina), en las células que expresan H-ras oncogénico con respecto a las células control con neo, tanto en cultivos asincrónicos como en cultivos sincronizados parcialmente en la fase S (Figura 9A). El análisis del ciclo celular demostró que ambas líneas celulares se encontraban sincronizadas en fase S (90% en las células que expresan neo y 86% en las que expresan H-ras) (Figura 9B), por lo tanto las diferencias observadas en la cantidad de la proteína ciclina B1 no se deben a diferencias en la distribución de las fases a lo largo del ciclo celular.

Los resultados anteriores fueron confirmados por el análisis de inmunofluorescencia en células sincronizadas, demostrándose que el aumento en la cantidad de ciclina B1 observado por Western blot es debido a un aumento en la cantidad de proteína por célula (Figura 10). Como se mencionó anteriormente los resultados del análisis del ciclo celular demuestran que las diferencias en la intensidad de la fluorescencia reflejan variaciones en la cantidad de la proteína ciclina B1 y no a diferencias en la distribución de las fases a lo largo del ciclo celular (Figura 9B).

A



B

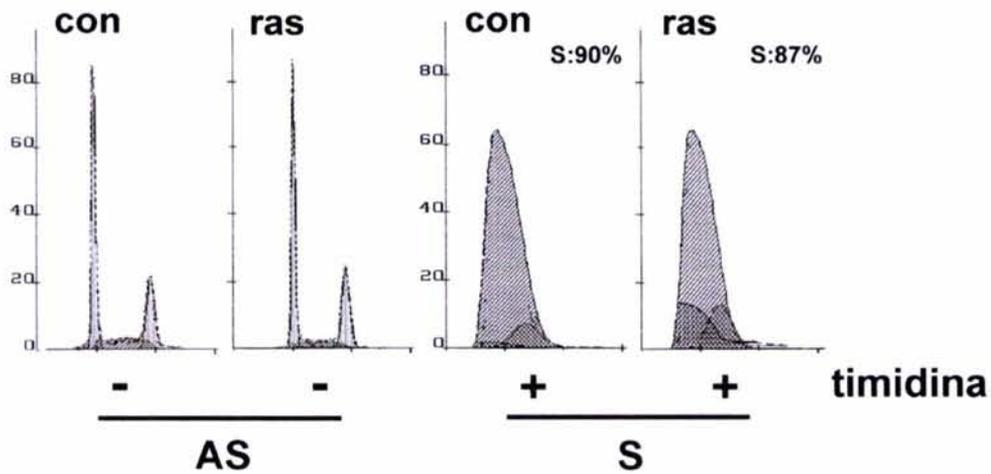


Figura 9.- El oncogen H-ras incrementa los niveles de la proteína ciclina B1. Las células HeLa transfectadas establemente, se crecieron por 24hrs y en el caso indicado se sincronizaron con timidina y se lisaron como se describe en Material y Métodos. **A**, **Western blot** de lisados totales con anticuerpos monoclonales anti-ciclina B1 o con anticuerpos anti-actina. **B**, **Citofluorimetría de flujo**, las células HeLa fueron procesadas para un análisis de la distribución de las fases del ciclo celular, los histogramas muestran el número de núcleos en función de su contenido de ADN. Cultivos asincrónicos (**AS**) o sincronizados en la fase S (**S**). Células transfectadas con el vector (**con**) o el oncogen H-ras (**ras**).

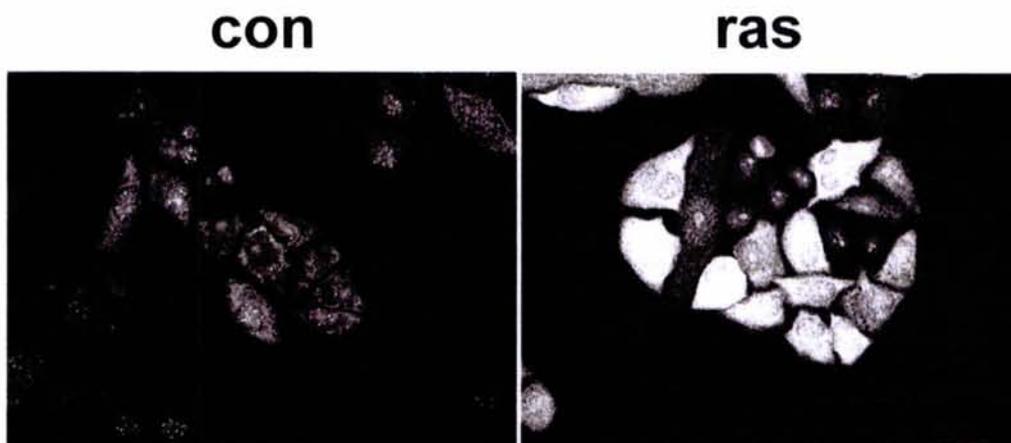


Figura 10.- El oncogen H-ras incrementa los niveles de la ciclina B1 por célula. Las células HeLa transfectadas establemente, se crecieron por 24hrs y se sincronizaron con timidina. Las células fueron procesadas para la inmunofluorescencia con anticuerpos anti-ciclina B1 como se describe en Material y Métodos. **Imagen confocal**, de células sincronizadas en la fase S y transfectadas con el vector (**con**) o el oncogen H-ras (**ras**).

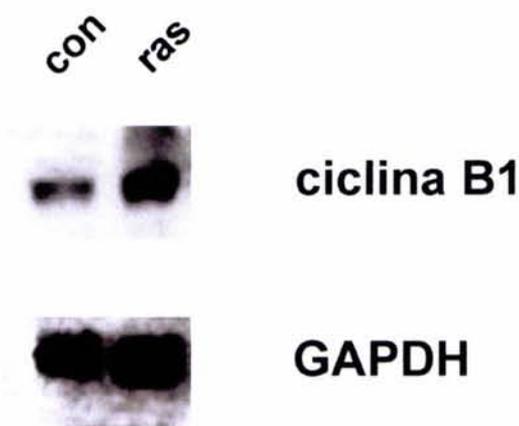


Figura 11.- El oncogen H-ras incrementa los niveles del mensajero de la ciclina B1. Las células HeLa transfectadas establemente, se crecieron por 24hrs y se lisaron para obtener el ARN como se describe en Material y Métodos. **Northern blot** de ARN total, se utilizaron sondas del gen de la ciclina B1 o del gen GAPDH. Los resultados son representativos de los obtenidos con dos clones independientes. Células transfectadas con el vector (**con**) o el oncogen H-ras (**ras**).

El análisis por Northern blot reveló que el aumento en la cantidad de la proteína ciclina B1 correlaciona con un aumento en los niveles de su ARNm, ya que hubo claramente más mensajero de la ciclina B1 en células que expresan el oncogen H-ras con respecto a las células control (Figura 11). Estos resultados confirman que la expresión de H-ras oncogénico en células HeLa induce niveles mayores de la proteína ciclina B1 mediante un aumento en los niveles de su ARNm

El oncogen H-ras aumenta la expresión del gen de la ciclina B1 por una vía independiente de p53.

Para determinar si el aumento en los niveles de la proteína ciclina B1 y de su mensajero se deben a que H-ras regula la expresión del gen de la ciclina B1; y para confirmar si esta regulación es por una vía independiente de p53, ya que se sabe que las células HeLa expresan el oncogen E6 del virus del VPH18 el cual inactiva a p53 al inducir su degradación (Scheffner, et al., 1990; Hoppe-Seyler & Butz, 1993); se determinó la actividad del promotor de la ciclina B1 mediante transfecciones transitorias en células SW480, las cuales tienen ambos alelos de p53 no funcionales (Haapajaryi et al., 1995). Para el ensayo se co-transfectó el plásmido que contiene 287pb del promotor de la ciclina B1 unido al gen de la luciferasa (Katula et al., 1997), junto con el plásmido que contiene H-ras oncogénico (Val12) (Chang, 1982) o el plásmido control pCDNA3. Se observó que la actividad de luciferasa es 19 veces mayor en las células transfectadas con el oncogen H-ras con respecto a las transfectadas con el plásmido control (Figura 12). Como control positivo se transfectó un plásmido que contiene dos sitios de unión al factor Ets2 unido al gen de luciferasa, el cual puede ser inducido por H-ras independientemente del ciclo celular. Se observó una inducción en la actividad de luciferasa 18 veces mayor en la células transfectadas con H-ras oncogénico comparadas con las del plásmido

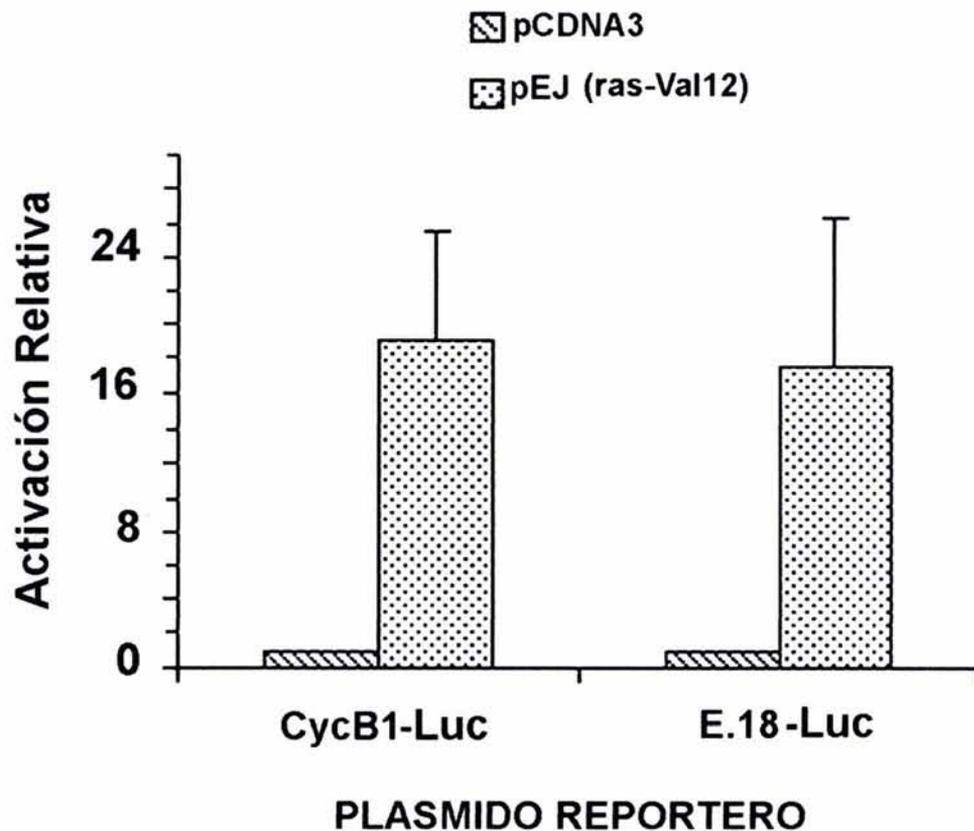


Figura 12.- El oncogen H-ras aumenta la expresión del gen de la ciclina B1 por una vía independiente de p53. Para determinar los niveles de transcripción del promotor de la ciclina B1 en células SW480 se realizó una **Transfección transitoria** como se indica en Material y Métodos. Los plásmidos reporteros ya sea con el promotor de la ciclina B1 [pCycB1-Luc] o un promotor con dos sitios Ets2 [E.18-Luc] unidos al gen de la luciferasa fueron cotransfectados con los plásmidos pCDNA3 o pEJ [ras(Val12)]. La activación está dada como el cociente de la actividad de luciferasa en la presencia de pEJ entre la actividad con el vector pCDNA3 para cada plásmido reportero. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes.

control, similar a lo reportado previamente (Galang, et al., 1994). Estos resultados demuestran que H-ras regula la expresión de la ciclina B1, a través de mecanismos independientes de p53.

El oncogen H-ras altera los niveles y la actividad del complejo ciclina B1/cdc2.

Se evaluó si el aumento en la cantidad de la ciclina B1 tiene efecto sobre la cantidad y actividad del complejo ciclina B1/cdc2. Para esto se co-inmunoprecipitó la proteína cdc2 con anticuerpos anti-ciclina B1 y se determinó el nivel de proteína por Western blot. Se observó que las células que expresan H-ras oncogénico tienen 3.5 veces más cdc2 asociado a la ciclina B1 (Figura 13A).

Para explorar posibles alteraciones en el punto de restricción G2 en la presencia de H-ras oncogénico, se trataron a las células HeLa con etopósido 10 μ m que produce daño al ADN, por una hora y se determinaron diferencias en la cantidad y actividad del complejo ciclina B1/cdc2. La exposición de células HeLa a etopósido por tiempos cortos provoca cortes de cadena sencilla que son reparados inmediatamente después de retirar la sustancia, e induce un arresto temporal en G2 seguido de la muerte celular por catástrofe mitótica a las 20 hrs. después de la exposición al agente (Lock, et. al. 1994; Maity et al., 1996).

Se observó un aumento en la cantidad de complejo tanto en las células que expresan H-ras oncogénico como en las células control 12 horas después del tratamiento con etopósido; sin embargo, dicho aumento fue claramente mayor en las células transfectadas con H-ras (Figura 13A). Este aumento correlaciona con el incremento en la cantidad de la proteína ciclina B1. No se observan diferencias en la distribución de las fases del ciclo celular entre ambas líneas celulares, tanto en los cultivos sin tratamiento como en los cultivos 12 horas después del tratamiento con etopósido (Figura 13B). Ambas líneas celulares se encontraron arrestadas en G2/M, con una proporción similar de células tanto en las control (38%) como en

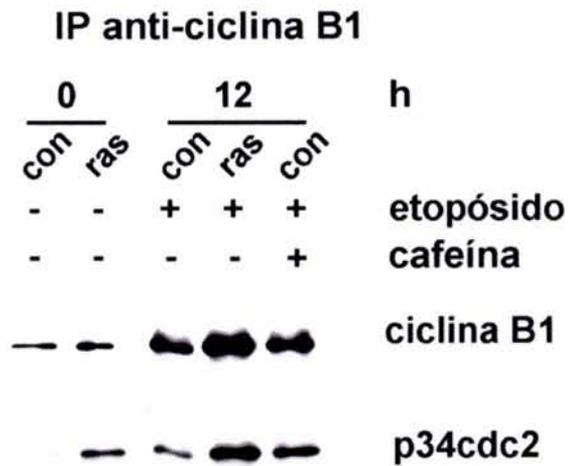
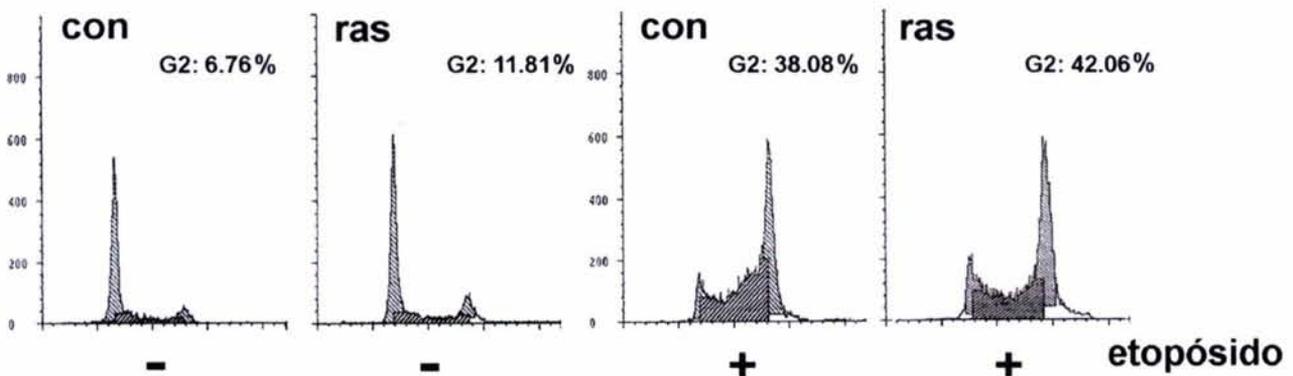
A**B**

Figura 13.- El oncogen H-ras incrementa los niveles del complejo ciclina B1/cdc2. Se crecieron células HeLa transfectadas establemente por 24hrs, se trataron con etopósido 10 μ M por 1 hr como se indica en Material y Métodos, y se cosecharon 12hrs después de haber retirado el etopósido. **A, Western blot** de la ciclina B1 y cdc2 de inmunoprecipitados con anticuerpos anti-ciclina B1. Se utilizaron como control positivo células transfectadas con neo tratadas con 1mM de cafeína. Cultivos sin tratamiento (-), 12hrs después de la exposición a etopósido o además tratadas con 1mM de cafeína (+) según se indica, de células que expresan el vector (**con**) o H-ras oncogénico (**ras**). **B, Citofluorometría de flujo**, los histogramas muestran el número de núcleos en función del contenido de ADN. Se indica en cada histograma el porcentaje de células en la fase G2/M del ciclo celular (G2). Este experimento es representativo de tres experimentos independientes. Cultivos sin tratamiento (-) o 12hrs después de la exposición a etopósido (+), de células que expresan el vector (**con**) o H-ras oncogénico (**ras**).

las que expresan H-ras (42%) (Figura 13B) coincidiendo con lo descrito previamente (Lock & Ross, 1990; Lock 1992). Estos resultados demuestran que las diferencias en la cantidad de complejo ciclina B1/cdc2 no se deben a diferencias en la distribución de las fases del ciclo celular.

Como control positivo se adicionó cafeína a las células control después del tratamiento con etopósido, ya que se ha visto que potencia la citotoxicidad celular de agentes que dañan al ADN, al impedir el arresto en G2 (Lau & Pardee, 1982). Aunque observamos un aumento en los niveles del complejo ciclina B1/cdc2 en las células control tratadas con etopósido y cafeína (Figura 13A), este aumento es menor que el observado en las células que expresan H-ras oncogénico, como era de esperarse. Igualmente en las células tratadas con cafeína no se observan diferencias en la distribución de las fases del ciclo celular al compararlas a las células control (datos no mostrados).

Para determinar si niveles mayores del complejo ciclina B1 /cdc2 podían resultar en un aumento en su actividad de cinasa, se realizó un ensayo de cinasa *in vitro* con inmunoprecipitados con anticuerpos anti-ciclina B1. Por análisis densitométrico de la histona H1 fosforilada; se encontró un pequeño aumento (2 veces) en la intensidad de la banda en las células sin tratamiento que expresan el oncogen H-ras con respecto a la de las células control, lo que indica un aumento en la actividad del complejo (Figura 14). Este aumento correlaciona con mayores niveles del complejo (Figura 13A). Como se había reportado previamente (Lock & Ross, 1990; Lock 1992) se observó una inhibición en la actividad del complejo ciclina B1/cdc2 12 horas después del tratamiento con etopósido. Se ha reportado que la adición de cafeína después del tratamiento con etopósido induce una activación prematura del complejo (Lau & Pardee, 1982; Lock et al., 1994), En concordancia, observamos que la actividad del complejo es mayor en las células control tratadas con cafeína con respecto a las que no se les adicionó esta sustancia. Interesantemente, 12 horas después del tratamiento con etopósido, las células que

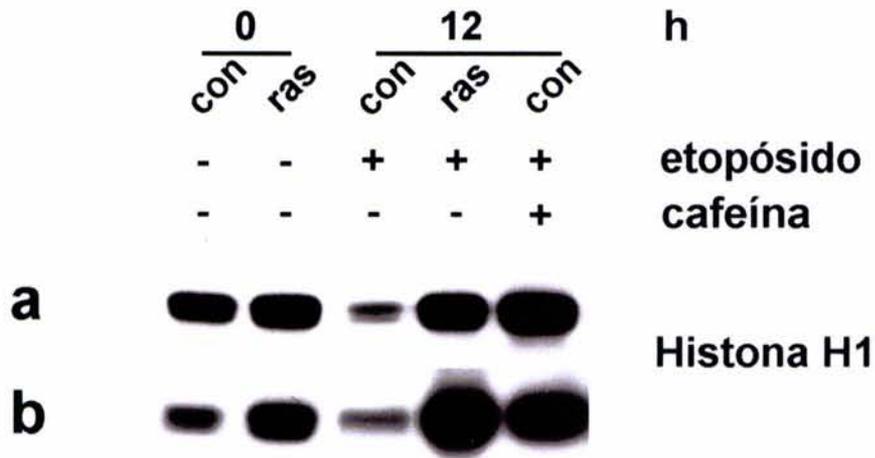


Figura 14.- El oncogen H-ras induce un aumento en la actividad del complejo ciclina B1/cdc2. Se crecieron células HeLa transfectadas por 24hrs, se trataron con etopósido 10 μ M por 1 hr como se indica en Material y Métodos, y se cosecharon 12hrs después de haber retirado el etopósido. Los inmunoprecipitados con anti-ciclina B1 fueron usados para el **Ensayo de cinasa in vitro** sobre la Histona H1. **a** y **b** indican dos experimentos independientes. Cultivos sin tratamiento (-), 12hrs después de la exposición a etopósido o además tratadas con 1mM de cafeína (+), según se indica. Células que expresan el vector (**con**) o H-ras oncogénico (**ras**).

expresan H-ras oncogénico muestran un aumento en la actividad de cinasa del complejo similar a la observada en las células control tratadas con cafeína, con una actividad en promedio tres veces mayor al compararlas a las células control (Figura 14). El aumento en la actividad del complejo que se observa en estas células a este tiempo no se debe a diferencias en la distribución del ciclo celular como se demuestra en la Figura 13B.

III. El aumento de la ciclina B1 nuclear inducido por H-ras provoca alteraciones en la cinética de actividad del complejo ciclina B1/cdc2.

El oncogen H-ras induce un aumento en los niveles de la ciclina B1 nuclear.

