



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**PAPEL DE R-RAS EN LA ACTIVACIÓN DE INTEGRINAS EXPRESADAS EN LOS
LINFOCITOS T**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
SANDRA ROMERO VALDEZ**

**TUTOR PRINCIPAL
CARLOS ROSALES LEDEZMA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**DR. ARTURO EDGAR ZENTENO GALINDO
FACULTAD DE MEDICINA**

**DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCÁ
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA**

MÉXICO, D. F. 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo de tesis de maestría se realizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del **Dr. Carlos Rosales Ledezma** y fue apoyada en parte por el **proyecto IN207514** de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM y por el **proyecto 168098** del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

El Comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Carlos Rosales Ledezma

Instituto de Investigaciones Biomédicas,
UNAM

Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo

Facultad de Medicina, UNAM

Dr. Alejandro Manuel García Carrancá

Instituto de Investigaciones Biomédicas,
UNAM

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. **Carlos Rosales Ledezma** por permitirme trabajar en su laboratorio, por su apoyo y dirección académica.

Al Dr. **Bernardo Franco Bárcenas** por su valiosa asesoría en la construcción de los plásmidos.

A la M en IBB. **Nancy Yorley Mora Pérez** por el apoyo técnico brindado en la fase experimental.

Al **Comité tutorial** por sus aportaciones durante el tiempo del trabajo experimental.

A los integrantes del **Jurado** por sus observaciones en la revisión del trabajo escrito.

Este trabajo de tesis está dedicado a:

A la **sociedad Mexicana** que sin ser conscientes hacen posible que muchos de nosotros podamos ser parte de un país donde se desarrolle el conocimiento y la ciencia.

A mi **familia** por ser el pilar que soporta mis sueños, esperanzas y metas.

A mis **amigos** con los compartí una parte de esta experiencia.

.. Hay que dormir con los ojos abiertos,
hay que soñar con las manos,
soñemos sueños activos de río buscando su cauce,
sueños de sol soñando sus mundos,
hay que soñar en voz alta,
hay que cantar hasta que el canto eche raíces, tronco, ramas, pájaros, astros,
cantar hasta que el sueño engendre y brote del costado del dormido la espiga roja de la resurrección...

Octavio Paz

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE TABLAS.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
ABSTRACT	vii
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	34
III. HIPÓTESIS	35
IV. OBJETIVO GENERAL	35
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
VI. RESULTADOS.....	46
VII. DISCUSIÓN.....	73
VIII. CONCLUSIONES	89
IX. REFERENCIAS	90
X. ANEXOS.....	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Moléculas de adhesión expresadas en los linfocitos T	13
Figura 2. Integrinas que se expresan en mamíferos. 24 α/β heterodímeros que constituyen las Integrinas encontradas en mamíferos.	15
Figura 3. Estructura general de las integrinas.	17
Figura 4. Estados conformacionales de la estructura de las integrinas.	20
Figura 5. Estados conformacionales de las GTPasa de la familia Ras.	26
Figura 6. Mapa circular del vector pIRES-hrGFP-1a.	47
Figura 7. Amplificación del gen de R-Ras por PCR.	48
Figura 8. Vector y Fragmentos amplificados digeridos con las enzimas de restricción Eco RI y Bam HI.	49
Figura 9. Digestión con Xho I del vector solo y del DNA plasmídico obtenido de las colonias transformantes de la reacción de ligación.	51
Figura 10. DNA transformante sometido a digestión con las endonucleasas Bam HI y Eco RI.	52
Figura 11. Secuencias blanco para Hind III.	53
Figura 12. Digestión de plásmidos transformantes con la enzima Hind III.	54
Figura 13. Alineación de la secuencia de amino ácidos que codifica el plásmido secuenciado.	55
Figura 14. Secuencia de nucleótidos de R-Ras wt clonada en el vector pIRES-hrGFP-1a.	56
Figura 15. DNA Plasmídico purificado de bacterias transformantes digeridos con Hind III.	57
Figura 16. DNA plasmídico digerido con las endonucleasa Eco RI y Bam HI.	58
Figura 17. Alineación de la secuencia de aminoácidos codificados en los plásmidos clonados	58
Figura 18. Secuencias de los plásmidos obtenidos por mutagénesis dirigida.	60
Figura 19. Expresión de la proteína verde fluorescente en células Jurkat transfectadas con el plásmido pIRES.	62
Figura 20. Expresión de GFP en células Jurkat después de 36 h de transfección.	63
Figura 21. Determinación de la eficiencia de la transfección con los plásmidos pIRES-hr-GFP y R-Ras-wt-pIRES en células Jurkat.	65
Figura 22. Expresión de GFP en células transfectadas y separadas por cell sorting a las 36 h y 2 semanas después de la transfección.	68
Figura 24. Identificación de integrinas $\beta 1$ expresadas en diferentes tipos celulares usando el anticuerpo TS2/16.	69
Figura 25. Histograma de la fluorescencia con anticuerpo monoclonal 15/7.	71
Figura 26. Determinación de Integrinas $\beta 2$ activadas en Células Jurkat y Monocitos en presencia de $MnCl_2$	72

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Volumen y concentración de reactivos utilizados en la PCR en la amplificación del gen R-Ras	39
Tabla 2. Condiciones probadas para la obtención de células Jurkat transfectadas con los diferentes plásmidos construidos de R-Ras	44
Tabla 3. Anticuerpos utilizados en la detección de integrinas por citometría de flujo en diferentes células	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ADMIDAS.	Adjacent metal ion dependent adhesion site
ADP	Adenosin difosfato
Ca²⁺	Catión divalente calcio
cDNA	DNA complementario
CPA	Células presentadoras del antígeno
DAG	Diacil glicerol
DNA	Acido desoxirribonucleico (Desoxi nucleic Acid)
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EGFR.	Receptores de factores de crecimiento epidermal
EMCV-IRES	Sitio de unión interno al ribosoma del virus de la encefalomiocarditis (internal ribosome entry site)
ERK	Cinasa reguladora extracelularmente
FACS	Clasificación de células activadas por fluorescencia (fluorescence-activated cell sorter)
FN	Fibronectina
GAPs	Proteínas activadoras de la GTPasa
GDP	Difosfato de Guanosina (Guanosin diphosphate)
GEFs	Factores de intercambio del nucleotido de guanina
GFP	Proteína verde fluorescente (Green protein fluorescence)
GlyCAM-1	Glycosylation-dependent cell adhesion molecule type I
GTP	Trifosfato de Guanosina (Guanosine triphosphate)
h	Horas
ICAM	Moléculas de adhesión intracelular (Intracellular molecules cell adhesion)
IgSF	Superfamilia de las inmunoglobulinas (immunoglobulins super family)
IL	Interleucina
INF-x	Interferon gama

IP-3	Inositol 1,4,5-trifosfato
Kb	Kilobases
LIMBS	Sitio de unión inducido por el metal del ligando (ligand-induced metal ion-binding site)
LMWGP.	Proteínas G de bajo peso molecular (low molecular weight G proteins)
Mad CAM	Mucosal vascular cell adhesion molecule
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos (Mitogen Activated Protein Kinases)
Mg²⁺	Catión divalente del magnesio
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MIDAS	Metal ion dependent adhesion site
min	Minutos
mM	milimolar
MnCl₂	Cloruro de manganeso
ng	nanogramo
PBS	Solucion buffer de fosfatos
PCL_v	Fosfolipasa C épsilon
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrogeno
PI3-K	Fosfatidilinositol 3-cinasa
PSGL-1	P-Selectin glycoprotein ligand
PSI	Plexina-semaforina-integrina
R-Ras	Relacionado con Ras (Related to Ras)
RNA	Acido ribonucleico (Ribonucleic Acid)
s	Segundos
siRNA	RNA pequeño de interferencia (small interfering RNA)
TCR	Receptor de los linfocitos T
Th1	Linfocitos cooperadores tipo 1 (T cell helper 1)

Th2 T	Linfocito cooperadores tipo 2 (T cell helper 2)
TNF-α	Factor de necrosis tumoral beta
T_{reg}	Linfocitos T reguladores
UV	Ultravioleta
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
~L	microlitro

ABSTRACT

R-Ras is a member of the Ras family of proteins that is involved in different cellular processes such as differentiation, migration, cell spreading and cancer. These processes are regulated in part by modulation of integrin activation by R-Ras. Like Ras, R-Ras acts as molecular switch depending on its GTP- or GDP-bound states. R-Ras can regulate signal transduction in the cell depending on external stimulus from outside of the cell. Although R-Ras shares many molecular effectors with Ras, external stimulus that are capable of turning R-Ras on are not totally defined. Therefore, constitutively mutants of R-Ras are a powerful tool for studying R-Ras effects in cells.

In this study we constructed five plasmids each one encoding for a different R-Ras mutant molecule. Two constitutively active mutants (38V, and 87L), two dominant negative mutants (41A, and 43N), and one with the wild type R-Ras protein. At the same time, these plasmids encode for the green fluorescence protein that helps monitoring plasmid expression when they are transfected in a cell line. We used these plasmids to introduce the mutant R-Ras proteins into Jurkat cells by electroporation, and then determined the activation state of integrins.

Our data on activation of integrins in Jurkat cell by R-Ras were not conclusive because the antibodies used were not able to identify $\beta 1$ integrins in a resting state of Jurkat cells. These antibodies could easily detect integrins expressed in THP-1 monocyte cell line and peripheral blood neutrophils. Moreover, induction of activation of $\beta 1$ integrins by divalent cation Mn^{2+} , resulted in monoclonal antibody 15/7 binding. This antibody binds integrins when they are in an active conformation. The monoclonal antibody 15/7 could

bind Jurkat cells in a resting state. Thus, in Jurkat cells $\beta 1$ integrins are expressed in an activated state without further stimulation.

For $\beta 2$ integrins, the monoclonal antibody CBRM1/5 binds to these receptors only when they are in an active conformation. We were not able to detect any CBRM1/5 binding to Jurkat or THP-1 cells after activation by Mn^{2+} .

In this work, we obtained five plasmids encoding for R-Ras mutants and GFP protein expressed from a bicistronic promoter. These plasmids are a useful tool for transiently transfecting cell lines and then study R-Ras functions.

RESUMEN

R-Ras es una GTPasa, la cual se ha visto involucrada en la regulación de la activación de integrinas en varios tipos celulares. Para el estudio de esta GTPasa en la célula el uso de mutantes constitutivamente activas y dominantes negativas es de gran utilidad debido principalmente a que no se sabe como R-Ras es activada desde el exterior de la célula. En este trabajo se construyeron 5 plásmidos que codifica para cada uno de los cuales codifica para una mutante de R-Ras. Dos mutantes constitutivamente activas de R-Ras (38V y 87L), dos mutantes dominantes negativas (41A y 43N) y la molécula R-Ras silvestre. Además estos plásmidos expresan la proteína verde fluorescente (GFP) de manera simultánea al gen clonado. Con estos plásmidos se transfectaron células Jurkat por el método de electroporación. Teniendo células que expresan GFP se optó por la técnica de citometría de flujo para evaluar el efecto de R-Ras sobre la activación de las integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ expresadas en las células Jurkat, usando anticuerpos monoclonales para la identificación de integrinas $\beta 1$ totales (TS2/16), integrinas $\beta 2$ totales (IB4), integrinas $\beta 1$ activadas (15/7) e integrinas $\beta 2$ activadas (CBRM1/5). Al evaluar la expresión basal de las integrinas $\beta 1$ en células Jurkat con el anticuerpo TS2/16, se encontró que éste anticuerpo no identifica la cadena $\beta 1$ de las integrinas. Por otro lado el anticuerpo 15/7 identifica integrinas $\beta 1$ activadas en células Jurkat sin ningún estímulo y cuando se estimularon con Mn^{2+} su activación fue mayor, lo que sugiere que las integrinas $\beta 1$ se encuentran en una forma activada en estas células. En el caso de las integrinas $\beta 2$ el anticuerpo IB4 se unió a las células Jurkat y a las células THP-1, pero el anticuerpo CBRM1/5 no, aún después de tratar a las células

con Mn^{2+} . Esto sugiere que el anticuerpo no es el adecuado para identificar integrinas $\beta 2$ activadas en estas células.

En este trabajo se obtuvieron cinco plásmidos que codifican para diferentes mutantes de R-Ras. Con estos plásmidos se podrán obtener líneas celulares con las cuales se puede determinar el efecto de esta GTPasa con la ayuda de un gen reportero que se expresa de manera simultánea a R-Ras.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del sistema inmunológico

El sistema inmunológico es un conjunto de proteínas, células, órganos y tejidos cuya función es proteger a animales de la entrada de sustancias extrañas ajenas al cuerpo o de microorganismos patógenos [1]. Su funcionamiento consiste en conectar todos los componentes que lo integran en una complicada red de comunicación que lo hace capaz de reconocer la entrada de las sustancias extrañas, responder ante ellas y eliminarlas eficazmente. Para que estos eventos ocurran, el sistema inmunológico ha desarrollado una serie de mecanismos para el reconocimiento específico de las sustancias extrañas, generar una variedad de respuestas adecuadas para cada tipo y, finalmente eliminarlas. Además, el sistema inmunológico puede diferenciar entre moléculas o células pertenecientes al cuerpo y aquellas que son extrañas; lo que hace al sistema inmunológico altamente específico [1-3].

Dicha especificidad se debe a que el sistema inmunológico puede reconocer a cualquier microorganismo o sustancia ajena al cuerpo y desencadenar una respuesta por parte del sistema inmunológico. Los microorganismos y sustancias capaces de desencadenar esta respuesta se conocen como antígenos [1]. Al reconocer al antígeno el sistema inmunológico genera dos tipos de respuestas: la respuesta inmunológica innata y la respuesta inmunológica adaptativa. Ambas respuestas son diferentes, pero interactúan a varios niveles para desarrollar una completa defensa contra los agentes patógenos.

La respuesta inmunológica innata define una colección de mecanismos protectores que el organismo usa para prevenir o minimizar la infección y es la primera línea de defensa

contra los agentes patógenos. Se caracteriza por ser una respuesta rápida, inespecífica, que carece de memoria inmunológica y, usualmente, es de corta duración. Los mecanismos de defensa asociados con la inmunidad innata consisten en cuatro tipos de barreras: 1) Anatómica, como la piel, mucosas y membranas. 2) Fisiológica, como la temperatura, pH y proteínas reguladoras (complemento, interferones y algunas citocinas). 3) Fagocítica, que consiste en ingerir y posteriormente eliminar a microorganismos patógenos dentro de la célula (función llevada a cabo por células como los macrófagos y neutrófilos). Y 4) eventos inflamatorios que desencadena la respuesta inmunológica, como la secreción de citocinas, e interleucinas, la proliferación celular y la actividad citotóxica [1, 3, 4].

Con lo que respecta a la respuesta inmunológica adaptativa, podemos decir que es un sistema de reconocimiento específico, con memoria inmunológica, que genera un gran número de moléculas para reconocer diferentes antígenos [2, 5, 6]. El reconocimiento específico que caracteriza a esta respuesta deriva de la recombinación genética de receptores en los linfocitos. Esto lleva a una gran variedad de receptores específicos de reconocimiento. Estos receptores de antígeno (TCR) en linfocitos T son capaces de distinguir entre miles de antígenos y células propias del organismo. Debido a esto la respuesta inmunológica adaptativa es altamente específica [2, 3, 5].

La capacidad de diferenciar entre las sustancias extrañas al cuerpo y las propias es esencial para no generar una respuesta inapropiada hacia las células o moléculas propias del cuerpo, lo cual puede llegar a ser fatal [2].

La respuesta inmunológica innata suministra una primera línea de defensa eficaz contra microorganismos patógenos, sin embargo muchos de estos microorganismos han evolucionado hasta ser resistentes a los mecanismos de la respuesta inmunológica

innata, y su eliminación exige de aquellos mecanismos más específicos que tiene la respuesta inmunológica adaptativa

1.1.2 Respuesta inmunológica adaptativa

Las propiedades de la respuesta inmunológica adaptativa están diseñadas para dar al individuo una mejor protección contra infecciones recurrentes [7]. La especificidad antigénica le permite al sistema inmunológico distinguir sustancias de una gran cantidad de antígenos diferentes. De hecho, los mecanismos de la respuesta inmunológica adaptativa pueden distinguir entre dos proteínas que difieren en un solo aminoácido, por lo que se genera un gran número de moléculas y células distintas para la identificación de cada antígeno. Una vez que el sistema inmunológico ha reconocido y respondido ante el antígeno, exhibe memoria inmunológica. Esto es, un segundo encuentro con el mismo antígeno, induce un estado elevado de reactividad que permite la rápida eliminación del antígeno. Además esta memoria puede otorgar inmunidad de por vida frente a agentes infecciosos después del reconocimiento inicial.

La respuesta inmunológica adaptativa actúa mediante dos rutas diferentes para responder de manera eficaz ante los antígenos: la inmunidad humoral y la inmunidad celular. La inmunidad humoral es la mayor defensa contra las infecciones bacterianas. Ésta implica la secreción de proteínas, las cuales se unen de manera específica al antígeno y lo neutralizan. Tales proteínas, también llamadas anticuerpos; son secretados en la sangre, linfa y otros fluidos corporales por los linfocitos B que son las células efectoras de la respuesta inmunológica adaptativa de tipo humoral [2, 4, 5]. La inmunidad mediada por células o inmunidad celular es el mecanismo de defensa contra infecciones por virus, hongos y algunas bacterias como el bacilo de la tuberculosis. Este mecanismo es mediado por células efectoras, llamadas linfocitos T o células T.

Estas células reconocen al antígeno de manera específica mediante un receptor único que expresan en su membrana y, ayudadas por otro tipo de células, procesan al antígeno y ejercen su función [1, 5, 6]. Los linfocitos T son las células efectoras de la respuesta inmunológica adaptativa y son los responsables absolutos del reconocimiento inmunológico específico del antígeno, por lo que es importante revisar con más detalle sus características fundamentales.

1.2 Linfocitos T

Todos los linfocitos en el cuerpo son derivados de una célula madre pluripotencial en la médula ósea. Los linfocitos B maduran en la médula ósea, para dar lugar a las células plasmáticas que producen anticuerpos [2]. Los linfocitos T se producen en la médula ósea a partir de la misma célula madre que los linfocitos B, pero a diferencia de éstos, los precursores de linfocitos T migran hacia el timo, donde maduran por completo. Posteriormente entran al torrente sanguíneo y migran a los tejidos linfoides periféricos. Ya maduros, reciben el nombre de linfocitos T vírgenes. Estos linfocitos nunca han estado expuestos al antígeno pero expresan ya en su superficie los receptores y moléculas necesarias para el reconocimiento del antígeno [1, 4, 7].

Una vez que los linfocitos T vírgenes han salido al torrente sanguíneo y están en los órganos linfoides periféricos, pueden encontrarse con un antígeno. Este encuentro deriva en la activación de los linfocitos T vírgenes que inician una proliferación hacia células efectoras [2, 3]. La activación de los linfocitos T vírgenes sigue una serie de pasos sucesivos: primero aumentan de tamaño convirtiéndose en linfoblastos y luego proliferan para formar células genéticamente idénticas. A este proceso se le conoce como expansión clonal [1, 3, 4].

Los linfocitos producto de esta proliferación son células efectoras que migran a cualquier zona de inflamación o daño donde es probable que se encuentre con el antígeno responsable de su activación para finalmente, proceder a su eliminación [1]. Parte de la descendencia procedente de los linfocitos T estimulados por el antígeno se diferencia en células de memoria longevas, que tienen por función intervenir en respuestas rápidas e intensificadas después de una segunda exposición al antígeno. Por lo tanto, siempre hay diferentes poblaciones de linfocitos T (vírgenes, efectores y de memoria) en diversos lugares del cuerpo [1, 2, 5]. De ahí que se vuelva necesario hablar un poco de ellos.

1.2.1. Poblaciones y subpoblaciones de linfocitos T

Las células madres en la médula ósea, que están destinadas a diferenciarse en linfocitos T, migran al timo donde se lleva a cabo su maduración. Dentro del timo los pre-linfocitos T proliferan, rearreglan los genes del TCR y sufren cambios en la expresión de moléculas de superficie [1, 3, 4].

Las moléculas que expresan los linfocitos T vírgenes para que puedan migrar hacia los órganos linfoides periféricos son las moléculas de adhesión, que median la unión a las vénulas del endotelio alto y permiten a los linfocitos llegar a tejidos u órganos donde tienen la mejor oportunidad de encontrar al antígeno [1, 5]. Los receptores de citocinas permiten a los linfocitos captar las citocinas necesarias para los cambios ocurridos en la activación y la expansión clonal [1]. Las moléculas que se expresan sobre la superficie de los linfocitos T vírgenes sirven para diferenciar a subpoblaciones de linfocitos y su expresión va a depender de sus características efectoras. Estas moléculas son llamadas grupos de diferenciación (CD del inglés cluster of differentiation) según los anticuerpos que las reconocen. Algunos linfocitos T vírgenes

expresan el marcador CD4, que los va a diferenciar en linfocitos T cooperadores. Otros linfocitos expresan el marcador CD8, que los va a diferenciar en linfocitos T citotóxicos. Estos mismos linfocitos T vírgenes sean CD4 (linfocitos T cooperadores) o CD8 (linfocitos T citotóxicos) expresan, el marcador CD3 que está asociado al TCR en la membrana formando un complejo de transducción de señales[1-4].

El receptor de los linfocitos T (TCR) es un heterodímero que está formado por dos cadenas polipéptidicas transmembranales, denominadas α y β , unidas de manera covalente entre sí mediante puentes disulfuros, estas cadenas son las que reconocen de manera específica, al antígeno. Existe otro tipo de receptor menos común formado por una cadena γ y otra δ , y parece ser que el TCR formado por las cadenas $\gamma\delta$ reconoce cierto tipo de antígenos microbianos como componentes de micobacterias [1, 3].

Así, los linfocitos T vírgenes expresan las moléculas necesarias para el reconocimiento específico del antígeno, lo que les permite activarse, llevar a cabo la expansión clonal y diferenciarse en células efectoras que tendrán la función de eliminar al antígeno. Sin embargo, los linfocitos T no pueden reconocer al antígeno sin que éste haya sido procesado por unas células especializadas llamadas células presentadoras del antígeno (CPAs).

Las células presentadoras del antígeno son células del sistema inmunológico que están encargadas de procesar el antígeno, exhibirlo sobre su membrana plasmática y presentárselo a los linfocitos para que puedan activarse y proliferar en células efectoras. El procesamiento del antígeno es llevado a cabo por macrófagos, células dendríticas o linfocitos B. Estas células internalizan al antígeno por endocitosis o fagocitosis, lo degradan en péptidos pequeños que se unen a moléculas del complejo

principal de histocompatibilidad (MCH, del inglés Major Histocompatibility Complex). El péptido unido a la molécula MHC se exhibe posteriormente sobre su membrana celular. Las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), son glicoproteínas polimórficas que se expresan sobre la superficie de la membrana celular. Existen dos tipos de moléculas MCH: las moléculas del MCH de clase I, que consisten en una cadena pesada unida a una proteína pequeña llamada microglobulina- $\beta 2$ y las moléculas del MCH de clase II, que son glicoproteínas formadas por una de cadena α y β [3, 4, 6]. Los linfocitos T, dependiendo del marcador de superficie que expresen, identificarán al complejo formado por las MCH de clase I (linfocitos T CD8) o por las MCH de clase II (linfocitos T CD4) y responderán de manera apropiada. [1, 2, 5].

Una vez que las células presentadoras del antígeno (CPA) han procesado al antígeno, éstas lo exhiben a los linfocitos T, en este paso el linfocito T virgen reconoce al antígeno mediante el receptor TCR para poder iniciar su activación y proliferación como célula efectora. [1-3, 5, 7].

Los linfocitos T cooperadores o linfocitos T CD4 reconocen al complejo formado por las moléculas MCH de clase II y el determinante antigénico. Cuando se activa el TCR, los linfocitos T CD4 se pueden diferenciar en una subpoblación de linfocitos llamados Th1 o Th2 (T cell helper 1 o 2 por sus siglas en inglés). Los linfocitos Th1 ayudan a la diferenciación de macrófagos y linfocitos T citotóxicos mediante la secreción de algunas citocinas como $\text{INF-}\gamma$ y $\text{TNF-}\beta$. Los linfocitos Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-9 y IL-13, las cuales son eficientes en la estimulación de los linfocitos B para su diferenciación en células plasmáticas y en la producción de anticuerpos así como en la generación de linfocitos B de memoria. Otra subpoblación de linfocitos CD4 es denominada linfocitos

T reguladores (T_{reg}), los cuales juegan un papel importante en la regulación de la autotolerancia, así como en la supresión de la inmunidad [2, 5, 8].

Los linfocitos T CD8 al reconocer en la superficie celular a las moléculas del MCH de clase I, iniciarán un proceso de destrucción de las células portadoras del antígeno, normalmente células infectadas por virus o células cancerosas. Los linfocitos T citotóxicos llevan a la destrucción de la célula infectada mediante una adhesión estrecha y la liberación de sustancias almacenadas en gránulos preformados. Estos gránulos contienen proteínas, como la perforina, que genera poros en la membrana de la célula permitiendo el paso de agua y electrolitos, induciendo la lisis osmótica. Los gránulos también contienen la enzima granzima, que ingresa a la célula a través de los poros formados en la membrana. Esta enzima tiene la capacidad de inducir la muerte celular mediante la fragmentación del DNA de la célula blanco, induciendo el mecanismo de apoptosis [2, 5].

La otra población de linfocitos que se genera en la diferenciación de las células T vírgenes, son las células T de memoria. Hay, por lo menos, dos tipos de linfocitos T de memoria. Un subtipo son las células efectoras de memoria; estas son de vida corta y migran de manera rápida y efectiva hacia los tejidos blancos para destruir al patógeno. La segunda población está formada por las llamadas células centrales de memoria, que son las células de reserva del sistema inmunológico, las cuales están listas para reaccionar ante una segunda exposición del antígeno por el cual fueron activadas [1, 2, 5].

Las funciones de los linfocitos T, como la migración, la recirculación, la interacción con células y la citotoxicidad, dependen de la expresión de ciertas moléculas en la membrana plasmática. Estas moléculas, llamadas moléculas de adhesión, median las

interacciones de los linfocitos T con las células y con proteínas de la matriz extracelular.

1.3. Moléculas de adhesión

A diferencia de las células que conforman los órganos y tejidos en el cuerpo, las células del sistema inmunológico se encuentran en diferentes partes del cuerpo en dos diferentes estados: como células adherentes y como células no adherentes; esta propiedad está regida por la regulación de la expresión de moléculas de adhesión sobre la membrana plasmática de las células del sistema inmunológico [9, 10]. Las moléculas de adhesión son receptores, que fluctúan entre estados de alta afinidad y baja afinidad hacia sus respectivos ligandos [11]. La principal función de estos receptores es la de adhesión a otras células cuando así lo requieren, sin embargo su papel no está restringido a esta función; también funcionan como reguladores de su propia expresión en la células y como receptores celulares que transducen señales para la comunicación celular. De esta manera las moléculas de adhesión están involucradas en el tráfico celular, interacción célula-célula, sobrevivencia, proliferación, maduración, diferenciación celular y algunos procesos patológicos como el de cáncer [12-16]. Las moléculas de adhesión que se expresan en los linfocitos T pertenecen, principalmente, a tres familias: la familia de las selectinas, la superfamilia de las inmunoglobulinas y la más relevante por su diversidad de funciones, las integrinas [13]. A continuación se hará una breve descripción de sus características y funciones.

1.3.1 Familia de las Selectinas

La familia de las selectinas comprende tres miembros: L-Selectina, expresada sobre leucocitos circulantes, E-Selectina, expresada sobre el endotelio activado y P-Selectina, expresada sobre células endoteliales activadas y plaquetas. Todas tienen una estructura afín; son proteínas transmembranales tipo I que comprenden una región amino terminal homóloga a lectinas dependientes de calcio, seguida de una región tipo factor de crecimiento epidermal (EGF), un número variable de regiones de proteínas reguladoras del complemento, una región helicoidal transmembranal y una cola citoplasmática corta. (Fig. 1a) [11, 14, 16-18]. Las regiones tipo lectina tipo EGF son las que están relacionadas con la unión a su ligando. La unión es dependiente de calcio y facilita la interacción célula-célula mediante la unión de estas regiones a oligosacáridos sialilados o sulfatados relacionados con los antígenos de grupos sanguíneos Lewis A y Lewis X, la molécula PSGL-1 (P-Selectin glycoprotein ligand) y la glicoproteína GlyCAM-1 (glycosylation-dependent cell adhesion molecule type I), que están expresados en las células blanco [15, 17, 18].

El principal papel fisiológico de las selectinas en los leucocitos es mediar la adhesión a las células endoteliales y plaquetas durante un proceso inflamatorio. La L-Selectina de los leucocitos se une a su ligando expresado sobre las células endoteliales de los nodos linfáticos periféricos, además induce su propia expresión sobre las células endoteliales de los órganos inflamados. La L-Selectina junto con la E-Selectina median las interacciones de los linfocitos con el endotelio en la recirculación por la linfa de los linfocitos T vírgenes para el encuentro del antígeno, y la migración de los linfocitos activados hacia sitios de infección e inflamación [19, 20].

