



**Universidad de  
Buenos Aires**



**Facultad de Ciencias  
Exactas y Naturales**

**RALA PARTICIPA EN LOS MECANISMOS DE  
TRANSFORMACIÓN INDUCIDOS POR LOS  
ONCOGENES V-RAS, V-RAF Y V-SRC**

**Tesis presentada para optar al título de Doctor  
de la Universidad de Buenos Aires  
en el área de Ciencias Biológicas**

**Lic. Alejandro Pablo Adam**

**Directora de Tesis**

**Dra. Elisa Bal de Kier Joffé**

**Buenos Aires, 2006**

**RALA PARTICIPA EN LOS MECANISMOS DE  
TRANSFORMACIÓN INDUCIDOS POR LOS  
ONCOGENES V-RAS, V-RAF Y V-SRC**

**Jurados:**

**Dra. Silvia Moreno**

**Dr. Omar Coso**

**Dr. Juan Carlos Calvo**

## **RalA Participa en los Mecanismos de Transformación Inducidos por los Oncogenes v-Ras, v-Raf Y v-Src**

RalA pertenece a la familia de GTPasas pequeñas Ras y es un efector de la misma. Como tal, posee un importante rol en los mecanismos de transducción de señales del protooncogén Ras. En esta Tesis se detallan los experimentos realizados a fin de investigar un posible papel de RalA en los mecanismos de transducción oncogénica que promueven un aumento en la supervivencia celular y una modificación del citoesqueleto que deriva en una capacidad migratoria incrementada. Para ello, se utilizó como modelo fibroblastos murinos NIH3T3 sobreexpresando o no los oncogenes virales v-Ras, v-Raf ó v-Src, y coexpresando o no una mutante dominante negativa de RalA, S28N-RalA. Se demuestra que RalA actúa de forma independiente de otras vías de transducción activadas por Ras, tales como MEK/Erk y PI3K/PDK/Akt en la promoción de la supervivencia celular y en la desorganización de las fibras de stress de actina. Asimismo, se propone una nueva vía mediante la cual RalA mediaría la inhibición de la activación de p38 inducida por la sobreexpresión de oncogenes. Estos resultados podrían explicar observaciones previas de que la inhibición de la actividad RalA por sobreexpresión de S28N-RalA impide por completo la tumorigenicidad de fibroblastos transformados por v-Ras ó v-Src.

## **RalA is Involved in the Transformation Mechanisms Induced by the Oncogenes v-Ras, v-Raf and v-Src**

RalA belongs to the Ras family of small GTPases and it is a Ras downstream effector. As such, it has an important role in the signal transduction mechanisms of the Ras protooncogenes. In this Thesis, there are shown the experiments performed in order to investigate a possible role of RalA in the mechanisms of oncogenic signal transduction leading to an increased cell survival and cytoskeleton modifications promoting an increase in the migratory capacity. This was achieved by using as a model mouse fibroblasts NIH3T3 overexpressing or not the viral oncogenes v-Ras, v-Raf or v-Src, and coexpressing or not a dominant negative mutant of RalA, S28N-RalA. Here, it is demonstrated that RalA acts independently of other signal transduction pathways activated by Ras, such as MEK/Erk and PI3K/PDK/Akt in promoting cell survival and actin stress fiber disorganization. Also, a novel pathway is proposed, in which RalA would mediate the inhibition, induced by oncogene overexpression, of p38 activation. These results may explain the previous observations that inhibition of RalA activity by overexpression of S28N-RalA completely inhibits the tumorigenicity of NIH3T3 fibroblasts transformed by v-Ras or v-Src.

## **Agradecimientos**

En primer lugar, quisiera agradecer a mis padres, Teófilo y Gabriela, porque me han dado todo y han hecho posible que yo siguiera mi camino sin dificultades. Quiero agradecer también a mi hermana, Ingrid, por su aliento y cariño. Y a Bibiana, mi esposa, por todo su amor y su apoyo en los momentos finales de esta Tesis que también fueron los más difíciles para mí.

Quiero agradecer también a la Dra. Elisa Bal de Kier Joffé por todo lo que supo darme durante los años que me formé en el Instituto Roffo. Y por su paciencia conmigo. Asimismo, quiero agradecer a la Dra. Lydia Puricelli y a toda la gente con la que trabajé en el Instituto y especialmente a la Dra. Lilia Lauría de Cidre por su ayuda en la toma de ciertas decisiones.

También quisiera nombrar a varias personas que han contribuido con reactivos y sugerencias para este trabajo. Al Dr. Julio Aguirre Ghiso por sus invaluable contribuciones y sugerencias a lo largo de todo el trabajo; a la Dra. Mónica Costas, por su contribución para los estudios de señalización y de genes reporteros; al Dr. Andrei Bakin por el anticuerpo contra tropomiosina y por su ayuda con las RT-PCR para tropomiosina; a la Dra. Cecilia Colonna por las construcciones para expresar Rho; y por supuesto al Dr. David Foster por la generación de las líneas celulares estudiadas.

# Índice

<b>RESUMEN EXPANDIDO .....</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>14</b>
LA SUPERFAMILIA RAS .....	17
<i>La superfamilia Ras</i> .....	17
<i>Estructura y modo de activación</i> .....	18
<i>Las vías activadas por Ras</i> .....	21
<i>La subfamilia Ral. Su lugar en la red de transducción de señales</i> .....	23
MIGRACIÓN E INVASIÓN .....	24
LA MATRIZ EXTRACELULAR.....	25
EL CITOESQUELETO .....	26
<i>Mecanismos de regulación de la polimerización de actina</i> .....	27
LA TRANSFORMACIÓN MALIGNA, TUMORIGÉNESIS Y CASCADA METASTÁSICA .....	31
<i>La transformación in vitro</i> .....	33
<i>Tumorigénesis</i> .....	34
<i>La formación de metástasis</i> .....	37
SARCOMAS .....	39
CAMBIOS EN LA MATRIZ, EL CITOESQUELETO Y LA MOTILIDAD CELULAR EN LA TRANSFORMACIÓN MALIGNA .....	40
PROLIFERACIÓN Y SOBREVIDA .....	41
<i>El ciclo celular</i> .....	42
<i>Apoptosis</i> .....	45
<i>El control intracelular de la apoptosis</i> .....	49
<i>El rol de las SAPKs</i> .....	51
<i>Mecanismos de inhibición de la muerte celular</i> .....	52
PAPEL DE RALA EN LA TRANSFORMACIÓN MALIGNA.....	53
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>56</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>58</b>
MODELO EXPERIMENTAL. CULTIVO CELULAR .....	59
FLUORESCENCIA, INMUNOFUORESCENCIA E INMUNOHISTOQUÍMICA .....	59
ENSAYOS DE MIGRACIÓN CELULAR.....	60
OBTENCIÓN DE LISADOS CELULARES Y WESTERN BLOT .....	61
CUANTIFICACIÓN DE LA APOPTOSIS .....	63
ENSAYOS DE SOBREVIDA IN VIVO .....	63
CULTIVOS EN SUSPENSIÓN .....	64
INDUCCIÓN DE APOPTOSIS CON CISPLATINO O PRIVACIÓN DE SUERO.....	64
EFECTO DE INHIBIDORES DE QUINASAS SOBRE LOS COMPORTAMIENTOS CELULARES REGULADOS POR RALA.....	65
TRANSFECCIONES TRANSIENTES .....	65
<i>Ensayos de genes reporteros</i> .....	65
<i>Análisis de mutantes la familia Rho y de la vía p38</i> .....	66
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	66
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>67</b>
RALA EN LA REGULACIÓN DE LA MORFOLOGÍA CELULAR, LA MATRIZ EXTRACELULAR, EL CITOESQUELETO Y LA MIGRACIÓN.....	68
<i>La alteración de la morfología en fibroblastos transformados depende de RalA</i> .....	68
<i>RalA modula la expresión de fibronectina</i> .....	71
<i>La configuración del citoesqueleto de actina depende de la actividad RalA</i> .....	73
<i>La contribución de RalA sería menor en la conformación de los microtúbulos y de los filamentos intermedios</i> .....	75
<i>La formación de complejos de adhesión focal es inhibida por la actividad RalA</i> .....	76

<i>Los oncogenes inducen la delocalización de integrina <math>\beta 1</math> por una vía que depende de la actividad RalA</i> .....	78
<i>v-Ras inhibe la expresión de Tropomiosina (TM)-2 de forma dependiente de RalA</i> .....	79
<i>La expresión de los oncogenes v-Ras, v-Raf ó v-Src induce una delocalización de las restantes TMs dependiente de RalA</i> .....	81
<i>La señalización de RalA es independiente de Mek1/2 y PI3K</i> .....	81
<i>La activación de las vías MEK/Erk y PI3K/Akt es necesaria para la desaparición de fibras de stress inducida por v-Ras de forma paralela a RalA</i> .....	84
<i>RalA inhibe la activación de p38</i> .....	86
<i>La activación de p38 es necesaria para la reaparición de las SFs inducida por la inhibición de RalA</i> .....	88
<i>RhoA es capaz de modular la formación de fibras de stress y la contractilidad celular aún en presencia de v-Ras en forma paralela o río debajo de RalA</i> .....	92
<i>Relación entre la capacidad de formación de fibrillas de fibronectina y la configuración del citoesqueleto de actina</i> .....	94
<i>RalA es necesaria para el aumento de la migración celular inducido por v-Ras, v-Raf y v-Src</i> .....	98
<b>RALA EN LA MODULACIÓN DE LA SOBREVIDA CELULAR</b> .....	101
<i>La actividad RalA es necesaria para la supervivencia celular in vivo</i> .....	101
<i>RalA regula asimismo la supervivencia in vitro</i> .....	103
<i>La regulación de la supervivencia celular in vitro sería independiente de la expresión de proteínas de la familia Bcl-2</i> .....	107
<i>RalA promueve la supervivencia celular de forma independiente de MEK ó PI3K</i> .....	107
<i>La regulación de p38 sería un mecanismo de promoción de la supervivencia celular</i> .....	109
<i>Ni el oncogén v-Ras ni RalA inducirían la activación de los promotores AP1 ó NF-<math>\kappa</math>B</i> .....	110
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>112</b>
<b>EL ROL DE RALA EN LA RED DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES Y SU RELACIÓN CON LA TRANSFORMACIÓN MALIGNA. UNA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>114</b>
<b>RALA EN LA REGULACIÓN DE LA MEC Y DE LA MORFOLOGÍA CELULAR</b> .....	<b>125</b>
<i>RalA en la regulación de la morfología de la célula transformada</i> .....	125
<i>RalA está involucrada en la regulación de la formación de la matriz extracelular de fibronectina</i> .....	127
<i>RalA es necesaria para la desaparición de los complejos de adhesión focal y de las fibras de stress, inducidas por los oncogenes</i> .....	128
<i>La fibronectina: suficiente, pero no necesaria</i> .....	130
<i>El rol de las MAPKs y de Akt</i> .....	131
<i>Un posible intermediario: Tropomiosina</i> .....	136
<i>La GTPasas Rho estaría en una vía paralela o río abajo de RalA</i> .....	137
<i>El efecto de RalA en la capacidad migratoria</i> .....	139
<b>RALA EN LA SOBREVIDA CELULAR INDUCIDA POR ONCOGENES</b> .....	<b>142</b>
<i>La actividad RalA es necesaria para la supervivencia in vivo a corto plazo</i> .....	143
<i>Estudios de supervivencia in vitro</i> .....	144
<i>La señal inducida por RalA es independiente de Raf ó PI3K</i> .....	145
<i>El rol de p38 en la supervivencia mediada por RalA</i> .....	146
<i>La supervivencia mediada por RalA en el contexto de la red de transducción de señales</i> ....	147
<b>RAL EN LA REGULACIÓN DEL CITOESQUELETO, LA SOBREVIDA Y LA TUMORIGÉNESIS. UNA POSIBILIDAD TERAPÉUTICA?</b> .....	<b>149</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>152</b>

A microscopic image of biological tissue, possibly a cross-section of a plant stem or a similar structure, showing various cellular and fibrous components. The image is overlaid with a semi-transparent red filter. The text "RESUMEN EXPANDIDO" is centered in white, bold, uppercase letters.

# RESUMEN EXPANDIDO



Se presenta al comienzo, y según lo dispuesto por el Reglamento de Tesis, un breve resumen, tanto en castellano como en inglés. Sin embargo, a continuación se ofrece un resumen expandido, a fin de promover la comprensión del modelo utilizado y de las vías de transducción que se propone están involucradas en la promoción de la tumorigénesis de células NIH3T3.

La transformación maligna involucra profundos cambios fenotípicos en los mecanismos de transducción de señales, que conducen a la alteración de la regulación de la replicación, la diferenciación y la supervivencia celular, así como a la modificación del entorno celular, tanto en lo que respecta a la matriz extracelular (MEC) como a la capacidad de adhesión célula-célula o célula-MEC. Todas estas alteraciones son producto de unos pocos cambios a nivel genotípico. La determinación y estudio de los cambios genotípicos involucrados en la transformación maligna promoverán un conocimiento que podrá luego ser traducido en la generación de terapéuticas racionales y dirigidas, en el corto o mediano plazo, a fin de erradicar tanto el tumor primario como su diseminación metastásica.

Ras cuenta entre las moléculas mayormente modificadas, apareciendo mutaciones de ésta en alrededor del 30% de los tumores humanos. Entre las moléculas activadas río abajo de Ras se encuentran PI3K, asociada con la inhibición de la muerte celular, Raf, involucrada en la inducción de la proliferación y la familia de RalGEFs, activadores de RalA y RalB. Aunque estas últimas proteínas no han sido tan estudiadas como las anteriores, se sabe que Ral modula el tráfico vesicular y la proliferación. Además, RalA induce la activación de RalBP1, la cual inhibe a su vez a CDC42. Esta última puede activar a p38, un

miembro de la familia MAPK involucrado en la respuesta a stress celular y en la inducción de apoptosis. Recientemente, nuestro laboratorio y otros han descrito que la actividad de RalA es imprescindible para la tumorigénesis, la adquisición de un fenotipo metastásico y el aumento en la secreción de proteasas inducidos por oncogenes. En particular, en nuestro laboratorio, en colaboración con el Dr. David Foster (CUNY) y el Dr. Larry Feig (Tufts University) se ha demostrado que la inhibición de la actividad RalA por expresión de una variante dominante negativa S28N-RalA es suficiente para abolir completamente la capacidad de inducción de tumorigénesis por la expresión de los oncogenes v-Ras, v-Raf ó v-Src.

Mucho resta por comprender en cuanto a los mecanismos por los cuales la transformación por oncogenes de las células NIH3T3 depende de una actividad RalA intacta. El objetivo en el presente trabajo de Tesis fue determinar el rol de RalA en la regulación de varios aspectos de la transformación maligna, analizando su capacidad de mediar las señales inducidas por variantes virales oncogénicas de *ras*, *raf* y *src* (v-Ras, v-Raf y v-Src) en cuanto a la regulación de la configuración del citoesqueleto, la formación de la MEC, la capacidad migratoria y la sobrevivencia celular. Para ello, se utilizó un modelo de transformación maligna por transfección estable con estos oncogenes en la línea continua de fibroblastos murinos NIH3T3 y, a fin de estudiar las vías dependientes de RalA, cotransfección o no con una variante dominante negativa de RalA, S28N-RalA.

Se demuestra que la actividad RalA es necesaria para la inhibición de la expresión de fibronectina y de su fibrillogénesis inducida por los oncogenes v-Ras, v-Raf ó v-Src. Asimismo, la desorganización del citoesqueleto de actina y

de los complejos de adhesión focal (FAC) y la desregulación de tropomiosinas inducida por los oncogenes fue revertida por la inhibición de RalA. La desorganización del citoesqueleto de actina y de los FAC inducida por los oncogenes desaparece si estas células se cultivan sobre una capa de fibronectina, sugiriendo que la unión a FN es suficiente para inducir fibras de stress (SFs) aún en el contexto de la sobreexpresión de los oncogenes. Sin embargo, la unión de la FN a su receptor integrina  $\beta 1$  demostró no ser necesaria para la formación de SFs en las células control. Asimismo, la desaparición de las SFs en células NIH3T3-v-Ras fue parcialmente revertida en presencia de inhibidores farmacológicos de MEK o PI3K o por la sobreexpresión de MKK6Eb (una variante constitutiva del activador de p38, MKK6) o V14-RhoA. La restauración de las fibras de stress y de los FAC por la inhibición de RalA dependió de las actividades p38 y RhoA, según ensayos con el inhibidor farmacológico de su actividad catalítica, SB203580, o por la sobreexpresión transiente de una mutante dominante negativa de p38 o de N19-RhoA, respectivamente. En conjunto, estos resultados sugieren que el oncogén v-Ras (y posiblemente también v-Raf y v-Src), induce la desaparición de fibras de stress en fibroblastos NIH3T3 a través de una vía que involucra la activación de RalA y la inactivación de p38, de forma paralela a la activación de PI3K y Raf y en paralelo o río arriba de Rho. Ni la expresión de los oncogenes ni la coexpresión de la dominante negativa indujeron cambios mayores en la organización de los microtúbulos. Además, se observó que la expresión de los oncogenes promovió un importante aumento de la capacidad migratoria de células NIH3T3, mientras que la coexpresión de S28N-RalA inhibió en un 50% este efecto.

Dado que la actividad RalA es necesaria para la tumorigénesis inducida por los oncogenes, se estudió si este efecto se debía a una mayor capacidad de las células transformadas para sobrevivir *in vivo*. Como era esperable, se observó que, si bien las células control mueren a los pocos días de ser inoculadas en la dermis de ratones singeneicos, la sobreexpresión de los oncogenes permitió a estas células sobrevivir y multiplicarse. En cambio, la coexpresión de S28N-RalA restauró en gran medida la muerte observada en las células control, demostrando que la actividad RalA es necesaria para la supervivencia a corto plazo *in vivo* y sugiriendo que la adquisición de resistencia a la apoptosis es un prerrequisito para la generación de tumores *in vivo*. A fin de estudiar los mecanismos involucrados en la promoción de la supervivencia celular, se realizaron ensayos *in vitro*. La expresión de los oncogenes indujo una profunda inhibición de la muerte celular inducida por privación de anclaje, privación de suero o tratamiento con cisplatino. En cambio, la inhibición de RalA por la coexpresión de la dominante negativa revirtió este efecto, demostrando que RalA es necesaria para la promoción de supervivencia por estos oncogenes. El tratamiento de privación de suero indujo en las células control un marcado aumento en el nivel de activación de p38, que fue inhibido por la expresión de los oncogenes. La coexpresión de S28N-RalA restauró la activación de p38 a niveles similares al de las células control. Más aún, la inhibición farmacológica de p38 por pretratamiento con SB203580 inhibió la muerte por privación de suero en todas las líneas celulares, demostrando la necesidad de p38 para la inducción de muerte celular inducida por privación de suero y sugiriendo que RalA podría mediar la supervivencia a través de la inhibición de la activación de p38.

En conclusión, en este trabajo se demuestran dos nuevos roles para la proteína RalA como efector de los oncogenes v-Ras, v-Raf y v-Src en fibroblastos NIH3T3: por un lado, la modulación del citoesqueleto y la matriz extracelular (con un importante efecto en la motilidad celular) y, por otro lado, la promoción de supervivencia frente a estímulos proapoptóticos, nuevos posibles blancos tumorales para la terapia contra la célula maligna.

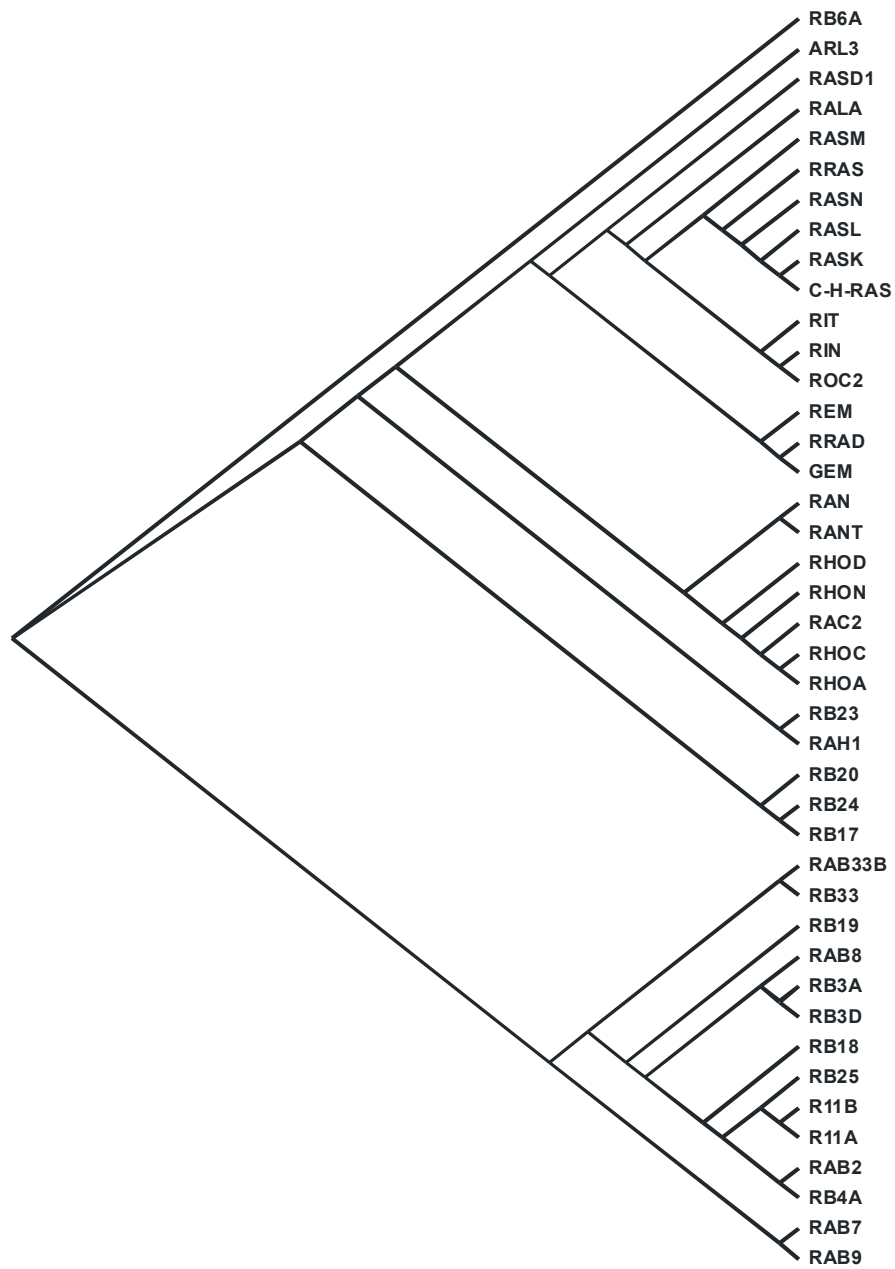
A la luz de estos resultados y en el contexto de nuevas publicaciones aparecidas durante la realización de estos estudios, se propone que RalA tendría un papel fundamental en las vías de transducción de señales involucradas en la transformación maligna, tanto de células de estirpe mesodérmica como de estirpe epitelial. RalA puede convertirse en un blanco interesante para el diseño de terapias antitumorales.

# INTRODUCCIÓN



Numerosas evidencias, tanto experimentales como clínicas, sugieren que las células tumorales se distinguen de sus pares normales en la expresión y actividad diferencial e inapropiada de moléculas involucradas en procesos celulares normales, como la proliferación, la supervivencia, la diferenciación y la migración celulares (revisado en el artículo de Hanahan y Weinberg, 1). La expresión génica está sujeta a una estricta regulación por parte de la maquinaria de señalización intracelular, y pequeñas alteraciones en los componentes moleculares de esta maquinaria pueden producir profundos cambios en el patrón de expresión proteica. El estudio de las vías de transducción de señales activadas o inactivadas en la célula maligna permitiría identificar nuevos blancos moleculares para la prevención de la transformación maligna y la intervención terapéutica sobre el crecimiento y la diseminación tumoral.

En la presente Tesis se propone una nueva vía de transducción de señales relevante para el entendimiento de la patogénesis de tumores con activación del oncogén Ras y moléculas relacionadas. Se ofrecen una introducción a las moléculas estudiadas en el contexto de la biología tumoral y una breve descripción de cada uno de los métodos experimentales utilizados. A fin de facilitar la comprensión de los resultados y dada la complejidad de la señalización inducida por Ras, la introducción no intenta describir por completo todas las vías de señalización posiblemente relacionadas, sino solamente aquellas relacionadas directamente a esta Tesis. Los resultados obtenidos en cuanto a la regulación del citoesqueleto y la motilidad celular se presentan separados de los relacionados con la respuesta a stress y supervivencia celular. Luego, a fin de juzgar más cabalmente los resultados en el contexto de las funciones conocidas de



**Figura 1 – Árbol filogenético no exhaustivo de los genes de la familia Ras en ratón, según BLAST para la secuencia de RalA de ratón, alineamiento múltiple según MACAW y filogenia según Phylip. Se utilizaron las secuencias accesibles en 2001.**



RalA, se ofrece una extensiva revisión bibliográfica que abarca sus múltiples facetas como regulador de la biología celular. Se discuten finalmente los resultados obtenidos a la luz del conocimiento actual.

