



03021  
9  
2EJ

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE  
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES,  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**LA EXPRESION INAPROPIADA DE H-RAS INDUCE  
MUERTE MITOTICA EN CELULAS HELA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO  
DE LICENCIADO EN INVESTIGACION  
BIOMÉDICA BÁSICA**

**P R E S E N T A**

**CARLA SANTANA TORRES**

**MEXICO, D. F.**

**1995**

**FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Este trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de UNAM, bajo la dirección del Dr. Alejandro García Carrancá.**

## **AGRADECIMIENTOS:**

Esta tesis representa una meta que fue alcanzada gracias al recorrer de un largo camino en el que no estuve sola si no en compañía de amigos, familiares y grandes maestros que hicieron posible que llegara hasta el final de esta primera etapa de mi formación académica.

Quiero agradecerle profundamente a Alejandro García Carrancá el haberme dado la oportunidad de desarrollar este trabajo; por su ejemplo y dedicación; y por su reconocimiento.

Quiero agradecer:

A los miembros del jurado conformado por el Dr. Raúl Mancilla, Dr. Roberto Hernández, Dr. Lino Díaz de León, Dr. Emilio Rojas y el Dr. Alejandro, García Carrancá.

A los maestros que me enseñaron a dar los primeros pasos, como son Julieta, Auster, Roberto, Himelda y Francisco.

A mis compañeros siempre solidarios con los que he pasado momentos memorables: Alejandra, Norma, Gabriela, Tania, Lucia, Gino y Mario.

A mis tutores, grandes maestros y amigos, que con su ejemplo y dedicación me han enseñando mucho más de lo que un alumno puede esperar: Dr. Sergio Sánchez y Enrique Ortega.

A mis ex-compañeros de laboratorio, hoy amigos: Elia, Dany, Ana, Claudia y Martha Isabel.

A mis compañeros de Labo.: Lupita, Manuel, Nestor, Paloma, Salomón, Enrique, Olga, y muy especialmente a Miriam y a Marcela, dos personas muy valiosas que me han brindado su apoyo y su amistad.

**A la Señora Julia, que gracias a su empeño y dedicación permite que podamos realizar nuestro trabajo experimental.**

**A mis compañeros del proyecto con los que he pasado una gran cantidad de horas rompiendonos la cabeza: Enrique, Emilio y Salomón.**

**A Edith Garay por su amistad y sus grandes consejos.**

**A la Dra. Patricia Ostrosky por su tiempo y atención.**

**Al Dr. Larralde por su reconocimiento.**

**Al Dr. Ricardo Rosales por su orientación.**

**Muy especialmente les agradezco:**

**A Daniel, Enrique, Alejandra, Marcela, Diana y Gino por brindarme su amistad, su confianza y su apoyo.**

**A mis padres que me han dado muchísimo amor y un enorme apoyo, sin ellos no podría haber logrado lo que hasta ahora he hecho.**

**A mi hermano, Mauricio, que ha su manera me demuestra su cariño y comprensión.**

**Le dedico especialmente este trabajo a Gino: mi compañero, amigo y amante. Le agradezco todo el tiempo que dedicó a leer el manuscrito, siempre mi mejor crítico, por su paciencia y su gran apoyo. Muchas gracias**

## INDICE

RESUMEN.....	3
<b>INTRODUCCION</b>	
I. La Familia Ras.....	4
II. Función molecular de las proteínas Ras.....	6
III. Regulación de Ras.....	8
IV. Participación de Ras en la transducción de señales extracelulares.....	11
V. Participación de Ras en la vía de transducción de señales de Rho/Rac.....	15
VI. Participación de Ras en el ciclo celular.....	19
VII. Función biológica de Ras.....	20
 OBJETIVOS.....	 25
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	
Construcción de los plásmidos RAS <sup>siV</sup> /neo y RAS <sup>mut</sup> /neo.....	26
Cultivo celular.....	26
Transfección celular.....	27
- Transfección por electroporación.....	27
- Transfección con lipofectina.....	28
Análisis morfológico.....	28
- Tinción con hematoxilina-eosina.....	29
- Análisis de la estructura de la cromatina- Tinción con DAPI.....	29
Cuantificación de la proporción de células multinucleadas en la población.....	30
- Curso temporal.....	30
- Sensibilidad al suero.....	30
- Proporción de células multinucleadas con "x" número de núcleos.....	30
Análisis de la expresión de H-Ras por Northern blot.....	31
- Extracción del mRNA.....	31
- Transferencia del mRNA.....	32
- Hibridación de las sondas radioactivas al RNA inmobilizado.....	32



<b>Análisis del ciclo celular por citofluorometría de flujo.....</b>	<b>33</b>
<b>Análisis citogenético.....</b>	<b>34</b>
<b>RESULTADOS</b>	
<b>Transfección estable de H-Ras en células HeLa.....</b>	<b>35</b>
<b>Cambios morfológicos inducidos por la expresión inapropiada de H-Ras.....</b>	<b>35</b>
<b>Anormalidades nucleares inducidas por H-Ras.....</b>	<b>36</b>
<b>Curso temporal de la aparición de células multinucleadas.....</b>	<b>37</b>
<b>Aumento en la sensibilidad a la ausencia de suero inducido por el oncogen H-Ras.....</b>	<b>38</b>
<b>Presencia de células multinucleadas con un número impar de núcleos.....</b>	<b>39</b>
<b>Análisis de la expresión de H-Ras en células HeLa.....</b>	<b>40</b>
<b>Alteraciones en los parámetros del ciclo celular y en la distribución del número de cromosomas inducidas por la expresión inapropiada de H-Ras.....</b>	<b>42</b>
<b>DISCUSION.....</b>	<b>46</b>
<b>CONSLUSIONES.....</b>	<b>56</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>58</b>

## RESUMEN

Las proteínas Ras son GTPasas que pertenecen a la superfamilia de proteínas Ras y participan en la transducción de señales involucradas en procesos de proliferación, transformación y diferenciación celular. Ras regula por lo menos dos vías de transducción de señales, una que controla la traducción, transcripción y el ciclo celular; y la otra que controla la organización del citoesqueleto. La primera vía es a través de la cascada de las proteínas MAP (quinasas activadas por mitógenos), que incluye una serie de cinasas de serina/treonina, las cuales actúan sobre factores traducción y de transcripción. La segunda vía es a través de las proteínas Rho/Rac, las cuales son también GTPasas que pertenecen a la superfamilia de proteínas Ras. Estas proteínas regulan la organización del citoesqueleto de actina en la célula. La función de Ras es requerida para la progresión del ciclo celular y se ha propuesto que participa al menos en tres diferentes puntos de control del ciclo celular: en la salida de  $G_0$ , en la entrada a S y en la salida del ciclo celular para entrar a diferenciación. Existe un reporte que sugiere que Ras es requerido para pasar de  $G_2$  a mitosis.

En este trabajo se estudió la posible participación de Ras en la fase M del ciclo celular, para ello se analizó el efecto que tiene sobre la morfología, la estructura de la cromatina y el ciclo celular, la introducción del gen H-ras normal o mutado en células HeLa.

Se transfectaron de manera estable células HeLa, derivadas de un adenocarcinoma epitelial cérvico-uterino, con plásmidos que expresan la versión normal o mutada del gen H-Ras, unido a un gen de resistencia a neomicina. Un análisis morfológico de las clonas seleccionadas reveló la formación de células gigantes con varios núcleos. El análisis de la estructura de la cromatina mostró alteraciones como son la presencia de micronúcleos y núcleos heteroplóides. Curiosamente, se encontraron células multinucleadas con un número impar de núcleos. Las alteraciones morfológicas observadas culminaron en la muerte celular, como consecuencia de una catástrofe mitótica (o muerte mitótica). Las clonas que expresaban el gen mutado produjeron significativamente un número mayor de células multinucleadas que aquellas transfectadas con la forma normal del gen, sin embargo ambas produjeron significativamente más células gigantes que las células HeLa sin transfectar o las transfectadas con el vector solamente. Se observó también que las clonas transfectadas con el gen H-Ras mutado fueron más sensibles a la ausencia de factores de crecimiento presentes en el suero. Además, se observaron alteraciones en los parámetros del ciclo celular, incluyendo la aparición de una subpoblación de células con un contenido anormal de DNA, probablemente representando a las células que están muriendo. Un análisis del mRNA por Northern blot, reveló la sobreexpresión del gen H-Ras normal en las clonas transfectadas con el mismo. Estos resultados apoyan que una expresión anormal de H-Ras, ya sea la sobreexpresión de la forma normal o la presencia de la forma mutada, contribuye a una catástrofe mitótica y la muerte de una subpoblación de células HeLa.

# INTRODUCCION

## I. La Familia Ras.

La **superfamilia de Ras** pertenece a una familia extensa de GTPasas, que participan en el control de una gran variedad de procesos celulares. Este gran grupo de proteínas, la familia de proteínas G, incluye además de la superfamilia Ras, proteínas involucradas en síntesis de proteínas, como son los factores de iniciación y elongación, y las proteínas G heterotriméricas (Boguski, & McCormick, 1993).

La superfamilia de Ras, o de pequeñas GTPasas, se divide en tres familias en base a la similitud de sus secuencias. Los miembros de cada familia tienen características funcionales semejantes. **Familia Ras:** son proteínas que participan en la transducción de señales y regulan eventos celulares como el crecimiento y la diferenciación. **Familia Rho/Rac:** tienen un 30% de similitud con Ras, son proteínas que están involucradas en la regulación de la organización del citoesqueleto. Las proteínas Rac participan en la regulación de la NADPH oxidasa en leucocitos-fagocíticos. **Familia Rab:** son proteínas asociadas a la superficie citoplasmática de los diferentes organelos celulares y juegan un papel importante en la regulación del transporte vesicular entre los diferentes compartimentos intracelulares. Además de estos tres grandes grupos se han identificado otras familias representadas por **Arf/Sar:** están involucradas en la formación vesicular, regulación del transporte intracelular y fusión nuclear de vesículas y **Ran:** son proteínas asociadas a varios procesos nucleares, como la replicación, la transcripción, procesamiento y exportación del RNA y mantenimiento de la estructura nuclear. (Downward, 1990; Hall, 1990; Boguski, & McCormick, 1993; Bokoch & Der, 1993; Hall & Zerial, 1994).

La **Familia Ras** se subdivide en varias subfamilias: **Ras**, que se conocen como proteínas Ras verdaderas y tienen un 85% de similitud entre sí; **Rap**, **R-Ras** y **Ral**,

estas tres subfamilias presentan un 50% de similitud con la subfamilia Ras (Downward, 1990, Boguski, & McCormick, 1993).

La **Subfamilia Ras**, en los seres humanos, está conformada por tres genes funcionales: **H-Ras-1** (localizado en el brazo corto del cromosoma 11), **K-Ras-2** (brazo corto del cromosoma 12) y **N-Ras** (brazo corto del cromosoma 1) los tres genes codifican para proteínas homólogas de un peso molecular de 21 kDa. Existen además dos pseudogenes Ras: **H-Ras-2** (localizado en el cromosoma X) y **K-Ras-1** (cromosoma 6) (Ellis et. al., 1981; Santos et. al., 1982; McGrath et. al., 1983; Marshall, 1985; Barbacid, 1987).

La comparación de las secuencias de aminoácidos de las **proteínas Ras** (H-Ras-1, K-Ras-2 y N-Ras) de mamíferos y la obtención de mutantes, ha permitido definir cinco **dominios** no contiguos en la estructura de estas moléculas. El primer dominio comprende un tercio de la molécula altamente conservado hacia el lado amino terminal (residuos 5-63), de hecho estos residuos son idénticos en las proteínas: H-Ras-1, K-Ras-2 y N-Ras en el humano; H-Ras-1, K-Ras-2 y N-Ras en el ratón; y H-Ras-2 en la rata. Tres dominios internos (residuos 77-92, 109-123 y 139-165), que divergen ligeramente entre las proteínas Ras, con un 85% de similitud en las secuencias nucleotídicas de los genes humanos. El quinto dominio, consiste en una región hipervariable (residuos 166-185) hacia el extremo carboxilo terminal; seguido de cuatro últimos aminoácidos conservados, presentes en todos los miembros de la superfamilia Ras. Probablemente, esta región hipervariable les confiere propiedades funcionales diferentes a las tres proteínas Ras (Barbacid, 1987).

## II. Función molecular de las proteínas Ras.

Las proteínas Ras, como todas las GTPasas, son moléculas que unen GTP y tienen la capacidad de hidrolizarlo; funcionan como un interruptor con dos estados conformacionales: GDP-unido, estado inactivo, y GTP-unido, estado activo. Existe también un estado intermedio, "vacío", que sirve para el remplazo de GDP por GTP. El estado activo perdura hasta que el GTP es hidrolizado. La irreversibilidad de la hidrólisis del GTP hace que el ciclo sea unidireccional. La versatilidad de este mecanismo: la habilidad para adquirir un cambio conformacional dependiente de un nucleótido de guanina y la unidireccionalidad de la reacción, permite que sea usado por diferentes organismos para la regulación de diversas vías bioquímicas. La función básica del interruptor molecular es regular cíclicamente la transmisión de una señal a un efector, que se encuentra a bajo en la cascada de señalización. Cuando recibe una señal extracelular intercambia GDP, estado inactivo, por GTP, estado activo, adquiriendo entonces un estado conformacional diferente que le permite interactuar con el efector, esta interacción termina cuando se da la hidrólisis del GTP (Downward, 1990; Bourne, et. al. 1990; Hall & Zerial, 1994). (Figura A)

Los genes que codifican las proteínas Ras son proto-oncogenes, y se encuentran mutados en el 30% de los tumores humanos (Boss, 1989). Los proto-oncogenes se convierten en oncogenes por alteraciones (mutaciones, amplificaciones, inserciones, etc.) que provocan la desregulación de su actividad. Se considera que las formas mutadas de Ras son dominantes porque pueden transformar células aún que se exprese la versión normal de la proteína (Bishop, 1991).

En base al modelo planteado para la activación de Ras, el tiempo que la molécula permanezca en estado activo, dependerá principalmente de las velocidades de dos reacciones: la disociación de GDP y de la hidrólisis del GTP. Las formas oncogénicas lo que hacen es romper con el equilibrio entre la forma inactiva y activa de la proteína. La estabilización de Ras en su estado activo, unido a GTP, provoca un flujo continuo de la señal estimuladora, lo cual resulta en la transformación maligna de

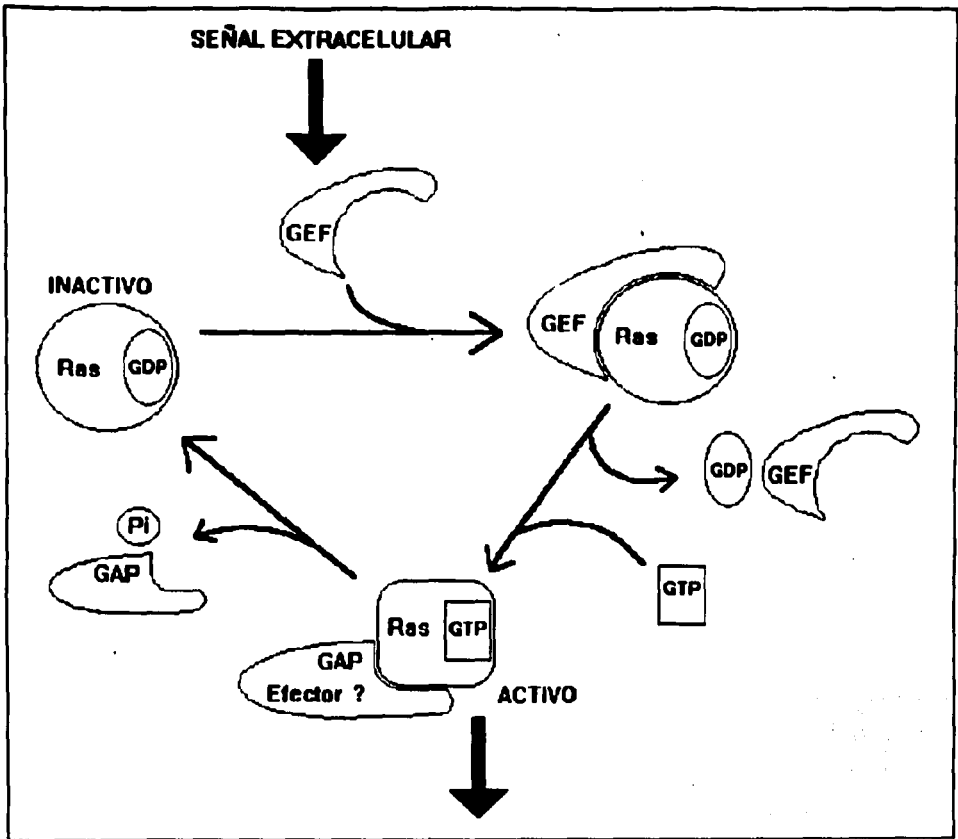


Figura A

las células. Este proceso puede obtenerse por mutaciones que inhiban la actividad de GTPasa de Ras o que aumenten la velocidad de intercambio entre el GDP y el GTP. Las proteínas Ras adquieren la propiedad de inducir transformación por una única mutación puntual. Las mutaciones que se encuentran en tumores humanos se localizan en los codones 12, 13, 59 o 61, siendo las más comunes en los codones 12 y 61. Las mutaciones en el codón 61 que producen la substitución de una glutamina por cualquier otro aminoácido (excepto prolina y glutámico) resultan en una proteína Ras oncogénica. En el caso de las mutaciones en el codón 12, aunque generalmente en los tumores humanos se encuentra el cambio de una glicina por una valina (o una arginina), la substitución con cualquier aminoácido transforma la proteína en oncogénica (Reddy, et. al. 1982; Tabbin, et. al. 1982; Seeburg, et. al. 1984; Der, et. al. 1986; Barbacid, 1987).

Se considera también que la sobreexpresión de los genes normales de Ras pueden inducir transformación celular. Altos niveles de la proteína Ras normal produce suficientes moléculas en estado activo unido a GTP, sin afectar el equilibrio entre la forma activa e inactiva de la proteína normal. Una expresión elevada de Ras puede lograrse por alteraciones en las secuencias reguladoras o por amplificación de genes (Barbacid, 1987). La unión de un elemento de control de retrovirus (LTR) al lado 5' del gen Ras normal o cualquier promotor fuerte, los cuales provocan una expresión elevada del gen, inducen la transformación maligna de células NIH3T3 (Chang, et. al. 1982; McKay, et. al. 1986). Resultados similares se han obtenido cuando se integran múltiples copias del gen H-Ras-1 normal, por lo que la amplificación del gen Ras normal es capaz de desarrollar transformación (Pulciani, et. al. 1985). Estas células tumorigénicas expresan de 30 a 100 veces más el gen normal que las células normales o bien que células transformadas con el oncogen Ras. Sin embargo, en términos generales las propiedades neoplásicas inducidas por la sobreexpresión del proto-oncogen Ras son más limitadas que las inducidas por las mutaciones alélicas puntuales (Barbacid, 1987).

### III. Regulación de Ras.

El ciclaje entre la forma activa e inactiva de la GTPasa, se encuentra regulado principalmente por tres diferentes clases de proteínas: **proteínas activadoras de GTPasas (GAPs)**, **factores intercambiadores de guanin-nucleótidos (GEFs)** e **inhibidores de la disociación de guanin-nucleótidos (GDIs)**.

Ras tiene una capacidad intrínseca de hidrolizar GTP muy baja, proceso que es acelerado por las **GAPs**, entre las que se encuentran p120-GAP y NF1-GAP (producto del gen de la neurofibromatosis tipo 1). La velocidad de hidrólisis de GTP por Ras es aumentado 10,000 veces por la proteína p120-GAP, por lo que ésta funciona como un regulador negativo de Ras. Las formas oncogénicas de Ras, con mutaciones en los residuos 12,13 o 61, son resistentes a la estimulación de la actividad de GTPasa por **GAP** (aunque GAP se sigue uniendo a la proteína), manteniendo a Ras en la forma activa (Gibbs, et. al. 1984; Trahey & McCormick, 1987). Por otro lado, la activación de la proteína involucra el intercambio de GDP por GTP, este intercambio es extremadamente lento y es acelerado por los **GEFs**, entre los que se encuentran Sos, C3G (ambas proteínas ubicuas) y CDC25<sup>Mm</sup>/p140-GRF (se expresa solo en cerebro). Los GEFs reconocen preferentemente a Ras unido a GDP catalizando la disociación del nucleótido del sitio de unión en la proteína. Existen dos modelos para la regulación positiva de estas proteínas, una vez que promueven la disociación del GDP: **1)** el GTP que se encuentra presente en una concentración mayor que el GDP en la célula, se une preferentemente a Ras; **2)** el complejo GEF:apoRas (la proteína Ras con el sitio catalítico vacío) tiene una afinidad mayor por GTP que por GDP, facilitando preferentemente la unión del GTP a la proteína. Este evento es a su vez regulado negativamente por los **GDIs** (Bourne, et. al. 1990; Bollag & McCormick, 1991; Munder & Furst, 1992; Bokoch & Der, 1993, Boguski, & McCormick, 1993; Lowy & Willumsen, 1993; Haney & Broach, 1994; Feig 1994; Quilliam, et. al. 1995).



Aunque se sabe que la función de Ras es regulada por las proteínas antes mencionadas, hasta el momento no es claro como es que éstas actúan, que papel juegan en la cascada de transducción de señales mediada por Ras y sobre todo como es que se regula su actividad. Podría ser que todas estas proteínas reguladoras a su vez sean blanco del mismo receptor que está activando a Ras (Hunter 1991).

Varios estudios indican que la actividad de los GEFs es regulada por la activación de los receptores a factores de crecimiento, para así activar la vía de señalización de Ras (Bokoch & Der, 1993). Por ejemplo se sabe que Vav es fosforilada en tirosina cuando se activa el receptor de células T y al parecer esta fosforilación aumenta la actividad intercambiadora de nucleótidos de Vav (Gulbins, et. al. 1993). Mientras que se ha visto que la activación de Sos esta mediada por la translocación de la proteína del citoplasma a la membrana cuando se estimulan células con el factor de crecimiento epidermal (EGF), probablemente por el simple hecho de acercar a Sos a la proteína Ras anclada a membrana, se promueve el intercambio GDP/GTP (Aronheim, et. al. 1994; Quilliam, et. al. 1995).

Por otro lado, se sabe que GAP es fosforilada en tirosina cuando se estimulan células con el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), y que dicha fosforilación provoca la asociación de GAP con el receptor (Molloy, et. al. 1989; Kazlauskas, et. al. 1990). La función de este evento no se conoce, una posibilidad es que esta modificación activa la vía de transducción de la señal a través de Ras, al bloquear la habilidad de GAP de inactivar a Ras por quedar secuestrada por el receptor. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que la fosforilación de GAP resulta en la formación de un complejo con el receptor que le permite interaccionar con Ras, produciendo un cambio conformacional en GAP y transduciendo una señal; actuando entonces como un efector positivo que propaga la señal mitogénica (Parsons, 1990; Cantley, et. al. 1991; McCormick 1994). Ras activado controlaría la función efectora de GAP y la duración del efecto estaría determinado por la velocidad en que GAP inactive a Ras (Boguski, & McCormick, 1993). Alternativamente GAP puede no ser en si una proteína efectora de Ras, sino que

existan otros efectores que reconozcan únicamente al complejo Ras-GTP unido a GAP y no solo a la proteína Ras activa (Bollag & McCormick, 1991).

Las tres alternativas son posibles ya que no se conoce bien el papel fisiológico de GAP, existen evidencias que indican que es un **regulador negativo** de Ras. Cuando se estimulan células T a través del receptor de T, se da una inhibición de GAP por la proteína cinasa C, que provoca un aumento en los niveles de Ras activo unido a GTP (Downward, et. al. 1990), o bien, la sobreexpresión de p120-GAP en fibroblastos revierte el fenotipo transformado inducido por la sobreexpresión de c-Ras (Zhang, et. al. 1990). También existen evidencias que apoyan que funciona como un **efector positivo** a bajo de la cascada de señalización de Ras. GAP interacciona con Ras a través del sitio de unión al efector y no se une a mutantes de Ras que tienen alterado el sitio de unión al efector y que por lo tanto no presentan actividad biológica (Adari, et. al. 1988; Vogel, et. al. 1988). Rap-1A/K-rev-1 (de la subfamilia de Ras) revierte el fenotipo transformado provocado por Ras, al unirse con una mayor afinidad a GAP que Ras, pero GAP no estimula la actividad de GTPasa de Krev-1 (Kitayama, et. al., 1989; Frech, et. al., 1990; Hunter, 1991). Se sabe que una proteína G acopla un receptor muscarínico a canales de potasio en membranas cardíacas y Ras-GTP inhibe este acoplamiento; anticuerpos dirigidos contra GAP o formas truncadas de GAP incapaces de unirse a Ras, bloquean el efecto inhibitorio de Ras, por lo tanto GAP es necesario para que Ras actúe (Yatani, et. al. 1990).