La P-Selectina, se encuentra almacenada en cuerpos de Weibel Palade en las plaquetas y células endoteliales. Es distribuida rápidamente en la membrana plasmática bajo la activación por trombina, histamina, leucotrienos o por radicales libres. La E-Selectina se sintetiza y expresa transitoriamente sobre las células endoteliales activadas por citocinas. Tanto la E y P-Selectinas se unen a sus ligandos glicosilados que se expresan sobre la membrana de células mieloides y en subpoblaciones de linfocitos T las cuales median la interacción de las plaquetas y células endoteliales con los linfocitos en los procesos de inflamación [13, 19-21].

La función de adhesión de las selectinas es crucial para las múltiples interacciones que se dan en la respuesta inmune [14].

1.3.2 Moléculas de adhesión de la Superfamilia de las Inmunoglobulinas

Las moléculas de adhesión de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF), son proteínas transmembranales expresadas en una gran variedad de tipos celulares, incluyendo células del sistema nervioso, células endoteliales, epiteliales y del sistema inmunológico. Las proteínas pertenecientes a esta familia median las interacciones célula-célula por interacciones homofílicas; es decir, sus ligandos son moléculas pertenecientes a la misma familia, que se expresan en las células blanco (como el TCR expresado en los linfocitos, se une a las moléculas del MHC, expresados en los macrófagos) [12, 17, 22]. También median la adhesión por Interacciones heterofílicas donde las ICAMs se unen a moléculas diferentes como integrinas, cadherinas, receptores de factores de crecimiento e incluso con componentes de la matriz extracelular [14, 23].

Las proteínas pertenecientes a esta familia se caracterizan por tener regiones tipo inmunoglobulinas, las cuales tienen una estructura característica tipo sándwich, compuesta por dos hojas beta antiparalelas unidas por un puente disulfuro. La mayoría son proteínas transmembranales tipo I, que están conformadas por una región extracelular amino terminal (el cual contiene una o más regiones tipo inmunoglobulina) una región transmembranal y una cola citoplasmática corta. Algunas proteínas pertenecientes a esta familia como las moléculas de adhesión intracelular (ICAMs) contienen en su estructura varias copias de una región repetida de fibronectina (FN) tipo III (Fig. 1b) [12, 24, 25].

Las funciones biológicas de estas moléculas, varían dependiendo de las células en las que se expresan; en el caso de las células del sistema nervioso central, éstas están involucradas en la orientación del axón en el momento de las conexiones neuronales, así como en el establecimiento y el mantenimiento de las mismas. En las células del sistema inmunológico, las moléculas de adhesión de la superfamilia de las inmunoglobulinas median la interacción de los linfocitos T en su migración hacia los nodos linfáticos para su maduración, posteriormente su recirculación por la linfa para el encuentro con el antígeno y el reconocimiento del mismo. En las plaquetas media la adhesión con los leucocitos en un proceso inflamatorio. En el caso de las células endoteliales se ha observado que intervienen en procesos de morfogénesis y cáncer. Así, las moléculas de adhesión de la Superfamilia de las inmunoglobulinas tienen diferentes funciones como la adhesión celular, migración y en algunos procesos patológicos como el cáncer [23, 26, 27]

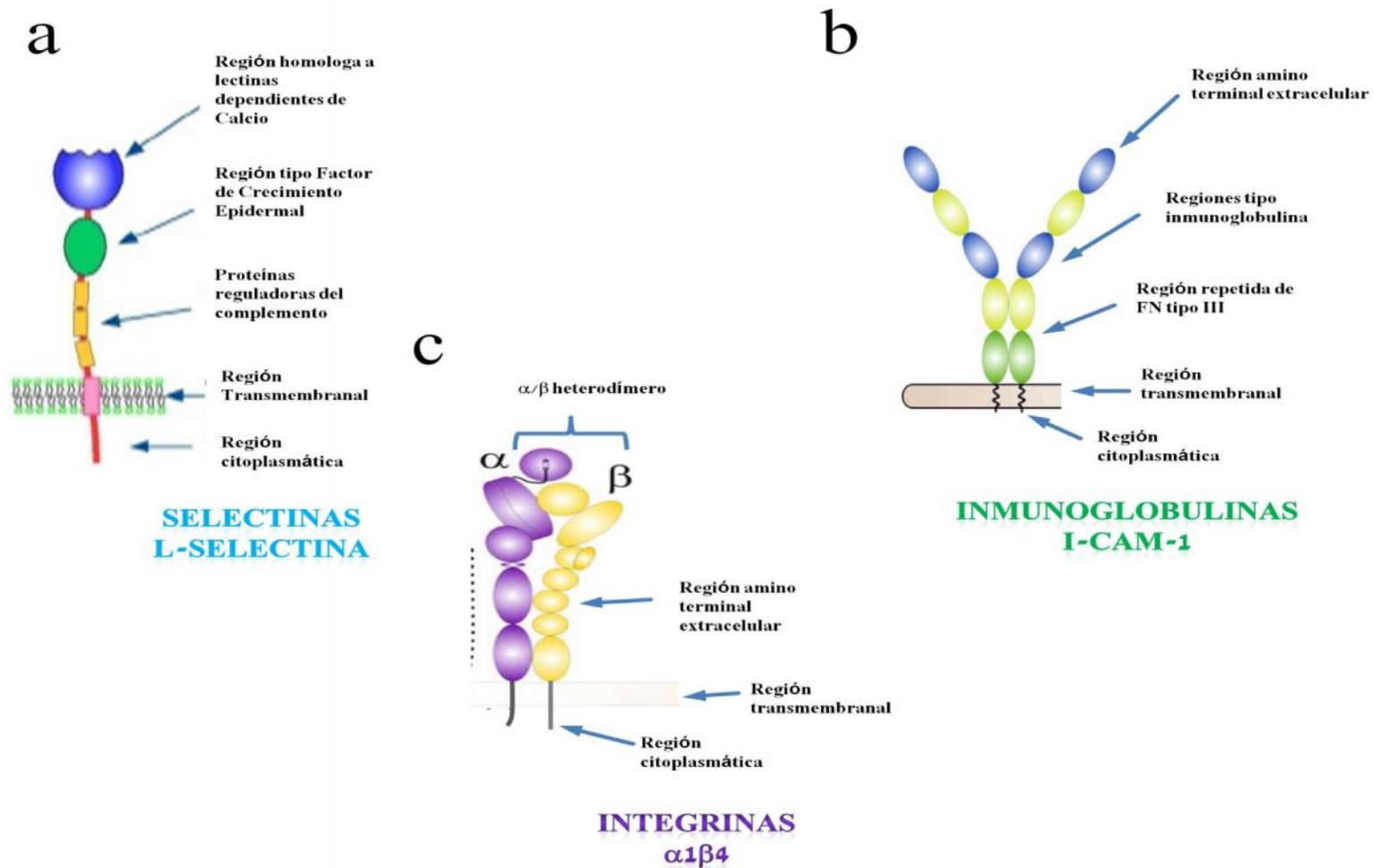


Figura 1. Moléculas de adhesión expresadas en los linfocitos T. **a.** L-Selectina, uno de los tres miembros de esta familia, que se expresa de manera constitutiva en los leucocitos. **b.** ICAM-1 perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas y ligando de algunas integrinas. **c.** Integrina L-FA-1 o $\alpha 1 \beta 2$ que se expresa en los linfocitos T

1.3.3 Integrinas

Las integrinas son glicoproteínas de la superficie celular expresadas en una gran variedad de células, las cuales actúan como receptores de la matriz extracelular y de ligandos expresados en otras células [28-30]. Su función principal es llevar a cabo la interacción con la matriz extracelular y la adhesión célula-célula. Además las integrinas pueden transducir señales bioquímicas a través de sus regiones transmembranales y citoplasmáticas hacia el interior de la célula [31-33]. La unión de la integrina con su ligando está regulada por procesos intracelulares, que son inducidos por receptores de antígenos, quimiocinas o citocinas y cationes divalentes (Ca^{2+} o Mg^{2+}), que desencadenan vías de señalización, conocidas como señalización de adentro hacia afuera, las cuales resultan en cambios conformacionales en la estructura de la integrina, lo que provoca un aumento de la afinidad hacia el ligando (activación) y del agrupamiento de las integrinas en la superficie celular (avidez) [34-36]. Debido a esto, las integrinas no sólo median la adhesión con la matriz extracelular y con otras células, sino también están involucradas en varios procesos celulares como embriogénesis, morfogénesis, apoptosis, diferenciación, migración y metástasis. En el sistema inmunológico juegan un papel crítico en la fagocitosis, la formación de la sinapsis inmunológica, el tráfico de leucocitos, la coestimulación y la señalización [14, 27-30].

1.3.3.1 Estructura general de las integrinas

Las integrinas están constituidas por una subunidad α y una β , unidas de manera no covalente para formar α/β heterodímeros (Fig. 1c). En la actualidad se han identificado 18 subunidades α y 8 subunidades β , que forman 24 α/β heterodímeros con diferentes ligandos y diferente distribución en los tejidos (Fig. 2). Cada subunidad es un

polipéptido transmembranal tipo I, conformado por tres regiones: una región glicosilada extracelular, una hidrofóbica transmembranal y una región citoplasmática corta (Fig. 1 c)[14, 32, 33].

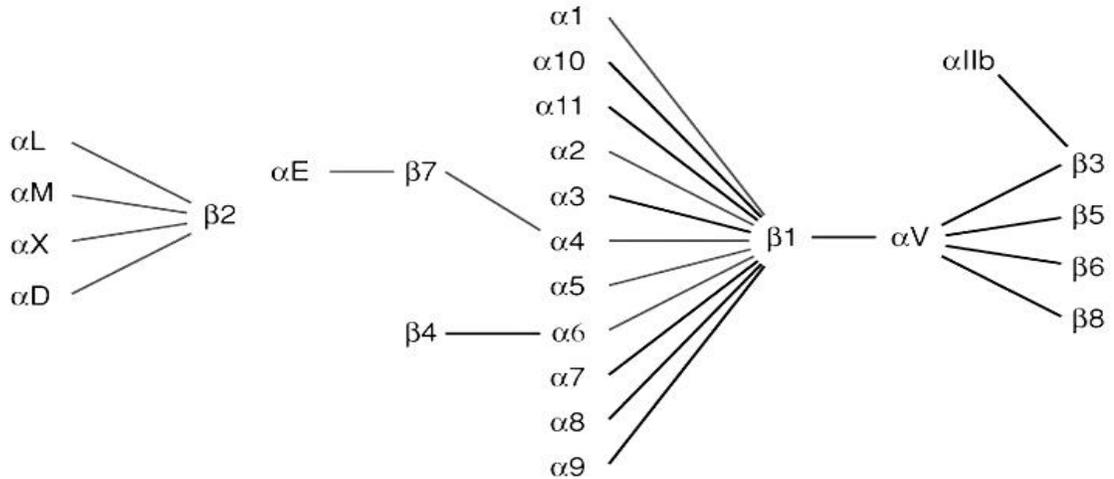


Figura 2. Integrinas que se expresan en mamíferos. 24 α/β heterodímeros que constituyen las Integrinas encontradas en mamíferos. Las integrinas de la familia $\beta 2$ son las que se expresan principalmente en células del sistema inmunológico.

La región extracelular de las integrinas está formada por 12 regiones: 4 de la subunidad α y 8 pertenecientes a la subunidad β (Fig. 3). Las regiones N-terminal de las subunidades α y β forman una cabeza globular donde se encuentra el sitio de unión al ligando, y representan una interfase de unión crítica entre las subunidades α y β [32]. Esta cabeza descansa sobre dos largos tallos o piernas que conectan la región extracelular con la transmembranal y la citoplasmática de la integrina. La región extracelular de las cadenas β es más flexible que la de la cadena α . Debido a esto los cambios conformacionales se llevan a cabo principalmente en la subunidad β [32, 37]. La región transmembranal de ambas subunidades adopta una conformación de α -hélice, es flexible y atraviesa una sola vez la membrana plasmática [32, 33, 37]. La

región transmembranal de la subunidad α se encuentra perpendicular a la membrana plasmática y es una región altamente conservada, mientras que la subunidad β se encuentra de forma inclinada. Ambas subunidades forman una interfase que estabiliza las asociaciones en la porción extracelular de las integrinas [32].

Las regiones citoplasmáticas de las integrinas generalmente son cortas, a excepción de la subunidad β_4 , la cual se une de manera específica a la queratina del citoesqueleto y presenta regiones de fibronectina tipo III [36]. La región citoplasmática de ambas subunidades forman una α -hélice enrollada que parece estabilizar las regiones transmembranales y extracelulares de la proteína [32, 38].

Varios estudios sobre la estructura de las integrinas apoyan los resultados encontrados de la existencia de dos estados conformacionales de las integrinas: uno donde la cabeza globular (formada por las regiones extracelulares de las cadenas α y β) se encuentra de cara hacia la membrana plasmática y los tallos están doblados. Este estado es conocido como inactivo o de baja afinidad a su ligando (Fig. 4a) [32, 33]. El otro estado es donde los tallos se encuentran completamente extendidos, lo que permite que la cabeza globular se encuentre de cara al espacio extracelular, de esta manera se favorece la interacción de la integrina con su ligando. A esta conformación se le conoce como activa o de alta afinidad (Fig. 4b). Reportes sobre las estructuras cristalizadas de las integrinas con su ligando, unido o sin él, sugieren que los cambios conformacionales se pueden encontrar en estados de transición o en equilibrio en condiciones fisiológicas [32, 36].

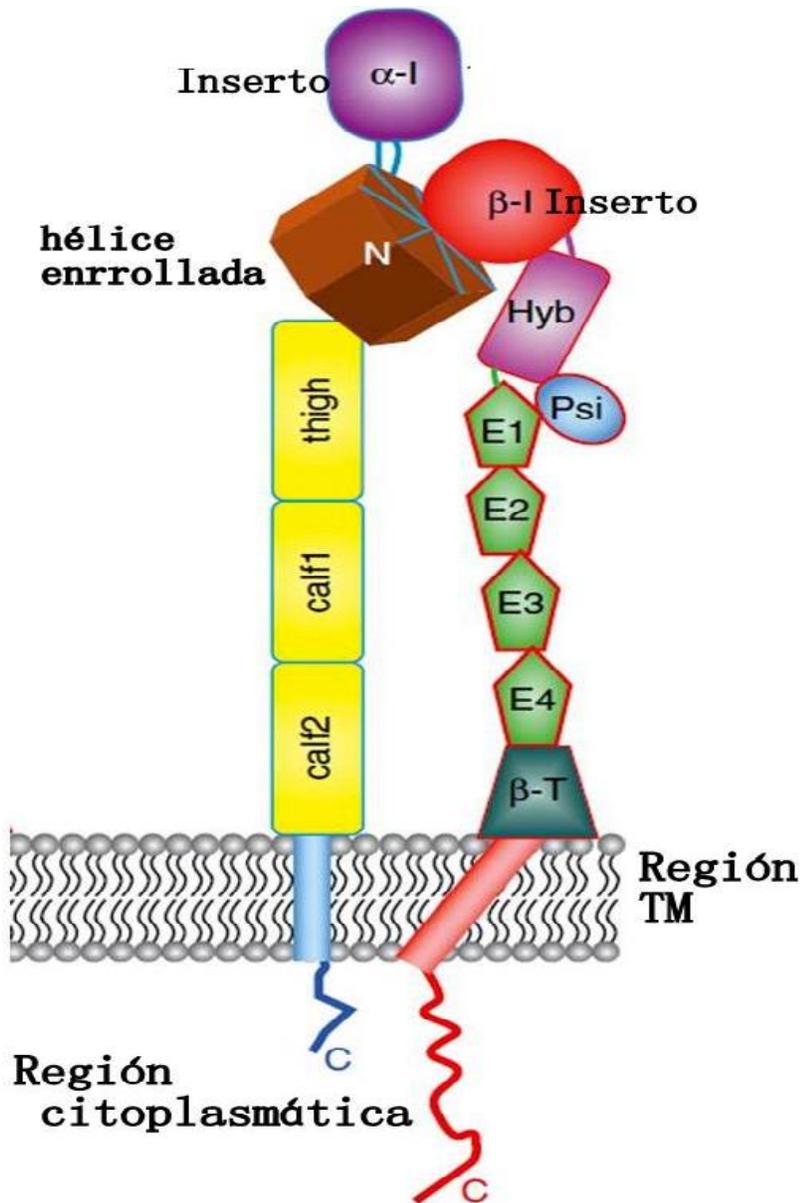


Figura 3. Estructura general de las integrinas. Heterodímero formado por las subunidades α y β donde se muestran las 4 regiones pertenecientes a la subunidad α : una hélice enrollada donde se encuentra insertada la región α -I, una región denominada thigh que conecta a la cabeza globular con las porciones C-terminal de la región extracelular de la subunidad α denominados calf1 y calf2, los cuales conectan a la región transmembranal y la cola citoplasmática de la subunidad α . La subunidad β presenta 8 regiones: una región híbrida donde se encuentra la región β -I, seguida de una región PSI (plexina-semaforina-integrina), cuatro regiones ricas en cisteína que son regiones tipo factor de crecimiento epidermal (EFG) y una cola beta que se conecta con la región transmembranal y citoplasmática de la subunidad β

La característica más inusual de las integrinas es que pueden cambiar de un estado de baja afinidad a su ligando a uno de alta afinidad (activación), en una escala menor de tiempo a un segundo, por estímulos generados desde el exterior de la célula. Esto permite que el interior y exterior de la célula estén unidos físicamente y que se puedan transmitir señales bioquímicas y mecánicas a través de la membrana [32, 36-39].

Desde el primer estímulo que experimenta la célula, se van a generar señales intracelulares que tienen como propósito la generación de segundos mensajeros, la liberación de calcio intracelular y, con ello, la reorganización del citoesqueleto, lo que permite la conexión entre la α -actina, vinculina o talina con las colas citoplasmáticas de las integrinas, específicamente con la porción citoplasmática de la subunidad β [39-41]. Estudios sobre estos cambios provocados en la estructura de las integrinas han revelado que la unión de la talina con las colas citoplasmáticas de la subunidad β rompen un puente salino que está formado en la región citoplasmática de la subunidad β y de la subunidad α , lo que permite que se dirijan cambios hacia las zonas transmembranales y que se rompa la asociación de los tallos que se encuentran en su conformación doblada, resultando así en su extensión y exposición del sitio de unión del ligando. Así, las piernas quedan extendidas, lo que favorece la orientación de la cabeza globular hacia el espacio extracelular [32, 38, 41].

En muchas integrinas se presenta una región insertada de 200 aminoácidos aproximadamente, dentro de la subunidad α . A esta región se le denomina α_I o factor de von Willebrand. Esta región es el principal sitio de unión al ligando en las integrinas que lo presentan [32, 33, 38]. La estructura de la región α_I es parecida a una GTPasa en donde el sitio catalítico es remplazado por un sitio llamado MIDAS (metal ion independent adhesión site). En este sitio, cationes divalentes (Mg^{2+} , Mn^{2+}) se coordinan

con una molécula de agua cuando el sitio de unión al ligando está libre, de la misma manera que el Mg^{2+} se coordina con el γ -fosfato del GTP en las proteínas G [32, 33, 36, 38]. Cuando el ligando se une a la integrina, residuos ácidos pertenecientes al ligando desplazan a la molécula de agua, de manera que los cationes divalentes presentes en el sitio MIDAS, ahora se coordinan con el residuo ácido del ligando, de esta manera se estabiliza la unión con la integrina [32, 38].

En el resto de las integrinas que carecen de la región αI , se presenta una región homóloga encontrada en la subunidad β denominada $\beta-I$. Esta región es muy parecida, estructuralmente hablando, a la αI , por lo que la unión al ligando es muy similar. Sin embargo la región $\beta-I$ no solamente participa en la unión al ligando de las integrinas que carecen de la región αI , sino que también está involucrada en la estabilidad de la formación del heterodímero α/β y en la regulación de la unión al ligando de las integrinas que presentan ambas regiones [32, 38].

Los residuos ácidos que participan en la coordinación con el sitio MIDAS generalmente son el ácido glutámico (que se encuentran en la secuencia RGD y LVD) o el ácido aspártico que se puede encontrar en otras proteínas. Debido a que estos residuos son muy conservados en las proteínas, las integrinas tienen una gran diversidad de ligandos como proteínas de la matriz extracelular (fibronectina, vitronectina y el colágeno) o proteínas de la membrana celular como las IgCAMS y las cadherinas [32, 41, 42].

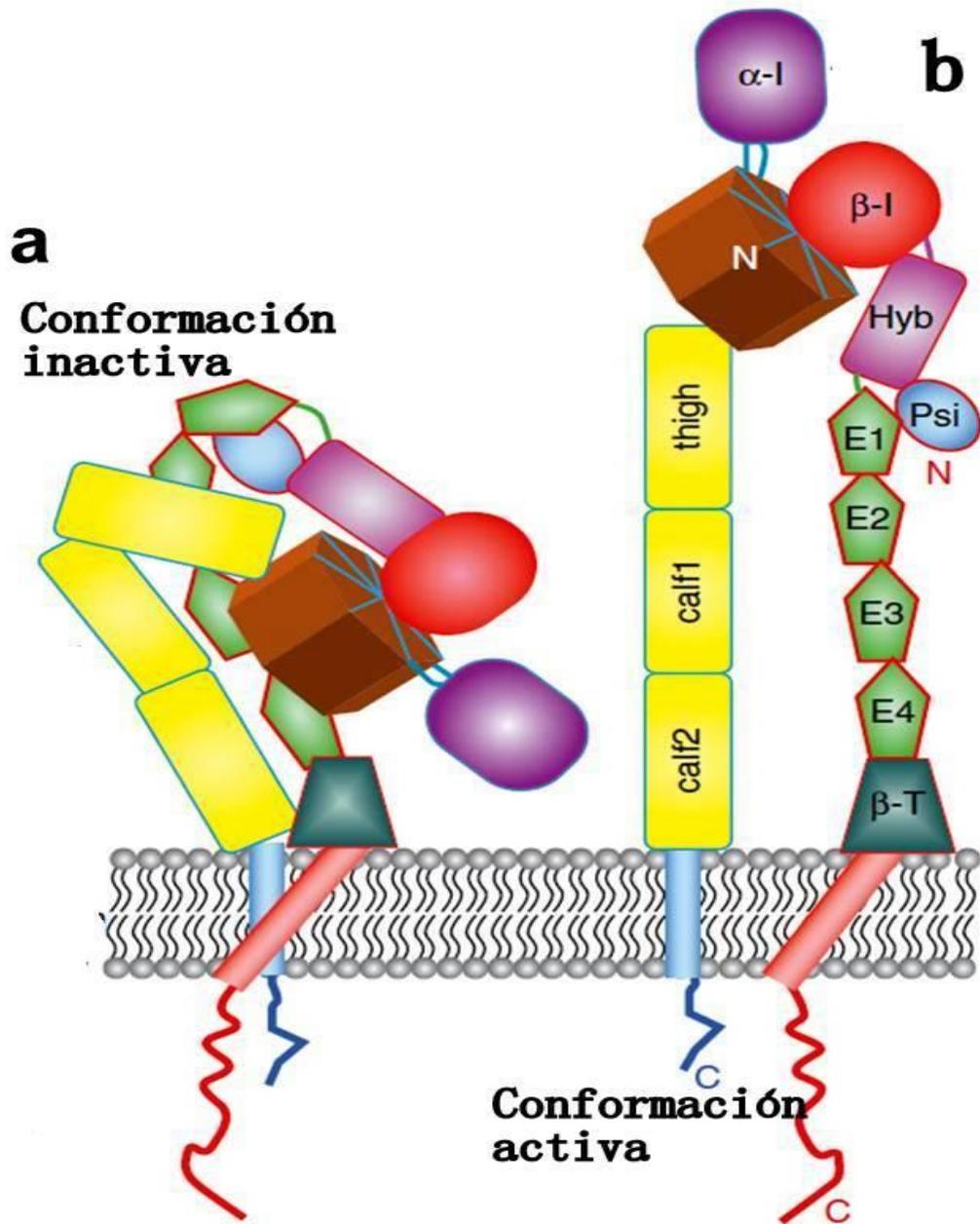


Figura 4. Estados conformacionales de la estructura de las integrinas. a. Conformación inactiva. La porción N-terminal del heterodímero, donde se forma la cabeza globular se encuentra orientada hacia la membrana plasmática por lo que el sitio de unión al ligando, (región α -I o β -I) no puede unirse a su ligando. b. Las regiones transmembranales y citoplasmáticas de ambas subunidades se encuentran separadas, lo que provoca la extensión de las zonas extracelulares y permite que los tallos o piernas se extiendan completamente de manera que la cabeza se orienta hacia el espacio extracelular y el sitio de unión queda expuesto para la interacción con el ligando.

Además del reconocimiento de los residuos ácidos en los ligandos de las integrinas, esta unión depende de cationes divalentes como el Mg^{2+} y el Ca^{2+} . La función del Mg^{2+} está implicada en la coordinación que se realiza entre el catión y el residuo ácido del ligando en el sitio MIDAS. Varios estudios muestran que en la mayoría de las integrinas, el Ca^{2+} tiene tanto efectos reguladores positivos como negativos. Altas concentraciones de Ca^{2+} inhiben la adhesión, mientras que bajas concentraciones de Ca^{2+} , junto con óptimas concentraciones de Mg^{2+} , potencializan la adhesión a su ligando. Esto es debido a que el Ca^{2+} tiene dos sitios de unión; uno adyacente al sitio MIDAS (ADMIDAS) que es el responsable de los efectos inhibitorios del Ca^{2+} porque compite de manera alostérica con el Mg^{2+} y otro que se encuentra cercano al sitio MIDAS, el cual se conoce como LIMBS (ligand-induced metal ion-binding site) cuya función consiste en mediar los efectos sinérgicos a bajas concentraciones del Ca^{2+} [33, 36, 41].

Para que ocurran todos los eventos descritos, la célula tiene que ser estimulada de manera externa, desencadenar una serie de señales intracelulares que dirigen los cambios realizados en las regiones citoplasmáticas de las integrinas, los cuales son transmitidos hacia su región frontal y terminan con el cambio de conformación de la integrina para activarla. Estas señales intracelulares que se desencadenan por un estímulo externo son referidas como señalamientos de adentro hacia afuera o “inside out signaling” [29, 30, 37, 41].

1.3.3.2 Señalización de adentro hacia afuera “inside out signaling”.

Las interacciones de adhesión de las células del sistema inmunológico son usualmente dinámicas y transitorias. Un alto grado de flexibilidad en la adhesión y movilidad de las células inmunes se requieren para cubrir el amplio rango de funciones del sistema

inmunológico, lo que incluye su respuesta inmediata ante un evento inflamatorio, de daño a un tejido o la entrada de un agente infeccioso [28, 43]. Los leucocitos se encuentran viajando por el torrente sanguíneo en un estado no adherente; al responder a un estímulo como un agente quimiotáctico, citocinas inflamatorias o un antígeno, los leucocitos pueden adherirse a otras células en cuestión de segundos. Esto les permite migrar hacia los sitios donde son requeridos y llevar a cabo su función efectora. Este proceso de activación de los leucocitos para responder de manera tan rápida y efectiva se debe a la habilidad de las integrinas de alterar su afinidad hacia su ligando y su avidéz mediante señales intracelulares denominadas “inside out signaling” o señalización de adentro hacia afuera [28, 44].

La señalización de adentro hacia afuera es definida como todos aquellos eventos que inducen los cambios conformacionales en las integrinas que dirigen el aumento en la afinidad hacia su ligando (activación de las integrinas) y el agrupamiento de las integrinas en la membrana plasmática (avidéz de las integrinas), que en conjunto resultan en la regulación de la adhesión a las proteínas de la matriz extracelular y la adhesión célula–célula [45].

La señalización de adentro hacia afuera es común para varias integrinas expresadas en diferentes tipos celulares. Comienza con un estímulo generado principalmente por agentes quimiotácticos como: ADP, tromboxano, leucotrienos, el factor de activación plaquetaria, C5a, fMLP ó citocinas quimiotácticas, los cuales generalmente son agonistas de receptores acoplados a proteínas G. Los receptores acoplados a proteínas G desencadenan señales que activan a la fosfolipasa C (PCL), esta activación provoca la hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5-bifosfato que genera la producción de segundos mensajeros como el diacilglicero (DAG), el 1,4,5-trifosfato (IP₃)

y la liberación de calcio intracelular. En monocitos el incremento de Calcio intracelular se requiere para la activación de las integrinas $\alpha 4$; y en linfocitos se ha observado que es necesario para activar factores de intercambio del nucleótido de guanidina (GEFs). Los GEFs como el CalDAG-GEF activan a las GTPasas de la familia Ras (H-Ras, Rac, Rap1 y R-Ras), las cuales regulan la afinidad de las integrinas $\beta 2$ y $\beta 1$. También el incremento de Ca^{2+} favorece un rearrreglo del citoesqueleto que promueve la unión de proteínas como la talina y la actina a las colas citoplasmáticas de las integrinas, lo que provoca su activación [28, 43, 45, 46].

Por otro lado, también se ha visto que los receptores acoplados a proteínas G activan la vía de la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3-K), que está asociada con la activación de los receptores de quimiocinas y factores de crecimiento. Se ha observado que la activación de PI3-K en mastocitos aumenta la afinidad de las integrinas $\alpha 5\beta 1$. En células metásticas de cáncer de mama, aumenta la migración y adhesión por medio de la estimulación de los receptores EGFR que pertenecen a la familia de receptores de crecimiento dependientes de PI3-K [28, 46]. Con respecto a los linfocitos T, la señalización de adentro hacia afuera se ha visto que es activada principalmente por quimiocinas como CCL21, CXCL12, y CXCL13 que se encuentran localizadas sobre la superficie apical del endotelio. Las señales desencadenadas por los receptores de estas citocinas aumentan la avidéz de las integrinas $\alpha L\beta 2$ y la afinidad de la integrina $\alpha 1\beta 4$.