## ***LA SUPERFAMILIA RAS***

### **La superfamilia Ras**

La superfamilia de GTPasas monoméricas Ras cumple un rol clave en la regulación de las funciones celulares, actuando como nodo de integración de las distintas señales, tanto intracelulares como extracelulares (2,3,4). Esta superfamilia está compuesta por decenas de proteínas, todas ellas con alta homología de secuencia (Figura 1), y se divide en dos familias, Ras y Ran (Figura 2). Los miembros de la familia Ran tienen localización nuclear y su función primordial es la de regular el transporte nucleocitoplasmático. La familia Ras, a su vez, se subdivide en las subfamilias Ras, Rho y Rab. Esta última contiene a proteínas que regulan el transporte vesicular. La familia Rho, compuesta por las proteínas Rho, Rac y CDC42 (incluyendo todas las isoformas de estas proteínas), tiene un papel fundamental en la regulación del citoesqueleto, la matriz extracelular (MEC), la adhesión y la migración. La familia Ras está compuesta por las subfamilias Ras (H-Ras, N-Ras y K-Ras), Ral (RalA y RalB) y Rap y sus funciones son variadas, desde el control del transporte vesicular hasta la replicación, la sobrevivencia, la diferenciación y la migración. Si bien cada familia de proteínas tiene funciones bien conocidas, son muchas las funciones que aún hoy se siguen descubriendo y el solapamiento de roles entre ellas es cada vez más notorio (5,6). Por ejemplo, es cada vez más evidente que la fami-

lia Rho juega un papel preponderante en la respuesta al stress celular y en el control de la sobrevivencia celular (7).

### Estructura y modo de activación

Todas estas proteínas tienen una estructura similar, conteniendo dominios estructurales muy conservados en toda la superfamilia (Figura 3A). Entre los dominios más importantes se encuentran el de unión a activadores, el de

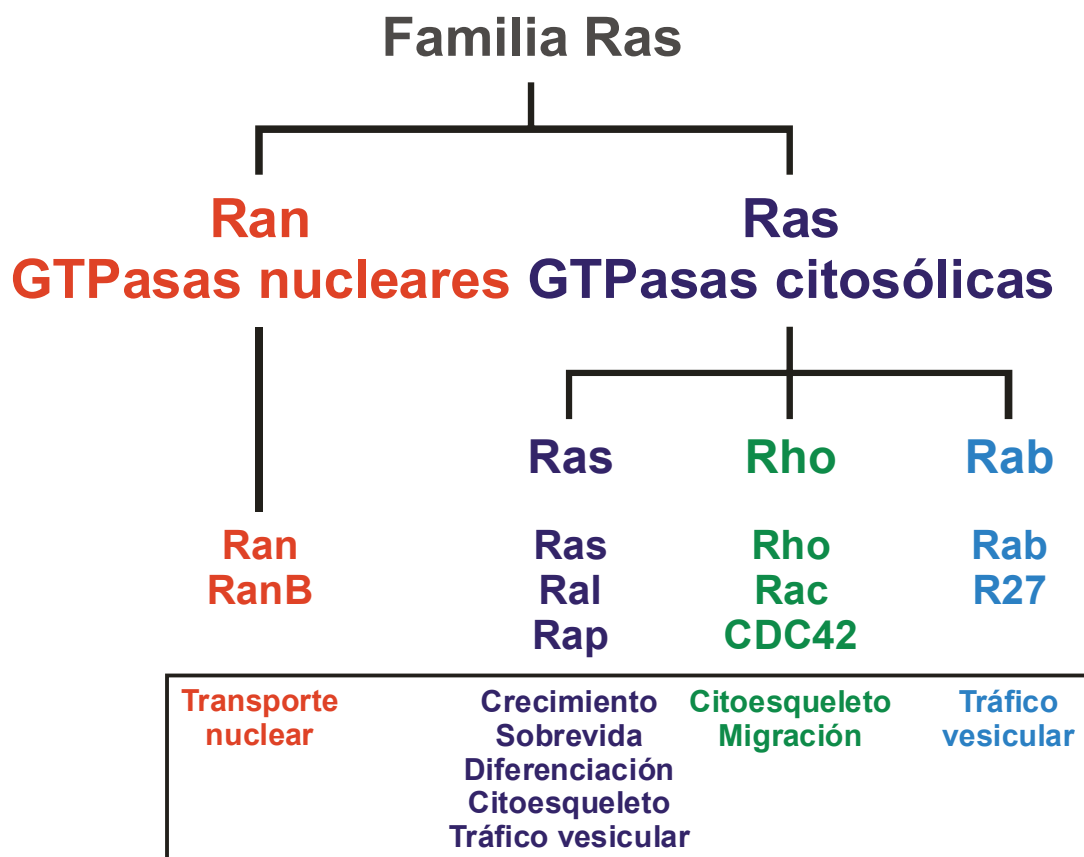


Figura 2 – Composición de la familia de GTPasas Ras. La agrupación corresponde a similitud en estructura, secuencia y función de cada miembro. Sólo se muestran algunos ejemplos de cada familia y/o subfamilia.

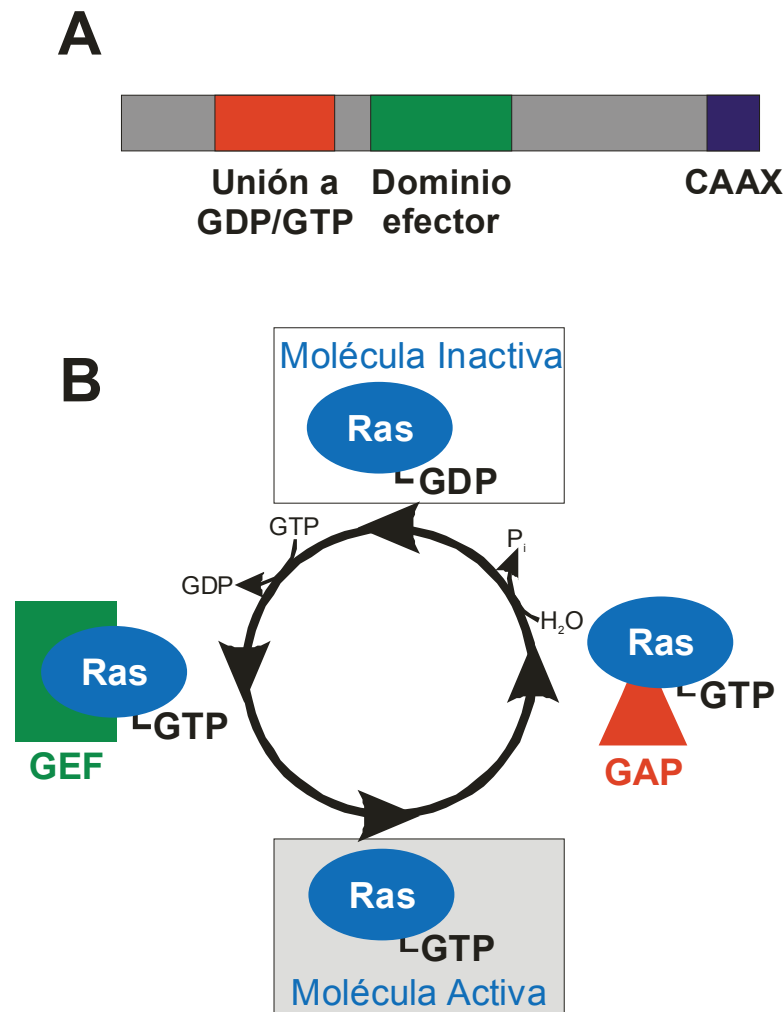


Figura 3 – A. Estructura típica de las GTPAsas de la familia Ras. Se componen de un dominio de unión a guanina, un dominio efector mediante el cual unen y modulan la activación de las moléculas de señalización río abajo de ellas y un motivo carboxi-terminal CAAX mediante el cual unen un grupo lipídico isoprenílico para su anclaje en membrana. B. Ciclo de activación (reemplazo de una molécula GDP por GTP), mediada por factores de intercambio de guanilo (GEFs), e inactivación (hidrólisis de la molécula de GTP a GDP), inducido por proteínas activadoras de la GTPasa (GAPs).

unión a GTP, el dominio efector y el dominio de farnesilación/isoprenilación (8). Tanto el dominio de unión a activadores como el de unión a efectores mantienen un patrón estructural similar en todos los miembros, pero difieren en aquellas secuencias que determinan la especificidad de unión a sus proteínas activadoras o efectoras, proporcionando de esta forma el mecanismo de especificidad de función de cada una de ellas. El dominio de farnesilación/isoprenilación es necesario para anclar estas proteínas a la membrana plasmática y se encuentra presente en toda la superfamilia, excepto en la familia Ran de GTPasas nucleares, a las que la presencia de este dominio dificultaría su localización nuclear.

Ante un estímulo, estas proteínas desplazan una molécula de GDP unida a ellas para ser reemplazada por una molécula de GTP (Figura 3B). Una vez unidas a GTP, estas proteínas se encuentran en su forma activa y son capaces entonces de unir y activar a sus proteínas efectoras. El fin de la activación es la hidrólisis de la molécula de GTP a GDP, para lo cual es imprescindible la presencia de un residuo de serina cerca del extremo amino de la proteína. A esta capacidad hidrolítica deben su nombre de GTPasas.

El mecanismo de regulación es muy parecido al mecanismo de las proteínas G acopladas a receptores serpentina o de siete pasos transmembrana. Sin embargo, éstas últimas son proteínas triméricas de mayor peso molecular, lo que les permite realizar su actividad de manera autónoma; en cambio, las GTPasas monoméricas, de sólo 21 kDa, necesitan de proteínas auxiliares para ejecutar los pasos de activación e inactivación. Estas proteínas, imprescindibles en la regulación de los procesos de transducción de señales, pueden clasi-

ficarse, según su función, en cuatro clases principales: GAPs, GDIs, GDSs y GEFs.

Las GAPs (GTPase activator proteins) son proteínas inhibitorias, que promueven la hidrólisis de la molécula de GTP y, por lo tanto, la inactivación de las GTPasas; las GDIs (guanine dissociation inhibition) actúan estabilizando la unión a GDP y, por ende, dificultando la activación; las GDSs (guanine dissociation stimulator) actúan desestabilizando la unión a la molécula de GDP; y, por último, las proteínas GEFs (guanine exchange factor) realizan el intercambio de GDP por GTP. Entonces, tanto las proteínas GDS como GEF son activadoras de las GTPasas.

### **Las vías activadas por Ras**

Ras ejerce su actividad a través de la regulación de distintos efectores. Se han encontrado al menos doce efectores de Ras hasta el momento (3). Tres de ellos son los que más se han estudiado: Raf, PI3K y RalGDS. Si bien el solapamiento de actividades de estas proteínas es notable, Raf, a través de la activación de la vía MEK/Erk, está descrita como un inductor fundamental de la replicación y la diferenciación celulares; PI3K, por medio de la activación de PDK1/Akt es conocido como promotor de la supervivencia celular y RalGDS, a través de la activación de RalA y RalB, como regulador del transporte vesicular y de la replicación celular. Un sencillo esquema de las moléculas nombradas se muestra en la Figura 4A. Un interesante modelo ampliamente utilizado para demostrar los roles de cada una de estas vías en la señalización río abajo de

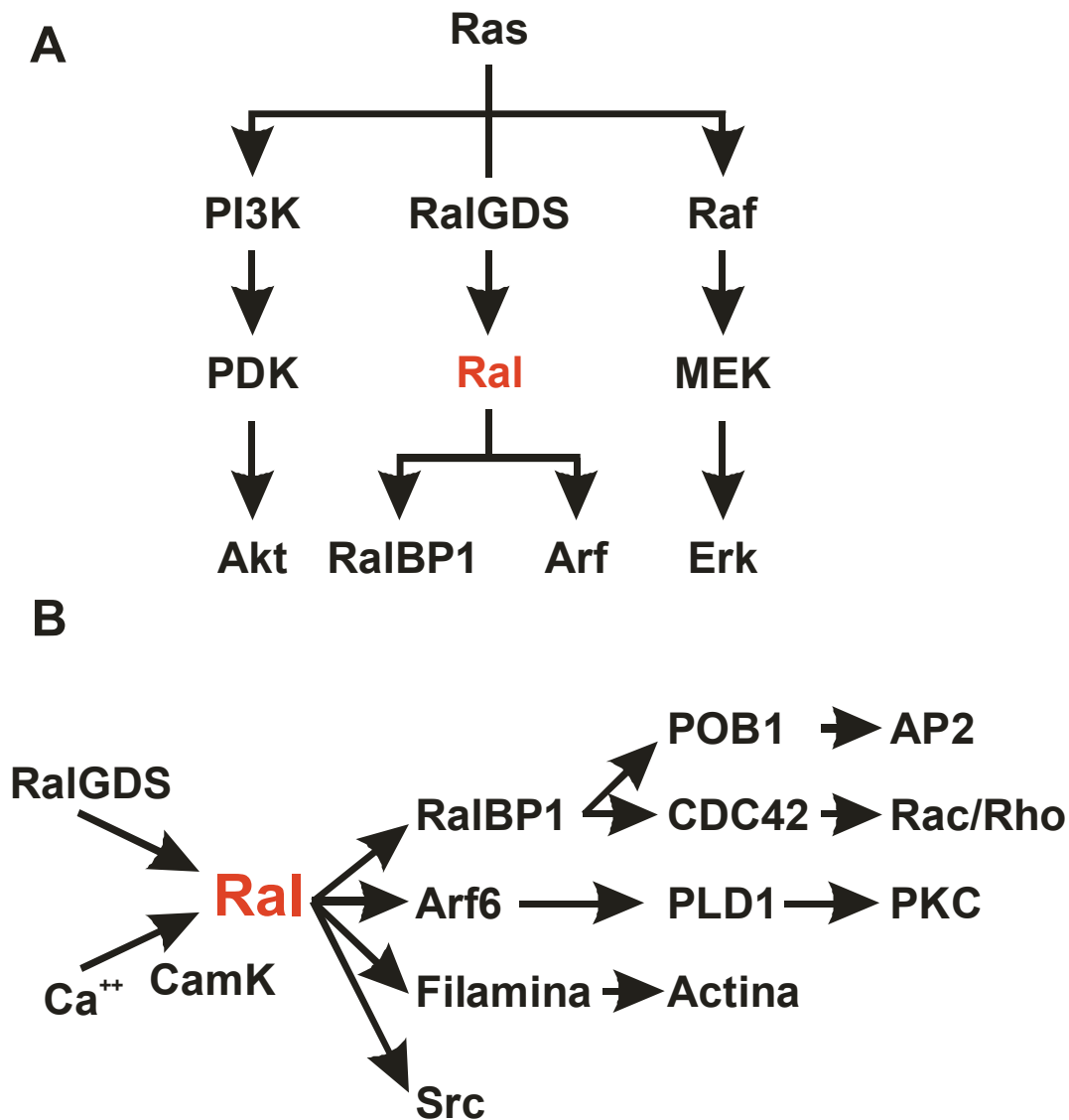


Figura 4 – A. Principales vías de señalización inducidas por Ras. La unión de GTP por Ras permite a esta GTPasa unir y activar diversos efectores río abajo. Entre ellos, la subunidad reguladora de PI3K, las quinasas de treonina y serina Raf y varios factores GEF específicos para las GTPasas RalA y RalB. B. Posición de Ral en las vías de transducción de señales. Se muestran algunos activadores y vías reportadas activadas por Ral.

Ras es un grupo de mutantes de Ha-Ras constitutivamente activas (Ha-RasV12) que además contienen diferentes mutaciones en el sitio efector que las convierten en activadores selectivos de una sola de estas tres vías (9).

### **La subfamilia Ral. Su lugar en la red de transducción de señales**

Se presenta aquí una breve descripción de los mecanismos de señalización dependientes de Ral. Una detallada revisión del tema se ofrece más adelante en la Discusión. La subfamilia Ral está compuesta por dos proteínas, RalA y RalB, productos de dos genes distintos en los loci 7p14.1 y 2cen q13, respectivamente (10,11). La expresión de tanto RalA como RalB es ubicua, con mayor intensidad en cerebro, testículos y ovarios (12,13). Ral puede encontrarse en *Drosophila* y *Echinococcus* (14), pero no en levaduras (15). Son GTPasas pertenecientes a la familia Ras y activadas por los GEFs RalGDS, Rgl1, Rgl2 y Rlf. Estas últimas proteínas son efectores directos de Ras e inducen el intercambio de GDP por GTP y la activación de RalA y RalB (16,17). Una vez activadas, RalA y RalB translocan a membrana y son capaces de unirse a sus efectores, entre los cuales se cuentan RalBP1, Arf6 y filamina (Figura 4B). Filamina está involucrada en la morfología celular y la estabilización del citoesqueleto y en señalización intracelular (18,19,20). Cuando RalA se une a Arf6, este dímero es capaz de unir y activar PLD1 (21,22), una fosfolipasa específica de fosfatidilcolina, la cual hidroliza esta molécula a ácido fosfatídico y colina (23). El ácido fosfatídico es sustrato, a su vez, para la enzima PAP (ác. fosfatídico fosfatasa), siendo hidrolizado a diacilglicerol (DAG) y ortofosfato. El DAG así generado puede activar a las isoformas clásicas y nóveles de PKC (23). RalBP1, el tercer efector de Ral, es una GAP específica para CDC42 y, en me-

nor medida, Rac (24). Estas GTPasas pertenecientes a la familia Rho regulan el citoesqueleto, la respuesta al stress celular y la inducción de apoptosis (25,26). RalBP1 también promueve la endocitosis de receptores de membrana (27), posiblemente mediante la unión a Reps1 (28), POB1 (29), la cadena  $\mu$ 2 del complejo AP2 (30) o Arip2 (31,32).

Aunque se conocen en detalle algunos de los mecanismos moleculares río abajo de Ral, aún no se sabe el significado biológico de estas relaciones. Por ejemplo, Ral es capaz de inducir, por mecanismos aún desconocidos, la activación de NF- $\kappa$ B (33) y de AP1 (34,35,36) y la fosforilación de miembros de la familia Forkhead (37,38), todos ellos factores de transcripción involucrados en múltiples procesos celulares, particularmente la regulación de la sobrevivencia y el control de la proliferación celular. Asimismo, Ral puede ser activado de forma independiente de Ras, por un aumento de la concentración de calcio intracelular, posiblemente a través de la unión a calmodulina (39,40,41,42) (Figura 4B).

### ***MIGRACIÓN E INVASIÓN***

El movimiento celular comienza en los primeros estadios del desarrollo embrionario y continúa en toda la vida adulta. Muchos tipos celulares deben viajar de un lugar a otro a fin de cumplir sus roles. Las células stem deben migrar hacia donde se necesita una generación de nuevas células, los componentes del sistema inmune deben migrar hacia los sitios de inflamación, etc. Para ello, la célula debe ser capaz de reconocer distintos sustratos a fin de utilizarlos como guía, degradar la matriz extracelular que bloquee su recorrido y, finalmente, cambiar constantemente su morfología para lograr el movimiento. Ello lo logra generando fuertes sitios de unión a la matriz extracelular en el frente de



avance celular, ya sea a través de un lamelipodium o de filopodia (revisado en 43,44). A partir de estos sitios de unión, genera luego la polimerización de actina capaz de proveer la fuerza de tensión suficiente para mover el citoplasma. Esta tensión se logra por la activación de las miosinas que son las encargadas de generar la contracción de las fibras de actina. En la cola de la célula, los sitios de anclaje son degradados y la actina depolimerizada. Estos ciclos de polimerización y depolimerización se renuevan constantemente, proporcionando la fuerza motriz necesaria para el movimiento migratorio e implica la capacidad de la célula de adherirse al medio externo y, al mismo tiempo, despegarse de él. Para ello, utiliza receptores de matriz extracelular (integrinas, ver abajo) y proteasas, capaces de degradar la matriz circundante. Entre las proteasas más importantes para la migración e invasión celulares, se cuentan la familia de las metaloproteasas (MMPs) y el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA). Los roles de estas moléculas se han publicado ampliamente (45,46,47).

### ***LA MATRIZ EXTRACELULAR***

La célula depende de un entorno favorable para su existencia. Este entorno está compuesto por las células adyacentes, moléculas solubles cercanas y un lecho proteico que envuelve a la célula denominado matriz extracelular (MEC). Los componentes moleculares de esta matriz varían según la localización, el tipo de célula al que envuelven y los tipos celulares adyacentes. Los principales componentes de la MEC son los colágenos, la fibronectina, la vitronectina y los proteoglicanos (48). Estas proteínas, casi todas ellas fibrilares, forman un tejido que no sólo provee un soporte físico a la célula sino que también cumple importantes roles biológicos, desde la unión y regulación de facto-

res de crecimiento hasta la unión directa a receptores en las membranas plasmáticas (principalmente, de la familia de las integrinas). La célula está constantemente recibiendo señales provenientes de la MEC, lo que resulta en respuestas biológicas correspondientes, que varían desde el crecimiento hasta el arresto o apoptosis. La MEC es asimismo imprescindible para la formación y mantenimiento de la morfología y la motilidad celulares.

La MEC es un ambiente en constante renovación y cambio, sostenido por la constante secreción de componentes de la matriz por parte de los distintos tipos celulares y por la acción continua de proteasas como las MMPs y uPA, anteriormente mencionadas (48). Estas proteasas, además de promover el recambio continuo de la MEC, son el medio para la liberación de distintos factores de crecimiento presentes en la MEC y retenidos por ésta. Por último, fragmentos de proteínas de la matriz extracelular pueden tener acciones distintas a las del componente entero.

### ***EL CITOESQUELETO***

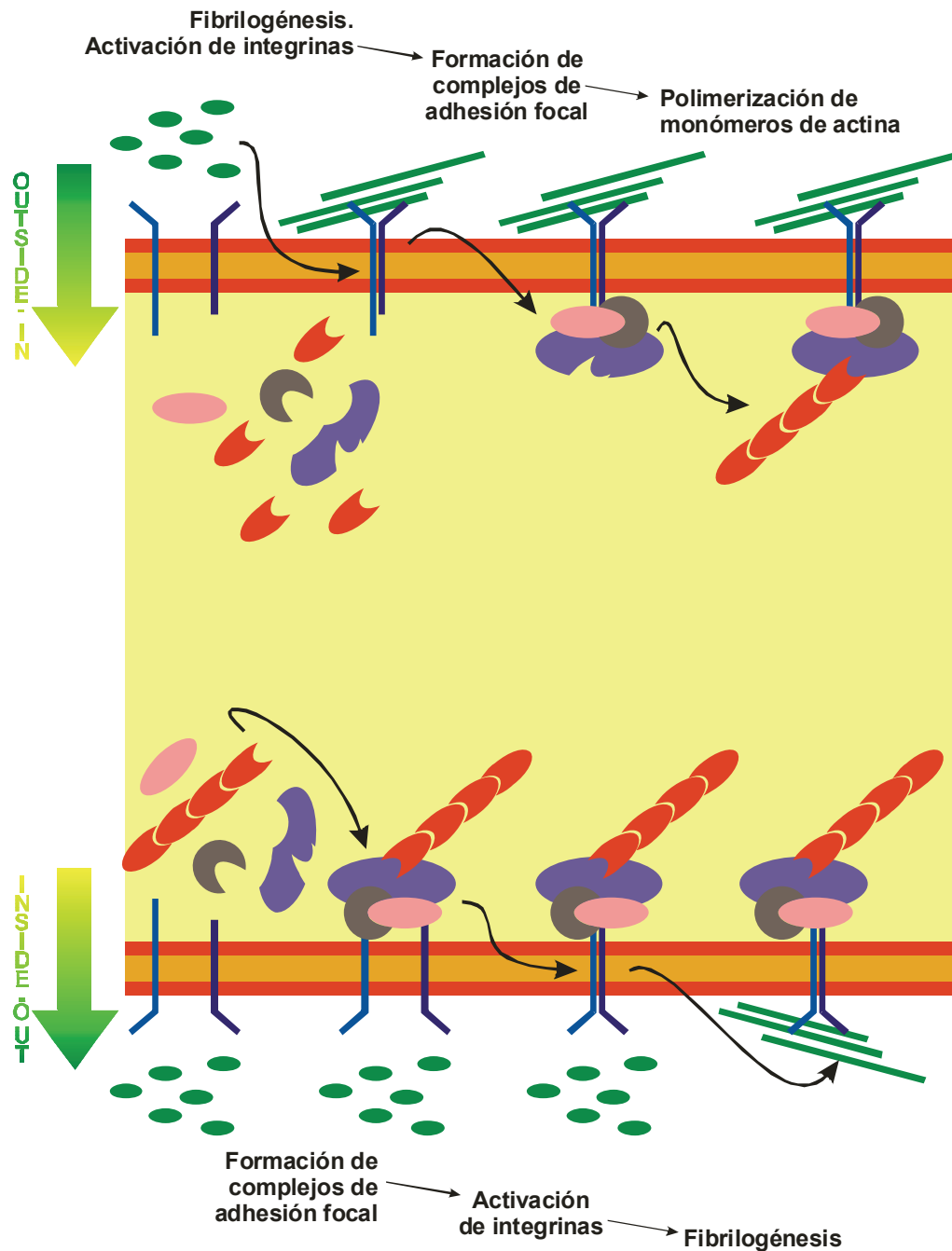
La generación y mantenimiento de la morfología celular es imprescindible para la función celular. Las distintas formas que puede adoptar una célula quedan determinadas por un sistema proteico denominado citoesqueleto. Este consta de varias “redes” de proteínas: los microtúbulos (formados principalmente por polímeros de tubulina), los microfilamentos (constituidos mayoritariamente por polímeros de actina) y los filamentos intermedios (dependiendo del tipo celular, formados por citoqueratinas o vimentinas).