Un evento crítico que regula también la función de Ras es el anclaje de la proteína a la membrana, pues determina la localización intracelular de la GTPasa, afectando la posible interacción con proteínas activadoras, reguladoras o efectoras (Cox & Der, 1992). Este **anclaje** se da mediante una modificación **postranscripcional** o **prenilación**, que consiste en la unión covalente de un lípido isoprenóide, un grupo farnesilo (15 carbonos), a un residuo de cisteína en el extremo carboxilo terminal. Las proteínas Ras tienen un tetrapéptido de la forma **Cys<sup>186</sup>-A-A-X** (en donde "A" representa un aminoácido alifático y "X" es usualmente una metionina o una serina) y son **farnesiladas** en el residuo de cisteína por una enzima farnesiltransferasa

(Hancock, et. al. 1989; Boguski, & McCormick, 1993). Después de la prenilación, se remueve por **proteólisis** los residuos A-A-X y la cisteína isoprenilada es sujeta a una **carboxi-metilación** (Hancock, et. al. 1991; Hall & Zerial, 1994). Las pequeñas GTPasas se localizan en distintos compartimentos intracelulares, aunque la prenilación es suficiente para anclar la proteína a la membrana, no es suficiente para determinar el organelo específico al cual tienen que ser ancladas, es por lo que, las proteínas Ras (con excepción de K-Ras-2) requieren ser **palmitiladas** en residuos de cisteína (residuos 181 y 184) que se encuentran hacia el N-terminal de la caja Cys<sup>180</sup>-A-A-X, para su correcta localización en la membrana citoplasmática (Hancock, et. al. 1989; Kato, et. al. 1992). Mutaciones que impiden las modificaciones post-transcripcionales necesarias, generan proteínas funcionalmente inactivas (Hancock, et. al. 1989; Hancock, et. al. 1990; Hall, 1990; Hall & Zerial, 1994). Así como mutantes oncogénicas que carecen de la Cys<sup>180</sup> codifican para proteínas que permanecen en el citosol y no pueden inducir transformación de células NIH 3T3 (Willumsen, et. al. 1984).

#### **IV. Participación de Ras en la transducción de señales extracelulares.**

Las proteínas Ras funcionan como componentes críticos a bajo en la cascada de transducción de señales iniciada por la estimulación de diversos receptores. La unión del ligando a su receptor, provoca el agregamiento del mismo, estimulando su actividad de tirosina-cinasa y su autofosforilación. Los sitios de autofosforilación en tirosina de los receptores se unen con una alta afinidad a dominios **SH2** (homología con Src). La **activación de Ras** por el receptor para **EGF** requiere de una proteína adaptadora llamada **Grb2**, la cual contiene un dominio **SH2** por el cual se une al receptor fosforilado y dos dominios **SH3**, a través de los cuales forma un complejo con el **GEF de Ras: Sos**. Los dominios **SH3** de Grb2 se unen a una región rica en prolina que se encuentra en el extremo carboxilo-terminal de Sos. El complejo **Grb2/Sos** está presente en el citosol en células no estimuladas, cuando estas se estimulan, el complejo se une al receptor activado a través de Grb2, reclutando a Sos a la

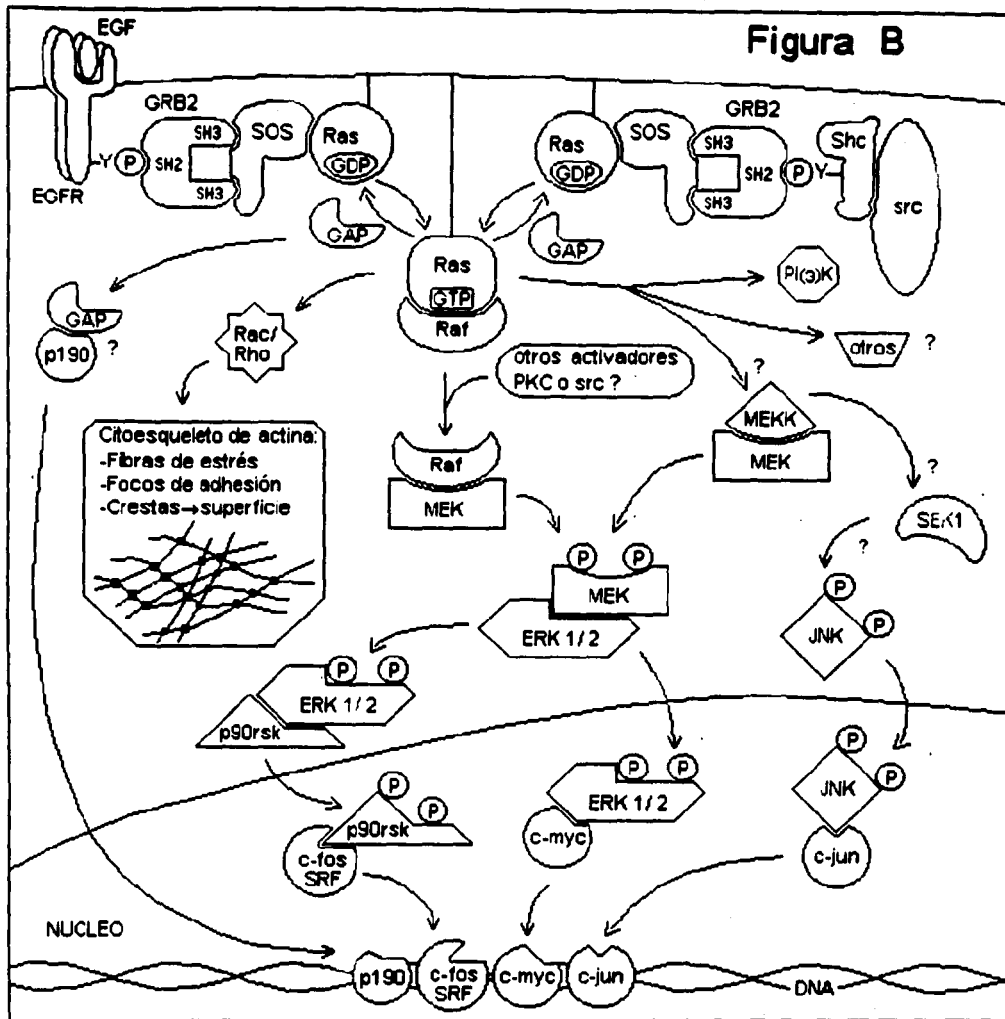
membrana plasmática, lo cual provoca la activación de Ras al promover Sos el intercambio de GDP por GTP (Lowenstein, et. al. 1992; Chardin, et. al. 1993; Egan, et. al. 1993; Schlessinger, 1993; McCormick 1993; Feig, 1994; Quilliam, et. al. 1995). Para otros receptores, existen otras proteínas que están involucradas en la activación de Ras, tal es el caso de la proteína adaptadora **Shc**, que contiene un dominio SH2, el cual reconoce al residuo de tirosina fosforilados ya sea de los receptores autofosforilados o de cinasas no receptor que se autofosforilan tras la estimulación celular. Al unirse **Shc** es fosforilada en tirosina por la cinasa, creando un sitio que es reconocido por el dominio SH2 de **Grb2**, reclutando así al complejo **Grb2/Sos** y activando a Ras (Pellicci, et. al. 1992; Rozakis-Adcock, et. al. 1992; Feig, 1994).

Una vez que **Ras** ha sido activado por Sos, a su forma activa unida a GTP, interacciona físicamente a través del dominio de unión al efector con el dominio regulador (región amino terminal) de una cinasa de serina/treonina: **Raf**; por lo que **Raf** es un **efector** directo de Ras. **Raf** se une a Ras únicamente cuando está unido GTP. **Raf** inhibe la habilidad de 120-GAP de estimular la actividad intrínseca de GTPasa de Ras, probablemente por competencia entre ambas proteínas por unirse al dominio efector de la proteína (Zhang, et. al. 1993; Vojtek, et. al. 1993; Avruch, et. al. 1994). Sin embargo, la unión de Ras a **Raf** no activa el dominio catalítico de ésta, por lo que, la única función de Ras-GTP es reclutar a **Raf** a la membrana plasmática. La asociación con Ras es transitoria y se requieren de otros eventos independientes a Ras que activen al dominio de cinasa de **Raf** (Stokoe, et. al. 1994; Hall 1994). Al parecer, una vez que la proteína es translocada a la membrana, la activación se da por la fosforilación de **Raf**, ya sea por la **proteína cinasa C (PKC)** o por cinasas de la familia de **Src**. La **PKC** estimula parcialmente la actividad de cinasa de **Raf in vivo**. Se sabe que la **PKC** y Ras funcionan independientemente, por lo que es concebible pensar que Ras y **PKC** actúan juntas para activar completamente a **Raf**. (Morrison, et. al. 1988, Sozeri, et. al. 1992; Fabian, et. al. 1993; Kolch, et. al. 1993; Cleghon & Morrison, 1994; Burgering & Bos, 1995).

Después de que **Raf** es activada por **Ras**, se une, fosforila y activa a la cinasa de la **cinasa de MAP** (proteína activada por mitógenos), conocida también como **MAPKK** o **MEK** (Dent, et. al. 1992; Kyriakis, et. al. 1992; Moodie, et. al. 1993; Crews & Erikson 1993). MEK a su vez fosforila tanto en treonina como en tirosina a la cinasa **MAP** o **MAPK**, activando así su función de cinasa. A esta cinasa se le conoce también como **ERK** (cinasa regulada por señales extracelulares), hay dos cinasas identificadas **ERK1** o **p44<sup>mapk</sup>**, y **ERK2** o **p42<sup>mapk</sup>**. Una vez activada **MAPK**, ésta fosforila a otras serina/treonina cinasas como **p90<sup>rsk</sup>** y la **fosfolipasa A2** (citósólica), así como se transloca al núcleo y fosforila a factores de transcripción como son **c-Myc**, **Elk-1** y **c-Jun** (Pulverer, et. al. 1991; Seth, et. al. 1991; Lin, et. al. 1993). El sitio blanco de fosforilación de las cinasas **MAP** es **Leu/Pro-X-Ser/Thr-Pro**, se sabe de muchos factores de transcripción que presentan en su secuencia este sitio consenso de reconocimiento por la cinasa, por lo que al parecer **MAPK** regula la activación de diversos factores de transcripción además de los ya mencionados. (Leivers & Marshall, 1992; Marx, 1993; Nishida & Gotoh, 1993; Avruch, et. al. 1994; Marshall, 1994). Estos factores de transcripción que son regulados por estímulos extracelulares, son considerados como mensajeros nucleares que median la acción de las vías de transducción de señales estimuladas por factores de crecimiento, hormonas, citocinas o neurotransmisores, permitiendo la activación de otros genes que determinan la respuesta celular a dicho estímulo (Karin & Smeal, 1992). (**Figura B**)

Además de **Raf**, se sabe que existen otros efectores de **Ras**, como se dijo anteriormente, **p120-GAP** es un buen candidato y recientemente se encontró que la **fosfatidilinositol-3-OH cinasa (PI(3)K)** al parecer es también un efector directo que se une físicamente a **Ras** a través de su subunidad catalítica y es dependiente de **Ras-GTP**; no se sabe cual es su función o la vía que activa (Rodríguez-Viciano, et. al. 1994; Feig & Schaffhausen, 1994). Al parecer, la cascada de transducción de señales mediada por **Ras**, se diversifica grandemente a este nivel, pudiéndose activar solo uno de todos los efectores dependiendo del receptor activado y de otras vías de señalización encendidas, o bien, todos los efectores conjuntamente se activan cuando

Figura B



se activa Ras dando lugar a la **amplificación** de la señal que permita controlar diversos aspectos celulares que conllevan a una respuesta específica al estímulo externo. Se sabe que el factor de transcripción **c-Jun** es fosforilado en los residuos de serina 63 y 73 (dentro del dominio de activación) por la cinasa **JNK**, esta fosforilación regula positivamente, transactivando a c-Jun. La activación de esta cinasa requiere a su vez de fosforilaciones en treonina y tirosina. Sin embargo, aunque la expresión del oncogen **H-Ras** estimula a la cinasa, su activación parece ser independiente de la cascada de las cinasas **MAP** (Dérjard, et. al. 1994). Ya que su activación está mediada por otra vía de señalización pero depende de Ras, podría pensarse que algún otro efector de Ras, tal vez alguno de los antes señalados, activen una cascada que culmine en la activación de la cinasa **JNK**. Por otro lado, se sabe que existen otros activadores de **MEK** además de **Raf**, **MEKK** fosforila y activa a **MEK** de manera independiente a **Raf**, no se sabe quien activa a **MEKK**. Sin embargo, al parecer la isoforma **MEKK-1** está involucrada en la activación de **JNK**, así como la cinasa **SEK1**; podría pensarse que **Ras** activa a **MEKK-1** de la misma manera que lo hace con **Raf**, una vez activada **MEKK-1** se inicia una cascada de activación de cinasas, similar a la cascada de las **MAP** cinasas, en la cual esta involucrada **SEK-1**. Se han clonado cuatro diferentes **MEKKs**, las cuales divergen en el dominio regulatorio amino terminal, mientras que el dominio catalítico es conservado, sugiriendo que cada isoforma responde a distintos estímulos externos (Lange-Carter, et. al. 1993; Minden, et. al., 1994; Yan, et. al., 1994; Blumer & Johnson 1994).

Esta aparente vía lineal de la transducción de una señal extracelular a través de **Ras**, en realidad tiene que considerarse en el contexto de otras vías que se **entrecruzan** formando una red compleja y ramificada, que permite a la célula integrar diversas señales extracelulares. La integración de la información proveniente de las diversas vías le permite controlar finamente procesos transitorios como son cambios morfológicos o motilidad celular, así como procesos irreversibles como es la proliferación, diferenciación o inclusive la muerte celular programada. Esta red le permite a la célula llevar a cabo una regulación cruzada, positiva o negativa, entre

diferentes vías de transducción, dependiente de los estímulos extracelulares (Roberts, 1992; Egan & Weinberg, 1993).

Existen diversos estudios que indican que existe una regulación cruzada de otras vías de transducción hacia la cascada mediada por Ras. Por ejemplo, se sabe que diversos receptores, como aquellos para trombina y acetilcolina, que están acoplados a proteínas G heterotriméricas (existen 4 tipos Gs, Gi, Gq y G<sub>12</sub>) pueden regular, positiva o negativamente, la cascada Ras/Raf/ERK2 a diferentes niveles. La proteína Gq activa a la fosfolipasa  $\beta$ , y ésta activa a la PKC, que como ya se dijo, fosforila y activa a Raf, también la PKC aumenta ligeramente la forma Ras-GTP en células B y T. La proteína Gi, activa a Ras, al parecer estimulando a Sos o inhibiendo a p120-GAP a través del complejo  $\beta\gamma$  de la proteína; este complejo se une a dominios PH, los cuales están presentes tanto en Sos como en GAP. Por otro lado, existe una inhibición de la cascada a nivel de Raf dependiente de cAMP. La inhibición por cAMP probablemente este mediada por la activación de este de la proteína cinasa A (PKA). Raf es sustrato de fosforilación de la PKA. La fosforilación de la serina 43 disminuye la afinidad de Raf por Ras-GTP, mientras que las fosforilaciones de otros residuos inhiben la actividad catalítica de la proteína. Por lo tanto, la vía Raf-1/ERK2 está determinada por el balance entre el estado activo de la PKC, el número de moléculas de Ras en estado activo unido a GTP y el nivel intracelular del cAMP (Lacal, et. al. 1987; Wu, et. al. 1993; Cook & McCormick, 1993; Blumer & Johnson, 1994; Burgering & Bos, 1995).

#### V. Participación de Ras en la vía de transducción de señales de Rho/Rac.

Una de las características de la estimulación celular por factores de crecimiento es una rápida y extensa remodelación de la arquitectura del citoesqueleto, principalmente de la reorganización de los microfilamentos de actina. Las proteínas de la familia Rho/Rac son componentes esenciales en las vías de transducción de



señales que unen factores de crecimiento con la organización del citoesqueleto. Los cambios iniciales en la organización de actina inducidos por la estimulación con factores de crecimiento son la formación de fibras de estrés acompañadas de la formación de focos de adhesión y un aumento en la polimerización de actina en la membrana plasmática formando crestas en la superficie de las células. Rho es esencial en el ensamblaje de los microfilamentos de actina para la formación de focos de adhesión y fibras de estrés. La microinyección de una proteína Rho constitutivamente activa, a fibroblastos, provoca la aparición de una red densa de filamentos de actina. Mientras que el bloqueo de su función provoca la inhibición del ensamblaje de fibras de actina inducido por factores extracelulares. Rac es necesario para la formación de crestas en la superficie de la membrana citoplasmática. Mutantes dominantes negativos de Rac impiden la formación de crestas cuando se estimulan las células con factores de crecimiento (Paterson, et. al. 1990; Ridley & Hall, 1992; Ridley, et. al. 1992; Prendergast & Gibbs, 1993).

Además, de la acumulación inicial de actina en la membrana para la formación de crestas, se observa la formación de fibras de actina y focos de adhesión cuando se microinyecta Rac. Mutantes dominantes negativos de Rac impiden la formación de fibras de estrés cuando se estimula con ciertos factores de crecimiento: PDGF, EGF o insulina; pero no cuando se estimula con LPA o bombesina. La formación de fibras de actina en respuesta a todos los factores extracelulares antes mencionados es dependiente de Rho, por lo que al parecer existen dos vías de activación de Rho, una independiente y otra dependiente de Rac, en donde Rac se encuentra arriba de Rho en la cascada de transducción de señales (Ridley, et. al. 1992; Prendergast & Gibbs, 1993).

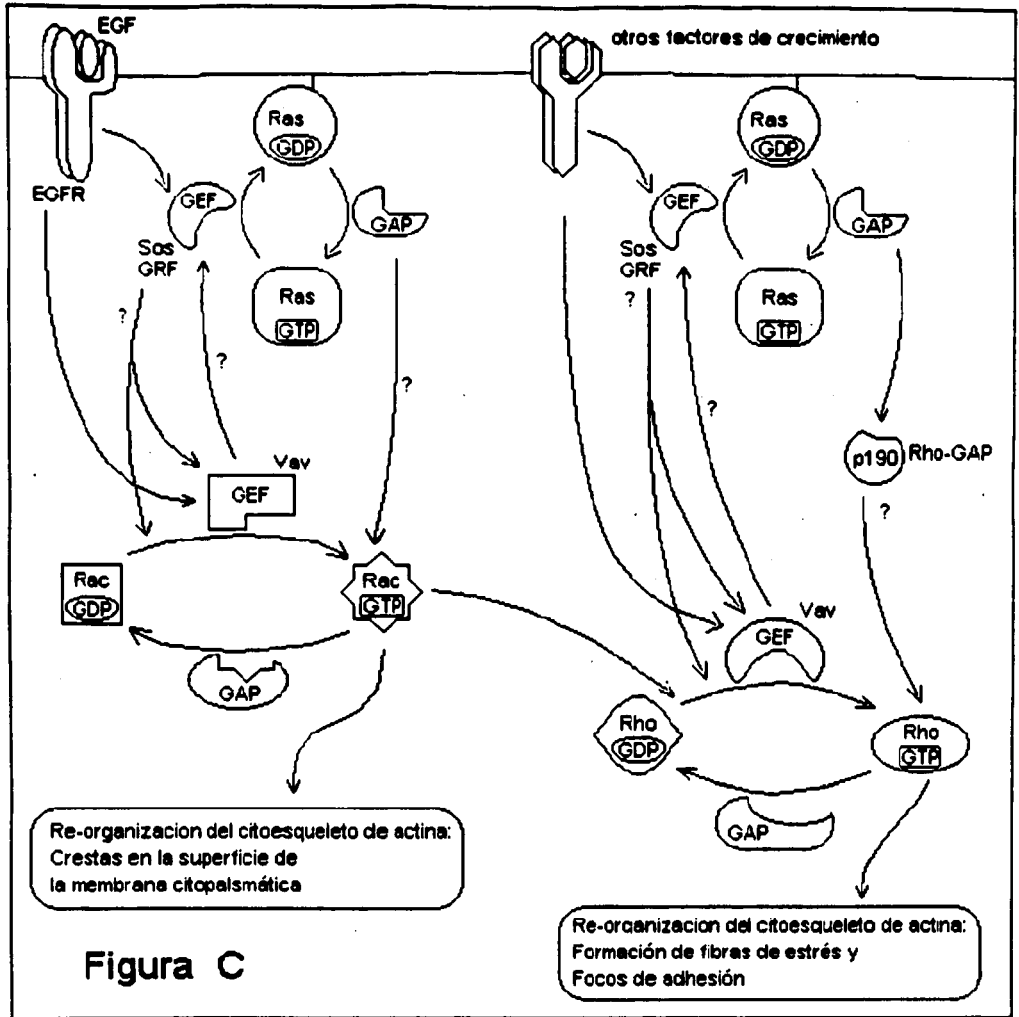
La microinyección de Ras a fibroblastos resulta en la estimulación de la formación de crestas en la membrana, pinocitosis y fibras de actina; lo que indica que Ras induce la reorganización del citoesqueleto de actina. Esta reorganización es dependiente de Rho y Rac, ya que la microinyección de la forma oncogénica de H-Ras a fibroblastos con una proteína Rho no funcional, no provoca la formación de fibras de actina;

mientras que la co-microinyección de H-Ras con una mutante dominante negativa de Rac inhibe tanto la formación de fibras de estrés como la aparición de crestas en la membrana. Todo esto sugiere que Ras actúa arriba de Rho y Rac en la cascada de transducción de señales al citoesqueleto. Sin embargo, no todos los factores de crecimiento que provocan cambios en la polimerización de actina a través de Rac y Rho dependen de Ras por lo que existe una vía alternativa de activación de Rho/Rac independiente de Ras (Bar-Sagi, D. & Feramisco, J. R. 1986; Ridley, et. al. 1992). **(Figura C)**

Existen diversas evidencias que indican que las proteínas **Ras** se comunican con las proteínas **Rho/Rac** a través de las proteínas reguladoras **GEFs** y **GAPs**, controlando así tanto las señales mitogénicas como las de reorganización del citoesqueleto.

Se sabe que **GRF** y **Sos**, dos **GEFs** de **Ras**, tienen además de los dominios **SH2** y **SH3**, dominios **DH/PH**. El dominio **PH** tiene homología con un dominio de la plecstrina y se ha identificado en diversas proteínas involucradas en señalización; este dominio al parecer participa en la interacción proteína-proteína y proteína-lípido. El dominio **PH** se encuentra dentro del dominio **DH**. El dominio **DH** fue identificado en la proteína **Dbl**, la cual posee actividad intercambiadora de nucleótidos sobre las proteínas **Rho**. Se cree que las proteínas que contienen dominios **DH** funcionan como **GEFs** para los diferentes miembros de la familia **Rho**, por lo que, se podría pensar que tanto **GRF** como **Sos** funcionan como **GEFs** de **Rho** regulando de manera coordinada las actividades tanto de **Ras** como de **Rho**, promoviendo al mismo tiempo las respuestas mitogénicas y morfogénicas asociadas a **Ras** (Prendergast & Gibbs, 1993; Quilliam, et. al. 1995).

Por otro lado, la proteína **Vav**, con dominios **DH/PH** y **SH2-SH3**, (se expresa solo en células hematopoiéticas) fue identificada como un **GEF** de **Ras**, al promover la transformación celular a través de está. Sin embargo, un análisis más detallado indica



que las características en la transformación por Vav son semejantes a cuando se transforma con Rho o con Dbl y no a cuando se transforma con Ras. Además, el aumento en la expresión de Vav no provoca un aumento en los niveles de Ras unido a GTP, por lo que Vav más bien, parece ser un GEF de Rho. Se propone que Vav podría tener actividad intercambiadora hacia Ras a través de su interacción con un GEF específico de Ras, posiblemente a través de sus dominios SH2-SH3 (Bustelo, et. al. 1994; Khosravi-Far, et. al. 1994; Quilliam, et. al. 1995).

Cuando se estimulan células con factores de crecimiento, p120-GAP o Ras-GAP forma un complejo con una proteína p190 a través de sus dominios SH2-SH3, esta interacción reduce la actividad estimuladora de GTPasa de Ras-GAP. La proteína p190 contiene una región central casi idéntica a un factor de transcripción, por lo que, es posible pensar que p190 transmite señales de Ras a través de Ras-GAP al núcleo, afectando la expresión de genes, de manera independiente a las MAP cinasas. La región C-terminal es homóloga al de las proteínas Bcr y N-quinerina, las cuales funcionan como GAPs de las proteínas Rho/Rac. p190 funciona como GAP de la proteína Rho *in vitro*. Un fragmento (GAP-N) con el extremo N-terminal de Ras-GAP, conteniendo únicamente los dominios SH2-SH3 de la proteína, pero no su dominio catalítico, se une a p190 *in vivo*. La expresión elevada de GAP-N en células Rat-2, no provoca cambios en la síntesis de DNA y proliferación celular; sin embargo estas células presentan cambios en su morfología con una red de actina desorganizada y un reducido número de focos de adhesión. Este fenotipo puede explicarse si la unión de GAP-N a p190 estimula su actividad de GAP hacia Rho, la conversión de las proteínas Rho a su forma inactiva unida a GDP provocaría una disminución en las fibras de estrés y en los focos de adhesión. La formación de un complejo entre Ras-GAP y p190 podría ser un mecanismo por el cual se acoplan las señales mediadas por Ras y por Rho. p120-GAP a través de p190 podría estar acoplando los factores de crecimiento con el control de la morfología celular; coordinando la progresión del ciclo celular con la reorganización del citoesqueleto (Settleman, et. al. 1992a; Settleman, et. al. 1992b; McGlade, et. al. 1993; Prendergast & Gibbs, 1993).