En estudios sobre las vías de señalización que activan a las integrinas y las moléculas que participan en ellas, se observó que receptores acoplados a proteínas G participaban en la señalización de adentro hacia fuera. Además, diversos estudios sugieren que las GTPasas de la familia Ras juegan un papel crucial en la regulación de

la activación de las integrinas. Por lo que es importante revisar las funciones y características de estas proteínas.

1.4. GTPasas de la familia Ras

Las proteínas G de bajo peso molecular (LMWGP) comprenden un grupo de proteínas muy relacionadas a nivel funcional y estructural que responden a la activación de diferentes receptores expresados en la superficie celular [47]. Esta familia de proteínas consiste en más de 150 miembros, los cuales están involucrados en una gran variedad de funciones celulares como crecimiento celular, tráfico intracelular, migración y apoptosis [48, 49]. Debido a que Ras fue la primera proteína descrita en su clase y ha sido la más estudiada dentro de esta familia, este grupo de proteínas es generalmente referido como la superfamilia Ras. Esta gran familia se encuentra dividida en 6 subfamilias por sus características estructurales. La subfamilia Ras que incluye las proteínas: H-Ras, K-Ras, M-Ras, N-Ras, Rap y Rheb. La subfamilia R-Ras que incluye R-Ras, TC21 y M-Ras. La subfamilia Rho/Rac que incluye a Ral y Cdc42. Y las subfamilias Rab, Sar1/Arf y Ran. Aunque todavía no son del todo claras las funciones de todos los miembros de la superfamilia Ras, todos parecen tener funciones similares y redundantes entre sí. Los miembros mejor caracterizados de la subfamilia Ras son H-Ras, K-Ras, M-Ras y N-Ras, estas proteínas comparten un 85% en homología y son las que resultan mutadas en varios cánceres humanos [47-49].

Las proteínas de la familia Ras tiene un tamaño de 20 a 29 KD y todas ellas tienen en común un motivo de unión a GTP y otro a GDP, una región altamente conservada en su carboxilo terminal (motivo CAAX) y una región hipervariable. El motivo CAAX es esencial para la actividad de estas proteínas, debido a que en él se encuentra una

secuencia señal de prenilación que va a localizar a las proteínas Ras en la membrana plasmática.

Estas proteínas tienen actividad enzimática que hidroliza al GTP en GDP y fósforo inorgánico. Al mismo tiempo funcionan como interruptores celulares, que pasan de un estado inactivo a uno activo favorecido por su unión a GTP. La unión a GTP induce cambios conformacionales que exponen sitios de unión a moléculas afines a ellos y elevan su afinidad por ellas. Esta unión desencadena diversas vías de señalización intracelulares, las cuales son las responsables de diferentes procesos. La regulación de su función como interruptores en las vías de señalización depende de la hidrólisis de GTP a GDP, la cual está catalizada por dos clases de proteínas auxiliares: los factores de intercambio del nucleótido de guanina (GEFs), que promueven la liberación de GDP y la captura de una molécula de GTP, y las proteínas activadoras de las GTPasas (GAPs), las cuales estimulan la actividad intrínseca de la hidrolasa para hidrolizar el GTP a GDP (Fig. 5). De esta manera las GTPasas de la familia Ras pueden cambiar de un estado inactivo a un estado activo estimulado por factores como los GEFs o las GAPs [47-51].

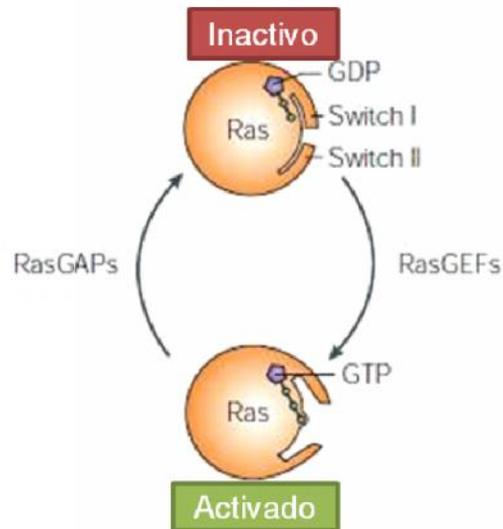


Figura 5. Estados conformacionales de las GTPasa de la familia Ras. Las GTPasas presentan dos estados conformacionales. Uno unido a GTP que es favorecido por los factores del intercambio del nucleótido de Guanina (GEFs) que promueve la liberación de una molécula de GDP y captura una molécula de GTP, al cual se le conoce como su estado activado o encendido. La molécula de GTP capturada es hidrolizada a GDP ayudada por las proteínas activadoras de las GTPasas, lo que favorece el estado apagado o inactivo de la proteína.

Las GTPasas de la familia Ras comenzaron a ser sujetos de estudio cuando se descubrió que los genes que las codifican se encuentran mutados en cánceres humanos con una frecuencia de 30 %. En todos los casos la mutación resultaba en la activación de la GTPasa [52]. Estos resultados dieron indicios sobre cuál es la función de las GTPasas de la familia Ras.

Estudios llevaron al descubrimiento de que Ras participa en transducción de señales desde la superficie celular a partir de la activación de receptores tirosina cinasa que dirige al reclutamiento de GEFs, los cuales activan Ras. Ras activada lleva a la activación de Raf-1 y subsecuentemente a la activación de MEK y de ERK. ERK activada es entonces traslocada al núcleo, donde fosforila a factores de transcripción como Elk-1, para promover la proliferación celular [48-51]. Estudios posteriores indican que las proteínas Ras participan además en otras vías de señales intracelulares, que

desencadenan diferentes respuestas celulares: como ciclo celular, crecimiento, diferenciación, migración y adhesión celular. Dentro de las funciones de migración y adhesión celular la familia Ras ha mostrado participar en la regulación de la activación de las integrinas mediante su participación en la señalización de adentro hacia afuera, la primera GTPasa de esta familia que mostró esta función fue R-Ras.

1.4.1 R-Ras (del inglés Related Ras)

La subfamilia R-Ras está conformada por tres miembros que son R-Ras, TC21 (R-Ras2) y M-Ras (R-Ras3). Todos comparten una homología del 50-55% en su secuencia con las proteínas clásicas de Ras. Esta subfamilia ha mostrado promover el crecimiento, transformación y la alteración de la diferenciación celular, en su forma activa [53].

R-Ras, el miembro más estudiado de esta familia, es una GTPasa con una masa molecular de 23 KDa. Fue aislada originalmente por hibridación de baja exigencia al usar una sonda viral de H-Ras. Como resultado de esto, se encontró que el gen de R-Ras codifica para 218 aminoácidos y muestra una homología de 55% en su secuencia con H-Ras, por lo que se clasificó dentro de la familia Ras [54]. Como todas las GTPasas, R-Ras presenta una región de unión a GTP y otra a GDP que son referidas como Switch I y Switch II, respectivamente. El Switch I es parte del llamado loop efector que permite la unión de varias moléculas, cuando la GTPasa se encuentra unida a GTP [47, 55]. Estas regiones son muy conservadas en las GTPasa de la familia Ras, debido a ello varias moléculas efectoras de Ras interaccionan con R-Ras [56-58]. A pesar de ello R-Ras es una de las GTPasa que presenta grandes diferencias entre las proteínas típicas de Ras. R-Ras es la única que presenta en su N-terminal una extensión de 26

aminoácidos y en su carboxilo terminal modificaciones postraduccionales de palmitoilación y geranil-geranilación, las cuales están asociadas con su localización en la membrana plasmática [47, 55, 59-62]. Además presenta una región rica en glicina y prolina que permite unirse a regiones SH3 en proteínas blanco como Nck [60, 63-65].

Se ha observado que cerca de 30 % de los tumores humanos presentan mutaciones puntuales en la secuencia de las proteínas Ras, estas mutaciones son, predominantemente, localizadas cerca del sitio de unión del nucleótido. De hecho las mutaciones más comunes están en las posiciones 12, 13 y 61 de la estructura primaria de la proteína. Mutaciones análogas en R-Ras en la posición 38 y 87 de su secuencia resultan en una proteína constitutivamente activa y muy transformante [58, 59, 66]. Las mutaciones en las posiciones 41 y 43 resultan en una proteína dominante negativa. Las mutaciones constitutivamente activas de estas GTPasas las hacen insensibles a la estimulación de las GAPs, por lo que no son capaces de liberar GTP, debido a ello siempre están activadas y señalizando hacia el interior de la célula. En el caso de las mutantes dominantes negativas, la mutación favorece la formación de complejos inactivos con los GEFs-GTPasas, por lo que inhibe la activación de la GTPasa. Esto lleva finalmente a la pérdida de la función de la proteína [67, 68]. El uso de estas mutantes en el estudio de R-Ras ha sido de gran ayuda para determinar algunas de las funciones que R-Ras desempeña.

R-Ras comenzó a ser sujeto de estudio debido a su homología con las proteínas clásicas de Ras, además de que mostró tener propiedades oncogénicas en varios tipos celulares [58, 69, 70]. La mutante constitutivamente activa de R-Ras promueve la migración y transformación de células de epitelio de mama y tiene un efecto transformante en células NIH 3T3 y 32D [66, 69]. Además parece inducir la

proliferación de células epiteliales independientes de estrógenos y el crecimiento de tumores en células de cáncer cervico-uterino [71, 72]. En células EpH4 la mutante activa R-Ras-38V tiene efectos transformantes a través de la señalización TGF- β . Aunque no se han descrito mutaciones en cánceres humanos, en un estudio con células de pacientes con cáncer gástrico R-Ras mostró ser indispensable para la adhesión y sobrevivencia de las células [73, 74].

Por otro lado, en una línea celular de linfocitos B que depende de IL-3 para su sobrevivencia, la expresión de la mutante constitutivamente activa de R-Ras 87L inhibió el proceso de apoptosis cuando IL-3 fue retirada del medio [70]. Posteriormente se demostró que R-Ras inhibe el proceso de apoptosis mediante la participación del factor insulínico IGF-I para activar las vías Raf-Erk y PI3K-Ark [75, 76]. Además en mioblastos la expresión de la mutante activa de R-Ras disminuyó la muerte celular y promovió la diferenciación de estas células mediante la inducción de la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-xL y la activación de la cinasa Ark [77].

En contraste con estos resultados, en células 32D, al transfectar la mutante constitutivamente activa 38V, las células mostraron tener una mayor velocidad de muerte celular y al cotransfectar la proteína antiapoptótica Bcl2, se inhibió el proceso de apoptosis [78]. Este fue uno de los primeros indicios que llevan a suponer que las funciones de R-Ras dependen del tipo celular en el que se exprese.

Otras de las funciones celulares donde R-Ras se ha visto involucrada es en el proceso de morfogénesis. En células endoteliales de la arteria coronaria, la expresión de R-Ras favoreció la reparación de los vasos por medio de la morfogénesis y la reparación de las uniones entre éstas células. Además al inhibir la función de la GTPasa aumentaba la permeabilidad de la capa celular de células en cultivo. Esto sugiere que R-Ras es

indispensable para mantener la barrera endotelial [79]. Consistente con estos resultados, ratones knockout para R-Ras, mostraron deficiencias en la barrera endotelial, lo que permitió la migración de tumores y la disminución de las uniones entre las células endoteliales. Al introducir el cDNA de la mutante activa 38V de R-Ras a los ratones, se observó que los vasos se restauraban promoviendo la morfogénesis de las células endoteliales de los vasos [80]. En neuronas, R-Ras estimula la polarización de la célula durante la especificación del axón y media la formación de microtúbulos lo que favorece la morfogénesis y el desarrollo de neuritas [81]

De esta manera R-Ras ha mostrado estar involucrada en procesos celulares, como la adhesión, la migración, la extensión celular, el cáncer, la apoptosis y la morfogénesis y diferenciación celulares. De todas las funciones descritas hasta ahora para R-Ras en las que se ha visto más implicada son las mediadas por las integrinas.

Zhang y colaboradores demostraron que al transfectar la mutante activa 38V de R-Ras en células no adherentes, estas células se adhirieron a matrices de fibronectina y vitronectina, y al transfectar la mutante dominante negativa de R-Ras, disminuía la adhesión de células CHO. Este fue el primer reporte donde se observó la participación de R-Ras en la adhesión celular [82]. En un estudio posterior se observó que al realizar mutaciones en la parte del loop efector de la mutante activa 87L de R-Ras, las células perdieron su función al adherirse a fibronectina [70]. En líneas celulares de glioblastoma se observó que la adhesión de estas células está regulada por el receptor EpHB2. Este receptor induce la fosforilación de R-Ras en su loop efector, lo cual modifica la afinidad de las integrinas y reduce la adhesión de estas células [83-85]. Por otro lado, en células HeLa R-Ras colocaliza en la periferia de la membrana con proteínas que participan en la formación de los contactos focales, induciendo así la

adhesión celular [86]. Y en células endoteliales R-Ras promovió la adhesión de estas células a monocitos, evento que se lleva a cabo en procesos inflamatorios crónicos [87].

La microinyección de la mutante activa de R-Ras en una línea celular de neuronas promovió la extensión celular y en neuronas de ratones en estado embrionario, aumentó la extensión celular sobre colágeno para la formación de neuritas [88, 89]. Por otro lado en células de cáncer cervicouterino, R-Ras aumentó la extensión celular sobre matrices de colágeno [71]. En células de mieloma humano, la introducción de siRNA de R-Ras inhibió la extensión celular y migración [90]. Y en células NIH3T3, se observó que la localización de R-Ras en la periferia de la membrana plasmática dependía de la señal de prenilación y geranyl-geranilación que se encuentra al final de la secuencia de la proteína, y que esta localización favorece la formación de los contactos focales por lo que aumenta la extensión de la célula [62]. También, R-Ras ha mostrado aumentar la migración de células epiteliales de cérvix y de cáncer de mama a través de colágeno. Mientras que en mioblastos, R-Ras promueve la migración favoreciendo la diferenciación de las células. Este proceso es dependiente de la vía PI3K [71, 77, 91]. Los reportes descritos arriba sugieren que las funciones mediadas por R-Ras son múltiples y varían dependiendo del tipo celular.

Los procesos celulares de extensión, adhesión y migración celular son indispensables para que se lleve a cabo la comunicación celular, morfogénesis, diferenciación celular y la ubicación de las células en el sitio adecuado donde llevan a cabo su función. Estos procesos celulares son mediados por moléculas de adhesión como las integrinas y la participación de R-Ras en estos procesos celulares, hace pensar que R-Ras está involucrada en la regulación de la activación de las integrinas. En varios estudios se

describe que R-Ras activa a las integrinas de las células que lo expresan. Por ejemplo, en células epiteliales de mama, las integrinas $\alpha 2\beta 1$ son las responsables de mediar la migración a través de colágeno, en estas células la expresión de R-Ras aumentó la migración celular mediante la activación de las integrinas $\alpha 2\beta 1$ [91]. En fibroblastos transfectados con $\text{tac-}\beta$, un inhibidor de integrinas se observó que se inhibe la extensión celular. Al cotransfectar a la mutante activa de R-Ras se restauró la extensión de estas células [92]. En mastocitos, al transfectar R-Ras 38V se incrementa la adhesión a fibronectina por medio de las integrinas $\alpha 5\beta 1$ [93]. También, al activar la vía de señalización Notch1 se observó que aumenta la activación de las integrinas $\beta 1$ donde se demostró que participa R-Ras por la vía Notch1 [94]. En otro estudio, mediante un sistema de doble híbrido, se identificó una nueva proteína, la filamina A, la cual, al interactuar con R-Ras, media los efectos que tiene sobre las integrinas $\alpha 5\beta 1$ ya que aumenta la adhesión de las células y activa la migración sobre fibronectina [95]. En células endoteliales se observó que la activación de las integrinas $\beta 1$ aumenta la adhesión a monocitos, dicha activación es modulada por la expresión de R-Ras [87]. En conjunto, estos estudios muestran que R-Ras afecta directamente la activación de las integrinas en varios tipos celulares. Sin embargo, no es del todo claro si existe una interacción directa con las integrinas. En estudios recientes se ha reportado que la localización de R-Ras en la periferia de la membrana forma un complejo con RIN2 y Rab5 en la zona de adhesiones nacientes para controlar el tráfico de las integrinas $\beta 1$ [96]. Se ha observado también que R-Ras se activa en la membrana plasmática, donde colocaliza con proteínas del citoesqueleto, como la talina y la vinculina. Estas son las proteínas responsables de la activación de las integrinas [80, 86]. En conjunto estas

observaciones sugieren un probable mecanismo por el cual R-Ras active a las integrinas: Primero, mediante su señal de prenilación y geranyl-geranilación se localizará en la membrana plasmática, donde parece ser que es activada. Posteriormente forma un complejo con RIN y Rab5, lo que favorece el reciclaje de las integrinas, aumenta su agrupación en la membrana plasmática y su activación mediante la vinculina y la talina, de esta manera permite, la formación de contactos focales, la formación de ondulaciones de la membrana y la formación de la filipodia [62, 86, 96-98].

A pesar de que las funciones de R-Ras se han descrito para varios tipos celulares, en células inmunológicas hay muy pocos reportes sobre la participación de R-Ras en la activación de integrinas. En macrófagos R-Ras aumentó la capacidad fagocítica mediada por la integrinas $\alpha_M\beta_2$, y en células progenitoras hematopoyéticas, R-Ras mostró regular de forma negativa la migración celular [88, 93, 99]. En células dendríticas R-Ras está involucrada en su maduración y es indispensable para la interacción entre las células dendríticas y los linfocitos T CD4, así como también afecta el número la proliferación de linfocitos T reguladores.[100, 101].

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

R-Ras participa en procesos celulares como diferenciación, migración, extensión celular y del cáncer. Estas funciones están relacionadas con la participación de R-Ras sobre la activación de las integrinas. Sin embargo no es del todo claro cómo es que R-Ras está involucrada en la activación de las integrinas. En el caso específico de los linfocitos T los cuales son cruciales en la comunicación entre las células de la respuesta inmunológica innata y adaptativa, no hay ningún reporte que sugiera la participación de R-Ras sobre la activación de las integrinas expresadas en estas células. Por lo que nos planteamos la posibilidad de que R-Ras active las integrinas expresadas en los linfocitos

III. HIPÓTESIS

R-RAS ACTIVA INTEGRINAS EXPRESADAS EN LINFOCITOS T

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar la activación de integrinas en células Jurkat transfectadas con plásmidos que codifican para las diferentes mutantes de R-Ras.

Objetivos Particulares

- Construir plásmidos que codifiquen el gen para la proteína silvestre (wt), sus diferentes mutantes constitutivas activas y dominantes negativas de R-Ras.
- Determinar las condiciones ideales para la transfección de las células Jurkat, evaluar la expresión de la proteína verde fluorescente y determinar la eficiencia de la transfección.
- Identificar las integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ totales expresadas a nivel basal en los linfocitos T mediante anticuerpos monoclonales.
- Determinar la activación de las integrinas en células transfectadas con los plásmidos de R-Ras, mediante citometría de flujo.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales.

5.1.1 Anticuerpos.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos: el anticuerpo monoclonal anti-integrina $\beta 1$ (TS2/16) que fue donado gentilmente por el Dr. Martin Hemler del Instituto de Investigación de Cancer Dana Faber (Boston, MA). El anticuerpo monoclonal anti-integrina $\beta 2$ (IB4), este fue donado por el Dr. Eric J. Brown de la Universidad de California (San Francisco, CA). El anticuerpo anti integrina $\beta 1$ activada (15/7), el cual fue un regalo del Dr. Ted Yednock. Elan pharmaceuticals. Inc. (San Francisco, CA). El anticuerpo anti- integrina $\beta 2$ activada (CBRM1/5) fue donado por el Dr. Tomothy Springer de la Escuela de Medicina de Harvard (Boston, MA)

El anticuerpo secundario goat anti-mouse conjugado con Alexa 647 se obtuvo de invitrogen (Grand Island, NY).

5.1.2 Enzimas.

Se utilizaron las siguientes enzimas de restricción Eco RI, Bam HI, XhoI, Hind III y Bgl II, Las enzimas, Taq DNA polimerasa, Fosfatasa alcalina (CIAP) y la T4 DNA ligasa. Los marcadores de ácidos nucleicos (100 pb DNA ladder y λ DNA/Hind III Fragments). Enzimas y marcadores se obtuvieron de Invitrogen (Grand Island, NY).

5.1.3 Plásmidos.

Los plásmidos que codifican para la GTPasa R-Ras en sus formas mutantes y silvestre: R-Ras wt, R-Ras 38V, R-Ras 43N, R-Ras 87L, fueron clonadas en el plásmido retroviral pZIPNeoSV(X)1. Estas construcciones fueron donadas por la Dra. Adrienne D. Cox (University of North Carolina).

El plásmido pIRES-hrGFP-1a, que tiene como característica ser un plásmido bistrónico, es decir, transcribe para la proteína GFP y el gen insertado de manera simultánea e independiente; fue donado amablemente por la Dra. Diana Escalante del Instituto de Fisiología de la UNAM.

5.1.4 Células.

La línea celular Jurkat es derivada de células extraídas de sangre periférica de un niño de 14 años y nombradas originalmente JM [102]

La línea celular Jurkat se mantuvo en medio RPMI-1640, suplementado con suero fetal bovino al 10%, L- glutamina 20 μ M, penicilina 50 U/mL y estreptomina 50 μ g/mL. En una atmósfera de CO₂ al 5% y 37°C. Todos los reactivos utilizados en el mantenimiento de las células Jurkat son de Gibco BRL (Grand Island, NY)

5.1.5 Bacterias.

Las cepas que se utilizaron fueron las *E. coli* D5H α y *E.coli* XL-Blue para la transformación y propagación de los plásmidos. Estas cepas de *E.coli* tienen una mutación (en el gen *RecA*) que permite que el plásmido insertado en las bacterias no se recombine con el genoma de la bacteria favoreciendo que la expresión del plásmido sea más estable, lo que facilita la purificación del plásmido así como el porcentaje de recuperación sea alto y al mismo tiempo sea de una alta calidad

5.1.6 Antibióticos:

En todas las purificaciones de los plásmidos se utilizó ampicilina a una concentración de 100 μ g/mL. Este se obtuvo de Sigma-Aldrich (Buchs SG, Suiza)

5.2 Metodología

5.2.1 Clonación del gen de R-Ras en el vector pIRES-hrGFP-1a

Para la clonación del gen de R-Ras en el vector de interés, se amplificó el gen mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Se utilizó como molde un plásmido donde el gen de R-Ras fue clonado previamente: R-Ras en su forma silvestre (wt), o bien con las mutaciones 38V, 43N y 87L en el plásmido pZipNeoSV.

- **Diseño de oligos para la reacción en cadena de la polimerasa**

Para amplificar el gene de R-Ras se diseñaron los siguientes oligonucleótidos: para el oligo sentido se tomaron los primeros 15 nucleótidos de la secuencia de R-Ras y se añadió el sitio de restricción para la enzima de restricción Bam HI.

5' GGG GCC **GGA TCC** ATG AGC TCT GGT GCT GCT TCT GGT 3'
Bam HI

Para el oligo anti sentido se tomaron los últimos 15 nucleótidos de la secuencia de R-Ras y se añadió el sitio de restricción para la endonucleasa EcoRI

5' GGG GCC **AAT TCA** GGA GGA CGC AGG GGC AGCC 3'
Eco RI

Los oligos se mandaron a sintetizar a Invitrogen (Grand Island, NY).

- **Reacción en cadena de la polimerasa, PCR**

Para la reacción en cadena de la polimerasa se realizaron alícuotas de todos los reactivos para obtener la concentración final, como se indica en la tabla 1, y obtener un volumen final de la reacción de 50 μ L, para cada muestra.

Tabla 1. Volumen y concentración de reactivos utilizados en la PCR en la amplificación del gen R-Ras

Reactivo	Volumen de la alícuota	Concentración final en la reacción
Oligo sentido	5 μ L	0.5 μ M
Oligo antisentido	5 μ L	0.5 μ M
Buffer de la reacción	5 μ L	1X
Taq DNA polimerasa	1 μ L	2.5 unidades
DNA molde	1 μ L	20 ng/ μ L
Agua estéril	33 μ L	-
Volumen final de la reacción	50 μ L	

Para la reacción de PCR se utilizó el termociclador marca TECHNE modelo TC-3000 con el que se realizaron 30 ciclos de la siguiente manera:

Desnaturalización: 95°C por 45 s

Alineamiento: 65°C por 45 s

Elongación: 75 °C por 1.5 min.

- **Purificación del DNA amplificado.**

Para purificar el DNA amplificado por PCR; primero se corrió una electroforesis de agarosa con todo el producto de PCR. Posteriormente se cortó la banda del producto esperado y el DNA se purificó con el kit PureLink Quick Gel extration de Invitrogen (Grand Island, NY).

- **Reacción de digestión y desfosforilación**

El DNA se sometió a una reacción de digestión con las endonucleasas Bam HI y Eco RI. Ambas enzimas trabajan a la misma concentración de sales y la misma

temperatura. El vector pIRES-hrGFP también se sometió a la reacción de digestión con las enzimas de restricción Bam HI y Eco RI. Posteriormente se agregó 1 μ L de la enzima fosfatasa alcalina (CIAP) a la reacción de digestión y se incubó por 2h a 37°C.

Las reacciones de digestión con las diferentes endonucleasas (XhoI, Hind III, Eco RI y Bam HI) se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante utilizándose 1 μ g del plásmido en cada reacción.

El DNA obtenido de las diferentes reacciones de digestión se purificó con el kit QIAEX II gel extraction de Qiagen (Mainz, Alemania).

- **Reacción de ligación del fragmento amplificado de R-Ras en el vector pIRES-hrGFP-1a**

Los fragmentos del cDNA de R-Ras y el vector se ligaron usando la enzima T4 DNA ligasa. En la reacción de ligación se trabajó con una cantidad de vector de 100 ng y 100 veces más de los fragmentos, para tener al final una relación 1:100 (vector: fragmento). Las cantidades de buffer, enzima y agua se agregaron siguiendo las instrucciones del proveedor. La reacción se incubó toda la noche a temperatura ambiente.

- **Purificación del producto de la reacción de ligación**

Debido a que en algunas ocasiones el buffer de la reacción de ligación afecta la viabilidad de algunas cepas de *E.coli* [103], se procedió a precipitar el DNA de la reacción de ligación de la siguiente manera:

Al tubo de la reacción de ligación se le agregaron 100 μ L de H₂O y 100 μ L de CHCl₃ y se mezclaron. Se centrifugó a la máxima velocidad y se recuperó la fase acuosa. Esto se repitió dos veces más. Después se recuperó la fase acuosa y se agregaron 10 μ L de 3 M CH₃COONa (pH=8), 1 μ L 10 μ g/ μ L de glucógeno y 110 μ L de Isopropanol. La mezcla se incubó a -20°C por 1 h. Se centrifugó a la máxima velocidad por 30 minutos.

Se retiró el sobrenadante y el precipitado se secó en un termoblock a 60 °C. Finalmente el precipitado se resuspendió en 5 µL de agua.

- **Transformación de bacterias competentes con el producto purificado de la reacción de ligación**

Para la transformación de las bacterias con el producto de la reacción de ligación se utilizaron bacterias *E.coli* de la cepa D5HαF químicamente competentes. Se ocuparon 2 µL de la precipitación de la reacción de ligación y se transformaron por el método del shock térmico [104]. Las bacterias se plaquearon en medio LB con 100 µg/mL ampicilina y se incubaron a 37 °C por 24h.

Para obtener el DNA de las bacterias transformantes se utilizo el Kit Wizard Plus Minipreps DNA Purification System de Promega.

5. 2.2 Obtención de células químicamente competentes de *E.coli*

Bacterias *E.coli* se sembraron en 5 mL de medio SOB y se incubaron a 37°C con agitación a 200 rpm toda la noche. Un mL de este cultivo se añadió a 100 mL de medio SOB y se incubó a 37°C con agitación vigorosa de 2 a 3 h, hasta que la absorbancia a 550 nm fuera 0.5. Las bacterias se centrifugaron a 600 g por 10 minutos a 4°C y la pastilla se resuspendió en 40 mL de buffer Tfb I frío (30mM CH₃COOK, 50mM MnCl₂, 100mM RbCl, 10mM CaCl₂, 12% Glicerol). Se incubó en hielo por 2 h. Las bacterias se centrifugaron de la misma manera que el paso anterior, se resuspendieron en 4 mL de buffer Tfb II frío (10 mM RbCl, 75mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH=7, 12% Glicerol) y se incubaron en hielo por 1 h. Se mezcló ligeramente y se incubó en hielo por 1 h. Las bacterias competentes se guardaron en alícuotas de 100 µL congeladas a -20 °C hasta su uso.

5. 2.3 Mutagénesis dirigida

Utilizando la secuencia del plásmido construido, R-Ras-wt-pIRES como vector parental se diseñaron oligos para realizar mutaciones puntuales en las posiciones 38, 41, 43 y 87 del gen de R-Ras para obtener las mutantes constitutivamente activas (38V y 87L) y las mutantes dominantes negativas (41A y 43N) de R-Ras. La mutagénesis dirigida se realizó con el kit comercial QuiKChange multi Site-Directed Mutagenesis de Agilent technologies.

▪ Diseño de oligos para la mutagénesis dirigida

Se tomó como base la secuencia del plásmido R-Ras-wt-pIRES para diseñar los oligos con la finalidad de obtener plásmidos con las mutaciones puntuales deseadas.