Para explorar otras posibles alteraciones inducidas por H-ras se analizó, por Western blot de fracciones de proteínas nucleares /citoplásmicas (Figura 15) y por inmunofluorescencia confocal (Figura 16), la localización celular de la proteína ciclina B1 en células HeLa sin tratamiento y después de inducir daño al ADN con etopósido. Se observó mayor cantidad de ciclina B1 en los núcleos de las células transfectadas con el oncogen H-ras, tanto en células asincrónicas (Figura 15) como en células sincronizadas en la fase S (Figura 16). Una hora después del tratamiento con etopósido, la ciclina B1 nuclear disminuye considerablemente en ambas líneas celulares. Sin embargo, 6 horas después del tratamiento con etopósido, la cantidad de la ciclina B1 nuclear se recupera en las células que expresan H-ras oncogénico (Figura 15 y Figura 16), mientras que en las células control se observa que los niveles de la ciclina B1 nuclear se mantienen bajos. Esto es más evidente en las células de los cultivos sincrónicos analizados en los experimentos de inmunofluorescencia (Figura 16). Cabe mencionar que las diferencias en los niveles de la ciclina B1 nuclear observadas entre el análisis de Western blot y el de la inmunofluorescencia son debidas principalmente a las diferencias en la

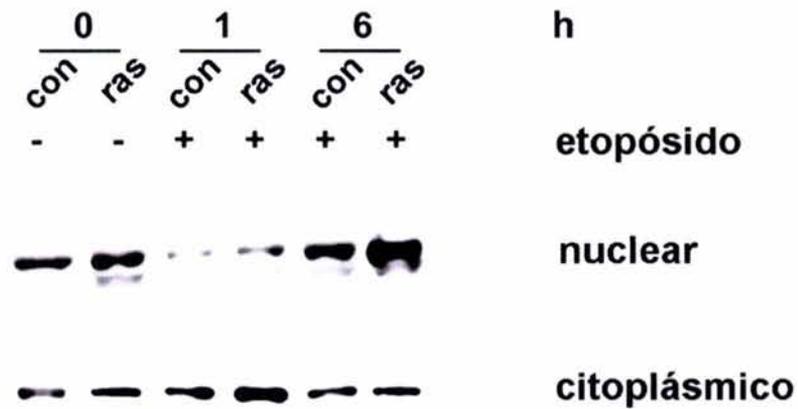


Figura 15.- El oncogen H-ras incrementa los niveles de la ciclina B1 nuclear. Se crecieron células HeLa por 24hrs, se trataron con etopósido y se cosecharon en los tiempos indicados. **Western blot** de la ciclina B1 de fracciones de proteínas nucleares o citoplásmicas obtenidas como se describe en Material y Métodos. Cultivos sin tratamiento (0h), 1 y 6 hrs después de la exposición a etopósido de células transfectadas con el vector (**con**) o H-ras oncogénico (**ras**).

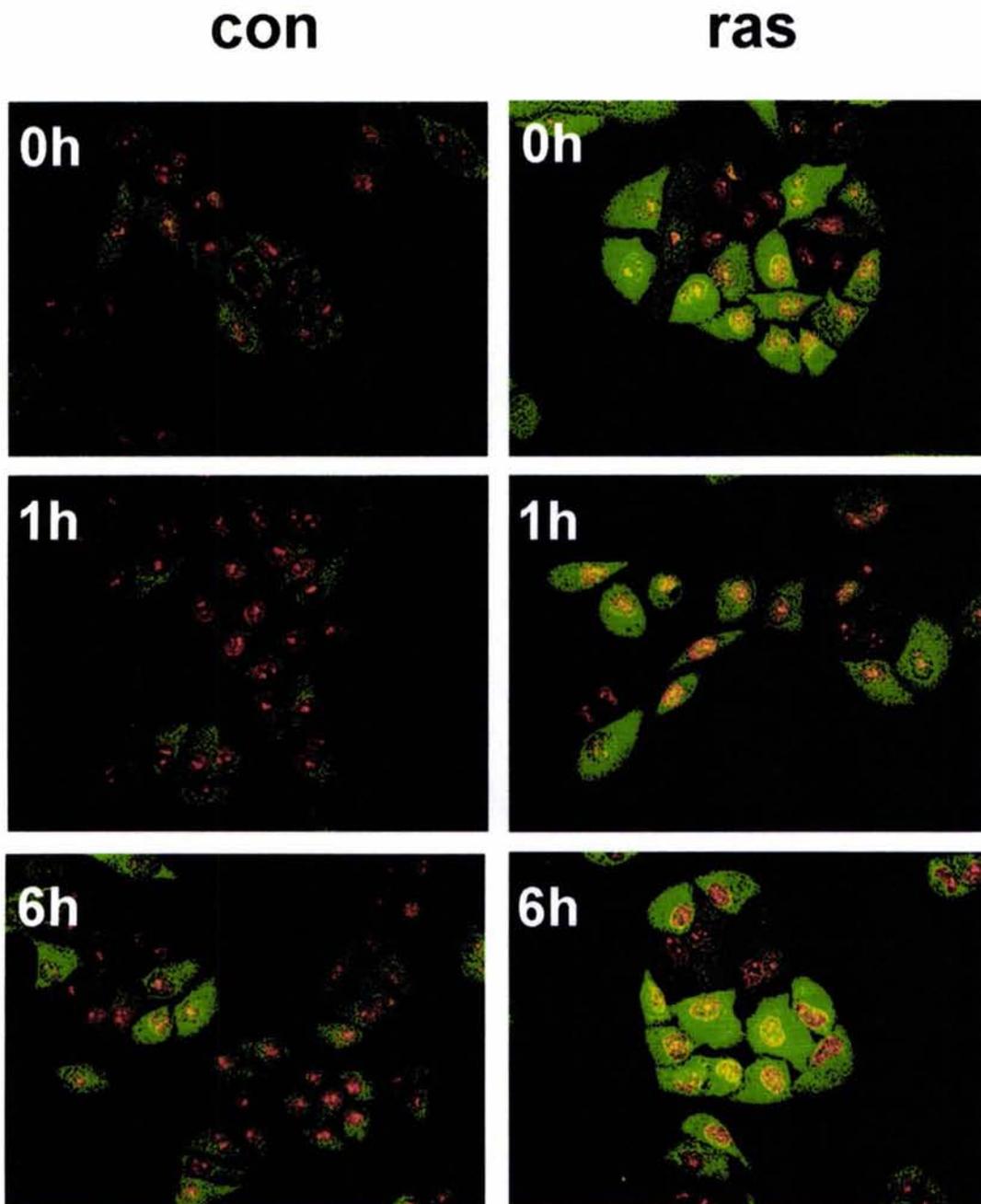


Figura 16.- El oncogen H-ras induce un aumento en los niveles de la ciclina B1 nuclear por célula. Se crecieron células HeLa por 24hrs, se sincronizaron con timidina, se trataron con etopósido y se cosecharon en los tiempos indicados. **Microscopía Confocal** de inmunofluorescencia con anti-ciclina B1 (**verde**), los núcleos se tiñeron con bromuro de etidio (**rojo**); el color **amarillo** representa la proteína ciclina B1 nuclear. Cultivos sincronizados en la fase S tardía sin tratamiento (0h), o 1h y 6h después de la exposición a etopósido de células transfectadas con el vector (**con**) o H-ras oncogénico (**ras**).

sincronización celular, pues en el primero se utilizaron cultivos asincrónicos mientras que en el segundo se utilizaron cultivos sincronizados en la fase S del ciclo celular.

H-ras oncogénico provoca que la actividad del complejo ciclina B1/cdc2 se recupere más rápidamente después del daño al ADN.

Para evaluar si el aumento de la ciclina B1 nuclear en las células que expresan H-ras oncogénico induce alteraciones en la actividad del complejo ciclina B1/cdc2, se realizó un ensayo de cinasa *in vitro*. Ya que se sabe que la actividad del complejo ciclina B1/cdc2 se encuentra también regulada por la localización núcleo /citoplasma del mismo. Se encontró que, la actividad de cinasa del complejo ciclina B1 /cdc2 disminuye en las células control tratadas con etopósido, con respecto a la actividad observada en las células sin tratamiento, en concordancia con lo reportado en la literatura (Lock & Ross, 1990; Lock, 1992). Esta disminución es evidente desde la primera hora y se mantiene hasta las 12 horas post-tratamiento (Figura 17A y 17B). La adición de cafeína a las células control después del tratamiento con etopósido, provoca que la actividad del complejo regrese a niveles normales desde las 6 horas post-tratamiento y 12 horas después la actividad del complejo es incluso mayor que la actividad observada en las células sin ningún tratamiento, concordantemente con lo reportado (Lau & Pardee, 1982; Lock et al., 1994). Interesantemente, las células HeLa que expresan H-ras oncogénico tratadas con etopósido, presentan un comportamiento similar al de las células control tratadas con etopósido y cafeína, la actividad del complejo ciclina B1/cdc2 disminuye a la hora post-tratamiento pero la actividad se recupera 6 horas después y 12 horas después es 3 veces mayor a la de las células control (Figura 17A y 17B). Las diferencias en la cinética de actividad del complejo ciclina B1/cdc2 entre las células control y las transfectadas con el oncogen H-ras, no son debidas a

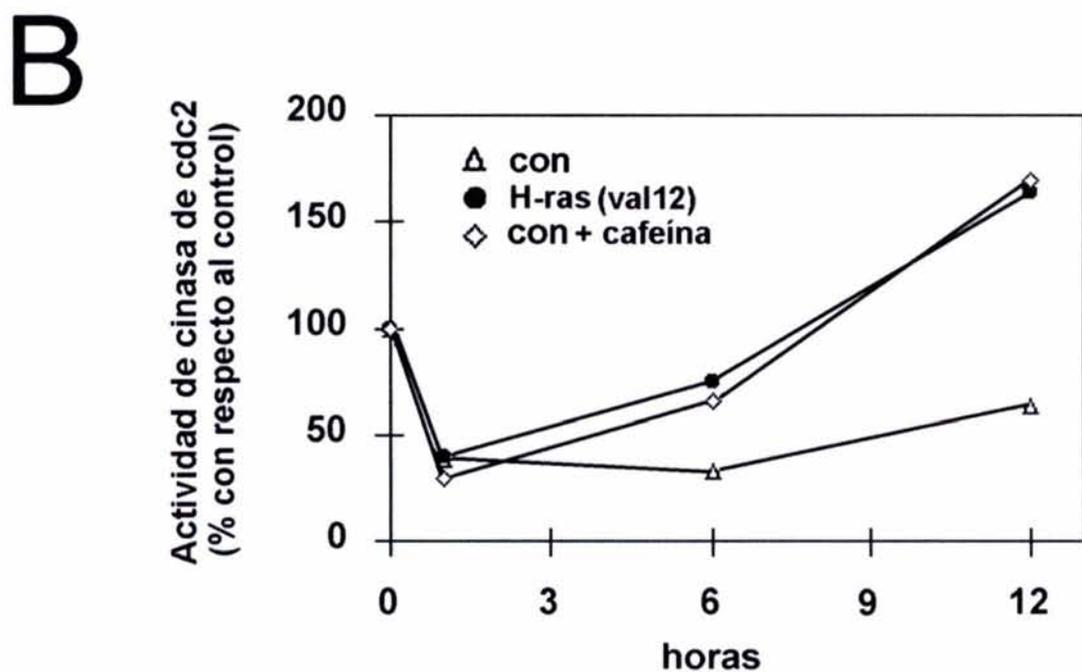
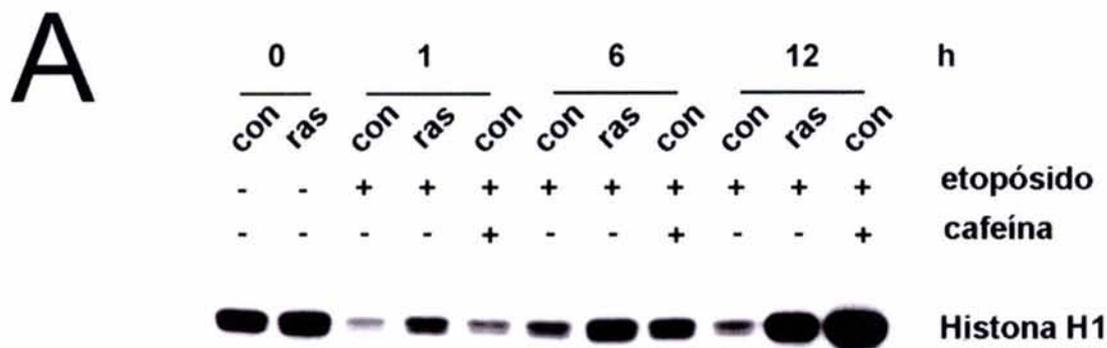


Figura 17.- H-ras oncogénico provoca que la actividad del complejo ciclina B1/cdc2 se recupere más rápidamente después del daño al ADN. Se crecieron las células y se trataron con etopósido o además con cafeína, según se indica; y en los tiempos indicados se cosecharon las células. **A, Ensayo de cinasa *in vitro*** de inmunoprecipitados con anti-ciclina B1 sobre la Histona H1. Células transfectadas con el vector (**con**) o H-ras oncogénico (**ras**). **B, Análisis densitométrico** de la Histona H1 fosforilada. Los resultados son expresado como el porcentaje de la actividad con respecto a las células sin tratamiento (0 h). Células que expresan el vector (Δ), H-ras oncogénico (val12) (●) o células control tratadas con 1mM de cafeína (◊). Los resultados representan el promedio de dos experimentos independientes.

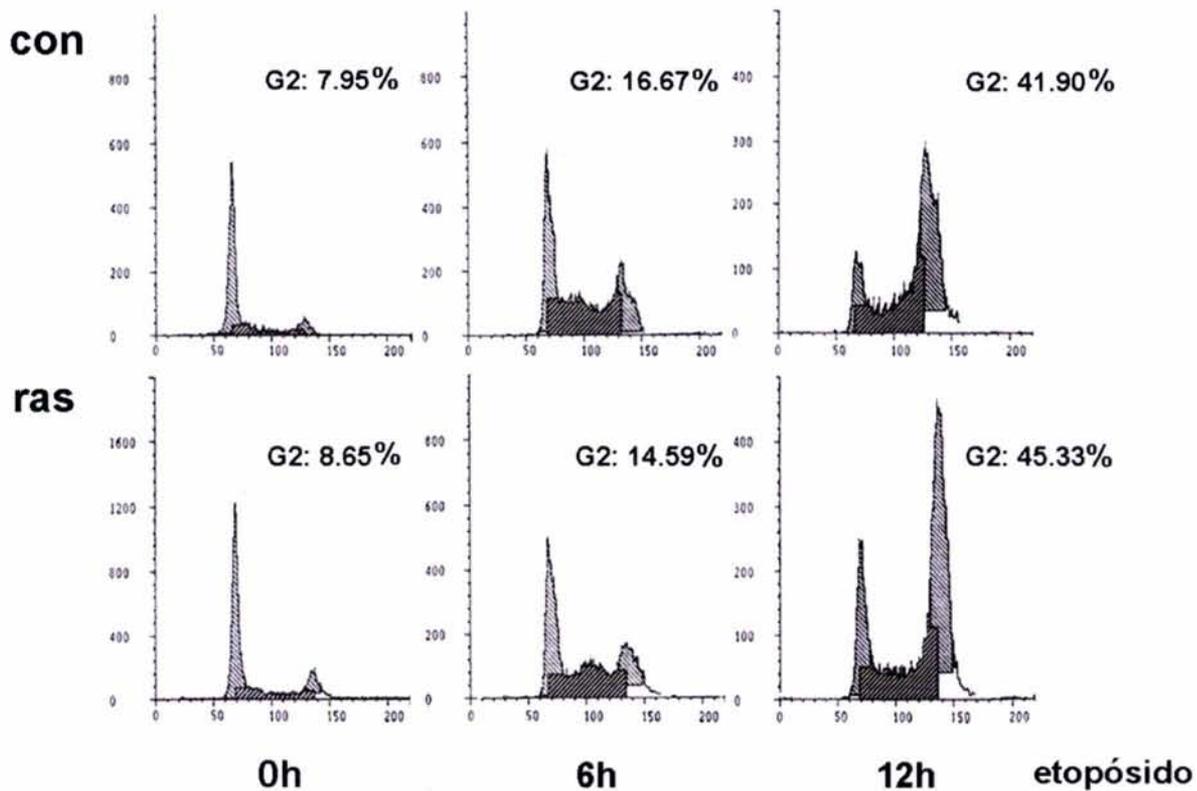


Figura 18.- En las primeras 12 horas, después de la exposición a etopósido, no se observan diferencias en la distribución de las fases del ciclo celular. Se crecieron las células y se trataron con etopósido como se indica en Material y Métodos y en los tiempos indicados se cosecharon las células para el análisis por **Citofluorometría de flujo**, los histogramas muestran el número de núcleos en función del contenido de ADN. Células HeLa que expresan el vector (**con**) o H-ras oncogénico (**ras**), de cultivos sin tratamiento (0h), 6 o 12 horas después del tratamiento con etopósido. Se indica en cada histograma el porcentaje de células en la fase G2/M del ciclo celular (**G2**).

diferencias en la distribución de las fases del ciclo celular entre ambas líneas celulares, como se puede observar por el análisis de citofluorometría de flujo (Figura 18).

Interesantemente, la recuperación a las 6 horas post-tratamiento en la actividad de cinasa del complejo ciclina B1/cdc2, en las células que expresan el oncogen H-ras (Figura 17), correlaciona con el incremento observado en los niveles de la ciclina B1 nuclear en estas células (Figuras 15 y 16).

Al mismo tiempo, se analizaron los niveles totales tanto de la proteína ciclina B1 como del complejo ciclina B1/cdc2 por Western blot. Se observó que, en las primeras 6 horas post-tratamiento los niveles totales de la proteína ciclina B1 y del complejo ciclina B1/cdc2 (Figura 19) se mantienen iguales a los observados en las células sin tratamiento. Además, se corroboró en cultivos sincrónicos que no hay cambios en la cantidad de ciclina B1 hasta las 6 horas después del tratamiento con etopósido (Figura 20). Estos resultados indican que la recuperación de la actividad a las 6 horas después del tratamiento con etopósido no se deben a un incremento en la cantidad de ciclina B1; y por lo tanto, es posible que se deban a un aumento en los niveles de la ciclina B1 nuclear.

IV. El oncogen H-ras induce alteraciones en la respuesta al daño al ADN

La expresión del oncogen H-ras induce la liberación prematura del arresto en G2.

Para investigar si las alteraciones observadas sobre la ciclina B1 y el complejo ciclina B1/cdc2 en las células que expresan el oncogen H-ras pueden afectar la cinética del arresto en G2 inducido por etopósido, se analizó la distribución de las fases del ciclo celular. Las células control y las transfectadas con el oncogen H-ras de cultivos sin tratamiento no muestran ninguna diferencia en la distribución del

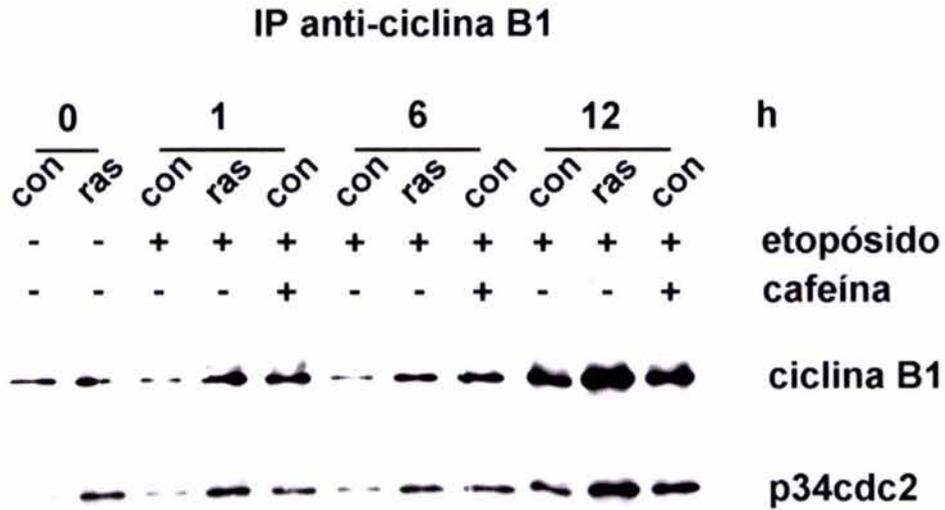
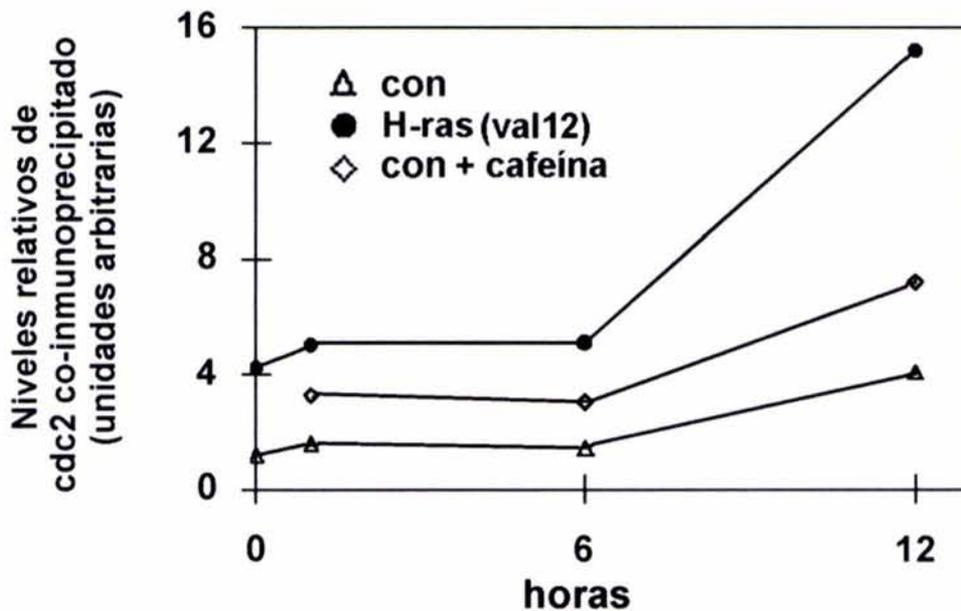
A**B**

Figura 19.- En las primeras 6 horas, después de la exposición a etopósido, no se observan diferencias en la cantidad del complejo ciclina B1/cdc2. Se crecieron células por 24 hrs., se trataron con etopósido o además con cafeína según se indica, y se cosecharon en los tiempos indicados. **A**, Western blot de la ciclina B1 y cdc2 de inmunoprecipitados con anticuerpos anti-ciclina B1, el tiempo 0 h indica células no tratadas con el etopósido. Células transfectadas con el vector (con) o H-ras oncogénico (ras). **B**, Análisis densitométrico de cdc2 coimmunoprecipitado. Células que expresan el vector (con) o H-ras oncogénico (ras). Los resultados representan el promedio de dos experimentos independientes.