## VI. Participación de Ras en el ciclo celular.

Se sabe que la función de Ras es requerida en al menos tres diferentes puntos de control del ciclo celular: en la salida de  $G_0$ , la microinyección de H-Ras a células quiescentes NIH-3T3 provoca la transición a  $G_1$  y el inicio de la replicación del DNA; en la entrada a S, la microinyección de anticuerpos anti-Ras bloquea la respuesta mitogénica de células NIH-3T3 al suero, éstas no entran a la fase S del ciclo celular, y en la salida del ciclo celular para entrar a diferenciación, la microinyección del oncogen Ras induce la diferenciación de la línea celular de feocromocitoma (PC12) a neuronas (Feramisco, et. al. 1984; Mulcahy, et. al. 1985; Bar-Sagi & Feramisco, 1985). La estimulación con PDGF, factor competente, permite que las células en estado quiescente salgan de  $G_0$  y entren a  $G_1$ , mientras que la estimulación con EGF, factor de progresión, permite que las células entren a la fase S del ciclo celular. Se sabe que Ras es requerido en la vía de transducción de señales tanto de PDGF como de EGF, lo que refleja el requerimiento de la activación de Ras tanto para el punto de restricción  $G_0/G_1$ , como para el de  $G_1/S$ . (Moodie & Wolfman, 1994).

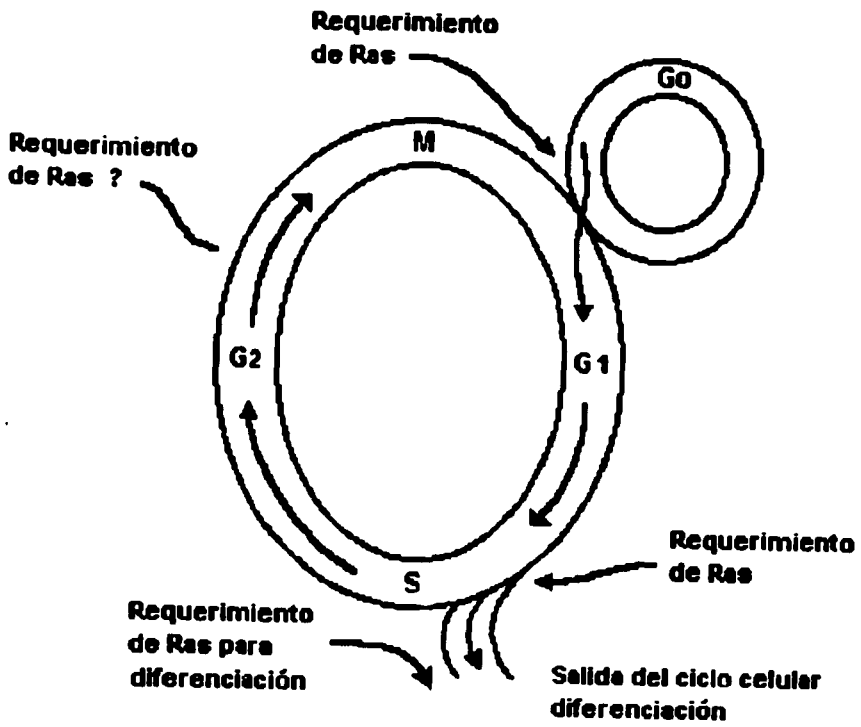
Mucha de los estudios se han concentrado en los puntos de restricción antes mencionados pero cada vez existen más evidencias que indican que la transición  $G_2/M$  es otro punto de regulación importante en ciclo celular, se sabe que se requiere de la expresión de genes específicos como las ciclinas para entrar a la mitosis; este punto de restricción controla que las células no entran a mitosis si son muy pequeñas o no se ha terminado de replicar su DNA. Existe un reporte que sugiere que Ras es requerido para salir de  $G_2$  y entrar a mitosis. Al parecer el oncogen K-Ras no solo es necesario para la transición  $G_1/S$ , sino que se requiere para la transición  $G_2/M$  en células NRK. La inactivación de v-K-Ras cuando las células se encuentran en la fase S del ciclo celular provoca un arresto en  $G_2$ , bloqueo que únicamente se puede revertir con la reactivación de la proteína Ras. La expresión del gen Ras normalmente se puede iniciar en fase  $G_1$ , también, por lo que la adición de suero a células bloqueadas en  $G_2$  no estimula la expresión de Ras, cual es necesaria para entrar a la mitosis.

Unicamente los factores que actúan en un punto crítico antes del paso G<sub>1</sub>/S serán capaces de inducir la activación de Ras que permita el transito por G<sub>2</sub> (Durkin & Whitfield, 1987).

Una manera de explicar como es que Ras se encuentra participando en varios puntos de control y en un momento dado solo activa un estado específico del ciclo celular, es la existencia de diversas vías efectoras de Ras que sean únicas para cada punto de restricción. Esto se encuentra apoyado por la existencia de diversos efectores de Ras, por la presencia de diferentes isoformas de las cinasas MAP y por las interconexiones de diversas vías de señalización que regulan de diferente manera la vías dependientes de Ras. Lo cual permite tener una variedad de combinaciones, en la que cada una de ellas determina un punto particular de regulación al controlar de diferente manera la expresión de genes específicos para cada fase del ciclo celular (Moodie & Wolfman, 1994) (Figura D)

## VII. Función biológica de Ras.

Los genes Ras han sido identificados en aves, insectos, moluscos, plantas, hongos, levaduras y mamíferos. Las tres proteínas Ras (H-, K- y N-Ras) de mamíferos tienen secuencias muy similares a la proteína Ras de *Schizosaccharomyces pombe* y a los primeros 160 aminoácidos de las dos proteínas Ras de *Saccharomyces cerevisiae* (60% de identidad). La alta conservación de las proteínas Ras a través de la evolución de los eucariontes sugiere que juegan un papel fundamental en las funciones básicas de la célula (Barbacid, 1987; DeFeo, et. al. 1983; Dhar, et. al. 1984; Powers, et. al. 1984; Neuman-Silberberg, et. al. 1984; Reymond, et. al. 1984; Mozer, et. al. 1985; Swanson, et. al. 1986; Nadin-Davis, et. al. 1986a). La evolución ha preservado su función biológica básica, a tal grado de tener la capacidad de funcionar en sistemas heterólogos: los proteínas Ras de levadura pueden transformar células de mamífero, mientras que los genes Ras de mamífero bajo el control adecuado de promotores de



**Figura D**

levadura pueden complementar a las mutantes Ras-1 y Ras-2 y permitir su crecimiento (Clark, et. al. 1985; DeFeo, et. al., 1985; Kataoka, et. al. 1985).

Las proteínas Ras participan en múltiples y distintos procesos biológicos: En *Saccharomyces cerevisiae*, Ras está involucrada en la supervivencia de la levadura, al regular la actividad de la adenilato ciclasa y la concentración del cAMP, el cual regula el crecimiento y la división celular (Casperson, et. al. 1983; Matsumoto, et. al. 1983; Toda, et. al. 1985; Gibbs & Marshall, 1989). En *Schizosaccharomyces pombe*, participa en el apareamiento de las levaduras (Fukui, et. al. 1986; Nadin-Davis, et. al. 1986b). En *Drosophila melanogaster*, participa en proliferación celular cuando son larvas, mientras que en los adultos se expresa en tejido reproductivo y cerebro, y participa principalmente en el desarrollo y diferenciación de alas y ojos (Mozer, et. al. 1985; Segal & Shilo, 1986; Bishop & Corces, 1988; Gibbs & Marshall, 1989). Al parecer en el molusco *Aplysia* tiene que ver con la diferenciación del tejido nervioso principalmente de neuronas (Swanson, et. al. 1986). En el sistema de *Xenopus laevis*, Ras juega un papel importante en la maduración de oocitos induciendo la meiosis (Birchmeier, et. al. 1985). En el nemátodo *Caenorhabditis elegans* participa en el desarrollo de la vulva (Han & Sternberg, 1990; Bollag & McCormick, 1991). En mamíferos está involucrado tanto en procesos de proliferación como en procesos de diferenciación. Por lo tanto, al parecer las proteínas Ras funcionan como un cruce crítico en la cascada de transducción de señales en muchos organismos (Barbacid, 1987).

Los proteínas Ras en mamíferos son ubicuas y se expresan a bajos niveles en casi todos los tipos celulares. En la mayoría de los linajes, el nivel de expresión de Ras es significativamente más alto en células inmaduras que en las diferenciadas. Sin embargo, niveles elevados de expresión de Ras no siempre correlacionan con proliferación celular, en ciertos tipos celulares que se encuentran en diferenciación terminal como son células epiteliales de las glándulas endócrinas y las neuronas del sistema nervioso central la expresión de Ras es elevada. Por lo que, las proteínas Ras al parecer participan tanto en la proliferación como en la diferenciación celular, dos procesos que se sabe son mutuamente excluyentes (Barbacid, 1987).



**Diversos experimentos apoyan la participación de Ras en procesos de proliferación:**

**1) La microinyección de anticuerpos anti-Ras bloquea la respuesta mitogénica de células NIH-3T3 a factores de crecimiento presentes en el suero (Mulcahy, et. al. 1985). 2) La microinyección de la proteína oncogénica H-Ras a fibroblastos de ratón NIH3T3 provoca la proliferación y la transformación neoplásica de los mismos (Feramisco, et. al. 1984; Stacey & Kung, 1984). 3) La microinyección de anticuerpos específicos para Ras revierten el fenotipo maligno producido por la proteína H-Ras oncogénica (Feramisco, et. al. 1985; Kung, et. al. 1986). 4) La expresión de mutantes dominantes negativas de Ras inhiben el crecimiento celular (Feig & Cooper, 1988; Cai, et. al. 1985; Sigal, et. al. 1986; Farnsworth & Feig, 1991; Jung, et. al. 1994; Quilliam, et. al. 1995)**

Además de sus propiedades transformantes, los oncogenes Ras también pueden inducir **diferenciación**. Se ha observado: **1) La diferenciación de la línea celular de feocromocitoma (PC12) a neuronas cuando se infecta con el virus del sarcoma murino de Kirsten o con el de Harvey (v-K-Ras, o v-H-Ras, respectivamente) (Noda, et. al. 1985); cuando se microinyecta el oncogen Ras o el proto-oncogen H-Ras unido a un análogo no hidrolizable de GTP (Bar-Sagi & Feramisco, 1985; Satoh, et. al. 1987). 2) La inducción por Ras de extensión de neuritas en neuronas embrionarias (Borasio, et. al. 1989). 3) La diferenciación de células de carcinoma embrionarias (F9) a células endodérmicas (Yamaguchi-Iwai, et. al. 1990). 4) La introducción del oncogen v-H-Ras provoca la diferenciación endócrina de células de carcinoma de médula de tiroides a células C de tiroides las cuales dejan de proliferar, empiezan a expresar calcitonina y a tener gránulos citoplasmáticos secretorios. (Nakagawa, et. al. 1987).**

Es difícil dilucidar como es que Ras puede participar en varios puntos de control del ciclo celular y sobretodo regular procesos tan opuestos como son el crecimiento y la diferenciación. Más aún, cuando todavía no se conocen con precisión cuales y cuantos son efectores y/o reguladores de Ras, y no se sabe en dónde diferentes vías de señalización se inter-conectan e inter-regulan

Estudios recientes apoyan que un factor importante que determina si una célula responde a una señal externa proliferando o diferenciándose, es la **duración de dicha señal**. El tratamiento de células **PC12** con **NGF** (factor de crecimiento nervioso) o **EGF**, produce **diferenciación** o **proliferación** respectivamente. La activación por ambos factores, al parecer se da por la utilización de la misma vía de transducción de la señal, en la cual participa **Ras** y las **MAP cinasas**. Sin embargo, se han encontrado **diferencias cuantitativas** entre las señales de proliferación y diferenciación. La estimulación con **NGF** resulta en una elevación persistente de **Ras-GTP** y una activación sostenida por varias horas de **ERK**; mientras que la estimulación con **EGF** produce un elevación momentánea de **Ras-GTP** y una activación transitoria de **ERK**. Por lo tanto, una activación prolongada compromete a las células **PC12** a diferenciarse, mientras que una activación transitoria resulta en proliferación celular. Esto es consistente con el hecho que la transfección del oncogen **Ras** a células **PC12** produce diferenciación, lo cual es esperado, si la forma oncogénica de **Ras** produce una activación prolongada de **ERK**. Las diferencias cuantitativas en la activación de **ERK**, al parecer se traducen a **diferencias cualitativas** en la activación de los **factores de transcripción** y por lo tanto en la **expresión de genes**. Por tanto, es posible que genes con promotores que contienen sitios con baja afinidad para un factor de transcripción, solo se expresan cuando el factor de transcripción activado se encuentre en niveles altos, mientras que aquellos que tienen sitios con una alta afinidad se expresan con niveles muy bajos del factor de transcripción activado (Marshall, 1995).

Existen diversas maneras para que un receptor mande una señal transitoria y otro una señal sostenida: concentración del ligando, número de receptores, velocidad de internalización del receptor y regulación negativa del mismo. Además de la probable activación simultánea de varias vías que le permitan regular la amplitud y duración de la señal, por ejemplo la distinta regulación de **ERK** por vías independientes a **Raf** o **Ras** que puedan producir diferencias en el nivel y duración de la activación de **ERK** por uno u otro receptor (Marshall, 1995).

No es un requisito que la activación sostenida invariablemente de lugar a diferenciación, mientras que la activación transitoria siempre conlleve a proliferación. En otros tipos celulares se puede dar lo contrario, se sabe que en fibroblastos la activación sostenida de ERK produce proliferación. Al parecer las células de mamífero están programadas para interpretar las señales extracelulares de manera diferente. Esto podría lograrse por una regulación transcripcional específica y diferente para cada linaje celular, la cual está principalmente determinada: 1) en si los elementos reguladores se encuentran en una conformación de la cromatina accesible o inaccesible (cromatina condensada) y 2) en si se expresan o no factores de transcripción específicos en un determinado tipo celular (Marshall, 1995; Hill & Treisman, 1995)

## **OBJETIVOS**

### **General:**

Analizar el efecto que tiene la introducción del gen H-ras normal o mutado en las células HeLa.

### **Particulares:**

- Observar si existen alteraciones en la morfología, en la estructura de la cromatina y/o en el ciclo celular en las células transfectadas.
- Si se observan alteraciones, determinar si existen diferencias entre las células transfectadas con el gen normal y el gen mutado.

## MATERIAL Y METODOS

### Construcción de los plásmidos RAS<sup>silv</sup>/neo y RAS<sup>mut</sup>/neo:

La obtención de los plásmidos RAS<sup>silv</sup>/neo y RAS<sup>mut</sup>/neo se realizó de acuerdo a técnicas convencionales. Los plásmidos EC y EJ, que contienen el gen H-Ras silvestre (Ras<sup>silv</sup>) y el gen mutado (Ras<sup>mut</sup>) respectivamente, fueron digeridos con la endonucleasa BamHI y el fragmento liberado de 6.6kb que contiene el gen completo se purificó por electroforesis en gel de agarosa seguido de "Gene Clean" (BIO 101). Los fragmentos con extremos BamHI cohesivos se insertaron en el sitio de restricción BamHI del plásmido vector SV<sub>2</sub>neo, utilizando la ligasa de DNA del bacteriófago T4. Se transformaron bacterias *E. coli* y se seleccionaron colonias resistentes a ampicilina (Sambrook et. al. 1989). Las clonas seleccionadas se caracterizaron con enzimas de restricción y así se obtuvieron los plásmidos: RAS<sup>silv</sup>/neo conteniendo el gen Ras normal y el RAS<sup>mut</sup>/neo con el gen mutado, ambos unidos al gen de resistencia a neomicina. Se hicieron maxipreparaciones de cada plásmido, lisando a las bacterias por álcali y purificando el plásmido por centrifugación al equilibrio en gradientes de cloruro de cesio - bromuro de etidio (Sambrook et. al. 1989).

### Cultivo celular:

Se trabajó con la línea celular HeLa, proveniente de un adenocarcinoma epitelial cérvico uterino. Las células se crecieron en Medio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) con estreptomycin (100µg/ml) y penicilina (100U/ml), suplementado con 10% de suero neonato de Gibco, (en los casos en que se especifique se suplementó el medio con suero fetal bovino), en cajas petri de 60 y 100mm<sup>2</sup> a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

## **Transfección celular:**

**Transfección por electroporación.-** Se crecieron las células en cajas p100, una caja para cada plásmido. Se utilizaron 2.5µg de cada plásmido linearizado con EcoRI (pRAS<sup>neo</sup>/neo, pRAS<sup>neo</sup>/neo o pSV<sub>2</sub>neo) y 200µg de DNA acarreador (DNA de esperma de salmón) por muestra. El DNA (plásmido y acarreador) se llevó a un volumen de 250µl con HeBS pH 7.05 (NaCl 137mM, KCl 5mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.7mM, glucosa 6mM, Hepes 20mM; filtrado por membranas de 0.22µm) por muestra, se colocó en las celdas para electroporación; se "vortexeó" suavemente y se dejó en hielo. Las células en confluencia se desprendieron de la caja con tripsina (tripsina 0.05%, NaCl 137mM, KCl 5.3mM, dextrosa 5mM, NaHCO<sub>3</sub> 7mM, EDTA 0.5mM, filtrado por membranas de 0.22µm) y se lavaron dos veces por centrifugación con 5ml de HeBS. Las células se resuspendieron en 250µl de HeBS por muestra. Se colocaron en las celdas para electroporación y se "vortexearon" despacio. Se incubaron en hielo por 10 minutos, para que el DNA se aproxime lo suficiente a las células. Se electroporaron durante 10 segundos en un electroporador Gene-Pulser BIO-RAD a 250V y 960µF, para formar poros en la membrana. Se incubaron 10 minutos en hielo, para que el DNA entre a las células, después de los cuales se sembraron las células en DMEM con suero neonato al 10% (Guido, et. al. 1992).

Las células una vez electroporadas se clonaron por dilución limitante en cajas de 96 pozos, sembrando 30 pozos por cada plásmido. Al cuarto día, una vez que las células se habían recuperado de la electroporación, se les adicionó 800µg/ml de geneticina (G418) y se seleccionaron las células por 15 días. Después de lo cual se pasaron 12 clonas por cada plásmido a cajas de 24 pozos. Posteriormente, se expandieron 4 clonas de cada condición a cajas p100 y se congelaron en nitrógeno líquido.

**Transfección con lipofectina.-** Se crecieron las células a un 50-60% de confluencia en cajas p100, una caja para cada plásmido. Se utilizaron 10µg de cada

plásmido circular: pRAS<sup>wt</sup>/neo, pRAS<sup>mut</sup>/neo o pSV<sub>2</sub>neo. Se mezcló cada plásmido con 20µl de lipofectina, se "vortexó" y se dejó 15 minutos a temperatura ambiente. A la caja petri con las células adheridas se le retiró el medio, dejando solo 1ml. Se le agregó el plásmido, se mezcló suavemente y se dejó incubando a 37°C por tres horas, agitando cada 20 minutos. Después de las tres horas se le agregó 9ml de medio con suero. A las 24hrs, se le cambió el medio y se le agregó 800µg/ml de G418 (Felgner, et. al. 1987).

Se seleccionaron por 15 días, después de lo cual se tomaron 36 clonas por cada plásmido transfectado y se crecieron en cajas con 12 pozos, de ahí se tomaron 8 clonas que se expandieron a cajas p100, después de lo cual se congelaron en nitrógeno líquido.

Se eligieron dos clonas por cada plásmido transfectado, una por cada transfección. Todos los resultados mostrados se realizaron en las clonas obtenidas por electroporación y solo cuando se especifique en el texto los resultados corresponderán a las clonas obtenidas por transfección con lipofectina.

Debido a que la tendencia de las células transfectadas con Ras es a desaparecer, no se permitió que las células a estudiar tuvieran muchas divisiones, así que se expandieron a un número significativo, para poder hacer los análisis necesarios, y se congelaron. Por lo tanto, todos los resultados están hechos en células que tienen aproximadamente el mismo número de divisiones entre si.

### **Análisis morfológico:**

Una vez que se obtuvieron clonas de células transfectadas establemente, éstas se sembraron en cajas p60 y se dejaron crecer por 72hrs. La células vivas se fotografiaron en un microscopio invertido Nikon TMS, objetivo ph 2DL 20x, cámara Nikon Fx-35WA en exposición automática, película Kodak blanco y negro, asa 125.

**Tinción con hematoxilina-eosina.**- Las células se crecieron en cubreobjetos por 72hrs, se lavaron 3 veces con PBS pH 7.0 (NaCl 137mM, KCl 3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2mM) y se fijaron con etanol 80% - sacarosa 10% durante 20 minutos. Después de este tiempo se lavaron con H<sub>2</sub>O corriente por 5 minutos. Se tiñeron por 1 minuto con hematoxilina de Harris (hematoxilina 0.5%, sulfato de aluminio y amonio 10%, óxido rojo de mercurio 0.25%, etanol absoluto 5%). Se lavaron con H<sub>2</sub>O corriente por 1 minuto para retirar el exceso de colorante y con etanol al 50% por 1 minuto. Se tiñeron con eosina Y al 1% (en etanol al 75%) por 15 segundos e inmediatamente se lavaron en etanol al 100% para retirar el exceso de eosina (Bancroft & Stevens, 1990). Se dejaron secar las muestras a temperatura ambiente y se montaron en los portaobjetos. Las muestras se fotografiaron en un microscopio de luz, Zeiss Axioskop, objetivo Plan-Apochromat 63x y Plan-Neofluar 100x, con película Kodak de color asa 200, utilizando una cámara Contax 167MT, con exposición automática.

**Análisis de la estructura de la cromatina - Tinción con DAPI (4'6-diamidino-2-fenilindol.2HCl).**- Las células se crecieron en cubreobjetos por 72hrs., tiempo en el cual se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron con etanol 80% - sacarosa 10% por 20 minutos. Se lavaron las células con H<sub>2</sub>O corriente por 5 minutos y se tiñeron por 1 hora con DAPI (2.5µg/ml en amortiguador de Tris pH 8.0 con MgCl<sub>2</sub> 0.5M) (Hacker et. al., 1980). Después se lavaron las células 3 veces con PBS, para retirar el exceso de colorante y se montaron los cubreobjetos con PBS-Glicerol 2:1 en los portaobjetos. Se fotografiaron las células en un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axioskop, objetivo Plan-Neofluar 100x, con los filtros para DAPI (excitación 450-490nm - emisión 510nm); se utilizó película Kodak de color, asa 200 y la cámara Contax 167MT en exposición automática.



### **Cuantificación de la proporción de células multinucleadas en la población:**

**Curso temporal.-** Las células se sembraron a baja densidad, 500 células por caja p60, se dejaron crecer por 72hrs, para permitir la formación de la colonia, en suero fetal bovino al 10%. Después de este tiempo se les cambio el suero a neonato al 10%, se circularon y contaron al microscopio invertido aproximadamente 100 colonias por caja, determinando cuantas eran colonias de células multinucleadas. Se graficó el porcentaje de colonias de células multinucleadas con respecto al total de colonias contadas a lo largo del cultivo: 72, 144 y 216hrs.

Se determinó que la colonia era de células multinucleadas cuando la mayoría de las células lo eran, esto es importante sobre todo a tiempos largos del cultivo donde cada colonia está formada por muchas células.

**Sensibilidad al suero.-** Se hizo un experimento similar al anterior, las células sembradas a baja densidad, 500 células por caja p60, se crecieron en suero fetal bovino al 10% por 72hrs, tiempo en el cual se le cambio el suero a fetal bovino al 2% o neonato al 10%, o bien se dejaron con suero fetal bovino al 10%. Se circularon y contaron aproximadamente 100 colonias por caja. Se determinó el porcentaje de colonias de células multinucleadas con respecto al total de colonias contadas para cada tiempo: 72, 144, y 216hrs.

**Proporción de células multinucleadas con "x" número de núcleos.-** Se sembraron las células a baja densidad, 500 células por caja p60, se dejaron crecer por 72hrs en suero fetal bovino al 10%. Se les cambio el suero a neonato al 10%. Se circularon y contaron 100 colonias por caja. Se determinó el número de colonias de células multinucleadas. A cada una de estas colonias se le determinó, por observación al microscopio, si tenía células con dos núcleos, células con tres, cuatro o más núcleos. Debido a que es imposible contar todas las células que hay en cada colonia y más difícil aún determinar cuantos núcleos tienen todas esas células, sobre todo a tiempos largos del cultivo cuando la colonia esta formada por muchas células, no se

cuantificó el número de células multinucleadas, con "x" número de núcleos, por colonia, únicamente se determinó si había células (por lo menos más de tres o cuatro por colonia) que tenían dos, tres, cuatro o más núcleos. Se gráfico el porcentaje de colonias, con respecto al total de colonias contadas (normales y multinucleadas), (eje de las ordenadas) que tienen células con "x" número de núcleos (eje de las abscisas).