Los oligodesoxinucleótidos fueron los siguientes:

Oligo para mutación 38V

5'-GTG GTC GTG GGC GGC **GTC** GGC GTG GGC AAG AGC-3'
G→V

Oligo para mutación 43N

5'-GGC GGC GTG GGC AAG **AAC** GCG CTG ACC ATC CAG-3'
S→N

Oligo para mutación 41A

5'-GGC GGC GGC GGC GTG **GCC** AAG AGC GCG CTG ACC-3'
G→A

Oligo para mutación 87L

5'-CTG GAC ACC GCG GGC **CTG** GAA GAG TTC GGG GCC-3'
Q→L

Los oligos se mandaron a sintetizar a Invitrogen (Grand Island, NY).

5. 2.4 Secuenciación

Los plásmidos se mandaron a secuenciar a la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM que cuenta con un secuenciador Perkin Elmer/Applied Biosystems Modelo 3730 y utiliza el método de Fluorescence-Based Sequencing. Para la secuenciación de los plásmidos se utilizó el primer universal T3 que se encuentra dentro de la secuencia del vector pIRES. Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa Bio Edit versión 7.0 para Windows.

5. 2.5 Purificación de plásmidos para transfección

El DNA plasmídico utilizado en la transfección celular se purificó por el método de gradiente de Cloruro de Cesio-Bromuro de Etidio [104]

5. 2.6 Transfección de la línea celular Jurkat

Las células Jurkat mantenidas en cultivo se transfectaron por el método de electroporación. Las células se resuspendieron en 0.4 mL de medio RPMI completo en tubos eppendorf y se les añadió la cantidad de DNA a transfectar. Posteriormente la mezcla de DNA y células se paso a una celda de electroporación y se le dio un pulso en un EasyJet Electroporador Plus (Flowgen, Boughton Kent, England). Se probaron diferentes condiciones experimentales basándonos en diferentes trabajos [105-109] y haciendo modificaciones para obtener las mejores condiciones de transfección (ver tabla 2).

Las células electroporadas se resuspendieron en 3 mL de medio completo y se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. La expresión de GFP se observó con un microscopio de fluorescencia (Olympus).

Tabla 2. Condiciones probadas para la obtención de células Jurkat transfectadas con los diferentes plásmidos construidos de R-Ras

Condición	No. Células	Cantidad DNA	Pulso	Referencia	Modificación
1º	12 x 10 ⁶	35 µg	250V, 960µF	(Reedquis et al.,2000)[103]	900 µF
2º	10 x 10 ⁶	20 µg	200V, 960µF	(Iafate et al., 1997) [110]	12 x 10 ⁶ Células 35 µg DNA 900 µF
3º	1 x 10 ⁶	2 µg/millón de células	230V, 960 µF	(García-Bernal et al., 2005)[108]	12 x 10 ⁶ células 35 µg DNA 900µF

5. 2.7 Enriquecimiento de células transfectadas por citometría de flujo

Las células Jurkat transfectadas se mantuvieron en cultivo a una atmósfera de 5% de CO₂ y una temperatura de 37°C. Las células se lavaron con PBS, se resuspendieron en 5mL de PBS estéril y se mantuvieron en hielo hasta su separación por cell sorting. Se utilizó el citómetro de flujo FACSARIA de la unidad de Citofluorometría del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, colectando las células más fluorescentes. Las células recuperadas se transfirieron a placas de 96 pozos y se incubaron en medio completo a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%.

5. 2.8 Detección de Integrinas por Citometría de Flujo

1 x 10⁶ células se resuspendieron en 100 µL de buffer de FACS (0.5% BSA, 1% sacarosa en PBS, pH 7.4) y se les añadió el anticuerpo primario correspondiente (ver Tabla 3). Las células se incubaron a 4°C por 45 minutos. Pasado el tiempo, las células se lavaron 3 veces con buffer de FACS, se resuspendieron en 100 µL de buffer de FACS que tenía 20 µL del anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a Alexa 647 y se incubaron a 4°C por 30 minutos. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con buffer de FACS y por último se resuspendieron en 300 µL de 1 % paraformaldehído. La

fluorescencia de las células se midió con un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson).

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en la detección de integrinas por citometría de flujo en diferentes células

Anticuerpo	Especificidad	Tipo de anticuerpo	Concentración	Células en las que se utilizaron los anticuerpos
TS2/16	Integrinas $\beta 1$	Monoclonal	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Jurkat, monocitos THP1, neutrófilos de sangre periférica
IB4	Integrinas $\beta 2$	Monoclonal	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Jurkat
15/7	Integrinas activadas $\beta 1$	Monoclonal	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Jurkat en presencia de MnCl_2
CBRM1/5	Integrinas activadas $\beta 2$	Monoclonal	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Jurkat y Monocitos THP1 en presencia de MnCl_2
anti-IgG de ratón acoplado al fluorocromo Alexa 647	IgG de ratón	Policlonal de cabra	Dilución 1/1000	Todas las células

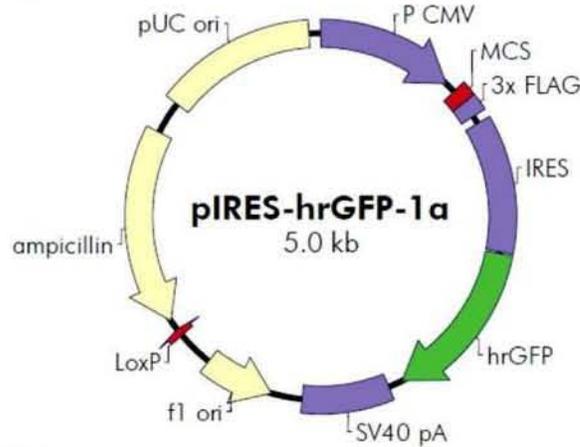
VI. RESULTADOS

6.1 Construcción del plásmido R-Ras wt en pIRES

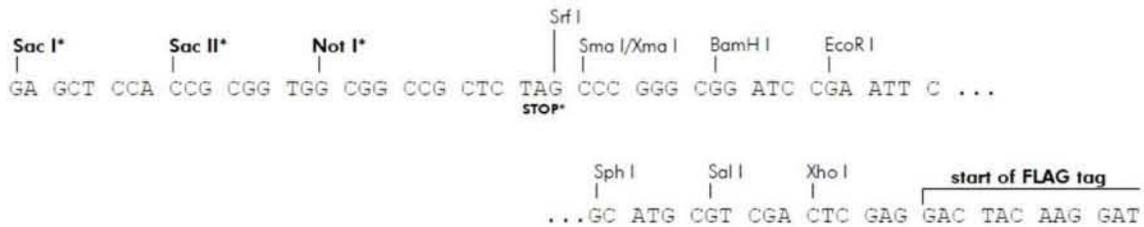
Para la clonación del gen de R-Ras dentro del vector pIRES-hrGFP-1a (Fig. 6), se utilizó como molde un plásmido retroviral donde previamente se clonaron las diferentes mutantes de R-Ras y la proteína silvestre [67]. Por medio del uso de la secuencia de estos plásmidos se diseñaron oligodesoxinucleótidos en los que se añadieron los sitios de restricción para las enzimas Bam HI y Eco RI, con el fin de realizar una clonación direccionada. Estas endonucleasas, al cortar su secuencia blanco, generan extremos cohesivos, lo que permite que las terminaciones del gen amplificado por PCR, tengan terminaciones diferentes y se puedan unir con su secuencia complementaria en el vector. Esto es posible debido a que dentro del sitio de multiclonación del vector elegido se encuentran sitios de corte para estas enzimas (anexo 10.1). Por otro lado el gen de R-Ras no tiene secuencias blanco para las enzimas seleccionadas (anexo 10.2).

De esta manera, la amplificación del gen de R-Ras silvestre (wt), las mutantes constitutivamente activas (38V y 87L) y la dominante negativa (43N) se realizaron mediante PCR.

pIRES-hrGFP-1a Vector



Sitio de multiclonación del vector pIRES-hrGFP-1a
(Secuencia mostrada 651-727)



Características	Posición del nucleótido
Promotor CVM	1-602
Sitio de unión del T3 primer en el extremo 5' [5' AATTAACCCCTCACTAAAGGG 3']	620-639
Sito de multiclonación	651-715
Codón de terminación (dentro del marco de lectura la etiqueta 3X Flag)	677-679
Etiqueta 3X Flag	716-787
Sitio de unión del cebador (extremo 3') [5' GTCCTTATCATCGTCGTCTT 3']	747-766
Sitio de unión interno al Ribosoma (IRES)	823-1397
hr GFP ORF	1407-2123
Sitio de unión T7 primer [5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3']	2155-2176
Señal de poly A SV40	2188-2571
f1 Origen de la replicación del DNA s-s	2709-3015
Secuencia Lox P	3178-3211
ORF del casset de resistencia a ampicilina	3256-4113
pUC origen de la replicación	4260-4927

Figura 6. Mapa circular del vector pIRES-hrGFP-1a. El vector pIRES-hrGFP-1a contiene un cassette de expresión en el cual el sitio de multiclonación es seguido de un sitio de unión interno al ribosoma (IRES) unido a una secuencia que codifica para la proteína verde fluorescente. El gen de interés está fusionado con tres copias continuas de la epitope FLAG. También cuenta con un sitio de recombinación mediado por la recombinasa Cre.

6.1.1 Amplificación del gen de R-Ras wt, 38V, 43N y 87L

Para verificar la amplificación del gen de R-Ras se realizó un gel de agarosa al 2% con Bromuro de etidio. En la figura 7 se muestra el gel y se observa la presencia de bandas cercanas a 700 pb, que es la longitud esperada ya que el gen reportado contiene 680 pb [54, 111]

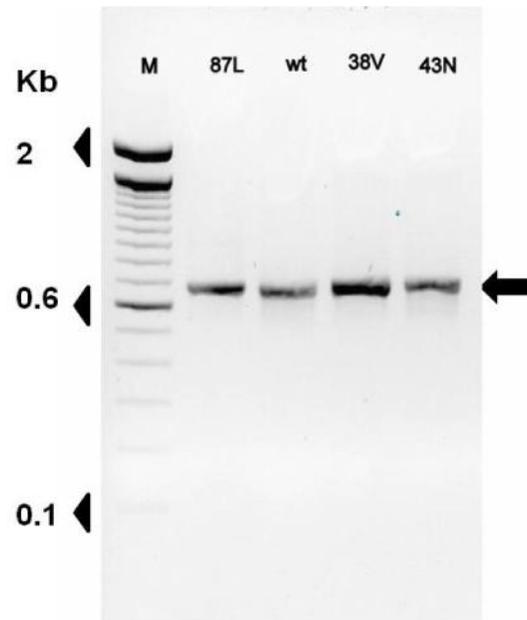


Figura 7. Amplificación del gen de R-Ras por PCR. Gel de agarosa al 2% con BrEt a 0.5 $\mu\text{g/mL}$ se agregó 1 μL de cada muestra de la reacción de PCR. Carril 1: Marcador. Carril 2: R-Ras 87L. Carril 3: R-Ras wt. Carril 4: R-Ras 38V. Carril 5: R-Ras 43N. Se utilizó como marcador DNA ladder de 100pb

6.1.2 Ligación del fragmento de R-Ras amplificado con el vector pIRES

Una vez obtenidos los fragmentos amplificados de R-Ras silvestre (wt) y sus diferentes mutantes (38V, 87L y 43N) se procedió a purificar y digerir con las enzimas de restricción Eco RI y Bam HI. El vector fue digerido en las mismas condiciones y tratado con fosfatasa alcalina con el fin de eliminar los grupos fosfatos de los extremos 5' generados por los cortes de las enzimas de restricción, evitando así que se unan los

extremos 3' del vector en la reacción de ligación [104, 112]. Se corrió un gel de agarosa al 1.5 % para conocer la pureza del DNA obtenido después de la digestión (Fig. 8).

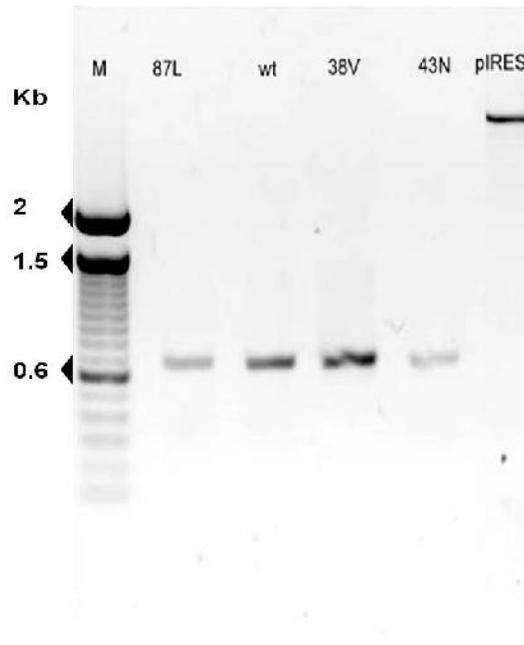


Figura 8. Vector y Fragmentos amplificados digeridos con las enzimas de restricción Eco RI y Bam HI. Gel de agarosa al 1.5 % con BrEt a 0.5 μ g/mL. En cada carril se depositaron 1 μ L de cada muestra. Carril 1: Marcador. Carril 2: R-Ras 87L. Carril 3: R-Ras wt. Carril 4: R-Ras 38V. Carril 6: R-Ras 43N. Carril 7: vector pIRES-hrGFP1a

Las condiciones de la reacción de ligación se establecieron de acuerdo a varios experimentos en donde se variaron diferentes parámetros como la concentración de DNA de trabajo (relación vector: fragmento), la temperatura y tiempo de incubación. Las condiciones ideales determinadas de la reacción de ligación se describen en la sección 5.1. El DNA se precipitó y se usó para transformar bacterias por el método de choque térmico. Para la transformación se utilizaron las cepas de *E.coli* D5H α ó XL-Blue. Las bacterias transformadas se sembraron en presencia de ampicilina y se incubaron por 24 h a 37°C. De 20 a 24 horas después se seleccionaron colonias transformantes para resembrarlas y extraer el DNA plasmídico. Para determinar sí las bacterias resistentes a ampicilina seleccionadas expresaban el plásmido donde se

clonó R-Ras se procedió a realizar análisis de restricción con diferentes endonucleasas.

6.1.3 Análisis de restricción con las enzimas Xho I, Hind III, EcoRI y Bam HI

Para caracterizar el DNA clonado en el vector pIRES se tomaron como base los mapas de restricción del vector y de la secuencia de R-Ras. Se analizaron los mapas de restricción de ambas secuencias para seleccionar las enzimas con las cuales se realizarían las digestiones que nos permitieran saber si el gen deseado se insertó dentro del vector. Como primer criterio se eligió una enzima que tuviera un solo corte dentro de la secuencia del vector pIRES y ninguno en la de R-Ras, con la finalidad de linearizar el plásmido. La endonucleasa elegida para realizar este corte fue Xho I. En la figura 9 se presenta el gel de una muestra derivada de la ligación del fragmento de R-Ras silvestre con el vector pIRES, comparada con el vector sin el inserto. Se puede observar una diferencia de tamaño entre ambas muestras, lo que hace evidente que el fragmento de DNA que codifica para R-Ras se insertó en el plásmido. Este corte se realizó con todas las muestras obtenidas de las diferentes reacciones de ligación de los fragmentos amplificados de R-Ras en la PCR y todos aquellos que mostraron un patrón similar, es decir, una mayor longitud con respecto al vector solo, se seleccionaron para someterlas a un segundo criterio de restricción.

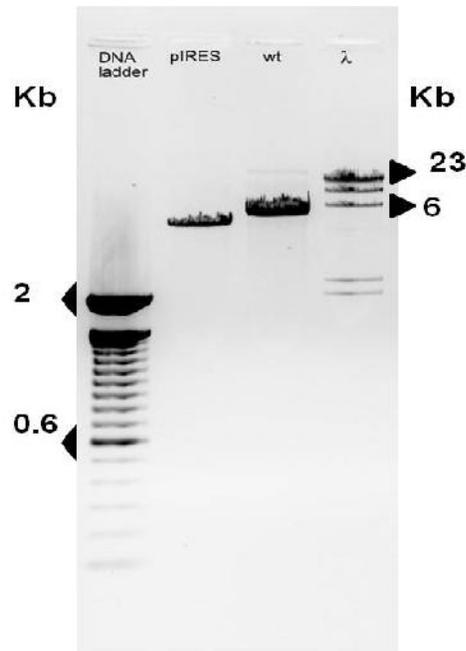


Figura 9. Digestión con Xho I del vector solo y del DNA plasmídico obtenido de las colonias transformantes de la reacción de ligación. Muestra derivada de la reacción de ligación del fragmento amplificado de R-Ras wt con el vector pIRES Carril 1: Marcador DNA ladder. Carril 2: Vector solo. Carril 3: muestra R-Ras wt. Carril 4: marcador DNA lamda/Hind III.

Para confirmar la presencia del gen de R-Ras, se realizó una digestión con las enzimas que se utilizaron para generar los sitios de restricción y hacer la ligación. Estas enzimas fueron Bam HI y Eco RI. La digestión con ambas enzimas libera el fragmento clonado. En la figura 10, se presenta un gel de agarosa donde se corrieron las muestras que se sometieron a la reacción de digestión con ambas enzimas, estas muestras son las preseleccionadas con la reacción de digestión anterior. Los carriles 2,3, 7, 11 y 14 son los que presentan la banda cercana a 700 pb.

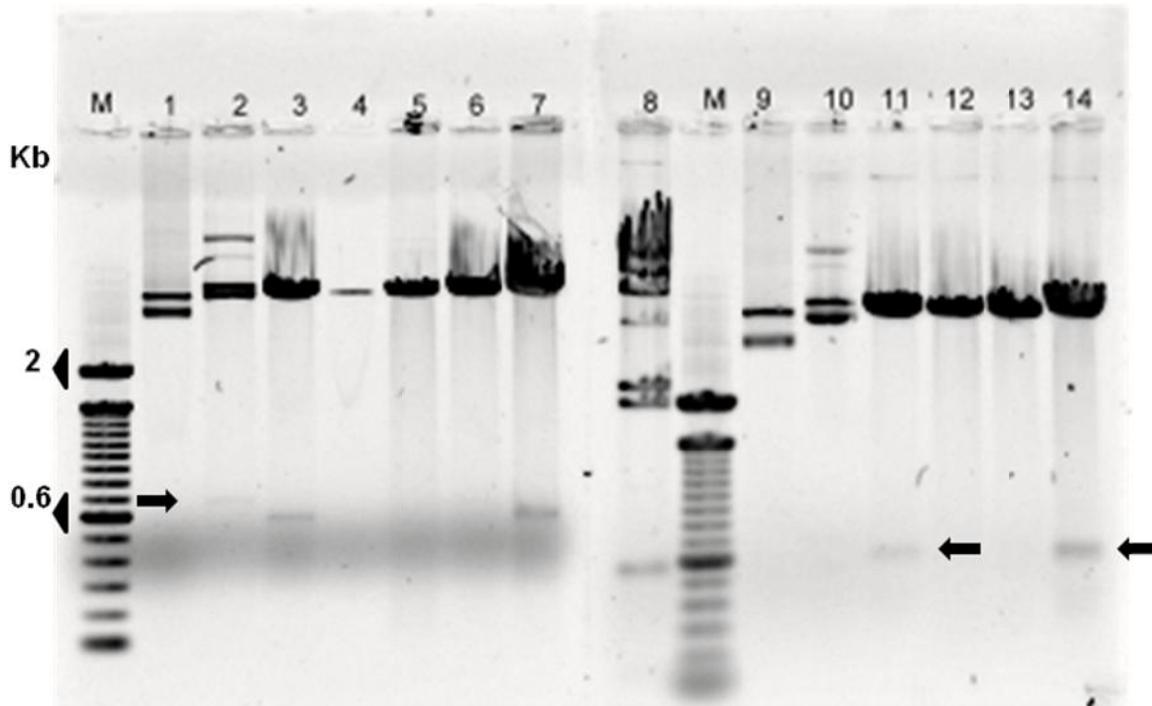


Figura 10. DNA transformante sometido a digestión con las endonucleasas Bam HI y Eco RI. Carril M: Marcador DNA ladder. Carriles 1, 2, 9 y 10, R-Ras wt. Carriles 3, 5, 6, 11-13, R-Ras 43N. Carril 4: Vector solo. Carriles 7 y 14: R-Ras 38V. Carril 8: marcador DNA lambda/Hind III. Carril M: Marcador DNA ladder

Finalmente para determinar la dirección en la que se insertó el fragmento de DNA dentro del vector se eligió una enzima de restricción que al realizar los cortes dentro de la secuencia nos proporcionara un patrón de restricción el cual indicara si la dirección en la que fue clonado el inserto fue la correcta. Basándonos en los mapas de restricción tanto del gen como del vector (anexos 10.1 y 10.2) se eligió la endonucleasa Hind III. Esta enzima tiene dos sitios blancos en la secuencia del gen de R-Ras y uno en la secuencia del vector pIRES (Fig. 11). El patrón de restricción esperado resultaría en tres fragmentos de DNA: uno de aproximadamente 100 pb., otro de 1000 pb. y otro de 4500 pb. para el plásmido clonado, mientras que para el vector solo se presentaría un solo fragmento. Otro tipo de patrón de restricción nos indicaría que el gen no se clonó en la dirección correcta.

El DNA plasmídico obtenido de las colonias transformantes se sometió a digestión con la enzima así como el vector sin el inserto, en las condiciones descritas en la metodología; se tomaron 20 μ L de la reacción de digestión y se corrió un gel de agarosa al 1% para observar el patrón de restricción. En la figura 12 se presenta el gel de muestras derivadas de la reacción de ligación del fragmento R-Ras wt con el vector pIRES, digeridas con Hind III. El patrón esperado lo presentan las muestras que se corrieron en los carriles 11, 12 y 14. Las muestras que presentaron los patrones de restricción esperados para cada una de las endonucleasa elegidas, se escogieron para enviarlas a secuenciar.

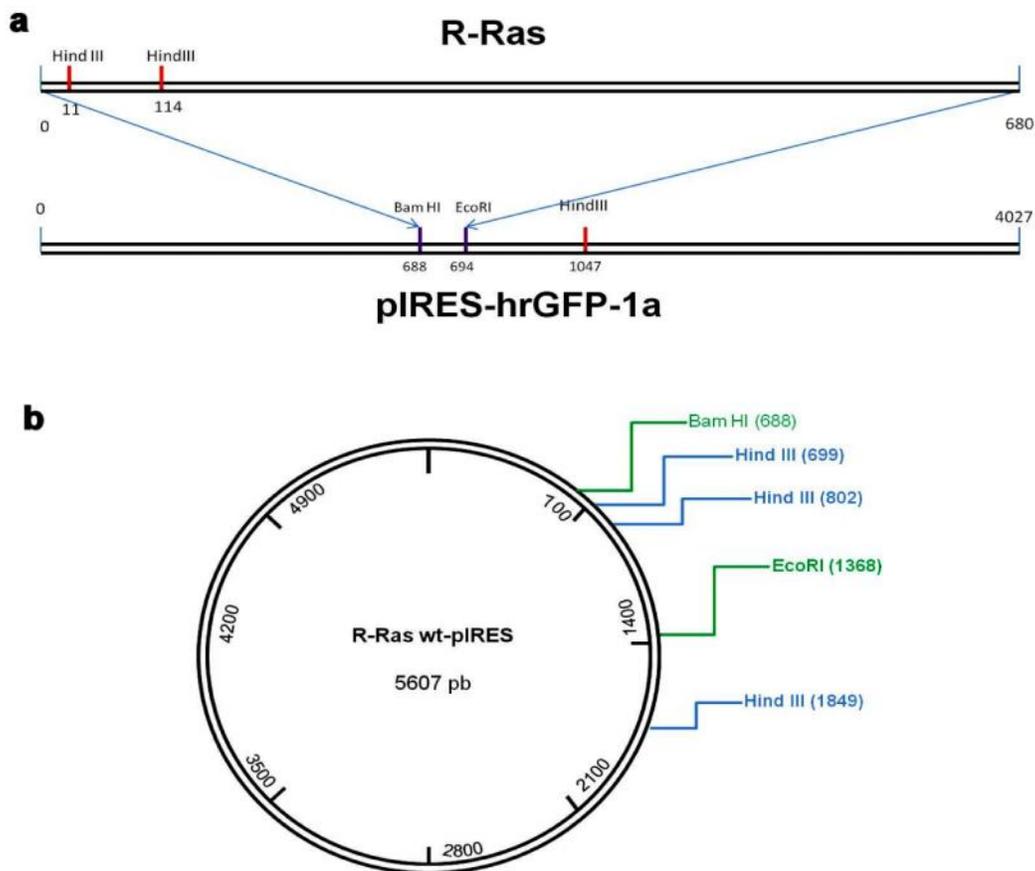


Figura 11. Secuencias blanco para Hind III. a. Mapa de restricción de la secuencia de R-Ras y del vector pIRES. b. Mapa de restricción teórico del plásmido clonado R-Ras en pIRES

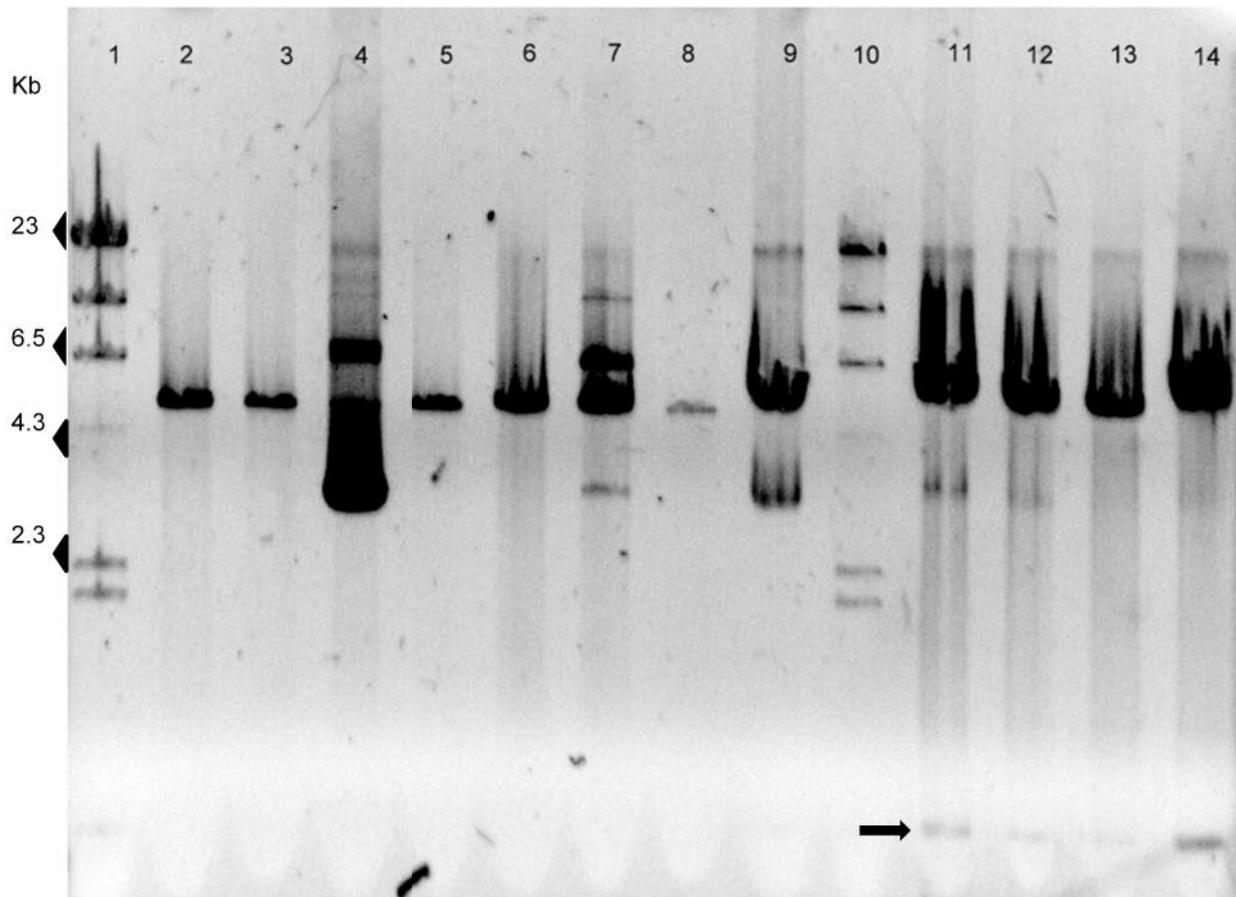


Figura 12. Digestión de plásmidos transformantes con la enzima Hind III. Carril 2-6, 7,9 y 11-14 plásmidos obtenidos de diferentes colonias transformantes de la muestra R-Ras wt. Carril 8: pIRES. Carril 1 y 10: marcador DNA lamda/Hind III

6.2 Secuencia del Plásmido R-Ras-wt-pIRES

El DNA plasmídico que se caracterizó con los diferentes patrones de restricción ya descritos, se purificó y se envió a secuenciar.

Los resultados de secuencia de DNA se analizaron con el programa bio Edit versión 7.0 para windows para obtener la secuencia de amino ácidos. Ésta se comparó con la publicada en Gen Bank [111]. La alineación de ambas secuencias de aminoácidos se muestra en la figura 13. La homología entre ambas secuencias fue de 99.6%. Las posiciones de los aminoácidos sombreados, son aquellos donde se esperaba alguna

mutación. Debido a que las muestras no presentan ninguna mutación, se determinó que la secuencia mostrada codifica para la proteína silvestre de R-Ras.