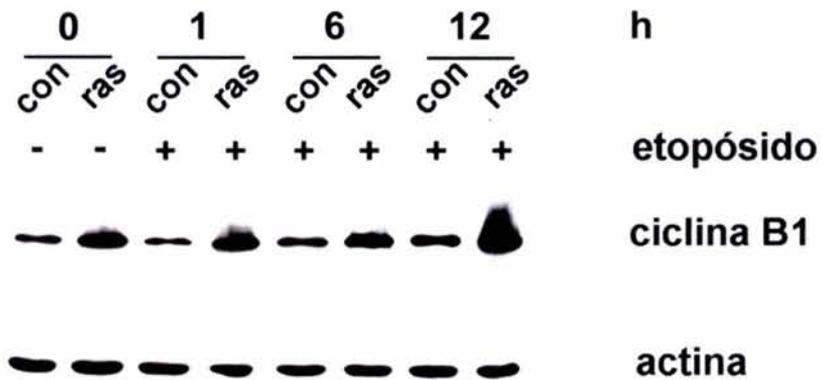


Figura 20.- En las primeras 6 horas, después de la exposición a etopósido, no se observan diferencias en la cantidad de la ciclina B1. Se crecieron células por 24 hrs., se sincronizaron con timidina, se trataron con etopósido y se cosecharon en los tiempos indicados. Western blot anti-ciclina B1 de lisados totales de cultivos sincronizados en la fase S tardía. Células transfectadas con el vector (**con**) o H-ras oncogénico (**ras**).

ciclo celular (Figura 21A). Ambas líneas celulares presentaron aproximadamente la misma proporción de células arrestadas en G2/M, 12 horas después del tratamiento con etopósido. Sin embargo, las células que expresan H-ras oncogénico muestran una proporción menor de células arrestadas en G2/M (30%) con respecto a las células que expresan neo (50%) 24 horas después de la exposición a etopósido (Figura 21A).

Debido a que por citofluorometría de flujo no se puede discernir si las células arrestadas en G2/M se encuentran en G2 o en mitosis, se decidió determinar la relación del porcentaje de células en G1 con respecto al de G2/M. Este índice nos permite ver más claramente la proporción de células que están saliendo del arresto y están entrando al siguiente ciclo celular. Como se observa en la gráfica desde las 15 horas post-tratamiento la proporción de células en G1 con respecto a la de las células arrestadas en G2/M es mayor en las células transfectadas con H-ras oncogénico, siendo más dramático a las 18 y 24 horas (Figura 21B).

En las células de cultivos sincrónicos se observa algo similar pero a tiempos más largos, si bien 24 horas después del tratamiento no hay diferencias con casi el 100% de las células arrestadas en G2/M en ambas líneas celulares. A las 36 horas las diferencias son más evidentes entre las células control y las que expresan el oncogen, observándose en las primeras un 92% de las células arrestadas en G2 mientras que en las segundas solo el 40% de ellas permanecen arrestadas, indicando que salieron antes del arresto (Figura 22).

Como se mencionó anteriormente no podemos determinar por citofluorometría de flujo si las células están en G2 o en M; por lo tanto, para confirmar que las células transfectadas con H-ras efectivamente estaban saliendo prematuramente del arresto en G2, se realizó un ensayo de cinasa *in vitro* para determinar la actividad del complejo ciclina B1/cdc2 en células tratadas con etopósido y nocodazol. El complejo ciclina B1/cdc2 se encuentra inactivo en G2 y en metafase tiene su máxima actividad, el nocodazol arresta a las células en

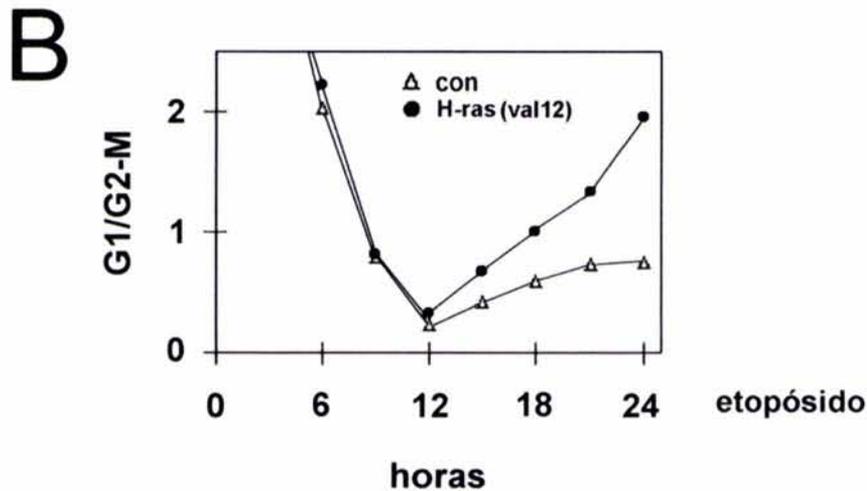
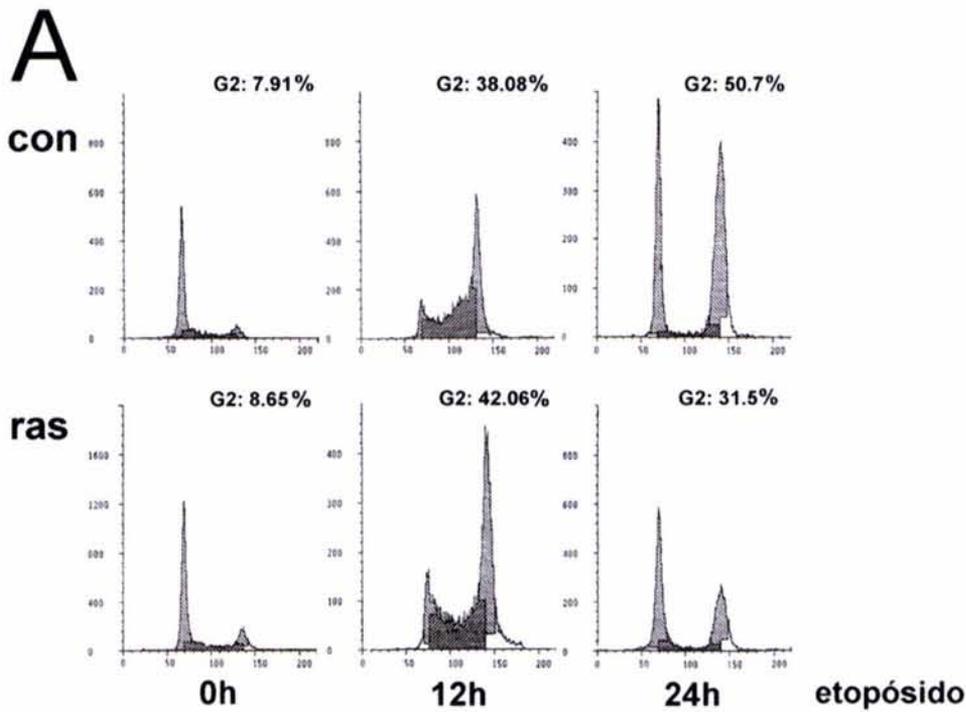


Figura 21.- La expresión del oncogen H-ras induce la liberación prematura del arresto en G2 provocado por etopósido. Se crecieron células HeLa por 24hrs, se trataron con etopósido y se cosecharon en los tiempos indicados para ser procesadas para el análisis de la distribución de las fases del ciclo celular. **A, Citofluorometría de flujo**, los histogramas muestran el número de núcleos en función de su contenido de ADN. Cultivos sin tratamiento (0h) o, 12 y 24 horas después del tratamiento con etopósido. Células transfectadas con el vector (**con**) o H-ras oncogénico (**ras**). Se indica en cada histograma el porcentaje de células en la fase G2/M del ciclo celular (G2). **B, Proporción** del número de núcleos en la fase G1 con respecto a los de G2-M. Células que expresan el vector (Δ) o H-ras oncogénico (●).

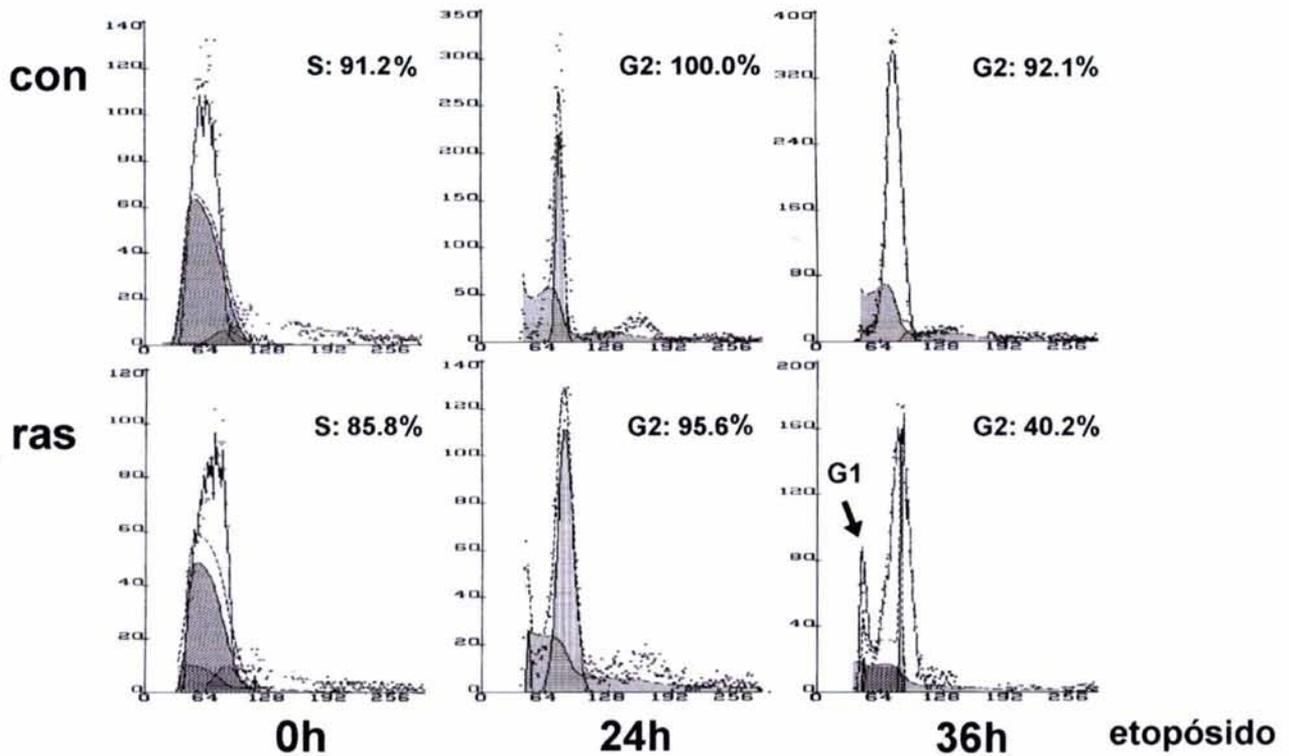


Figura 22.- La expresión del oncogen H-ras induce la liberación prematura del arresto en G2 en cultivos sincrónicos. Se crecieron células HeLa por 24hrs, se sincronizaron con timidina y se trataron con etopósido como se indica en Material y Métodos, se cosecharon las células en los tiempos indicados. **Citofluorometría de flujo** de cultivos sincrónicos, en la fase S (0h) o, 24 y 36 horas después del tratamiento con etopósido. Se indica en cada histograma el porcentaje de células en la fase S (S) o G2/M (G2) del ciclo celular. La flecha señala a las células que salieron del arresto y se encuentran en G1. Células transfectadas con el vector (**con**) o H-ras oncogénico (**ras**).

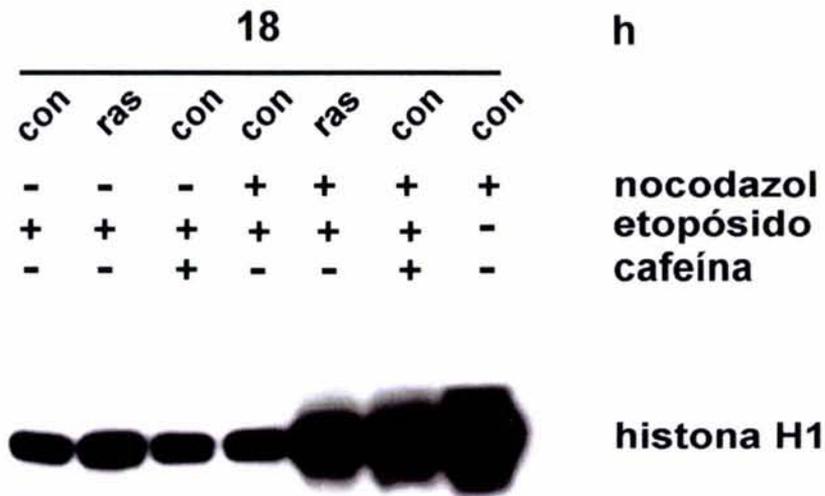


Figura 23.- Una mayor actividad del complejo ciclina B1/cdc2 demuestra la liberación prematura del arresto en G2 provocada por el oncogen H-ras. Se crecieron células HeLa por 24hrs, se trataron con etopósido o además con cafeína según se indica, y se lisaron 18 horas después, en donde se indica las células fueron incubadas en presencia de nocodazol después de retirar el etopósido. **Ensayo de cinasa in vitro**, de inmunoprecipitados con anticiclina B1 sobre la Histona H1. Células transfectadas con el vector (**con**) o H-ras oncogénico (**ras**).

metafase con el complejo ciclina B1/cdc2 activo (Jordan et al., 1992). Las células que salen del arresto en G2 (inducido por etopósido) se arrestan en metafase en presencia del nocodazol con el complejo en su forma activa e impide que entren a G1 donde ya no está presente el complejo.

Se observó a las 18 horas que en las células que expresan el oncogen H-ras tratadas con etopósido y nocodazol, el complejo ciclina B1/cdc2 presenta varias veces más actividad que en las células control, indicando que salieron un mayor número de células del arresto de G2 en las primeras (Figura 23). Lo mismo ocurre en las células control tratadas también con cafeína. Se encontró una clara correlación entre la reducción del arresto en G2/M, que observamos en el análisis de citofluorometría de flujo, con una mayor actividad del complejo ciclina B1/cdc2 en el ensayo de cinasa *in vitro* en las células que expresan H-ras oncogénico.

Cabe señalar que a este tiempo (18hrs) si no se adiciona nocodazol al medio, no se observan diferencias en la actividad del complejo entre las diferentes tipos celulares, muy probablemente porque no se puede distinguir entre un complejo inactivo de células arrestadas en G2 y la ausencia del complejo de las células que ya entraron a G1.

Las alteraciones nucleares provocadas por el daño al ADN son potenciadas por el oncogen H-ras.

En trabajos anteriores reportamos que la expresión del oncogen H-ras en las células HeLa induce la aparición de células gigantes y multinucleadas (Miranda et al., 1996, Figura 24A y B, paneles a y b). Si bien el tratamiento con etopósido provoca tanto en las células control como en las transfectadas con el oncogen H-ras la aparición de células gigantes y multinucleadas (Figura 24A) con fragmentación nuclear y micronúcleos (Figura 24B) aproximadamente 48 horas después del tratamiento, las alteraciones observadas son cualitativamente diferentes entre

ambas. Observamos diferentes tipos de alteraciones cromosómicas que incluyen células binucleadas con micronúcleos, núcleos parcialmente fragmentados y células gigantes con núcleos totalmente fragmentados. Mientras que estas últimas rara vez se encontraron en las células control, fueron frecuentemente observadas en las células transfectadas con H-ras (Figura 24A y B, paneles c y d). Por lo que, al parecer la expresión del oncogen H-ras potencia algunos de los cambios morfológicos previamente reportados en las células HeLa tratadas con etopósido (Lock & Ross, 1990; Lock et al., 1994).

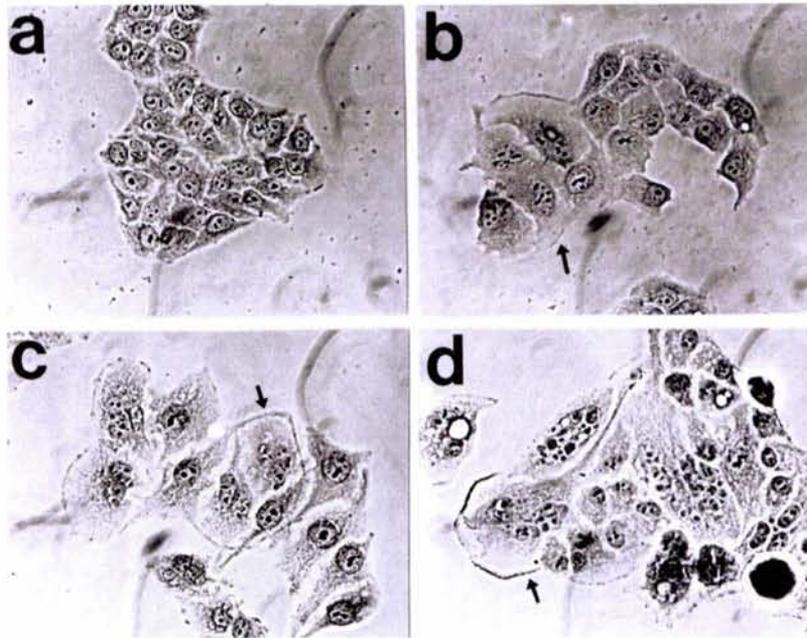
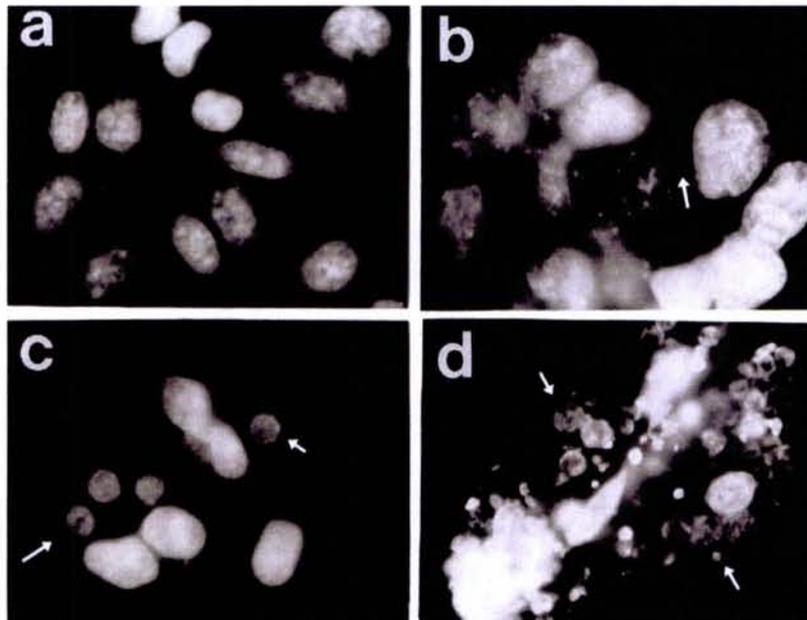
A**B****con****ras**

Figure 24.- Las alteraciones nucleares provocadas por la exposición a etopósido son potenciadas por el oncogen H-ras. Las células fueron crecidas en cubreobjetos, tratadas con etopósido y teñidas como se indica en Material y Métodos. **A,** Tinción con hematoxilina-eosina. Las flechas negras indican células binucleadas y multinucleadas. **B,** Tinción con DAPI (objetivo 100x). Las flechas blancas indican micronúcleos. Células que expresan el vector (a, c) o H-ras oncogénico (b, d); sin tratamiento (a, b) o 48hrs después del tratamiento con etopósido (c, d).

DISCUSION

Los resultados muestran que la expresión del oncogen H-ras en células HeLa afecta el punto de restricción G2/M al aumentar la concentración y la localización nuclear de la ciclina B1, este efecto es independiente de la proteína p53. Las células que expresan H-ras oncogénico presentan una mayor cantidad y actividad de cinasa del complejo ciclina B1/cdc2 y muestran una reducida inhibición de la actividad del complejo tras la exposición a etopósido. Esto es causado en parte por el aumento en la cantidad de la ciclina B1 y del complejo, así como por las alteraciones observadas en la localización celular de la ciclina B1. Las células que expresan H-ras oncogénico muestran un menor tiempo de arresto en el punto de restricción G2 inducido por etopósido lo que provoca la aparición de mayores alteraciones en la cromatina de estas células.

Caracterización de las células HeLa transfectadas con H-ras oncogénico.

Es importante mencionar que estas alteraciones observadas son debidas a la expresión del oncogen H-ras introducido en las células HeLa ya que se demostró que esta línea celular tiene el gen endógeno H-ras normal y que las células establemente transfectadas expresan la forma mutada del mismo. La conocida regulación de ras sobre la expresión de fra1 y fos, y sobre la estabilidad de la proteína β -catenina (Mechta et al., 1997; Cook et al., 1999; Espada et al., 1999; Kukushkin et al., 2002; Casalino et al., 2003) se demostró mediante el análisis de la cantidad de proteína por Western blot. Finalmente las diferencias observadas entre las células que expresan el oncogen y las células control en el arresto en el punto de restricción G1/S provocado por timidina corroboran lo antes publicado respecto a las alteraciones inducidas por ras en este punto de control (Pardee, 1989; Filmus et al., 1994; Liu et al., 1995).