Cada uno de estos componentes del citoesqueleto cumple además roles específicos. Los microtúbulos son indispensables para el tráfico vesicular y pa-

ra la división mitótica. Los haces de actina proveen el soporte estructural básico y la fuerza de tensión para el mantenimiento básico de la morfología, así como para la formación de proyecciones (filopodia o lamellipodia) y la migración. Microtúbulos y microfilamentos están ambos altamente regulados por los complejos de transducción de señales y su generación es dinámica, formándose y desarmándose constantemente para cumplir sus roles en la fisiología celular (49).

### **Mecanismos de regulación de la polimerización de actina**

La célula interactúa con la matriz extracelular principalmente a través de los receptores de tipo integrina. Esta interacción induce el agrupamiento de integrinas y la formación de acúmulos en la membrana plasmática. Las integrinas son receptores heterodiméricos, formados por una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$ . Existen decenas de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  y es la combinación de ambas subunidades lo que define a la integrina. Si bien ambas subunidades son necesarias para la selectividad de unión a componentes de la matriz, es la subunidad  $\beta$  la responsable de la transducción de señales. En cultivos bidimensionales, los acúmulos de integrinas inducidos por la unión a componentes de la MEC reclutan a su vez otras moléculas, entre ellas vinculina, para formar los denominados complejos de adhesión focal (FACs) (84). En matrices 3D, los sitios de adhesión serían ligeramente diferentes (50). Estos complejos son los puntos de inicio para la polimerización de actina G a actina F y la formación de fibras de stress (51). A su vez, puede producirse el mecanismo opuesto (mecanismo “inside-out”, en contraposición con el mecanismo anterior, “outside-in”),

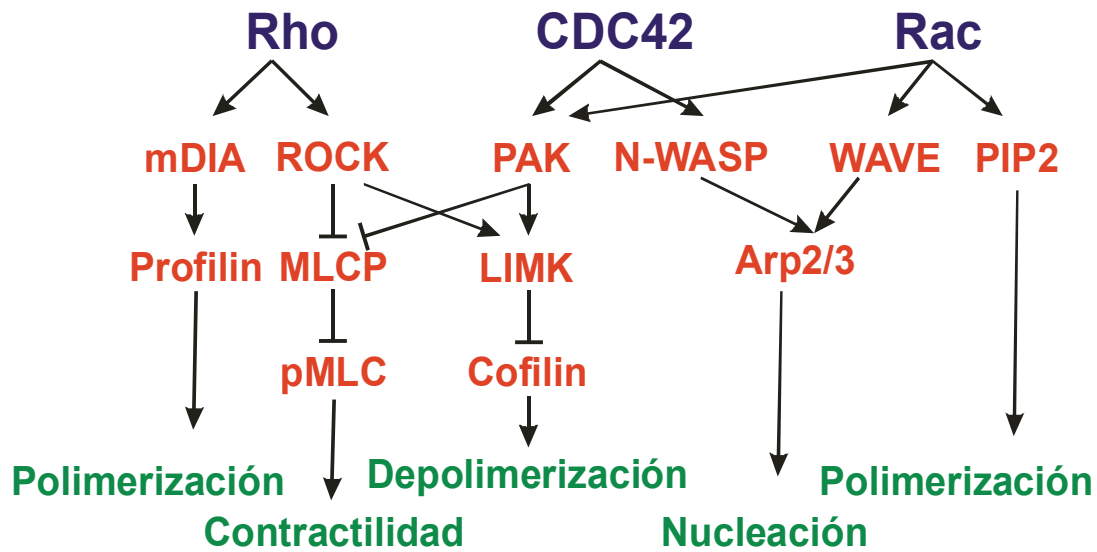


**Figura 5 – Activación de las integrinas, formación de las fibras de stress y fibrillogénesis. Mediante el mecanismo “outside-in”, las fibrillas de FN inducen la activación de las integrinas, la formación de complejos de adhesión focal y la polimerización de actina. Por el contrario, mediante el mecanismo “inside-out”, las fibras de stress de actina y vías de transducción activan a las integrinas, que luego serán las responsables de promover la polimerización de FN en fibrillas.**

es decir, que la polimerización de actina induce la formación de FACs, los cuales activan a las integrinas (52,53). Estas integrinas inducen entonces la fibrillogénesis, o formación de fibrillas de FN. Estos mecanismos se muestran de forma esquemática en la Figura 5.

La polimerización y depolimerización de la actina F es dinámica, y este intercambio entre los estados polimerizados y depolimerizados son los que permiten a la célula los cambios en su morfología y la capacidad de migrar e invadir (25,54). La formación de fibras de stress en los frentes de avance, la contracción en el citoplasma y la depolimerización en la parte trasera de la célula proveen el anclaje y la fuerza necesaria para el movimiento hacia adelante de la célula.

La familia Rho de GTPasas monoméricas está íntimamente involucrada en la regulación de la polimerización de actina. Esta familia consta de cerca de una decena de miembros, entre los cuales los más estudiados son RhoA, Rac1 y CDC42. RhoA es quizás el regulador más importante de la generación y mantenimiento de fibras de stress, ya que induce la tensión necesaria en las fibras para su estabilización (a través de la vía ROCK/MLCP/MLC) e inhibe la depolimerización de actina inducida por cofilina (a través de la ROCK/LIMK) (55) (Figura 6). Rac1 promueve la formación de lamellipodia (55). Estas estructuras sirven de punto de inicio para la generación *de novo* de fibras de stress desde los sitios de anclaje (56,57). Para ello, Rac1 activa la nucleación de actina mediada por el complejo Arp2/3 a través de WAVE y la remoción de la “tapa” de los extremos libres de las fibras de stress a través de la activación de PI-4P-5K y la generación de PIP<sub>2</sub> (55). CDC42 también puede promover la formación de



**Figura 6 – Las principales vías de transducción que regulan la polimerización de actina y la estabilidad de las fibras de stress. Rho, Rac y CDC42 pertenecen a la familia Rho de GTPasas monoméricas, descrita previamente.**

fibras de stress a través de la inducción de filopodia. El mecanismo consistiría en la activación del complejo Arp2/3 a través de N-WASP (55). Tanto Rac1 como CDC42 inducen la activación de PAK1, que a su vez promueve la fosforilación de MLC y, por ende, la tensión y estabilización de las fibras de stress de manera similar a RhoA. PAK1 es capaz asimismo de inducir la fosforilación e inactivación de cofilina (56).

Una vez formadas las fibras de stress son estabilizadas a través de entrecruzamientos entre ellas. Dos moléculas serían los principales responsables de esta actividad, filamina y  $\alpha$ -actinina (58,59). Asimismo, caldesmon serviría como entrecruzador de actina y miosina (60), aunque inhibiría la contractilidad de manera dependiente de  $\text{Ca}^{++}$ /Calmodulina (61,62). Otra forma de promover

la estabilización de los polímeros de actina es por medio de la inhibición de su degradación. Las tropomiosinas (63) son una familia de proteínas que impiden la actividad depolimerizadora de ADF/cofilina (64) y gelsolina (65). Además, las tropomiosinas unen tropomodulinas en el sitio barbado de actina y de este modo promueven la estabilización de las fibras de stress (66).

## ***LA TRANSFORMACIÓN MALIGNA, TUMORIGÉNESIS Y CASCADA***

### ***METASTÁSICA***

El cáncer es una enfermedad genética. Anormalidades en un subconjunto de genes involucrados en la regulación del comportamiento celular provocan un crecimiento exacerbado, generalmente de origen monoclonal, de un tipo celular (67,68). El origen clonal del cáncer se debe a la aparición, al azar, en una única célula, de las primeras mutaciones que favorecen el crecimiento o inhiben la muerte celular. Asimismo, suelen observarse mutaciones en los mecanismos de respuesta al daño en el DNA, las cuales son las responsables de la heterogeneidad tumoral. Esta célula entonces, debido a las mutaciones adquiridas, comienza a proliferar y da origen a una pequeña masa cuyos componentes celulares podrán adquirir progresivamente nuevas mutaciones. Aunque de origen clonal, un tumor es, sin embargo, altamente heterogéneo. Esto se debe a que, luego de la aparición de las mutaciones originales, y debido a la falla en los mecanismos de respuesta al daño en el DNA, las distintas células que derivan de la célula original seguirán también proliferando y mutando, por lo que, en conjunto, un tumor contiene unas pocas mutaciones compartidas y varias otras dispersas por distintos grupos de células. De esta forma, aunque un tu-

mor es de origen clonal, es una masa celular con alta variabilidad. Un tumor puede pensarse como un pequeño sistema evolutivo acelerado, donde las células que adquieren mutaciones letales no prosperan, mientras que las células que adquieren mutaciones que promueven el crecimiento o la supervivencia crecen e imponen estas mutaciones, generando una población mutante.

Los genes involucrados en la tumorigénesis pueden clasificarse en dos grandes grupos, denominados protooncogenes y genes supresores de tumores (67,68). Los primeros son genes cuyos productos proteicos están involucrados en la promoción del crecimiento celular o en la inhibición de la apoptosis. Mutaciones en estos genes que provocan la sobreexpresión o hiperactivación del producto de traducción son capaces de inducir un crecimiento de la masa celular con una menor dependencia de señales de crecimiento exógenas. Cuando un protooncogén contiene mutaciones de este tipo se denomina oncogén. El producto de un gen supresor de tumores (o, simplemente, gen supresor), en cambio, tiene la función de inhibir el crecimiento, inducir la muerte celular o promover la diferenciación; mutaciones inactivantes en estos genes tienen un efecto similar a la activación de un protooncogén, ya que las células dejan de responder a señales inhibitorias del crecimiento y, por ende, dejan a la célula libre de proliferar y sobrevivir en condiciones en que normalmente no lo haría.

Sin embargo, una sola mutación es insuficiente para generar un tumor maligno. La célula contiene múltiples mecanismos de regulación que impiden la transformación maligna a la primera mutación; es necesaria una acumulación de diversas mutaciones para la aparición de un tumor maligno. Aún así, los tumores contienen algunos mecanismos de regulación activos o, al menos, acti-



vables. Así, las células tumorales son capaces de sobrevivir y proliferar en condiciones en las que una célula normal no lo haría, pero de ninguna manera se vuelven completamente independientes de su entorno.

### **La transformación *in vitro***

Aunque el término “transformación” puede utilizarse para nombrar cualquier modificación en el patrón de comportamiento celular, el concepto de “transformación celular” suele estar íntimamente relacionado con el de “transformación maligna”. Con éste, se resume un conjunto de modificaciones celulares, entre las que se incluyen aumentos en la tasa de crecimiento celular, la inhibición de la muerte, una motilidad incrementada, cambios radicales en la estructura de la matriz extracelular, etc. (1,67).

Ensayos *in vitro* de los cambios enumerados se utilizan para intentar predecir la capacidad tumorigénica de un tipo celular. Asimismo, se utilizan rutinariamente en el laboratorio a fin de determinar los mecanismos de regulación del crecimiento y supervivencia celular. Es posible evaluar cambios en la tasa de crecimiento (tiempo de replicación), resistencia a tratamientos proapoptóticos, cambios en la motilidad celular o en la capacidad invasiva, habilidad de crecer en suspensión o en agar blando y muchos otros parámetros. Sin embargo, ninguno de estos parámetros por sí solo es útil para determinar la capacidad tumorigénica de una célula; es el conjunto de todos los cambios el que importa para entender los diversos mecanismos y el único ensayo final y necesario para determinar la capacidad tumorigénica de una línea celular es el desarrollo de tumores como consecuencia de la inoculación de las células en animales.

Los ensayos de transformación celular tienen una amplia historia en la biología celular y tumoral. Ya a principios del siglo XX, Rous demostró la existencia de una actividad transformante en el Virus del Sarcoma de Pollo (69). Esta actividad fue descrita como *v-src* y hoy se sabe que *v-src* es un oncogén con alta homología con un protooncogén celular, *c-src* o simplemente *src*. Para una revisión actualizada de la actividad de este oncogén, ver (70). Muchos otros oncogenes virales se han encontrado y han sido ampliamente utilizados para el estudio de la transformación celular y de las vías de transducción de señales reguladas por éstos o por sus ortólogos celulares. Entre ellos, se cuentan *v-ras*, *v-raf*, *v-myc*, *v-erb*, etc. (67,68).

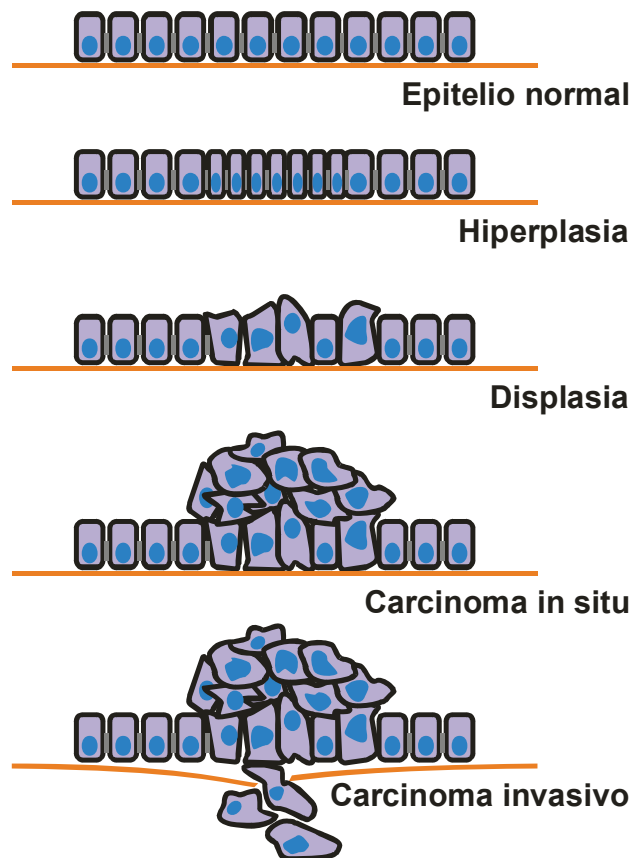
## **Tumorigénesis**

Desde los primeros eventos de transformación celular hasta la formación de un tumor maligno, las células deben sufrir diversos cambios genéticos y epigenéticos. Histológicamente, un tumor puede clasificarse en grados, dependiendo del avance de la transformación. Dado que alrededor del 80% de los tumores en adultos son de origen epitelial (71), se conoce mucho más a fondo la evolución de los carcinomas, de origen epitelial, que la evolución de tumores de otros orígenes tisulares. Sin embargo, la tasa varía enormemente en tumores pediátricos (71), apareciendo sólo cerca del 20% de tumores de origen epitelial y siendo preponderantes los tumores de origen mesenquimático. El entendimiento de la etiología y la biología de los tumores de origen mesenquimático es fundamental para la generación de nuevas terapias dirigidas a los mismos en forma específica (72).

Debido a la falta de una descripción acabada de la progresión maligna de sarcomas de tejidos blandos, se describe la progresión de tumores sólidos epiteliales a fin de proveer una base conceptual de los mecanismos de tumorigénesis. El primer grado histopatológico en un tumor sólido epitelial se denomina hiperplasia celular y consiste en un incremento anormal del contenido celular en un tejido. Una hiperplasia puede derivar luego en una displasia, el segundo grado histopatológico, que consiste en la observación de células con una morfología diferente a la morfología normal observable en las células vecinas. Estos cambios en número y morfológicos son producidos por las primeras mutaciones y no implican un riesgo inmediato para el huésped. Una característica común de estas etapas es una alta tasa de proliferación acompañada por una importante apoptosis, por lo que el balance de crecimiento neto es aún lento. La siguiente etapa en el proceso tumorigénico es el carcinoma in situ. Ya las células poseen una gran tasa proliferativa con una menor muerte celular, la tasa de crecimiento neta es alta y la independencia del medio externo está incrementada. En este momento la masa tumoral sobrepasa la capacidad de irrigación del tejido, por lo que se genera un estado de hipoxia tumoral; cambios genéticos o epigenéticos adquiridos por las células tumorales inducen el proceso de angiogénesis, mediante el cual se forman nuevos vasos que irrigan el tumor (1,67). Finalmente, las células tumorales adquieren nuevos cambios que permiten invadir y crecer en el tejido adyacente; cambios en las moléculas de adhesión, proteasas y componentes de matriz extracelular son los responsables de una reorganización del tejido circundante a fin de permitir la motilidad, el crecimiento y la supervivencia por fuera de su sitio de origen (1,67,68). El au-

mento de la capacidad motriz implica asimismo una desregulación y un aumento de la tasa de recambio del citoesqueleto (73,74,75).

Una característica adicional imprescindible para la tumorigénesis y que puede aparecer en cualquiera de estas etapas es la adquisición de la capacidad de proliferar indefinidamente (inmortalidad celular); ninguna célula somática normal puede replicarse ilimitadamente, ya que cada replicación del genoma

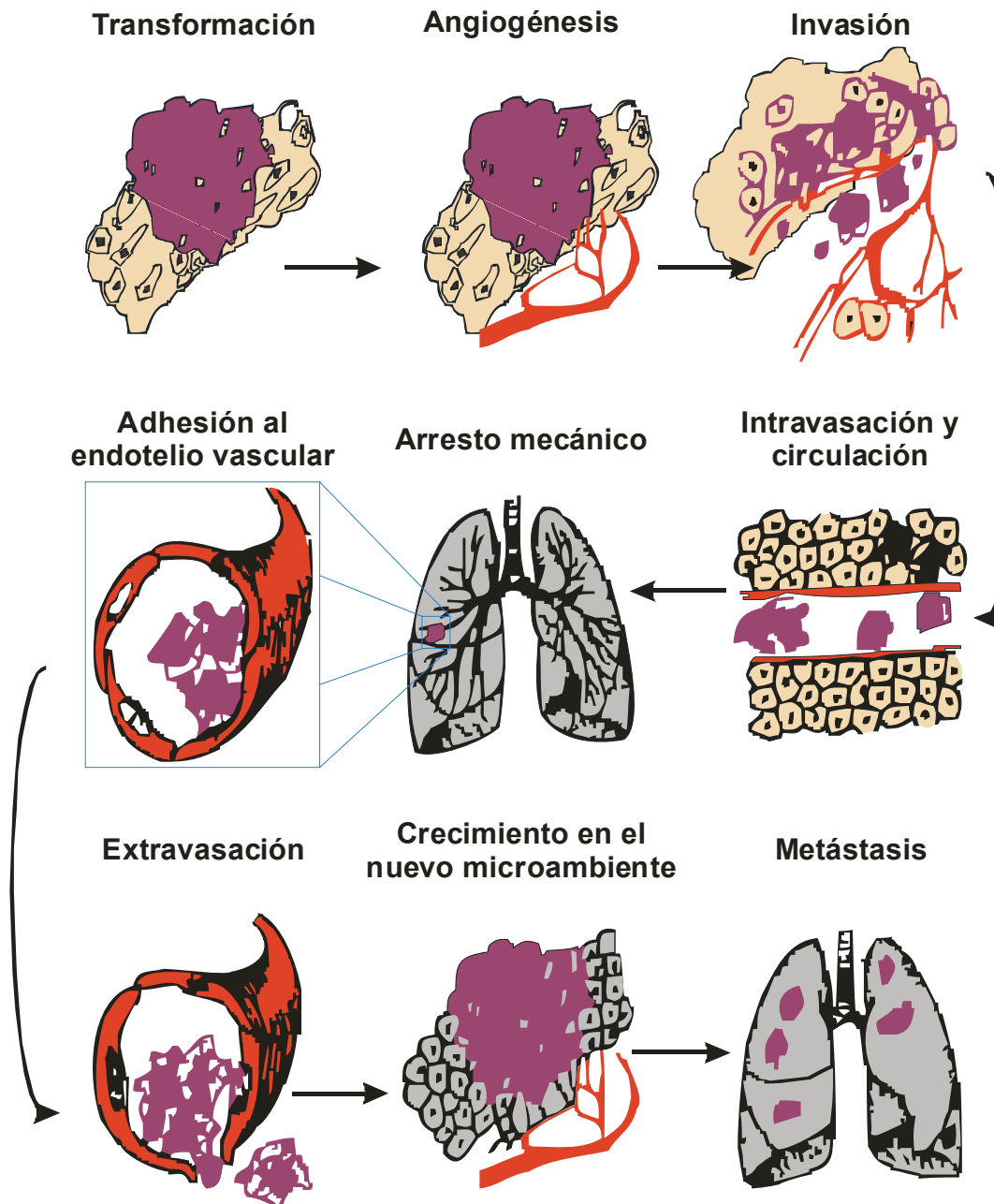


**Figura 7 – Etapas de la transformación maligna en un epitelio**

tiene como efecto una disminución del tamaño de los telómeros (76); las células tumorales adquieren esta capacidad a través de la activación de la telomerasa, un complejo de ribonucleoproteínas capaz de regenerar los telómeros en cada replicación (77). Un ejemplo de las distintas etapas de la transformación maligna de un epitelio se muestra en la Figura 7.

### **La formación de metástasis**

El término clínico para el tumor original es el de tumor primario. Este puede traer al paciente una serie de manifestaciones clínicas importantes pero, salvo contadas excepciones, no es un serio reto a la vida del mismo. Es la aparición de metástasis, o crecimiento de células tumorales en órganos distantes, la mayor preocupación clínica. Las metástasis se forman por la aparición y crecimiento de células derivadas del tumor primario en diversos órganos. Este es un proceso que implica numerosas etapas y adquisición de características dinámicas que les permitan llevar a cabo cada uno de los pasos necesarios (esquematizado en la Figura 8). Las células tumorales deben penetrar los vasos sanguíneos o linfáticos mediante un proceso denominado intravasación, viajar con el flujo por el cuerpo y detenerse en un capilar río abajo. Deben luego extravasarse, es decir, atravesar nuevamente la pared del vaso sanguíneo o linfático, para colonizar el nuevo tejido y, finalmente, ser capaces de sobrevivir en el nuevo ambiente, proliferar y promover un nuevo proceso angiogénico que le permita el flujo de nutrientes necesario para la formación de las metástasis o tumor secundario.



**Figura 8 – Eventos del proceso de la diseminación metastásica.** La célula tumoral degrada y atraviesa la membrana basal a fin de invadir el estroma circundante. Luego, traspasa el endotelio e ingresa al torrente sanguíneo o linfático y viaja en circulación hasta arrestarse en un capilar. Allí, cruza nuevamente el endotelio y accede al nuevo tejido. En el nuevo microambiente, la célula tumoral debe ser capaz de sobrevivir y crecer para formar un tumor secundario o metástasis.

A nivel molecular, para la formación de metástasis es imprescindible la modificación de las moléculas de adhesión, es decir, separarse del tejido original, unirse y desligarse de la pared de los vasos, ser capaz de unir la matriz del órgano blanco, etc.; el aumento de la secreción de proteasas como uPA y MMPs, a fin de permitir la intra- y extravasación, la emigración del tejido original y la introducción en el órgano blanco; la inducción de la capacidad motriz, ya que sin ella la célula sería incapaz de alcanzar nuevos tejidos; y la secreción de factores de crecimiento, angiogénesis y supervivencia, de manera de poder sobrevivir y proliferar en el nuevo microambiente (1,67,68).

## **SARCOMAS**

Los sarcomas son tumores derivados de células mesenquimáticas, y pueden clasificarse principalmente en dos tipos: tumores derivados del hueso (osteosarcomas) y tumores no óseos (sarcomas de tejidos blandos) (78). La aparición de sarcomas se asoció de forma temprana a distintos tipos de predisposición familiar, entre los que se encuentra el síndrome de Li-Fraumeni, debido a la mutación en la línea germinal de *p53*. Otros desórdenes comúnmente asociados a la aparición de sarcomas son la ausencia de *nf1* ó la inactivación de *rb* en pacientes sobrevivientes de retinoblastoma infantil. Además, la posibilidad de aparición de sarcomas se incrementa enormemente en los pacientes que han recibido radiación ionizante como tratamiento para otro tumor previo y en los pacientes con inmunosupresión importante debido a un trasplante o HIV (sarcoma de Kaposi).