#### **Análisis de la expresión de H-Ras por Northern blot en las células transfectadas:**

**Extracción del RNA mensajero.-** Las células se crecieron en cajas p100 a un 80% de confluencia y se hizo la extracción del RNA total con tiocinato de guanidina. A las cajas se les retiró el medio y se les agregó 200µl de la solución de tiocinato de guanidina (tiocinato de guanidina 4.5M, N-lauroilsarcosil de Na 0.5%, Citrato de Na 25mM, 2-mercaptoetanol 0.1M, EDTA 25mM pH 7, filtrado por membrana de 0.45µm) por caja. Se rasparon con un gendarme estéril y se recuperó el lisado en tubos eppendorffs. Se hizo una extracción fenol-cloroformo, utilizando fenol saturado con H<sub>2</sub>O. Se precipitó el RNA con 0.025 volúmenes de ácido acético 1M y 0.5 volúmenes de etanol absoluto a -20°C toda la noche, se recuperó la pastilla por centrifugación. (Chomczynski, et. al. 1987)

La pastilla de RNA total se resuspendió en buffer de unión (Tris 10mM pH 7.5, EDTA 1mM, NaCl 0.3M, SDS 0.1%) y el RNA mensajero (mRNA) se purificó por una columna de oligo dT (100mg de celulosa-oligo dT). Se siguió el procedimiento que indica el fabricante (Life-Technologies): el RNA se calienta para romper las estructuras secundarias y se pasa a través de la columna en la presencia de 0.3M de NaCl para promover la hibridación de la cola de poli(A) de los mRNA al oligo dT unido a la celulosa, después de que la columna es lavada para remover el RNA no mensajero, se eluye el mRNA retirando el NaCl, lo que desestabiliza los híbridos oligo dT-poli(A). La pastilla de mRNA que se obtuvo se resuspendió en 50µl de H<sub>2</sub>O tratada con dietilpircarbonato (DEPC).

**Transferencia del mRNA.-** Se corrieron de 2-4 $\mu$ g de mRNA por carril en un gel de agarosa al 1% con formaldehído 1.1M y MOPS 1x (solución stock 10x: MOPS 0.4M, NaAc 0.1M, EDTA 10mM, pH 7, esterilizado por autoclave), utilizando H<sub>2</sub>O tratada con DEPC. El mRNA de cada muestra se llevó a un volumen de 10 $\mu$ l con H<sub>2</sub>O (tratada con DEPC), se le agregó 3 $\mu$ l de MOPS 10x, 15 $\mu$ l de formamida, 2 $\mu$ l de formaldehído al 37% y 3 $\mu$ l de colorante de corrida (Ficol 400 25%, EDTA 1mM pH 8, 0.4% azul de bromofenol, 0.4% xilencianol). Se mezcló y se desnaturalizó, 3 minutos a 65°C y 2 minutos en hielo. Se cargaron inmediatamente las muestras y se corrió el gel con MOPS 1x a 120V. Se hizo la transferencia a membrana de nylon en seco: se colocaron 4 piezas de papel Whatman 3MM, el gel invertido, la membrana y 3 piezas de papel Whatman 3MM. Todo previamente equilibrado en SSC20x (NaCl 3M, Na<sub>2</sub>citrato.2H<sub>2</sub>O 0.3M, pH 7). Encima se colocó papel de estraza (5-7cm de alto), y un peso de 0.5Kg. Se transfirió toda la noche. Después de la transferencia se fijó el RNA a la membrana con U.V. 0.15J/cm<sup>2</sup>. (Sambrook et. al. 1989 con modificaciones del Dr. R. Rosales)

**Hibridación de las sondas radioactivas al RNA inmovilizado.-** Se hizo la hibridación en bolsas utilizando formamida e incubando a 42°C sin agitación. Se colocó la membrana en una bolsa de hibridación y se le agregó la solución de prehibridación: formamida 50%, Denhardt's 5x (solución stock 50x: Ficoll 400 1%, polyvinylpyrrolidona 1%, albúmina sérica bovina 1%, esterilizado por filtración), SSPE 5x (solución stock 20x: NaCl 3M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0.2M, EDTA 0.02M, pH 7, esterilizado por autoclave), SDS 0.1%, DNA de esperma de salmón 0.2mg/ml (solución stock: 10mg/ml soncado y esterilizado por autoclave) desnaturalizado en el momento: 10 minutos a 100°C y 5 minutos en hielo. Después de prehibridar por 4 horas a 42°C, se descargó la solución y se le agregó la solución de hibridación: formamida 50%, SSPE 5x, Denhardt's 1x, DNA de esperma de salmón 0.1mg/ml y la sonda, estos dos últimos desnaturalizados. Se hibridó por 16 horas a 42°C. (Sambrook et. al. 1989)

Se hibridó primero con la sonda del gen de H-Ras. Después de hibridar se lavó la membrana 4-5 veces con SSPE 2x, SDS 0.1%, pirofosfato 0.03% a 50-55°C (Sambrook et. al. 1989). Se dejó exponiendo la membrana a un placa de rayos-X a -70°C por

72hrs, se reveló y se incubó la membrana con Tris 1mM pH 8, EDTA 1mM pH 8, Denhardt's 0.1x por 2 horas a 75°C, para retirar la sonda (Sambrook et. al. 1989). Después de retirar la sonda, se prehibridó y se hibridó con la sonda del gen de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa humana (GAPDH), se lavó la membrana y se dejó exponiendo por 4 horas.

Se utilizaron como sondas los plásmidos purificados: pEC que contiene el gen de H-Ras silvestre y pBR322/GAPDH que contiene el gen de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa humana; linearizados con EcoRI y marcados con  $\alpha$ -( $^{32}$ P)dCTP por el sistema de "random primer" (kit de Amersham). Después de una hora a 37°C en presencia de la polimerasa Klenow, el producto se hizo pasar por una columna de Sefadex G-50 equilibrada con TEN (Tris 10mM pH 8, EDTA 1mM pH 8, NaCl 100mM) para separar la sonda de la marca no incorporada (Sambrook et. al. 1989)

#### **Análisis del ciclo celular por citofluorometría de flujo.**

Se sembraron  $5 \times 10^5$  células por caja p100, 10 cajas por cada clona. Se tripsinizó una caja por clona cada 6 horas, empezando con el tiempo 0 (que equivale a una hora después de sembradas las células para permitir que éstas se adhieran a la caja) y hasta el tiempo de las 72 horas de cultivo, con excepción de los tiempos de 12, 36 y 60hrs, los cuales no se analizaron.

Las células una vez tripsinizadas se lavaron con PBS por centrifugación, se fijaron con 5ml de etanol al 70% con la ayuda de un vortex y se almacenaron a 4°C. Una vez obtenidas las células de las 72hrs de cultivo, se analizaron todas las muestras en el citofluorómetro. A cada muestra se le retiró el sobrenadante por centrifugación y se le adicionó 3ml de la solución 1 del "High Resolution DNA Kit", (Partec, GmbH-Alemania), la cual tiene detergentes para romper las membranas citoplasmáticas. Se resuspendió el botón con una pipeta pasteur durante 5 minutos y se transfirió 1.5ml de muestra a un tubo para el citofluorómetro. Se le adicionó 2.5ml de la solución 2 (Dapi 2.5 $\mu$ g/ml en

amortiguador de Tris pH 8.0 con  $MgCl_2$  0.5M) (Hacker et. al., 1980). El tubo con la muestra celular resuspendida en las dos soluciones se colocó en la cámara de flujo del citofluorómetro Partec CA-II (GmbH, Alemania), para hacer el análisis del ciclo celular a 20,000 núcleos.

Se obtuvieron los histogramas que muestran el número de núcleos en función de su contenido de DNA. Se reportaron únicamente los tiempos de 0, 24, 42 y 72hrs., los cuales son representativos de la distribución celular en las diferentes fases del ciclo a lo largo del cultivo.

#### **Análisis citogenético:**

Se sembraron  $5 \times 10^5$  células por caja p100 para cada clona y se crecieron por 42hrs. Dos horas antes de cosecharlas se les adicionó 200 $\mu$ l de colcemida por caja y se incubaron a 37°C, para arrestar a las células en mitosis. Se tripsinizaron y centrifugaron para retirar el medio de cultivo, se les agregó 5ml de la solución hipotónica (KCl 0.075M) y se dejaron incubando por 20 minutos a 37°C. Una vez que las células se lisaron, se lavaron y fijaron los núcleos con 5ml de solución fijadora (metanol:ácido acético 3:1). Se guardaron a 4°C en la solución fijadora. (Vega et. al. 1995)

Posteriormente, se prepararon las laminillas: se homogeneiza la muestra y se deja caer con una pipeta pasteur una gota a una distancia de 30-50cm sobre un portaobjeto (previamente enfriado en etanol a -20°C), se seca a la flama y se tiñe con Giemsa al 3% (en PBS) por 3 minutos.

Se observaron al microscopio las muestras y se analizaron 100 metafases por clona para determinar el número de cromosomas por núcleo.

## RESULTADOS

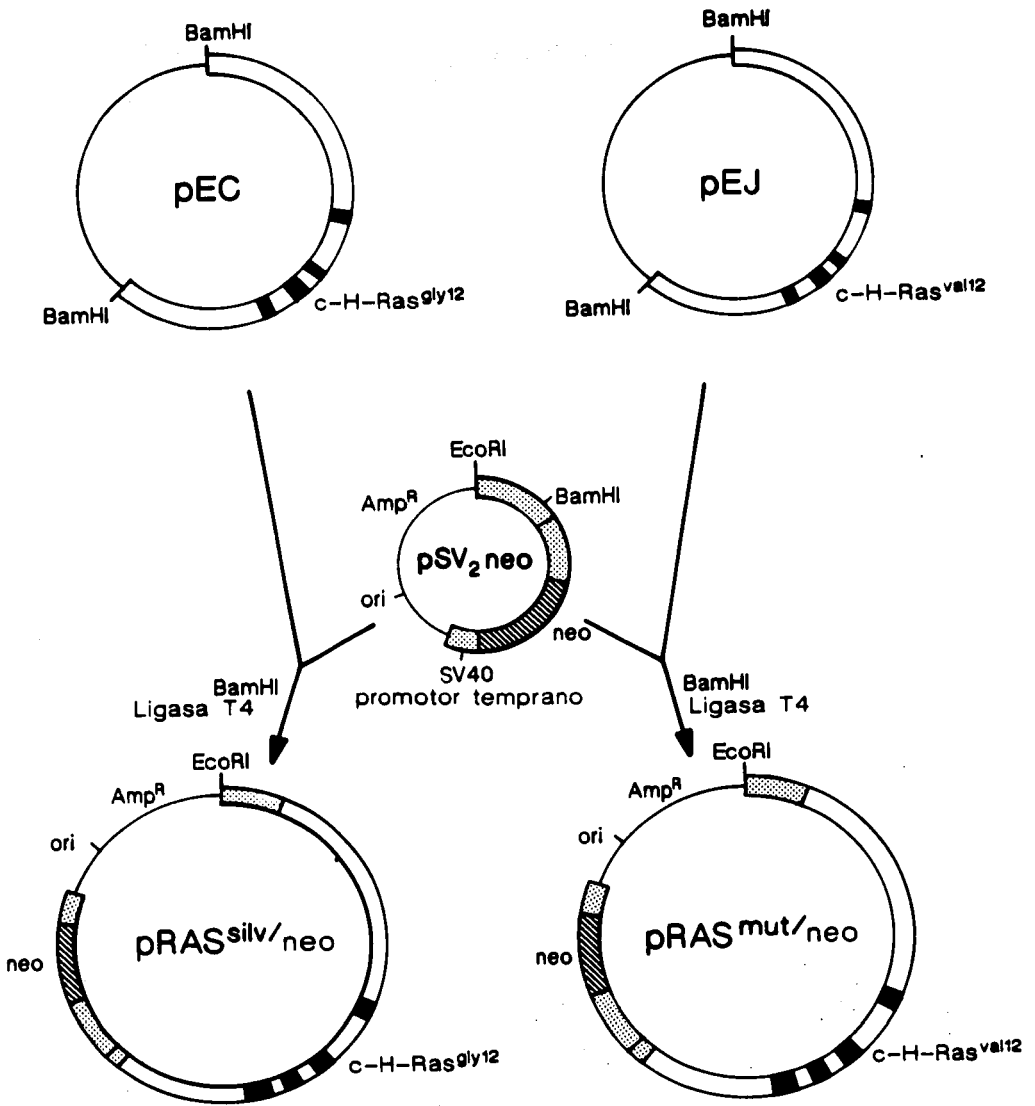
### Transfección estable de H-Ras en células HeLa:

Se transfectaron establemente células HeLa con plásmidos que expresan la versión silvestre o mutada del gen H-Ras. Se utilizaron como control células HeLa sin transfectar o transfectadas con el plásmido vector pSV<sub>2</sub>neo. Las células se clonaron por dilución limitante, después de seleccionarlas con geneticina, se analizó una clona por cada plásmido transfectado.

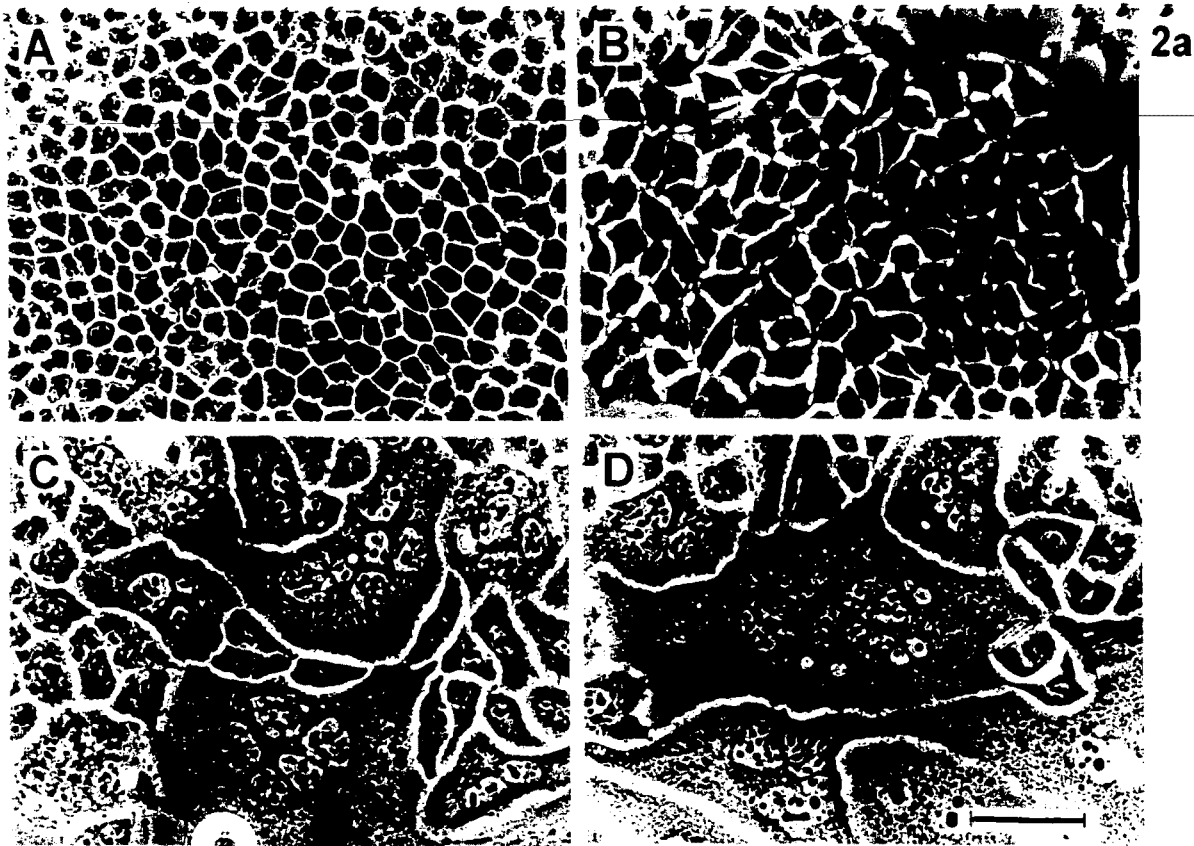
En la figura 1 se muestran los plásmidos: RAS<sup>silv</sup>/neo que contiene el gen c-H-Ras normal (Ras<sup>silv</sup>) y RAS<sup>mut</sup>/neo que contiene el gen mutado con un cambio de glicina por valina en el codón 12 (Ras<sup>mut</sup>). Estos plásmidos se obtuvieron de la inserción de las versiones respectivas, en el plásmido vector pSV<sub>2</sub>neo que contiene el gen de resistencia a neomicina (neo), este último permite seleccionar a las células eficientemente transfectadas. El inicio de la transcripción está en el extremo 5' del gen de neomicina y los genes H-Ras están orientados de tal manera que su transcripción se inicia después de la del antibiótico.

### Cambios morfológicos inducidos por la expresión inapropiada de H-Ras:

Al analizar a las células, transfectadas de manera estable, en un microscopio invertido se encontraron alteraciones morfológicas evidentes. Como se observa en la figura 2a, las células transfectadas con ambas versiones de Ras muestran un tamaño varias veces mayor al de las células transfectadas con el vector solamente o al de las células sin transfectar. Además, se puede observar claramente que estas células gigantes tienen varios núcleos. Es importante señalar que estos cambios morfológicos



**FIGURA 1.-** Estructura de los plásmidos RAS<sup>silv</sup>/neo y RAS<sup>mut</sup>/neo. El plásmido RAS<sup>silv</sup>/neo contiene el gen c-H-Ras normal, y el RAS<sup>mut</sup>/neo contiene el mutado, ambos unidos al gen de resistencia a neomicina. Estos plásmidos se obtuvieron de la inserción de un fragmento de 6.6kb que contiene el gen silvestre o mutado, derivados de los plásmidos pEC o pEJ respectivamente, en el plásmido vector pSV<sub>2</sub>neo, que contiene el gen de resistencia a neomicina (neo).



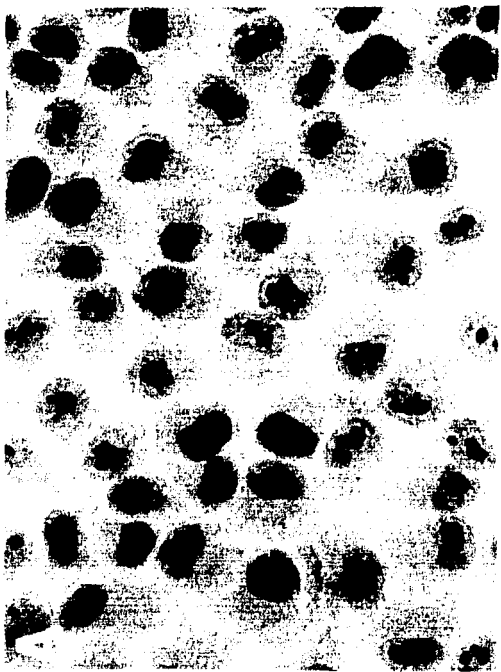
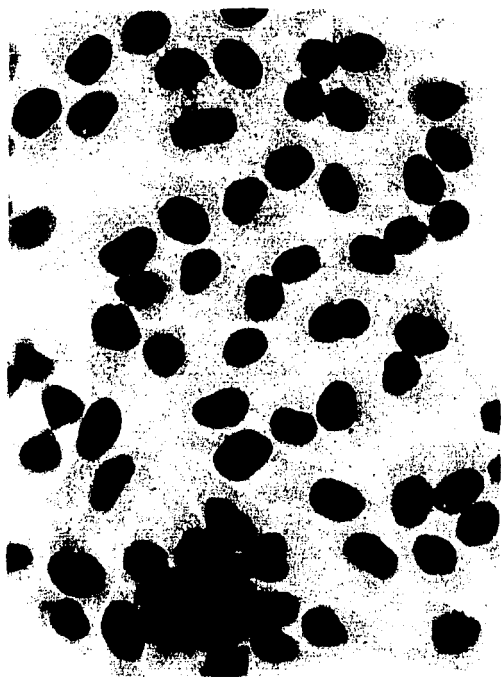
2a

FIGURA 2.- Cambios morfológicos inducidos por la expresión inapropiada de H-Ras.

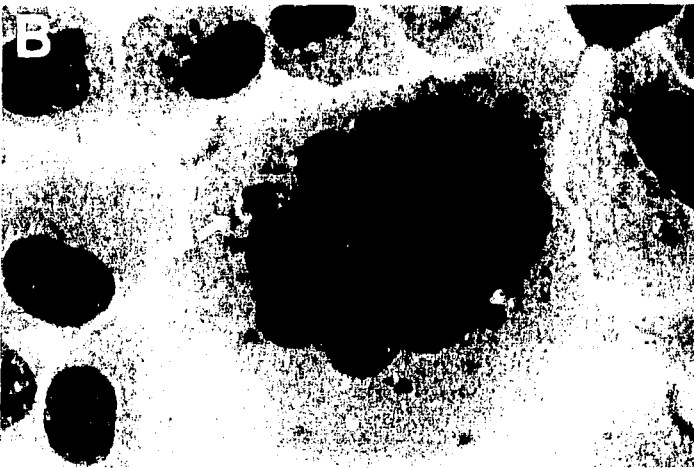
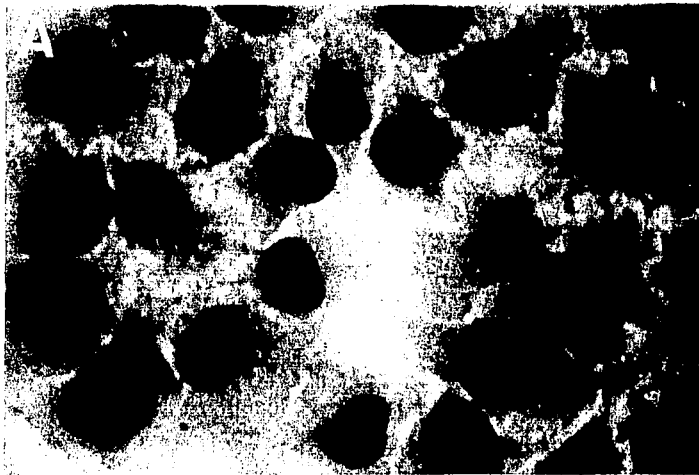
Figura 2a.- Las células de clones establemente transfectadas se crecieron por 72hrs y se fotografiaron vivas en un microscopio invertido. HeLa (A), transfectadas con neo (B), Ras<sup>SHV</sup> (C) o Ras<sup>MTL</sup> (D). La barra equivale a 70μm.

Figuras 2b y 2c.- Las células crecidas en cubreobjetos se fijaron y tiñeron con hematoxilina-eosina, el primero tñe los núcleos de morado y el segundo el citoplasma de rosa. Las muestras se fotografiaron en un microscopio de luz: 2b.- Células HeLa (A), transfectadas con neo (B), Ras<sup>SHV</sup> (C) o Ras<sup>MTL</sup> (D). Barra = 40μm. 2c.- Células transfectadas con neo (A), Ras<sup>SHV</sup> (B) o Ras<sup>MTL</sup> (C). Barra = 25μm. Los micronúcleos están indicados con las flechas.





2c



se observaron en varias clonas de transfecciones independientes, pero solo se analizó con detalle una clona por cada plásmido transfectado.

Para un análisis más detallado de estas alteraciones, las células se crecieron en cubreobjetos y después de 72 horas de cultivo se fijaron y se tiñeron con hematoxilina-eosina. En la figura 2b se puede comparar claramente el gran aumento en el tamaño de las células transfectadas con Ras (C y D) con respecto a los controles (A y B). Como se puede apreciar la célula gigante y multinucleada transfectada con Ras<sup>mut</sup> (D) es mucho más grande que la transfectada con Ras<sup>silv</sup> (C). Aunque es común encontrar en ambas poblaciones, células gigantes con tamaños muy similares entre ellas, también es claro que en las células transfectadas con Ras<sup>mut</sup> aparecen células multinucleadas de un tamaño varias veces mayor que el de las células multinucleadas transfectadas con Ras<sup>silv</sup>. Cabe señalar, que la célula gigante en el panel C contiene cinco núcleos

En la figura 2c, se muestra otro grupo de células multinucleadas. Estas fotografías fueron tomadas con un aumento mayor a las anteriores, como se observa el tamaño de los núcleos de las células multinucleadas (B y C) es mayor al de los núcleos de las células control (A). Se puede ver que el tamaño de los núcleos inclusive dentro de una misma célula multinucleada varía considerablemente (C).

Se observa la presencia de micronúcleos, signo de inestabilidad cromosómica, tanto en las células transfectadas con Ras<sup>silv</sup> como en las transfectadas con Ras<sup>mut</sup>.