H-ras regula a la ciclina B1 a través de una vía independiente de p53.

Los resultados sugieren que el oncogen H-ras regula la expresión y localización de la ciclina B1 así como la actividad del complejo ciclina B1/cdc2 a través de una vía independiente de p53. Puesto que, H-ras oncogénico induce un aumento: en la actividad del promotor de la ciclina B1 en las células SW480 y en los niveles de la ciclina B1, de su mensajero, de ciclina B1 nuclear, así como en la actividad del complejo en las células HeLa. Ambas líneas celulares carecen de una proteína p53 funcional. En el caso de las células HeLa, se sabe que expresan el oncogen E6 del VPH18 el cual inactiva a p53 al inducir su degradación (Scheffner, et al., 1990; Hoppe-Seyler & Butz, 1993). Además, previamente reportamos que las células HeLa transfectadas con el oncogen H-ras tienen un aumento en la expresión de E6 y E7 (Medina-Martínez et al., 1997), y como es lo esperado no se observa a la proteína p53 en estas células (datos no mostrados). Cabe señalar que la participación de las proteínas p21 y Gadd45 en el punto de control de G2 a través de regular al complejo ciclina B1/cdc2 no es crítico en estas células ya que dicha regulación depende de p53 funcional (Bates et al., 1998; Bunz et al., 1998; de Toledo et al., 1998; Taylor et al., 1999; Wang et al., 1999; Flatt et al., 2000). Más importante aún se descarta la regulación del complejo ciclina B1/cdc2 por H-ras a través de la inducción de p21 antes mencionada, que se sabe depende de p53 funcional (Lloyd et al., 1997). El hecho de que H-ras induzca la expresión de la ciclina B1 en las células SW480, las cuales tienen ambos alelos nulos de p53, sugiere que la regulación de H-ras sobre la vía de p53, la cual involucra a las proteínas mdm2 y p19ARF (Palmero et al., 1998; Ries et al., 2000), no tiene un efecto importante en la inducción de la ciclina B1 en estas células. Esto sugiere que H-ras está regulando el punto de restricción G2/M a través de una vía independiente a p53.

Importantemente, observamos que las células HeLa que expresan el oncogen H-ras presentan una expresión y localización de la ciclina B1 alterada, incluso antes del tratamiento con etopósido. Además, hay evidencia que demuestra que otras

vías independientes de p53 juegan un papel importante en la regulación del punto de control de G2/M en respuesta al daño al ADN. Como se mencionó anteriormente, diversas líneas celulares deficientes de p53 funcional muestran un arresto normal en G2 después de inducir daño al ADN (Paules et al., 1995; Donner et al., 1996; Thompson et al., 1997; Agapova et al., 1999; Passalaris et al., 1999; Atar et al., 2000).

Una de estas vías probablemente involucra a la ciclina D1. Diversas evidencias apoyan esta posibilidad: la actividad del complejo ciclina D/cdk4 es requerida no solo en G1 sino también en G2 para que las células progresen normalmente de G2 a mitosis (Gabrielli et al., 1999; Hitomi et al., 2001); la actividad de la ciclina D3/cdk4 es inhibida en respuesta al daño por radiación UV y consecuentemente se observa un arresto en G2 (Gabrielli et al., 1999); la sobreexpresión de la ciclina D1 acelera la salida del arresto en G2 provocado por radiación ionizante, con una actividad elevada del complejo ciclina B1/cdc2 (Coco-Martin et al., 1999); y finalmente, la ciclina D induce la trans-activación del promotor de la ciclina B1 a través de los dos elementos CCAAT (Katula et al., 1997; Moro et al., 1997). Lo más importante es que, se ha descrito que ras induce la expresión de la ciclina D1 (Filmus et al., 1994; Albanese et al., 1995), y recientemente se ha observado que dicha inducción se da principalmente en la fase G2 del ciclo celular (Hitomi et al., 2001; Sa et al., 2002). Los resultados obtenidos junto con las evidencias descritas sugieren que muy probablemente la vía de regulación de H-ras sobre la ciclina B1 sea a través de vías en las que participe la ciclina D, por tanto sería interesante para un trabajo futuro determinar dicha participación.

Se ha demostrado en otros trabajos que la co-transfección de los oncogenes H-ras y v-myc a células primarias de embrión de rata induce un arresto en G2 más prolongado después de ser irradiadas, con la supresión de la expresión del mensajero de la ciclina B1 y por consiguiente una radioresistencia mayor que las

células parentales (McKenna et al., 1991; McKenna et al., 1996). Nuestros resultados aparentemente contradicen estos datos ya que observamos lo contrario, una disminución en el arresto en G2 después del daño al ADN con etopósido así como un aumento en los niveles del mensajero de la ciclina B1. Una explicación a las observaciones anteriores es que la respuesta depende de la función de p53.

Se ha reportado que en fibroblastos primarios de embrión de rata, la sobreexpresión de H-ras induce un arresto en G2 y que la transfección de una mutante dominante negativa de p53 libera del arresto inducido por H-ras (Hicks et al., 1991; Hirakawa & Ruley, 1988; Stewart et al., 1995). Así mismo, la expresión del oncogen ras en células deficientes de p53 provoca un aumento en la inestabilidad genómica y una disminución del arresto en G2 después del daño al ADN, pero no libera prematuramente del arresto a células con p53 funcional (Agapova et al., 1999). Por otro lado, como se mencionó en la Introducción, se sabe que p53 regula el punto de control de G2/M en respuesta al daño al ADN mediante la inhibición de la transcripción y de la localización nuclear de la ciclina B1 (Chan et al., 1999; Innocente et al., 1999; Taylor et al., 1999). Por consiguiente es evidente que existen diferentes vías de regulación del punto de restricción G2/M en respuesta al daño al ADN que resultan redundantes y que por lo tanto es necesario inactivar más de una vía para que se pierda el punto de control. Por lo que, si bien estos resultados no contradicen que H-ras pueda estar regulando el punto de restricción de G2/M a través de regular a la ciclina B1 por una vía independiente de p53, sí es claro que se necesita alterar más de una vía de transducción para observar un efecto.

H-ras induce la expresión de la ciclina B1 regulando así al complejo ciclina B1/cdc2.

Se encontró que las células HeLa que expresan el oncogen H-ras presentan un aumento en la cantidad de proteína y de ARNm de la ciclina B1 e incluso este

aumento es mayor después del tratamiento con etopósido. Como resultado se observa también un aumento en la cantidad del complejo ciclina B1/cdc2 tanto en cultivos sin tratamiento, como 12 horas después de la exposición a etopósido. Estas células mostraron una actividad de cinasa aumentada del complejo ciclina B1/cdc2 y una inhibición reducida de esta actividad 12h después del tratamiento con etopósido. En contraste, después de la exposición al etopósido, las células control, aunque acumularon una concentración modesta de la ciclina B1 y del complejo ciclina B1/cdc2, la actividad de cinasa del complejo se encontró inhibida. El hecho de que ambas líneas celulares exhibieron la misma proporción de células en G2/M 12h después del tratamiento con etopósido, sugiere que el efecto del oncogen H-ras sobre los niveles y actividad del complejo ciclina B1/cdc2, no es una consecuencia de diferencias en la distribución de la fase del ciclo celular de los cultivos.

Respecto a lo anterior se sabe que, con el tratamiento con etopósido se observa una disminución inicial en los niveles de la ciclina B1, pero con el tiempo estas células muestran un aumento en los niveles del mensajero y de la proteína que exceden a los observados en las células sin tratamiento. Sin embargo, en estas condiciones, las células permanecen arrestadas en G2 con una actividad baja del complejo ciclina B1/cdc2, la cual es muy similar a la de las células sin tratamiento (Lock & Keeling, 1993; Maity et al., 1996). Por otro lado, en la línea celular de ovario de hámster (CHO) después del tratamiento con etopósido, los niveles de la ciclina B1 y la actividad de cinasa del complejo ciclina B1/cdc2 son mayores que los observados en las células HeLa. Estas células salen antes del arresto en G2, independientemente de las diferencias en la duración del ciclo celular de cada línea (Lock & Keeling, 1993) y por consiguiente la citotoxicidad por etopósido es mayor en las células CHO. De tal manera, la expresión de H-ras oncogénico en las células HeLa aumenta dramáticamente los niveles de la ciclina B1, semejante a lo observado en las células CHO. Esto a su vez induce un aumento en el complejo ciclina B1/cdc2, el cual puede activarse rápidamente debido al proceso de

retroalimentación positiva al que esta sujeto, como se ha descrito anteriormente (Hoffman et al., 1993).

Como se mencionó anteriormente, se utilizó como control positivo cafeína después del tratamiento con etopósido, ya que se ha visto que impide el arresto en G2 después del daño al ADN (Lau & Pardee, 1982). La adición de cafeína a las células control después del tratamiento con etopósido, provoca que la actividad del complejo regrese a niveles normales desde las 6 horas post-tratamiento en concordancia con lo reportado (Lau & Pardee, 1982; Lock et al., 1994). Interesantemente, las células HeLa que expresan H-ras oncogénico tratadas con etopósido, presentan un comportamiento similar al de las células control tratadas con etopósido y cafeína. Sin embargo, se sabe que la exposición a cafeína induce la defosforilación específica y por tanto la activación de la cinasa cdc2, con una proporción de las células entrando a mitosis (Lock et al., 1994), y no se ha reportado ningún efecto directo sobre la expresión o cantidad de la ciclina B1 ni del complejo. Por tanto, si bien el resultado es similar entre la adición de cafeína y la expresión del oncogen H-ras los mecanismos de control que se ven alterados son diferentes. Esto apoya lo ya antes encontrado, de que existen diversas vías de control que resultan redundantes o complementarias.

H-ras incrementa los niveles de la ciclina B1 nuclear.

Se encontró que, además de las alteraciones inducidas por H-ras oncogénico en la expresión de la ciclina B1, también se producen alteraciones en la localización intracelular de la ciclina; se encontró que las células que expresan el oncogen H-ras tienen mayor cantidad de ciclina B1 nuclear. Se observó que una hora después del tratamiento con etopósido, hay una reducción en la cantidad de ciclina B1 nuclear en ambas líneas celulares; sin embargo, 6 horas después del tratamiento con etopósido la cantidad de ciclina B1 nuclear se recupera sólo en las células

transfectadas con H-ras. Significativamente, una hora después de la exposición a etopósido, existe una correlación directa entre la disminución observada en la cantidad de ciclina B1 nuclear y la disminución de la actividad del complejo ciclina B1/cdc2. A 6 horas después del tratamiento con etopósido, cuando la actividad del complejo ciclina B1/cdc2 se ha recuperado únicamente en las células que expresan el oncogen H-ras, también se observa un incremento de la ciclina B1 en los núcleos de estas células. Por lo tanto, es probable que a estos tiempos, el aumento en la cantidad de ciclina B1 nuclear este causando una activación prematura del complejo después del daño al ADN por etopósido; mas que el aumento en los niveles de la ciclina B1. Ya que hasta las 6 horas después del tratamiento con etopósido no se observan diferencias en la cantidad de la ciclina B1 ni del complejo ciclina B1/cdc2 con respecto a las células sin tratamiento. Es importante señalar que las diferencias observadas entre el análisis por Western blot y la inmunofluorescencia confocal se deben, como se dijo anteriormente, a que los cultivos eran asincrónicos en el primero y sincrónicos en el segundo. Debido a que en los cultivos sincronizados en la fase S tenemos la mayor proporción de células (más del 80%) en la misma fase del ciclo, las diferencias en la cantidad de ciclina B1 nuclear entre las células control y las células que expresan H-ras oncogénico son más claras.

Se sabe que en la fase S tardía, la ciclina B1 se encuentra principalmente en el citoplasma y que requiere de su entrada al núcleo para su activación y para el avance a la mitosis (Pines & Hunter, 1994; Hagting et al., 1998; Li et al., 1995; Jin et al., 1996, Li et al., 1997). El hecho de que las células que expresan el oncogen H-ras presenten en esta fase una mayor cantidad de ciclina B1 nuclear que rápidamente puede ser activada, sugiere que son células que pueden entrar prematuramente a mitosis y que esto puede hacerse evidente si se produce un daño al ADN que requiera de un arresto celular. Se ha reportado que la sobre-expresión de la ciclina B1 induce una ligera disminución en el arresto en G2 después de irradiar a las

células, sin embargo la sobre-expresión de una mutante de la ciclina B1 constitutivamente dirigida al núcleo, claramente produce efectos más dramáticos con una significativa reducción del arresto en G2 (Jin et al., 1998). Además, las células HeLa tratadas con etopósido y leptomicina B, un inhibidor específico del transporte dependiente de NES, acumulan ciclina B1 en el núcleo, pero solo presentan una prematura liberación del arresto en G2 si también se tratan con cafeína que induce la desfosforilación de cdc2 (Toyoshima et al., 1998). Por lo que, se requiere de alterar por lo menos dos mecanismos de control para reducir el arresto en G2 después de producir un daño al ADN. Por lo tanto, al parecer la sobre-expresión de la ciclina B1 y el aumento en su localización nuclear inducido por el oncogen H-ras, son responsables de la activación prematura del complejo ciclina B1/cdc2 y de la reducción en el arresto en G2 después del daño al ADN provocado por el etopósido.

Como se mencionó en la Introducción, en la fase G2 tardía, la ciclina B1 es fosforilada en 4 residuos de serina que se encuentran dentro de la región CRS para su rápida translocación al núcleo y el inicio de la mitosis (Pines & Hunter, 1994; Li et al., 1995; Li et al., 1997; Hagting et al., 1998; Toyoshima et al., 1998; Yang, et al., 1998). Se sabe que las cinasas Plx1/Plk1 y Erk, una MAP cinasa, están involucradas en su fosforilación (Izumi & Maller, 1991; Toyoshima et al., 2001; Yang et al., 2001; Yuan et al., 2002; Walsh et al., 2003). Por otro lado, como se mencionó anteriormente la activación de ras induce la fosforilación y la activación de la vía de las MAP cinasas incluyendo a Erk1/2 (Moodie, et al., 1993; Avruch, et. al. 1994; Lewis et al., 1998). Además se ha reportado que en *Xenopus*, H-ras induce la activación de una cinasa MAP de 42kDa que corresponde a la cinasa Erk, la cual a su vez activa al complejo ciclina B1/cdc2 promoviendo la maduración meiótica de los oocitos (Pomerance et al., 1992; Shibuya et al., 1992; Nebreda et al., 1993; Pomerance et al., 1996). En estos trabajos solo determinan la actividad de cinasa del complejo, pero podría especularse que dicha activación es vía la regulación de la

localización de la ciclina B1 debido a los reportes antes mencionados. Nosotros observamos en las células HeLa que expresan el oncogén H-ras, una forma de la ciclina B1 con una migración más lenta cuando se separan las proteínas en los geles de acrilamida y que es reconocida por el anticuerpo anti-ciclina B1 en el Western blot (datos no mostrados), la cual podría ser la forma fosforilada de la ciclina. Así también observamos en los Western blot de lisados nucleares y citoplásmicos una diferencia en la migración de la ciclina B1 (Figura 19). Todas estas evidencias permiten sugerir que H-ras oncogénico podría estar alterando la localización nuclear de la ciclina B1 al inducir a través de la cinasa Erk la fosforilación de los residuos de serina en la región CRS.

Por otro lado, la regulación de la localización de la ciclina B1 por ras podría estar dada por otra vía que también involucra a las MAP cinasas que activan a p90rsk. Se ha reportado en *Xenopus* que H-ras también induce la activación de la cinasa p90rsk y que dicha activación es previa a la activación del complejo ciclina B1/cdc2 (Barrett, et al., 1990; Nebreda et al., 1993). Estudios más recientes demuestran que p90rsk fosforila e inactiva a la cinasa Myt1 (Palmer et al., 1998). Interesantemente existen evidencias que sugieren que la cinasa Myt1 no solo inactiva al complejo ciclina B1/cdc2 al fosforilar a cdc2, sino que se une a la ciclina B1 secuestrando al complejo en el citoplasma e impidiendo su importación nuclear (Liu et al., 1999).

Como se mencionó anteriormente, la regulación de la actividad del complejo ciclina B1/cdc2 esta dado entre otros factores por la fosforilación de la cinasa cdc2; de hecho la desfosforilación y activación del complejo es necesaria para la entrada a la mitosis (Hoffman & Karsenti, 1994; King et al., 1994; Jin et al., 1996). Se sabe que la exposición a etopósido induce un aumento en la cantidad de complejo ciclina B1/cdc2 secuestrado en el citoplasma con una actividad de cinasa inhibida, debido principalmente a la fosforilación de cdc2, y por tanto un arresto en G2 (Lock & Ross, 1990; Lock & Keeling, 1993; Tounekti et al., 1993; Lock et al., 1994; Jin

et al., 1996). Es probable que el aumento en la actividad del complejo ciclina B1/cdc2 en las células que expresan H-ras oncogénico incluso después del daño al ADN pueda deberse a que niveles altos del complejo sean sujetos a la activación a través de mecanismos de retroalimentación positiva que involucran a la fosfatasa cdc25, la cual se sabe desfosforila a cdc2, (Hoffman et al., 1993; Gabrielli et al., 1996). Además, también hay que considerar que esta posible activación del complejo sea inducido no solo por el aumento en la cantidad del mismo sino por su acumulación en el núcleo en las células que expresan H-ras oncogénico. Se sabe que cdc25C es nuclear (Millar et al., 1991; Girard et al., 1992) y que si bien después de un daño al ADN, ésta es secuestrada en el citoplasma por la proteína 14-3-3, se ha demostrado recientemente que al parecer dicha acumulación es solo el reflejo de una lenta pero continúa importación nuclear con una rápida exportación (Yang et al., 1999). Por lo tanto, es necesario no solo secuestrar a cdc25C sino también al complejo ciclina B1/cdc2 en el citoplasma para evitar su activación en el núcleo. Además, la fosfatasa cdc25B que normalmente es citoplasmática (Gabrielli et al., 1996) después de que se produce un daño al ADN se acumula en el núcleo y retiene su actividad de fosfatasa, consecuentemente puede activar al complejo que se encuentre en el núcleo (Gabrielli et al., 1997;). Por otro lado, Wee1 es nuclear y después del daño al ADN puede activarse e inhibir al complejo ciclina B1/cdc2; sin embargo, el complejo activo y localizado en el núcleo también puede fosforilar e inactivar a Wee1 a través de mecanismos de retroalimentación positiva, además Myt1 estaría inactiva debido a la cinasa p90rsk e inducir así la liberación prematura del arresto en G2 (Palmer et al., 1998; Takizawa & Morgan, 2000). Experimentos preliminares, por Western blot de lisados totales, sugieren que hay una reducción en la fosforilación de cdc2 después del tratamiento con etopósido en las células que expresan H-ras oncogénico al compararlas con las células control. Esto estaría en concordancia con lo antes reportado, de que la correcta localización

del complejo ciclina B1/cdc2 determina su actividad y por lo tanto la entrada a la mitosis.

H-ras oncogénico induce la liberación prematura del arresto en G2 en respuesta al daño al ADN.

Se sabe que la exposición a etopósido por tiempos cortos provoca cortes de cadena sencilla en el ADN que son reparados rápidamente al retirar la sustancia; sin embargo, este tratamiento induce un arresto prolongado en G2 que va de 36 a 48 horas en la mayoría de las células de cultivos asincrónicos. Aquellas células que salen prematuramente del arresto mueren por muerte mitótica (Lock & Ross, 1990; Lock, 1992; Lock et al., 1994). Nosotros observamos que las células transfectadas con el oncogen H-ras presentan una proporción significativa de células que salen antes del arresto en G2 con respecto a las células control, siendo muy evidente a las 24h después del tratamiento con etopósido en cultivos asincrónicos y a las 36h en los cultivos sincrónicos. Estas diferencias entre los cultivos asincrónicos y sincrónicos se debe principalmente al porcentaje de células que se encuentran en S tardía cuando se les provoca el daño al ADN. Para poder determinar claramente si las células transfectadas con H-ras oncogénico están saliendo antes del arresto en G2, se adicionó nocodazol al medio de cultivo después del tratamiento con etopósido y se realizó el ensayo de cinasa *in vitro*. Como se mencionó anteriormente el nocodazol arresta a las células en metafase al alterar la polimerización de los microtúbulos, cuando el complejo ciclina B1/cdc2 se encuentra con su máxima actividad (Jordan et al., 1992). Se encontró una correlación entre la reducción del arresto en G2/M que observamos en el análisis de citofluorometría de flujo con una mayor actividad del complejo ciclina B1/cdc2 en el ensayo de cinasa *in vitro*. Estos resultados confirman que las células que expresan H-ras están saliendo prematuramente del arresto en G2.

Se sabe que, existen diferentes vías de regulación del punto de restricción G2/M en respuesta al daño al ADN, específicamente de la regulación del complejo ciclina B1/cdc2, que resultan ser redundantes. Existen mecanismos que regulan la actividad del complejo en los que participan cdc25, chk1/2 y cafeína, mientras que otros regulan la cantidad y la localización de la ciclina B1 en los que participan p53, p21, 14-3-3, Rb, las MAP cinasas y Ras entre otros. Se ha reportado que p53 y por tanto p21 no son necesarios para inducir un arresto en G2 pero que son esenciales para mantener dicho arresto, que puede durar hasta más de 96 hrs. (Bunz et al., 1998; Flatt et al., 2000). Así, las células HeLa y las transfectadas con el gen neo control presentan un arresto en G2 más corto que otras líneas celulares que tienen p53 funcional; sin embargo, la transfección de H-ras reduce aún más y de manera significativa dicho arresto. Por lo tanto, no se requiere únicamente de p53 para mantener el arresto en G2 como se había planteado, sino que posiblemente otras vías como en las que participa ras también son necesarias. Es importante señalar que se sigue observando un arresto inicial en G2 en las células HeLa transfectadas con H-ras oncogénico tras el tratamiento con etopósido y lo mismo ocurre cuando se adiciona cafeína a las células control (resultados no mostrados). Esto podría indicar que los otros mecanismos de control son suficientes para iniciar un arresto. De aquí, que sería interesante evaluar el efecto si se adiciona cafeína a las células HeLa transfectadas con H-ras oncogénico.