La principal caracterización de los sarcomas de tejidos blandos se basa en la histología. Si bien por medio de la histología puede determinarse el origen

de los tumores con alto grado de diferenciación celular, en la práctica clínica, los tumores menos diferenciados han probado ser muy difíciles de caracterizar. Ello es importante debido a la gran diferencia en la colonización de ganglios regionales en los distintos tipos de sarcomas. Las metástasis originadas son en su mayoría pulmonares y la supervivencia promedio luego del diagnóstico de metástasis es cercana al año (79). El tratamiento de las metástasis es tan urgente como ineficaz. Las drogas más efectivas, doxorubicina o ifosfamida, no superan el 20% de eficacia (80). Por ello, el desarrollo de nuevas terapias dirigidas a las vías de señalización involucradas en la tumorigénesis de la célula mesenquimática es imprescindible a fin de mejorar el tratamiento de los pacientes con sarcoma de tejido blando. En particular, inhibidores de receptores tirosina quinasa como el imatinib probaron ser eficaces en el tratamiento de tumores del estroma gastrointestinal (81) y del dermatofibrosarcoma protuberans metastásico (82,83).

### ***CAMBIOS EN LA MATRIZ, EL CITOESQUELETO Y LA MOTILIDAD CELULAR EN LA TRANSFORMACIÓN MALIGNA***

La MEC y el citoesqueleto sufren importantes cambios durante la transformación celular (84,85). Dependiendo del tipo celular, distintos componentes de matriz extracelular pueden aumentar o disminuir y el citoesqueleto puede organizarse de distintas maneras. Asimismo, la secreción de proteasas capaces de remodelar la MEC está en la mayoría de los casos aumentada. La transformación celular induce profundos cambios en la dinámica de la polimerización y depolimerización de fibronectina (FN), siendo el estado de equilibrio llevado



hacia uno u otro extremo, dependiendo del tipo celular y de los cambios genotípicos y fenotípicos involucrados. En fibroblastos, suele observarse que la transformación celular induce una marcada disminución de la cantidad y tamaño de las fibras de stress y de la expresión de fibronectina (84), mientras que en ciertas células de carcinomas mamarios ocurre lo opuesto (86). Estas alteraciones están inducidas principalmente por cambios en los niveles de actividad de los miembros de la subfamilia Rho de GTPasas monoméricas (51,87) y las vías de transducción de señales río abajo de éstas. El grado de polimerización de actina depende de un balance entre las moléculas inductoras de la polimerización y de sus opuestas, moléculas que inhiben la polimerización o que inducen su depolimerización. La activación e inactivación de miembros de la familia Rho pueden inducir tanto un aumento como una disminución de la capacidad invasiva de la célula tumoral, dependiendo de la estirpe que se trate (74).

Se conoce que Ras induce la desaparición de las fibras de stress por varios mecanismos. Uno de ellos es la inhibición de la actividad quinasa de ROCK (88,89), una serino-treonin quinasa río abajo de Rho e inductora de fibras de stress (90). Además, Ras inhibe la expresión de tropomiosinas (TM-1 ó TM-2, dependiendo del tipo celular) y la reexpresión de estas moléculas es suficiente para inhibir la transformación inducida por Ras ó Src (75,91,92,93).

### ***PROLIFERACIÓN Y SOBREVIDA***

Los tumores malignos son esencialmente una acumulación celular de origen clonal, aunque sumamente heterogénea en cuanto a las propiedades de las células que lo componen. El crecimiento o división celular es imprescindible,

aunque en la mayor parte de los casos, insuficiente. Si bien la célula tumoral contiene todos o al menos la gran mayoría de los genes necesarios para la inhibición del crecimiento, la inducción de apoptosis o de diferenciación celular, es, sin embargo, incapaz de regular estos procesos de manera adecuada (78).

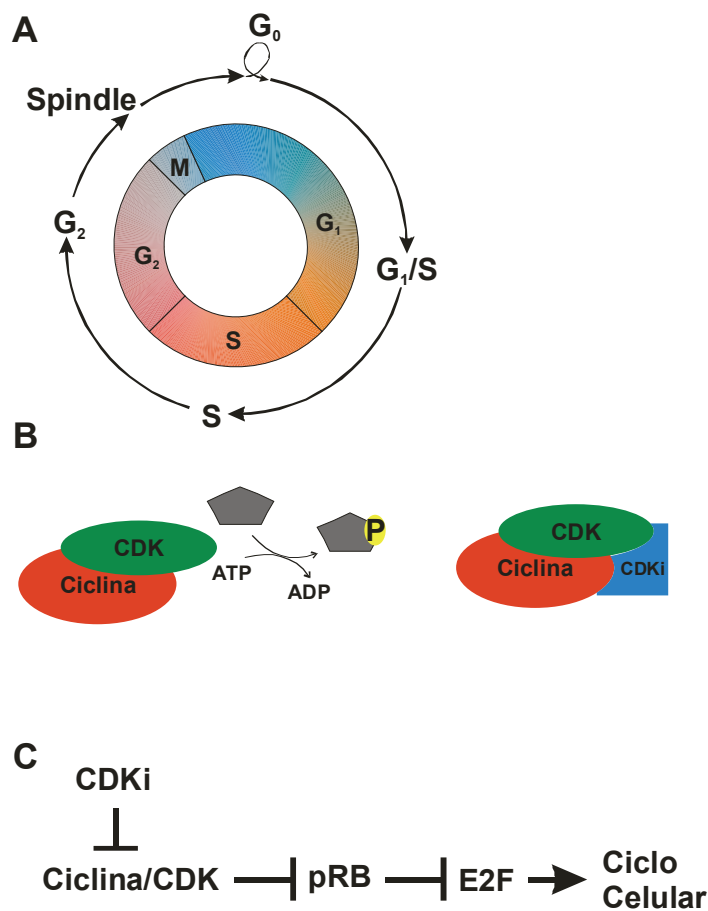
La tumorigénesis involucra dos mecanismos fundamentales: una proliferación exacerbada y una disminución de la tasa de muerte celular. Ambos procesos están estrictamente regulados en la célula normal y las moléculas involucradas en esta regulación son las más comúnmente alteradas en los tumores tanto humanos como experimentales. Para comprender de qué manera la alteración de los sistemas de regulación puede inducir una neoplasia, es necesaria una comprensión cabal de los mecanismos operativos en una célula normal.

## **El ciclo celular**

Un ciclo celular normal consta de cuatro fases: dos funcionales a la división celular (la fase de síntesis del DNA o fase S y la división celular propiamente dicha, o fase M) y dos fases preparatorias denominadas  $G_1$  y  $G_2$ . Se denomina  $G_0$  al estado de quiescencia celular (ausencia de ciclos de replicación). A fin de realizar una división celular en tiempo y lugar apropiados, la célula debe poder “decidir” cuándo comenzará un nuevo ciclo de replicación, es decir, salir de  $G_0$ . Además, es imprescindible que la célula haya completado la duplicación del DNA (durante la fase S) y sintetizado todas las organelas necesarias para las dos células hijas (mayormente en la fase  $G_2$ ) antes de comenzar la mitosis, por lo que existen nuevos momentos de “decisión” para continuar un ciclo de replicación ya comenzado. Estos momentos decisivos se denominan puntos de control o *checkpoints*. Un esquema de las fases del ciclo celular y la ubica-

ción temporal de los puntos de control puede observarse en la Figura 9A. La fase G1 contiene dos puntos de control, denominados “competencia” y “restricción”. El primero es el que regula la salida de G<sub>0</sub> y entrada en ciclo. El segundo es el que determina si termina la fase G<sub>1</sub> y comienza la fase S.

Estos puntos de control están estrechamente regulados por un sistema compuesto por tres familias de proteínas: las ciclinas, las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas



**Figura 9 – A. Fases del ciclo celular y posiciones temporales de los puntos de control. B. Actividad del complejo Ciclina/CDK e inhibición por unión de un CDKi. C. Rol de las ciclinas en la regulación de pRB y E2F.**

(CDKIs) (94) (Figura 9B). Las ciclinas son moléculas cuya expresión varía a lo largo del ciclo celular, por lo que ejercen su acción en una ventana determinada de tiempo y espacio. Las CDKs, por el contrario, suelen estar constitutivamente expresadas y su mecanismo de activación se basa en la unión directa a determinadas ciclinas y en fosforilaciones. CAK, una quinasa que también forma parte de la familia CDK, fosforila y activa las demás CDKs (94). Además, otras quinasas inducen la fosforilación del sitio de unión a ATP e inhiben la actividad CDK; una fosfatasa, CDC25, es la responsable de liberar la actividad mediante la remoción de dicha fosforilación (95). Finalmente, cuando un CDK no es más necesario, es degradado por el sistema ubiquitina-proteosoma. Los CDKIs se unen a las CDKs inhibiendo su actividad catalítica y su expresión aumenta siempre que la célula determine que debe frenar su ciclo celular, ya sea debido a algún daño celular o a señales externas (94).

La salida de  $G_0$  está regulada principalmente por las ciclinas D. Estas se unen a las CDK 4 y 6 y el complejo activo entonces fosforila al producto del gen supresor Retinoblastoma (Rb). La función principal de Rb es la de unir y de esta forma inhibir la actividad de los factores de transcripción E2F; al ser fosforilada por los complejos Ciclina D/cdk4 ó 6, Rb es incapaz de unir E2F y entonces este factor queda libre para inducir la expresión de moléculas promotoras del ciclo celular. Entre ellas, induce la expresión de ciclina E, la cual se una a la cdk2, formando un complejo activo que es el responsable principal de la entrada en fase S (96).

Ante un daño en el DNA, las células normales activan una respuesta de reparación del daño y freno del ciclo celular o inducción de muerte celular, a fin

de evitar que el daño en el genoma se propague a las células hijas. Esta respuesta está mediada en gran parte por los productos de los genes supresores ATR, ATM y p53 (97). p53 es un factor de transcripción que está siendo constantemente sintetizado y degradado por el sistema ubiquitina-proteosoma. Cuando el DNA recibe un daño, la degradación de p53 se inhibe y por lo tanto ésta se acumula, induciendo la expresión de p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, una CDKI que inhibirá la actividad catalítica de los complejos ciclina D/cdk 4 ó 6 y ciclina E/cdk2, impidiendo el inicio de la fase S. Si el daño ocurriera en la fase G<sub>2</sub>, p53 induce el arresto celular en la misma fase G<sub>2</sub> e impide el inicio de la mitosis. p53 induce asimismo la expresión de MDM2, una molécula encargada de promover la exportación del núcleo al citoplasma y la degradación final de p53, siendo éste un posible mecanismo de terminación de la señal de p53 (98,99).

La expresión y actividad del complejo de regulación formado por las ciclinas, las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y sus inhibidores (CDKIs) (para una revisión de este complejo proteico, ver 100, 101) están moduladas por la actividad de diversas moléculas de transducción de señales, entre ellas Ras y PI3K. La activación de receptores de factores de crecimiento induce la activación posterior de estas moléculas y ellas a su vez inducen la expresión de ciclinas (principalmente ciclinas D<sub>1</sub> y A) y CDKs, al tiempo de inhibir la expresión de CDKIs. De esta manera, promueven el ciclo celular induciendo la fosforilación e inactivación de pRb (Figura 9C).

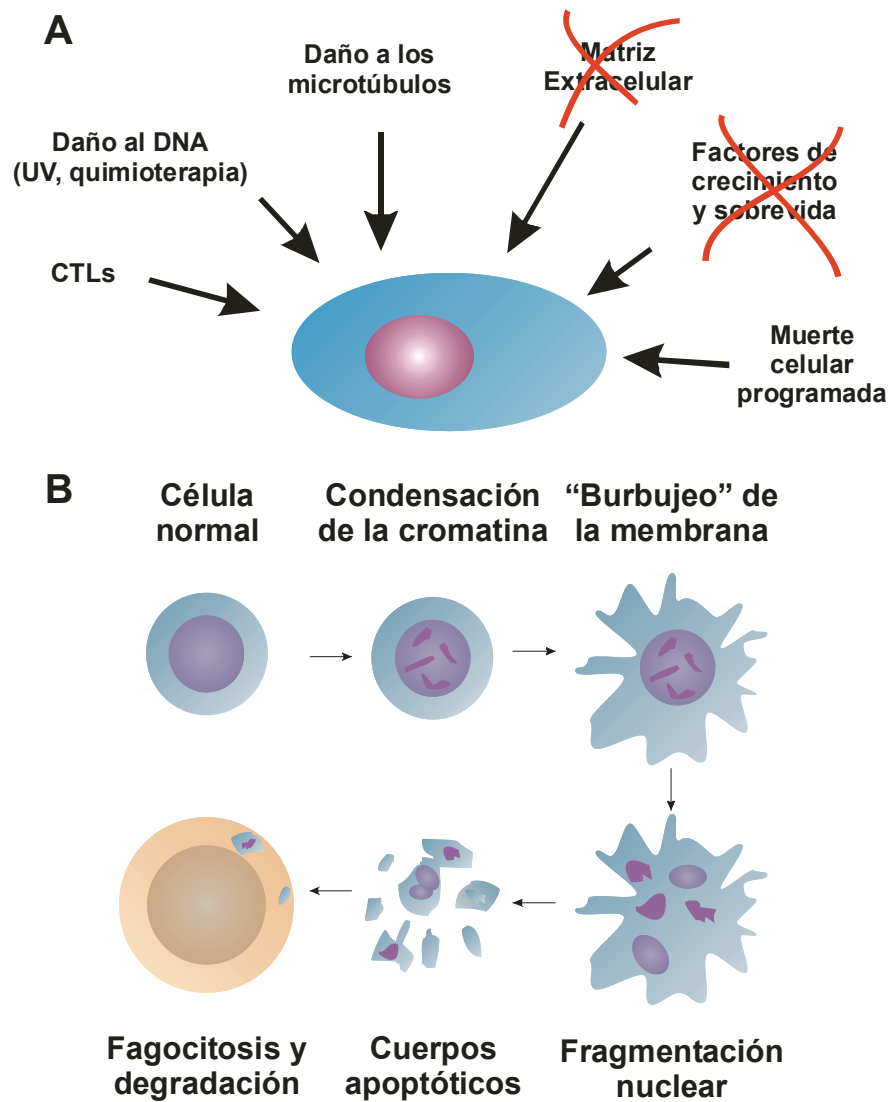
## **Apoptosis**

La apoptosis (102) es un proceso altamente regulado de muerte celular. La muerte celular apoptótica puede inducirse por diversas razones, como ser la

aparición de un daño irreparable en el DNA, la ruptura de la estructura del citoesqueleto, la falta de una matriz extracelular adecuada o de factores de crecimiento y supervivencia necesarios, etc. (Figura 10A). La apoptosis es parte de los mecanismos fisiológicos normales que mantienen la homeostasis celular, como el balance de la proliferación.

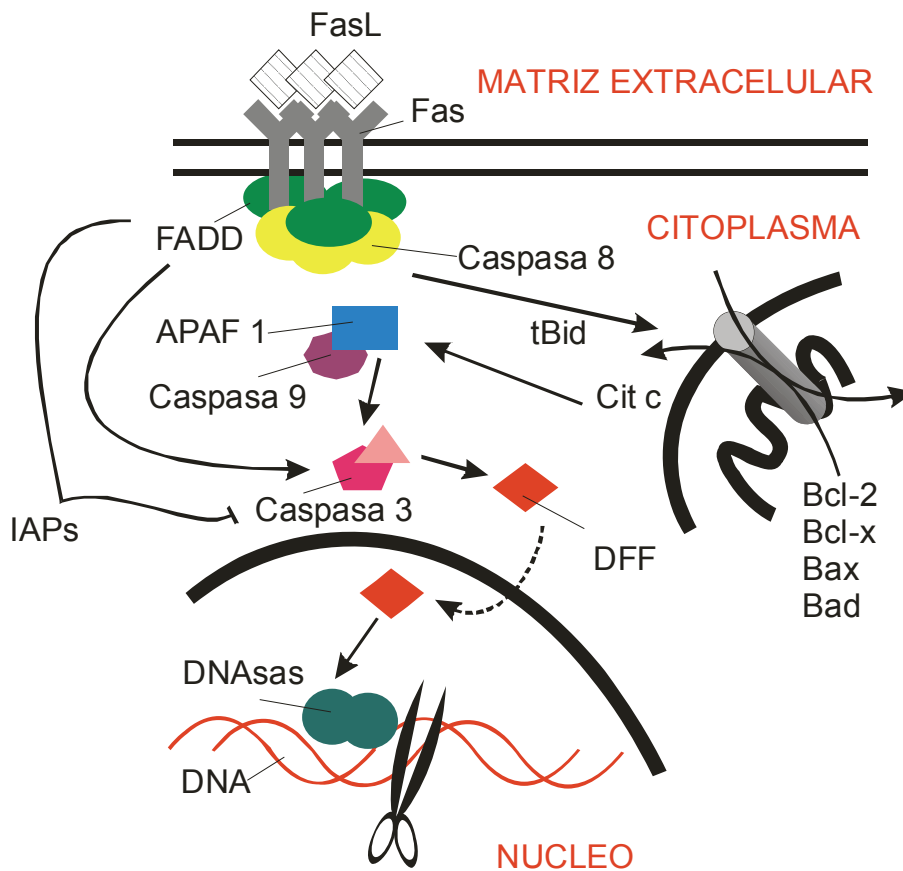
La célula depende continuamente de señales de supervivencia, otorgadas por factores solubles (103,104,105), la matriz extracelular (106) y el contacto célula-célula (107) a fin de proseguir con su actividad y no morir. En particular, son muy comunes los ensayos de inducción de apoptosis por privación de suero (que consiste en la eliminación de los factores de supervivencia presentes en el suero) y por inhibición de anclaje (denominado anoikis, basado en la incubación de las células en suspensión a fin de impedir la interacción con una matriz extracelular). Las señales intracelulares inducidas por estos factores incluyen la activación de Ras, Src y PI3K; la ausencia de actividad de estas proteínas es la causante de la inducción de apoptosis.

La morfología de la célula apoptótica presenta una serie de características distinguibles, entre las que se cuenta la condensación y fragmentación de la cromatina, el burbujeo o "blebbing" de la membrana plasmática y la degradación celular por medio de la generación de cuerpos apoptóticos, fragmentos de membrana que envuelven parte del contenido celular, incluyendo citoplasma, organelas y porciones del núcleo (Figura 10B). Las células apoptóticas pueden distinguirse de las células viables mediante simples tinciones nucleares y observación al microscopio (108,109). Una de las características claves de la muerte apoptótica es la fagocitosis por las células vecinas. Ello se debe, entre



**Figura 10 – A.** La apoptosis puede ser inducida por diversos estímulos internos o externos a la célula. Entre ellos, la activación de receptores por linfocitos T citotóxicos (CTLs), daño al DNA o al citoesqueleto, señalización en el desarrollo y/o ausencia de factores de supervivencia o de componentes de la matriz extracelular necesarios para la supervivencia celular. **B.** Características morfológicas de la apoptosis. La célula en proceso de apoptosis muestra condensación de la cromatina, burbujeo (blebbing) de la membrana plasmática, fragmentación nuclear y la generación de cuerpos apoptóticos, o fragmentos de citoplasma, organelas y núcleo envueltos por membrana plasmática, que son luego fagocitados.

otros, a la aparición de moléculas de fosfatidilserina en la capa externa de la membrana plasmática, en contraposición con una célula viva que sólo contiene fosfatidilserina en la capa interna (110,111). La exposición de este fosfolípido es una señal de fagocitosis para la célula vecina y puede ser detectada fácilmente mediante la tinción con derivados de la Anexina V, una molécula que reconoce específicamente fosfatidilserina (112,113).



**Figura 11 –Esquema mostrando algunas de las moléculas involucradas en la señalización intracelular de la inducción y control de la apoptosis. Se ejemplifica la vía extrínseca por activación del receptor Fas y la regulación de la vía intrínseca por liberación de citocromo c y activación de caspasa 9.**



## El control intracelular de la apoptosis

Como es esperable debido a la extrema importancia del proceso apoptótico, varias familias de proteínas intervienen en la regulación, control y ejecución de la apoptosis. Existen múltiples vías de inducción de apoptosis (Figura 11). La primer vía, denominada extrínseca, se debe a la activación de receptores triméricos transmembrana de la familia TNF- $\alpha$  (114). Estos a su vez activan, a través de una serie de proteínas acopladas, una familia de proteasas específicas de secuencias que contienen un residuo aspartato, denominadas caspasas (114,115) (Figura 12A). Dependiendo del tipo celular, esta activación puede ser suficiente para inducir apoptosis o necesitar superar un nuevo punto de control, situado en la mitocondria. Además, señales intracelulares de stress inducen cambios en la mitocondria y subsiguiente activación de caspasas, lo que se denomina vía intrínseca. Allí, la familia de proteínas Bcl-2 regula la apertura de un canal mitocondrial y con él el potencial transmembrana mitocondrial. La familia Bcl-2 (Figura 12B) consiste en miembros antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w) y proapoptóticos (Bax, Bad, Bid, Bak, Bcl-x<sub>S</sub>) (116,117). Los miembros de esta familia se caracterizan por la presencia de dominios BH (o de homología a Bcl-2), que son los responsables de promover la interacción entre estas moléculas. En particular, el dominio BH3 es el único presente en toda la familia Bcl-2, y aquellas proteínas que contienen sólo el dominio BH3 funcionarían como inhibidores de los miembros antiapoptóticos; distintas proteínas 'sólo BH3' suelen ser activados por vías específicas. Los miembros proapoptóticos funcionan promoviendo la apertura del canal y la pérdida de potencial mitocondrial, mientras que los miembros antiapoptóticos funcionan impidiendo estos

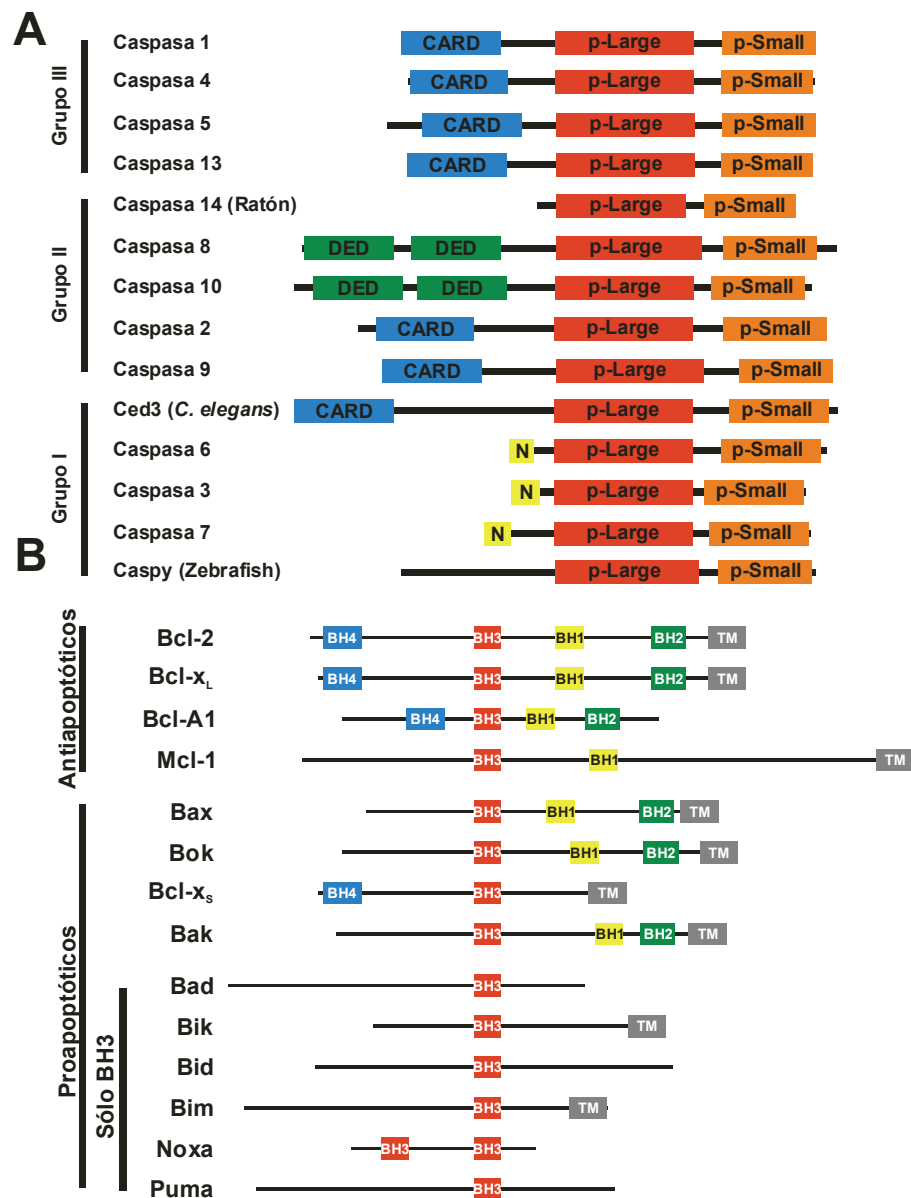


Figura 12 – A. Esquema de la estructura de la familia de las caspasas. El grupo I contiene a los miembros proinflamatorios, el grupo II a las caspasas iniciadoras y el grupo III a las caspasas efectoras. Adaptado de J B Denault, The Apoptosis Database, [www.apoptosis-db.org](http://www.apoptosis-db.org). B. Alineamiento de los distintos miembros de la familia Bcl-2. 1 a 4 representan los distintos dominios de homología a Bcl-2 (BH1-BH4). TM, dominio de inserción en membranas (adaptado de Coultas L y Strasser S, ref. 117).

cambios. Una vez perdido el potencial mitocondrial, se libera citocromo c (118), el cual difunde al citoplasma y se une a un complejo proteico que está compuesto por APAF-1, Caspasa 9 y ATP, denominado apoptosoma (119,120,121). El apoptosoma es capaz de clivar y activar a las caspasas efectoras 3,6 y 7 y de esta manera inducir la muerte celular (Figura 12). Un nuevo punto de control, es la expresión y liberación al citosol de reguladores de la actividad caspasa, entre los que se cuentan las IAPs (inhibidores de la actividad catalítica de las caspasas) y Smac/Diablo, inhibidor a su vez de las IAPs. Para una revisión de la regulación de la apoptosis, se pueden consultar las referencias 122,123,124.