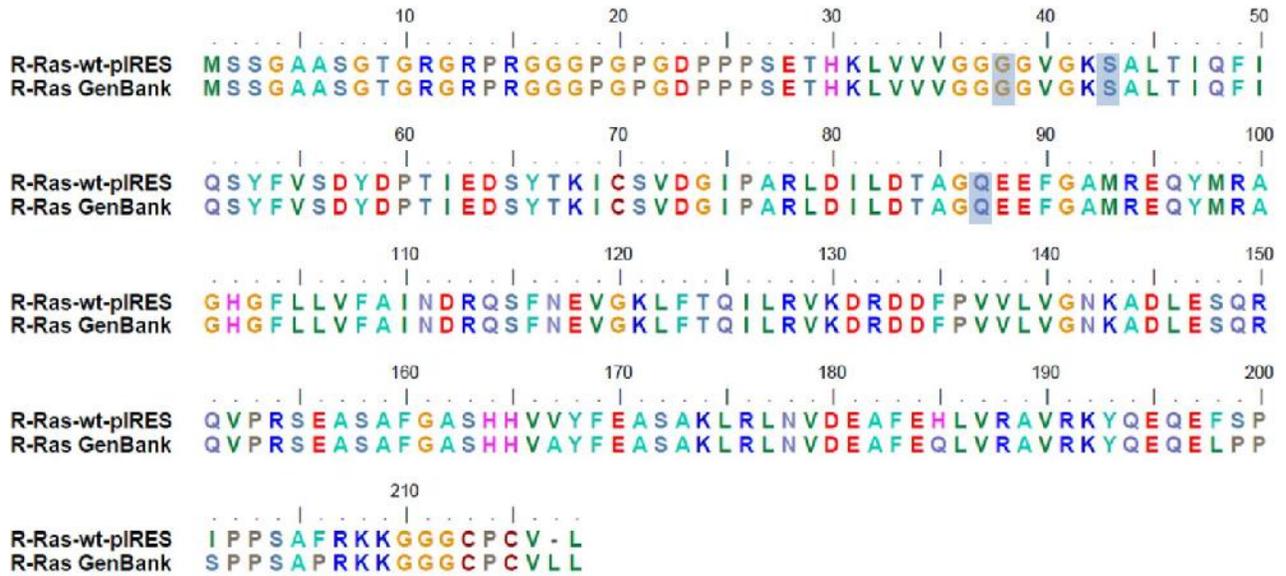
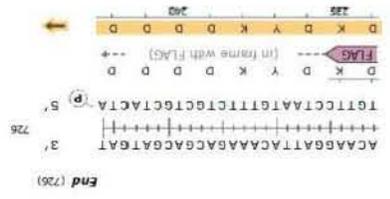
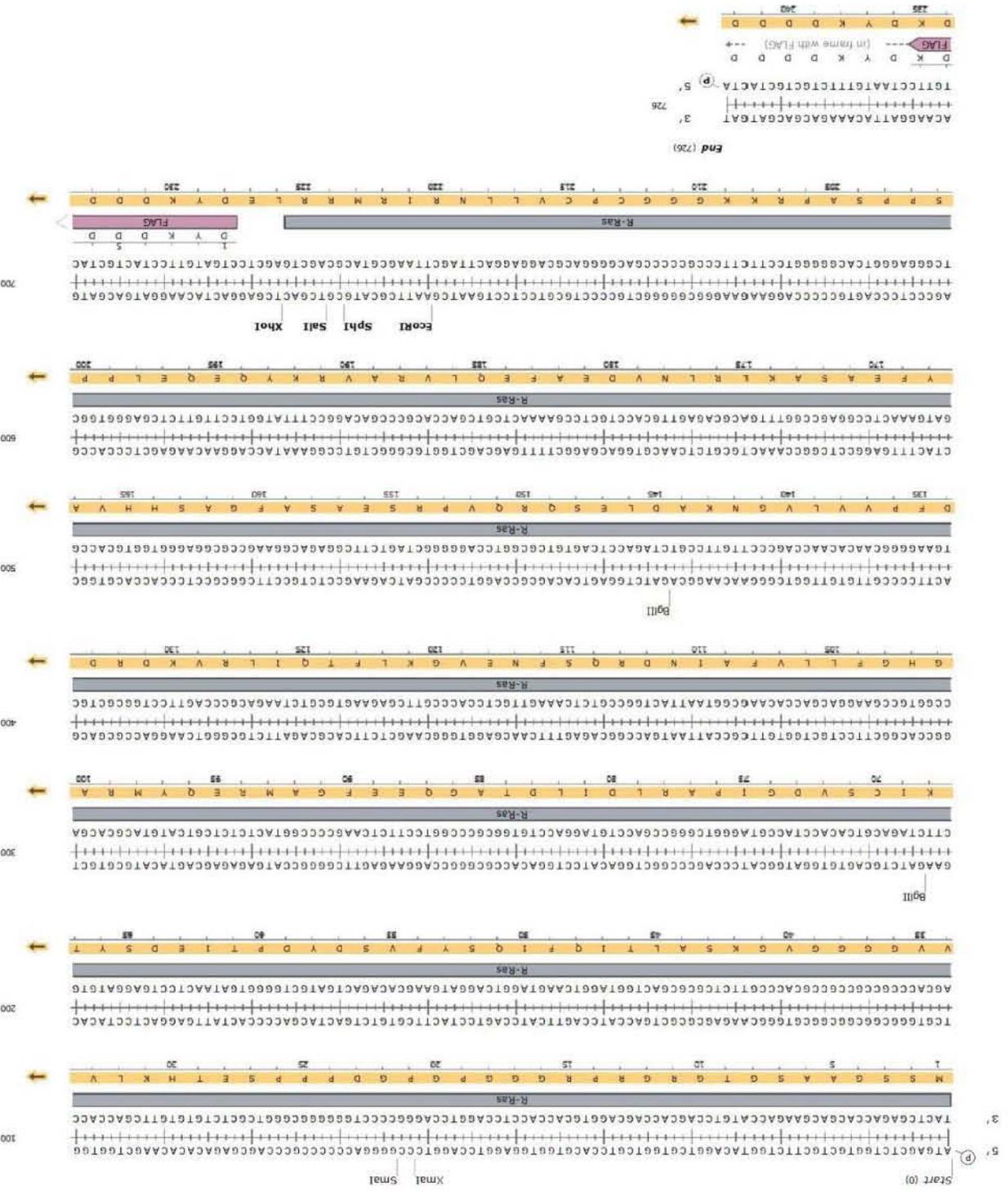


Figura 13. Alineación de la secuencia de aminoácidos que codifica el plásmido secuenciado. R-Raswt-pIRES comparado con el reportado en NBCI Gen Bank. En la figura se muestran sombreados los aminoácidos donde se espera alguna mutación.

La secuencia del DNA del plásmido clonado se muestra en la figura 14, observando que efectivamente R-Ras silvestre estaba correctamente clonada en el vector pIRES-hrGFP-1a



6.3 Clonación de R-Ras 38V, 43N y 87L en pIRES-hrGFP-1a.

Para la clonación de las diferentes mutantes de R-Ras se siguió el mismo procedimiento que se utilizó para clonar el gen de la proteína silvestres (R-Ras wt), la amplificación del fragmento, purificación, digestión de fragmentos y plásmido, reacción de ligación, transformación de bacterias competentes así como su respectivo análisis de restricción.

En la figura 15 se muestra el patrón de restricción de diferentes muestras con la enzima de restricción Hind III

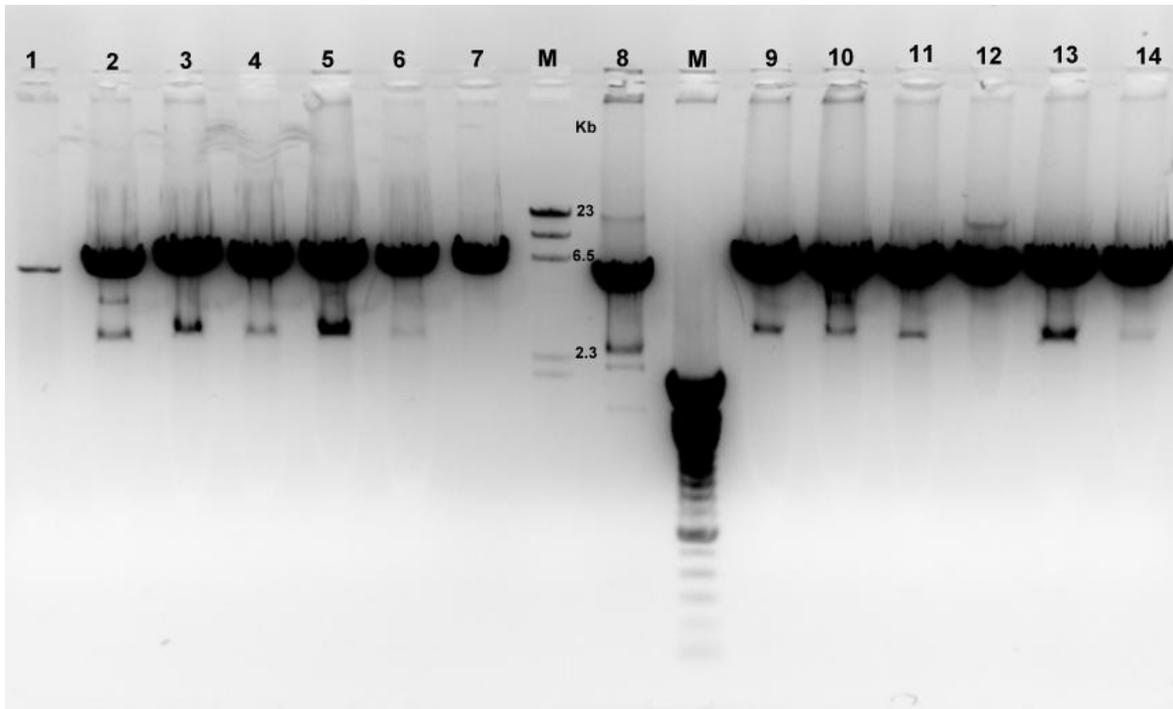


Figura 15. DNA Plasmídico purificado de bacterias transformantes digeridos con Hind III. Carril 1-3, 5, 10,14 R-Ras 43N. Carril 4 y 11 R-Ras 38V. Carril 6,9 y 11 R-Ras 87L. Carril 7 pIRES solo. Carril 8 R-Ras-wt-pIRES. Carril 12-13 R-Ras wt. M: DNA lamda/HindIII y DNA ladder.

Las muestras donde se observó el patrón de restricción esperado con la digestión con la enzima Hind III, se sometieron a digestión con EcoRI y Bam HI para la liberación del fragmento (Fig. 16) y se mandaron a secuenciar.

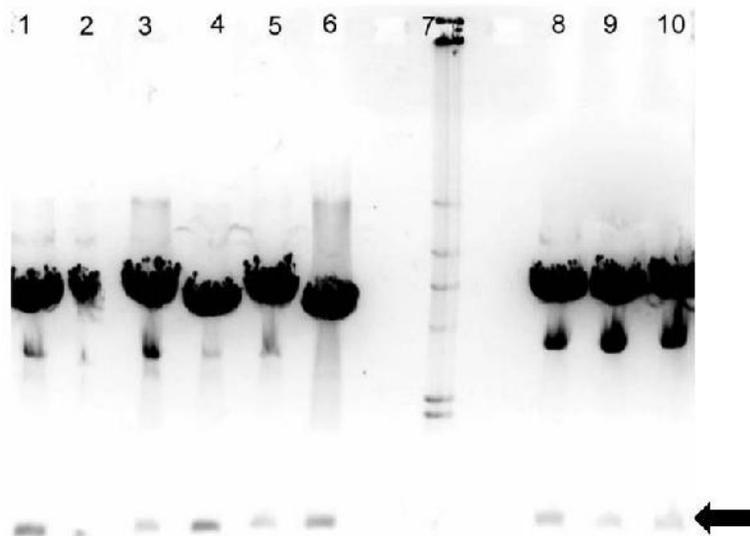


Figura 16. DNA plasmídico digerido con las endonucleasa Eco RI y Bam HI. Para observar el fragmento insertado en el vector, el plásmido se cortó con las enzimas de restricción con las que se creó el sitio de inserción dentro del vector. Carril 1-3 R-Ras 43N. Carril 4-6 R-Ras 87L. Carril 8-10 R-Ras 38 V. carril 7 Marcador DNA lamda/HindIII. La flecha indica la liberación del fragmento clonado.

Los resultados de secuenciación mostraron desafortunadamente que en todos los casos sólo se obtuvo la proteína R-Ras silvestre (Fig. 17). Por lo que se decidió obtener las diferentes mutantes de R-Ras por la técnica de mutagénesis dirigida, usando como molde el nuevo plásmido clonado R-Ras-wt-pIRES.

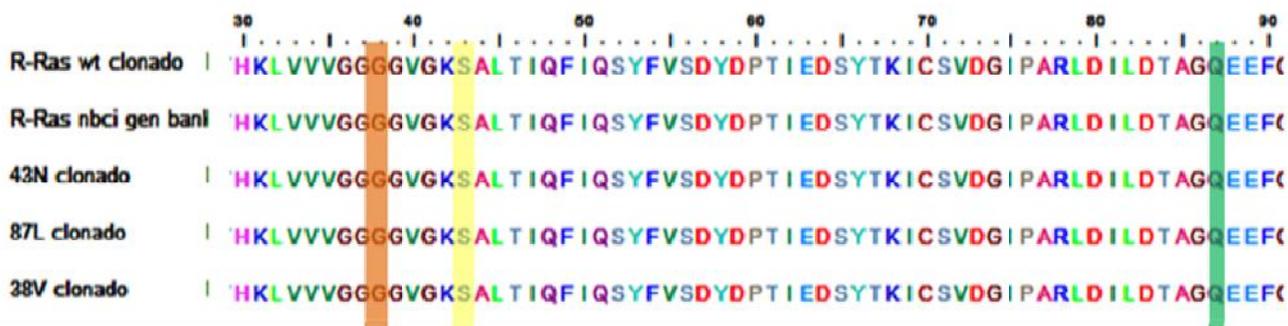


Figura 17. Alineación de la secuencia de aminoácidos codificados en los plásmidos clonados. Los plásmidos donde se clonaron las mutantes de R-Ras se secuenciaron y la secuencia de aminoácidos predicha se muestra para los amino ácidos 30 hasta el 90. Las áreas sombreadas son los aminoácidos donde es esperada alguna mutación

6.4 Obtención de los plásmidos R-Ras-38V-pIRES, R-Ras-41A-pIRES, R-Ras-43N-pIRES, R-Ras-87L-pIRES por mutagénesis dirigida

El plásmido R-Ras-wt-pIRES se utilizó como molde para realizar mutagénesis dirigida. Por lo tanto los oligos se diseñaron con base en la secuencia de este plásmido para insertar las mutaciones puntuales deseadas. Se usó el kit QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis, siguiendo las indicaciones del fabricante. Para cada mutación se obtuvieron de 3 a 5 colonias transformantes. De ésta, el DNA plasmídico se purificó y se envió a secuenciar. Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa Bioedit versión 7.0 para Windows.

En la figura 18 se muestra la secuencia de los plásmidos entre los pares de bases 110 y 300 donde se esperan las mutaciones. Las secuencias se alinearon con la secuencia de R-Ras silvestre (R-Ras wt). Se observa que todas las mutaciones puntuales deseadas (Q87L, G38V, S43N y G41A) se obtuvieron correctamente en cada una de las muestras.

Una vez obtenidos, los plásmidos que codifican para las diferentes mutantes de R-Ras se procedió a transfectar la línea celular de linfocitos.

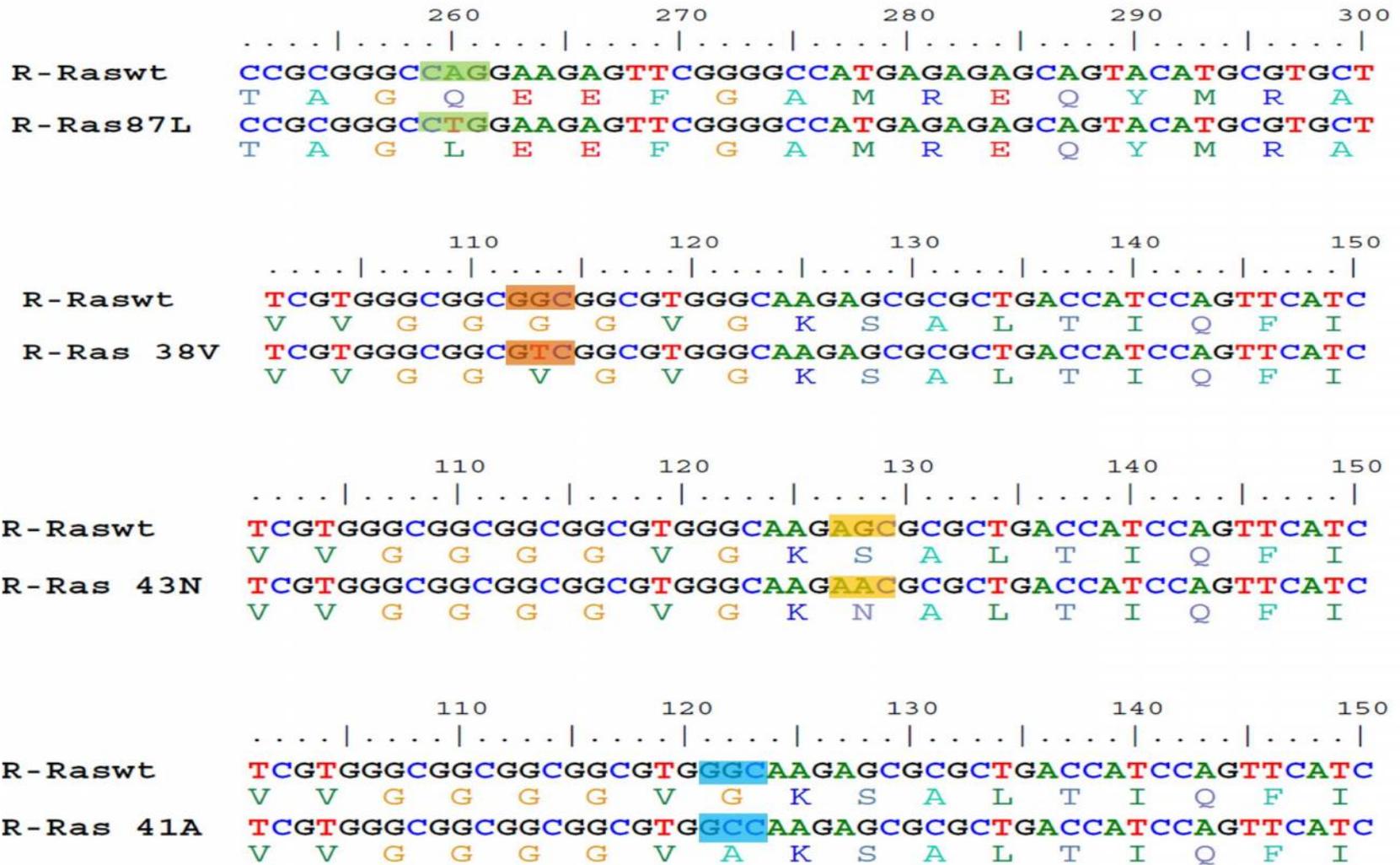


Figura 18. Secuencias de los plásmidos obtenidos por mutagénesis dirigida. La Secuencia de cada plásmido se comparo con la secuencia de R-Ras silvestre junto con la secuencia de amino ácidos para verificar la mutación puntual esperada

6.5 Transfección celular

Para la transfección de las células Jurkat se eligió el método de electroporación, ya que éste es el más reportado para transfectar células de este tipo. Para determinar las condiciones óptimas de transfección, primero se probaron las condiciones que se han usado con monocitos. A 10×10^6 células, se les añadió 10 μg de plásmido y se electroporaron con una capacitancia de 1050 μF y un voltaje de 350 V. Sin embargo, en estas condiciones no se obtuvieron células Jurkat transfectadas. Por lo que se decidió probar diferentes condiciones reportadas en varios trabajos donde se ha utilizado esta línea celular [105, 108, 110]. Primero se trabajaron las condiciones descritas en cada uno de los reportes, en algunos casos no se obtuvieron células transfectadas y en otros muy pocas, de esta manera se decidió establecer la cantidad de DNA a transfectar y el número de células para realizar la transfección. Para ello se realizaron varios experimentos probando diferentes condiciones y se determinó que la cantidad de plásmido y la cantidad de células serían de 35 μg y 12×10^6 células respectivamente.

Para determinar el pulso eléctrico se probaron tres condiciones:

Primera condición: 12×10^6 células, 35 μg de DNA, con un pulso de 250 V y 900 μF [105].

Segunda condición: 12×10^6 células, 35 μg de DNA y un pulso de 200V y 900 μF [110].

Tercera condición: 12×10^6 células, 35 μg de DNA y un pulso de 230V y 900 μF [108].

Los resultados de las diferentes condiciones se presentan en la figura 19. Estos experimentos se realizaron con el plásmido que sólo codifica para la GFP para determinar las mejores condiciones de transfección.

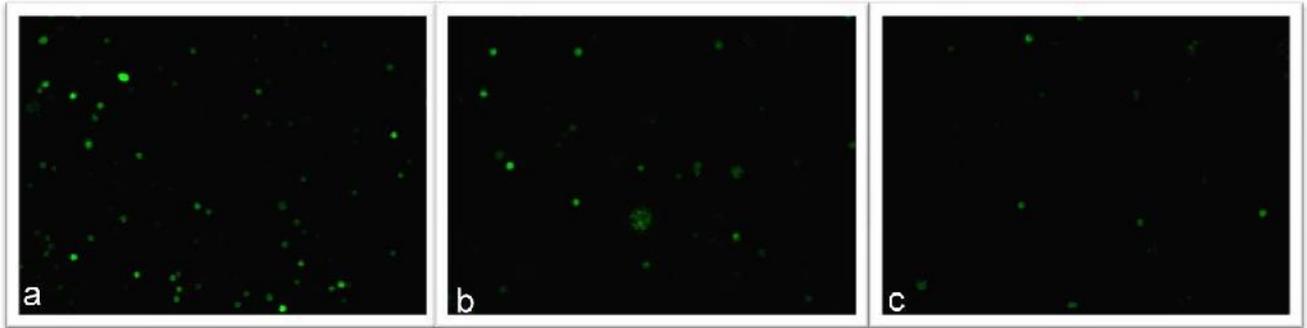


Figura 19. Expresión de la proteína verde fluorescente en células Jurkat transfectadas con el plásmido pIRES. a. Primera condición a un pulso de 250V y 900µF. b. Segunda condición a 200 V y 900 µF. c. Tercera condición 230 V y 900 µF. Las imágenes son una muestra representativa de tres experimentos realizados de manera independiente.

Una vez obtenidas las células transfectadas, estas se observaron bajo microscopia de fluorescencia a 24, 36 y 48 h. después de la transfección, con el fin de observar el tiempo en el cual se expresaba más GFP. En la figura 20 se muestran las células transfectadas a las 36 h de la transfección, a este tiempo fue donde se observó el mayor número de células que expresaban la proteína verde fluorescente. También se hace una comparación de las células que expresan GFP con el total de las células. Como se puede observar en las imágenes, las células que expresan la GFP comparadas con el total de células, son muy pocas, por lo que se decidió determinar la eficiencia de la transfección usando como parámetro la fluorescencia que emiten las células debido a la expresión de la GFP utilizando la citometría de flujo

6.6 Determinación de la eficiencia de la transfección por citometría de flujo (FACS)

Para medir la eficiencia de la transfección en las células Jurkat, se volvieron a transfectar en las condiciones donde se observó el mayor número de células que expresaban GFP. Primera condición: 12×10^6 células, 35 µg de DNA, con un pulso de 250 V y 900 µF; segunda condición: 12×10^6 células, 35 µg de DNA y un pulso de 200V

y 900 μ F. Una vez electroporadas, las células se mantuvieron en cultivo por 36 h (Fig. 20). Las muestras donde se observó el mayor número de células que expresaban GFP (condición uno), se lavaron con PBS frío para luego analizarlas por citómetro de flujo.

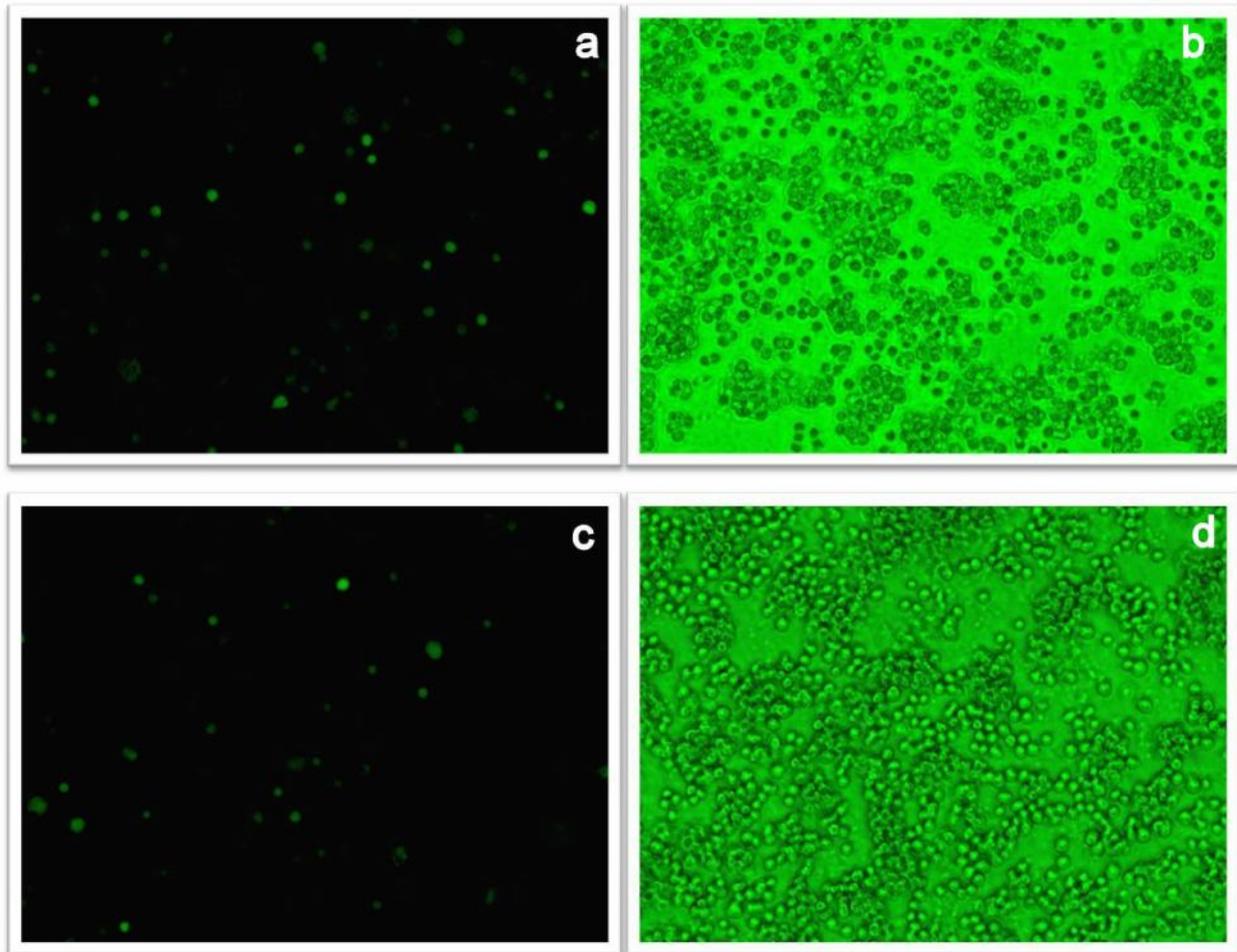


Figura 20. Expresión de GFP en células Jurkat después de 36 h de transfección. a y b. Células Jurkat transfectadas con el plásmido R-Ras-wt-pIRES usando la primera condición (12×10^6 células, 35 μ g de DNA, con un pulso de 250 V y 900 μ F). **c y d.** Células Jurkat transfectadas con el plásmido R-Ras-wt-pIRES usando la segunda condición (segunda condición: 12×10^6 células, 35 μ g de DNA y un pulso de 200V y 900 μ F). **a y c,** fluorescencia. **b y d,** luz visible.

En la figura 21 se muestran las gráficas de puntos (dotplots) de las células Jurkat intactas y los histogramas de emisión de fluorescencia de la GFP. La población de células Jurkat transfectadas con el plásmido pIRES-hrGFP mostró que 70 % eran

positivas a GFP (Fig. 21b). De igual forma, la población de células Jurkat transfectadas con el plásmido R-Ras-wt-pIRES mostró que 66 % eran positivas a GFP (Fig. 21d).

Como estas células se transfectaron con plásmidos que no confieren resistencia a algún antibiótico, la expresión de las proteínas codificadas en los plásmidos es sólo transitoria. Las células positivas a GFP se aislaron con ayuda del citómetro (sorting) y se mantuvieron en cultivo por dos semanas. Al cabo de este tiempo las células perdieron la expresión de GFP (Fig. 22).