A través del análisis de la cromatina por microscopía observamos que las células que expresan H-ras oncogénico presentan alteraciones morfológicas asociadas a muerte por catástrofe mitótica, como es la presencia de células gigantes multinucleadas y con micronúcleos. Si bien estas alteraciones también se observan en las células control, no son tan dramáticas como las observadas en las células transfectadas con el oncogen H-ras. Cabe mencionar que como habíamos reportado anteriormente, estas células incluso sin ningún tratamiento presentan una alta frecuencia de células binucleadas, multinucleadas y micronúcleos (Miranda et al.,

1996). Por lo tanto, pareciera que la expresión del oncogen H-ras induce en estas células una mayor citotoxicidad a sustancias que dañan al ADN que lleva a las células a muerte mitótica debido a una liberación prematura del arresto en G2.

CONCLUSIONES

H-ras regula el punto de restricción G2/M y este efecto es independiente de la proteína p53.

- H-ras oncogénico induce la expresión de la ciclina B1 en células deficientes de p53 funcional.
- El aumento en la expresión del gen de la ciclina B1 induce un aumento en la cantidad de la proteína y del complejo ciclina B1/cdc2.
- La actividad del complejo ciclina B1/cdc2 se incrementa en presencia del oncogen H-ras.
- H-ras oncogénico induce un aumento de la ciclina B1 nuclear.
- El punto de control de G2 y la respuesta al daño al ADN se alteran en presencia del oncogen H-ras.

PERSPECTIVAS

- Establecer los mecanismos que utiliza H-ras para inducir la expresión de la ciclina B1:
 - Determinar los componentes que participan en la vía de transducción de señales regulada por H-ras.
 - Determinar los factores de transcripción regulados por H-ras que activan al promotor de la ciclina B1.
 - Determinar el papel de la ciclina D en la activación por H-ras de la ciclina B1.
- Establecer las vías en las que participa H-ras para regular la localización nuclear de la ciclina B1:
 - Determinar las proteínas que participan en la vía de transducción de señales mediada por H-ras.
 - Determinar si la ciclina B1 en las células que expresan H-ras se encuentra fosforilada en la región CRS a diferencia de las células control.
 - Utilizar mutantes conocidas de la ciclina B1 en las células que expresan el oncogen H-ras, para determinar los mecanismos por los que H-ras regula la localización celular de la ciclina B1.
- Establecer si las alteraciones inducidas por H-ras en el punto de control de G2/M en respuesta al daño al ADN por etopósido son similares si se utiliza radiación o sustancias que inhiben la síntesis de ADN por mecanismos diferentes al etopósido, que se sabe activan diferentes vías de transducción de señales.
- Evaluar si los efectos sobre el punto de restricción G2/M observados con H-ras oncogénico son los mismos que si se sobre-expresa el gen H-ras normal.

BIBLIOGRAFIA

- Agapova, L. S., Ivanov, A. V., Sablina, A. A., Kopnin, P. B., Sokova, O. I., Chumakov, P. M., Kopnin, B.P. p53-dependent effects of RAS oncogene on chromosome stability and cell cycle checkpoints. *Oncogene* 1999, **18**:3135-3142.
- Agarwal, M. L., Agarwal, A., Taylor, W. R., Stark, G. R. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, **92**:8493-8497.
- Aktas, H., Cai H., Cooper, G.M. Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the cdk inhibitor p27kip1. *Mol. Cell. Biol.* 1997, **17**:3850-3857
- Albanese, C., Johnson, J., Watanabe, G., Eklund, N., Vu, D., Arnold, A., Pestell, R. G.. Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. *J. Biol. Chem.* 1995, **270**: 23589-23597.
- Athar, M., Kim, A.L., Ahmad, N., Muckhtar, H., Gautier, J., Bickers, D.R. Mechanism of ultraviolet B induced cell cycle arrest in G2/M phase in immortalized skin keratinocytes with defective p53. *Bioch. Bioph. Res. Commun.* 2000, **277**:107-111.
- Avruch, J., Zhang, X-f., Kyriakis, J. M. Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends Biochem. Sci.* 1994, **19**:279-283.
- Bailly, E., Dorée M., Nurse, P., Bornens, M. Cytoplasmic accumulation of cyclin B1 in human cells: association with a detergent-resistant compartment and with the centrosomes. *J. Cell Sci.* 1992, **101**:529-545.
- Bancroft, J. D., Stevens, A. Theory and Practice of Histological Techniques. Tercera edición. *Churchill Livingstone Inc.* N.Y. USA. 1990, 108-112.
- Barbacid, M. Ras genes. *Annu. Rev. Biochem.* 1987, **56**:779-827.
- Barrett, C. B., Schroetke, R. M., VanderHoorn, F. A., Nordeen, S. K., Maller, J. L. H-rasval12, thr59 activates S6 kinase and p34cdc2 kinase in *Xenopus* oocytes, evidence for c-mos xe-dependent and -independent pathways. *Mol. Cell. Biol.* 1990, **10**:310-315.
- Bar-Sagi, D., Feramisco, J. R. Microinjection of the ras oncogene protein into PC12 cells induces morphological differentiation. *Cell* 1985, **42**:841-848.
- Bates, S., Ryan, K.M., Phillips, A.C., Vousden, K.H. Cell cycle arrest and DNA endoreduplication following p21Waf1/Cip1 expression. *Oncogene* 1998, **17**:1691-1703.
- Bernhard, E.J., McKenna, W.G., Muschel, R.J. Cyclin expression and G2-phase delay after irradiation. *Radiat. Res.* 1994, **138**:S64-S67.
- Boguski, M.S., McCormick, F. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 1993, **366**:643-654.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A., McCormick, F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 1990, **348**:125-132.
- Bulavin, D.V., Tararova, N.D., Aksenov, N.D., Popelov, V.A., Pospelova, T.V. Deregulation of p53/p21cip1/waf1 pathway contributes to polyploidy and apoptosis of E1A + cHa-ras transformed cells after g-irradiation. *Oncogene* 1999, **18**:5611-5619.

- Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J.P., Sedivy, J.M., Kinzler, W., Vogelstein, B. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 1998, **282**:1497-1500.
- Campell, S.L., Khosravi-Far, R., Rossman, K.L., Clark, G.J., Der, C.J. Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 1998, **17**:1395-1413.
- Canman, C.E., Lim, D.S., Cimprich, K.A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M.B., Siliciano, J.D. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 1998, **281**:1677-1679.
- Casalino L., De Cesare, D., Verde, P. Accumulation of fra1 in ras-transformed cells depends on both transcriptional autoregulation and MEK-dependent posttranslational stabilization. *Mol. Cell Biol.* 2003, **23**:4401-4415.
- Chan, T. A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. 14-3-3 σ is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* 1999, **401**:616-620.
- Chang, E.H., Furth, M.E., Scolnick, E.M., Lowy, D.R. Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus. *Nature* 1982, **297**:479-483.
- Chang, T. H-T., Ray, F. A., Thompson, D. A., Schlegel, R. Disregulation of mitotic checkpoints and regulatory proteins following acute expression of SV40 large T antigen in diploid human cells. *Oncogene* 1997, **14**: 2383-2393.
- Chang, W. P. & Little, J. B. Delayed reproductive death in X-irradiated Chinese hamster ovary cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 1991, **60**:483-496.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987, **162**:156-159.
- Cliby, W.A., Roberts, C.J., Cimprich, K.A., Stringer, C.M., Lamb, J.R., Shreiber, S.L., Friend, S.H. Overexpression of a kinase-inactive ATR protein causes sensitivity to DNA-damaging agents and defects in cell cycle checkpoints. *EMBO J* 1998, **17**:159-69
- Coco-Martin, J. M., Balkenende, A., Verschoor, T., Lallemand, F., Michalides, R. Cyclin D1 overexpression enhances radiation-induced apoptosis and radiosensitivity in a breast tumor cell line. *Cancer Res.* 1999, **59**:1134-1140.
- Cogswell, J.P., Godlevski, M.M., Bonham, M., Bisi, J., Babiss, L. Upstream stimulatory factor regulates expression of the cell cycle-dependent cyclin B1 gene promoter. *Mol. Cell. Biol.* 1995, **15**:2782-2790.
- Cook, S.J., Aziz, N., McMahon, M. The repertoire of fos and jun proteins expressed during the G1 phase of the cell cycle is determined by the duration of mitogen-activated protein kinase activation. *Mol Cell Biol.* 1999, **19**:330-41.
- Daar, Y., Nebreda, A. R., Yew, N., Sass, P., Paules, R., Santos, E., Wigler, V., Woude, G. F. The ras oncoprotein and m-phase activity. *Science* 1991, **253**:74-76.
- De Toledo, S.M., Azzam, E.I., Keng, P., Laffrenier, S., Little, J.B. Regulation by ionizing radiation of cdc2, cyclin A, cyclin B, thymidine kinase, topoisomerase I α , and RAD51 expression in normal human diploid fibroblasts is dependent on p53/p21waf1. *Cell Growth & Diff.* 1998, **9**:887-896.

- Deng, C., Zhang, P., Wade-Harper, J., Elledge, S.J., Leder, P. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development but are defective in G1 checkpoint. *Cell*, 1995, **82**:675-684.
- Denko, N., Stringer, J., Wani, M., Stambrook, P. Mitotic and post mitotic consequence of genomic instability induced by oncogenic Ha-ras. *Som. Cell Mol. Gen.* 1995, **21**:241-253.
- Denko, N.C., Giaccia, A.J. Stringer, J.R., Stambrook P.J. The human Ha-ras oncogene induces genomic instability in murine fibroblasts within one cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, **91**:5124-5128.
- Der, C. J., Finkel, T., Cooper, G. M. Biological and biochemical properties of human ras-H genes mutated at codon 61. *Cell* 1986, **44**:167-176.
- Donner, E., & Preston, R.J. The relationship between p53 status, DNA repair and chromatid aberration induction in G2 mouse embryo fibroblast cells treated with bleomycin. *Carcinog.* 1996, **17**:1161-1165.
- Downward, J. Ras signalling and apoptosis. *Curr. Op. Genet. Dev.* 1998, **8**:49-54
- Downward, J. The ras superfamily of small GTP-binding proteins. *TIBS* 1990, **15**:469-472.
- Durkin, J. P., & Whitfield, J. F. The viral K-ras gene must be expressed in the G2 phase if ts Kirsten sarcoma virus-infected NRK cells are to proliferate in serum-free medium. *Mol. Cell. Biol.* 1987, **7**:444-449.
- Ellis, R.W., DeFeo, D., Shih, T.Y., Gonda, M.A., Young, H.A., Tsvchida, N., Lowy, D.R., Scolnick, E.M. The p21 src genes of Harvey and Kirstein sarcoma viruses originate from divergent member of a family of normal vertebrate genes. *Nature* 1981, **292**:506-511.
- Espada, J., Pérez-Moreno, M., Braga V.M.M., Rodríguez-Viciano, P., Cano, A. H-ras activation promotes cytoplasmic accumulation and phosphoinositide 3-OH kinase association of b-cateinin in epidermal keratinocytes. *J. Cell Biol.* 1999, **146**:967-980.
- Fan, S., Smith, M. L., Rivet II., D.J., Duba, D., Zhan, Q., Kohn, K. W., Fornace, A. J., O'Connor, P. M. Disruption of p53 function sensitizes breast cancer MCF-7 cells to cisplatin and pentoxifylline. *Cancer Res.* 1995, **55**:1649-1654.
- Farina A., Gaetano, C., Crescenzi, M., Puccini, F., Manni, I., Sacchi, A., Piaggio, G. The inhibition of cyclin B1 gene transcription in quiescent NIH3T3 cells is mediated by an E-box. *Oncogene* 1996, **13**:1287-1296.
- Farina, A., Manni, I., Fontemaggi, G., Tiainen, M., Cenciarelli, C., Bellowini, M., Mantovani, R., Sacchi, A., Piaggio, G. Down-regulation of cyclin B1 gene transcription in terminally differentiated skeletal muscle cells is associated with loss of functional CCAAT-binding NF-Y complex. *Oncogene* 1999, **18**:2818-2827.
- Farnsworth, C. L. & Feig, L. A. Dominant inhibitory mutations in the Mg²⁺ binding site of ras blocks its activation by GTP. *Mol. Cell. Biol.* 1991, **11**:4822-4829.
- Feig, L. A. & Cooper, G. M. Inhibition of NIH 3T3 cell proliferation by a mutant ras protein with preferential affinity for GDP. *Mol. Cell. Biol.* 1988, **8**:3235-3243.
- Feig, L. A. & Schaffhausen, B. The hunt for Ras targets. *Nature* 1994, **370**:508-509.
- Feig, L. A. Guanine-nucleotide exchange factors: a family of positive regulators of Ras and related GTPases. *Curr. Op. Cell Biol.* 1994, **6**:204-211.

- Feramisco, J. R., Gross, M., Kamata, T., Rosenberg, M., Sweet, R. W. Microinjection of the oncogene form of the human H-ras (T-24) protein results in rapid proliferation of quiescent cells. *Cell* 1984, **38**:109-117.
- Filmus, J., Robles, A. I., Shi, W., Wong, M. J., Colombo, L. L., Conti, C. J. Induction of cyclin D1 overexpression by activated ras. *Oncogene* 1994, **9**:3627-3633.
- Flatt, P.M., Tang, L.J., Scatena, C.D., Szak, S.T., Pietenpol, J.A. p53 regulation of G2 checkpoint is retinoblastoma protein dependent. *Mol. Cell. Biol.* 2000, **20**:4210-4223.
- Gabrielli, B. G., Sarcevic, B., Sinnamon, J., Walker, G., Castellano, M., Xue-Qing, W., Ellem, K.A.O. A cyclin D-cdk4 activity required for G2 phase cell cycle progression is inhibited in ultraviolet radiation-induced G2 phase delay. *J. Biol. Chem.* 1999, **274**:13961-13969.
- Gabrielli, B.G., Clark, J.M., McCormack, A.K., Ellem, K.A.O. Ultraviolet light-induced G2 phase cell cycle checkpoint blocks cdc25-dependent progression into mitosis, *Oncogene* 1997, **15**:749-758.
- Gabrielli, B.G., De Souza, C.P., Tonks, I.D., Clark, J.M., Hayward, N.K., Ellem, K.A. Cytoplasmic accumulation of cdc25B phosphatase in mitosis triggers centrosomal microtubule nucleation in HeLa cells. *J. Cell Sci.* 1996, **109**:1081-1093.
- Galang, C.K., Der, C.J., Hauser, C.A. Oncogenic Ras can induce transcriptional activation through a variety of promoter elements, including tandem c-ets2 binding sites. *Oncogene* 1994, **9**:2913-2921.
- Girard, F., Strausfeld, U., Cavadore, J.C., Russell, P. Fernandez, A., Lamb, N.J. cdc25 is a nuclear protein expressed constitutively throughout the cell cycle in nontransformed mammalian cells. *J. Cell Biol.* 1992, **118**:785-794.
- Graves, P.R., Yu, L., Schwarz, J.K., Gales, J., Sausville, E.A., O'Connor, P.M., Piwnicka-Worms, H. The Chk1 protein kinase and the Cdc25C regulatory pathways are targets of the anticancer agent UCN-01. *J. Biol. Chem.* 2000, **275**:5600-5.
- Haapajaryi, T., Kivinen, L., Pitkanen, K., Laiho, M. Cell cycle dependent effects of u.v.-radiation on p53 expression and retinoblastoma protein phosphorylation. *Oncogene* 1995, **11**:151-9.
- Hacker, U., Schumann, J., Göhde. Effects of acute gamma-irradiation of spermatogenesis as revealed by flow cytometry. *Acta Radiologica Oncology.* 1980, **19**: 361-366
- Hagting, A., Jackman, M., Simpson, K., Pines, J. Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal. *Curr. Biol.* 1999, **9**, 680-689.
- Hagting, A., Karlsson, C., Clute, P., Jackman, M., Pines, J. MPF localization is controlled by nuclear export. *EMBO J.* 1998, **17**:4127-4138.
- Hall, A. A biochemical function for Ras-at last. *Science* 1994, **264**:1413-1414.
- Heald, R., McLoughlin, M., Mckee, F. Human Wee1 maintains mitotic timing by protecting the nucleus from cytoplasmically activated cdc2 kinase. *Cell* 1993, **74**:463-474.
- Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T-C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. 14-3-3 σ is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol. Cell* 1997, **1**:3-11.

- Hicks, G.G., Egan, S.E., Greenberg, A.H., Mowat, M. Mutant p53 tumor suppressor alleles release ras-induced cell cycle growth arrest. *Mol. Cell. Biol.* 1991, **11**:1344-1352.
- Hirakawa, T., & Ruley, E. Rescue of cells from ras oncogene-induced growth arrest by a second, complementing, oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988, **85**:1519-1523.
- Hitomi, M., & Stacey, D.W. Ras-dependent cell cycle commitment during G2 phase. *FEBS Letters* 2001, **490**:123-131.
- Hoffman, I. & Karsenti, E. The role of cdc25 in checkpoints and feedback controls in the eukaryotic cell cycle. *J. Cell Sci.* 1994, **1807**:1-5.
- Hoffman, I., Clarke, P.R., Marcote, M.J., Karsenti, E., Draetta, G. Phosphorylation and activation of human cdc25C by cdc2-cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *EMBO J.* 1993, **12**:53-63.
- Hoppe-Seyler, F., & Butz, K. Repression of endogenous p53 transactivation function in HeLa cervical carcinoma cells by Human Papillomavirus type 16 E6, human mdm-2, and mutant p53. *J. Virol.* 1993 **67**:3111-3117.
- Hwang, A., Maity, A., Mckenna, W.G., Muschel, R.J. Cell cycle-dependent regulation of the cyclin B1 promoter. *J. Biol. Chem.* 1995, **270**:28419-28424.
- Hwang, A., Mckenna, W.G., Muschel, R.J. Cell cycle-dependent usage of transcriptional start sites. *J. Biol. Chem.* 1998, **273**:31505-31509.
- Innocente, S. A., Abrahamson, J.L.A., Cogwell, J.P., Lee, J. Mp53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* . 1999, **96**:2147-2152.
- Izumi, T. & Maller, J.L. Phosphorylation of *Xenopus* cyclins B1 and B2 is not required for cell cycle transitions. *Mol. Cell. Biol.* 1991, **11**:3860-3867.
- Jin, P., Gu, Y., Morgan, D.O. Role of inhibitory cdc2 phosphorylation in radiation-induced G2 arrest in human cells. *J. Cell Biol.*, 1996 **134**:963-970.
- Jin, P., Hardy, S., Morgan, D.O. Nuclear localization of cyclin B1 controls mitotic entry after DNA damage. *J. Cell. Biol.* 1998, **141**:875-885.
- Jordan, M.A., Thrower, D., Wilson, L. Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles. Implications for the role of microtubule dynamics in mitosis. *J. Cell Sci.* 1992, **102**:401-16
- Jung, V., Wie, W., Ballester, R., Camonis, J., Mi, S., Van-Aelst, L., Wigler, M., Broek, D. Two types of Ras mutants that dominantly interfere with activators of Ras. *Mol. Cell. Biol.* 1994, **14**:3707-3718.
- Kao, G. D., McKenna, W. G., Maity, A., Blank, K., Muschel, R. J. Cyclin B1 availability is a rate-limiting component of the radiation-induced G2 delay in HeLa cells. *Cancer Res.* 1997, **57**:753-758.
- Karantza, V., Maroo, A., Fay, D., Sedivy, J.M. Overproduction of RB protein after the G1/S boundary causes G2 arrest. *Mol. Cell. Biol.* 1993, **13**:6640-6652.
- Karlsson, C., Katich, S., Hasting, A., Hoffmann, I., Jonathan, P. Cdc25B and cdc25C differ markedly in their properties as initiators of Mitosis, *J. Cell Biol.* 1999, **146**:573-583.