### **El rol de las SAPKs**

JNK y p38 son dos subfamilias de MAPKs (comúnmente denominadas proteínas quinasas activadas por stress, SAPKs). Estas quinasas se cuentan entre las moléculas más importantes de respuesta a stress e inductoras de apoptosis (125).

Se ha observado que tratamientos inductores de stress y promotores de apoptosis como la inhibición de anclaje o la privación de suero provocan una franca activación de p38 en fibroblastos (126,127). Esta activación es necesaria para la inducción de muerte celular, ya que su inhibición farmacológica o por expresión de formas dominante negativas de p38 es capaz de impedir la muerte celular (127). En células epiteliales p38 puede inducir tanto apoptosis como arresto celular (128,129,130). Aunque en ciertos casos también pueden inducir sistemas de sobrevivencia (131), la activación forzada de p38 es capaz de inhibir la transformación celular y la tumorigénesis (131,132).

La función de JNK es aún más difícil de entender; existen reportes que sugieren que JNK está involucrada en la promoción de supervivencia, en la inducción de apoptosis, en promoción de proliferación y en transformación celular (133,134,135,136). Se ha publicado que la expresión de JNK puede inducir la expresión de Fas y su ligando FasL, induciendo de este modo la muerte celular (137,138). Sin embargo, el rol de las JNK en la regulación de la apoptosis es controversial y, dependiendo de la intensidad y del estímulo, podría funcionar también generando señales de supervivencia (139).

Es posible que las funciones de las SAPKs dependan en gran medida de diferentes condiciones, como el tipo celular, las isoformas expresadas y el contexto en el que se originan las señales recibidas por la célula, pudiendo tener funciones muy disímiles en distintas oportunidades.

### **Mecanismos de inhibición de la muerte celular**

El control de la muerte celular recae sobre dos familias de proteínas, la familia de las caspasas y la de Bcl-2. Las caspasas pueden ser moduladas por fosforilación –por ejemplo, la caspasa 9 es inhibida por AKT en células humanas (140) aunque no en ratón (141,142)– o por la modulación de su expresión (143), pero el principal mecanismo de regulación es a través de la modulación de su actividad proteolítica. Las IAPs (o inhibidores de la apoptosis) son una familia de proteínas capaces de unirse a las caspasas e inhibir su actividad. Su expresión está regulada por la actividad, entre otros, de NF- $\kappa$ B (144) y PI3K (145). La familia Bcl-2 tiene múltiples formas de regulación, como ser la proteólisis (146,147,148,149), la fosforilación (150,151,152) y la regulación de la expresión (153,154).

Las vías de transducción de señales activadas por Ras principalmente, y por otros oncogenes, pueden promover sobrevivencia a través de varios de estos mecanismos, tanto a través de modificaciones post-traduccionales directas como por la regulación de factores de transcripción encargados de regular su expresión, de una forma compleja y dependiente del contexto de señalización (155).

### ***PAPEL DE RALA EN LA TRANSFORMACIÓN MALIGNA***

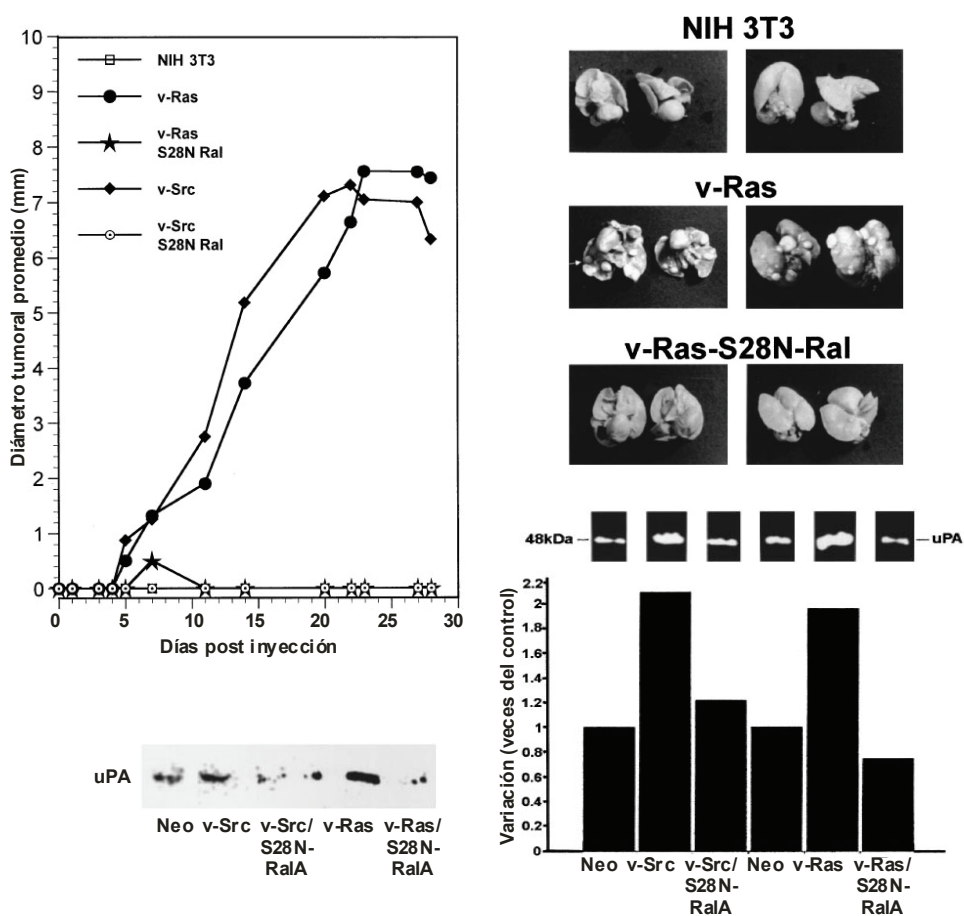
Se conoce que la activación de los oncogenes Ras contribuye a la formación de alrededor del 30% de las neoplasias humanas. Asimismo existen numerosos datos que avalan la participación de las vías reguladas por Ras en los complejos procesos involucrados en la transformación maligna y la progresión tumoral. Estas evidencias han determinado el interés creciente en la elucidación de dichas vías (3,156). La existencia de Ral como molécula activada por Ras se conoce desde la década del '80, pero recién en la segunda mitad de la década pasada se comenzó a describir su papel en la transformación maligna. Ral es necesaria para la inducción de la proliferación por variantes constitutivas de Ras (157). Una probable vía de activación de la proliferación puede ser la inducción de la expresión de la ciclina D<sub>1</sub> a través de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, así como la inducción de la expresión de c-Fos a través de Rlf (34). Por otra parte, la introducción de una forma constitutivamente activa de Ral en fibroblastos Swiss3T3 inhibe la formación de fibras de stress e induce filopodia, a través de la modulación de la localización intracelular de filamina, sugiriendo que cumple alguna función en la determinación de la morfología y migración celular (18). Asimismo, se ha reportado que la inhibición de RalA

inhibe la inducción de la migración inducida por tratamiento con EGF (158). Como ya se ha mencionado, a través de Arf6, RalA promueve la activación de PLD1 y, por consiguiente, la producción de ác. fosfatídico y diacilglicerol (21). Tanto un lípido como el otro poseen actividad mitogénica, por lo que ésta es otra vía probable de regulación de la replicación celular. Más aún, la sobreactivación de PLD es suficiente para promover la transformación celular (159).

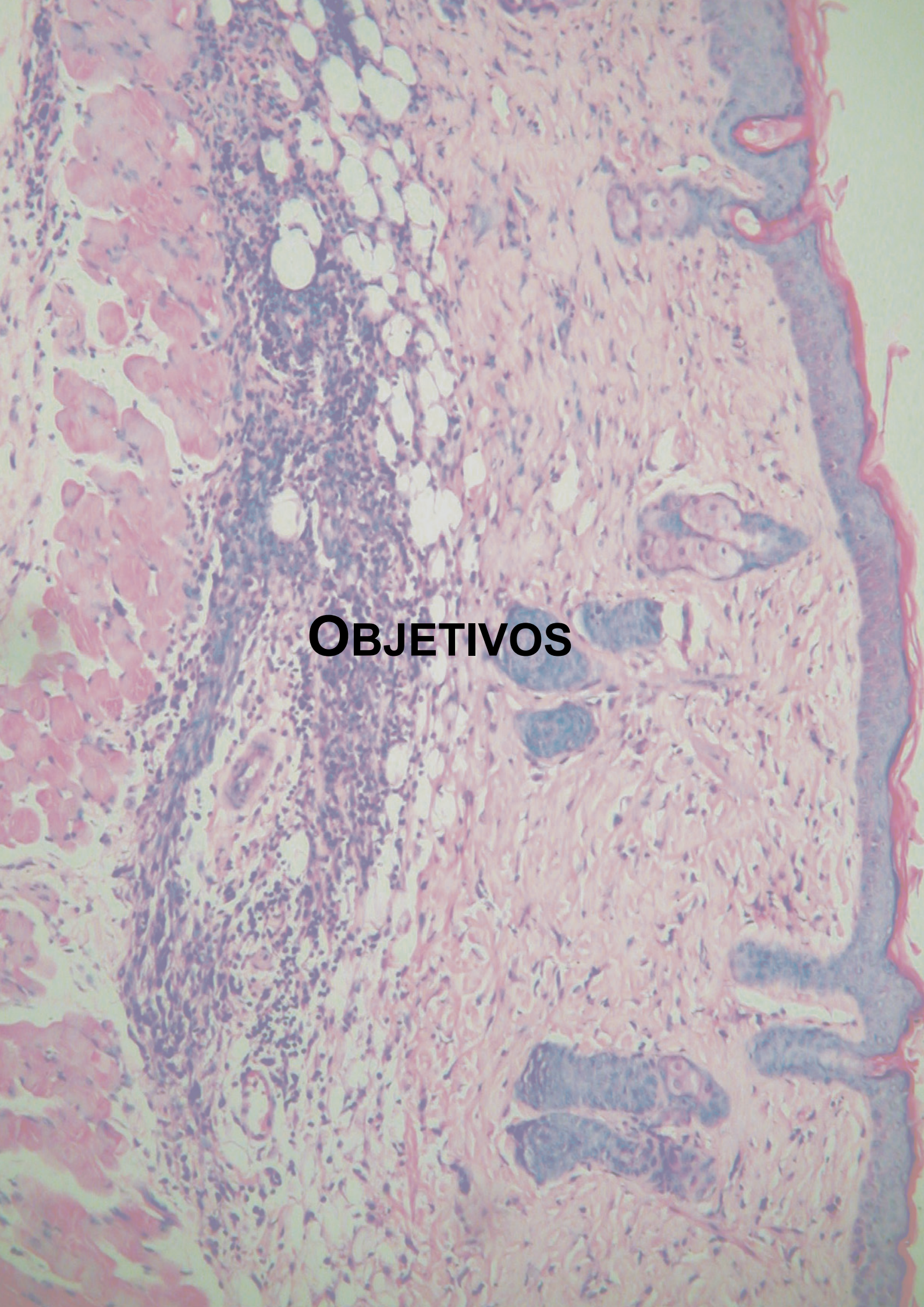
Se ha demostrado que la expresión constitutiva de los oncogenes v-Src y v-Ras induce la transformación *in vitro* de las células NIH3T3, y que dicho efecto es dependiente de una señal mediada por la pequeña GTPasa RalA y PLD1 (160). Asimismo se demostró que Ral coopera con el receptor de EGF en la transformación de fibroblastos de rata 3Y1 (161) y que una forma activa de Ras, que sólo puede transmitir la señal a través de Ral (RasV12G37), es capaz de transformar a las células NIH3T3 alcanzando un fenotipo tumorigénico completo en ratones desnudos (162).

En nuestro laboratorio, se ha demostrado previamente que el aumento de la secreción de uPA y MMP-2 y -9 inducido en fibroblastos NIH3T3 por el oncogén v-Src, así como el aumento de la secreción de uPA por v-Ras, requieren de la actividad de RalA (163). Más importante aún, la inhibición de RalA impidió la adquisición de la capacidad de crecer en agar blando y la formación de tumores de las células NIH3T3 transformadas por v-Ras ó v-Src inyectadas de forma subcutánea, así como la capacidad de colonizar el pulmón cuando fueron inoculadas por vía endovenosa (163) (Figura 13).

Más recientemente, se ha reportado que RalA sería un efector de Ras imprescindible para la transformación maligna de células humanas (164).



**Figura 13 – Efecto de la inhibición de RalA en la capacidad tumorigénica, formación de metástasis y secreción de uPA en células NIH3T3 transformadas por sobreexpresión de variantes virales de Src ó Ras. Adaptado de Aguirre-Ghiso et al, 163)**



# OBJETIVOS

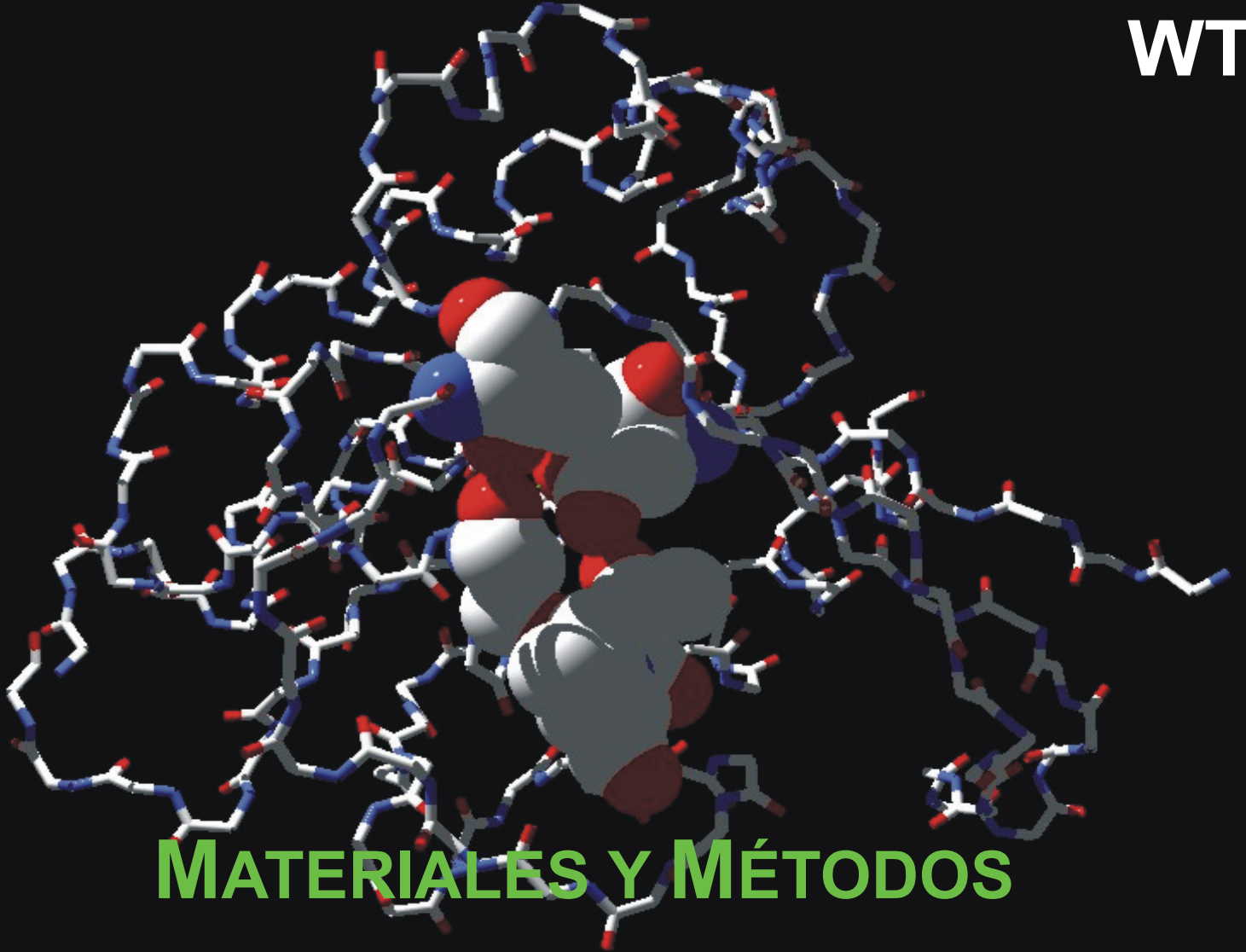


Dado que la capacidad de los oncogenes v-Ras, v-Raf ó v-Src de inducir un fenotipo oncogénico en las células NIH3T3 depende de una actividad RalA intacta, el objetivo fue dilucidar qué mecanismos promotores de la transformación son regulados por esta vía, a fin de comprender el rol de RalA en la transformación maligna y las vías involucradas en la oncogénesis en general. La hipótesis de trabajo fue que RalA podría promover la transformación maligna por múltiples vías, incluyendo cambios en el citoesqueleto, inducción de la proliferación e inhibición de la apoptosis.

Los objetivos específicos fueron investigar el rol de RalA en:

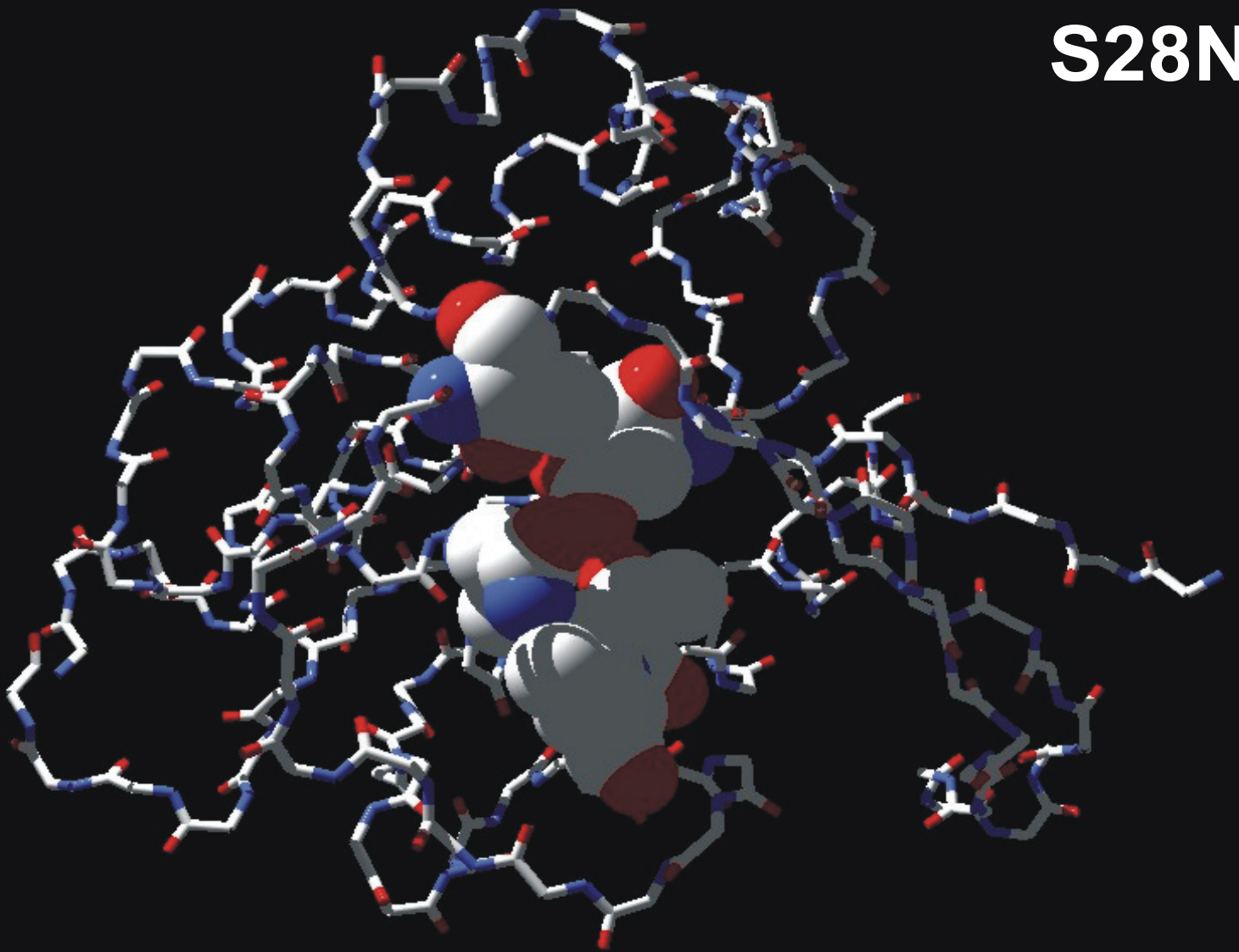
- la alteración de la morfología celular inducida por la sobreexpresión de variantes virales de Ras, Raf ó Src en fibroblastos NIH3T3.
- la producción de componentes de la matriz extracelular y la expresión y localización de sus receptores de membrana.
- la desregulación del citoesqueleto y de los complejos de adhesión focal en las cascadas dependientes de oncogenes.
- la interdependencia entre la modulación de la matriz extracelular, los complejos de adhesión focal y el citoesqueleto, y si estos mecanismos están asociados causalmente entre sí.
- la capacidad migratoria celular.
- la capacidad de sobrevivir *in vivo* de los fibroblastos transformados.
- la sobrevivida celular inducida por oncogenes *in vitro*, frente a diferentes tratamientos inductores de stress y muerte celular.
- Las vías de transducción involucradas en la inducción de sobrevivida por oncogenes.

WT



**MATERIALES Y MÉTODOS**

S28N



**MODELO EXPERIMENTAL. CULTIVO CELULAR**

Se utilizaron células NIH3T3 transfectadas de forma estable con vectores conteniendo las variantes virales de Ras, Raf ó Src o el vector vacío con resistencia a G418 (Neo). Estas líneas fueron luego transfectadas con un vector conteniendo la secuencia de una mutante dominante negativa de RalA, S28N-RalA (165), análoga a la mutante 17N-Ras (166,167), generando en total 7 líneas celulares, denominadas NIH3T3-Neo, -v-Ras, -v-Ras/S28N-RalA, -v-Raf, -v-Raf/S28N-RalA, -v-Src y -v-Src/S28N-RalA. Las 7 líneas se mantuvieron en DMEM (GIBCO BRL) conteniendo 10% de suero fetal bovino (Gen S.A.), 80 µg/ml gentamicina y 250 µg/ml G418 (Calbiochem) a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> en atmósfera húmeda. Las células fueron provistas por el Dr. Foster, City University of New York, USA.

**FLUORESCENCIA, INMUNOFLUORESCENCIA E INMUNOHISTOQUÍMICA**

Para la realización de estos ensayos las células se sembraron en cubreobjetos pretratados para cultivo celular y luego de 24 hs. se fijaron con 3% p-formaldehído en PBS por 15-30 min. Para la observación de los microfilamentos, las células se permeabilizaron con tritón 0,2% en PBS por 10-15 min. y se tiñeron por 1 h. a temperatura ambiente (TA) con faloidina conjugada con FITC ó TRITC (Sigma Co.) y se montaron en glicerol:PBS 1:1.

Para la observación de vinculina, integrina  $\beta$ 1 o tropomiosinas, células crecidas en cubreobjetos por 24 hs se fijaron con p-formaldehído 3% en PBS, se permeabilizaron con tritón 0,2% en PBS por 10-15 min. y se bloquearon con leche 5% en PBS-0,1% tween-20. Luego, se incubaron toda la noche (ON) a

4°C con anti-vinculina (Sigma) o anti-integrina  $\beta 1$  (Transduction Labs) en solución de bloqueo y, posteriormente, se incubaron con un anticuerpo anti-ratón o anti-conejo -FITC ó -TRITC. Para los ensayos de doble marcación, se incubaron conjuntamente los segundos anticuerpos con faloidina-FITC ó -TRITC. En la mayoría de los experimentos, la incubación de los anticuerpos secundarios se realizó en presencia de 1  $\mu\text{g/ml}$  Hoechst 33258 para teñir los núcleos. Se utilizó Vectashield (Vector) como solución de montaje debido a su actividad inhibitoria del “fading” de FITC.