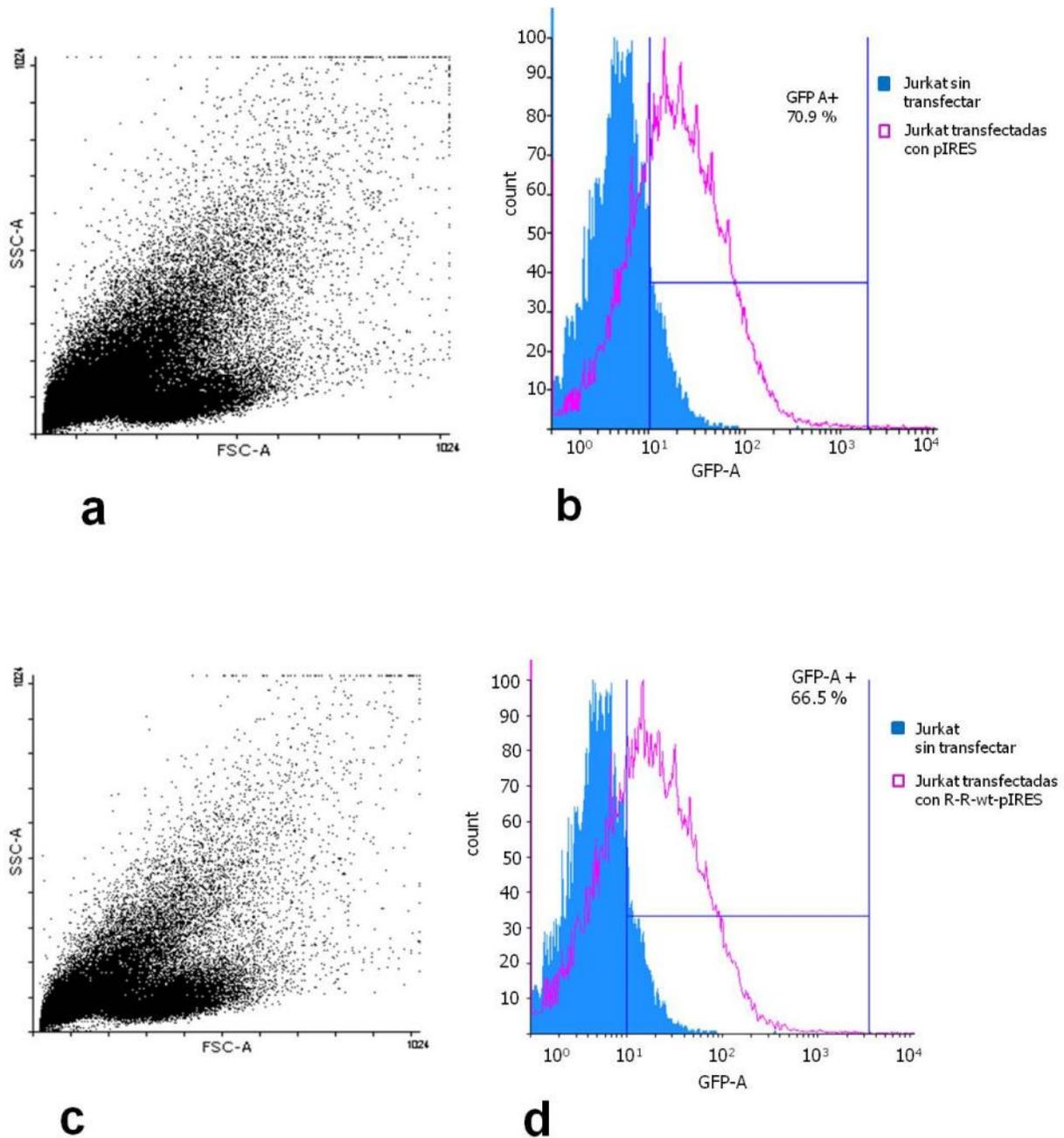


Figura 21. Determinación de la eficiencia de la transfección con los plásmidos pIRES-hr-GFP y R-Ras-wt-pIRES en células Jurkat. a. Dotplot de células Jurkat transfectadas con el plásmido pIRES-hr=GFP. b. Histograma de la fluorescencia de la GFP que expresan las células Jurkat transfectadas con el plásmido pIRES-hr-GFP. c. Dotplot de células Jurkat transfectadas con el plásmido R-Ras-wt-pIRES. d. Histograma de la fluorescencia de la GFP que expresan las células Jurkat transfectadas con el plásmido R-Ras-wt-pIRES

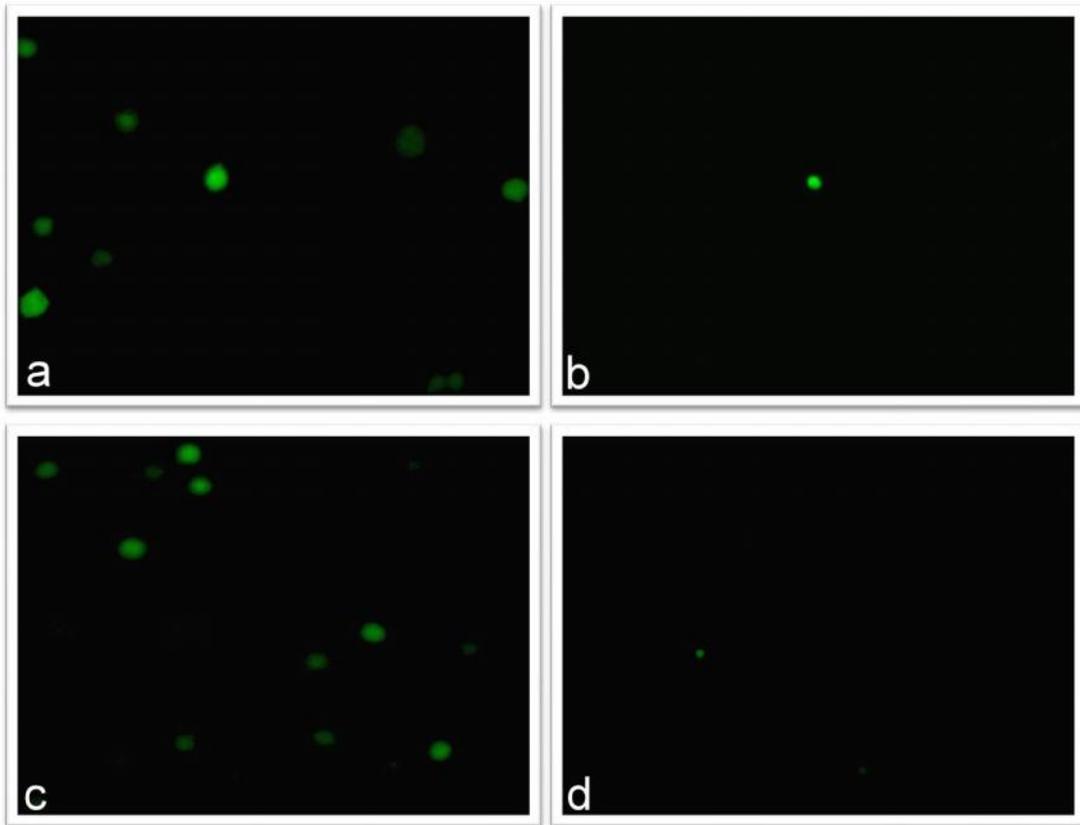


Figura 22. Expresión de GFP en células transfectadas y separadas por cell sorting a las 36 h y 2 semanas después de la transfección. a. Células Jurkat transfectadas con el plásmido pIRES-hr-GFP sometidas a cell sorting después de 36 h de la transfección. b. Células Jurkat transfectadas y posteriormente seleccionadas por cell sorting mantenidas en cultivo por dos semanas. c. Células Jurkat transfectadas con el plásmido R-Ras-wt-pIRES sometidas a cell sorting después de 36 h de la transfección. d. Células Jurkat separadas por cell sorting y mantenidas en cultivo por 2 semanas.

6.7 Determinación de la expresión de integrinas en células Jurkat.

Una vez confirmado que los plásmidos se podían transfectar bien en células Jurkat y que dirigían bien la expresión de la proteína GFP y por tanto la de R-Ras, se decidió determinar la expresión de las integrinas en las células Jurkat para posteriormente ver si R-Ras tenía un efecto sobre las integrinas.

Como primer paso se determinó la expresión total de integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ en células Jurkat usando los anticuerpos monoclonales TS2/16 e IB4 que reconocen a las integrinas totales $\beta 1$ y $\beta 2$, respectivamente. Para determinar el estado de activación de

las integrinas se usaron los anticuerpos monoclonales que son específicos para la conformación activada de las integrinas. El anticuerpo 15/7 reconoce a las integrinas $\beta 1$ activadas, mientras que el anticuerpo CBRM1/5 reconoce a las integrinas $\beta 2$ activadas. Para poder diferenciar la señal de fluorescencia proveniente de las células transfectadas (fluorescencia verde de la GFP) con la de las integrinas, se utilizó en el marcaje de integrinas el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a Alexa 647, la cual emite fluorescencia en la zona roja del espectro. Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo FACScalibur, y se procesaron con el programa FlowJo versión vX0.6.

En la figura 23, se muestran los histogramas de la expresión de las integrinas totales $\beta 1$ y las integrinas $\beta 2$ totales en las células Jurkat.

El anticuerpo TS2/16 que se usa comúnmente para identificar a las integrinas $\beta 1$ totales no mostró ninguna expresión de integrinas $\beta 1$ (Fig. 23a). En cambio, la expresión de las integrinas $\beta 2$ totales se pudo detectar fácilmente con el anticuerpo IB4 (Fig. 23b). El hecho de que no se detectaran integrinas $\beta 1$, podría significar que el anticuerpo TS2/16 no funcionara o que las células no expresaran de verdad estas integrinas. Para verificar la funcionalidad del anticuerpo, se realizó una tinción de integrinas $\beta 1$ totales en otras células, neutrófilos y monocitos, con el anticuerpo TS2/16. En ambos tipos celulares ambos tipos de integrinas se detectaron fácilmente (Fig. 24)

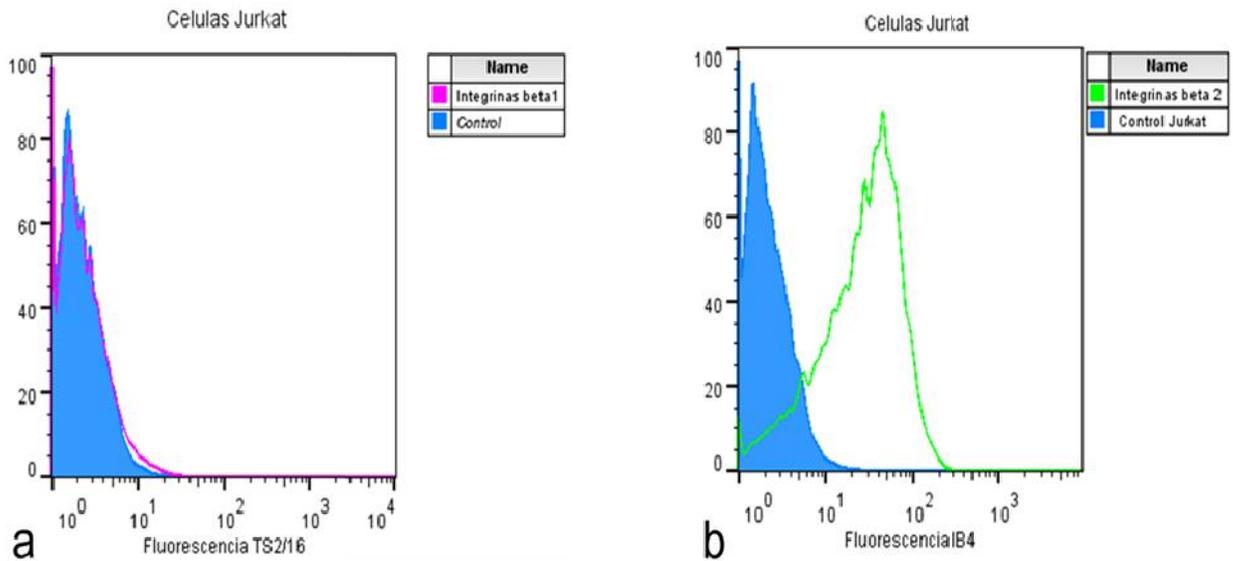


Figura 23. Integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ expresadas en las células Jurkat. 1×10^6 células Jurkat se marcaron con el anticuerpo TS2/16 para identificar integrinas $\beta 1$ totales (a), o con el anticuerpo IB4 para identificar integrinas $\beta 2$ totales (b). En azul se presenta la fluorescencia del anticuerpo secundario solo. Histogramas representativos de tres experimentos realizados de manera independiente

Debido a que el anticuerpo TS2/16 sí identificó integrinas $\beta 1$ expresadas en células monocíticas y neutrófilos, la falta de señal en células Jurkat podría significar que las células no expresan integrinas $\beta 1$ o que éstas están en una conformación diferente que el anticuerpo TS2/16 no puede reconocer. El anticuerpo 15/7 reconoce integrinas $\beta 1$ en una conformación activada. Entonces se decidió usar el anticuerpo 15/7 para ver si las integrinas $\beta 1$ estaban activadas en células Jurkat.

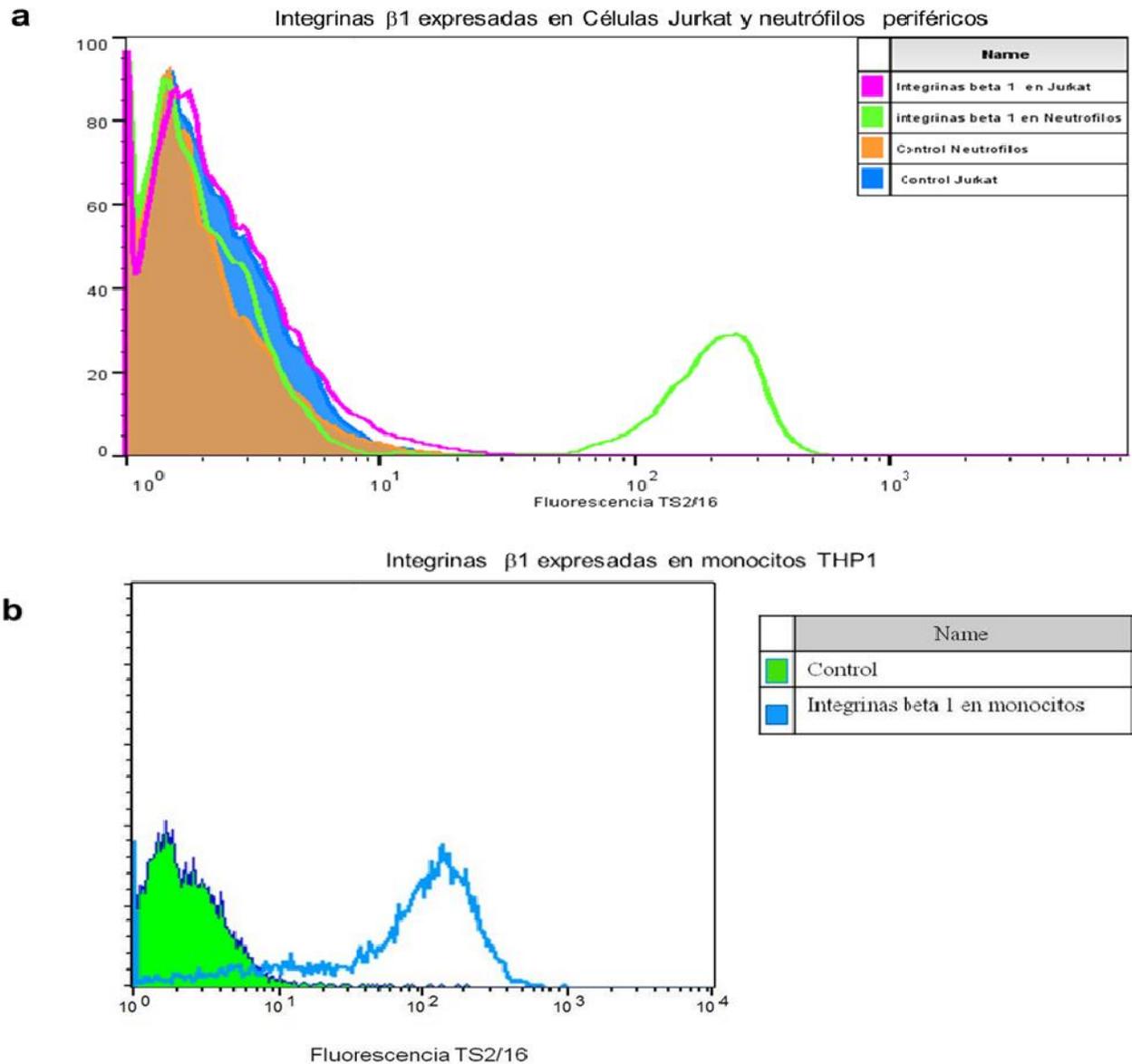


Figura 24. Identificación de integrinas $\beta 1$ expresadas en diferentes tipos celulares usando el anticuerpo TS2/16. **a.** Expresión de integrinas $\beta 1$ en células Jurkat y en neutrófilos. **b.** Expresión de integrinas $\beta 1$ en la línea celular de monocitos THP-1. El control son células marcadas con el anticuerpo secundario solo. Histogramas representativos de tres experimentos realizados de manera independiente.

Para inducir la activación de las integrinas en células Jurkat se utilizó cloruro de manganeso ($MnCl_2$) a una concentración de $500 \mu M$ disuelto en buffer de HEPES a $pH=7.4$. Las células se incubaron por 30 minutos a $37^\circ C$ y posteriormente se procedió a marcar las células con el anticuerpo 15/7. Las células Jurkat unieron bien al

anticuerpo 15/7 (Fig. 25a), indicando que las integrinas ya se encuentran en un estado conformacional activo. Cuando las células Jurkat fueron tratadas con Mn^{2+} , la fluorescencia emitida por la unión del anticuerpo 15/7 fue mayor. Esto indica que las integrinas $\beta 1$ de las células Jurkat muestran un estado de activación mayor en presencia del catión (Fig. 25a).

Debido a que el anticuerpo TS2/16 no pudo identificar en un inicio a las integrinas $\beta 1$ totales en las células Jurkat, nos preguntamos si este anticuerpo no podía identificarlas debido a que las integrinas se encontraban en un estado de activación. Con el fin de tratar de llevar a las integrinas a un estado inactivado, las células Jurkat se trataron con EDTA. El EDTA es un compuesto quelante que ante la presencia de cationes como el Ca^{2+} y el Mg^{2+} , se coordina con ellos, por lo que no permite que estos cationes favorezcan el estado de activación en las integrinas. El anticuerpo TS2/16 no pudo identificar a las integrinas $\beta 1$, en las células tratadas con EDTA a una concentración de 5mM (Fig. 25b), a pesar de que su estado conformacional es el inactivado, gracias a la presencia de EDTA.

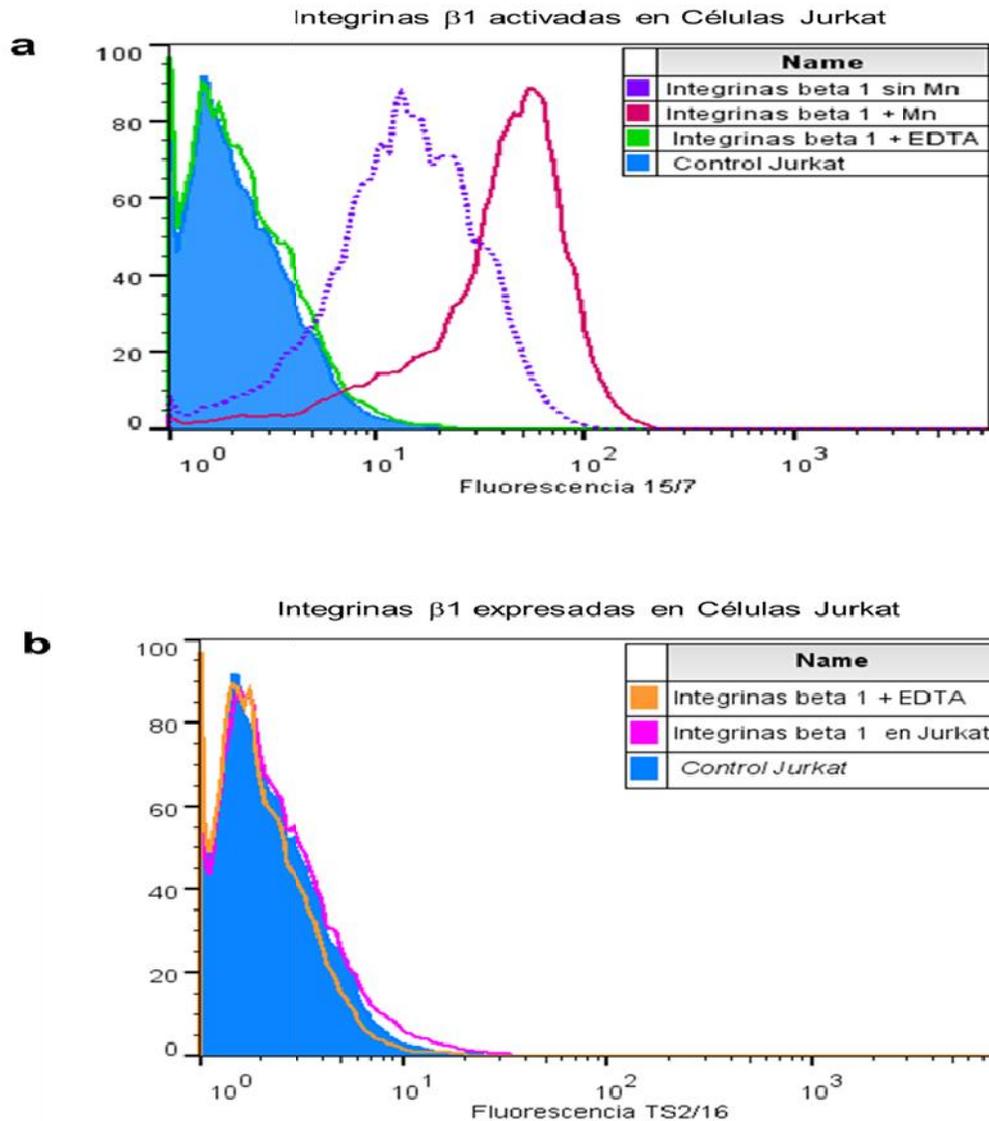


Figura 25. Histograma de la fluorescencia con anticuerpo monoclonal 15/7. Las células Jurkat se marcaron con los anticuerpos 15/7 (a) y TS2/16 (b) para la identificación de integrinas activadas o integrinas totales $\beta 1$ respectivamente con o sin la presencia de EDTA, o Mn^{2+} . En azul se presenta la fluorescencia del anticuerpo secundario solo. Histogramas representativos de tres experimentos realizados de manera independiente

Las integrinas $\beta 2$ totales expresadas en células Jurkat se identificaron fácilmente con el anticuerpo IB4 (Fig. 23b). Pero cuando las células fueron tratadas con cloruro de manganeso, el anticuerpo CBRM1/5 se unió poco a las células (Fig. 26a). Esto indica que las integrinas $\beta 2$ también se activaron por la presencia de Mn^{2+} , aunque

aparentemente muy poco. Por otro lado, el tratamiento de monocitos con Mn^{2+} también llevó a un pequeño aumento en la unión del anticuerpo CBRM1/5 (Fig. 26b). Esto nos sugiere que el tratamiento con Mn^{2+} puede activar integrinas $\beta 2$ en estas células, pero no eficientemente como lo refleja la unión del anticuerpo CBRM1/5.

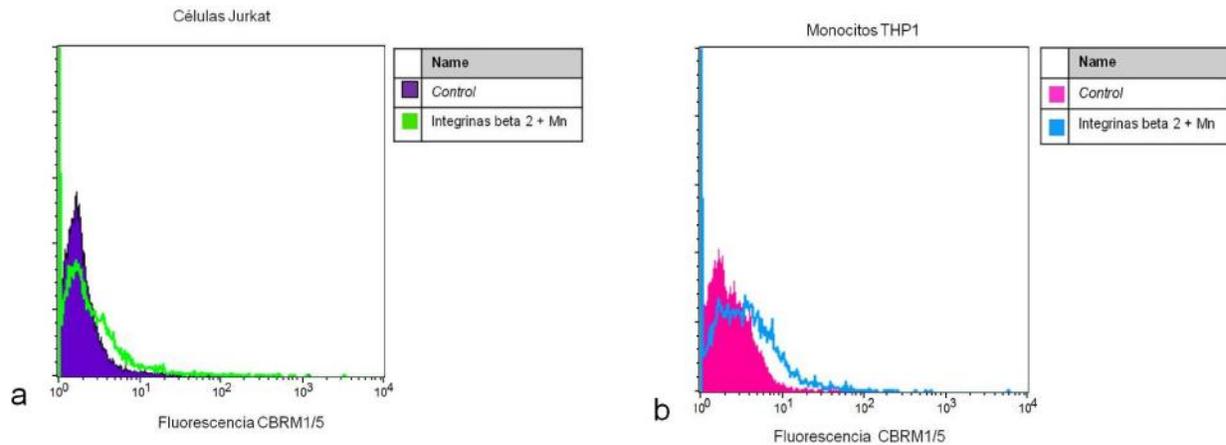


Figura 26. Determinación de Integrinas $\beta 2$ activadas en Células Jurkat y Monocitos en presencia de $MnCl_2$. Células Jurkat y monocitos THP1 se incubaron a $37^\circ C$ por 30 min en presencia de 500mM de $MnCl_2$. **a.** Células Jurkat marcadas con el anticuerpo CBRM1/5. **b.** Monocitos THP1 marcados con el anticuerpo CBRM1/5. El control son células marcadas con el anticuerpo secundario. Histogramas representativos de tres experimentos realizados de manera independiente

Finalmente, con estos resultados, se decidió no seguir con los experimentos hasta que contáramos con otros anticuerpos que pudieran identificar integrinas $\beta 1$ totales en las células Jurkat, así como otro método que identificara mejor las integrinas $\beta 2$ activadas. Sin esto, no teníamos un sistema eficiente para determinar el efecto sobre las integrinas cuando se transfectaran las células Jurkat con los plásmidos que codifican para R-Ras.

VII. DISCUSIÓN.

El estudio del funcionamiento de R-Ras en las células ha estado sujeto al uso de plásmidos que codifican para las mutantes activas y dominantes negativas de R-Ras debido principalmente, a que la manera en la que esta GTPasa es activada desde el exterior de la célula no ha sido elucidada. Para lograr este objetivo se ha clonado, dentro de plásmidos, el gen que codifica para la proteína silvestre, las mutantes constitutivamente activas (mutantes que siempre están señalizando hacia el interior de la célula) y las mutantes dominantes negativas (proteínas que inhiben el funcionamiento de R-Ras como molécula efectora), para después introducirlos en células y observar el efecto que cada una genera dentro de éstas. En diversos estudios R-Ras ha sido clonada en diferentes tipos de vectores, y la elección de dichos vectores depende del objetivo del estudio. En el caso de los trabajos realizados en el laboratorio del Dr. Rosales sobre esta GTPasa, se cuentan con dos vectores donde R-Ras está clonada; en el vector pDCR y en el vector retroviral pZipNeoSV(X) [113]. Ambos vectores tienen dentro de su secuencia una epitope de hemaglutinina (HA), un marcador de selección de Gentamicina y un gen de resistencia a ampicilina [67, 113]. Estas características permiten la inmunodetección de la proteína mediante anticuerpos que reconocen la tag de HA. El gen de Gentamicina permite que las células transfectadas con el plásmido sobrevivan a la presencia de este antibiótico y de esta manera puedan ser seleccionadas de las células que no contengan el plásmido. La presencia de este marcador de selección también permite obtener una línea celular que exprese de manera estable la proteína de interés ya que una vez que las células se dividen, éstas siguen expresando el gen [104]. Sin embargo estos vectores no contienen dentro de su secuencia un gen reportero que monitoree la expresión del

plásmido en las células transfectadas, como puede ser el gen de la β -galactosidasa, el de la proteína verde fluorescente (GFP) o el de la luciferasa. Además la expresión de un gen reportero como la GFP, permite visualizar las células transfectadas y determinar el efecto en ellas de la proteína de interés en un intervalo corto de tiempo, ya que algunas veces las proteínas en estudio suelen ser tóxicas para la célula, o la célula puede compensar, de alguna forma, la presencia de esta proteína cuando están presentes por mucho tiempo, como sucede en las transfecciones estables.

En el presente trabajo se decidió clonar el gen de R-Ras dentro del vector pIRES-hrGFP-1a el cual codifica para un gen reportero, la proteína verde fluorescente que nos permite monitorear la eficiencia de la transfección. A diferencia de otros vectores que generan proteínas fusionadas (proteína reportera unida con la proteína de interés) el vector pIRES-hrGFP-1a contiene una secuencia que codifica para un sitio de unión interno al ribosoma (IRES) del virus de la encefalomiocarditis (EMCV-IRES) unido a la secuencia de la GFP. La presencia del IRES permite que el ribosoma inicie, nuevamente, la traducción, reconociendo este sitio y reclutando toda la maquinaria celular para poder traducir la secuencia que contiene un codón de inicio, en este caso de la GFP [114]. Por lo que dentro del vector pIRES-hrGFP-1a se encuentra un sitio diseñado para insertar un fragmento de DNA (sitio de multiclonación) y un gen que codifica para la GFP. Este diseño permite que el gen clonado se exprese simultáneamente al gen reportero, evitando así los problemas de cambios físicos y biológicos que puede causar la fusión de la proteína clonada con la proteína que funciona como reportera, ya que la solubilidad y estabilidad de la proteína de interés pueden ser alteradas dramáticamente debido a la fusión, lo que puede comprometer su funcionamiento celular [104]. Otra de las características del vector pIRES-hrGFP-1a

es que dentro de su secuencia se localiza una epitope de FLAG, la cual es muy utilizada ya que hay una gran disponibilidad de anticuerpos que la reconocen. La secuencia FLAG se encuentra río abajo del sitio de multiclonación, por lo que se traduce fusionada con la proteína clonada. Esto permite que se pueda realizar una inmunodetección de la proteína de interés mediante la detección de la epitope de FLAG. También la secuencia del vector contiene dentro un sitio de recombinación específico mediado por la recombinasa Cre que permite la inserción de módulos prefabricados, como un marcador de selección como Neomicina o Gentamicina.