- Katula, K.S., Wright, K.L., Paul, H., Surman, D.R., Nuckolls, F.J., Smith, J.W., Ting, J.P.Y., Yates, J., Cogswell, J.P. Cyclin-dependent kinase activation and S-phase induction of the cyclin B1 gene are linked through the CCAAT elements. *Cell Growth & Differ.* 1997, **8**:811-820.
- Kaufmann, W.K., Levedakou, E.N., Grady, H.L., Paules, R.S., Stein, G.H. Attenuation of G2 checkpoint function precedes human cell immortalization. *Cancer Res.* 1995, **55**:7-11.
- Khosravi-Far, R., Campell, S., Rossman, K.L. Der, C.J. Increasing complexity of ras signaling transduction: involvement of rho family proteins. *Adv. Cancer Res.* 1998, 57-107.
- King, R.W., Jackson, P.K., Kirschner, M.W. Mitosis in transition. *Cell* 1994, **79**:563-571
- Krek, W. & Nigg, E.A. Differential phosphorylation of vertebrate p34cdc2 kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle, identification of major phosphorylation sites. *EMBO J.* 1991, **10**:305-316.
- Krek, W. & Nigg, E.A. Mutations of p34cdc2 phosphorylation sites induce premature mitotic events in HeLa cells, evidence for a double block to p34cdc2 kinase activation in vertebrates. *EMBO J.* 1991b, **10**:3331-3341.
- Kukushkin, A.N., Abramova, M.V., Svetlikova, S.B., Darieva, Z.A., Pospelova, T.V., Pospelov V.A. Downregulation of c-fos gene transcription in cells transformed by E1A and cHa-ras oncogenes: a role of sustained activation of MAP/ERK kinase cascade and of inactive chromatin structure at fos promoter. *Oncogene* 2002, **21**:719-730.
- Kumagai, A. & Dunphy, W.G. The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation of the cdc2 protein in a cell-free system. *Cell* 1991, **64**:903-914.
- Lakin, N.D. & Jackson, S.P. Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* 1999, **18**:7644-7655.
- Lau, C.C., & Pardee, A.B. Mechanism by which caffeine potentiates lethality of nitrogen mustard. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1982, **79**:2942-2946.
- Lewis, T.S., Shapiro, P.S., Ahn, N. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv. Cancer Res.* 1998, 49-139.
- Li, J., Meyer, A.N., Donoghue, D.J. Nuclear localization of cyclin B1 mediates its biological activity and is regulated by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997, **94**:502-507.
- Li, J., Meyer, A.N., Donoghue, D.J. Requirement for phosphorylation of cyclin B1 for *Xenopus* oocyte maturation. *Mol. Biol. Cell* 1995, **6**:1111-1124.
- Liu, F., Rothblum-Oviatt, C., Ryan, C.E., Piwnica-Worms, H. Overproduction of human myt1 kinase induces a G2 cell cycle delay by interfering with the intracellular trafficking of cdc2-cyclin B1 complexes. *Mol. Cell Biol.* 1999, **19**:5113-5123.
- Liu, F., Stanton, J.J., Wu, Z., Piwnica-Worms, H. The human myt1 kinase preferentially phosphorylates cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Mol. Cell Biol.* 1997, **17**:571-583.
- Liu, J.J., Chao, J.R., Jiang, M.C., Ng, S.Y., Yen, J., Yang-Yen, H. Ras transformation results in an elevated level of cyclin D1 and acceleration of G1 progression in NIH3T3 cells. *Mol. Cell Biol.* 1995, **15**:3654-3663.
- Liu, L.F. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu. Rev. Biochem.* 1989, **58**:351-

- Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X.S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A., Donehower, L.A., Elledge, S.J. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev.* 2000, **14**:1448-1459.
- Lloyd A.C., Obermuller, F., Staddon, S., Barth, C.F., McMahon, M., Land, H. Cooperating oncogenes converge to regulate cyclin/cdk complexes. *Genes Dev.* 1997, **11**:663-677.
- Lock, R., & Keeling, P.K. Responses of HeLa and Chinese hamster ovary p34cdc2/cyclin B kinase in relation to cell cycle perturbations induced by etoposide. *International Journal of Oncology* 1993, **3**:33-42.
- Lock, R.B. Inhibition of p34cdc2 kinase activation, p34cdc2 tyrosine dephosphorylation and mitotic progression in chinese hamster ovary cells exposed to etoposide. *Cancer Res.* 1992, **52**:1817-1822.
- Lock, R.B., & Ross, W.E. Inhibition of p34cdc2 kinase activity by etoposide or irradiation as a mechanism of G2 arrest in chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* 1990, **50**:3761-3766.
- Lock, R.B., & Ross, W.E. Possible Role for p34cdc2 kinase in etoposide-induced cell death of chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* 1990b, **50**:3767-3771.
- Lock, R.B., Galperina, O. V., Feldhoff, R. C., Rhodes, L. J. Concentration-dependent differences in the mechanisms by which caffeine potentiates etoposide cytotoxicity in HeLa cells. *Cancer Res.* 1994, **54**:4933-4939.
- Lopez-Girona, A., Furnari, B., Mondeseret, O., Russell, P. Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature* 1999, **397**:172-175.
- Maity, A., Hwang, A., Janss, A., Phillips, P., McKenna, W.G., Muschel, R.J. Delayed cyclin B1 expression during the G2 arrest following DNA damage. *Oncogene* 1996, **13**:1647-1657.
- Maity, A., McKenna, W. G., Muschel, R.J. Evidence for post-transcriptional regulation of cyclin B1 mRNA in the cell cycle and following irradiation in HeLa cells. *EMBO J.* 1995, **14**:603-609.
- Manni, I., Mazzaro, G., Gurtner, A., Mantovani, R., Haugwitz, U., Krause, K., Engeland, K., Sacchi, A., Soddu, S., Piaggio G. NF-Y mediates the transcriptional inhibition of the cyclin B1, cyclin B2 and cdc25C promoters upon induced G2 arrest. *J. Biol. Chem.* 2001, **276**:5570-5576.
- Marshall, C.J. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr. Op. Genet. Dev.* 1994, **4**:82-89.
- Marx, J. Forging a Path to the Nucleus. *Science* 1993, **260**:1588-1590.
- Matsuoka, S., Huang, M., Elledge, S.J. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* 1998, **282**:1893-1897.
- McCormick, F. Activators and effectors of ras p21 proteins. *Curr. Op. Genet. Dev.* 1994, **4**:71-76.
- McCormick, F. How receptors turn Ras on. *Nature* 1993, **363**:15-16.
- McGowan, C.H., Russell, P. Cell cycle regulation of human Wee1. *EMBO J.* 1995, **14**:2166-2175.

- McGowan, C.H., Russell, P. Human Wee1 kinase inhibits cells division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on tyr15. *EMBO J.* 1993, **12**:75-85.
- McGrath, J.P., Capon, D.J., Smith, D.H., Chen, E.Y., Seeburg, P.H., Goeddel, D.V., Levinson, A.D. Structure and organization of the human Ki-ras proto-oncogene and a related processed pseudogene. *Nature* 1983, **304**:501-506.
- McKay, I.A., Marshall, C. J., Calés, C., Hall, A. Transformation and stimulation of DNA synthesis in NIH-3T3 cells are a titratable function of normal p21N-ras expression. *EMBO J.* 1986, **5**:2617-2621.
- McKenna, W.G., Bernhard, E.J., Markiewicz, D.A., Rudolfs, M.S., Maity, A., Muschel, R.J. Regulation of radiation-induced apoptosis in oncogene-transfected fibroblasts, influence of H-ras on the G2 delay. *Oncogene* 1996, **12**:237-245.
- McKenna, W.G., Iliakis, G., Weiss, M.C., Bernhard, E.J., Muschel, R. Increased G2 delaying radiation-resistant cells obtained by transformation of primary rat embryo cells with the oncogenes H-ras and v-myc. *Radiat. Res.* 1991, **125**:283-287.
- Mechta, F., Lallemand, D., Pfarr, C.M., Yaniv, M. Transformation by ras modifies AP1 composition and activity. *Oncogene* 1997, **14**:837-847
- Medina-Martínez O., Vallejo V., Guido MC., García-Carrancá A. Ha-ras oncogene-induced transcription of human papillomavirus type 18 E6 and E7 oncogenes *Mol. Carcinog.* 1997, **19**:83-90.
- Millar, J.B., Blevitt, J., Gerace, L., Sadhu, K., Featherstone, C., Russell, P. p55cdc25 is a nuclear protein required for the initiation of mitosis in human cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1991, **88**:10500-10504.
- Minden, A.; McMahon, M.; Lange-Carter, C.; Dérijard, B.; Davis, R. J.; Johnson, G. L.; Karin, M. Differential activation of ERK and JNK MAP kinases by Raf-1 and MEKK. *Science* 1994, **266**:1719-1723.
- Miranda, E.I., Santana, C., Rojas, E., Hernández, S., Ostrosky-Wegman, P., García-Carrancá, A. Induced mitotic death of HeLa cells by abnormal expression of c-H-ras. *Mut. Res.* 1996, **349**:173-182.
- Moodie, S.A., Willumsen, B.M., Weber, M.J., Wolfman, A. Complexes of Ras-GTP with Raf-1 and Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase. *Science* 1993, **260**:1658-1661.
- Moro, A., Zerfass, K., Joswig, S., Jansen-Duerr, P. Effect of cyclins and cdks on the cyclin B1 promoter activation. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1997, **41**:919-924.
- Mueller, P.R., Coleman, T.R., Kumagai, A., Dunphy, W.G. Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science* 1995, **270**:86-90.
- Mulcahy, L.S., Smith, M.R. Stacey, D.W. Requirement for ras proto-oncogene function during serum-stimulated growth of NIH 3T3 cells. *Nature* 1985, **313**:241-243.
- Muschel, R.J., Zhang, H.B., Iliakis, G., McKenna, W.G. Cyclin B expression in HeLa cells during the G2 block induced by ionizing radiation. *Cancer Res.* 1991, **51**:5113-5117.
- Muschel, R.J., Zhang, H.B., McKenna, W.G. Differential effect of ionizing radiation on the expression of cyclin A and cyclin B in HeLa cells. *Cancer Res.* 1993, **53**:1128-1135.

- Nebreda, A.R., Porras, A., Santos E. P21ras induced meiotic maturation of *Xenopus* oocytes in the absence of protein synthesis: MPF activation is preceded by activation of MAP and S6 kinases. *Oncogene* 1993, **8**:467-477.
- Norbury, C., & Nurse, P. Animal cell cycles and their control. *Annu. Rev. Biochem.* 1992, **61**:441-470.
- O'Connor, P.M., Ferris, D.K., Pagano, M., Draetta, G., Pines, J., Hunter, T., Longo, D.L., Kohn, K.W. G2 delay induced by nitrogen mustard in human cells affects cyclin A/cdk2 and cyclin B1/cdc2-kinase complexes differently. *J. Biol. Chem.* 1993, **268**:8298-8308.
- Ookata, K., Hisanaga, S., Bulinski, J.C., Murofushi, H., Aizawa, H., Itoh, T., Hotani, H., Okumura, E., Tachibana, K., Kishimoto, T. Cyclin B interaction with microtubule-associated protein 4 (MAP4) targets p34cdc2 kinase to microtubules and is a potential regulator of M-phase microtubule dynamics. *J. Cell. Biol.* 1995, **128**:849-862.
- Palmer, A., Gavin, A-C., Nebreda, A.R. A link between MAP kinase and p34cdc2/cyclin B during oocyte maturation: p90rsk phosphorylates and inactivates the p34cdc2 inhibitory kinase Myt1. *EMBO J.* 1998, **17**:5037-5047.
- Palmero, I., Pantoja, C., Serrano, M. p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature* 1998, **395**:125-126.
- Pardee, A.B. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 1989, **246**:603-608.
- Park, M., Chae, H.D., Yun, J., Jung, M., Kim, Y.S., Kim, S.H., Han, M.H., Shin, D.Y. Constitutive activation of cyclin B1-associated cdc2 kinase overrides p53-mediated G2/M arrest. *Cancer Res.* 2000, **60**:542-545.
- Parker, L., Piwnica-Worms, H. Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human Wee1 tyrosine kinase. *Science* 1992, **257**:1955-1957.
- Parshad, R., Sanford, K.K., Price, F.M., Rhim, J.S., Tarone, R.E., Fusenig, N.E., Boukamp, P. Association of deficient DNA repair during G2 phase with progression from benign to malignant state in a line of human skin keratinocytes transfected with ras oncogene. *Carcinog.* 1994, **15**:33-37.
- Passalaris, T.M., Benanti, J.A., Gewin, L., Kiyono, T., Galloway, D.A. The G2 checkpoint is maintained by redundant pathways. *Mol. Cell. Biol.* 1999, **19**:5872-5881.
- Paules, R.S., Levedakou, E.N., Wilson, S.J., Innes, C.L., Rhodes, N., Tlsty, T.D., Galloway, D.A., Donehower, L.A., Tainsky, M.A., Kaufmann, W.K. Defective G2 checkpoint function in cells from individual with familial cancer syndromes. *Cancer Res.* 1995, **55**:1763-1773.
- Peng, C-Y., Graves, P.R., Thoma, R.S. Wu, Z., Shaw, A.S., Piwnica-Worms, H. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of cdc25C on serine-216. *Science* 1997, **277**:1501-1505
- Peter, M., Nakagawa, J., Dorée, M., Labbé, J.C., Nigg, E.A. In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* 1990, **61**:591-602.
- Piaggio, G., Farina, A., Perrotti, D., Manni, Y., Fuschi, P., Sacchi, A., Gaetano, C. Structure and growth-dependent regulation of the human cyclin B1 promoter. *Exp. Cell Res.* 1995, **216**:396-402.

- Pines, J. & Hunter, T. Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *J. Cell Biol.* 1991, **115**:1-17.
- Pines, J. & Hunter, T. Isolation of a human cyclin cDNA:evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34cdc2. *Cell* 1989, **58**:833-846.
- Pines, J. & Hunter, T. The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *EMBO J.* 1994, **13**:3772-3781.
- Pomerance, M., Schweighoffer, F., Tocqué B., Pierre, M. Stimulation of mitogen-activated protein kinase by oncogenic ras p21 in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 1992, **267**:16155-16160.
- Pomerance, M., Thang, M.N., Tocque, B., Pierre, M. The ras-GTPase-activating protein SH3 domain is required for cdc2 activation and mos induction by oncogenic ras in *Xenopus* oocytes independently of mitogen-activated protein kinase activation. *Mol. Cell Biol.* 1996, **16**:3179-3186.
- Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liegeois, N.J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H.W. The ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf interacts with mdm2 and neutralizes mdm2's inhibition of p53. *Cell* 1998, **92**:713-723.
- Powell, S. N., DeFrank, J.S., Connell, P., Eogan, M., Preffer, F., Dombkowski, D., Tang, W., Friend, S. Differential sensitivity of p53(-) and p53(+) cells to caffeine-induced radiosensitization and override of G2 delay. *Cancer Res.* 1995, **55**:1643-1648.
- Pulciani, S., Santos, E., Long, L.K., Sorrentino, V., Barbacid, M. Ras gene amplification and malignant transformation. *Mol. Cell Biol.* 1985, **5**:2836-2841.
- Quilliam, L.A., Khosravi-Far, R., Huff, S.Y., Der, C.J. Guanine nucleotide exchange factors: activators of the Ras superfamily of proteins. *BioEssays* 1995, **17**:395-404.
- Reddy, E.P., Reynold, R.K., Santos, E., Barbacid, M. A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties of the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 1982, **300**:149-152.
- Ridley, A.J., Paterson, H.F., Noble, M., Land, H. ras-mediated cell cycle arrest is altered by nuclear oncogenes to induce Schwann cell transformation. *EMBO J.* 1988, **7**:1635-1645.
- Ries, S., Biederer, C., Woods, D., Shifman, O., Shirasawa, S., Sasazuki, T., McMahon, M., Oren, M., McCormick, F. Opposing effects of ras on p53: transcriptional activation of mdm2 and induction of p19ARF. *Cell* 2000, **103**:321-330.
- Rodriguez-Viciano, P., Warne, P.H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M.J., Waterfield, M.D., Downward, J. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 1994, **370**:527-532.
- Rodriguez-Viciano, P., Warne, P.H., Khwaja, A., Marte, B.M., Pappin, D., Das, P., Waterfield, M.D., Ridley, A., Downward, J. Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell* 1997, **89**:457-467.
- Sa G., Hitmoi, M., Harwalkar, J., Stacey A.W. Chen, G., Stacey D.W. Ras is active throughout the cell cycle, but is able to induce cyclin D1 only during G2 phase. *Cell Cycle* 2002, **1**:50-58.

- Sambrook, J., Fritsch, F.F., Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Segunda edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. *Cold Spring Harbor, N.Y. USA*. 1989, págs 1.33-1.84, 7.43-7.52 y 9.58.
- Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R.S., Richman, R., Wu, Z., Piwnica-Worms, H., Elledge, S.J. Conservation of the chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to cdk regulation through cdc25. *Science* 1997, **277**:1497-1501.
- Santos, E., Tronick, S.R., Aaronson, S.A., Pulciani, S., Barbacid, M. T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB-and Harvey-MSV transforming genes. *Nature* 1982, **298**:343-347.
- Satoh, T., Nakamura, S., Kaziro, Y. Induction of neurite formation in PC12 cells by microinjection of proto-oncogenic Ha-ras protein preincubated with guanosine-5'-O-(3-thiotriphosphate). *Mol. Cell. Biol.* 1987, **7**:4553-4556.
- Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J., Howley, P.M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990, **63**:1129-1136.
- Seeburg, P.H., Colby, W.W., Capon, D.J. Goedell, D.V., Levinson, A.D. Biological properties of human c-Ha-ras genes mutated at codon 12. *Nature* 1984, **312**:71-75.
- Serrano, M., Lin A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., Lowe, S.W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997, **88**:593-602.
- Shibuya, E., Polverino, A.J., Chang, E., Wigler, M., Ruderman, J.V. Oncogenic ras triggers the activation of 42-kDa mitogen-activated protein kinase in extracts of quiescent *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, **89**:9831-9835.
- Stewart, N., Hicks, G.G., Paraskevas, F., Mowat, M. Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53. *Oncogene* 1995, **10**:109-115.
- Strausfeld, U., Labbé, J.C., Fesquet, D., Cavadore, J.C., Picard, A., Sadhu, K., Russell, P., Dorée, M. Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human cdc25 protein. *Nature* 1991, **351**:242-244.
- Tabbin, C.J., Bradley, S.M., Bargmann, C.Y., Weinberg, R.A., Papageorge, A.G., Scolnick, E.M., Dhar, R., Lowy, D.R. Chang, E.H. Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 1982, **300**:143-149.
- Takizawa, C.G. & Morgan, D. Control of mitosis by cnages in the subcellular location of cyclin B1-cdk1 and cdc25C. *Curr. Op. Cell Biol.* 2000, **12**:658-665.
- Taylor, W.R. & Stark, G.R. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 2001, **20**:1803-1815.
- Taylor, W.R., DePrimo, S.E., Agarwal, A., Agarwal, M.L., Schönthal, A.H., Katula, K.S., Stark, G.R. Mechanisms of G2 arrest in response to overexpression of p53. *Mol. Biol. Cell* 1999, **10**:3607-3622.
- Thompson, D.A., Belinsky, G., Chang, T.H-T., Jones, D.L., Schlegel, R., Münger, K. The human papillomavirus-16 E6 oncoprotein decreases the vigilance of mitotic chechpoints. *Oncogene* 1997, **15**:3025-3035.

- Tounekti, O., Pron, G., Belehradec, J., Mir, L.M. Bleomycin, an apoptosis-mimetic drug that induces two types of cell death depending on the number of molecules internalized. *Cancer Res.* 1993, **53**:5462-5469.
- Toyoshima, F., Moriguchi, T., Wada, A., Fukuda, M., Nishida, E. Nuclear export of cyclin B1 and its possible role in the DNA damage-induced G2 checkpoint. *EMBO J.* 1998, **17**:2728-2735.
- Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E., Shinya, N., Iwamatsu, A., Nishida E. Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase. *Nature* 2001, **410**:215-220.
- Tsao, Y-P., D'Arpa, P., Liu, L.F. The involvement of active DNA synthesis in camptothecin-induced G2 arrest, altered regulation of p34^{cdc2}/cyclin B1. *Cancer Res.* 1992, **52**:1823-1829.
- Waldman, T., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res.* 1995, **55**:5187-5190.
- Walsh, S., Margolis, S.S., Kornbluth S. Phosphorylation of the cyclin B1 cytoplasmic retention sequence by mitogen-activated protein kinase and Plx. *Mol. Cancer Res.* 2003, **1**:280-289.
- Wang, X.W., Zhan, Q., Coursen, J.D., Khan, M.A., Kontny, H.U., Yu, L., Hollander, M.C., O'Connor, P.M., Fornace, A.J., Harris, C.C. Gadd45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999, **96**:3706-3711.
- Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., Beach, D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993, **366**:701-704.
- Yamashiro, S., Yamakita, Y., Ishikawa, R., Matsumura, F. Mitosis-specific phosphorylation causes 83K non-muscle caldesmon to dissociate from microfilaments. *Nature* 1990, **344**:675-678.
- Yang, J., Bardes, E.S.G., Moore, J.D., Brennan, J., Powers, M.A., Kornbluth, S. Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes Dev.* 1998, **12**:2131-2143.
- Yang, J., Song, H., Walsh, S., Bardes, E.S.G., Kornbluth, S. Combinatorial control of cyclin B1 nuclear trafficking through phosphorylation at multiple sites. *J. Biol. Chem.* 2001, **276**:3604-3609.
- Yang, J., Winkler, K., Yoshida, M., Kornbluth, S. Maintenance of G2 arrest in the *Xenopus* oocyte: a role for 14-3-3 mediated inhibition of cdc25 nuclear import. *EMBO J.* 1999, **18**:2174-2183.
- Yen, A., & Sturgill, R. Hypophosphorylation of the Rb protein in S and G2 as well as G1 during growth arrest. *Exp. Cell Res.* 1998, **241**:324-331.
- Yuan, J., Eckerdt F., Bereiter-Hahn J., Kurunci-Csacski, E., Kaufmann, M., Strebhardt, K. Cooperative phosphorylation including the activity of polo-like kinase 1 regulates the subcellular localization of cyclin B1. *Oncogene* 2002, **21**:8282-92.
- Zhan, Q., Antinore, M.J., Wang, X.W., Carrier, F., Smith, M.L., Harris, C.C., Fornace, A.J. Association with cdc2 and inhibition of cdc2/cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein gadd45. *Oncogene* 1999, **18**:2892-2900.