#### **Anormalidades nucleares inducidas por H-Ras:**

Las células se crecieron en cubreobjetos y después de 72 horas de cultivo se fijaron y se tiñeron con DAPI, figura 3. Se puede observar el desorden nuclear que existe en cada célula multinucleada (D y F). El desorden nuclear en la célula multinucleada transfectada con Ras<sup>mut</sup> (F) es mayor que en la transfectada con Ras<sup>silv</sup>

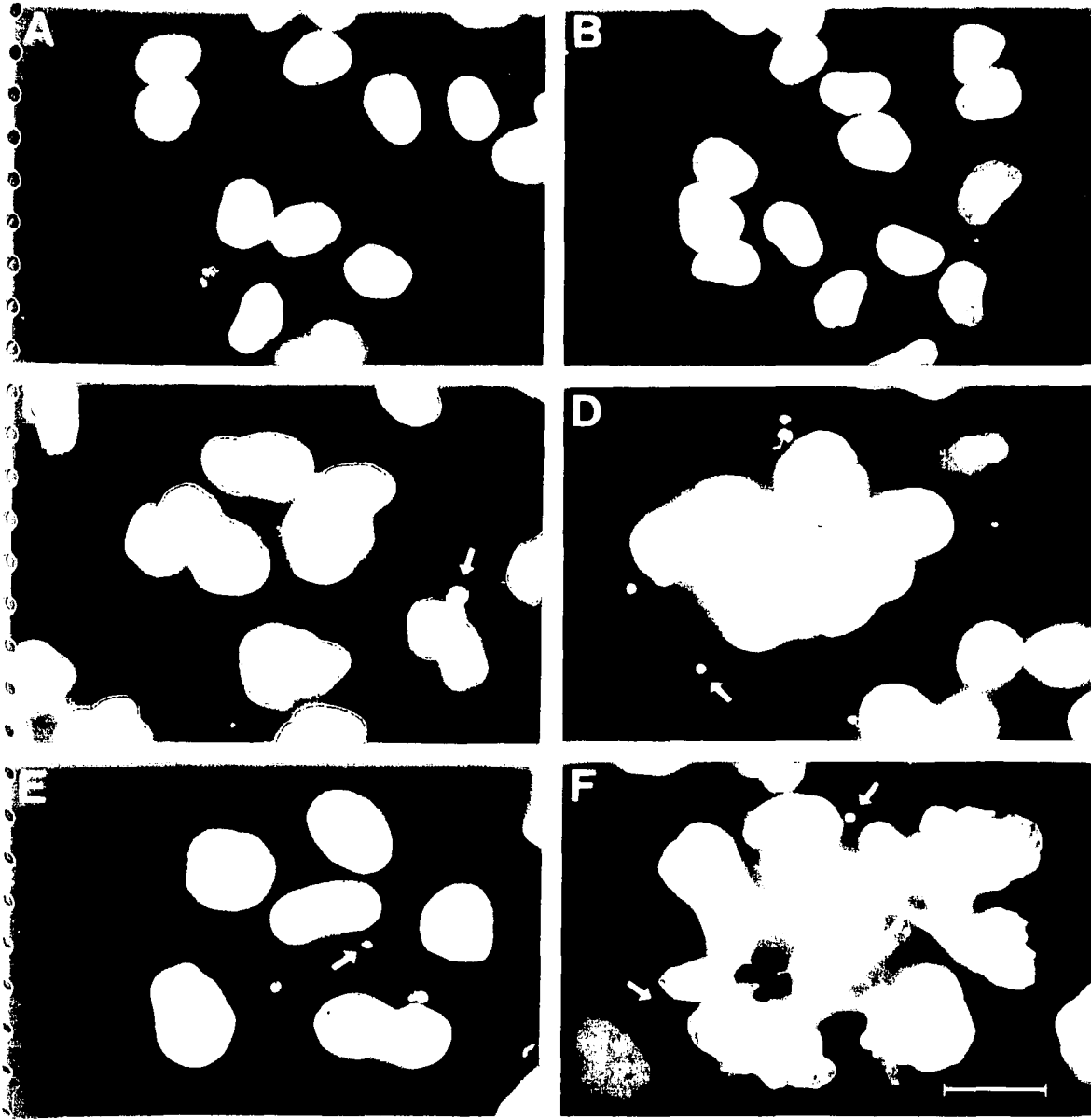


FIGURA 2. Anormalidades nucleares inducidas por H-Ras. (A) e (B) células normais, (C) células com defeitos nucleares de 10<sup>6</sup> células normais transfectadas com H-Ras, (D) células com defeitos nucleares de 10<sup>6</sup> células normais transfectadas com H-Ras e (E) células com defeitos nucleares de 10<sup>6</sup> células normais transfectadas com H-Ras. (F) células com defeitos nucleares de 10<sup>6</sup> células normais transfectadas com H-Ras. Barra de escala = 10 μm.

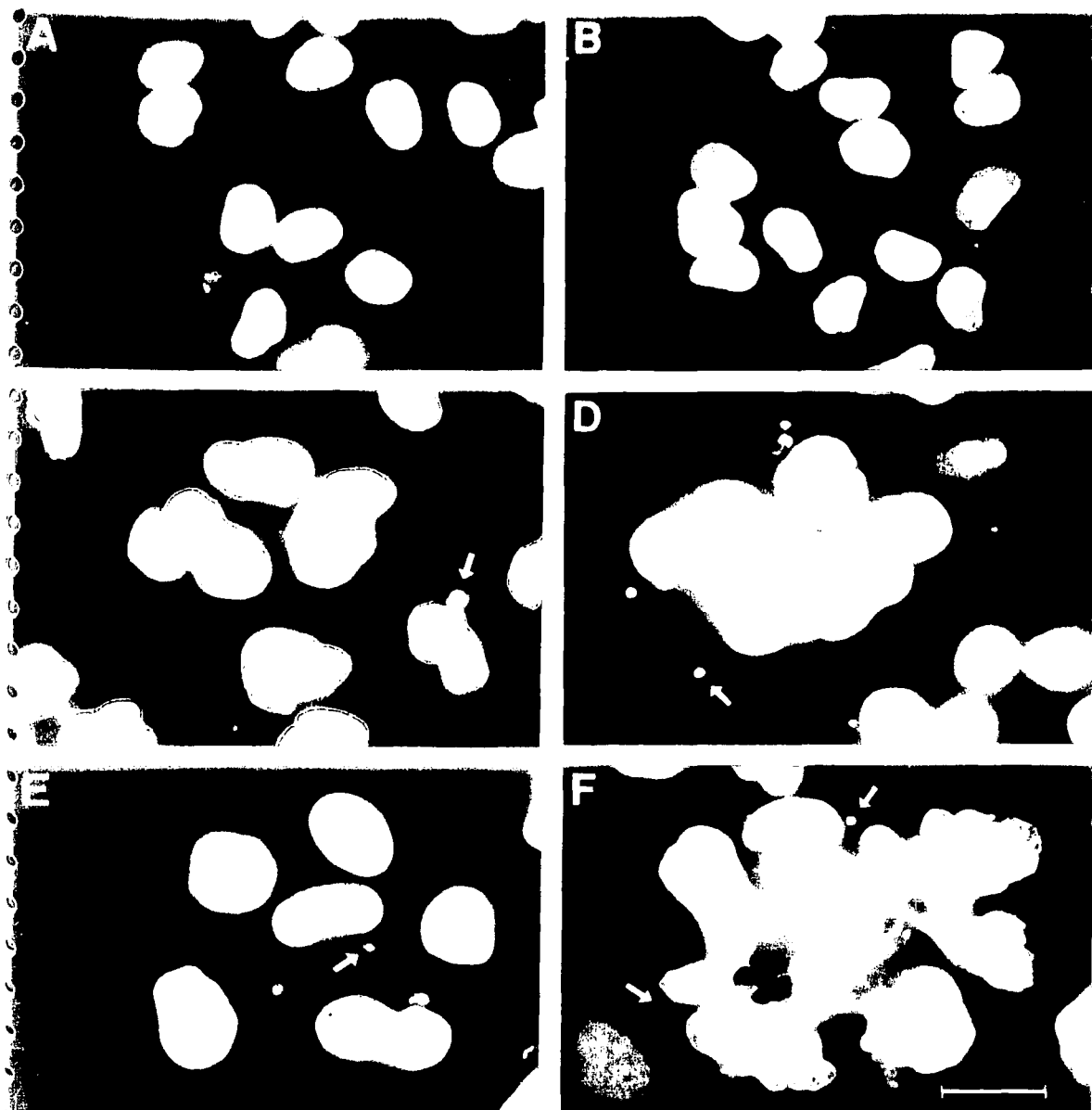


Fig. 1. *p53* translocaciones nucleares inducidas por H-Ras. Se transfirieron los genes *h-ras* y *p53* en células de fibroblastos de ratón. Los puros de *p53* transfiridos (**A-C**) mostraron una localización de *p53* en el citoplasma, mientras que los puros de *h-ras* (**D-F**) mostraron una localización de *p53* en el núcleo. Las flechas indican *p53* nuclear. Barra = 10  $\mu$ m.

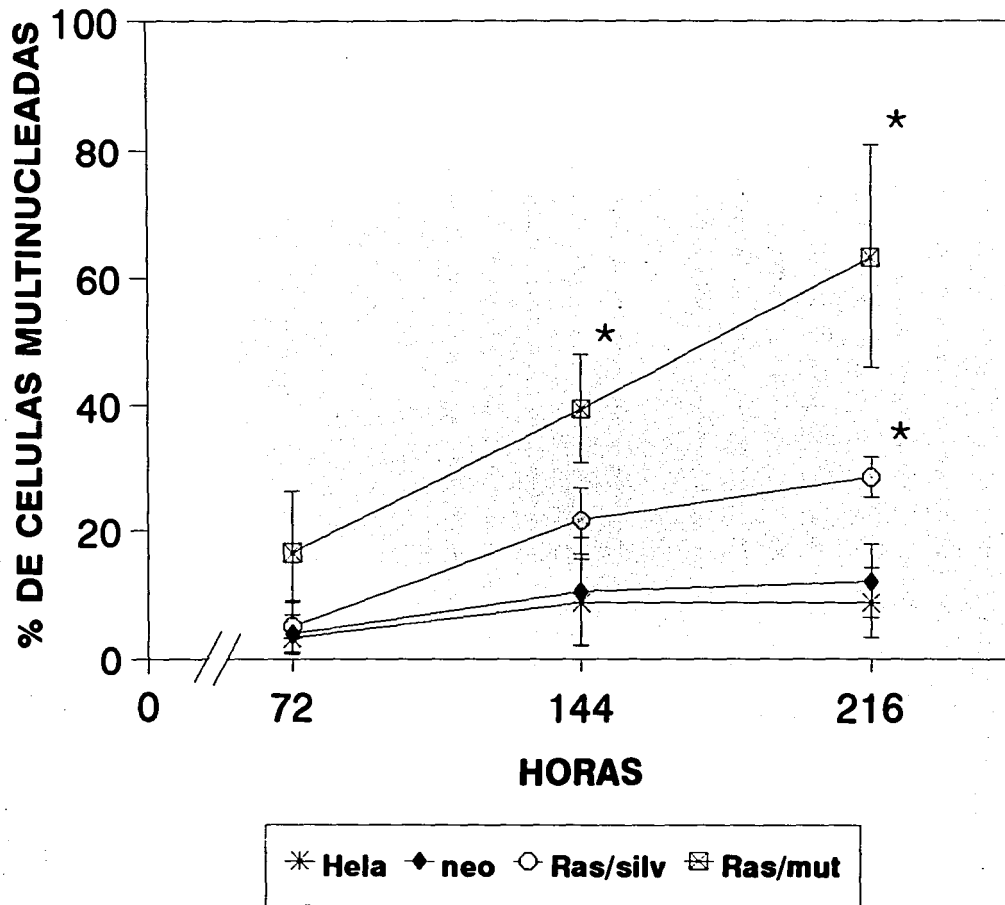
(D). Las células transfectadas con Ras<sup>mut</sup> alcanzan muchas veces niveles de desorganización mayores que las células transfectadas con Ras<sup>silv</sup>, siendo más frecuente encontrar células con núcleos más grandes y de formas anormales en las primeras que en las últimas. Aquí, se hace más evidente, que los núcleos de las células transfectadas con el gen Ras silvestre o mutado, aún en algunas células que no se encuentran multinucleadas (C y E), son más grandes que los núcleos de las células transfectadas con el vector (A y B).

Los micronúcleos se observan más claramente en la tinción con DAPI; hay la aparición de micronúcleos en las células transfectadas con el gen Ras, silvestre o mutado, aún en células que solo tienen un núcleo, por lo que al parecer este evento precede al de la aparición de varios núcleos por célula. Sin embargo, aparecen también micronúcleos posteriormente a la multinucleación. Es común encontrar en las células transfectadas con Ras<sup>mut</sup> (E y F) micronúcleos de mayor tamaño que los de las células transfectadas con Ras<sup>silv</sup> (C y D).

#### **Curso temporal de la aparición de células multinucleadas:**

Se determinó la proporción de células gigantes en la población. Se sembraron las células a baja densidad y se cuantificó el número de colonias de células multinucleadas a través del tiempo. Se graficó el porcentaje de colonias de células multinucleadas con respecto al total de colonias contadas. Se observa en la figura 4, que aproximadamente un 20% de la población de células transfectadas con Ras<sup>silv</sup> son gigantes a las 144hrs. mientras que a las 216hrs., aumenta a un 30%. El efecto con Ras<sup>mut</sup> es mayor, teniendo un 40% de células multinucleadas a las 144hrs y un 60% a las 216hrs. En las células control la proporción de células gigantes es mucho menor alcanzando un 10% a las 216hrs.

La gráfica muestra tres experimentos independientes, como se puede observar las desviaciones estándar son considerables en las células transfectadas con el



**FIGURA 4.-** Curso temporal de la aparición de células multinucleadas. Se sembraron las células a baja densidad y se dejaron crecer por 72hrs, para permitir la formación de colonias. A partir de ese momento, se cuantificó el número de colonias formadas por células gigantes, a través del tiempo. La gráfica muestra el promedio de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas, respecto a las células control.  $p < 0.05$  por la prueba T de Student.

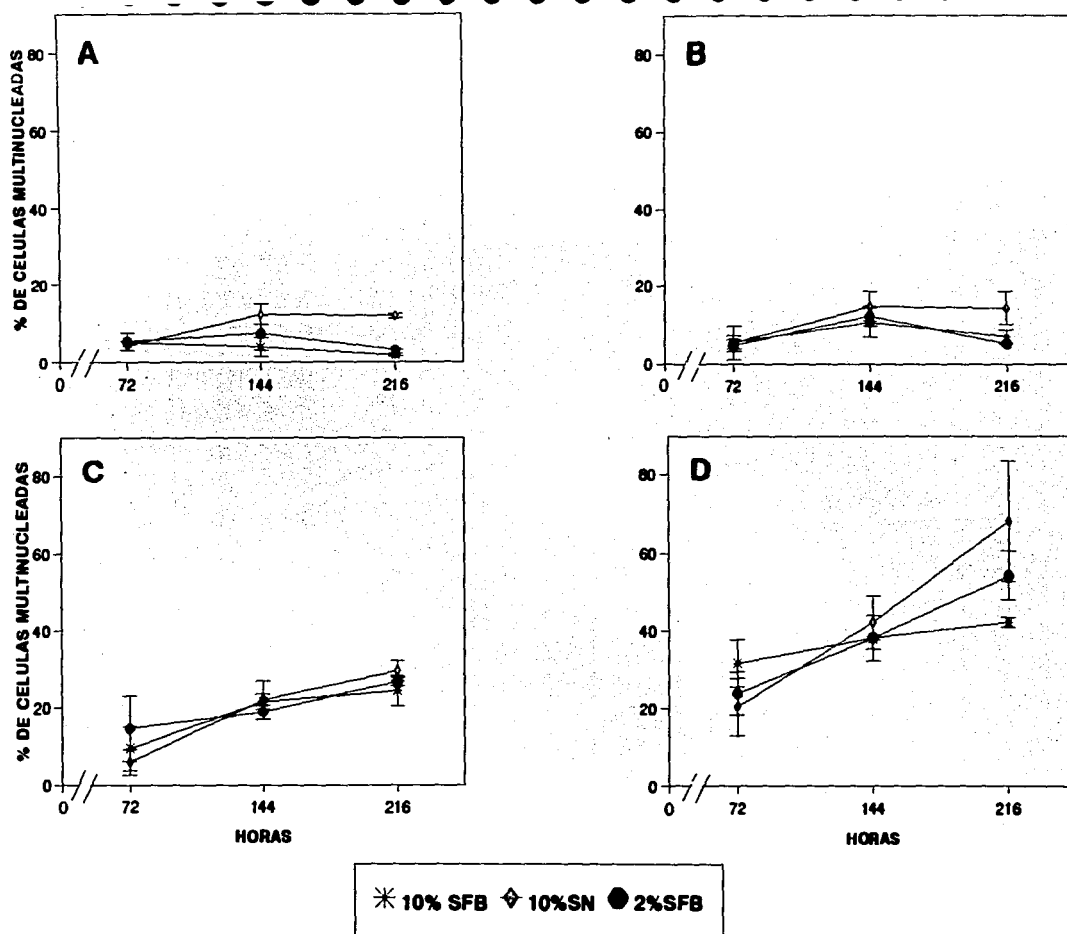
oncogen, sobre todo en el tiempo de las 216hrs. Sin embargo, en cada experimento se observó que se guardaba la misma proporción entre los diferentes tipos celulares. Al hacer un análisis estadístico, se encontró que a las 144hrs de cultivo, solo hay diferencias significativas en el número de células multinucleadas con respecto al control, en las células transfectadas con Ras<sup>mut</sup>. Mientras que a las 216hrs, existen diferencias significativas con respecto al control, tanto en las células transfectadas con Ras<sup>siV</sup> como con Ras<sup>mut</sup>. Cabe señalar, que aún cuando aumenta ligeramente el número de células gigantes en los controles, este pequeño aumento no es significativo, mientras que el aumento de células multinucleadas a través del tiempo tanto para Ras<sup>siV</sup> como para Ras<sup>mut</sup>, resultó ser significativo.

Es importante hacer notar, que las diferencias observadas en el número de células multinucleadas entre las células transfectadas con Ras<sup>siV</sup> y Ras<sup>mut</sup>, resultaron ser significativas, para todos los tiempos del cultivo. Este último análisis demuestra que aún cuando se observan las mismas alteraciones morfológicas tanto con el proto-oncogen como con el oncogen, la magnitud del efecto es mucho mayor con este último.

#### **Aumento en la sensibilidad a la ausencia de suero inducido por el oncogen H-Ras:**

En experimentos preliminares se observó que las células transfectadas con el gen mutado eran más sensibles al tipo (fetal o neonato) y concentración de suero, por lo que se hizo un experimento utilizando suero fetal bovino o suero neonato al 10% o al 2%, para determinar si la generación de células multinucleadas, con uno u otro suero, era diferente. Se encontró, como se observa en la figura 5, que mientras las células HeLa sin transfectar o las transfectadas ya sea con el plásmido vector o con Ras<sup>siV</sup> no son sensibles al tipo y concentración de suero (A, B, C), las células transfectadas con Ras<sup>mut</sup> si lo son (D). Cuando estas últimas se crecen en suero fetal bovino al 10%, no se observa que aumente significativamente el porcentaje de colonias de células





**FIGURA 5.- Aumento en la sensibilidad a la ausencia de suero inducido por el oncogen H-Ras.** Se sembraron las células a baja densidad en medio con suero fetal bovino al 10% y se dejaron crecer por 72hrs, tiempo en el que se le cambio al suero respectivo. Se cuantificó el porcentaje de colonias de células gigantes, a través del tiempo. Las gráficas muestran los resultados de dos experimentos independientes. Células HeLa (gráfica A), transfectadas con neo (gráfica B), Ras<sup>wt</sup> (gráfica C) o Ras<sup>mut</sup> (gráfica D). Suero fetal bovino al 10% - SFB 10%; suero fetal bovino al 2% - SFB 2%; suero neonato al 10% - SN 10%.

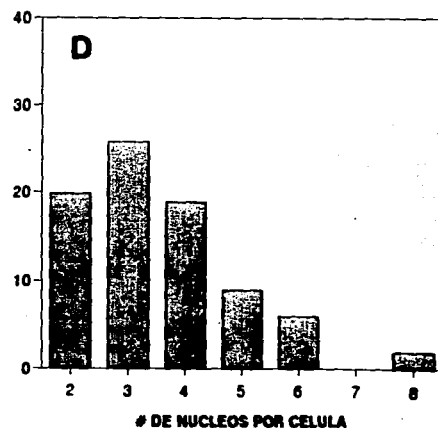
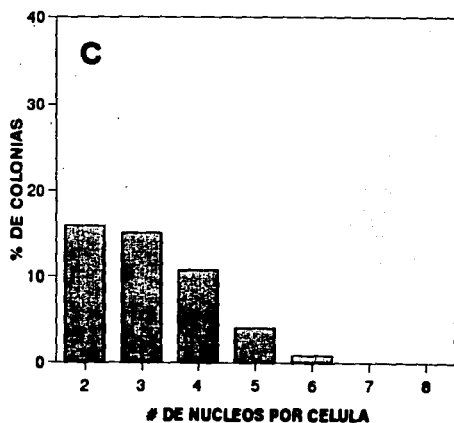
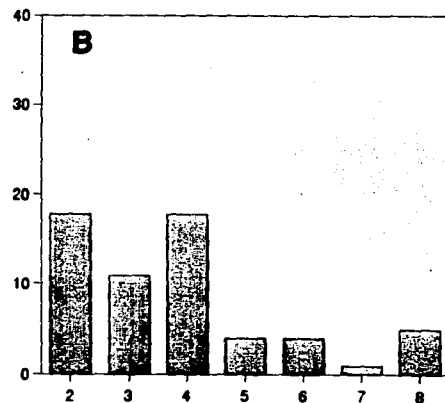
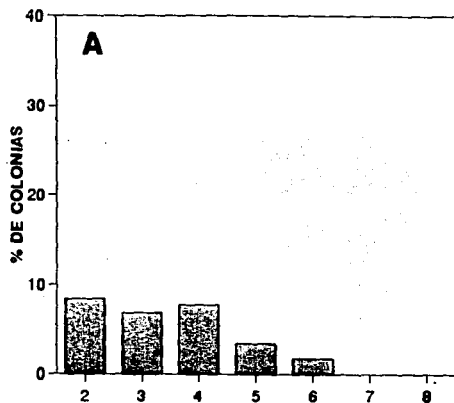
multinucleadas a través del tiempo, de un 35% a las 72hrs aumenta a un 40% a las 216hrs. Al crecerlas en suero fetal bovino al 2%, de un 25% inicial se llega a un 55%. Mientras que con suero neonato al 10%, de un 20% inicial llegan hasta un 65% aproximadamente, a las 216hrs. Con suero neonato al 2% las células HeLa no crecen y se mueren rápidamente.

Las gráficas muestran los resultados de dos experimentos independientes y se reportan los valores de los dos experimentos arriba y a bajo de cada promedio. Como se puede observar salvo en las células transfectadas con Ras<sup>mut</sup>, los resultados de ambos experimentos son muy similares. Ahora bien, en el caso de Ras<sup>mut</sup> aunque se puede considerar que los valores de cada experimento están muy alejados entre si, sobre todo cuando se crecen a las células en suero neonato al 10%, lo que es importante observar aquí son las pendientes de las rectas, las cuales se conservan para cada experimento y son muy distintas entre los diferentes sueros empleados. Así la pendiente de la recta de las células crecidas con suero fetal bovino al 10% es poco pronunciada, se generan pocas células multinucleadas a través del tiempo. La pendiente aumenta cuando se baja la concentración de suero fetal bovino al 2%; y se vuelve todavía más pronunciada cuando se crecen las células en suero neonato al 10%.

Con esto último se puede decir que las células transfectadas con el oncogen resultaron ser más sensibles a la ausencia de factores de crecimiento que las células control, de tal manera que si se crecen a concentraciones bajas de suero fetal bovino, o bien se utiliza suero neonato, que se sabe es menos rico en factores de crecimiento, aumenta la proporción de células multinucleadas en la población.

#### **Presencia de células multinucleadas con un número impar de núcleos:**

Se pueden apreciar, en la figura 2, células gigantes con el número de núcleos impar, esto nos llevó a preguntar si la frecuencia de estas células era similar o



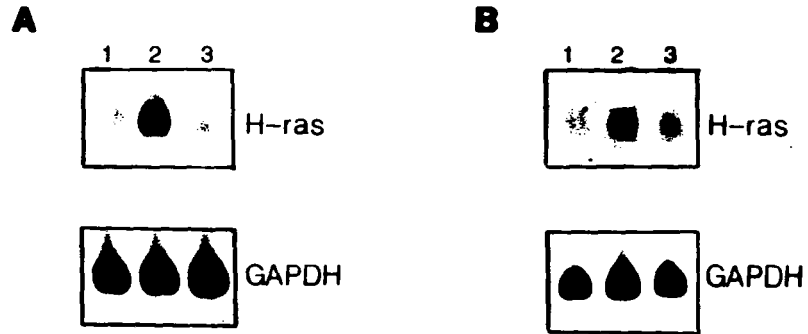
**FIGURA 6.- Presencia de células multinucleadas con un número impar de núcleos.** Se sembraron las células a baja densidad y se dejaron crecer por 72hrs. Se cuantificó el número de colonias de células gigantes. A cada una de estas colonias se le determinó si tenía células con dos núcleos, células con tres, cuatro o más núcleos. Se tomaron los valores de dos tiempos 120 (A y B) y 144hrs (C y D). Células transfectadas con Ras<sup>wt</sup> (A y C) o Ras<sup>mut</sup> (B y D).

diferente al de células con número par de núcleos. Se sembraron las células a baja densidad y a las 72hrs se cuantificó el número de colonias de células multinucleadas. A cada una de estas colonias se le determinó si tenía células con dos núcleos, células con tres, cuatro o más núcleos (figura 6). Se tomaron los valores de dos tiempos 120 (A y B) y 144hrs (C y D) y se graficó el porcentaje de colonias, con respecto al total de colonias contadas (normales y multinucleadas). Como se puede observar, tanto las células transfectadas con Ras<sup>shv</sup> (A y C) como con Ras<sup>mut</sup> (B y D), presentan colonias que contienen células con tres núcleos con la misma frecuencia que aparecen colonias con células de dos o cuatro núcleos.