Con las características descritas anteriormente, se eligió este vector para clonar a R-Ras mediante una clonación direccionada, para lo que se utilizó como molde el vector retroviral pZipNeoSV(X) donde se encuentra clonada R-Ras silvestre y sus mutantes (87L, 38V y 43N). Para realizar una clonación direccionada se requiere que las terminaciones 5' y 3' del fragmento de DNA sean diferentes entre sí y sean complementarias con las terminaciones del vector. Esto se logra realizando cortes en la secuencia del vector y del DNA que se desea insertar con enzimas de restricción que generan extremos cohesivos. Sin embargo generalmente la secuencia del gen no contiene secuencias blanco para estas enzimas, justo en las terminaciones 5'- 3'. Entonces se diseñan oligos donde se añade la secuencia blanco de las enzimas seleccionadas y se amplifica el fragmento de DNA por PCR. De esta manera se obtiene el gen amplificado con los sitios de restricción de las enzimas. Al digerir el gen con las enzimas de restricción se generan los extremos cohesivos que se requieren. Las enzimas seleccionadas fueron Bam HI y Eco RI.

La amplificación del gen se realizó mediante PCR y su caracterización se llevó a cabo comparándolo con marcadores de tamaño comerciales de DNA (DNA ladder) en un gel

de agarosa al 2 %. El marcador DNA ladder contiene 15 fragmentos entre 100 y 1500 pb en múltiplos de 100 pb y un fragmento adicional de 2072 pb. La banda de 600 pb tiene una concentración mayor 2 a 3 veces más que cualquier otra banda. Este marcador nos sirvió de referencia, ya que el gen amplificado tiene una longitud de 680 pb [54, 111]. Una vez que se caracterizó, el fragmento amplificado fue purificado. Después el vector y el fragmento fueron sometidos a la digestión con las enzimas de restricción para generar los extremos cohesivos y unir al vector y los fragmentos mediante una reacción de ligación.

La reacción de ligación es llevada a cabo por la DNA ligasa la cual cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre nucleótidos adyacentes, únicamente si un nucleótido lleva un grupo fosfato en la terminación 5' y el otro nucleótido lleva un grupo hidróxilo en la terminación 3'. Cuando el vector es digerido por las endonucleasas para introducir el fragmento amplificado, se generan los extremos cohesivos que llevan el grupo fosfato en la terminación 5' y el grupo hidróxilo en su terminación 3', por lo que al realizar la reacción de ligación el vector puede volver a unirse, quedando vacío en el sitio de multiclonación. Para evitar esto, el vector ya digerido por las enzimas de restricción es sometido a una desfosforilación con la enzima fosfatasa alcalina. Esta enzima hidroliza los grupos fosfatos que se encuentran en las terminaciones 5' del DNA, de esta manera se disminuye la posibilidad de una religación del vector y se favorece la acción de la DNA ligasa para unir al vector con el fragmento de DNA amplificado. Además, la desfosforilación del vector favorece que la introducción del plásmido unido al vector en bacterias sea más eficiente, ya que un DNA circular transforma más eficientemente bacterias que un DNA linear desfosforilado. Sin embargo esto no garantiza que las bacterias transformantes no lleven un vector religado, pero sí disminuye la probabilidad.

Una vez que el vector se desfosforila, la fosfatasa alcalina se inactiva y se prepara la reacción de ligación. Al terminar la reacción de ligación se transforman bacterias competentes, con el producto de la reacción de ligación. En este paso se observó que, a pesar que se cuidaron las condiciones de la reacción, como temperatura, tiempo de incubación y concentración de sales, no se obtenían bacterias transformantes. Para revisar todos los factores que pudieran interferir en la clonación, se manejaron controles de eficiencia de la transformación, del funcionamiento de las enzimas utilizadas y de las condiciones ideales de cada reacción. Aun controlando todas las variables, no se obtenían colonias transformantes. El paso decisivo para la obtención de colonias transformantes después de revisar protocolos y condiciones de cada paso, fue la precipitación de la reacción de ligación. Se ha observado de manera experimental, que las soluciones buffer en las que las enzimas trabajan, afectan la viabilidad de algunas cepas de *E.coli*, debido a esto se precipitó la reacción de ligación y se resuspendió en agua para transformar bacterias químicamente competentes [103]. Para saber si las bacterias que crecieron en medio con presencia de ampicilina contenían el vector con el fragmento de DNA se realizó un análisis de restricción.

Un análisis de restricción se basa en la selección de endonucleasas que tienen secuencias blanco en el vector y en el gen, de forma tal que al cortar el plásmido se generan fragmentos de DNA que dan un patrón de corrida único en un gel de agarosa. A este patrón de corrida se le conoce como patrón de restricción [104, 115]. Mediante un análisis de las secuencias que tienen las enzimas dentro del vector y el gen (mapa de restricción) se puede realizar un mapa de restricción teórico del plásmido deseado, donde se pueden predecir las bandas que se pueden visualizar en un gel de agarosa para así poder determinar las bandas resultantes del proceso de digestión llevado a

cabo por las endonucleasas seleccionadas y saber si el inserto está dentro del plásmido, así como la orientación en la que se inserto el fragmento dentro del vector.

Las enzimas para realizar el análisis de restricción se eligieron bajo tres criterios: el primero fue que la enzima tuviera una secuencia blanco dentro del vector pero no dentro del gen de R-Ras, esto con la finalidad de linearizar el plásmido y comparar en un gel de agarosa la longitud del plásmido solo y del plásmido purificado. La enzima que cumplía con este criterio fue Xho I. Esta enzima corta al vector pIRES-hrGFP-1a en un solo sitio generando un plásmido lineal, en la figura 9 se observa la diferencia de longitudes entre el vector solo y el vector con el inserto, esta diferencia no es muy grande, como se esperaba, ya que el DNA insertado solo consta de 680 pb.

El segundo criterio de selección, fue una enzima que lograra liberar el fragmento de DNA y obtener un gel de agarosa donde se observara el fragmento clonado liberado y el vector solo. Esto se realizó para asegurarse que el fragmento de DNA clonado dentro del vector fuera el mismo que se amplificó. Las bandas que se esperaban en el gel eran una banda cercana a 700 pb y otra de 5.0 Kb (Fig. 10).

Finalmente para determinar la dirección del vector se eligió una enzima que tuviera secuencias blanco dentro del vector y dentro del gen de R-Ras. Nuevamente se realizó un análisis del mapa de restricción tanto del vector como del gen de R-Ras y se eligió a Hind III. Esta enzima tiene secuencias blanco en el nucleótido 11 y 114 de R-Ras y en el nucleótido 1047 del vector pIRES-hrGFP-1a. Con estos cortes se realizó un mapa de restricción teórico del plásmido deseado (Fig. 11b) y se determinó que las bandas esperadas en un gel de agarosa serian de 100 pb, de 1000 pb y de 4500 pb, si el gen se insertó en orientación correcta. En la figura 12 se observan las bandas esperadas en los carriles 11, 12 y 14. Estas bandas nos indican que la orientación del vector es la

correcta, ya que si se observa una sola banda como en el caso de los carriles 2, 3, 5 y 6, nos indica que el DNA amplificado no se inserto; si se ven otras bandas como en el caso de los carriles 4, 7, 9 nos indica que el DNA está insertado en la orientación incorrecta. Los plásmidos que mostraron los tres patrones de restricción correctos se eligieron para enviarlos a secuenciar. La secuencia reveló que el gen clonado corresponde a R-Ras silvestre (Fig.14).

La única proteína que se logró clonar mediante clonación direccionada en todos los casos fue R-Ras silvestre. A pesar que se siguió la misma metodología, las mutantes de R-Ras no se pudieron clonar. Esto probablemente se debió a una contaminación de los reactivos empleados en la PCR con el DNA molde de R-Ras silvestre. Para obtener los plásmidos faltantes se optó por la mutagénesis dirigida, ya que es una técnica muy sencilla comparada con una subclonación y se ahorra tiempo debido a que se emplea un kit comercial.

La mutagénesis es una metodología usada para realizar un cambio en la secuencia de bases en el DNA [104, 116]. Los cambios en la secuencia pueden ser dirigidos de manera diseñada (mutagénesis dirigida) o de manera aleatoria, para ello se usan modelos de organismos o cultivos celulares (*in vivo*) o vectores donde previamente se ha clonado el gen donde se desea realizar la mutación (*in vitro*) [117]. La mutagénesis *in vitro* puede utilizar como molde, DNA de una sola cadena (ssDNA) o DNA de doble cadena (dsDNA). Los métodos que emplean ssDNA como molde son laboriosos y requieren mucho tiempo para la subclonación y recuperación del DNA [104]. Por otro lado existen kits comerciales que utilizan diversas metodologías para realizar la mutagénesis dirigida en las que se usa como molde el DNA de doble cadena y oligodesoxinucleótidos diseñados donde se inserta la mutación deseada [116]. Uno de

los kits más usados es el QuikChange de Agilent Technologies. Este sistema utiliza la reacción en cadena de la polimerasa en donde se desnaturaliza el DNA templado, se alinean y extienden los oligos diseñados y se polimeriza el DNA. La polimerización del DNA es llevada a cabo por una DNA polimerasa que tiene una alta fidelidad para realizar la polimerización. Con esto se generan moléculas de DNA de una sola cadena que contiene la mutación deseada. Posteriormente se utiliza una endonucleasa (Dnp I) que digiere DNA que contiene secuencias metiladas y hemimetiladas, las cuales se encuentran sólo en el DNA molde, dejando solo el DNA de una sola cadena con la mutación deseada. El siguiente paso es la transformación de bacterias competentes con el producto de la reacción, donde el DNA de cadena simple mutado es convertido a su forma bicatenaria *in vivo*. Las bacterias que son capaces de expresar el plásmido son aisladas para posteriormente purificar el plásmido y determinar si la mutación deseada se encuentra dentro del gen.

La mutagénesis se realizó como se indica en la metodología y se obtuvieron bacterias transformantes de las cuales se purificó el DNA plasmídico y se envió a secuenciar. La secuencia confirmó que las mutaciones en los aminoácidos en las posiciones 38, 41, 43 y 87 de R-Ras se obtuvieron correctamente (Fig. 14). Durante la obtención de todos los plásmidos que codifican para R-Ras silvestre y sus diferentes mutantes, se comenzó a trabajar con la línea celular para determinar el mejor método de transfección y establecer las condiciones para introducir el DNA plasmídico en la línea celular de linfocitos T.

La transfección celular es una técnica que introduce ácidos nucleicos en las células para producir células genéticamente modificadas. Es usada para el estudio de genes así como la función y regulación de una proteína [118]. En el laboratorio esta técnica ha

sido utilizada para estudiar el funcionamiento de diversas proteínas en leucocitos; sin embargo estudios previos han mostrado que la eficiencia de la transfección en estas células es muy baja, debido, principalmente, a que son células que crecen en suspensión, llevan a cabo una rápida digestión de los materiales endocitados y específicamente los linfocitos T no realizan el proceso de endocitosis, por lo que los métodos de transfección más usuales como los químicos no son adecuados para este tipo de célula, ya que el principio de estos métodos está basado en la endocitosis que realiza la célula. Por otro lado una transfección transitoria en este tipo de célula es la más viable debido a que se obtiene en un tiempo relativamente corto de tiempo y es más eficiente (10 veces mayor) que las transfecciones estables. Debido a que las células como los linfocitos T son difíciles de transfectar se decidió obtener una transfección transitoria [119-125].

En este estudio, para obtener una línea celular que exprese de manera transitoria a R-Ras, utilizamos el vector pIRES-hrGFP-1a, el cual, como ya se expuso anteriormente, expresa, de manera simultánea, al gen clonado y a la proteína verde fluorescente. Esta característica es muy importante, ya que si se tuviera un vector que generara una proteína fusionada puede afectar el funcionamiento de R-Ras en la célula debido a que las modificaciones postraduccionales ubicadas en su carboxilo terminal están asociadas a su localización en la membrana, lo cual es indispensable para poder interactuar con sus moléculas efectoras y desencadenar las vías de señalización en las que participa [47, 55, 59-62]. También nos permite monitorear la expresión de R-Ras con la proteína verde fluorescente y medir los efectos de la proteína en las células transfectadas con el plásmido que la codifica, aun sí hay una sola célula transfectada [104, 124]. Para llevar a cabo la transfección, existen diferentes métodos para células

de mamíferos. Uno de los métodos más efectivos de transfección usados en células que crecen en suspensión es la electroporación. Este método de transfección es uno de los métodos físicos más usados; el mecanismo por el cual introduce el DNA en las células no es del todo claro, sin embargo se deduce que al utilizar un pulso eléctrico altera la membrana plasmática y hace poros en la membrana por donde los ácidos nucleicos pueden pasar [104, 118]. Este método además no es tóxico para la célula y puede transfectar un gran número de células al mismo tiempo. Sin embargo también es una técnica donde se reporta una viabilidad celular del 50 % después de la transfección en algunas líneas celulares [121]. Los parámetros críticos para obtener una alta eficiencia de la transfección con estas células es el pulso (voltaje y capacitancia) así como la solución buffer que se utiliza para la electroporación. [118-120]

Para determinar las condiciones de pulso óptimas se probaron diferentes condiciones reportadas en la literatura donde se realizaron transfecciones con líneas celulares de linfocitos T, como células Jurkat o células Molt-4 [105, 108, 110, 126]. Como se describió en la metodología, se probaron 3 condiciones de pulso, se varió también el número de células y la cantidad de DNA plasmídico. Aunque hay soluciones buffer que son recomendables para usar en la electroporación, para células sensibles como los linfocitos se ha reportado que la viabilidad de las células es mayor si se utiliza medio completo, aunque los iones, como el magnesio o el calcio, presentes en el medio pueden disminuir la eficiencia de la transfección [119]. En las condiciones donde se encontró una mayor eficiencia se utilizó un pulso de 250 V y 900 μ F de capacitancia utilizando medio completo como buffer en la transfección [119].

Durante la búsqueda de las condiciones donde se obtuvieran células transfectadas, se observó que la calidad del DNA es un parámetro determinante para obtener células

transfectadas, debido a la presencia de endotoxinas producidas por las bacterias, RNAsas, o cualquier otra proteína residuo de la purificación del plásmido que pudieran afectar la viabilidad de la célula. Esto se observó ya que el DNA utilizado en los primeros ensayos se purificó por columnas comerciales y no se obtuvieron células transfectadas. Por lo que se decidió purificar el DNA por el método de gradiente de Cloruro de Cesio- Bromuro de Etidio. Este método asegura que el DNA purificado esté libre de endonucleasas, toxinas, RNAsas, RNA o cualquier otro residuo de la purificación que pudiera afectar la entrada del DNA a la célula o la viabilidad de la misma [104, 119]. Ya que estos experimentos se realizaron al mismo tiempo que se obtenía el plásmido de las diferentes mutantes de R-Ras y sólo se contaba con el que codificaba para R-Ras silvestre, las pruebas de transfección se realizaron con el vector R-Ras-wt-pIRES y el vector vacío.

Una vez obtenidas las células transfectadas, éstas se observaron bajo microscopia de fluorescencia, donde se vio que muy pocas células expresaban GFP, por lo que se decidió determinar la eficiencia de la transfección usando el citómetro de flujo.

Los métodos más comunes para determinar la eficiencia de la transfección de un vector que se expresa de manera transitoria se basan en la detección de la expresión de genes reporteros como la β -galactosidas, la luciferasa o la proteína verde fluorescente [123, 127]. Estos genes pueden introducirse a la célula ya sea por un plásmido que codifique sólo al gen reportero y al mismo tiempo otro plásmido que codifique al gen de interés o dentro de un plásmido que codifique para ambos genes. Generalmente en las transfecciones transitorias es muy usado este tipo de genes ya que no se pretende que el gen se exprese de manera estable por lo que el gen reportero es de mucha ayuda para determinar el número de células que expresan el DNA introducido. La proteína

verde fluorescente es uno de los genes reporteros más usados, de hecho a lo largo de los años se ha modificado su estructura ya sea para cambiar la longitud de onda en la que emite su fluorescencia o para aumentar la intensidad de la fluorescencia, además se han introducido mutaciones para crear codones humanos y con ello aumentar la eficiencia de la expresión en células de mamíferos [104, 127]. La expresión de GFP es usualmente detectada por microscopia de fluorescencia o por citometría de flujo [127]. La fluorescencia de la proteína nos permite monitorear la expresión del gen en tiempo real y su localización mediante la microscopia de fluorescencia o nos permite analizar y clasificar las células a partir de una población grande con una alta sensibilidad mediante el citómetro de flujo.

Para determinar la eficiencia de la transfección por citometría de flujo (FACS; del inglés fluorescence-activated cell sorter) se detectó la fluorescencia emitida por las células que expresaban la GFP. Esto indicó una eficiencia de transfección de 70 %. Las células positivas a GFP se separaron por cell sorting, y se recuperaron para mantenerlas en cultivo por dos semanas. Al cabo de este tiempo, la expresión de GFP se perdía.

Una vez que se determinó la eficiencia de la transfección y el tiempo de máxima expresión de la GFP, se procedió a determinar las condiciones para identificar integrinas a totales en las células Jurkat.

Las integrinas son moléculas de adhesión que se encuentran expresadas en la superficie celular en un estado de baja afinidad a su ligando. Para que las integrinas puedan unirse a sus moléculas blanco necesitan ser estimuladas por una serie de señales intracelulares conocidas como señalamiento de adentro hacia afuera [30, 32, 33]. Estas señales tienen como objetivo la reorganización del citoesqueleto para que la talina se una a la porción citoplasmática de las integrinas, generando así cambios

conformacionales hacia sus porciones extracelulares, donde el ligando puede unirse. A este proceso de cambio de afinidad a su ligando se le llama activación de las integrinas [29, 36]. Cuando las integrinas son activadas, el cambio conformacional que se lleva a cabo, resulta en la exposición del sitio de unión inducido del ligando (LIMBS, por sus siglas en inglés Ligand Induced Binding Site), este sitio puede ser reconocido por diferentes anticuerpos monoclonales [128].

Uno de los anticuerpos más utilizados para el reconocimiento de integrinas $\beta 1$ activadas es el 15/7 que reconoce estos epitopes cuando las integrinas son inducidas por la unión a sus ligandos, por lo que se asume que este anticuerpo puede reconocer la unión del ligando con la integrina [128]. Otro de los anticuerpos usados es el CBRM1/5 que reconoce a las integrinas $\beta 2$ en su conformación activa. Este anticuerpo es el único que ha mostrado reconocer la región α -I que es donde se une el ligando en las integrinas que lo presentan [36]. Por otro lado, en diferentes estudios sobre la activación de las integrinas, reportan que los cationes divalentes como el Mg^{2+} , Ca^{2+} y Mn^{2+} tienen la capacidad de alterar la afinidad de las integrinas hacia su ligando. Se ha reportado que el Mn^{2+} produce el mayor aumento en la afinidad de las integrinas $\alpha 5\beta 1$ a fibronectina comparado con otros cationes (Ca^{2+} y Mg^{2+}). Estos resultados fueron confirmados posteriormente con una gran variedad de integrinas. Por lo que el uso de Mn^{2+} ha sido muy utilizado como control positivo cuando se estudia la activación de las integrinas [33, 36, 128, 129].

La detección de integrinas expresadas a nivel basal en las células Jurkat se realizó con la finalidad de establecer los parámetros de comparación entre células cultivadas sin ser sometidas a la transfección con las células transfectadas. Como primer paso se detectaron integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ que son las que se expresan de manera mayoritaria en

estas células. Para identificar estas integrinas se utilizaron los anticuerpos TS2/16 y el IB4 respectivamente. Como anticuerpo secundario se eligió un anti-IgG de ratón acoplado al fluorocromo Alexa 647, el cual emite fluorescencia roja. Esto permite diferenciar la fluorescencia verde de la GFP. El anticuerpo TS2/16 es un anticuerpo que identifica a la cadena β en los residuos 207-218 y pertenece al grupo de anticuerpos llamados anti LIMBS (anti-ligand induced binding site), los cuales tienen la característica de activar a las integrinas y favorecer su unión al ligando [130]. Las células Jurkat en las que se utilizó este anticuerpo para identificar a las integrinas $\beta 1$, se encontraban en cultivo y no habían sido estimuladas por ningún factor por lo que este anticuerpo solo reconocería la presencia de la cadena $\beta 1$ de las integrinas en las células Jurkat. Sin embargo este anticuerpo no identificó integrinas $\beta 1$ en las células Jurkat a pesar que se sabe que los linfocitos T expresan la integrina $\alpha 4\beta 1$ y que este anticuerpo se ha usado en diferentes trabajos en el laboratorio para identificar estas integrinas en diferentes tipos celulares [131, 132]. Debido a esto se procedió a probar si el anticuerpo era capaz de reconocer integrinas $\beta 1$ en otro tipo celular como monocitos THP1 y neutrófilos purificados de sangre periférica. Este anticuerpo sí identificó a las integrinas $\beta 1$ en neutrófilos y monocitos pero no en las células Jurkat, lo cual sugiere fuertemente que las integrinas ya están en una conformación diferente.

Con respecto a la integrina $\beta 2$ se utilizó el anticuerpo IB4 para identificar a las integrinas $\beta 2$. Los linfocitos T expresan a la integrina $\alpha L\beta 2$ y también en menor cantidad las integrinas $\alpha M\beta 2$. Efectivamente, encontramos presencia de integrinas $\beta 2$ en la membrana de las células Jurkat [131, 132]

Para activar a las integrinas de las células Jurkat se utilizó el $MnCl_2$ y para la detección de integrinas $\beta 1$ activadas y $\beta 2$ activadas se usaron los anticuerpos 15/7 y el CBRM1/5, respectivamente. El anticuerpo 15/7 reconoce una región cercana al sitio de unión al ligando que se expone cuando es activada la integrina y se llevan a cabo cambios conformacionales [130]. El anticuerpo CBRM1/5 por su parte reconoce una región dentro del sitio del ligando en las integrinas $\alpha M\beta 2$ [36, 133].

Debido a que el anticuerpo 15/7 sí identificó integrinas $\beta 1$ activadas y el anticuerpo TS2/16 no, surgió la interrogante de por qué el anticuerpo no estaba reconociendo a las integrinas $\beta 1$ expresadas en estas células. Se procedió entonces a marcar a las células Jurkat sin y con presencia de Mn^{2+} y además en presencia de EDTA para observar si las integrinas $\beta 1$ estaban en un estado activado. Se ha reportado que las integrinas pueden estar en tres estados conformacionales, estado inactivo, estado activado y el estado donde está unido al ligando. Estos estados conformacionales pueden estar en equilibrio. Al marcar a las células Jurkat con anticuerpo 15/7 se encontró detección de integrinas $\beta 1$. Al añadir Mn^{2+} , la unión del anticuerpo aumentó y en presencia de EDTA no hubo unión del anticuerpo. Esto sugiere que algunas de las integrinas $\beta 1$ expresadas en la célula ya se encuentran en un estado de activación y que con la presencia de Mn^{2+} , el resto de las integrinas son activadas. Estos resultados nos llevaron a pensar que tal vez el anticuerpo TS2/16 no reconocía a las integrinas debido a que ya se encontraban en un estado de activación, por lo que se incubaron las células con EDTA para tratar de eliminar cualquier catión que estuviera presente en la célula y favorecer el estado inactivo. Sin embargo se obtuvieron los mismos resultados, el anticuerpo TS2/16 no identificó a las integrinas $\beta 1$. Estos resultados sugieren que el

anticuerpo TS2/16 no es capaz de identificar a las integrinas $\beta 1$ en estas células debido a que se encuentran en una conformación, en la cual, no se expone la epítpe que identifica este anticuerpo en la cadena $\beta 1$.

En presencia de Mn^{2+} , el anticuerpo CBRM1/5 se unió un poco a las células. Esto indica que las integrinas $\beta 2$ también se activaron por la presencia de Mn^{2+} , aunque aparentemente muy poco. Por otro lado, el tratamiento de monocitos con Mn^{2+} también llevó a un pequeño aumento en la unión del anticuerpo CBRM1/5 (Fig. 26). Esto nos sugiere que el tratamiento con Mn^{2+} puede activar integrinas $\beta 2$ en estas células, pero no eficientemente como lo refleja la unión del anticuerpo CBRM1/5.

Finalmente, durante todo el trabajo de investigación sólo se pudieron obtener los diferentes plásmidos que codifican para R-Ras silvestre y sus diferentes mutantes así como determinar condiciones de transfección con una eficiencia del 70%, sin embargo no se pudieron establecer las mejores condiciones para detectar la activación de integrinas en estas células, por lo que hay que buscar otras alternativas para observar el efecto que tiene R-Ras sobre la activación de las integrinas en linfocitos T.

VIII. CONCLUSIONES

1. Se construyeron 5 plásmidos cada uno de los cuales codifica para la proteína R-Ras wt, R-Ras 38V, R-Ras 41A, R-Ras 43N y R-Ras 87L respectivamente, además todos ellos expresan la proteína verde fluorescente de manera simultánea.
2. Los plasmido obtenidos son una herramienta útil para la obtención de líneas celulares donde se pueda estudiar el efecto de R-Ras con la ayuda de la expresión de GFP que se expresa de manera simultánea a R-Ras.
3. Para la determinación de las integrinas expresadas en las células Jurkat se encontró que los anticuerpos utilizados no son los adecuados para estas células, por lo que se tiene que hacer uso de otros anticuerpos que reconozcan de manera basal a las integrinas $\beta 1$ y a las integrinas activadas $\beta 2$ expresadas en estas células para poder medir el efecto de R-Ras sobre las integrinas en linfocitos T, por medio de la aplicación de la citometría de flujo como método de detección.

IX. REFERENCIAS

1. K Abul, Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S: **Inmunología Celular y Molecular**, 6 edn. Madrid, España: Elsevier; 2009.
2. TJ Kindt, Osbone. B.A., Goldsby, R.A: **Kuby Immunology**, 6 edn. New York, N.Y.: W. H. Freeman & Company; 2007.
3. IM Roitt, Delves,P.J: **Roitt´s Essential immunology**, 10 edn. Malden, Massachusetts: Bleck well science. ; 2001.
4. JM Cruse, Lewis, R.E: **Atlas of immunology**, third edn. Jackson, Misisipi: CRC Press; 2010.
5. M O´Gorman, Donnenberg, A: **Handbook of human Immunology**, 2 edn. Jackson, Misisipi: CRC Press; 2008.
6. A Vander, Sherman, J. Luciano: **Human physiology: The Mechanisms of Body Function**, 8 edn; 2001.
7. L Hawley, M Ruebush, DJ Dunn, TF Lint: **USMLE Step 1 Microbiology and Immunology Notes**. New York: Kaplan Medical; 2004.
8. S Romagnani, E Maggi, F Liotta, L Cosmi, F Annunziato: **Properties and origin of human Th17 cells**. *Mol Immunol* 2009, **47**:3-7.
9. BJ Burbach, RB Medeiros, KL Mueller, Y Shimizu: **T-cell receptor signaling to integrins**. *Immunol Rev* 2007, **218**:65-81.
10. CC Denucci, JS Mitchell, Y Shimizu: **Integrin function in T-cell homing to lymphoid and nonlymphoid sites: getting there and staying there**. *Crit Rev Immunol* 2009, **29**:87-109.
11. Sanguineti AC, R-T JM.: **Moléculas de adhesión y piel**. *Dermatología Peruana* 1999, **9**:137-139.
12. AE Aplin, A Howe, SK Alahari, RL Juliano: **Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins**. *Pharmacol Rev* 1998, **50**:197-263.
13. ML Dustin, TA Springer: **Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion**. *Annu Rev Immunol* 1991, **9**:27-66.
14. RL Juliano: **Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members**. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002, **42**:283-323.
15. K Ley, C Laudanna, MI Cybulsky, S Nourshargh: **Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated**. *Nat Rev Immunol* 2007, **7**:678-89.
16. B Schleiffenbaum, J Fehr: **Regulation and selectivity of leukocyte emigration**. *J Lab Clin Med* 1996, **127**:151-68.
17. Y Shimizu, W Newman, Y Tanaka, S Shaw: **Lymphocyte interactions with endothelial cells**. *Immunol Today* 1992, **13**:106-12.
18. TM Zollner, K Asadullah: **Selectin and selectin ligand binding: a bittersweet attraction**. *J Clin Invest* 2003, **112**:980-3.
19. RP McEver, KL Moore, RD Cummings: **Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions**. *J Biol Chem* 1995, **270**:11025-8.
20. TF Tedder, DA Steeber, A Chen, P Engel: **The selectins: vascular adhesion molecules**. *FASEB J* 1995, **9**:866-73.
21. SD Rosen, CR Bertozzi: **Two selectins converge on sulphate. Leukocyte adhesion**. *Curr Biol* 1996, **6**:261-4.
22. A de Fougérolles, TA Springer: **Ideas crystallized on immunoglobulin superfamily-integrin interactions**. *Chem Biol* 1995, **2**:639-43.
23. TA Springer: **Adhesion receptors of the immune system**. *Nature* 1990, **346**:425-34.
24. CG Gahmberg, L Valmu, A Kotovuori, P Kotovuori, TJ Hilden, S Fagerholm, C Kantor, T Nurminen, E Ihanus, L Tian: **Leukocyte adhesion--an integrated molecular process at the leukocyte plasma membrane**. *Biosci Rep* 1999, **19**:273-81.
25. U Cavallaro, G Christofori: **Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer**. *Nat Rev Cancer* 2004, **4**:118-32.
26. CW Smith: **3. Adhesion molecules and receptors**. *J Allergy Clin Immunol* 2008, **121**:S375-9; quiz S414.
27. C Rosales, RL Juliano: **Signal transduction by cell adhesion receptors in leukocytes**. *J Leukoc Biol* 1995, **57**:189-98.