ANEXO I: Artículo Publicado

Oncogenic *H-ras* induces cyclin B1 expression in a p53-independent manner

Carla Santana^a, Enrique Ortega^b, Alejandro García-Carrancá^{a,c,*}

^a Department of Molecular Biology and Biotechnology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico

^b Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico

^c Research Division, Instituto Nacional de Cancerología, SSA, Mexico City 14000, Mexico

Received 12 March 2002; received in revised form 5 July 2002; accepted 12 July 2002

Abstract

The role of p53 in controlling the G2 checkpoint, in part by repressing cyclin B1 transcription, has been well established. However, accumulating evidence indicate that p53-independent pathways may also play an important role. Ras proteins have been shown to regulate G1/S, but also G2/M transitions. Since cyclin B1/cdc2 complex is the key regulator controlling the G2/M checkpoint, we were interested in addressing if the *H-ras* oncogene could regulate cyclin B1 expression in a p53-independent manner. We observed an induction of cyclin B1 promoter activity in the presence of *H-ras* oncogene in SW480 cells, which contain null *p53* alleles. In addition, HeLa cells known to express the HPV18 *E6* oncogene that inactivates p53, exhibited increased levels of cyclin B1 mRNA and protein when transfected with the *H-ras* oncogene. Higher expression of cyclin B1 correlated with higher levels of cyclin B1/cdc2 complex and kinase activity that interestingly, showed no inhibition at G2/M after DNA damage. These data suggest that *H-ras* participates in pathways that regulate cyclin B1 expression and therefore controls the G2/M checkpoint in a p53-independent manner.

© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: *H-ras* oncogene; Cyclin B1; G2/M checkpoint; p53-independent; DNA damage

1. Introduction

To maintain genomic stability, normal cells must guarantee that DNA replication is successfully completed before the onset of mitosis, through the existence of a complex mechanism operating at the G2/M

boundary [1]. DNA damaging agents, such as etoposide can induce, among others, an arrest in G2 that allows cells to repair DNA lesions prior to entering mitosis [2–5]. The cyclin B1/cdc2 complex is the key regulator of the G2/M checkpoint [1,3,6] and, although dephosphorylation of cdc2 at specific residues represents the rate-limiting step controlling entry into M phase after DNA damage, recent data indicate that levels of cyclin B1 and its localization are also important. Irradiation of HeLa cells in either S or G2 phases transiently reduces cyclin B1 expression [7–9] and, reduced G2 arrest is observed upon irradiation of cells overexpressing cyclin B1 [10,11].

* Corresponding author. BIOMEDICAS-UNAM, Apartado Postal 70-228, 04510 Mexico City, Mexico.
Tel.: +52-55-5628-0433 and +52-55-5485-4370;
fax: +52-55-5485-4371.
E-mail address: carranca@servidor.unam.mx
(A. García-Carrancá).

Inactivation of p53 by the HPV-16 E6 protein or SV40 large T antigen attenuates the G2 delay observed after DNA damage [12,13], and overexpression of wild-type p53 induces a G2 arrest [14,15]. Recent data indicate that p53 regulates the G2 DNA damage checkpoint by repressing cyclin B1 transcription and by inhibiting its localization to the nucleus [16–18]. However, the role of p53 in controlling the G2 checkpoint is still not fully understood, there is increasing evidence that p53-independent pathways may also play an important role in the control of the G2 DNA damage checkpoint. It has been shown that cells lacking p53 still retain the ability to arrest in G2 following DNA damage [13,19–21].

Ras proteins are small GTPases that regulate several signaling pathways by affecting the activity of protein kinases. They participate in the transduction of extracellular signals involved in different processes, such as cellular proliferation, differentiation, and transformation [22,23]. Different lines of evidence indicate that Ras proteins alter different cell cycle checkpoints. In particular, it has been described that H-*ras* oncogene induces overexpression of cyclin D1 by increasing transcription of its promoter [24,25]. There have also been indications that Ras proteins could also play a key role in controlling the G2/M checkpoint. In *Xenopus* oocytes arrested at the G2/M border of the first meiotic prophase, microinjection of oncogenic Ras protein induces meiotic maturation with high levels of cyclin B1/cdc2 complex activity [26,27]. Ras function also seems important for the G2/M transition point in mammalian cells. While the K-Ras protein is required for NRK cells to enter mitosis from G2 [28], H-Ras induces cell cycle arrest in G2/M phase, both in rat embryo fibroblasts and in Schwann cells [29,30]. H-Ras also appears to influence the G2 response to irradiation in c-myc-transformed embryo fibroblasts [31,32]. Furthermore, we have previously found that oncogenic H-Ras induces the appearance of giant multinucleated cells with micronuclei that culminate in mitotic catastrophe of HeLa cells [33].

In this work we evaluated the effect of H-*ras* oncogene on the expression and levels of cyclin B1 protein, independent of p53 function. We observed that H-*ras* is able to increase expression of a reporter driven by the cyclin B1 promoter gene in SW480 cells, which have been shown to contain null *p53* alleles. More-

over, HeLa cells expressing oncogenic H-Ras exhibit an increase in cyclin B1 protein and mRNA levels. These cells are known to harbor HPV 18 E6 protein that inactivates p53. In cells expressing H-Ras, higher expression of cyclin B1 correlates with higher levels of cyclin B1/cdc2 complex and kinase activity which showed no inhibition after DNA damage. These data suggest that H-Ras participates in pathways that regulate cyclin B1 expression and therefore control the G2/M checkpoint in a p53-independent manner.

2. Methods

2.1. Cell culture and drug treatment

SW480 cells, a human colon cancer cell line, were grown in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% fetal calf serum. Stable HeLa cell clones expressing oncogenic (Val¹²) H-*ras* linked to neo (neomycin resistance gene) or neo alone [33] were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% newborn calf serum.

Cells were plated 24 h before drug treatment or partial synchronization in S phase. Cells were synchronized with 2 mM thymidine (Gibco) during 24 h and then grown in fresh medium for different times, 8 h for neo control cells or 6 h for H-Ras-expressing cells, since although the length of S phase is the same in both cell lines, in the latter it starts 2 h earlier after the thymidine block. With this procedure, we obtained usually 85% or more of both cell types in S phase. Cells were treated with 10 μ M etoposide for 1 h [34], washed twice with PBS and then incubated in drug-free medium for 12 h. Where indicated, 1 mM caffeine (Sigma) [35] was added to cells after etoposide treatment.

2.2. DNA transfection and luciferase activity

SW480 cells were transfected with 3 μ g of Lipofectamine Plus reagent (Gibco BRL), as indicated by the manufacturer. Cells (4×10^5) were plated 24 h before in 30 mm dishes and transfected with 3 μ g of either pEJ (containing oncogenic H-*ras* Val12) [36], or pCDNA3 plasmids together with 0.5 μ g of either pCycB(-287)-LUC (including 287 bp of upstream promoter sequence from cycB1) [37], or E.18-Luc

plasmid (containing two overlapping Ets2 binding sites) [38]. Forty-eight hours later cells were collected in luciferase buffer (Promega) and assayed for activity using the luciferase assay system (Promega).

2.3. Cell extracts and immunoblot analysis

Cell lysates were prepared with RIPA buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) containing a cocktail of protease inhibitors (antipain, aprotinin, chymostatin, leupeptin, pepstatin A, each at a concentration of 5 µg/ml), 1 mM PMSF and phosphatase inhibitors (50 mM NaF and 1 mM Na₃VO₄). Lysates were incubated on ice for 10 min, centrifuged at 4 °C for 10 min and supernatants recovered and kept at –70 °C. Protein concentration was estimated by the DC protein assay (Biorad). For Western blot analysis, 20–40 µg of protein lysates were electrophoresed in 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The membrane was blocked with TBS/0.05% Tween 20 containing 1% BSA and 1% milk and incubated overnight at 4 °C with 1 µg/ml of anti-cdc2 (Boehringer Mannheim), anti-cyclin B1 (Santa Cruz, Inc.), or anti-actin (Zymed) monoclonal antibodies. Blots were washed and incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse IgG (Sigma) for 90 min at room temperature. Enhanced chemiluminescence (ECL) system (Amersham) was used for detection. Autoradiographic exposure times ranged between 30 s and 2 min.

2.4. Northern blot analysis

Total RNA was extracted using the guanidinium thiocyanate/phenol procedure [39]. Thirty microgram of total RNA were separated on a 1% formaldehyde-agarose gels and capillary-transferred to nylon filters for Northern analysis. Cyclin B1 cDNA (a kind gift of T Hunter) or human glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) probes were labeled with digoxigenin. Hybridization was carried out with formamide at 42 °C, and membranes washed at a stringency of 0.5 times SSC, 0.1% SDS at 65 °C. Hybrids were detected by enzyme immunoassay using a DIG chemiluminiscent detection kit (Boehringer Mannheim). Autoradiographic exposure times ranged between 30 min and 1 h.

2.5. Immunofluorescence

For immunofluorescence, cells were fixed with methanol and incubated for 2 h with cyclin B1 monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc.) at a concentration of 3 µg/ml in PBS containing 1% BSA in a humidified chamber at room temperature. FITC-conjugated goat anti-mouse IgG secondary antibody was incubated for 90 min at room temperature. Coverslips were mounted on glass slides using antifade solution and examined in a confocal microscope (Nikon).

2.6. Immunoprecipitation and in vitro kinase assay

For immunoprecipitation, total protein lysates (400 µg for Western blot or 150 µg for kinase assay) were precleared for 1 h and incubated overnight with 1 µg of anti-cyclin B1 monoclonal antibody (Santa Cruz Inc.) previously coupled to Protein A/G-Sepharose (Santa Cruz Inc.). Immunoprecipitates were washed three times and boiled in SDS-PAGE sample buffer for Western blot analysis. For in vitro kinase assay the immunoprecipitates were washed once with kinase buffer (50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 75 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ and 1 mM DTT) and then resuspended in 30 µl of the same buffer. One µM cAMP dependent protein kinase inhibitor (Sigma), 50 µg/ml histone H1 (Boehringer Mannheim) and 3 µCi of (γ³²P) ATP (Amersham, specific activity 5000 Ci/mmol) were added. Reactions were carried out at 37 °C for 20 min and stopped by adding 25 µl of two times SDS sample buffer; 25 µl of this mixture were separated in a 12% SDS-PAGE. Following electrophoresis, phosphorylated histone H1 was visualized by autoradiography. Autoradiographic exposure time was always 1 h. The densitometric analysis was carried out in a GS365W Hoeffer densitometer.

2.7. Cell cycle analysis

The proportion of cells in G1, S or G2/M was determined by flow cytometry. Cells were plated at a density of 5 × 10⁵ cells per dish and collected at different times. Cells were washed with PBS, lysed with 0.5% Tween 20 and 0.1 M citric acid, fixed in 70% ethanol and treated with the High Resolution DNA Kit (Partec GmbH, Germany). Cell cycle distribution of ten thousand nuclei was analyzed on a Partec CA-II flow cytometer.

3. Results

3.1. Oncogenic H-ras induces cyclin B1 promoter activity through a p53-independent pathway

We first asked whether H-ras oncogene could regulate cyclin B1 expression in the absence of a functional p53 protein. Therefore, we cotransfected SW480 cells, which harbor two null p53 alleles, with a luciferase reporter construct containing 287 bp of upstream sequences from the cyclin B1 promoter [37] and either the H-ras (Val12) oncogene [36] or pCDNA3. We found a luciferase activity in cells transfected with the H-ras oncogene that was 19 times higher than the one obtained with the control plasmid (Fig. 1). As a positive control we cotransfected a reporter plasmid containing two Ets2 binding sites, which can be induced independently of the cell cycle, along with the H-ras or the control plasmid. As expected, we observed an induction of luciferase activity that was at least 18 times higher with H-ras oncogene than with the control plasmid, in accordance with published results [38]. These data indicated that oncogenic H-Ras could modulate

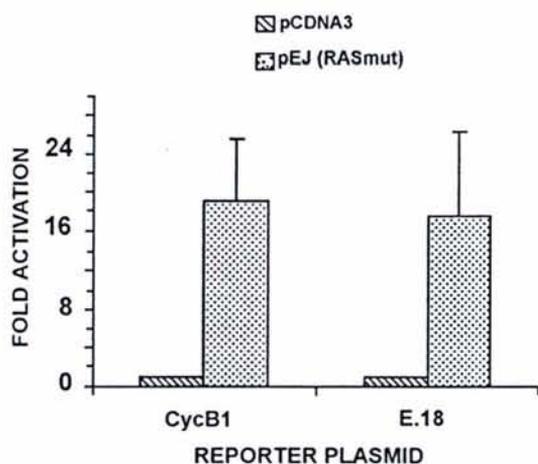


Fig. 1. H-ras oncogene induces transcription of cyclin B1 promoter in SW480 cells. Luciferase reporter plasmids containing either cyclin B1 promoter [pCycB1(-287)-Luc] or a fos promoter with 2 Ets2-binding sites [E.18-Luc] (0.5 μ g) were cotransfected with pEJ (H-ras) or pCDNA3 (3 μ g) in SW480 cells as indicated in Section 2. Resulting luciferase activity was determined 48 h after transfection. Fold activation is the ratio of luciferase activity in the presence of pEJ relative to that with pCDNA3 expression vector alone, for each reporter gene. Data represent the mean of three independent experiments.

cyclin B1 expression through a p53-independent pathway.

3.2. Oncogenic H-Ras increases cyclin B1 levels in HeLa cells

We decided to determine if increased transcription of cyclin B1 by oncogenic H-Ras in the absence of p53 protein, could result in changes in levels of cyclin B1 protein. For that purpose, we analyzed the amount of cyclin B1 protein in HeLa cells expressing the H-ras oncogene, these cells are known to express the HPV18 E6 oncogene that induces degradation of p53 protein [40]. We used whole lysates from HeLa cells expressing either oncogenic H-ras or the neomycin resistance gene alone [33]. We found four times more cyclin B1 protein (when measuring band intensities relative to actin), in asynchronous (AS) and partially synchronized (S phase) cells (S) expressing oncogenic H-Ras (lane 2) than in neo control cells (lane 1) (Fig. 2A). These observations were confirmed by immunofluorescence analysis of cells synchronized in S phase, showing that the increased cyclin B1 expression seen in Western blots was in fact due to an increase in the amount of protein per cell (Fig. 2B). Since cell cycle analysis showed that both cell lines were synchronized in S phase (90% in control cells and 86% in H-Ras-expressing cells) (Fig. 2C), different intensity of fluorescence reflects variations in cyclin B1 protein levels between control and H-Ras-expressing cells, rather than in their phase distribution along the cell cycle. As expected, in both cell lines cyclin B1 was localized mainly in the cytoplasm. Northern blot analysis revealed that this increase correlated with higher levels of cyclin B1 mRNA; there was clearly more cyclin B1 mRNA in asynchronous HeLa cells expressing H-Ras than in control cells (Fig. 2D). These results confirmed that expression of oncogenic H-Ras induces higher levels of cyclin B1 protein in HeLa cells by increasing its mRNA levels.

3.3. Altered cyclin B1/cdc2 complex levels in H-Ras-expressing cells

To determine if the observed induction of cyclin B1 expression could have any effect on cyclin B1/cdc2 complex levels and activity, that could possible alter the G2 checkpoint, we first co-immunoprecipitated

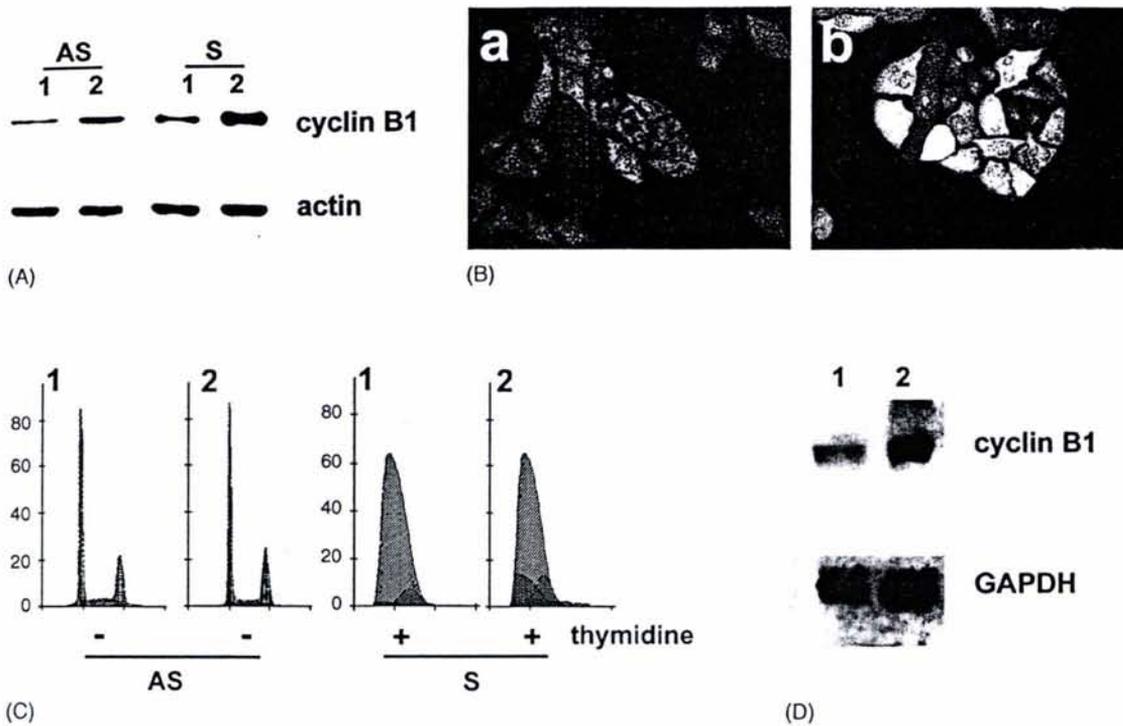


Fig. 2. Cyclin B1 protein levels are higher in H-Ras-transfected HeLa cells and correlate with increased mRNA levels. Stable clones of HeLa cells transfected with a mutated (Val¹²) H-*ras* gene linked to a neo marker or with the neo gene alone were grown for 24 h as described in Section 2. (A) Western blot for cyclin B1 of (AS) asynchronous or (S) synchronized S phase cultures of (1) neo control or (2) H-Ras-expressing cells; (B) confocal image of immunofluorescence staining with anti-cyclin B1 antibody of synchronized (a) control and (b) H-Ras-expressing cells; (C) FACS analysis. HeLa cells were processed for phase distribution analysis by flow cytometry, histograms show number of nuclei as a function of DNA content. (AS) asynchronous cells or (S) cells synchronized in S phase with 2 mM thymidine. (1) Cells expressing the neo gene alone or, (2) the H-*ras* (Val12) oncogene; (D) Northern blot analysis of total RNA from asynchronous cultures; blots were probed with cyclin B1 or GAPDH sequences. (1) Neo control cells, (2) oncogenic H-Ras-expressing cells. Data is representative of results obtained with three independent clones.

cdc2 with cyclin B1 antibodies and determined its amount in the immunoprecipitates by Western blotting. These experiments revealed that there was approximately 3.5 times more *cdc2* protein complexed to cyclin B1 in asynchronous cells expressing oncogenic H-Ras than in neo control cells (Fig. 3A). In order to explore possible changes in G2 checkpoint in the presence of oncogenic H-*ras*, we treated cells with a short exposure (1 h) of 10 μ M etoposide, a G2 DNA damaging agent [34] and addressed if different cyclin B1/*cdc2* complex levels were found. We observed an increase in the amount of complex in both control and H-Ras-expressing cells 12 h after etoposide treatment, although the increase was clearly more dramatic in cells expressing H-Ras (Fig. 3A). The higher amount

of *cdc2* complexed to cyclin B1 correlated with higher levels of cyclin B1 protein in these cells. Cell cycle analysis revealed that asynchronous neo control and H-Ras-expressing cells showed no differences in cell cycle kinetics without drug treatment. As previously described [2,6], both cells were found arrested in G2 12 h after etoposide exposure, with the same proportion of control (42%) and H-Ras-expressing (45%) cells in G2/M (Fig. 3C). These data indicate that differences observed in cyclin B1/*cdc2* complex levels are not due to differences in cell cycle phases distribution. As a positive control, we added caffeine to neo cells since it is known to enhance cytotoxicity when applied following exposure to DNA damaging agents, by circumventing the G2 arrest [41]. Although we

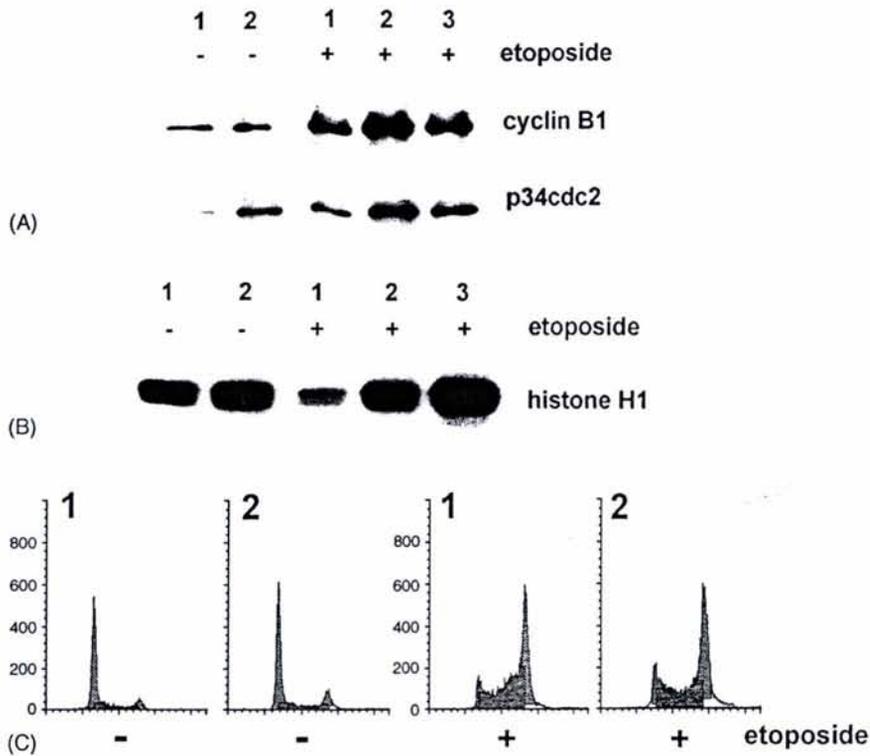


Fig. 3. Cyclin B1/cdc2 complex levels and In vitro kinase activity. HeLa cells were grown for 24 h, treated with etoposide as described in Section 2 and harvested 12 h after drug removal. (A) Western blot of cyclin B1 and cdc2 proteins immunoprecipitated from whole lysates with an anti-cyclin B1 monoclonal antibody. (1) neo control cells, (2) oncogenic H-Ras-expressing cells, (3) neo cells treated with 1 mM caffeine; (B) in vitro kinase assay. Cyclin B1/cdc2 complexes were immunoprecipitated from whole lysates with an anti-cyclin B1 monoclonal antibody; immunoprecipitates were used for in vitro kinase activity on histone H1. (1) Neo control cells, (2) oncogenic H-Ras-expressing cells, (3) neo cells treated with 1 mM caffeine. Data represent three independent experiments; (C) FACS analysis. Histograms show number of nuclei as a function of DNA content. (1) Cells expressing the *neo* gene alone or (2) the *H-ras* (Val12) oncogene. (–) Asynchronous cells or. (+) 12 h after etoposide exposure.

observed an increase in the levels of cyclin B1/cdc2 complex when we treated cells with caffeine after etoposide exposure (Fig. 3A, lane 3), this increase was smaller than that observed in cells expressing H-Ras.