La observación de FN se realizó de manera similar, excepto que no se permeabilizaron las células, que fueron incubadas por 30 min. con  $\text{H}_2\text{O}_2$  3% para eliminar la actividad peroxidasa endógena y que luego de la incubación ON con el anticuerpo anti-FN celular (Sigma) se incubó 1 h. a TA con un anti-ratón IgM biotinilado (Sigma), posterior incubación por 45 min. a TA con estreptoavidina-HRP (GIBCO) y que el revelado se realizó por adición de DAB (Sigma) con  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,3% en PBS. Se realizaron asimismo tinciones para fluorescencia por incubación con estreptoavidina-FITC.

### ***ENSAYOS DE MIGRACIÓN CELULAR***

La capacidad migratoria se analizó por el ensayo de “wound”, o herida en la monocapa. Se sembraron  $6 \times 10^5$  células en placas de Petri de 35 mm de diámetro y al cabo de 24 hs, las células alcanzaron un 100% de confluencia. La herida de aproximadamente 400  $\mu\text{m}$  se realizó con la punta de un tip de 200  $\mu\text{l}$  a lo largo de la monocapa. Las placas se lavaron repetidas veces con PBS a fin de eliminar las células desprendidas y se observaron inmediatamente en un microscopio de contraste de fase y fotografiaron para establecer el grosor ini-

cial de la herida. Al cabo de diferentes tiempos las placas fueron nuevamente fotografiadas para determinar la capacidad de las células de volver a cubrir la zona dañada. Las fotografías obtenidas se analizaron por densitometría (software Molecular Analyst, BIO-RAD) a fin de calcular el área de migración.

Dado que el ensayo anterior depende de la formación de una monocapa y que las células NIH3T3-v-Raf no forman monocapas enteras (ver Resultados), se realizaron asimismo ensayos de migración en cámaras Transwell (Costar) de poro de 8  $\mu\text{m}$ . Para ello, las células se sembraron sobre el lado superior del filtro en MEM 10% SFB. Se utilizó el mismo medio en el lado inferior, a fin de medir la migración espontánea y no la quimiotaxis, lo que fue posible dada la alta tasa migratoria de estas células. Luego de 16 h., las células se fijaron en formol neutro y se eliminaron las células no migrantes que quedaron sobre el lado superior del filtro mediante un hisopo. Las células que migraron se tiñeron luego con Hoechst 33258 por 1h y se contaron los núcleos presentes en el lado inferior del filtro bajo microscopía de fluorescencia.

### ***OBTENCIÓN DE LISADOS CELULARES Y WESTERN BLOT***

Se sembraron  $5 \times 10^5$  células por placa de 35 mm de diámetro en DMEM + 10% SFB. Con el objetivo de minimizar los efectos de los factores presentes en el suero y al mismo tiempo preservar la viabilidad celular, al cabo de 24 hs., las células, en un 80% de confluencia, fueron lavadas 2 veces por 10 min. con medio de cultivo y mantenidas ON con DMEM + 0,5% SFB. A la mañana siguiente, las células se lavaron nuevamente dos veces con DMEM y se mantuvieron 6 h en DMEM sin SFB. En este lapso se adicionaron los inhibidores de quinasas en los experimentos que lo requirieron o DMSO como control. Otras

placas se mantuvieron todo el tiempo en DMEM 10% SFB. Al fin de la incubación, las células se lisaron por adición de 100  $\mu$ l de buffer de siembra conteniendo inhibidores de fosfatasa y de proteasas (Sigma) y 5%  $\beta$ -mercaptoetanol. Los lisados se sonicaron, calentaron a 100 °C por 5 min. y clarificaron por centrifugación 10 min. a 13000 rpm.

Los lisados se separaron por SDS-PAGE (Bio-Rad) y las proteínas se transfirieron a membranas PVDF (Amersham) por transferencia líquida o semi-seca (Bio-Rad). Las membranas se bloquearon con 5% leche en PBS-0,1% Tween 20 por 1 h. a t. amb. y luego se incubaron ON. con anticuerpos contra FN (Sigma), integrina  $\beta_1$  (Transduction Labs), tropomiosinas (Sigma), vinculina (Sigma), Erk (Transduction Labs), p-Erk1/2 (Santa Cruz Biotechnology), Akt (Cell Signaling), p-Akt (Cell Signaling), actina (Santa Cruz), Bcl-2 (Santa Cruz), Bcl-x<sub>L</sub> (Santa Cruz) o Bax (Santa Cruz).

Los segundos anticuerpos utilizados fueron anti-IgG ratón-HRP (Vector), anti-IgM ratón biotinilado (Sigma), anti-conejo-HRP (Vector) o anti-rata biotinilado (Sigma). En los casos de anticuerpos biotinilados se realizó un tercer paso de incubación con estreptoavidina-HRP (Gibco). El revelado por luminiscencia se realizó por adición de una solución de coumarina/luminol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma) o ECL (Amersham) y exposición a placas radiográficas. Las placas fueron digitalizadas mediante el uso de un densitómetro (BIO-RAD) y las bandas se cuantificaron mediante el programa Molecular Analyst (Bio-RAD).

Los controles de siembra (marcaciones contra  $\beta$ -actina o contra las formas no fosforiladas de las proteínas) se realizaron en las mismas membranas, por eliminación de los anticuerpos ("stripping") de las membranas y remarca-

ción siguiendo el mismo protocolo. En algunos casos, se comprobó la siembra por tinción de la membrana completa con Rojo Ponceau ó Coomassie Blue R-250. Los valores de fosforilación se expresaron como el valor de la banda de la proteína fosforilada sobre el valor de la banda de proteína total.

### ***CUANTIFICACIÓN DE LA APOPTOSIS***

El número de células apoptóticas se determinó principalmente por recuento al microscopio de células que presentaban la típica morfología apoptótica (108) luego de tinción con Hoechst ó naranja de acridina, como ya se ha publicado previamente (168). En síntesis, células creciendo sobre cubreobjetos se fijaron con un volumen de p-formaldehído 6% directamente sobre el medio de crecimiento (concentración final 3%), a fin de minimizar la pérdida de células apoptóticas débilmente adheridas al vidrio. Luego de dos lavados con PBS, los cubreobjetos se tiñeron con 1  $\mu$ M Hoechst 33258 por 30 min. y se montaron en glicerina:PBS 1:1. Mediante observación al microscopio de fluorescencia, se contaron como apoptóticas las células que presentaron núcleos condensados y/o fragmentación nuclear, pero sin observación de cromátidas individuales, signo de célula en profase mitótica. Se realizaron asimismo ensayos de cuantificación colorimétrica del número de células viables (kit CellTiter, Promega) y tinciones con Anexina V (Sigma) según indicaciones de los fabricantes.

### ***ENSAYOS DE SOBREVIDA IN VIVO***

$10^6$  células se inocularon en la dermis de ratones singeneicos (cepa BALB/c), junto con una solución de azul tripán para delimitar el sitio de inoculación. Los ratones se mantuvieron por 3-7 días con comida y bebida *ad libitum* y

luego se sacrificaron y se recuperó el sitio de inoculación, que se fijó con glutaraldehído 3,5% en PBS. Luego, se realizaron cortes de 1  $\mu\text{m}$  de grosor, se tiñeron con 1% Azur II y 1% azul de metileno en agua por 5 minutos y se observaron y fotomicrografiaron a 400 y 1000X.

### ***CULTIVOS EN SUSPENSIÓN***

Para impedir el anclaje de las células y analizar su susceptibilidad a la muerte por *anoikis*, se cultivaron células en suspensión. Para ello, se recubrieron placas de Petri de 60 mm de diámetro con una capa de agar 1% en medio de cultivo. Sobre ella, se sembraron  $10^5$  células en suspensión en 5 ml de DMEM + 10% SFB y se incubaron por 3-7 días. Previamente a la obtención de las fotografías, una alícuota se analizó por tinción con azul tripán para determinar la viabilidad celular y luego las células se fijaron con una solución de formol neutro.

### ***INDUCCIÓN DE APOPTOSIS CON CISPLATINO O PRIVACIÓN DE SUERO***

Se sembraron  $2 \times 10^4$  células en cubreobjetos y luego de 24 hs se sometieron por otras 24 hs a diferentes tratamientos. Para los ensayos con cisplatino (Sigma), el medio de cultivo fue reemplazado por DMEM fresco con 10% de SFB adicionado con diferentes concentraciones (10-1000  $\mu\text{M}$ ) de cisplatino. Para los ensayos de privación de suero, las células fueron lavadas 3 x 10 min. con PBS a fin de eliminar el remanente de suero e incubadas en DMEM sólo. Durante las incubaciones con cisplatino o DMEM, se agregaron los inhibidores de quinasas en los experimentos que lo requirieron (ver más adelante).



Al cabo de las incubaciones, las células se fijaron en formol neutro y se tiñeron con Hoechst (1 h. a TA) o naranja de acridina (5 min), se montaron con una solución glicerol:PBS 1:1 y se observaron en un microscopio Nikon E400 de epifluorescencia a 400X y 1000X. Se contaron las células con evidencias de alteraciones en la morfología nuclear (ver más arriba) y se expresaron como porcentaje del total. Se contaron al menos 250 células por cubreobjetos.

### ***EFFECTO DE INHIBIDORES DE QUINASAS SOBRE LOS COMPORTAMIENTOS***

#### ***CELULARES REGULADOS POR RALA***

La actividad quinasa de Mek1/2, PI3K ó p38 se inhibió por adición de 50µM PD98059 (Sigma), 20 µM LY294002 (Sigma) ó 2 µM SB203580 (Sigma), respectivamente, en tratamientos de 6 a 24 hs. Las células así tratadas fueron analizadas por Western blot o por tinción con Hoechst y fluorescencia.

#### ***TRANSFECCIONES TRANSIENTES***

A fin de analizar la actividad transcripcional NF-κB ó AP1 se realizaron ensayos de genes reporteros. Asimismo, el rol de p38 y de Rho se analizó mediante transfecciones transientes.

#### **Ensayos de genes reporteros**

Estos ensayos fueron realizados en monocapas en un 80% de confluencia creciendo en multiplacas de 6 ó 24 wells. Las células fueron transfectadas con una mezcla de 0,5 µg de un plásmido 3x κB-Firefly Luc ó 4x AP1-Firefly Luc y 0,1 µg de plásmido CMV- *Renilla* Luc (plásmido de referencia) en presencia de Fugene (Roche) en relaciones µl Fugene:µg DNA 2:1 por cada well

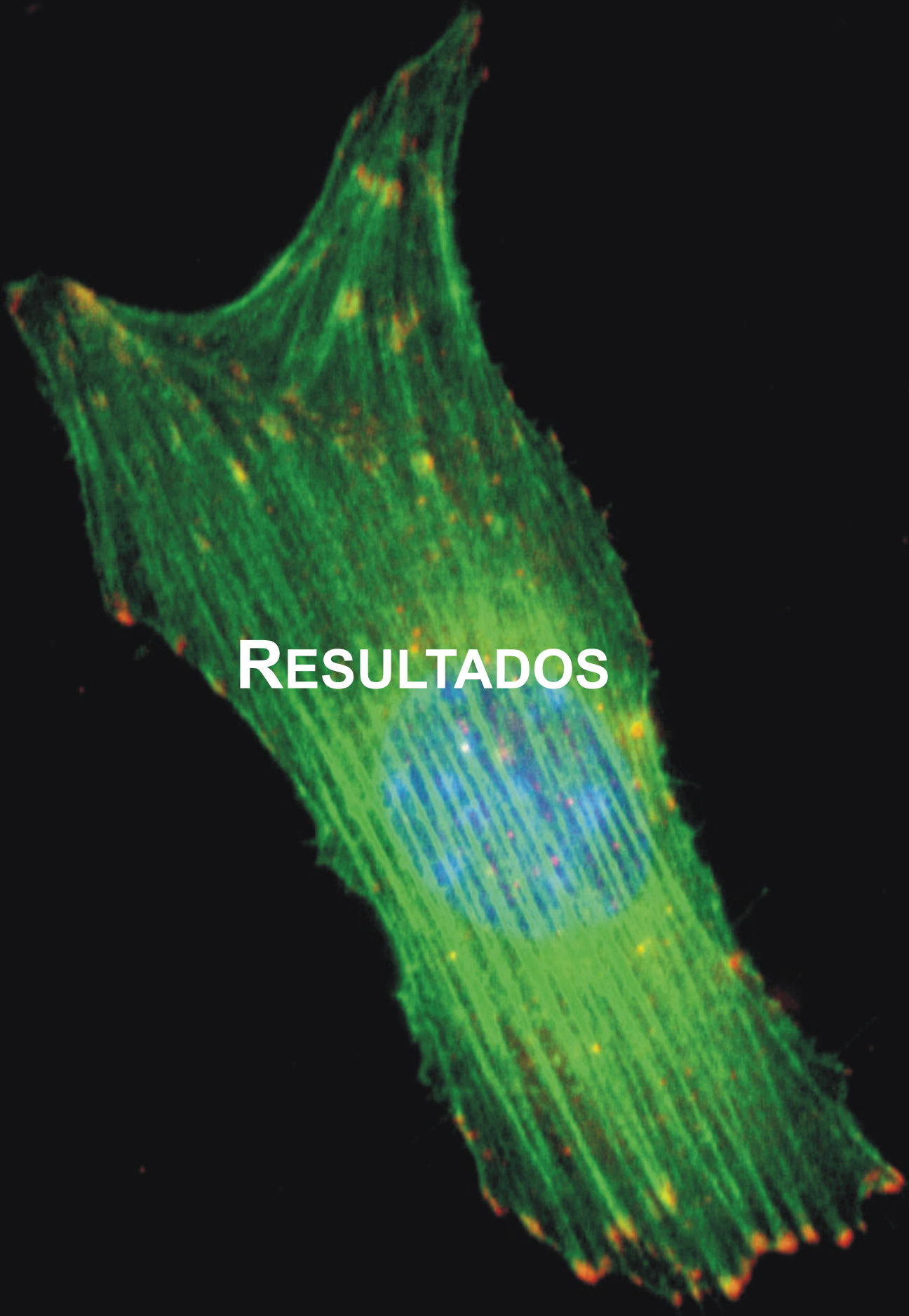
de placa de 6 wells. Las células se mantuvieron en presencia del plásmido por un mínimo de 24 h. Los ensayos con los inhibidores se realizaron en las 24 h siguientes. Luego se lisaron las células y se midieron las actividades luciferasa siguiendo el protocolo del fabricante (Promega Dual Luciferase Kit). La actividad NF- $\kappa$ B ó AP1 se expresó como actividad Firefly Luc / *Renilla* Luc.

### **Análisis de mutantes la familia Rho y de la vía p38**

Monocapas en un 80% se confluencia creciendo en multiplacas de 6 wells fueron transfectadas con una mezcla de 2  $\mu$ g de plásmido (Rho WT, RhoV14, RhoN19, DNp38, MKK6Eb) y 0,5  $\mu$ g de pEGFP (como marcador de transfección) en presencia de Fugene (Roche) en relaciones  $\mu$ l Fugene: $\mu$ g DNA 3:1 (por well de placa de 6 wells). Luego de 48 hs., las células se sembraron sobre cubreobjetos para determinar el estado del citoesqueleto o se trataron para inducir muerte celular.

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los valores de expresión de proteínas o de estado de fosforilación fueron analizados por ANOVA multifactorial y posterior Scheffé. Los porcentajes de apoptosis fueron analizados por Chi cuadrado. Se asumieron como diferencias significativas aquellas que produjeron un valor de  $p < 0,05$ .



# RESULTADOS

***RALA EN LA REGULACIÓN DE LA MORFOLOGÍA CELULAR, LA MATRIZ  
EXTRACELULAR, EL CITOESQUELETO Y LA MIGRACIÓN***

**La alteración de la morfología en fibroblastos transformados  
depende de RalA**

La línea celular NIH3T3 deriva de fibroblastos murinos no transformados. Estas células crecen *in vitro* adheridas al sustrato, formando monocapas con una marcada inhibición por contacto. La transformación de estas células induce típicos cambios en la morfología celular, que incluyen redondeamiento, pérdida de la inhibición por contacto, aumento de la cantidad de finas y elongadas proyecciones celulares y crecimiento en domos o en suspensión (136,169,170,171,172).

La sobreexpresión de variantes virales de Ras, Raf ó Src en fibroblastos NIH3T3 indujo todos los cambios arriba descritos (Figura 14A), si bien la morfología inducida por cada oncogén mantuvo aspectos característicos de cada uno. La expresión de v-Ras produjo un importante redondeamiento celular y una disminución de la adhesividad, así como la formación de proyecciones celulares que llegaron a medir algunas centenas de micrones de largo. Se pudieron observar asimismo estructuras que semejaban podosomas que fueron confirmadas por tinción contra actina (Figura 14B), ya que los mismos son complejos citoplasmáticos de actina, vinculina y otras moléculas que están involucrados en la adhesión y secreción de proteasas de células invasivas (173). No se vieron diferencias en la presencia de los podosomas en presencia de S28N-

RalA (datos no mostrados). A mayor confluencia, se produjeron múltiples focos de sobrecrecimiento en estrecho contacto con la monocapa circundante.

Por otro lado, la expresión de v-Raf produjo un redondeamiento celular mucho mayor aún y una importante disminución de la adhesión celular al sustrato plástico, observándose continuamente células en suspensión que se mantenían viables. Este efecto se confirmó al observar que la siembra de las células NIH3T3-v-Raf que se encontraban en el sobrenadante del cultivo generó el mismo patrón de crecimiento, conteniendo células adheridas y no adheridas (datos no mostrados). En cambio, la expresión de v-Src mostró una menor influencia en la morfología celular. Se observó sobrecrecimiento sólo en alta confluencia y abarcando toda la monocapa, siendo menor la formación de domos (Figura 14A).

La inhibición de la actividad RalA en las células transformadas por estos oncogenes, mediante la coexpresión de S28N-RalA, una variante dominante negativa de RalA, revirtió estas modificaciones, observándose un gran aumento de la adhesión al plástico con disminución del redondeamiento y un importante aumento del *spreading*. Se observó crecimiento en estricta monocapa con una fuerte inhibición por contacto. Es importante destacar que las células adquirieron al mismo tiempo nuevas características no observadas ni en las células control ni en sus derivadas transformadas, como ser aumento del tamaño celular y una notoria alineación intercelular (Figura 14A).

También observamos diferencias en su comportamiento adhesivo y de *spreading* si las células expresaban S28N-RalA. Estas diferencias se mantuvieron independientemente del tiempo de cultivo, lo que sugiere que no se deben

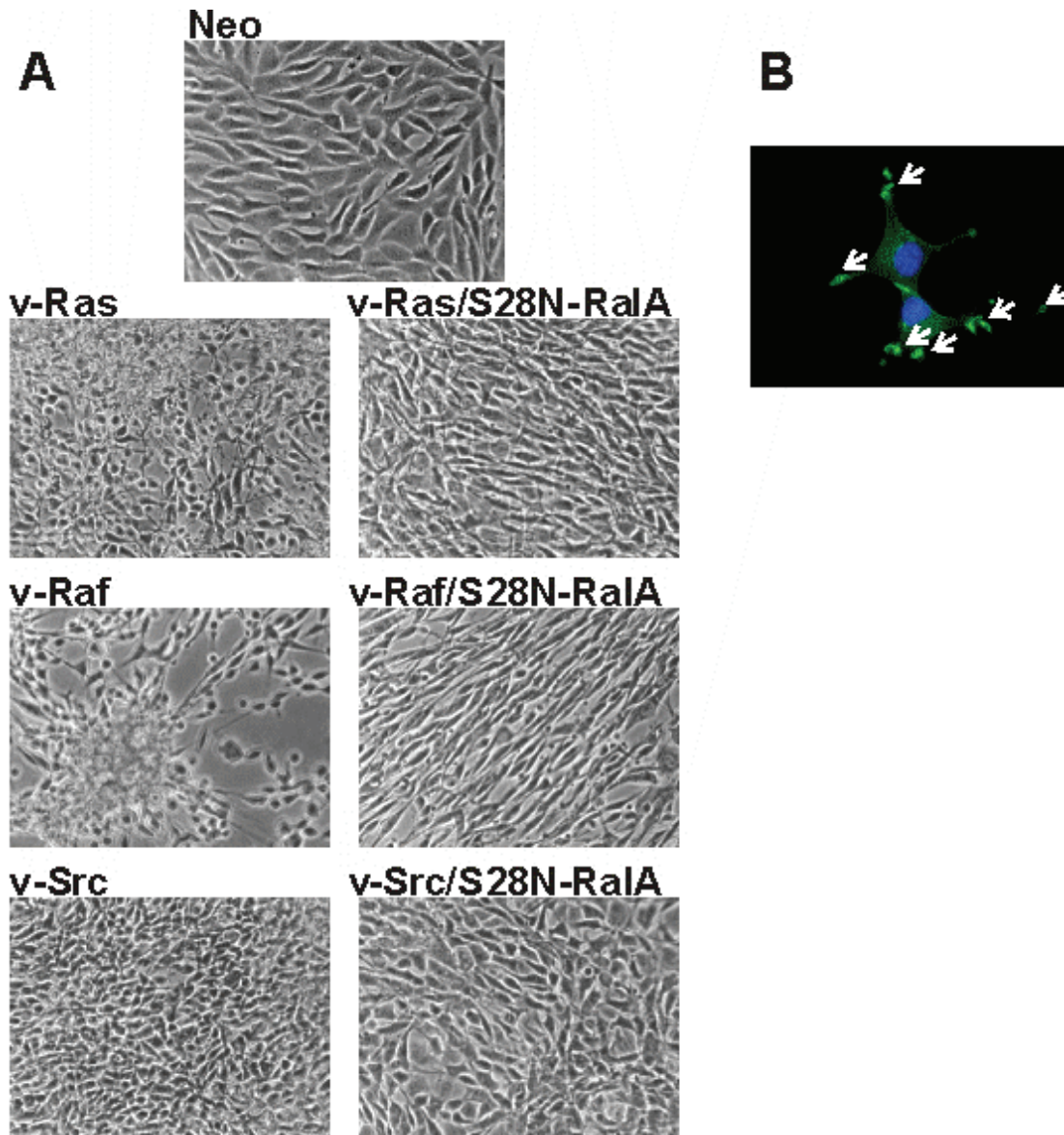
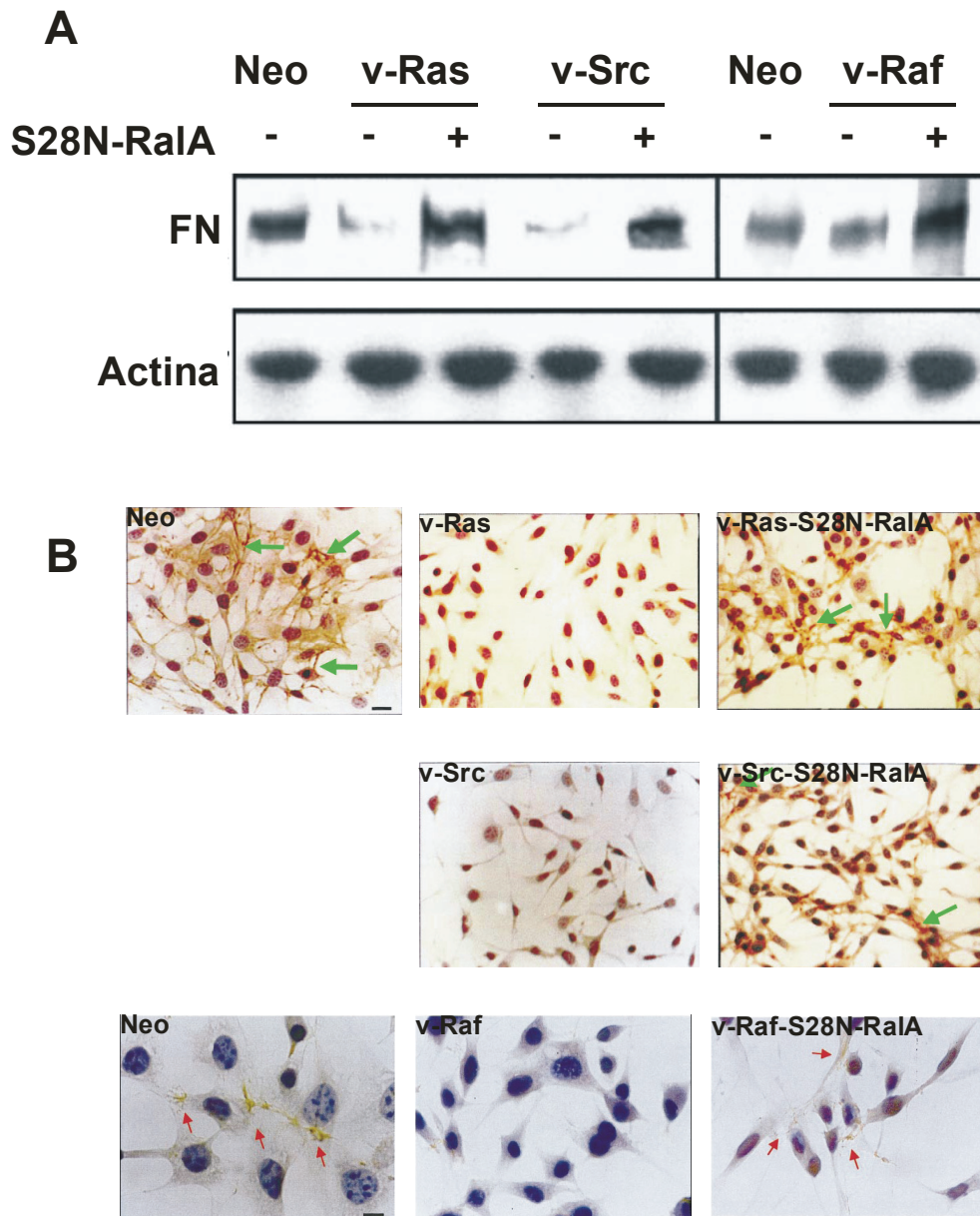


Figura 14 – A, Imágenes de microscopía de contraste de fase, mostrando los cambios morfológicos inducidos por los oncogenes. Puede observarse la inducción de procesos y el redondeamiento celular por la sobreexpresión de v-Ras o v-Raf y la capacidad de crecer en múltiples capas inducida por cualquiera de los oncogenes. Estas y otras características morfológicas fueron revertidas por la coexpresión de la dominante negativa de RalA, S28N-RalA. 200X. B, Ejemplo de observación de podosomas en células NIH3T3-v-Ras según tinción con faloidina (1000x).

a un aumento del tiempo necesario para que las células transformadas por los oncogenes lleguen al mismo estado que las células control o doble transfectantes. Además observamos que durante los primeros 30 minutos las células transformadas por v-Ras se pegaron y extendieron más rápidamente que las células Neo o que las v-Ras/S28N-RalA, pero que, a partir ese tiempo, primero desaparece y luego revierte (datos no mostrados).