28. C Laudanna, M Bolomini-Vittori: **Integrin activation in the immune system.** *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2009, **1**:116-27.
29. FG Giancotti, E Ruoslahti: **Integrin signaling.** *Science* 1999, **285**:1028-32.
30. E Ruoslahti: **Integrins.** *J Clin Invest* 1991, **87**:1-5.
31. M Shimonaka, K Katagiri, T Nakayama, N Fujita, T Tsuruo, O Yoshie, T Kinashi: **Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow.** *J Cell Biol* 2003, **161**:417-27.
32. ID Campbell, MJ Humphries: **Integrin structure, activation, and interactions.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011, **3**.
33. BH Luo, CV Carman, TA Springer: **Structural basis of integrin regulation and signaling.** *Annu Rev Immunol* 2007, **25**:619-47.
34. Y Tanaka: **T cell integrin activation by chemokines in inflammation.** *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2000, **48**:443-50.
35. G Menasche, S Kliche, N Bezman, B Schraven: **Regulation of T-cell antigen receptor-mediated inside-out signaling by cytosolic adapter proteins and Rap1 effector molecules.** *Immunol Rev* 2007, **218**:82-91.
36. M Shimaoka, J Takagi, TA Springer: **Conformational regulation of integrin structure and function.** *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2002, **31**:485-516.
37. BH Luo, TA Springer: **Integrin structures and conformational signaling.** *Curr Opin Cell Biol* 2006, **18**:579-86.
38. MA Arnaout, SL Goodman, JP Xiong: **Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion.** *Curr Opin Cell Biol* 2007, **19**:495-507.
39. CV Carman, TA Springer: **Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized?** *Curr Opin Cell Biol* 2003, **15**:547-56.
40. CA Lowell, G Berton: **Integrin signal transduction in myeloid leukocytes.** *J Leukoc Biol* 1999, **65**:313-20.
41. AE Berman, NI Kozlova, GE Morozovich: **Integrins: structure and signaling.** *Biochemistry (Mosc)* 2003, **68**:1284-99.
42. MA Schwartz: **Integrin signaling revisited.** *Trends Cell Biol* 2001, **11**:466-70.
43. RJ Faull, MH Ginsberg: **Inside-out signaling through integrins.** *J Am Soc Nephrol* 1996, **7**:1091-7.
44. T Kinashi: **Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes.** *Nat Rev Immunol* 2005, **5**:546-59.
45. CL Abram, CA Lowell: **The ins and outs of leukocyte integrin signaling.** *Annu Rev Immunol* 2009, **27**:339-62.
46. C Brakebusch, D Bouvard, F Stanchi, T Sakai, R Fassler: **Integrins in invasive growth.** *J Clin Invest* 2002, **109**:999-1006.
47. GW Reuther, CJ Der: **The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree.** *Curr Opin Cell Biol* 2000, **12**:157-65.
48. LE Goldfinger: **Choose your own path: specificity in Ras GTPase signaling.** *Mol Biosyst* 2008, **4**:293-9.
49. L Buday, J Downward: **Many faces of Ras activation.** *Biochim Biophys Acta* 2008, **1786**:178-87.
50. K Kinbara, LE Goldfinger, M Hansen, FL Chou, MH Ginsberg: **Ras GTPases: integrins' friends or foes?** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, **4**:767-76.
51. JL Bos: **Ras-like GTPases.** *Biochim Biophys Acta* 1997, **1333**:M19-31.
52. JL Bos: **ras oncogenes in human cancer: a review.** *Cancer Res* 1989, **49**:4682-9.
53. M Erdogan: **R-Ras Proteins and TGF-Beta in cancer.** Nashville, Tennessee: Vanderbilt University; 2008.
54. DG Lowe, DJ Capon, E Delwart, AY Sakaguchi, SL Naylor, DV Goeddel: **Structure of the human and murine R-ras genes, novel genes closely related to ras proto-oncogenes.** *Cell* 1987, **48**:137-46.
55. A Ehrhardt, GR Ehrhardt, X Guo, JW Schrader: **Ras and relatives--job sharing and networking keep an old family together.** *Exp Hematol* 2002, **30**:1089-106.
56. MD Garrett, AJ Self, C van Oers, A Hall: **Identification of distinct cytoplasmic targets for ras/R-ras and rho regulatory proteins.** *J Biol Chem* 1989, **264**:10-3.
57. I Rey, P Taylor-Harris, H van Erp, A Hall: **R-ras interacts with rasGAP, neurofibromin and c-raf but does not regulate cell growth or differentiation.** *Oncogene* 1994, **9**:685-92.

58. M Spaargaren, GA Martin, F McCormick, MJ Fernandez-Sarabia, JR Bischoff: **The Ras-related protein R-ras interacts directly with Raf-1 in a GTP-dependent manner.** *Biochem J* 1994, **300 (Pt 2)**:303-7.
59. DG Lowe, DV Goeddel: **Heterologous expression and characterization of the human R-ras gene product.** *Mol Cell Biol* 1987, **7**:2845-56.
60. B Oertli, J Han, BM Marte, T Sethi, J Downward, M Ginsberg, PE Hughes: **The effector loop and prenylation site of R-Ras are involved in the regulation of integrin function.** *Oncogene* 2000, **19**:4961-9.
61. X Dong, DA Mitchell, S Lobo, L Zhao, DJ Bartels, RJ Deschenes: **Palmitoylation and plasma membrane localization of Ras2p by a nonclassical trafficking pathway in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol Cell Biol* 2003, **23**:6574-84.
62. JG Wurtzel, P Kumar, LE Goldfinger: **Palmitoylation regulates vesicular trafficking of R-Ras to membrane ruffles and effects on ruffling and cell spreading.** *Small GTPases* 2012, **3**:139-53.
63. JX Zou, Y Liu, EB Pasquale, E Ruoslahti: **Activated SRC oncogene phosphorylates R-ras and suppresses integrin activity.** *J Biol Chem* 2002, **277**:1824-7.
64. B Wang, JX Zou, B Ek-Rylander, E Ruoslahti: **R-Ras contains a proline-rich site that binds to SH3 domains and is required for integrin activation by R-Ras.** *J Biol Chem* 2000, **275**:5222-7.
65. SP Holly, MK Larson, LV Parise: **The unique N-terminus of R-ras is required for Rac activation and precise regulation of cell migration.** *Mol Biol Cell* 2005, **16**:2458-69.
66. R Saez, AM Chan, T Miki, SA Aaronson: **Oncogenic activation of human R-ras by point mutations analogous to those of prototype H-ras oncogenes.** *Oncogene* 1994, **9**:2977-82.
67. SY Huff, LA Quilliam, AD Cox, CJ Der: **R-Ras is regulated by activators and effectors distinct from those that control Ras function.** *Oncogene* 1997, **14**:133-43.
68. LA Feig: **Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases.** *Nat Cell Biol* 1999, **1**:E25-7.
69. AD Cox, TR Brtva, DG Lowe, CJ Der: **R-Ras induces malignant, but not morphologic, transformation of NIH3T3 cells.** *Oncogene* 1994, **9**:3281-8.
70. M Osada, T Tolkacheva, W Li, TO Chan, PN Tschlis, R Saez, AC Kimmelman, AM Chan: **Differential roles of Akt, Rac, and Ral in R-Ras-mediated cellular transformation, adhesion, and survival.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**:6333-44.
71. H Rincon-Arano, R Rosales, N Mora, A Rodriguez-Castaneda, C Rosales: **R-Ras promotes tumor growth of cervical epithelial cells.** *Cancer* 2003, **97**:575-85.
72. Y Yu, LA Feig: **Involvement of R-Ras and Ral GTPases in estrogen-independent proliferation of breast cancer cells.** *Oncogene* 2002, **21**:7557-68.
73. M Erdogan, A Pozzi, N Bhowmick, HL Moses, R Zent: **Transforming growth factor-beta (TGF-beta) and TGF-beta-associated kinase 1 are required for R-Ras-mediated transformation of mammary epithelial cells.** *Cancer Res* 2008, **68**:6224-31.
74. M Nishigaki, K Aoyagi, I Danjoh, M Fukaya, K Yanagihara, H Sakamoto, T Yoshida, H Sasaki: **Discovery of aberrant expression of R-RAS by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays.** *Cancer Res* 2005, **65**:2115-24.
75. J Suzuki, Y Kaziro, H Koide: **An activated mutant of R-Ras inhibits cell death caused by cytokine deprivation in BaF3 cells in the presence of IGF-I.** *Oncogene* 1997, **15**:1689-97.
76. J Suzuki, Y Kaziro, H Koide: **Synergistic action of R-Ras and IGF-1 on Bcl-xL expression and caspase-3 inhibition in BaF3 cells: R-Ras and IGF-1 control distinct anti-apoptotic kinase pathways.** *FEBS Lett* 1998, **437**:112-6.
77. J Suzuki, Y Kaziro, H Koide: **Positive regulation of skeletal myogenesis by R-Ras.** *Oncogene* 2000, **19**:1138-46.
78. HG Wang, JA Millan, AD Cox, CJ Der, UR Rapp, T Beck, H Zha, JC Reed: **R-Ras promotes apoptosis caused by growth factor deprivation via a Bcl-2 suppressible mechanism.** *J Cell Biol* 1995, **129**:1103-14.
79. GS Griffiths, M Grundl, JS Allen, 3rd, ML Matter: **R-Ras interacts with filamin a to maintain endothelial barrier function.** *J Cell Physiol* 2011, **226**:2287-96.
80. J Sawada, T Urakami, F Li, A Urakami, W Zhu, M Fukuda, DY Li, E Ruoslahti, M Komatsu: **Small GTPase R-Ras regulates integrity and functionality of tumor blood vessels.** *Cancer Cell* 2012, **22**:235-49.

81. I Oinuma, H Katoh, M Negishi: **R-Ras controls axon specification upstream of glycogen synthase kinase-3beta through integrin-linked kinase.** *J Biol Chem* 2007, **282**:303-18.
82. Z Zhang, K Vuori, H Wang, JC Reed, E Ruoslahti: **Integrin activation by R-ras.** *Cell* 1996, **85**:61-9.
83. JX Zou, B Wang, MS Kalo, AH Zisch, EB Pasquale, E Ruoslahti: **An Eph receptor regulates integrin activity through R-Ras.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:13813-8.
84. M Dail, M Richter, P Godement, EB Pasquale: **Eph receptors inactivate R-Ras through different mechanisms to achieve cell repulsion.** *J Cell Sci* 2006, **119**:1244-54.
85. M Nakada, JA Niska, NL Tran, WS McDonough, ME Berens: **EphB2/R-Ras signaling regulates glioma cell adhesion, growth, and invasion.** *Am J Pathol* 2005, **167**:565-76.
86. J Furuholm, J Peranen: **The C-terminal end of R-Ras contains a focal adhesion targeting signal.** *J Cell Sci* 2003, **116**:3729-38.
87. AL Cole, G Subbanagounder, S Mukhopadhyay, JA Berliner, DK Vora: **Oxidized phospholipid-induced endothelial cell/monocyte interaction is mediated by a cAMP-dependent R-Ras/PI3-kinase pathway.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003, **23**:1384-90.
88. AJ Self, E Caron, HF Paterson, A Hall: **Analysis of R-Ras signalling pathways.** *J Cell Sci* 2001, **114**:1357-66.
89. JK Ivins, PD Yurchenco, AD Lander: **Regulation of neurite outgrowth by integrin activation.** *J Neurosci* 2000, **20**:6551-60.
90. AS Ada-Nguema, H Xenias, JM Hofman, CH Wiggins, MP Sheetz, PJ Keely: **The small GTPase R-Ras regulates organization of actin and drives membrane protrusions through the activity of PLCepsilon.** *J Cell Sci* 2006, **119**:1307-19.
91. PJ Keely, EV Rusyn, AD Cox, LV Parise: **R-Ras signals through specific integrin alpha cytoplasmic domains to promote migration and invasion of breast epithelial cells.** *J Cell Biol* 1999, **145**:1077-88.
92. AL Berrier, AM Mastrangelo, J Downward, M Ginsberg, SE LaFlamme: **Activated R-ras, Rac1, PI 3-kinase and PKCepsilon can each restore cell spreading inhibited by isolated integrin beta1 cytoplasmic domains.** *J Cell Biol* 2000, **151**:1549-60.
93. T Kinashi, K Katagiri, S Watanabe, B Vanhaesebroeck, J Downward, K Takatsu: **Distinct mechanisms of alpha 5beta 1 integrin activation by Ha-Ras and R-Ras.** *J Biol Chem* 2000, **275**:22590-6.
94. PS Hodgkinson, PA Elliott, Y Lad, BJ McHugh, AC MacKinnon, C Haslett, T Sethi: **Mammalian NOTCH-1 activates beta1 integrins via the small GTPase R-Ras.** *J Biol Chem* 2007, **282**:28991-9001.
95. JE Gawecka, GS Griffiths, B Ek-Rylander, JW Ramos, ML Matter: **R-Ras regulates migration through an interaction with filamin A in melanoma cells.** *PLoS One* 2010, **5**:e11269.
96. C Sandri, F Caccavari, D Valdembri, C Camillo, S Veltel, M Santambrogio, L Lanzetti, F Bussolino, J Ivaska, G Serini: **The R-Ras/RIN2/Rab5 complex controls endothelial cell adhesion and morphogenesis via active integrin endocytosis and Rac signaling.** *Cell Res* 2012, **22**:1479-501.
97. A Takaya, T Kamio, M Masuda, N Mochizuki, H Sawa, M Sato, K Nagashima, A Mizutani, A Matsuno, E Kiyokawa, et al: **R-Ras regulates exocytosis by Rgl2/Rif-mediated activation of RalA on endosomes.** *Mol Biol Cell* 2007, **18**:1850-60.
98. MW Conklin, A Ada-Nguema, M Parsons, KM Ricking, PJ Keely: **R-Ras regulates beta1-integrin trafficking via effects on membrane ruffling and endocytosis.** *BMC Cell Biol* 2010, **11**:14.
99. X Shang, JA Cancelas, L Li, F Guo, W Liu, JF Johnson, A Ficker, D Daria, H Geiger, N Ratner, et al: **R-Ras and Rac GTPase cross-talk regulates hematopoietic progenitor cell migration, homing, and mobilization.** *J Biol Chem* 2011, **286**:24068-78.
100. A Ray, S Basu, NM Miller, AM Chan, BN Dittel: **An increase in tolerogenic dendritic cell and natural regulatory T cell numbers during experimental autoimmune encephalomyelitis in Rras-/- mice results in attenuated disease.** *J Immunol* 2014, **192**:5109-17.
101. G Singh, D Hashimoto, X Yan, J Helft, PJ Park, G Ma, RF Qiao, CR Kennedy, SH Chen, M Merad, et al: **R-Ras is required for murine dendritic cell maturation and CD4+ T-cell priming.** *Blood* 2012, **119**:1693-701.

102. U Schneider, HU Schwenk, G Bornkamm: **Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma.** *Int J Cancer* 1977, **19**:621-6.
103. Comunicación Personal. **B Franco.** 2010
104. J Sambrook, DW Russell: **Molecular cloning : a laboratory manual**, 3rd edn. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
105. KA Reedquist, E Ross, EA Koop, RM Wolthuis, FJ Zwartkuis, Y van Kooyk, M Salmon, CD Buckley, JL Bos: **The small GTPase, Rap1, mediates CD31-induced integrin adhesion.** *J Cell Biol* 2000, **148**:1151-8.
106. PW Janes, SC Ley, AI Magee: **Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor.** *J Cell Biol* 1999, **147**:447-61.
107. X Su, J Cheng, W Liu, C Liu, Z Wang, P Yang, T Zhou, JD Mountz: **Autocrine and paracrine apoptosis are mediated by differential regulation of Fas ligand activity in two distinct Jurkat T cell populations.** *J Immunol* 1998, **160**:5288-93.
108. D Garcia-Bernal, N Wright, E Sotillo-Mallo, C Nombela-Arrieta, JV Stein, XR Bustelo, J Teixido: **Vav1 and Rac control chemokine-promoted T lymphocyte adhesion mediated by the integrin alpha4beta1.** *Mol Biol Cell* 2005, **16**:3223-35.
109. JA Epler, R Liu, H Chung, NC Ottoson, Y Shimizu: **Regulation of beta 1 integrin-mediated adhesion by T cell receptor signaling involves ZAP-70 but differs from signaling events that regulate transcriptional activity.** *J Immunol* 2000, **165**:4941-9.
110. AJ Iafrate, S Bronson, J Skowronski: **Separable functions of Nef disrupt two aspects of T cell receptor machinery: CD4 expression and CD3 signaling.** *EMBO J* 1997, **16**:673-84.
111. **nucleotide.** In: City; 2012.
112. C Mülhardt: **Molecular biology and genomics.** Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press; 2007.
113. H Rincon-Arano: **Estudio de oncogenes sobre funciones celulares de integrinas.** México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2001.
114. A Gutiérrez: **Inicio de la traducción dependiente de IRES: un mecanismo alternativo par la síntesis de proteínas.** *REB* 2006, **25**:12-19.
115. J Goranson-Siekierke, J Erbe: **Restriction Analysis of Recombinant Plasmids.** In: *E. coli Plasmid Vectors* Edited by N Casali, A Preston, vol. 235: Humana Press; 2003: 175-181.
116. P Carrigan, P Ballar, S Tuzmen: **Site-Directed Mutagenesis.** In: *Disease Gene Identification* Edited by JK DiStefano, vol. 700: Humana Press; 2011: 107-124.
117. RA Strachan T: **Human Molecular Genetics.** In: (Wiley-Liss ed., 2nd edition ed. City; 1999.
118. TK Kim, JH Eberwine: **Mammalian cell transfection: the present and the future.** *Anal Bioanal Chem* 2010, **397**:3173-8.
119. H Potter: **Transfection by electroporation.** *Curr Protoc Mol Biol* 2003, **Chapter 9**:Unit 9 3.
120. O Zelphati, Y Wang, S Kitada, JC Reed, PL Felgner, J Corbeil: **Intracellular delivery of proteins with a new lipid-mediated delivery system.** *J Biol Chem* 2001, **276**:35103-10.
121. F Schakowski, P Buttgereit, M Mazur, A Marten, B Schottker, M Gorschluter, IG Schmidt-Wolf: **Novel non-viral method for transfection of primary leukemia cells and cell lines.** *Genet Vaccines Ther* 2004, **2**:1.
122. C Baum, P Forster, S Hegewisch-Becker, K Harbers: **An optimized electroporation protocol applicable to a wide range of cell lines.** *Biotechniques* 1994, **17**:1058-62.
123. F Recillas-Targa: **Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals.** *Molecular Biotechnology* 2006, **34**:337-354.
124. BDH S.J. Higgins: **Protein Expression. A practical Approach.** New York: OXFORD University Press; 1999.
125. JS Kim, YK Lee, HY Jeong, SJ Kang, MW Kim, SH Ryu, HS Kim, KS Kim, DE Kim, YS Park: **Sendai F/HN viroplexes for efficient transfection of leukemic T cells.** *Yonsei Med J* 2013, **54**:1149-57.
126. K Katagiri, M Hattori, N Minato, S Irie, K Takatsu, T Kinashi: **Rap1 is a potent activation signal for leukocyte function-associated antigen 1 distinct from protein kinase C and phosphatidylinositol-3-OH kinase.** *Mol Cell Biol* 2000, **20**:1956-69.
127. RGH Teresa S. Hawley: **Flow Cytometry Protocols**, 2nd edn. Totowa, NJ: Humana Press; 2004.

128. G Bazzoni, L Ma, ML Blue, ME Hemler: **Divalent cations and ligands induce conformational changes that are highly divergent among beta1 integrins.** *J Biol Chem* 1998, **273**:6670-8.
129. F Ye, C Kim, MH Ginsberg: **Reconstruction of integrin activation.** *Blood* 2012, **119**:26-33.
130. A Byron, JD Humphries, JA Askari, SE Craig, AP Mould, MJ Humphries: **Anti-integrin monoclonal antibodies.** *J Cell Sci* 2009, **122**:4009-11.
131. A Ager: **Lymphocyte recirculation and homing: roles of adhesion molecules and chemoattractants.** *Trends Cell Biol* 1994, **4**:326-33.
132. TA Springer: **Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm.** *Cell* 1994, **76**:301-14.
133. MS Diamond, TA Springer: **A subpopulation of Mac-1 (CD11b/CD18) molecules mediates neutrophil adhesion to ICAM-1 and fibrinogen.** *J Cell Biol* 1993, **120**:545-56.

X. ANEXOS

10.1 Enzimas de restricción que tienen secuencias blancas dentro del vector pIRES-hrGFP-1a.

Enzima	Frecuencia	Posición donde se encuentra el sitio de restricción
AatII	4	127, 180, 263, 449
Acc65I	2	1264, 2130
AccI	1	705
AflIII	5	1138, 1313, 1492, 2571, 4927
AhdI	1	3321
Alw44I	3	1300, 3993, 4613
AlwNI	2	1419, 4513
Apal	2	936, 3216
ApoI	4	693, 2499, 2603, 2614
Aval	4	680, 710, 1644, 1989
Avall	2	3464, 3686
BamHI	1	687
BanI	7	471, 1116, 1264, 1569, 2130 2838, 3274
BanII	5	651, 936, 1601, 2872, 3216
BbeI	1	1569
BbsI	4	956, 1056, 1829, 2021
BciVI	2	3103, 4718
BclI	1	2342
Bfal	9	598, 676, 975, 1342, 2534 2952, 3516, 4181, 4434
BglI	6	90, 212, 283, 1119, 2211 3440
BlnI	1	974
BpmI	4	648, 1470, 2016, 3411
Bpu10I	1	1598
BsaAI	5	344, 1137, 1491, 2028, 2799
BsaBI	1	2343
BsaHI	6	127, 180, 263, 449, 1569 3862
BsaI	2	2061, 3393
BsaWI	3	3617, 4574, 4721
BseMII	8	1599, 2320, 3165, 3283, 3823 4121, 4244, 4653
BseRI	2	1222, 1761
BsgI	2	1548, 2109
BsiEI	5	668, 2185, 3693, 3842, 4590
BsiHKAI	5	651, 1300, 3908, 3993, 4613
BsmAI	4	435, 2061, 3115, 3393
BsmFI	5	167, 318, 486, 1361, 2297
BsmI	4	969, 1002, 2430, 2529
Bsp120I	2	936, 3216
Bsp1286I	9	651, 936, 1300, 1601, 2872 3216, 3908, 3993, 4613
BspHI	4	1450, 2339, 3111, 4207
BspLU11I	2	1313, 4927
BspMI	1	1153
BsrBI	3	671, 2943, 3107
BsrDI	3	927, 3380, 3562
BsrGI	1	1867
BssSI	4	2058, 2112, 3990, 4754
BstEII	1	816
BstF5I	10	724, 772, 1252, 1526, 1595 1667, 2003, 3306, 3487, 3774
BstXI	2	656, 1399
Bsu36I	2	3164, 4120
Cfr10I	6	876, 1434, 1683, 1839, 2902 3406
DdeI	8	1599, 2320, 3165, 3283, 3823 4121, 4244, 4653
DraI	4	2385, 3901, 4151, 4170
DraIII	2	1181, 2796
DrdI	2	2750, 4819
DsaI	6	366, 659, 1356, 1405, 1501 3212
EaeI	5	668, 853, 1126, 1396, 3714
EarI	2	1961, 4115
Ecl136II	1	651
Eco52I	1	668
Eco57I	4	1247, 1425, 4008, 4400
Eco72I	2	1137, 1491
EcoNI	1	1754
EcoO109I	5	935, 1291, 1344, 2314, 3216
EcoRI	1	693

EheI	1	1569
FauI	7	91, 117, 284, 1605, 1680 2945, 2999
FokI	10	724, 772, 1252, 1526, 15951667, 2003, 3306, 3487, 3774
FspI	3	1948, 2205, 3546
HaeII	4	1569, 2948, 2956, 4683
HgaI	6	523, 703, 3029, 3863, 4248 4826
HincII	2	705, 2446
HindIII	1	1047
HpaI	1	2446
KasI	1	1569
KpnI	2	1264, 2130
MluI	1	2571
MscI	1	1396
MspI	7	367, 657, 1400, 1952, 3574 3733, 4092
MspA1I	9	659, 1091, 1542, 1922, 1937 2076, 3959, 4342, 4587
MunI	1	2435
NaeI	2	1683, 2902
NarI	1	1569
NciI	7	680, 681, 939, 3171, 3508 3859, 4549
NcoI	4	366, 1405, 1501, 3212
NdeI	1	239
NgoMIV	2	1683, 2902
NheI	1	597
NotI	1	667
NsiI	1	1
NspI	5	699, 1304, 1313, 1945, 4927
PleI	8	416, 708, 1209, 2165, 2728 2750, 3321, 4557
Ppu10I	1	1
Psp1406I	3	845, 3551, 3924
PstI	2	1440, 1845
PvuI	2	2185, 3693
PvuII	3	1542, 1937, 2076
SacI	1	651
SacII	1	659
SalI	1	705
SapI	1	1961
SbfI	1	1439
Scal	1	3804
SchI	8	416, 708, 1209, 2165, 2728 2750, 3321, 4557
SexAI	1	2133
SfaNI	7	373, 1253, 2492, 3573, 3783 4013, 4840
SfiI	9	1071, 1440, 1845, 1934, 2158 3020, 3567, 4471, 4662
SmaI	1	680
SmlI	6	710, 1225, 3946, 4282, 4559 4821
SnaBI	1	344
SphI	1	699
SrfI	1	679
SspI	2	2591, 3144
StyI	7	366, 974, 1405, 1501, 1564 2300, 3212
TatI	7	223, 303, 336, 387, 1786 1867, 3804
TfiI	4	2265, 2289, 3160, 4953
Tsp45I	4	1560, 2975, 3583, 3794
TspRI	9	1175, 2525, 3268, 3373, 3720 3747, 4242, 4513, 4526
Van91I	1	1270
VspI	2	12, 3497
XcmI	1	1852
XhoI	1	710
XmaI	1	680
XmnI	3	1031, 1979, 3921

10.2 Enzimas de restricción que tienen secuencias blanco dentro del gen de R-Ras wt

Enzima	Frecuencia	Posición donde se encuentra el sitio de restricción
AlwNI	1	401
ApoI	1	18
AseI	1	352
AvaI	2	2, 84
BanI	1	504
BanII	4	9, 30, 615, 626
BbeI	1	508
BbvI	3	23, 587, 644
BceAI	1	344
BglII	2	226, 455
Bme1580I	1	637
Bmrl	1	624
Bpml	1	480
BsaAI	2	66, 518
BsaHI	1	505
BsaWI	1	592
BsaXI	1	627
BsaXI	1	597
BseYI	1	248
BsiHKA1	3	9, 30, 615
BsII	3	69, 84, 518
BsmAI	2	99, 555
BsmBI	1	555
BsmFI	3	67, 102, 462
Bsp1286I	5	9, 30, 615, 626, 637
BspEI	1	592
BspHI	1	22
BsrI	3	164, 173, 630
BsrFI	1	358
BssHII	1	151
BstAPI	3	314, 401, 581
BstBI	1	16
BstF5I	5	160, 169, 245, 244, 262
BstYI	2	226, 455
Btgl	2	274, 326
BtsI	1	239
DrallI	2	69, 518
EaeI	2	323, 538
EarI	2	280, 393
Ecil	1	85
EcoCRI	3	7, 28, 613
Eco57MI	1	480
EcoO109I	3	81, 89, 476
FauI	4	269, 397, 577, 644
FokI	5	147, 156, 231, 252, 249
HaeII	2	473, 508
HgaI	2	537, 655
Hin4I	3	447, 479, 629
Hin4I	3	447, 479, 597
HindIII	2	11, 114
Hpy8I	2	63, 560
Hpy188III	5	23, 443, 459, 593, 673
KasI	1	504
MbolI	4	236, 297, 380, 655
MlyI	2	207, 471
MscI	1	325
MspA1I	2	276, 578
NarI	1	505
NspI	1	317
PfiMI	2	69, 518
PleI	2	207, 470
PmlI	2	66, 518
PpuMI	3	81, 89, 476
PstI	1	234
PvuII	1	578

SacI	3	9, 30, 615
SacII	1	277
SanDI	1	89
SapI	1	393
SfaNI	1	253
Sfcl	1	230
SfoI	1	506
SmaI	1	86
SmlI	2	2, 8
StuI	1	534
TaqII	1	117
TatI	2	11, 158
TspRI	2	239, 637
XmaI	1	84