Como ya se había observado el número de colonias con células multinucleadas aumenta a través del tiempo (figura 4), sin embargo es claro que a tiempos mayores del cultivo aparecen preferentemente más células con dos, tres y cuatro núcleos y muy pocas con cinco o más núcleos, siendo cada vez menos frecuentes conforme más núcleos tengan, así, aunque se llegaron a encontrar células hasta con 16 núcleos, éstas eran muy escasas. No se observan diferencias significativas, en la frecuencia de células con un número impar de núcleos, entre las células transfectadas con el proto-oncogen y las transfectadas con el oncogen.

#### **Análisis de la expresión de H-Ras en células HeLa:**

Para tratar de responder a la pregunta, de porque el oncogen como el proto-oncogen inducen las mismas alteraciones morfológicas, aunque en diferente magnitud, se analizó por Northern blot la expresión de H-Ras. Las células se crecieron y cuando los cultivos estaban confluentes, se les extrajo el RNA mensajero, este se analizó utilizando como sonda el plásmido, con el gen Ras. Se encontró, figura 7A, que en las células transfectadas con el plásmido RAS<sup>shv</sup>/neo (carril 2), el gen H-Ras se encuentra sobreexpresado, mientras que la expresión de este en las células transfectadas con el pRAS<sup>mut</sup>/neo (carril 3) es muy semejante a las células control, transfectadas con el



**FIGURA 7.- Análisis de la expresión del mRNA de H-Ras.** Se analizaron por Northern blot. Se cargaron de 2-4 $\mu$ g de RNA mensajero por carril; el blot se hibridó con una sonda del gen de H-Ras (panel superior). Como control, se utilizó una sonda del gen de la GAPDH (panel inferior).

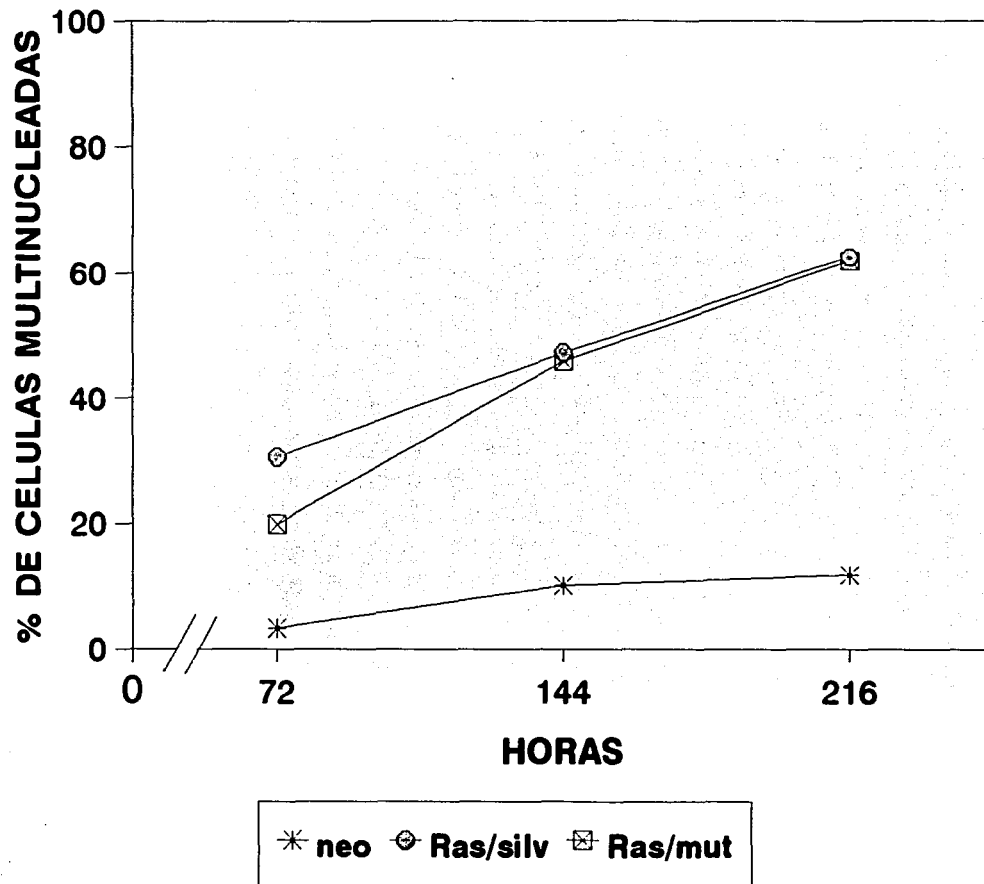
**Figura 7A.-** mRNA de células transfectadas con neo (carril 1), Ras<sup>shv</sup> (carril 2) o Ras<sup>mut</sup> (carril 3). Se extrajo el mRNA de clonas diferentes, obtenidas transfectando con lipofectina, **figura 7B.-** neo (carril 1), Ras<sup>shv</sup> (carril 2) y Ras<sup>mut</sup> (carril 3).

vector (carril 1). Como se puede observar, el control de GAPDH indica que se cargó la misma cantidad de RNA mensajero por carril.

Al parecer la expresión inapropiada de Ras, ya sea por la sobreexpresión del proto-oncogen o por la expresión del oncogen, induce los cambios morfológicos antes mencionados. Para confirmar lo anterior, se analizaron otras clonas transfectadas de manera independiente. Tanto la clona transfectada con el oncogen como la transfectada con el proto-oncogen generan aproximadamente un 45% de células multinucleadas a las 144hrs y un 60% a las 216hrs, figura 8. Así, se observa en la figura 7B, que una vez más la clona transfectada con el pRAS<sup>wt</sup>/neo, sobreexpresa el gen Ras con respecto al control y a la clona transfectada con pRAS<sup>mut</sup>/neo.

Esta nueva transfección de los plásmidos se realizó de manera diferente a la anterior, con el objetivo de tener un mejor control de la transfección, es decir, eliminar completamente la posibilidad de que las alteraciones observadas pudieran deberse a la transfección misma. Los plásmidos se transfectaron con lipofectina, a células adheridas a la caja. Después de seleccionar con geneticina, se tomaron colonias aisladas y se expandieron; de ahí se seleccionó una clona por cada plásmido transfectado.

Cabe señalar que si bien es cierto que se observan niveles elevados de mRNA del proto-oncogen que sugieren de una manera indirecta que la proteína Ras silvestre se encuentra en concentraciones superiores a la proteína Ras oncogénica o la endógena (en las células control). Es importante determinar por Western blot si existen diferencias, en la cantidad de proteína presente, entre las células transfectadas con el gen Ras silvestre o mutado y las células control, para poder asegurar que las alteraciones morfológicas observadas se deben a las expresión inapropiada de la proteína misma. Ya que la sobreexpresión de un gen no necesariamente indica que hay niveles elevados de la proteína respectiva.



**FIGURA 8.-** Curso temporal de la aparición de células multinucleadas en clonas transfectadas con lipofectina. Se sembraron las células a baja densidad y se dejaron crecer por 72hrs, para permitir la formación de colonias. A partir de ese momento se cuantificó el número de colonias formadas por células gigantes, a través del tiempo. La gráfica muestra los resultados de un solo experimento.

En las nuevas clonas transfectadas con Ras, tanto con el silvestre como con el mutado, se genera la misma proporción de células multinucleadas a través del tiempo. Se podría pensar que esto contradice a lo antes mencionado respecto a que se observan las mismas alteraciones morfológicas tanto con Ras<sup>silv</sup> como con Ras<sup>mut</sup>, aunque con un efecto mayor de este último. Como es de esperar el comportamiento entre clona y clona es muy variable, dependiendo de los niveles de expresión de Ras. El análisis de la expresión de H-Ras por Northern blot no permite determinar con precisión si existen diferencias en los niveles de la sobreexpresión entre las dos clonas transfectadas con Ras<sup>silv</sup>. Sin embargo, es lógico suponer que la sobreexpresión es distinta entre ambas clonas provocando así diferencias en la proporción de células multinucleadas que se generan. Además, estos resultados son de un único experimento, mientras que los resultados de las clonas anteriores son de tres experimentos independientes, esto podría explicar también las diferencias encontradas entre las clonas; por lo tanto sería conveniente repetir este experimento (y hacer otro tipo de experimentos más finos) si se desea hacer un análisis más preciso entre la relación que existe en la proporción de células multinucleadas que se generan y los niveles de expresión del gen H-Ras silvestre. Cabe señalar, que si bien es cierto que en las nuevas clonas se generan la misma proporción de células multinucleadas se siguen observando las diferencias morfológicas antes señaladas entre las células gigantes transfectadas con Ras<sup>silv</sup> y las transfectadas con Ras<sup>mut</sup>.

#### **Alteraciones en los parámetros del ciclo celular y en la distribución del número de cromosomas inducidas por la expresión inapropiada de H-Ras:**

Se decidió someter a las células a un análisis de citofluorometría de flujo, con el fin de determinar la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular. Las células se crecieron y a varios tiempos del cultivo se tomaron muestras que se analizaron en un citofluorómetro. Se muestra en la figura 9 histogramas del número de núcleos en función de su contenido de DNA a diferentes tiempos del cultivo celular. El pico 1 corresponde a los núcleos de las células en fase G<sub>1</sub> del ciclo, el pico 2

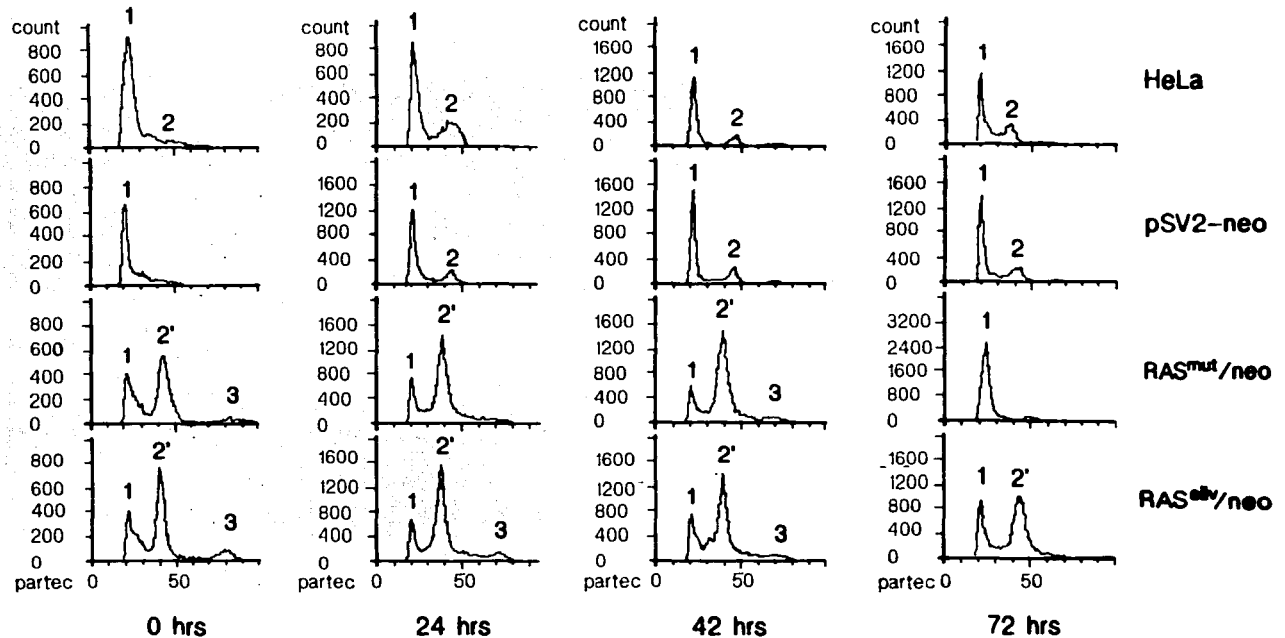


corresponde a núcleos con el doble contenido de DNA, típico de las células en fase G<sub>2</sub>/M. Los núcleos de las células en fase S se registran entre los dos picos.

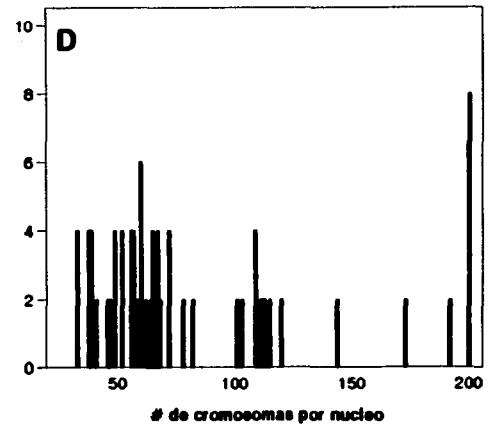
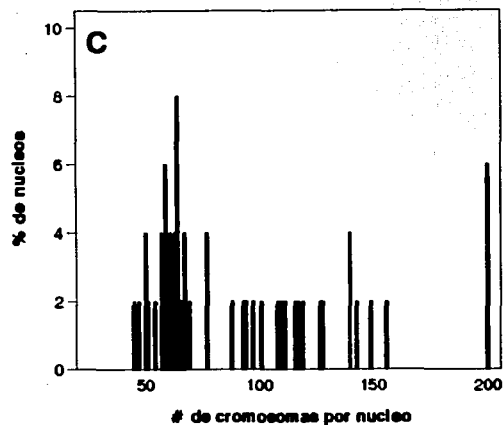
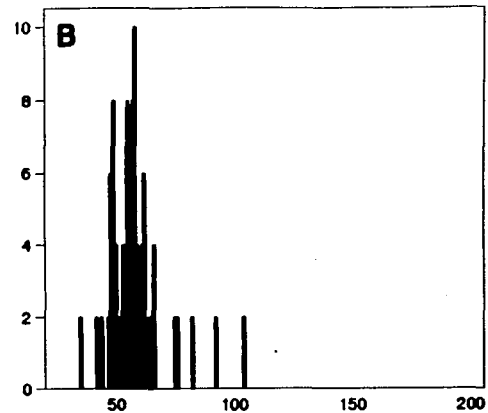
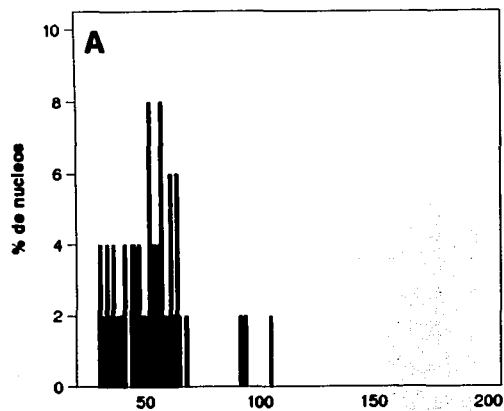
Las células transfectadas tanto con Ras<sup>silv</sup> como con Ras<sup>mut</sup> muestran alteraciones en los parámetros del ciclo celular. Se observa que aparece una segunda población, pico 2', con núcleos con un mayor contenido de DNA con respecto a los núcleos en G<sub>1</sub> (pico 1). Este pico 2' se encuentra ligeramente desplazado hacia la izquierda con respecto al pico 2, sobrelapándose con este último y haciendo difícil determinar la distribución celular en cada fase del ciclo en las clonas transfectadas con Ras. Estos resultados indican que, dado que las células se lisan antes de someterlas al análisis, al parecer una proporción considerable de los núcleos de las células transfectadas con Ras<sup>silv</sup> o con Ras<sup>mut</sup> tiene un número mayor de cromosomas que los núcleos de las células HeLa o las transfectadas con neo, esto explicaría porque al microscopio se observa que los núcleos de las células multinucleadas (y algunas cuantas no multinucleadas) transfectadas con Ras son más grandes que los núcleos de las células control. Se puede observar también que aparece un tercer pico (3) a la derecha del pico G<sub>2</sub>/M (2) que corresponde a núcleos con un gran contenido de DNA (más del doble).

Se sabe que las células HeLa, de por sí, son células heteroplóides con un rango de 38-106 cromosomas por célula (Lewin 1980). Para comprobar que las células transfectadas con el gen Ras, silvestre o mutado, tienen núcleos con un número de cromosomas mayor a las células HeLa o a las transfectadas con neo, se hizo un análisis citogenético, cosechando a las células a las 42 horas de cultivo.

Se observa en la figura 10, que las células HeLa (con las que se trabajó en el laboratorio) tienen un rango de 30-105 cromosomas, con una media de 53 cromosomas por célula, las células transfectadas con neo no varían grandemente, teniendo un rango de 35-105, con una media de 58 cromosomas por célula. Mientras que las células transfectadas con Ras<sup>silv</sup> presentan un rango de 45-200, con una media de 91 y las transfectadas con Ras<sup>mut</sup> un rango de 33-200 y una media de 84 cromosomas por



**FIGURA 9.-** Alteración en el contenido de DNA en células HeLa transfectadas con H-Ras. Las células se crecieron, a varios tiempos del cultivo se lisaron, el DNA se tiñó con DAPI y se analizaron las muestras en un citofluorómetro. El análisis muestra el número de núcleos en función de su contenido de DNA. El contenido de DNA correspondiente a G<sub>1</sub> está representado por el pico de la derecha (1), G<sub>2</sub>/M por el de la izquierda (2), S se registra entre ambos picos. Como se puede observar las células transfectadas con Ras<sup>silv</sup> o Ras<sup>mut</sup> muestran alteraciones en los parámetros del ciclo celular.



**FIGURA 10.-** Alteración en la distribución del número de cromosomas inducida por la expresión inapropiada de H-Ras. Las células se crecieron por 42hrs, se incubaron con colcemida por 2 horas, se cosecharon y se hizo un análisis citogenético. Se analizaron 100 metafases por clona. Se graficó el porcentaje de núcleos en función del número de cromosomas por núcleo. Células HeLa (A), transfectadas con neo (B), Ras<sup>Mv</sup> (C) o Ras<sup>mut</sup> (D).

núcleo. Esto indica que efectivamente el gen Ras induce la aparición de células con núcleos con un número mayor de cromosomas, con respecto a los núcleos de las células control, lo cual concuerda con los resultados observados en el citofluorómetro.

Cabe señalar, que las medias (con rangos muy amplios) del número de cromosomas de los núcleos de las células transfectadas con Ras, silvestre o mutado, son ligeramente menores al doble de cromosomas que tienen los núcleos de las células control, lo que podría explicar el pequeño desplazamiento hacia la izquierda del pico 2' con respecto al pico 2, el cual como ya se dijo anteriormente, corresponde a núcleos con el doble contenido de DNA, típico de la fase G<sub>2</sub>/M.

Estos datos apoyan fuertemente que el pico 2' en los histogramas de DNA (figura 9) corresponde a una segunda población de células y no a una S tardía como podría llegarse a pensar en un momento dado.

El pico 2' de la figura 9, desaparece a las 72hrs. de cultivo, en las células transfectadas con Ras<sup>mut</sup>, mas no en las transfectadas con Ras<sup>silv</sup>. La desaparición de esta segunda población en el análisis citofluorométrico concuerda con las observaciones hechas al microscopio. Se observa que las células multinucleadas son inestables y después de cierto tiempo mueren. Probablemente el pico 2' representa a los núcleos de las células multinucleadas que, a las 72hrs de cultivo, desaparece al morir una gran proporción de éstas. Cabe señalar, que a este tiempo del cultivo, cuando se siembra a alta densidad celular, se observa al microscopio que una gran proporción de las células son multinucleadas y se encuentran en su fase terminal: son muy frágiles, con una membrana citoplasmática poco definida y la mayoría con más de tres núcleos (figuras 2 y 3); por lo cual, no resisten el tratamiento a las que son sometidas para el análisis del ciclo celular y mueren durante el proceso. Estas células multinucleadas a las 96hrs de cultivo ya no se observan en la caja pues han muerto. En el caso de las células transfectadas con Ras<sup>silv</sup>, se observa un efecto similar pero a tiempos mucho más largos, de ahí que a las 72 horas del cultivo el pico 2' en estas células no desaparezca.

Debido a las alteraciones morfológicas que presentan: aumento en el tamaño celular, presencia de varios núcleos y micronúcleos; estas células al parecer mueren por catástrofe mitótica. Estos cambios morfológicos se han identificado previamente como manifestaciones de lo que se conoce como muerte mitótica (Lock, et. al. 1994). El número de células en cultivo que entran a muerte mitótica aumenta significativamente con el tiempo; a tiempos largos de cultivo la mayoría de estas células muere. Estas clonas tienen la característica de estar generando constantemente células gigantes multinucleadas a partir de células pequeñas en cultivo.

Debido a las alteraciones morfológicas que presentan: aumento en el tamaño celular, presencia de varios núcleos y micronúcleos; estas células al parecer mueren por catástrofe mitótica. Estos cambios morfológicos se han identificado previamente como manifestaciones de lo que se conoce como muerte mitótica (Lock, et. al. 1994). El número de células en cultivo que entran a muerte mitótica aumenta significativamente con el tiempo; a tiempos largos de cultivo la mayoría de estas células muere. Estas clonas tienen la característica de estar generando constantemente células gigantes multinucleadas a partir de células pequeñas en cultivo.

## DISCUSION

En este trabajo se analizó el efecto que tiene la expresión anormal del gen H-Ras sobre la morfología, la estructura de la cromatina y el ciclo celular de células HeLa. Se encontró que la expresión permanente del gen H-Ras, ya sea normal o mutado, unido a un marcador de selección a neomicina, induce alteraciones morfológicas considerables. Un efecto dramático es la aparición de células gigantes con varios núcleos. Un análisis grueso de la estructura de la cromatina revela un desorden nuclear evidente y la presencia de micronúcleos.

Cuando se analizaron los niveles del mRNA de H-Ras en las células transfectadas con este, se observó que el gen silvestre se encontraba sobreexpresado al compararlo con el gen endógeno y la forma mutada del mismo. Estos resultados indican que la expresión inapropiada de H-Ras, ya sea por la sobreexpresión del proto-oncogen o por la presencia del oncogen, producen casi los mismos cambios fenotípicos en las células HeLa.

Aunque la sobreexpresión de la forma silvestre provoca la formación de células gigantes, lo hace de una manera menos dramática que la expresión de la forma mutada. Se observaron, con una frecuencia considerable, células multinucleadas de un tamaño y un desorden nuclear mayor en la clona transfectada con el oncogen que en la transfectada con el proto-oncogen. Cuando se analizó la aparición de células multinucleadas en función del tiempo, se encontraron diferencias significativas entre las clonas que contenían la forma normal y la mutada del gen H-Ras. Además, las células transfectadas con la forma mutada resultaron ser más sensibles a la ausencia del suero, aumentando la proporción de células multinucleadas en la población cuando se retiran factores de crecimiento presentes en el mismo, hecho que no ocurre con la forma silvestre.

Los mecanismos moleculares que inducen la formación de células multinucleadas están todavía poco claros. Posibilidades como la malposición de los centriolos, defectos en la polimerización de tubulina, alteraciones en la reorganización de los microfilamentos y microtúbulos o bien problemas en la polimerización de actina para la formación del anillo contráctil durante la citocinesis, pueden estar directamente involucradas en la formación de estas células (Rodilla, 1993).

La formación de células binucleadas y multinucleadas puede darse como resultado de un proceso incompleto de división celular: cariocinesis sin citocinesis. Se ha sugerido que la inducción de células binucleadas y multinucleadas por cisplatino en cultivos de Sarcoma-180, se debe a una inhibición de la citocinesis. Cromosomas rezagados o masas de material nuclear dejados en el plano ecuatorial de la división celular pueden ser responsables de la inhibición de la citocinesis y por tanto la formación de células binucleadas. Hay autores que sugieren que la formación de células multinucleadas es una consecuencia de un defecto en el huso mitótico, produciendo anomalías en el movimiento de los cromosomas e inhibiendo la posterior citocinesis. Este fenómeno puede asociarse con la inducción de micronúcleos en células mononucleadas, los micronúcleos son cromosomas o fragmentos de los mismos que no son incorporados al núcleo durante la división. Al parecer la exposición a agentes que inhiben la formación del huso mitótico no solo impiden la cariocinesis, sino también la citocinesis (Kung, et. al. 1990). La exposición de células de ovario de hamster chino, al agente antineoplásico, cisplatino, provoca la aparición de células binucleadas y micronucleadas. Las células binucleadas contienen uno o más micronúcleos, al parecer las células binucleadas con micronúcleos se originaron de células mononucleadas que tenían micronúcleos (Aggarwal, 1974; Rodilla, et. al. 1990; Rodilla, et. al. 1993; Rodilla, 1993). Estos resultados apoyan lo antes señalado, que al parecer la aparición de micronúcleos en las células HeLa precede a la multinucleación. Se observan, en las clonas transfectadas con H-Ras, células con micronúcleos antes de convertirse en binucleadas o multinucleadas.



Por otro lado, se han reportado mitosis tripolares y tetrapolares, las cuales dan lugar a varias células hijas, a células multinucleadas o a mitosis abortivas (Rodilla, 1993). Las células normales se arrestan si el aparato mitótico está incorrectamente formado o los cromosomas están mal alineados en el plano metafásico, sin embargo, en líneas celulares derivadas de tumores, se han encontrado husos con tres o más polos, lo que indica que les falta el punto de restricción de la fase M (Hunter & Pines, 1994). Probablemente, un fenómeno similar es el que está ocurriendo en las células HeLa que expresan anormalmente el gen H-Ras, la posible existencia de tres o más polos durante la cariocinesis podría explicar no solo la presencia de varios núcleos en estas células, sino también la existencia de células con un número impar (tres o cinco) de ellos.