### **RalA modula la expresión de fibronectina**

Uno de los principales reguladores de la morfología celular es la matriz extracelular. Se conoce que la transformación por Ras en fibroblastos inhibe la expresión de fibronectina (174,175). Por ello, en primer lugar se estudió si la transformación con v-Ras, v-Raf ó v-Src modulaba la expresión de fibronectina y la capacidad de formar una matriz fibrilar en forma dependiente de la actividad de RalA. Para ello, se realizaron ensayos de Western blot, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia contra fibronectina (FN) en las siete líneas celulares. Se observó que, mientras que la expresión de los oncogenes indujo una profunda inhibición de la expresión de FN, la inhibición de la actividad RalA por la coexpresión de S28N-RalA restauró los niveles de expresión a valores semejantes a los de las células control (Neo) (Figura 15A), sugiriendo que estos oncogenes precisan de la actividad RalA para ejercer su efecto inhibitorio de la expresión de FN. Asimismo, la capacidad de inhibir la fibrillogénesis se perdió por la expresión de S28N-RalA (Figura 15B).



**Figura 15 – Western blot (A) e inmunohistoquímica (B) contra fibronectina (FN) de células NIH3T3 expresando los distintos oncogenes y/o S28N-RalA. Obsérvese que tanto la expresión como la fibrillogénesis de la fibronectina endógena se vio notoriamente disminuida por la expresión de los oncogenes, mientras que la coexpresión de S28N-RalA fue capaz de restaurar los valores a niveles similares a los controles. Resultados representativos de al menos 3 experimentos independientes.**



## **La configuración del citoesqueleto de actina depende de la actividad RalA**

A continuación se estudió del papel de RalA en la configuración del citoesqueleto de actina de las células NIH3T3 transformadas con los distintos oncogenes. Los fibroblastos NIH3T3 no transformados (vector control, Neo) mostraron un citoesqueleto de actina organizado en haces denominados fibras de stress, con escasa actina cortical (Figura 16A) según ensayos de fluorescencia por tinción con faloidina conjugada con Rhodamina. Estas células, de morfología mayoritariamente bipolar y elongada, contenían haces de actina que atravesaban todo el citoplasma, así como haces más cortos en lamelas o filopodia.

En cambio, la transformación con los diferentes oncogenes indujo una marcada desaparición de las fibras de stress, observándose una relocalización de la actina fibrilar hacia la periferia celular, formando un anillo de actina cortical (Figura 16A). Este efecto fue evidente en más del 90% de las células observadas. Sólo en algunas células con prominentes lamellipodia pudo observarse una pequeña formación de fibras, muy finas y cortas, sobre el frente de avance, que nunca se vio acompañada de la formación de fibras de stress maduras que atravesaran el citoplasma (no mostrado).

La coexpresión de S28N-RalA no sólo fue suficiente para reestablecer las formación fibras de stress en estas células, sino que el número de fibras y su tamaño fueron notoriamente mayores a los observados en las células control (Figura 16A). Estas células mostraron un grado de *spreading* mayor que las

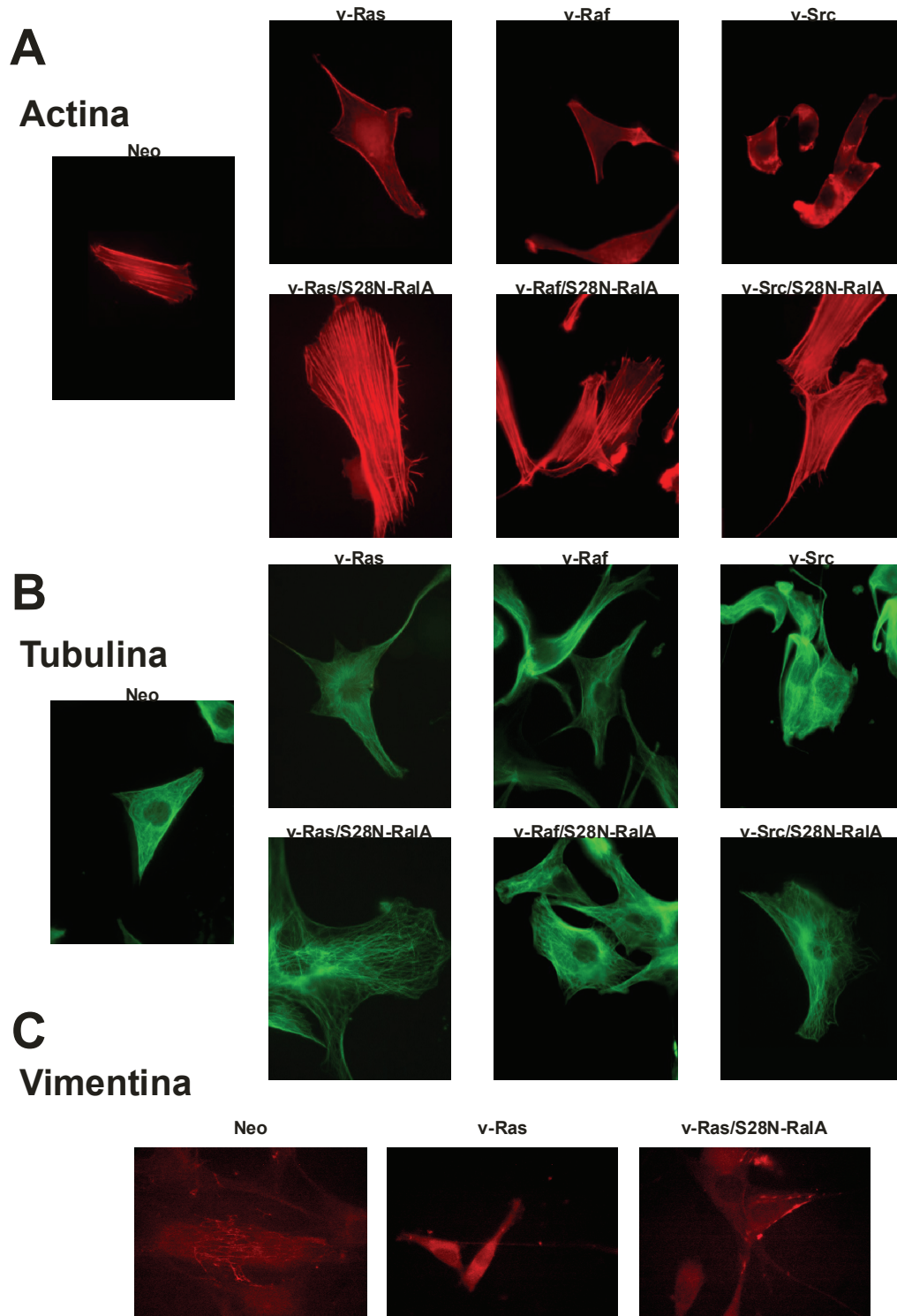


Figura 16 – Imágenes de fluorescencia contra actina (A),  $\beta$ -Tubulina (B) y Vimentina (C). Nótese la disminución de las fibras de stress de actina inducida por la expresión de los oncogenes (A). La coexpresión de S28N-RalA indujo un aumento de la cantidad y tamaño de las fibras por

células transformadas e incluso mayor que las células control. Todas las proyecciones celulares contenían una importante red de fibras de stress. La restauración de las fibras de stress fue observada en la vasta mayoría de las células estudiadas.

Imágenes similares a las observadas por tinción con faloidina se obtuvieron mediante ensayos de inmunofluorescencia contra actina (datos no mostrados).

### **La contribución de RalA sería menor en la conformación de los microtúbulos y de los filamentos intermedios**

Al contrario que en el caso de los microfilamentos de actina, la organización de los microtúbulos no mostró mayores diferencias en ninguna de las células estudiadas (Figura 16B). Se ha descrito que la sobreexpresión de oncogenes es capaz de alterar la organización de los microtúbulos (176,177). Aunque se observó en estas células que al expresar los oncogenes aparecía una tin-

**Figura 16 (Continuación) – sobre los niveles control. En cambio, el efecto de la expresión de las distintas construcciones fue mínimo en la localización de los microtúbulos (B). Si bien la expresión de Ras indujo una marcada deslocalización de los filamentos intermedios de vicentina (C), la coexpresión de S28N-RalA fue incapaz de restaurar completamente la estructura observada en las células control. Campos representativos de al menos duplicados por tipo celular por tinción en tres experimentos independientes. 1000X.**

ción difusa con mayor intensidad que en las células control (sugiriendo la existencia de tubulina soluble), en todos los casos se observó una importante red de microtúbulos que recorría todo el cuerpo celular.

Se estudió asimismo el rol de la vía Ras/Ral en la organización de los filamentos intermedios. Se observó que la expresión de v-Ras fue capaz de alterar la distribución de vimentina en estas células; sin embargo, la coexpresión de S28N-RalA restauró tan sólo muy parcialmente esta organización (Figura 16C). Así, las células doble transfectantes mostraron un cierto grado de formación de filamentos intermedios hacia la periferia celular, siendo muy escaso el número de células que mostraron una red importante de vimentina por todo el citoplasma. No se observó una asociación entre el grado de polimerización de vimentina y la morfología y *spreading* celulares, según la observación por contraste de fase (datos no mostrados).

### **La formación de complejos de adhesión focal es inhibida por la actividad RalA**

Dado que se han observado cambios dependientes de RalA tanto en la conformación de la MEC como de los microfilamentos de actina, se estudió si los oncogenes modificaban las estructuras que unen estos dos sistemas, los complejos de adhesión focal (FACs). Para ello, se realizaron ensayos de Western blot e inmunofluorescencia contra vinculina, una molécula estructural de los FACs y comúnmente utilizada como marcador de estas estructuras (84) e integrina  $\beta_1$ , un receptor de moléculas de MEC capaz de inducir la formación de FACs.

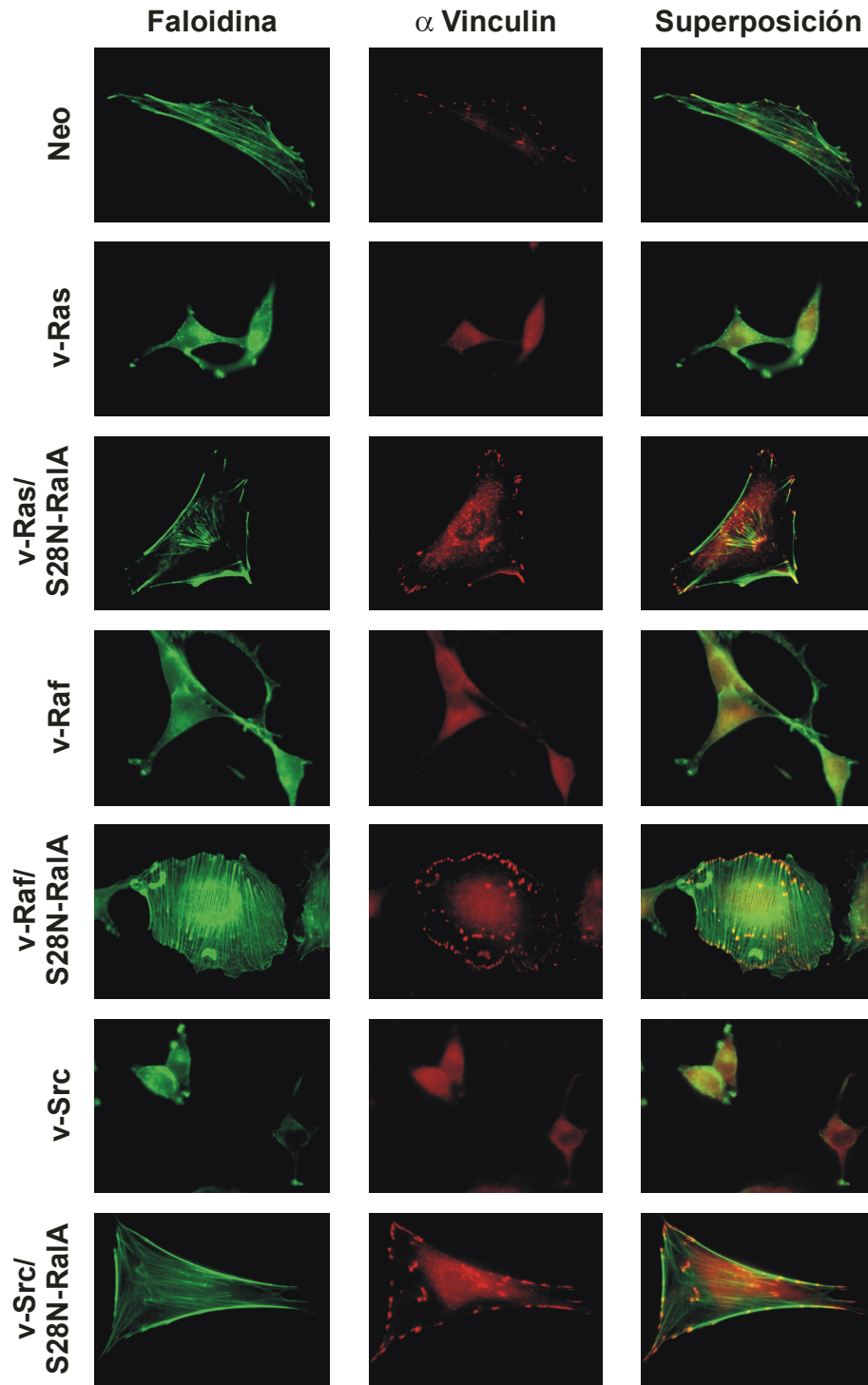


Figura 17 – Imágenes de tinción con faloidina para la detección de actina F (verde) e inmunofluorescencia contra Vinculina (rojo) para la detección de las FAC. En la columna de la derecha puede observarse la superposición de las dos imágenes. Las zonas marcadas en amarillo sugieren colocalización entre los complejos de adhesión focal, según

Las células NIH3T3-Neo mostraron un importante marcación contra vinculina similar a la reportada para los FACs en ésta (62,178) y otras (179) líneas celulares, que se distribuyó, según ensayos de doble marcación con anti-vinculina y faloidina, en los extremos de las fibras de stress (Figura 17), confirmando que los acúmulos detectados eran *bona fide* complejos de adhesión focal. La expresión de los oncogenes indujo la deslocalización de vinculina, observándose una marcación difusa en toda la periferia celular. En cambio, la coexpresión con S28N-Ra1A revirtió estos cambios y, al igual que lo observado en la distribución de actina, el número y el tamaño de los FACs fue aún mayor que en las células control (Figura 17). Del mismo modo que en las células Neo, estos complejos de adhesión focal colocalizaron con los extremos de las fibras de stress.

### **Los oncogenes inducen la delocalización de integrina $\beta_1$ por una vía que depende de la actividad Ra1A**

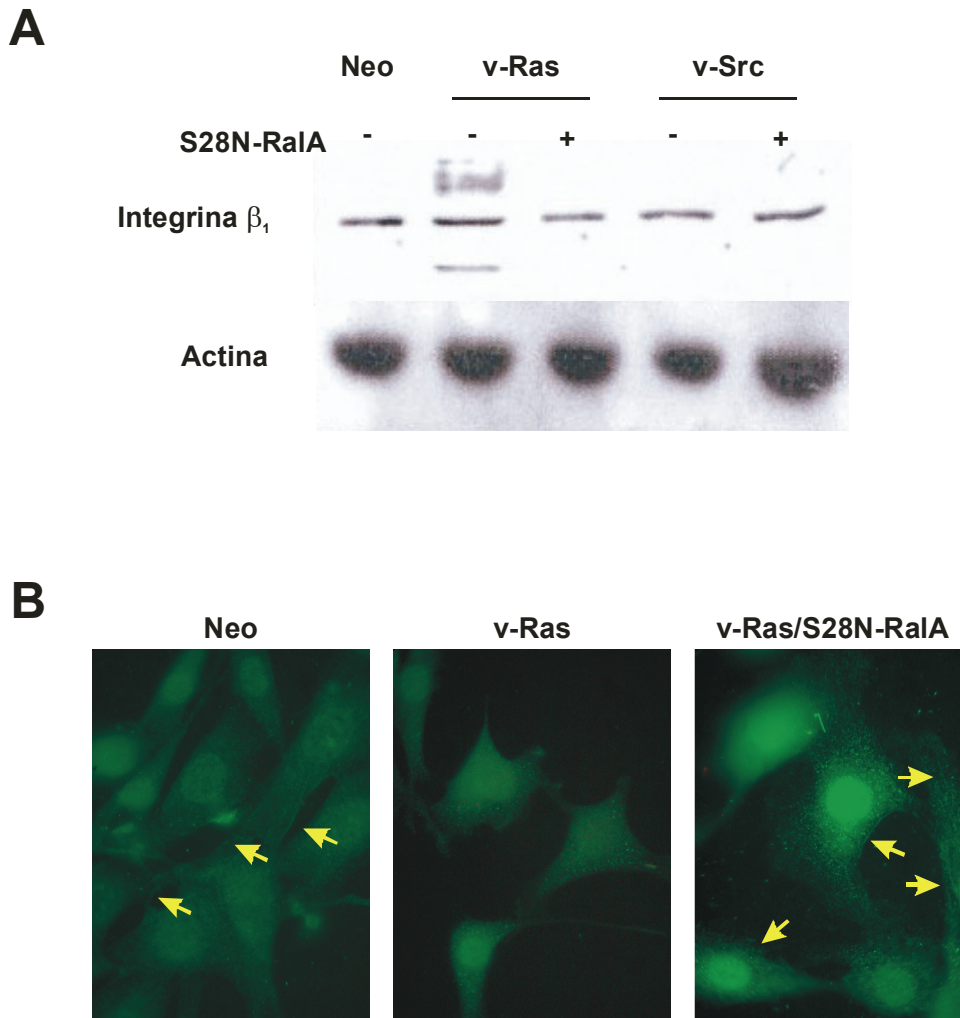
La integrina  $\beta_1$  es un importante receptor de moléculas de la MEC y funciona como nexo entre ésta y el citoesqueleto. Por ello, se estudió la expresión y localización de esta molécula en función de la actividad de los oncogenes y de Ra1A. Ni la sobreexpresión de los oncogenes v-Ras ó v-Src, así como tam-

**Figura 17 (Continuación) – la tinción contra vinculina y los extremos de las fibras de stress, según la tinción con faloidina. Nótese la tinción difusa y la ausencia de colocalización en las células transformadas por los oncogenes y su reaparición por la coexpresión de S28N-Ra1A. Campos representativos de triplicados en al menos 3 experimentos independientes. 1000X.**

poco la coexpresión de S28N-RalA modificaron el nivel de expresión de integrina  $\beta_1$ , según ensayos de Western blot (Figura 18A). La sobreexpresión de los oncogenes impidió la distribución localizada de esta proteína en puntos de membrana plasmática, induciendo en cambio una marcación difusa. La coexpresión de S28N-RalA restauró la localización de integrina  $\beta_1$ , sugiriendo que los oncogenes modifican, de forma dependiente de RalA, la localización y no el nivel de expresión total de integrina  $\beta_1$  (Figura 18B).

### **v-Ras inhibe la expresión de Tropomiosina (TM)-2 de forma dependiente de RalA**

La familia de las tropomiosinas cumple la función de estabilizar la actina F polimerizada en fibras de stress al inhibir la acción de gelsolina y ADF/cofilina, moléculas promotoras de la despolimerización de actina (63,64,65). En células que presentan fibras de stress las moléculas de TMs co-localizan con ellas. Dado que es sabido que variantes activadas de Ras reprimen la expresión de tropomiosinas (especialmente 1 y 2) y que la desaparición de las fibras de stress inducida por este oncogén depende de la inhibición de la expresión de TMs, se estudió por Western blot la expresión de estas moléculas. Para ello se utilizó un anticuerpo que reconoce varias proteínas de esta familia, ya que los fibroblastos NIH3T3 expresan múltiples isoformas, siendo TM-1 y TM-2 formas predominantes (91,93,180). Se observa en la Figura 19A que la expresión de v-Ras, pero no de v-Raf, reprimió fuertemente la expresión de TM-2 de forma dependiente de RalA ya que la coexpresión de S28N-RalA restauró su expresión a un nivel similar al de las células Neo. v-Src indujo una menor disminución de la expresión de TM2. Este resultado fue confirmado por



**Figura 18 – Ensayos de Western blot (A) e inmunofluorescencia (B) contra integrina  $\beta_1$ . Nótase que si bien la expresión de los oncogenes o de la dominante negativa de RalA no modificaron los niveles de expresión de esta integrina, el oncogén indujo la pérdida de su localización en la periferia celular, mientras que la coexpresión de S28N-RalA fue capaz de restaurarla. Resultados representativos de al menos tres experimentos independientes. B, 1000X.**



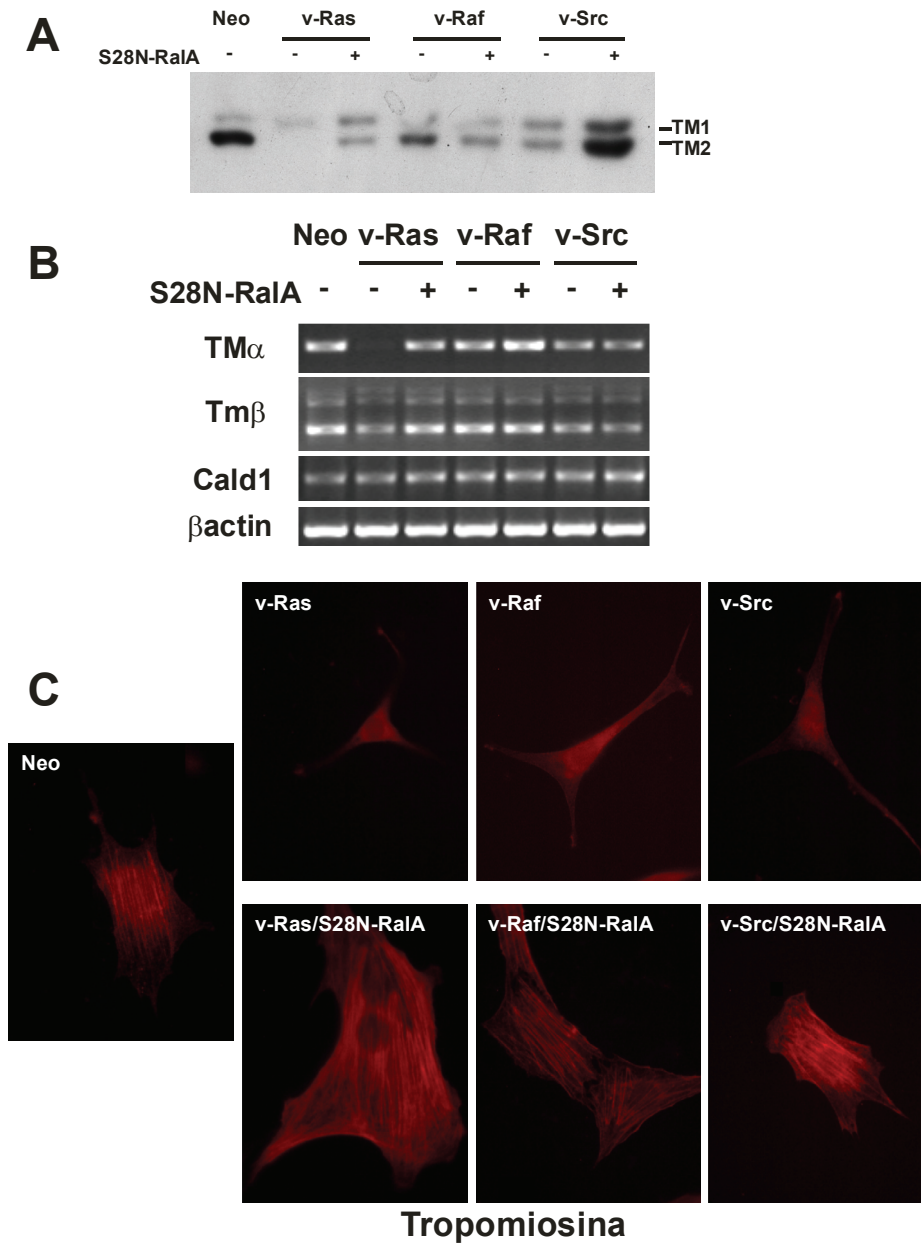
RT-PCR contra  $\alpha$ -tm (que codifica para TM-2, 3, 5a, 5b y 6) o  $\beta$ -tm (codificante para TM-1) (Figura 19B).