3.4. Higher cyclin B1/cdc2 kinase activity in H-Ras-expressing cells

To evaluate if increased levels of cyclin B1/cdc2 complex in HeLa cells could result in higher kinase activity, we first performed in vitro kinase assays in cyclin B1 immunoprecipitates. As expected, we found that asynchronous cells expressing oncogenic H-Ras exhibited a slight (two-fold) increase in the activity

of this complex, as revealed by a densitometric analysis (Fig. 3B) which corresponds with higher cyclin B1/cdc2 complex levels (Fig. 3A). When treated with etoposide, inhibition of cyclin B1/cdc2 activity was evident in control cells 12 h later, as previously described [2,6]. It has been reported that addition of caffeine after etoposide exposure induces a premature activation of cyclin B1/cdc2 kinase [35,41]. Accordingly, we observed that the activity of the complex was higher in cells treated with caffeine after etoposide treatment. Interestingly, 12 h after drug treatment cells expressing H-Ras exhibited a similar increase in kinase activity to that seen in control cells treated with caffeine, with three times higher activity compared to neo control cells (Fig. 3B). At this time point

the higher kinase activity in these cells was not due to differences in cell cycle distribution (Fig. 3C).

4. Discussion

Our results suggest that H-Ras regulate cyclin B1 expression in a pathway that is independent of p53, since oncogenic H-Ras induced cyclin B1 promoter activity in SW480 cells, and increased cyclin B1 mRNA and protein levels in HeLa cells, both cell lines lacking a functional p53 protein. In the case of HeLa cells, they are known to express the *E6* oncogene from HPV18, which induces degradation of p53 [40]. Moreover, we have previously reported that oncogenic H-Ras induces transcription of *E6* and *E7* in HeLa cells [42] and, as expected, we observed no p53 protein in cells expressing oncogenic H-Ras after DNA damage (data not shown). In addition, we observed that HeLa cells transfected with oncogenic H-Ras exhibit an altered expression of cyclin B1 even before etoposide treatment, when p53 has not been induced. The fact that H-Ras induces expression of cyclin B1 in SW480 cells, which contain null *p53* alleles, suggests that regulation of H-Ras upon the p53 pathway, that involves mdm2 and ARF proteins [43,44], has no important effect on the induction of cyclin B1. This suggests that H-Ras is controlling the G2/M checkpoint in a p53-independent manner.

It has been proposed that pathways independent of p53 may play a role in the control of the G2 DNA damage checkpoint. As previously mentioned, several cell lines deficient in p53 function show a normal arrest in G2 after irradiation [13,19–21] and in *p53*^{-/-} cells, abrogators of G2 such as caffeine produced a reduced delay in G2 and an increased sensitivity to radiation [45,46]. One such pathway may involve cyclin D1, different lines of evidence support this possibility. It is known that cyclin D-cdk4 activity is required not only in G1 but also in late S/G2 for normal cell cycle progression from G2 into mitosis [47,48]. Cyclin D3-cdk4 activity is inhibited in response to UV radiation, concomitant with a G2 arrest [47]. Overexpression of cyclin D1 accelerates exit of cells from G2 arrest after ionizing radiation, with high activity of cyclin B1/cdc2 complex [49]. Moreover, cyclin D induces transactivation of the cyclin B1 promoter CCAAT elements [37,50]. Interestingly, it has

been reported that Ras induces expression of cyclin D1 at G1 [24,25], and also at the G2 phase [48].

In this work we observed that HeLa cells expressing oncogenic H-Ras exhibit increased cyclin B1 mRNA and protein levels that are even higher after treatment with etoposide. These cells showed an increased histone H1 kinase activity and no inhibition of this activity 12 h after etoposide treatment, which correlate with higher amounts of the cyclin B1/cdc2 complex. In contrast, although control cells accumulate a modest concentration of cyclin B1, kinase activity of the complex was found inhibited after drug exposure. The fact that both cell lines exhibited the same proportion of cells in G2/M 12 h after drug treatment, suggests that the effect of H-ras oncogene upon cyclin B1/cdc2 complex level and activity is not a consequence of differences in the cell cycle phase distribution of the cultures.

It is known that expression of both cyclin B1 mRNA and protein are suppressed after S phase irradiation of HeLa cells [7–9]. In contrast, it has been reported that although HeLa cells treated with etoposide exhibit an initial decrease in cyclin B1 mRNA corresponding to low levels of cyclin B1 protein, with time they exhibit rising levels of cyclin B1 that exceed those seen in untreated cells. However, under these conditions, cells are still blocked in G2 with low cyclin B1/cdc2 complex kinase activity that is very similar to that of asynchronous cells [34,51]. In CHO cells, late after etoposide treatment, cyclin B1 protein levels and cyclin B1/cdc2 complex kinase activity are higher than in HeLa cells, therefore CHO cells overcome the G2 arrest earlier, independently of the differences in the duration of the cell cycle of each cell line [51]. Thus, it appears that expression of oncogenic H-Ras in HeLa cells raises cyclin B1 levels in a dramatic way, similar to that seen in CHO cells. This in turn induces higher levels of cyclin B1/cdc2 complex that could be rapidly activated due to a self-amplification process, as has been described [52].

Although it has been reported that increased expression of cyclin B1 produces a reduced delay in G2, it is not sufficient to overcome the arrest. However, overexpression of a constitutive nuclear-targeted mutant of cyclin B1 clearly produces more dramatic effects, with a much significant reduction in the G2 delay [11]. In this regard we have also found more cyclin B1 protein in the nuclei of cells expressing

H-Ras in asynchronous cultures and after etoposide treatment (unpublished data). Thus, it appears that both overexpression of cyclin B1 and increased nuclear localization induced by oncogenic H-Ras, could be responsible for the premature activation of the complex and the reduction in G2 arrest after DNA damage.

It is known that following etoposide exposure, there is an increase in cyclin B1/cdc2 complex that is sequestered in the cytoplasm with its kinase activity inhibited due to phosphorylation of p34cdc2 [5,35,51,53]. It is possible that higher cyclin B1/cdc2 activity seen in H-Ras-expressing cells after DNA damage could result from higher complex levels subjected to positive feedback activation involving cdc25C, which is known to dephosphorylate p34cdc2 [52]. Also, activation of the nuclear localized complex through cdc25B could be important, since it has been shown that cdc25B retains its activity and accumulates in the nucleus after DNA damage [54–56]. Indeed, we observed reduced p34cdc2 phosphorylation after etoposide treatment in H-Ras-expressing cells, as compared to controls (data not shown).

Even though short exposure to etoposide causes DNA single-strand breaks that are rapidly repaired upon drug removal, this treatment induces a prolonged G2 arrest of about 36 h in the majority of asynchronous cells. Those cells that are prematurely released die by mitotic catastrophe [6,35,53]. Indeed, in H-Ras-expressing cells we observed a lower proportion of cells arrested in G2 phase 24 h after drug treatment, concomitant with a higher proportion of cells showing a morphology associated with mitotic death (data not shown). This suggests that oncogenic H-Ras induces a premature release from the G2 arrest by modifying cyclin B1.

The data reported here provide evidence that H-Ras may regulate the G2 checkpoint in part through inducing cyclin B1 expression, and therefore causing an increase in cyclin B1 protein and cyclin B1/cdc2 complex levels and activity. It will be interesting to address how do H-Ras exert this induction, by looking to intermediates of Ras signaling transduction pathways and DNA-binding factors that could regulate cyclin B1 promoter activity. Also, it will be important to determine the role of cyclin D upon cyclin B activation, in order to define more precisely their roles in controlling the G2/M checkpoint.

Acknowledgements

The authors acknowledge P. Ostrosky for continuous support, M.C. Guido for technical support, E. Rojas and G. Cervantes for help with cell cycle analysis and, G. Noris, A. Zentella, J. Weitzman, F. Thierry, and J. Vázquez for critical reading of the manuscript. E.H. Chang for her generous gift of pEJ, C.A. Hauser for pE.18, T. Hunter for cyclin B1 cDNA and K. Katula for cyclin B1 promoter construct (pCycB1(-287)-LUC). Supported with grants from CONACYT (25299M) and PAEP (102366).

References

- [1] C. Norbury, P. Nurse, Animal cell cycles and their control, *Annu. Rev. Biochem.* 61 (1992) 441–470.
- [2] R.B. Lock, W.E. Ross, Inhibition of p34cdc2 kinase activity by etoposide or irradiation as a mechanism of G2 arrest in chinese hamster ovary cells, *Cancer Res.* 50 (1990) 3761–3766.
- [3] Y.-P. Tsao, P. D'Arpa, L.F. Liu, The involvement of active DNA synthesis in camptothecin-induced G2 arrest, altered regulation of p34cdc2/cyclin B1, *Cancer Res.* 52 (1992) 1823–1829.
- [4] P.M. O'Connor, D.K. Ferris, M. Pagano, G. Draetta, J. Pines, T. Hunter, D.L. Longo, K.W. Kohn, G2 delay induced by nitrogen mustard in human cells affects cyclin A/cdk2 and cyclin B1/cdc2-kinase complexes differently, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 8298–8308.
- [5] O. Tounekti, G. Pron, J. Belehradek, L.M. Mir, Bleomycin, an apoptosis-mimetic drug that induces two types of cell death depending on the number of molecules internalized, *Cancer Res.* 53 (1993) 5462–5469.
- [6] R.B. Lock, Inhibition of p34cdc2 kinase activation, p34cdc2 tyrosine dephosphorylation and mitotic progression in chinese hamster ovary cells exposed to etoposide, *Cancer Res.* 52 (1992) 1817–1822.
- [7] R.J. Muschel, H.B. Zhang, G. Iliakis, W.G. McKenna, Cyclin B expression in HeLa cells during the G2 block induced by ionizing radiation, *Cancer Res.* 51 (1991) 5113–5117.
- [8] R.J. Muschel, H.B. Zhang, W.G. McKenna, Differential effect of ionizing radiation on the expression of cyclin A and cyclin B in HeLa cells, *Cancer Res.* 53 (1993) 1128–1135.
- [9] A. Maity, W.G. McKenna, R.J. Muschel, Evidence for post-transcriptional regulation of cyclin B1 mRNA in the cell cycle and following irradiation in HeLa cells, *EMBO J.* 14 (1995) 603–609.
- [10] G.D. Kao, W.G. McKenna, A. Maity, K. Blank, R.J. Muschel, Cyclin B1 availability is a rate-limiting component of the radiation-induced G2 delay in HeLa cells, *Cancer Res.* 57 (1997) 753–758.

- [11] P. Jin, S. Hardy, D.O. Morgan, Nuclear localization of cyclin B1 controls mitotic entry after DNA damage, *J. Cell. Biol.* 141 (1998) 875–885.
- [12] T.H.-T. Chang, F.A. Ray, D.A. Thompson, R. Schlegel, Disregulation of mitotic checkpoints and regulatory proteins following acute expression of SV40 large T antigen in diploid human cells, *Oncogene* 14 (1997) 2383–2393.
- [13] D.A. Thompson, G. Belinsky, T.H.-T. Chang, D.L. Jones, R. Schlegel, K. Münger, The human papillomavirus-16 E6 oncoprotein decreases the vigilance of mitotic checkpoints, *Oncogene* 15 (1997) 3025–3035.
- [14] M.L. Agarwal, A. Agarwal, W.R. Taylor, G.R. Stark, p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (1995) 8493–8497.
- [15] N. Stewart, G.G. Hicks, F. Paraskevas, M. Mowat, Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53, *Oncogene* 10 (1995) 109–115.
- [16] T.A. Chan, H. Hermeking, C. Lengauer, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, 14-3-3 σ is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage, *Nature* 401 (1999) 616–620.
- [17] S.A. Innocente, J.L.A. Abrahamson, J.P. Cogwell, J.M. Lee, p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 2147–2152.
- [18] W.R. Taylor, S.E. DePrimo, A. Agarwal, M.L. Agarwal, A.H. Schönthal, K.S. Katula, G.R. Stark, Mechanisms of G2 arrest in response to overexpression of p53, *Mol. Biol. Cell* 10 (1999) 3607–3622.
- [19] R.S. Paules, E.N. Levedakou, S.J. Wilson, C.L. Innes, N. Rhodes, T.D. Tlsty, D.A. Galloway, L.A. Donehower, M.A. Tainsky, W.K. Kaufmann, Defective G2 checkpoint function in cells from individual with familial cancer syndromes, *Cancer Res.* 55 (1995) 1763–1773.
- [20] L.S. Agapova, A.V. Ivanov, A.A. Sablina, P.B. Kopnin, O.I. Sokova, P.M. Chumakov, B.P. Kopnin, p53-dependent effects of RAS oncogene on chromosome stability and cell cycle checkpoints, *Oncogene* 18 (1999) 3135–3142.
- [21] T.M. Passalaris, J.A. Benanti, L. Gewin, T. Kiyono, D.A. Galloway, The G2 checkpoint is maintained by redundant pathways, *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999) 5872–5881.
- [22] M. Barbacid, Ras genes, *Annu. Rev. Biochem.* 56 (1987) 779–827.
- [23] S.A. Moodie, B.M. Willumsen, M.J. Weber, A. Wolfman, Complexes of Ras-GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase, *Science* 260 (1993) 1658–1661.
- [24] J. Filmus, A.I. Robles, W. Shi, M.J. Wong, L.L. Colombo, C.J. Conti, Induction of cyclin D1 overexpression by activated ras, *Oncogene* 9 (1994) 3627–3633.
- [25] C. Albanese, J. Johnson, G. Watanabe, N. Eklund, D. Vu, A. Arnold, R.G. Pestell, Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 23589–23597.
- [26] C.B. Barrett, R.M. Schroetke, F.A. VanderHoorn, S.K. Nordeen, J.L. Maller, H-rasval12, thr59 activates S6 kinase and p34cdc2 kinase in *Xenopus* oocytes, evidence for c-mosx-dependent and -independent pathways, *Mol. Cell. Biol.* 10 (1990) 310–315.
- [27] Y. Daar, A.R. Nebrada, N. Yew, P. Sass, R. Paules, E. Santos, V. Wigler, G.F. Woude, The ras oncoprotein and m-phase activity, *Science* 253 (1991) 74–76.
- [28] J.P. Durkin, J.F. Whitfield, The viral K-ras gene must be expressed in the G2 phase if ts Kirsten sarcoma virus-infected NRK cells are to proliferate in serum-free medium, *Mol. Cell. Biol.* 7 (1987) 444–449.
- [29] T. Hirakawa, E. Ruley, Rescue of cells from ras oncogene-induced growth arrest by a second, complementing, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85 (1988) 1519–1523.
- [30] A.J. Ridley, H.F. Paterson, M. Noble, H. Land, Ras-mediated cell cycle arrest is altered by nuclear oncogenes to induce Schwann cell transformation, *EMBO J.* 7 (1988) 1635–1645.
- [31] W.G. McKenna, G. Iliakis, M.C. Weiss, E.J. Bernhard, R.J. Muschel, Increased G2 delaying radiation-resistant cells obtained by transformation of primary rat embryo cells with the oncogenes H-ras and v-myc, *Radiat. Res.* 125 (1991) 283–287.
- [32] W.G. McKenna, E.J. Bernhard, D.A. Markiewicz, M.S. Rudolfs, A. Maity, R.J. Muschel, Regulation of radiation-induced apoptosis in oncogene-transfected fibroblasts, influence of H-ras on the G2 delay, *Oncogene* 12 (1996) 237–245.
- [33] E.I. Miranda, C. Santana, E. Rojas, S. Hernández, P. Ostrosky-Wegman, A. García-Carrancá, Induced mitotic death of HeLa cells by abnormal expression of c-H-ras, *Mut. Res.* 349 (1996) 173–182.
- [34] A. Maity, A. Hwang, A. Janss, P. Phillips, W.G. McKenna, R.J. Muschel, Delayed cyclin B1 expression during the G2 arrest following DNA damage, *Oncogene* 13 (1996) 1647–1657.
- [35] R.B. Lock, O.V. Galperina, R.C. Feldhoff, L.J. Rhodes, Concentration-dependent differences in the mechanisms by which caffeine potentiates etoposide cytotoxicity in HeLa cells, *Cancer Res.* 54 (1994) 4933–4939.
- [36] E.H. Chang, M.E. Furth, E.M. Scolnick, D.R. Lowy, Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus, *Nature* 297 (1982) 479–483.
- [37] K.S. Katula, K.L. Wright, H. Paul, D.R. Surman, F.J. Nuckolls, J.W. Smith, J.P.Y. Ting, J. Yates, J.P. Cogwell, Cyclin-dependent kinase activation and S-phase induction of the cyclin B1 gene are linked through the CCAAT elements, *Cell Growth Differ.* 8 (1997) 811–820.
- [38] C.K. Galang, C.J. Der, C.A. Hauser, Oncogenic Ras can induce transcriptional activation through a variety of promoter elements, including tandem c-ets2 binding sites, *Oncogene* 9 (1994) 2913–2921.
- [39] P. Chomczynski, N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.* 162 (1987) 156–159.
- [40] M. Scheffner, B.A. Werness, J.M. Huibregtse, A.J. Levine, P.M. Howley, The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53, *Cell* 63 (1990) 1129–1136.
- [41] C.C. Lau, A.B. Pardee, Mechanism by which caffeine potentiates lethality of nitrogen mustard, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79 (1982) 2942–2946.

- [42] O. Medina-Martínez, V. Vallejo, M.C. Guido, A. García-Carrancá, Ha-*ras* oncogene-induced transcription of human papillomavirus type 18 *E6* and *E7* oncogenes, *Mol. Carcinogen.* 19 (1997) 83–90.
- [43] I. Palmero, C. Pantoja, M. Serrano, p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras, *Nature* 395 (1998) 125–126.
- [44] S. Ries, C. Biederer, D. Woods, O. Shifman, S. Shirasawa, T. Sasazuki, M. McMahon, M. Oren, F. McCormick, Opposing effects of ras on p53: transcriptional activation of mdm2 and induction of p19ARF, *Cell* 103 (2000) 321–330.
- [45] S.N. Powell, J.S. DeFrank, P. Connell, M. Eogan, F. Preffer, D. Dombkowski, W. Tang, S. Friend, Differential sensitivity of p53(–) and p53(+) cells to caffeine-induced radiosensitization and override of G2 delay, *Cancer Res.* 55 (1995) 1643–1648.
- [46] K.J. Russell, L.W. Wiens, W. Demers, D. Galloway, S.E. Plon, M. Groudine, Abrogation of the G2 checkpoint results in differential radiosensitization of G1 checkpoint-deficient and G1 checkpoint-competent cells, *Cancer Res.* 55 (1995) 1639–1642.
- [47] B.G. Gabrielli, B. Sarcevic, J. Sinnamon, G. Walker, M. Castellano, W. Xue-Qing, K.A.O. Ellem, A cyclin D-cdk4 activity required for G2 phase cell cycle progression is inhibited in ultraviolet radiation-induced G2 phase delay, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 13961–13969.
- [48] M. Hitomi, D.W. Stacey, Ras-dependent cell cycle commitment during G2 phase, *FEBS Lett.* 490 (2001) 123–131.
- [49] J.M. Coco-Martin, A. Balkenende, T. Verschoor, F. Lallemand, R. Michalides, Cyclin D1 overexpression enhances radiation-induced apoptosis and radiosensitivity in a breast tumor cell line, *Cancer Res.* 59 (1999) 1134–1140.
- [50] A. Moro, K. Zerfass, S. Joswig, P. Jansen-Duerr, Effect of cyclins and cdks on the cyclin B1 promoter activation, *Biochem. Mol. Biol. Int.* 41 (1997) 919–924.
- [51] R. Lock, P.K. Keeling, Responses of HeLa and Chinese hamster ovary p34cdc2/cyclin B kinase in relation to cell cycle perturbations induced by etoposide, *Int. J. Oncol.* 3 (1993) 33–42.
- [52] I. Hoffman, P.R. Clarke, M.J. Marcote, E. Karsenti, G. Draetta, Phosphorylation and activation of human cdc25C by cdc2-cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis, *EMBO J.* 12 (1993) 53–63.
- [53] R.B. Lock, W.E. Ross, Possible role for p34cdc2 kinase in etoposide-induced cell death of Chinese hamster ovary cells, *Cancer Res.* 50 (1990) 3767–3771.
- [54] A. Lopez-Girona, B. Furnari, O. Mondeseret, P. Russell, Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein, *Nature* 397 (1999) 172–175.
- [55] C. Karlsson, S. Katich, A. Hasting, I. Hoffmann, P. Jonathan, Cdc25B and cdc25C differ markedly in their properties as initiators of mitosis, *J. Cell Biol.* 146 (1999) 573–583.
- [56] B.G. Gabrielli, J.M. Clark, A.K. McCormack, K.A.O. Ellem, Ultraviolet light-induced G2 phase cell cycle checkpoint blocks cdc25-dependent progression into mitosis, *Oncogene* 15 (1997) 749–758.