Se observaron núcleos gigantes en las células multinucleadas que por análisis citogenético se encontró tenían un contenido mayor de cromosomas. Fibroblastos en cultivo, provenientes de embriones de ratón deficientes de p53, expuestos a inhibidores de la formación del huso mitótico (nocodazol y colcemida) llevan a cabo múltiples rondas de síntesis de DNA sin completar la segregación de cromosomas, formando células tetraplóides y octaplóides. Al parecer p53 es un componente importante en el punto de restricción en la fase M del ciclo celular, para que se lleve a cabo o no la cariocinesis. Sin embargo, se piensa que deben existir otros elementos de control en dicho punto de restricción, dado que hay líneas celulares que no tienen p53 funcional pero sí se arrestan al exponerlas a inhibidores del huso mitótico (Cross, et. al. 1995). Las células HeLa tienen los oncogenes E6 y E7 del papilomavirus humano tipo 18. Los productos de estos oncogenes se sabe que interactúan con dos moduladores del ciclo celular, entre ellos p53. La proteína E6 induce la degradación de p53. Así que podría pensarse que la falta de la proteína p53 en las células HeLa coopera con una expresión anormal de H-Ras para producir células con núcleos heteroplóides, probablemente no arrestando a las células en fase M, aún cuando se da una cariocinesis anormal o incompleta. Además en las clonas transfectadas con H-Ras, normal o mutado, se han detectado niveles elevados de los mensajeros E6 y E7, siendo estos superiores a los de las células HeLa sin transfectar (comunicación

personal de la Dra. Olga Medina), por lo que al parecer Ras actúa directamente en la regulación de la transcripción de estos dos genes, tal vez por un efecto sinérgico que provoque las alteraciones observadas en estas células.

Curiosamente, existe un trabajo en el que observan que Ras induce hiperplasia en células primarias si p53 se encuentra mutado. Las cuatro clonas analizadas presentan la característica de formar células multinucleadas con micronúcleos. Cuando se utiliza un anticuerpo dirigido contra p53, se marcan más fuertemente los núcleos de las células multinucleadas. Observan también, un aumento en el tamaño de los núcleos, por lo que posiblemente sean núcleos heteroplóides (Lu, et. al. 1992). Se puede pensar que, la falta de la proteína p53 funcional junto con una expresión inapropiada de H-Ras lleve a cabo una cariocinesis anormal, que a su vez provoque una falla en la citocinesis.

Cuando se analizaron parámetros del ciclo celular de las clonas transfectadas, se encontró la existencia de una subpoblación de células que contiene un mayor contenido de DNA, como se muestra con la presencia del pico 2', el cual no parece representar a una población arrestada en G<sub>2</sub>/M. Al parecer estas clonas dan lugar a un grupo de células con un mayor contenido de DNA, con un número mayor de cromosomas como lo indica el análisis citogenético y que muy probablemente corresponden a las células multinucleadas que se observan al microscopio, las cuales llevan a cabo un proceso llamado catástrofe mitótica. Estas células gigantes tienen un número limitado de duplicaciones y finalmente mueren, como lo indican tanto la desaparición del pico 2' a las 72hrs de cultivo, como las observaciones hechas al microscopio.

Los eventos moleculares que controlan la muerte mitótica aún se desconocen. Al parecer es un proceso lento, dependiente de la actividad mitótica, en donde las células después de dos o tres ciclos de duplicación mueren. Se caracteriza por un arresto inicial y transitorio en G<sub>2</sub>/M y la subsecuente liberación de dicho arresto que provoca la aparición de células multinucleadas, micronúcleos y un aumento del tamaño celular. La

muerte mitótica fue descrita por primera vez en células tratadas con bajas dosis de radiación ionizante (Lock & Ross, 1990; Chang & Little, 1991; Tounekti, et. al. 1993; Lock, et. al. 1994).

La radiación ionizante y diversos agentes, como epipodofilotoxina (etopósido) o agentes radiomiméticos como la bleomicina, provocan daño en el DNA y citotoxicidad en células de mamífero. Estos eventos al parecer culminan en dos diferentes manifestaciones de muerte celular: a) apoptosis y/o b) muerte mitótica; dependiendo de la dosis de radiación ionizante o agente citotóxico y/o la duración del tratamiento (Tounekti, et. al. 1993; Lock, et. al. 1994).

En la línea celular A253, proveniente de un carcinoma de cuello y cabeza, se observó que bajas concentraciones de bleomicina (10nM) inducen muerte mitótica. El porcentaje mayor (63%) de células gigantes y multinucleadas se obtiene después de tres tiempos de duplicación, lo cual equivale a 72hrs de cultivo para esta línea celular (Tounekti, et. al. 1993). Se sabe que las células HeLa tienen un ciclo de aproximadamente 24hrs, por lo que a las 72hrs de cultivo tendrían tres tiempos de duplicación, como se mencionó anteriormente, a este tiempo es cuando se observa el mayor porcentaje de células multinucleadas cuando el cultivo se siembra a alta densidad.

La exposición de células HeLa a etopósido por tiempos cortos (1 hora) provoca un arresto temporal en G<sub>2</sub>/M seguido de la muerte celular por catástrofe mitótica a las 20 hrs después de la exposición con el agente. Por otro lado, la exposición a bajas concentraciones de cafeína después de haber tratado a las células con etopósido, acelera significativamente la velocidad de aparición de las células gigantes y multinucleadas, además de aumentar la incidencia de muerte mitótica. Las metilxantinas, como la cafeína y la pentoxifilina, potencian la citotoxicidad de agentes que dañan el DNA, como el etopósido, al evitar el arresto inicial en G<sub>2</sub>/M, probablemente permitiendo menos tiempo para reparar las lesiones del DNA causadas por el agente. Cabe señalar, que la exposición con cafeína de las células HeLa induce

la defosforilación específica y por tanto la activación de la cinasa p34<sup>cdc2</sup> (cdc2), con una proporción pequeña de las células entrando a mitosis. La activación de cdc2 por la cafeína es probablemente un forma indirecta de eludir el punto de restricción G<sub>2</sub>, que provoca un arresto debido a las lesiones en el DNA (Lock, et. al. 1994).

La entrada a la mitosis esta señalada por la activación del complejo ciclinaB-cdc2. La cinasa Wee1 regula negativamente a cdc2, al fosforilarla en los residuos tirosina-15 y treonina-14, mientras que la fosfatasa cdc25C la regula positivamente, desfosforilando a cdc2 al final de G<sub>2</sub>. El balance entre estos dos caminos modulan la función de cdc2, permitiendo el arresto o el avance a la mitosis. Muchas líneas celulares derivadas de tumores activan al complejo ciclinaB-cdc2 independientemente del estado del DNA y por lo tanto entran a mitosis con daños en el mismo, al parecer por un defecto en la regulación de la fosforilación de cdc2. El defecto puede encontrarse en una inhibición de la cinasa Wee1 o en una estimulación constante de cdc25C (Hunter & Pines, 1994). Se sabe que la regulación de la síntesis de la ciclina B, de la activación de la cinasa Wee1, así como de la activación de la fosfatasa cdc25 dependen en gran parte de señales extracelulares (Hoffman & Karsenti, 1994; King, et. al. 1994). No se puede descartar la posibilidad que estas señales externas se transduzcan a través de cascadas dependientes de Ras, de tal manera que una expresión inapropiada de la proteína lleve a una desregulación del punto de restricción G<sub>2</sub>/M, al afectar la actividad del complejo ciclinaB-cdc2, impidiendo un arresto en G<sub>2</sub> si se diera algún daño en el DNA o hubiera otra alteración en las células que expresan constantemente Ras, tal como ocurre cuando se adiciona cafeína después de tratar a las células con etopósido.

Algunas evidencias que podrían apoyar lo anterior es la activación de una cinasa de la familia de las MAPKs durante la mitosis, la activación de ésta depende de la actividad de cdc2. Además al parecer la activación de cdc25 depende en parte de la cinasa MAP, así como de otras cinasas (King, et. al. 1994). Por otro lado, se observó que la transformación de células NIH-3T3 con c-H-Ras provoca un aumento considerable de los niveles de fosforilación de la cinasa cdc2 con respecto a los

niveles de las células parentales (Yamada, et. al. 1991). Todavía no se puede establecer una relación entre estos dos resultados, sin embargo, al parecer Ras participa directa o indirectamente en la regulación del complejo ciclina B-cdc2, probablemente a través de la activación de alguna de las cascadas de las MAP cinasas.

Se piensa que la cinasa cdc2 fosforila proteínas claves las cuales conducen a los eventos más importantes de la mitosis, como es la condensación de cromosomas, la reorganización del citoesqueleto, los cambios en la forma celular y la ruptura de la membrana nuclear. Se ha observado la asociación de cdc2 con los centrosomas, la cual aumenta durante la fase G<sub>2</sub> y la mitosis. Probablemente la fosforilación de proteínas centrosomales por la cinasa cdc2 puedan tener un papel en la reorganización del citoesqueleto de microtúbulos durante la mitosis (Nurse, 1990). Esto conectaría la posible participación de Ras en la activación del complejo ciclinaB-cdc2 con la reorganización del citoesqueleto de tubulina; una expresión anormal del gen H-Ras podría producir alteraciones en dicha reorganización que conlleven a una falla en la cariocinesis, muy probablemente en las fases finales de la misma, cuando se requiere que el complejo sea inactivado. Al parecer se requiere de la inactivación del complejo ciclinaB-cdc2 para que la célula pueda completar la citocinesis y regresar a la interfase. Una activación prolongada de la cinasa cdc2 podría impedir que se lleve a cabo la citocinesis, produciendo células binucleadas. Aunque es posible que otras células se queden en la fase M del ciclo debido a la activación constante de cdc2, esto al parecer no ocurre en las células HeLa, probablemente por otras alteraciones (como es la presencia de las proteínas E6 y E7 de papilomavirus), mutaciones, o bien por la misma expresión del gen H-Ras que provoca una constante estimulación mitogénica. Las células HeLa en lugar de arrestarse llevan a cabo posteriores rondas de replicación generando células multinucleadas que culminan en una catástrofe mitótica.

Como se señaló en la introducción, Ras regula por lo menos dos vías de transducción de señales, una vía que regula la transcripción de diversos genes y el ciclo celular, y en la cual se encuentran involucradas las MAPs cinasas y otra que

regula la organización del citoesqueleto de actina a través de las proteínas Rho/Rac, en esta vía también participan las proteínas reguladoras tanto de Ras como de Rho/Rac: GEFs y GAPs. Como se analizó anteriormente, la regulación de Ras a través de las MAPs cinasas puede explicar en gran medida las alteraciones morfológicas (tanto la heteroploidía como la multinucleación) observadas en las células HeLa cuando se transfecta el gen H-Ras. Sin embargo, es posible imaginar que esta vía únicamente produzca alteraciones en la cariocinesis, que provoquen la aparición de núcleos heteroplóides con un número mayor de cromosomas que las células sin transfectar. No necesariamente las anomalías en la segregación de cromosomas deban de producir fallas en la citocinesis. Tal es el caso de los fibroblastos provenientes de embriones de ratón deficientes de p53, expuestos a inhibidores del huso mitótico, que llevan a cabo múltiples rondas de síntesis de DNA sin completar la segregación de cromosomas, formando células tetraplóides y octaplóides pero que no son binucleadas o multinucleadas (Cross, et. al. 1995); indicando que si hubo citocinesis.

Por lo que una alternativa es que las fallas en la citocinesis se deben a la activación constante de Rho/Rac cuando se expresa anormalmente H-Ras, induciendo la formación de fibras de estrés y focos de adhesión permanentemente. Esto es altamente probable ya que se sabe por un lado que la microinyección de Ras resulta en la estimulación de la formación de fibras de actina y que esta estimulación depende de Rho y Rac, y por otro que la microinyección de una proteína Rho constitutivamente activa provoca la polimerización de actina con la consecuente formación de una red densa de filamentos de actina. Además se ha visto que la transfección del oncogen Vav, un GEF de Rho/Rac (y que se piensa puede conectar a Ras con Rho/Rac), a células NIH-3T3 resulta en la formación de células multinucleadas (Katzav, et. al. 1989). Esto apoya fuertemente que una proteína Rho constantemente activa, ya sea por mutaciones, por niveles altos del GEF Vav o por su continua estimulación debida a la proteína Ras, puede llegar a inducir la formación de células multinucleadas probablemente por una falla en la citocinesis.

Se sabe que por un lado, la células requieren de adherirse al sustrato para poder salir de  $G_0$  y proliferar, mientras que por otro lado, las células que han pasado este punto de restricción ya no necesitan del anclaje y normalmente se sueltan y adquieren una forma redonda al pasar a la fase M del ciclo celular. Se sabe que las estructuras presentes durante la interfase tanto de microtúbulos como de filamentos de actina son desensambladas durante la mitosis (Alberts, et. al. 1989). Es decir, en un primer momento necesitan de la formación de fibras de actina y focos de adhesión y una vez transducida la señal mitogénica que permite la entrada a  $G_1$ , las células necesitan despolimerizar la actina para reorganizar el citoesqueleto y poder así entrar a la mitosis y división celular. Una explicación lógica puede ser que la aparición de células multinucleadas, cuando se sobreexpresa el gen H-Ras o se expresa la forma mutada, se deba a que se induce una constante formación de fibras de actina y focos de adhesión a través de Rho/Rac, que aunque permite su entrada a  $G_1$ , posteriormente al no poderse reorganizar el citoesqueleto de actina entran a mitosis pero no pueden llevar a cabo la citocinesis. Ya sea porque el huso mitótico que determina en donde y cuando ocurre la división celular no puede rotar para adoptar una posición adecuada y orientar el plano de división, movimiento que depende de cambios locales en la corteza celular; o bien, porque no puede formarse el anillo contráctil. Ambas estructuras, la corteza y el anillo, están formadas principalmente de actina, la cual no puede reorganizarse adecuadamente durante la mitosis y la división en las células HeLa transfectadas con el gen H-Ras. La constante señal mitogénica de Ras, a través de las MAPs cinasas provoca un reinicio del ciclo produciendo células multinucleadas que después de dos o más duplicaciones mueren por catástrofe mitótica.

Alternativamente, la aparición de núcleos con más cromosomas se puede explicar por la desregulación producida por H-Ras de la vía Rho/Rac, en vez de la desregulación de la vía de las MAPs cinasas que pudiera estar actuando sobre la cinasa cdc2. La separación de los centrosomas duplicados a extremos opuestos de la célula depende de la interacción de los microtúbulos asociados al centrosoma con la red cortical de actina, cambios locales en ésta permiten que los centrosomas se desplacen hacia ambos polos de la célula; el movimiento es similar al de la rotación del

huso mitótico descrito anteriormente (Alberts, et. al. 1989; Karsenti 1991). Si existe un problema en la despolimerización de actina debido a la presencia de H-Ras, es difícil que se den los cambios locales necesarios en la corteza celular para el movimiento de los centrosomas, provocando una inadecuada separación de los mismos. Lo cual puede causar un huso mitótico anormal, que provoque la aparición de micronúcleos, o simplemente evitar la formación del mismo, produciendo núcleos heteroplóides; y en ocasiones incluso inhibiendo la misma citocinesis.

Todas las causas o razones discutidas aquí, por las que una expresión inapropiada de H-Ras puede estar induciendo la formación de células multinucleadas que culminan en un proceso de muerte mitótica en las células HeLa, son factibles hasta que no se comprueben experimentalmente y existan evidencias que afirmen una u otra posibilidad. Creo que un hecho que apoya el segundo mecanismo, en el cual Ras a través de la vía Rho/Rac produce las alteraciones observadas: núcleos con más cromosomas, micronúcleos y varios núcleos por célula, es la existencia de una población heterogénea formada por células normales y alteradas. Si bien es cierto que las células normales generan a las células gigantes, la presencia de ambas subpoblaciones en un momento dado solo puede explicarse si las células normales al duplicarse generan tanto nuevas células mononucleadas como células multinucleadas. Esto indica que en algunas ocasiones tanto la cariocinesis como la citocinesis se llevan a cabo adecuadamente, lo cual es más fácilmente explicable si en estas células el problema es principalmente mecánico, es decir, las alteraciones en la reorganización del citoesqueleto de actina probablemente no sean tan dramáticas y permitan en algunas ocasiones una división normal y en otras no. Esto es probable ya que se sabe que Rho puede ser regulado por vías independientes de Ras y por lo tanto, puede modular el citoesqueleto de actina de una manera independiente de este; el balance entre estas dos regulaciones pueden llegar a determinar el que se de o no una división celular correcta.



## CONCLUSIONES

- La expresión inapropiada del gen H-Ras induce alteraciones morfológicas considerables en las células HeLa: aparición de células gigantes con varios núcleos y micronúcleos, además de la existencia de células multinucleadas con un número impar de núcleos.
- La sobreexpresión del proto-oncogen o la presencia del oncogen producen casi los mismos cambios fenotípicos en las células HeLa.
- La sobreexpresión de la forma normal del gen H-Ras provoca la formación de células gigantes de una manera menos dramática que la expresión de la forma mutada del mismo. Se encontraron diferencias significativas en la aparición de células a través del tiempo entre las clonas que contenían la forma normal y la mutada del gen H-Ras. Además, las clonas transfectadas con la forma mutada resultaron ser más sensibles a la ausencia del suero, hecho que no ocurre con la forma normal del gen.
- Las clonas que expresan inapropiadamente el gen H-Ras dan lugar a una subpoblación de células con un contenido mayor de DNA y un número mayor de cromosomas, que probablemente corresponden a las células multinucleadas.
- Estas células gigantes, con varios núcleos heteroplóides y micronúcleos, culminan en una catástrofe mitótica que las lleva a la muerte. La expresión anormal del gen H-Ras contribuye a dicha catástrofe y la consecuente muerte mitótica de esta subpoblación de células HeLa.
- Estos resultados y las evidencias anteriormente descritas por otros autores, llevan a plantear dos modelos posibles:

**A. Ras actúa únicamente en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular, transmitiendo señales mitogénicas para la entrada a S y señales morfogénicas para la formación de fibras de estrés y focos de adhesión. La desregulación de estos eventos puede provocar alteraciones en la fase M del ciclo celular.**

**B. Ras regula directamente la mitosis y la división celular a dos niveles: (1) nuclear, regula la activación del complejo ciclinaB-cdc2, regulando así diversos eventos involucrados en la reorganización de los microtúbulos que ocurre en la transición de la interfase a la metafase y por tanto la cariocinesis. (2) extra nuclear, regula al citoesqueleto de actina, controlando eventos como el movimiento de los centrosomas y/o la formación del anillo contráctil de actina para la citocinesis o división celular.**

## REFERENCIAS

- Adari, H.; Lowy, D. R.; Willumsen, B. M.; Der, C. J.; McCormick, F.; (1988) Guanosine triphosphatase activating protein (GAP) interacts with the p21 ras effector binding domain. *Science* 240:518-521.
- Aggarwal, S. K. (1974) Inhibition of cytokinesis in mammalian cells by cis-dichloro-diammine-platinum (II). *Cytobiologie* 8:395-452.
- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. D. (1989) *Molecular Biology of the cell*. Segunda Edición. Garland Publishing, Inc. N.Y. USA. págs 743-780.
- Aronheim, A.; Engelberg, D.; Nanxin, L.; Al-Alawi, N.; Schlessinger, J.; Karin, M. (1994) Membrane targeting of Sos activates Ras signaling. *Cell* 78:949-961.
- Avruch, J. Zhang, X-f.; Kyriakis, J. M. (1994) Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends Biochem. Sci.* 19:279-283.
- Bancroft, J. D.; Stevens, A. (1990). *Theory and Practice of Histological Techniques*. Tercera edición. Churchill Livingstone Inc. N.Y. USA. págs. 108-112.
- Barbacid, M. (1987). Ras genes. *Annu. Rev. Biochem.* 56:779-827.
- Bar-Sagi, D.; Feramisco, J. R. (1985) Microinjection of the ras oncogene protein into PC12 cells induces morphological differentiation. *Cell* 42:841-848.
- Bar-Sagi, D.; Feramisco, J. R. (1986) Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblasts by ras proteins. *Science* 233:1061-1068.
- Birchmeier, C.; Broek, D.; Wigler, M. (1985) RAS proteins can induce meiosis in *Xenopus* oocytes. *Cell* 43:615-621.
- Bishop, J. G. III & Corces, V. G. (1988) Expression of an activated ras gene causes developmental abnormalities in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* 2:567-577.
- Bishop, J. M. (1991) Molecular Themes in oncogenesis. *Cell* 64:235-248.
- Blummer, K. J. & Johnson, G. L. (1994) Diversity in function and regulation of MAP kinase pathways. *Trens Biochem. Sci.* 19:236-239.
- Boguski, M.S.; McCormick, F.(1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366:643-654.

Bokoch, G. M.; Der, Ch. J.; (1993) Emerging concepts in the Ras superfamily of GTP-binding proteins. *FASEB Journal*. 7:750-759.

Bollag, G.; McCormick, F. (1991) Regulators and effectors of ras proteins. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7:601-632.

Bollag, G.; McCormick, F. (1991) Regulators and effectors of ras proteins. *Annu. Rev. Biol.* 7:601-632.

Borasio, G. D.; John, J.; Wittinghofer, A.; Barde, Y. A.; Sendtner, M.; Heumann, R. (1989) Ras p21 protein promotes survival and fiber outgrowth of cultured embryonic neurons. *Neuron* 2:1087-1096.

Boss, J. L. (1989) Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 49:4682-4689.

Bourne, H.R.; Sanders, D.A.; McCormick, F. (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 348:125-132.

Burgering, B. M. T. & Bos, J. L. (1995) Regulation of Ras-mediated signalling: more than one way to skin a cat. *Trends Biol. Sci.* 20:18-22.

Bustelo, X. R.; Suen, K.-L.; Leftheris, K.; Meyers, C. A.; Barbacid, M. (1994) Vav cooperates with Ras to transform rodent fibroblasts but is not a Ras GDP/GTP exchange factor. *Oncogene* 9:2405-2413.

Cai, H.; Szeberényi, J.; Cooper, G. M. (1990) Effect of a dominant inhibitory Ha-ras mutation on mitogenic signal transduction in NIH 3T3 cells. *Mol. Cell Biol.* 10:5314-5323.

Cantley, L. C.; Auger, K. R.; Carpenter, Ch.; Duckworth, B.; Graziani, A.; Kapeller, R.; Soltoff, S. (1991) Oncogenes and Signal Transduction. *Cell* 64:281-302.

Casperson, G. F.; Walker, N.; Brasier, A. R.; Bourne, H. R. (1983) A guanine nucleotide sensitive adenylate cyclase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 258:7911-7914.

Chang, E. H.; Furth, M. E.; Scolnick, E. M.; Lowy, D. R. (1982) Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus. *Nature* 297:479-483.

Chang, W. P. & Little, J. B. (1991) Delayed reproductive death in X-irradiated Chinese hamster ovary cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 60(3):483-496.

Chardin, P.; Camonis, H.; Gale, N. W.; Van Aelst, L.; Schlessinger, J.; Wigler, M. H. Bar-Sagi, D. (1993) Human Sos1: A guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to Grb2. *Science* 260:1338-1342.

Chomczynski, P.; Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.

Clark, S. G.; McGrath, J. P.; Levinson, A. D. (1985) Expression of normal and activated human Ha-ras cDNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 5:2746-2752.

Cleghon, V. & Morrison, D. K. (1994) Raf-1 interacts with Fyn and Src in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 269:17749-17755.

Cook, S. J. & McCormick, F. (1993) Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science* 262:1069-1071.

Cox, A. D.; Der, C. J. (1992) Protein prenylation: more than just glue? *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:1008-1016.

Crews, C. M. & Erikson, R. L. (1993) Extracellular Signals and reversible protein phosphorylation: what to MEK of it all. *Cell* 74:215-217.

Cross, S. M.; Sanchez, C. A.; Morgan, C. A.; Schimke, M. K.; Ramel, S.; Idzerda, R. L. Raskind, W. H.; Reid, B. J. (1995) A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science* 267:1353-1356.

DeFeo-Jones, D.; Scolnick, E. M.; Koller, R.; Dhar, R. (1983) Ras-related gene sequences identified and isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 306:707-709.

DeFeo-Jones, D.; Tatchell, K.; Robinson, L. C.; Sigal, I. S.; Vass, W. C.; Lowy, D. R.; Scolnick, E. M. (1985) Mammalian and yeast ras gene products: biological function in their heterologous systems. *Science* 228:179-184.

Dent, P.; Hasegawa, W.; Haystead, T. A. J.; Vincent, L. A.; Roberts, T. M.; Sturgill, T. W. (1992) Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells in vitro. *Science* 257:1404-1407.

Der, C. J.; Finkel, T.; Cooper, G. M. (1986). Biological and biochemical properties of human ras-H genes mutated at codon 61. *Cell* 44:167-176.

Dérjard B.; Hibi, M.; Wu, I-H.; Barret, T.; Su, B.; Deng, T.; Karin, M.; Davis, R. J. (1994) JNK1: A protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell.* 76:1025-1037.

Dhar, R.; Nieto, A.; Koller, R.; DeFeo-Jones, D.; Scolnick, E. M. (1984) Nucleotide sequence of two rasH related genes isolated from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 12:3611-3618.

Downward, J.; Graves, J. D.; Warne, P. H.; Rayter, S.; Cantrel, D. A. (1990) Stimulation of p21ras upon T-cell activation. *Nature* 346:719-723.

- Downward, J. (1990) The ras superfamily of small GTP-binding proteins. *TIBS* 15:469-472.
- Durkin, J. P. & Whitfield, J. F. (1987) The viral Ki-ras gene must be expressed in the G2 phase if its Kirsten sarcoma virus-infected NRK cells are to proliferate in serum-free medium. *Mol. Cell. Biol.* 7:444-449.
- Egan, S. E.; Giddings, B. W.; Brooks, M. W. Buday, L.; Sizeland, A. M.; Weinberg, R. A. (1993) Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature* 363:45-51.
- Egan, S. E.; Weinberg, R.A. (1993) The pathway to signal achievement. *Nature* 365:781-783.
- Ellis, R. W.; DeFeo, D.; Shih, T. Y.; Gonda, M. A.; Young, H. A.; Tsvchida, N.; Lowy, D. R.; Scolnick, E. M. (1981) The p21 src genes of Harvey and Kirstein sarcoma viruses originate from divergent member of a family of normal vertebrate genes. *Nature* 292:506-511.
- Fabian, J. Daar, I. Morrison, D. (1993) Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase. *Mol. Cell. Biol.* 13:7170-7179.
- Farnsworth, C. L. & Feig, L. A. (1991) Dominant inhibitory mutations in the Mg2+ binding site of ras blocks its activation by GTP. *Mol. Cell. Biol.* 11:4822-4829.
- Feig, L. A. & Cooper, G. M. (1988) Inhibition of NIH 3T3 cell proliferation by a mutant ras protein with preferential affinity for GDP. *Mol. Cell. Biol.* 8:3235-3243.
- Feig, L. A. (1994) Guanine-nucleotide exchange factors: a family of positive regulators of Ras and related GTPases. *Curr. Op. Cell Biol.* 6:204-211.
- Feig, L. A. & Schaffhausen, B. (1994) The hunt for Ras targets. *Nature* 370:508-509.
- Felgner, Ph.; Gadek, T.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M.; Danielsen, M. (1987). Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 7413-7417.
- Feramisco, J. R.; Gross, M.; Kamata, T.; Rosenberg, M.; Sweet, R. W. (1984) Microinjection of the oncogene form of the human H-ras (T-24) protein results in rapid proliferation of quiescent cells. *Cell* 38:109-117.
- Feramisco, J. R.; Clark, R.; Wong, G.; Arnheim, N.; Milley, R.; McCormick, F. (1985) Transient reversion of ras oncogene induced cell transformation by antibodies specific for amino acid 12 of ras protein. *Nature* 314:639-642.

Frech, M.; John, J.; Pizon, V.; Chardin, P.; Tavitian, A.; Clark, R.; McCormick, F.; Wittinghofer, A. (1990). Inhibition of GTPase activating protein stimulation of ras p21 GTPase by the Krev-1 gene product. *Science* 249: 169-171.

Fukui, Y.; Kozasa, T.; Kaziro, Y.; Takeda, T.; Yamamoto, M. (1986) Role of a ras homolog in the life cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell* 44:329-336.

Gibbs, J. B.; Sigal, Y. S.; Poe, M.; Scolnick, E. M. (1984) Intrinsic GTPase activity distinguishes normal and oncogenic ras p21 molecules. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81:5704-5708.

Gibbs, J. B. & Marshall, S. (1989) The ras Oncogene-an important regulatory element in lower eucaryotic organisms. *Microbiol. Rev.* 53(2):171-185.

Guido, M.; Zamorano, R.; Garrido-Guerrero, E.; Gariglio, P.; Garcia-Carranca A. (1992). Early promoters of genital and cutaneous human papillomaviruses are differentially regulated by the bovine papillomavirus type 1 E2 gene product. *J. Gen. Virol.* 73: 1395-1400.

Gulbins, E.; Coggeshall, M.; Baier, G.; Katzav, S.; Burn, P.; Altman, A. (1993) Tyrosine kinase-stimulated guanine nucleotide exchange activity of Vav in T cell activation. *Science* 260:311-313.

Hacker, U.; Schumann, J.; Göhde. (1980). Effects of acute gamma-irradiation of spermatogenesis as revealed by flow cytometry. *Acta Radiologica Oncology.* 19(5): 361-366.

Hall, A. (1990). The Cellular Functions of Small GTP-Binding Proteins. *Science* 249: 635-640.

Hall, A. & Zerial, M. (1994).

Hall, A. (1994) A biochemical function for Ras-at last. *Science* 264:1413-1414.

Han, M.; Sternberg, P. W. (1990) Let-60, a gene that specifies cell fates during *C. elegans* vulval induction, encodes a ras protein. *Cell* 63:921-931.

Hancock, J. F.; Magee, A. I.; Childs, J. E.; Marshall, C. J. (1989) All ras proteins are polysoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* 57:1167-1177.

Hancock, J. F.; Paterson, H.; Marshall, C. J. (1990) Apolybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell* 63:133-139.

Hancock, J. F.; Cadwallader, K.; Marshall, C. J. (1991) Methylation and proteolysis are essential for efficient membrane binding of prenylated p21K-ras(B). *EMBO J.* 10: 641-646.

Haney, S. A. & Broach, J. R. (1994) Cdc25p, the guanine nucleotide exchange factor for the Ras proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, promotes exchange by stabilizing Ras in a nucleotide-free state. *J. Biol. Chem.* 269:923-929.

Hill, C. S. & Treisman, R. (1995) Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* 80:199-211.

Hoffman, I. & Karsenti, E. (1994) The role of cdc25 in checkpoints and feedback controls in the eukaryotic cell cycle. *J. Cell Sci.* 1807:1-5.

Hunter, T. (1991) Cooperation between Oncogenes. *Cell* 64:249-270.

Hunter, T. & Pines, J. (1994) Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 79:573-582.

Jung, V. et. al. (1994) Two types of Ras mutants that dominantly interfere with activators of Ras *Mol. Cell. Biol.* 14:3707-3718.

Kaizlauskas, A.; Ellis, C.; Pawson, T.; Cooper, J. A. (1990) Binding of GAP to activated PDGF receptors. *Science* 247:1578-1581.

Karin, M. & Smeal, T. (1992) Control of transcription factors by signal transduction pathways the beginning of the end. *Trens Biochem. Sci.* 418-422.

Karsenti, E. (1991) Mitotic spindle morphogenesis in animal cells. *Sem. Cell Biol.* 2:251-260.

Kataoka, T.; Powers, S.; Cameron, S.; Fasano, O.; Goldfarb, M.; Broach, J.; Wigler, M. (1985) Functional homology of mammalian and yeast ras genes. *Cell* 40:19-26.

Kato, K.; Cox, A. D.; Hisaka, M. M.; Graham, S. M.; Buss, J. E.; Der, Ch. J. (1992) Isoprenoid addition to Ras protein is the critical modification for its membrane association and transforming activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:6403-6407.

Katzav, S.; Martin-Zanca, D.; Barbacid, M. (1989) Vav, a novel human oncogene derived from a locus ubiquitously expressed in hematopoietic cells. *EMBO J.* 8:2283-2290.

Khorsravi-Far, R.; Chrzanowska-Wodnicka, M.; Solski P. A.; Eva, A.; BurrIDGE, K.; Der, C. J. (1994) Dbl and Vav mediate transformation via mitogen-activated protein kinase pathways that are distinct from those activated by oncogenic Ras. *Mol. Cell. Biol.* 14:6848-6857.

King, R. W.; Jackson, P. K.; Kirschner, M. W. (1994) Mitosis in transition. *Cell* 79:563-571



- Kitayama, H.; Sugimoto, Y.; Matsuzaki, T.; Ikawa, Y.; Noda, M. (1989). A ras-related gene with transformation suppressor activity. *Cell* 56:77-84.
- Kolch, W.; Heidecker, G.; Kochs, G.; Hummel, R.; Vahidi, H.; Mischak, H.; Finkenzeller, G.; Marmé, D.; Rapp, U. (1993) Protein kinase C $\alpha$  activates Raf-1 by direct phosphorylation. *Nature* 364:249-252.
- Kung, H.-F.; Smith, M. R.; Bekesi, E.; Manne, V.; Stacey, D. W. (1986) Reversal of transformed phenotype by monoclonal antibodies against Ha-ras p21 proteins. *Exp. Cell Res.* 162:363-371.
- Kung, A. L.; Sherwood, S. W.; Schimke, R. T.; (1990. Cell line-specific differences in the control of cell cycle progression in the absence of mitosis. *PNAS* 87:9553-9557.
- Kyriakis, J. M.; App, H.; Zhang, X. F.; Banerjee, P.; Brautigan, D. L.; Rapp, U. R.; Avruch, J. (1992) Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 358:417-421.
- Lacal, J. C.; Fleming, T. P. Warren, B. S.; Blumberg, P. M.; Aaronson, S. A. (1987) Involvement of functional protein kinase C in the mitogenic response to de H-ras oncogene product. *Mol. Cell. Biol.* 7:4146-4149.
- Lange-Carter, C. A.; Pleiman, C. M.; Gardner, A. M.; Blumer, K. J.; Johnson, G. L. (1993) A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf.
- Leevers, S. J.; Marshall, C. J. (1992) MAP kinase regulation - the oncogene connection. *Trends Cell Biol.* 2:283-286.
- Lewin, B. (1980) *Somatic Cell Mutants in Gene Expression. Vol. 2 Eucaryotic chromosomes. Segunda edición. Wiley-Interscience Publication. USA págs. 142-146.*
- Lin, I. L.; Wartmann, M.; Lin, A. Y.; Knopf, J.; Seth, A.; Davis, R. (1993) cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 72:269-278.
- Lock, R. B. & Ross, W. E. (1990) Possible Role for p34cdc2 kinase in etoposide-induced cell death of chinese hamster ovary cells. *Cance Res.* 50:3767-3771.
- Lock, R. B.; Galperina, O. V.; Feldhoff, R. C.; Rhodes, L. J. (1994) Concentration-dependent differences in the mechanisms by which caffeine potentiates etoposide cytotoxicity in HeLa cells. *Cancer Res.* 54:4933-4939.
- Lowenstein, E. J.; Daly, R. J.; Batzer, A. G.; Li, W.; Mrgolis, B.; Lammers, R.; Ullrich, A.; Skolnik, E. Y.; Bar-Sagi, D.; Schlessinger, J. (1992) The SH2 and SH3 domain-containing protein Grb2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* 70:431-442.

- Lowy, D. R. & Willumsen, B. M. (1993) Function and Regulation of Ras. *Annu. Rev. Biochem.* 62:851-891.
- Lu, X.; Park, S. H.; Thompson, t. C.; Lane, D. P. (1992) ras-induced hyperplasia occurs with mutation of p53, but activated ras and myc together can induce carcinoma without p53 mutation. *Cell* 70:153-161.
- Marshall, C. J. (1985). Human oncogenes. In: Weiss, R.; Teich, N.; Varmus, H.; Coffin, J. *RNA tumor viruses, segunda edición.* Cold Spring Hrbor, N.Y. USA. págs. 487-558.
- Marshall, C. J. (1994) MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr. Op. Genet. Dev.* 4:82-89.
- Marshall, C. J. (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80:179-185.
- Marx, J. (1993) Forging a Path to the Nucleus. *Science* 260:1588-1590.
- Matsumoto, K.; Uno, I.; Ishikawa, T. (1983) Control of cell division in *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in adenylate cyclase and cyclic AMP dependent protein kinase. *Exp. Cell Res.* 146:151-162.
- McCormick, F. (1993) How receptors turn Ras on. *Nature* 363:15-16.
- McCormick, F. (1994) Activators and effectors of ras p21 proteins. *Curr. Op. Genet. Dev.* 4:71-76.
- McGlade, J.; Brunkhorst, B.; Anderson, D.; Mbama, G.; Settleman, J.; Dedhar, S.; Rozakis-Adcock, M.; Chen, L. B.; Pawson, T. (1993) The N-terminal region of GAP regulates cytoskeletal structure and cell adhesion. *EMBO J.* 12:3073-3081.
- McGrath, J.P.; Capon, D.J.; Smith, D.H.; Chen, E.Y.; Seeburg, P.H.; Goeddel, D.V.; Levinson, A.D. (1983) Structure and organization of the human Ki-ras proto-oncogene and a related processed pseudogene. *Nature* 304:501-506.
- McKay, I. A.; Marshall, Ch. J.; Calés, C.; Hall, A. (1986) Transformation and stimulation of DNA synthesis in NIH-3T3 cells are a titratable function of normal p21N-ras expression. *EMBO J.* 5(10):2617-2621.
- Minden, A.; McMahon, M.; Lange-Carter, C.; Dérjard, B.; Davis, R. J.; Johnson, G. L.; Karin, M. (1994) Differential activation of ERK and JNK MAP kinases by Raf-1 and MEKK. *Science* 266:1719-1723.
- Molloy, C. J.; Bottaro, D. P.; Flemming, T. P.; Marshall, M. S.; Gibbs, J. B.; Aaronson, S. A. (1989) PDGF induction of tyrosine phosphorylation of GTPase activating protein. *Nature* 342:711-714.

Moodie, S. A.; Willumsen, B. M.; Weber, M. J. Wolfman, A. (1993) Complexes of Ras-GTP with Raf-1 and Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase. *Science* 260:1658-1661.

Moodie, S. A. & Wolfman, A. (1994) The 3Rs of life: Ras, Raf and growth regulation. *Trends Genet.* 10:44-48.

Morrison, D. K.; Kaplan, D. R.; Rapp, U.; Roberts, T. M. (1988) Signal transduction from membrane to cytoplasm: growth factors and membrane-bound oncogene products increase Raf-1 phosphorylation and associated protein kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:8855-8859.

Mozer, B.; Marlor, R.; Parkhurst, S.; Corcos, V. (1985) Characterization and developmental expression of a *Drosophila melanogaster* ras oncogene. *Mol. Cell. Biol.* 5:885-889.

Mulcahy, L. S.; Smith, M. R. Stacey, D. W. (1985) Requirement for ras proto-oncogene function durin serum-stimulated growth of NIH 3T3 cells. *Nature* 313:241-243.

Munder, T. & Furst, P. (1992) The *Saccharomyces cerevisiae* CDC25 gene product binds specifically to catalytically inactive Ras proteins *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* 12:2091-2099.

Nadin-Davis, S. A.; Yang, R. C. A.; Narang, S.A.; Nasim, A. (1986a) The cloning and characterization of a ras gene from *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Mol. Evol.* 23:41-52.

Nadin-Davis, S. A.; Nasim, A.; Beach, D. (1986b) Involvement of ras in sexual differentiation but not in growth control in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* 5:2963-2972.

Nakagawa, T.; Mabry, M.; Bustros de, A.; Ihle, J. N.; Nelkin, B. D.; Baylin, S. B. (1987) Introduction of v-Ha-ras oncogene induces differentiation of cultured human medullary thyroid carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:5923-5927.

Neuman-Silberberg, F. S.; Schejter, E.; Hoffmann, F. M.; Shilo, B. Z. (1984) The *Drosophila melanogaster* ras oncogenes: structure and nucleotide sequence. *Cell* 37:1027-1034.

Nishida, E. & Gotoh, Y. (1993) The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem. Sci.* 18:128-131.

Noda, M.; Ko, M.; Ogura, A.; Liu, D.; Amano, T.; Takano, T.; Ikawa, Y. (1985) Sarcoma viruses carrying ras oncogenes induce differentiation-associated properties in a neuronal cell line. *Nature* 318:73-75.

Nurse, P. (1990) Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344:503-508.

Parsons, T. J. (1990) Closing the GAP in a signal transduccion pathway. *TIG* 6(6):169-171.

- Paterson, H. F.; Self, A. J.; Garrett, M. D.; Just, I.; Aktories, K.; Hall, A. (1990) Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology. *J. Cell Biol.* 111:1001-1007.
- Pellicci, G.; Lanfrancone, L.; Grignani, F.; McGlade, J.; Cavallo F.; Forni, G.; Nicolletti, I.; Pawson, T.; Pelicci, P. G. (1992) A novel transforming protein (Shc) with an SH2 domain is implicated in a mitogenic signal transduction. *Cell* 70:93-104.
- Powers, S.; Kataoka, T.; Fasano, O.; Goldfarb, M.; Strathern, J.; Broach, J.; Wigler, M. (1984) Genes in *Saccharomyces cerevisiae* encoding proteins with domains homologous to the mammalian ras proteins. *Cell* 36:607-612.
- Prendergast, G. C. & Gibbs, J. B. Pathways of Ras function: connections to the actin cytoskeleton. *Adv. Cancer Res.* 62:19-64.
- Pulciani, S.; Santos, E.; Long, L. K.; Sorrentino, V.; Barbacid, M. (1985) Ras gene amplification and malignant transformation. *Mol. Cell. Biol.* 5(10):2836-2841.
- Pulverer, B. J.; Kyriakis, J. M.; Avruch, J.; Nikolakaki, E.; Woodgett, J. R. (1991) Phosphorylation of c-Jun mediated by MAP kinases. *Nature* 353:670-674.
- Quilliam, L. A.; Khosravi-Far, R.; Huff, S. Y.; Der, C. J. (1995) Guanine nucleotide exchange factors: activators of the Ras superfamily of proteins. *BioEssays* 17(5):395-404.
- Reddy, E. P.; Reynold, R. K.; Santos, E.; Barbacid, M. (1982) A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties of the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 300:149-152.
- Reymond, C. D.; Gomer, R. H.; Nellen, W.; Theibert, A.; Devreotes, P.; Firtel, R. A. (1984) Developmental regulation of a *Dictyostelium* gene encoding a protein homologous to mammalian ras protein. *Cell.* 39:141-148.
- Ridley, A. J. & Hall, A. (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70:389-299.
- Ridley, A. J.; Paterson, H. F.; Johnston, C. L.; Diekmann, D.; Hall, A. (1992) The Small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70:401-410.
- Roberts, T. M. (1992) A signal chain of events. *Nature* 360:434-535.
- Rodilla, V.; Pellicer, J. A.; Pertusa, J.; Mothersill, C. (1990) Induction of micronucleated and binucleated cells in Chinese hamster ovary (CHO) cells by cis-diamminedichloroplatinum (II): a morphological and morphometric study. *Mutation Res.* 241:115-124.

Rodilla, V.; Pellicer, J. A.; Serrano, A.; Pertusa, J. (1993) Possible relationship between micronucleated and binucleated cells induced by cisplatin in cultured CHO cells. *Mutation Res.* 291:35-41.

Rodilla, V. (1993) Origin and evolution of binucleated cells and binucleated cells with micronuclei in cisplatin-treated CHO cultures. *Mutation Res.* 300: 281-291.

Rodriguez-Viciano, P.; Warne, P. H.; Dhand, R.; Vanhaesebroeck, B.; Gout, I.; Fry, M. J.; Waterfield, M. D.; Downward, J. (1994) Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 370:527-532.

Rozakis-Adcock, M.; McGlade, J.; Mbamalu, G.; Pelicci, G.; Daly, R.; Li, W.; Batzer, A.; Thomas, S.; Pellicci J.; Schlessinger, J. Pawson, T. (1992) Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2 containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature* 360:671-689.

Sambrook, J.; Fritsch, F.F.; Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Segunda edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y. USA. págs 1.33-1.84, 7.43-7.52 y 9.58.

Santos, E.; Tronick, S.R.; Aaronson, S.A.; Pulciani, S.; Barbacid, M. (1982) T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes. *Nature* 298:343-347.

Satoh, T.; Nakamura, S.; Kaziro, Y. (1987) Induction of neurite formation in PC12 cells by microinjection of proto-oncogenic Ha-ras protein preincubated with guanosine-5'-O-(3-thiotriphosphate). *Molec. Cell. Biol.* 7(12):4553-4556.

Schlessinger, J. (1993) How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends Biochem. Sci.* 18:273-275.

Seeburg, P. H.; Colby, W. W.; Capon, D. J. Goedell, D. V.; Levinson, A. D. (1984) Biological properties of human c-Ha-ras genes mutated at codon 12. *Nature* 312:71-75.

Segal, D. & Shilo, B. Z. (1986) Tissue localization of *Drosophila melanogaster* ras transcripts during development. *Mol. Cell. Biol.* 6:2241-2248.

Seth, A.; Alvarez, E.; Gupta, S.; Davis, R. J. (1991) A phosphorylation site located in the NH<sub>2</sub>-terminal domain of c-Myc increases transactivation of gene expression. *J. Biol. Chem.* 266:23521-23524.

Settleman, J.; Albright, C. F.; Foster, L. C.; Weinberg, R. A. (1992a) Association between GTPase activators for Rho and Ras families. *Nature* 359:153-154.

Settleman, J.; Narasimhan, V.; Foster, L. C.; Weinberg, R. A. (1992b) Molecular Cloning of cDNAs encoding the GAP-associated protein p190: implications for a signaling pathway from Ras to the nucleus. *Cell* 69:539-549.

Sigal, I. S.; Gibbs, J. B.; D'Alonzo, J. S.; Temeles, G. L.; Wolanski, B. S.; et. al. (1986) Mutant ras-encoded proteins with altered nucleotide binding exert dominant biological effects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:952-956.

Sozeri, O.; Vollmer, K.; Liyanage, M.; Frith, D.; Kour, G.; Mark, G. E.; Stabel, S. (1992) Activation of c-Raf protein kinase by protein kinase C phosphorylation. *Oncogene* 7:2259-2262.

Stacey, D. W. & Kung, H. (1984) Transformation of NIH 3T3 cells by microinjection of Ha-ras p21 protein. *Nature* 310:508-511.

Stokoe, D.; Macdonald, G.; Cadwallader, K.; Symons, M.; Hancock, J. F. (1994) Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science* 264:1463-1467.

Swanson, M. E.; Elste, A. M.; Greenberg, S. M.; Schwartz, J. H.; Aldrich, T. H.; Furth, M. E. (1986). Abundant expression of ras proteins in *Aplysia* neurons. *J. Cell. Biol.* 103:485-492.

Tabbin, C. J.; Bradley, S. M.; Bargmann, C. Y.; Weinberg, R. A.; Papageorge, A. G.; Scolnick, E. M.; Dhar, R.; Lowy, D. R. Chang, E. H. (1982) Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 300:143-149.

Toda, T.; Uno I.; Ishikawa, T.; Powers, S.; Kataoka, T.; Broek, D.; Cameron, S.; Broach, J. B.; Matsumoto, K.; Wigler, M. (1985) In yeast RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell* 40:27-36.

Tounekti, O.; Pron, G.; Belehradek, J.; Mir, L. M. (1993) Bleomycin, an apoptosis-mimetic drug that induces two types of cell death depending on the number of molecules internalized. *Cancer. Res.* 53:5462-5469.

Trahey, M.; McCormick, F. (1987) A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science* 238:542-545.

Vega, L.; Gonsebatt, M. E.; Ostrosky-Wegman, P. (1995) Aneugenic effect of sodium arsenite on human lymphocytes *in vitro*: an individual susceptibility effect detected. *Mutation Research.* 334: 365-373.

Vogel, U. S.; Dixon, R. A.; Schaber, M. D.; Diehl, R. E.; Marshall, M. S. (1988) Cloning of bovine GAP and its interaction with oncogenic ras p21. *Nature* 335:90-93.

Vojtek, A. B.; Hollenberg, S. M.; Cooper, J. A. (1993) Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* 74:205-214.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Willumsen, B. M. Christensen, A.; Hubbert, N. L.; Papageorge, A. G.; Lowy, D. R. (1984) The p21 ras C-terminus is required for transformation and membrane association. *Nature* 310:583-586.

Wu, J.; Dent, P.; Jelinek, T.; Wolfman, A.; Weber, M. J.; Sturgill, T. W. (1993) Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-Monophosphate. *Science* 262:1065-1069.

Yamada, H.; Omata-Yamada, T.; Lengyel, P. (1991) Characterization of recessive (mediator-) revertants from NIH3T3 cell transformed with a c-H-Ras oncogene. *J. Biol. Chem.* 266:4002-4009.

Yamaguchi-Iwai, Y.; Satake, M.; Murakami, Y.; Sakai, M.; Muramatsu, M. Ito, Y. (1990) Differentiation of F9 embryonal carcinoma cells induced by the c-jun and activated c-Ha-ras oncogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:8670-8674.

Yan, M.; Dai, T.; Deak, J. C.; Kyriakis, J. M.; Zon, L. I.; Woodgett, J. R. ; Templeton, D. J. (1994) Activation of stress-activated protein kinase by MEKK-1 phosphorylation of its activator, SEK1. *Nature* 320:798-801.

Yatani, A.; Okabe, K.; Polakis, P.; Halenbeck, R.; McCormick, F.; Brown, A. M. (1990). Ras p21 and GAP inhibit coupling of muscarinic receptors to atrial K<sup>+</sup> channels. *Cell* 61:769-776.

Zhang, K.; DeClue, J. E.; Vass, W. C.; Papageorge, A. G.; McCormick, F.; Lowy, D. R. (1990) Suppression of c-ras transformation by GTPase-activating protein. *Nature* 346: 754-756.

Zhang, X-f.; Settleman, J.; Kyriakis, J. M.; Takeuchi-Suzuki, E.; Elledge, S. J.; Marshall, M. S., Bruder, J. T.; Rapp, U. R.; Avruch. (1993) Normal and oncogenic p21 ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature* 364:308-313.