### **La expresión de los oncogenes v-Ras, v-Raf ó v-Src induce una delocalización de las restantes TMs dependiente de RalA**

Si bien el nivel de inhibición de la expresión de TM-2 depende del oncogén expresado, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia a fin de estudiar si la localización de estas moléculas podía ser regulada por estos oncogenes. Las células control mostraron una localización de tropomiosinas en fibras a lo largo de la célula (Figura 19C). La desaparición de las fibras de stress inducida por los oncogenes se acompañó de la delocalización de las TMs, observable por una tinción difusa citoplasmática. Este efecto fue dependiente de la actividad RalA, ya que la coexpresión de S28N-RalA restauró la localización de las TMs de manera similar a la reaparición de las SFs. Ensayos de doble marcaje demostraron una completa colocalización entre TMs y actina F en todas las células que presentaron fibras de stress (datos no mostrados).

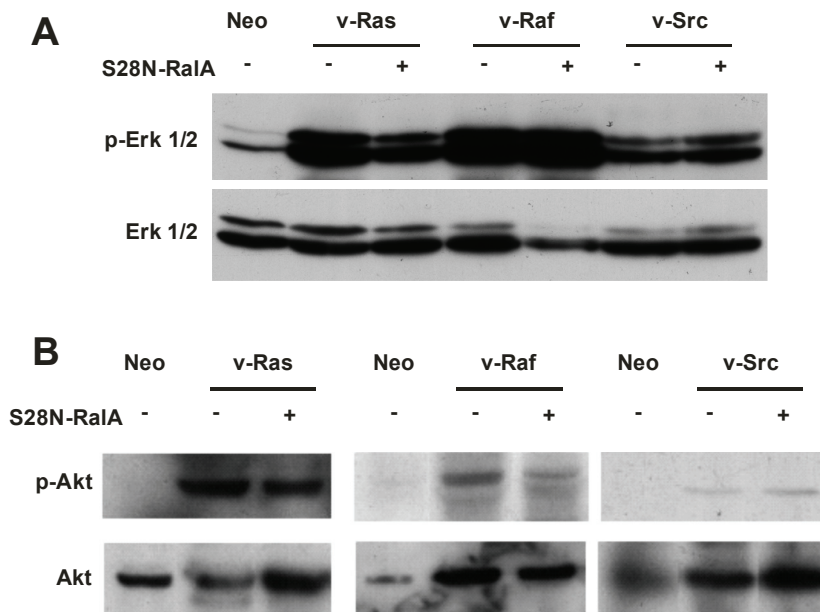
### **La señalización de RalA es independiente de Mek1/2 y PI3K**

En distintos modelos la actividad de Mek ó PI3K pueden mediar la transformación inducida por Ras y que la dominante negativa S28N-RalA podría estar interfiriendo con la activación de estas moléculas. Por ello, se decidió estudiar, a modo de control del modelo, si la coexpresión de S28N-RalA modulaba la activación de Mek ó PI3K inducida por los oncogenes. Según ensayos de



**Figura 19 – Ensayos de Western blot (A), RT-PCR (B) e inmunofluorescencia (C) contra Tropomiosina 2. Nótese que, si bien sólo la expresión de v-Ras es capaz de inhibir la expresión de TM-2 tanto a nivel de proteína como de mRNA (A y B), los tres oncogenes inducen la delocalización de las tropomiosinas (C). La expresión de S28N-RalA restaura no sólo la expresión de TM-2 en el contexto del oncogén v-Ras, sino la localización sobre las fibras de stress en las tres líneas. Resultados representativos de tres (A y C) o dos (B) experimentos independientes. C, 1000X.**

Western blot en ausencia de suero, no se encontraron diferencias en los niveles de fosforilación Erk1/2 y Akt, moléculas río abajo de las cascadas de estas Mek y PI3K respectivamente (Figura 20). Estos resultados demuestran que RalA no modula la activación de Mek ó PI3K y aseguran que la expresión de la mutante dominante negativa impone una inhibición selectiva a la vía Ral.

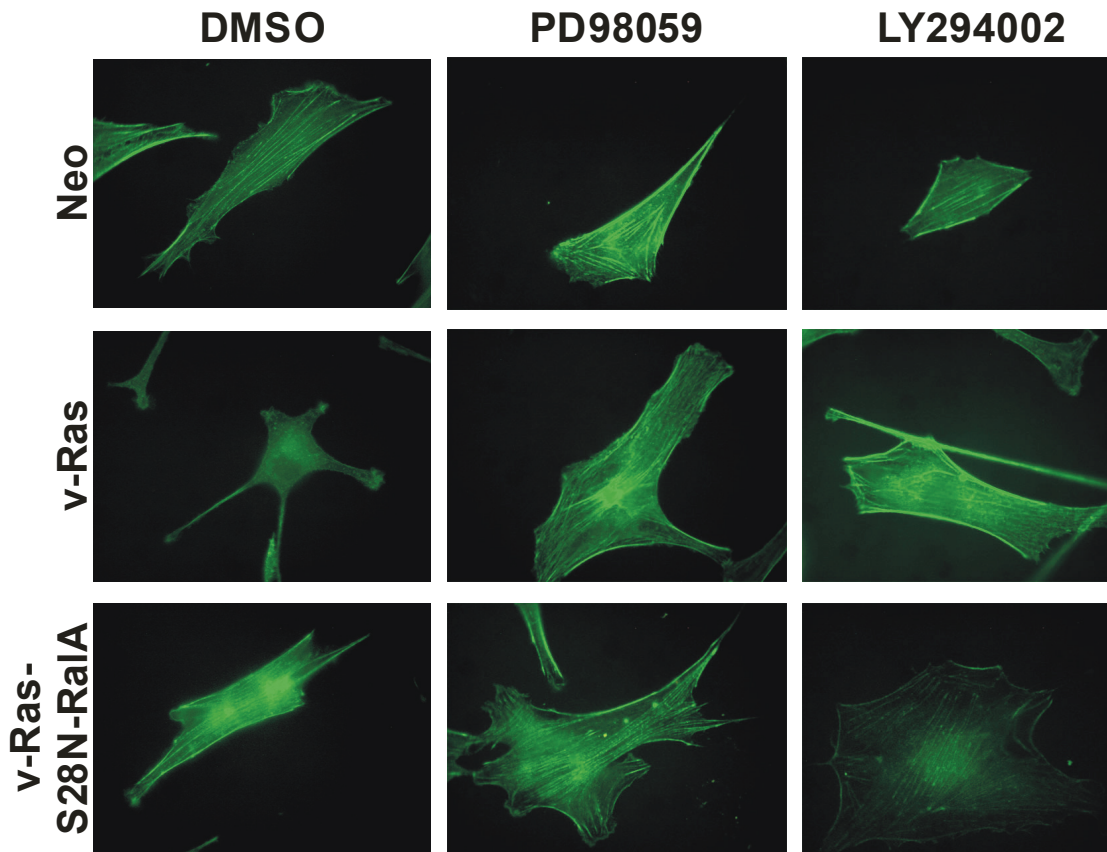


**Figura 20 – La expresión de la dominante negativa S28N-RalA no inhibe la activación de las vías Raf/MEK/Erk ó PI3K/PDK/Akt, según determinaciones del estado de fosforilación de Erk1/2 (A) o Akt (B). En ambos paneles, arriba se muestra el Western blot contra la forma fosforilada de la proteína, mientras que abajo se muestra el resultado del revelado contra la proteína total en la misma membrana. Resultados representativos de dos experimentos independientes.**

## **La activación de las vías MEK/Erk y PI3K/Akt es necesaria para la desaparición de fibras de stress inducida por v-Ras de forma paralela a RalA**

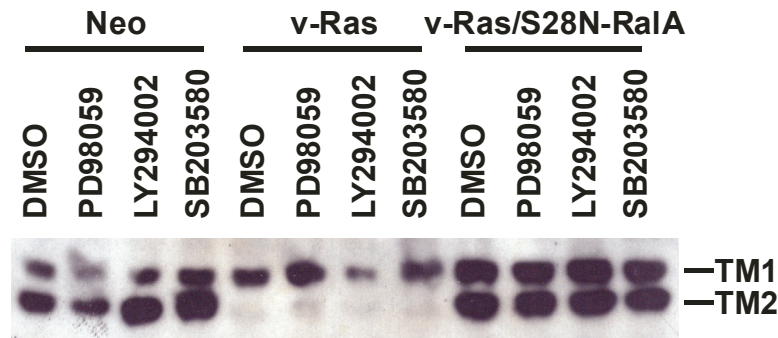
Ras puede promover la desaparición de fibras de stress por múltiples mecanismos. Para entender con mayor profundidad este sistema, se analizó la distribución de la actina F en estas células en presencia de inhibidores de las quinasas activadas por este oncogén. La Figura 21 muestra que la inhibición de la vía Raf/Mek/ERK por tratamiento con PD98059 ó de PI3K/AKT por tratamiento con LY294002 inhiben, al menos en parte, la acción del oncogén Ras sobre las fibras de stress de actina. Al igual que en las células control, en las células NIH3T3-v-Ras/S28N-RalA estos inhibidores no modificaron sustancialmente la conformación de las fibras de stress. Estos resultados demuestran que, además de RalA, las vías Raf/Mek/Erk y PI3K/Akt son necesarias para la desaparición de las SFs.

Se estudió entonces si estas vías conducían a cambios en los niveles de expresión o en la localización de TMs. Se encontró que la inhibición farmacológica de Mek ó PI3K inducen la relocalización de TMs en fibroblastos transformados por el oncogén de forma similar a la formación de fibras de stress (datos no mostrados). Sin embargo, estos tratamientos fueron incapaces de restaurar la expresión de TM-2 de cultivos paralelos de células transformadas con v-Ras (Figura 22). Tampoco fueron capaces de modificar la expresión



**Figura 21 – Ensayos de fluorescencia para la determinación de la organización de actina según tinción con faloidina en presencia de inhibidores de Mek ó Akt. Células creciendo en cubreobjetos fueron tratadas por 24 hs con 50  $\mu$ M PD98059 (inhibidor de MEK) ó 20  $\mu$ M LY 294002 (inhibidor de PI3K). Nótese la reaparición de las fibras de stress de actina en las células transformadas por v-Ras en presencia de los inhibidores. Campos representativos de duplicados en tres experimentos independientes. 1000X**

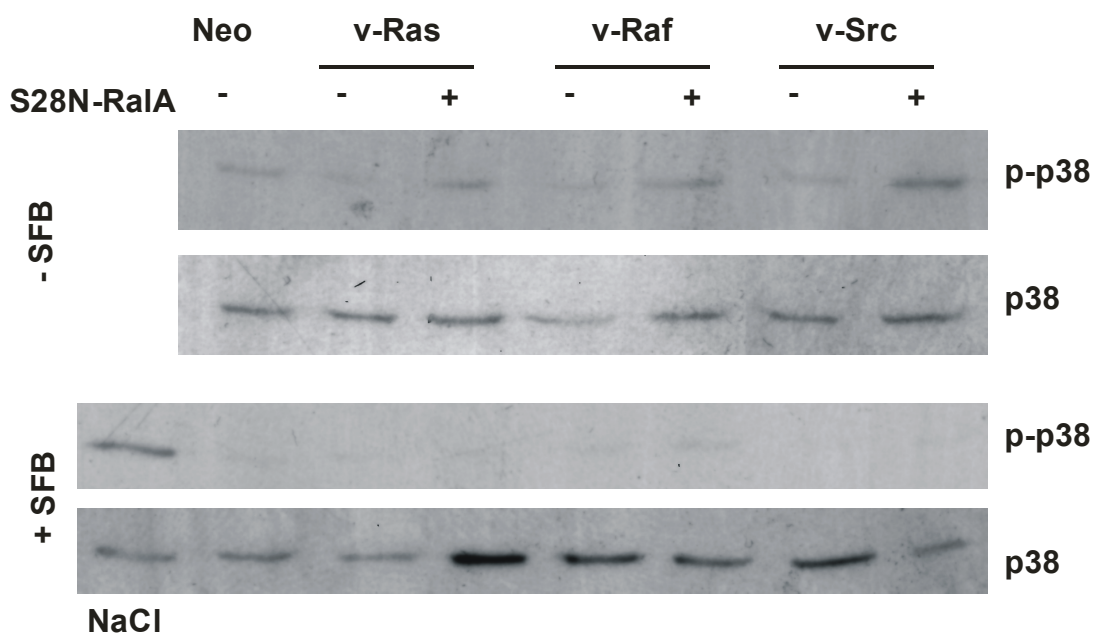
basal de las células control o de las doble transfectantes v-Ras/S28N-Ra1A. Estos resultados sugieren que las distintas vías río abajo de Ras inducen la desaparición de las SFs por diversos mecanismos, tanto dependientes como independientes de la regulación de TM-2.



**Figura 22 – Ensayos de Western blot para la detección de TMs en células NIH3T3 incubadas por 24 hs con 0.5% DMSO (control), 50  $\mu$ M PD98059, 20  $\mu$ M LY294002 ó 10  $\mu$ M SB203580. Nótese la ausencia de efecto de estos inhibidores en la expresión de TM-2. Resultados representativos de dos experimentos independientes.**

### **Ra1A inhibe la activación de p38**

Uno de los efectores de Ra1A es Ra1BP1, una molécula con actividad GAP específica para CDC42 y Rac. Estas moléculas tienen como efectores, a su vez, a las MAPKs de la subfamilia SAPK (proteína quinasas activadas por stress) JNK y p38. Se estudió entonces la capacidad de los oncogenes y de Ra1A de modular la activación de estas quinasas. La expresión de los oncogenes indujo un importante aumento en el nivel de fosforilación (activación) de JNK, el cual no fue modulado por la coexpresión de la dominante negativa S28N-Ra1A (datos no mostrados). En cambio, la expresión de los oncogenes disminuyó drásticamente el nivel de fosforilación de p38 en ausencia de suero y este efecto fue revertido por la coexpresión de la dominante negativa de Ra1A (Figura 23). En presencia de suero todas las líneas mostraron un bajo nivel de



**Figura 23 – Ensayos de Western blot para la determinación del estado de fosforilación (activación) de p38. Células en subconfluencia fueron incubadas por 24 hs en presencia (paneles inferiores) o ausencia (paneles superiores) de 10% SFB previamente a la lisis. Como control positivo de activación, células creciendo en presencia de 10% SFB fueron tratadas por 30 minutos con 0.5 M NaCl. Obsérvese que los oncogenes fueron capaces de inhibir la activación de p38 inducida por a ausencia de suero, y que la coexpresión de S28N-RaIA restaura dicha activación. Resultados representativos de tres experimentos independientes.**

activación de p38 (comparar contra el control positivo, tratamiento de 30 minutos con NaCl 0,5 M). Los oncogenes, en cambio, no fueron capaces de impedir la activación de p38 en respuesta a un stress intenso (tratamiento de 30 minutos con NaCl 0,5 M, datos no mostrados).

## **La activación de p38 es necesaria para la reaparición de las SFs inducida por la inhibición de RalA**

El balance entre Erk y p38 regula la expresión de TMs en fibroblastos (181), por lo que se estudió si p38 está involucrada en la regulación de las fibras de stress y la expresión de TM-2 mediada por RalA en estas células. Para ello, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia (Figura 24A y C) y de Western blot (Figura 21 y Figura 24B) de células tratadas con un inhibidor farmacológico de p38 (SB203580) o de células transfectadas de forma transiente con una variante dominante negativa de p38 $\alpha$ . La Figura 24 muestra que las células NIH3T3-v-Ras-S28N-RalA fueron incapaces de formar fibras de stress cuando p38 se mantuvo inhibida por cualquiera de los dos mecanismos (Figura 24 A y C). Asimismo, las TMs mantuvieron una marcación difusa en estas condiciones (Figura 24C). Sin embargo, la inhibición de p38 en las células Neo ó v-Ras/S28N-RalA fue incapaz de inhibir la expresión de TM-2 (Figura 22 y Figura 24B) de forma comparable al efecto inducido por v-Ras, por lo que RalA podría inhibir la formación de fibras de stress por más de un mecanismo.

Más aún, la activación forzada de p38 en células NIH3T3-v-Ras por sobreexpresión transiente de una variante constitutiva de MKK6 indujo la reaparición, al menos parcial, de las fibras de stress (Figura 25). Dicha actividad fue abolida por el tratamiento con el inhibidor de p38, SB203580 (Figura 25), sugiriendo que la vía MKK6/p38 sería suficiente para restaurar la configuración de los microfilamentos, aún en el contexto del oncogén v-Ras y la vía RalA funcional.



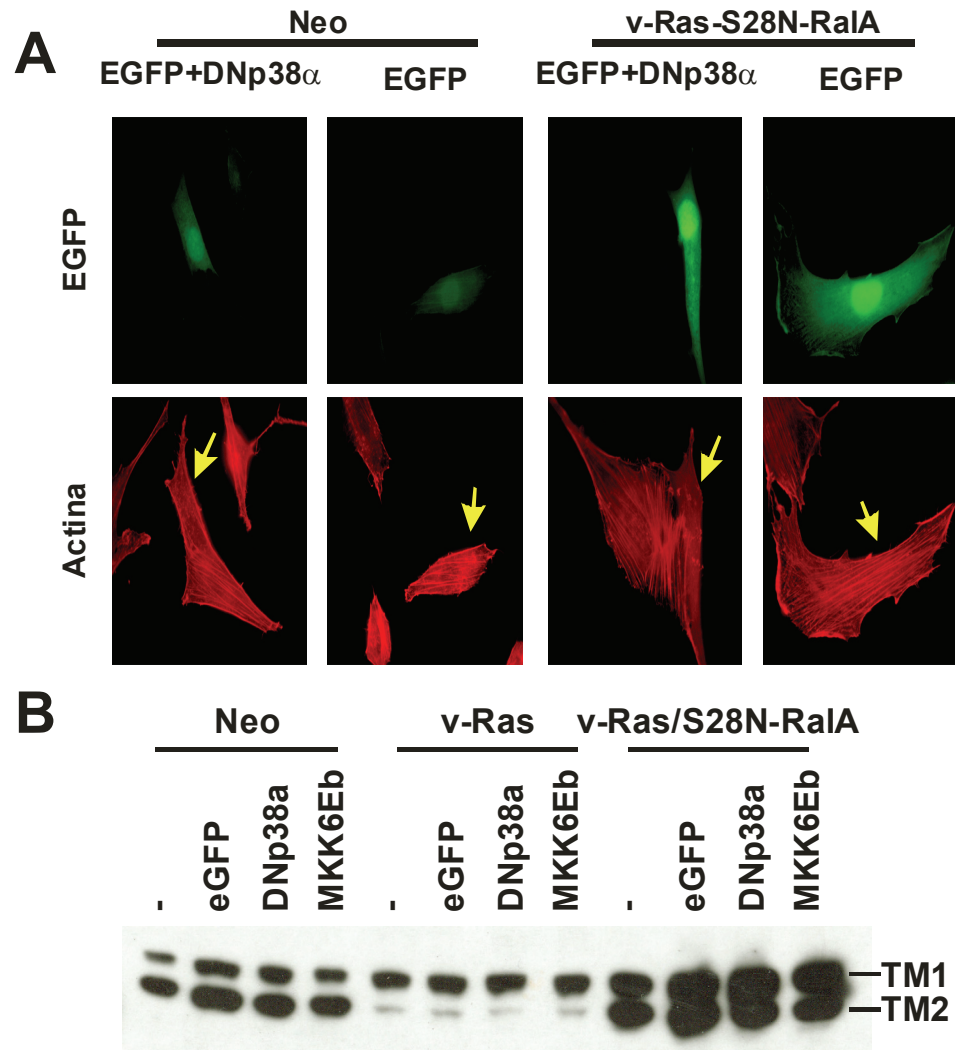
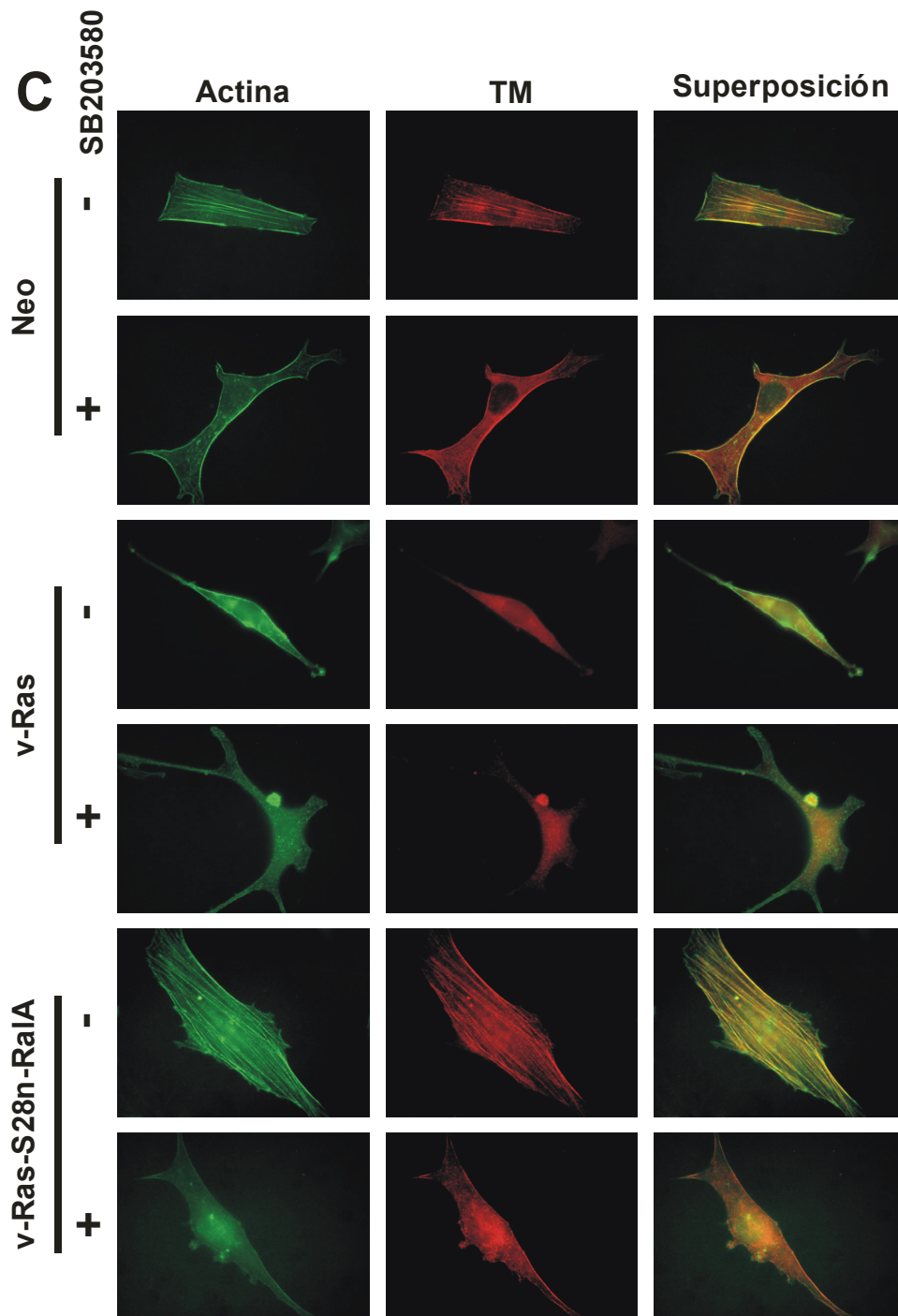
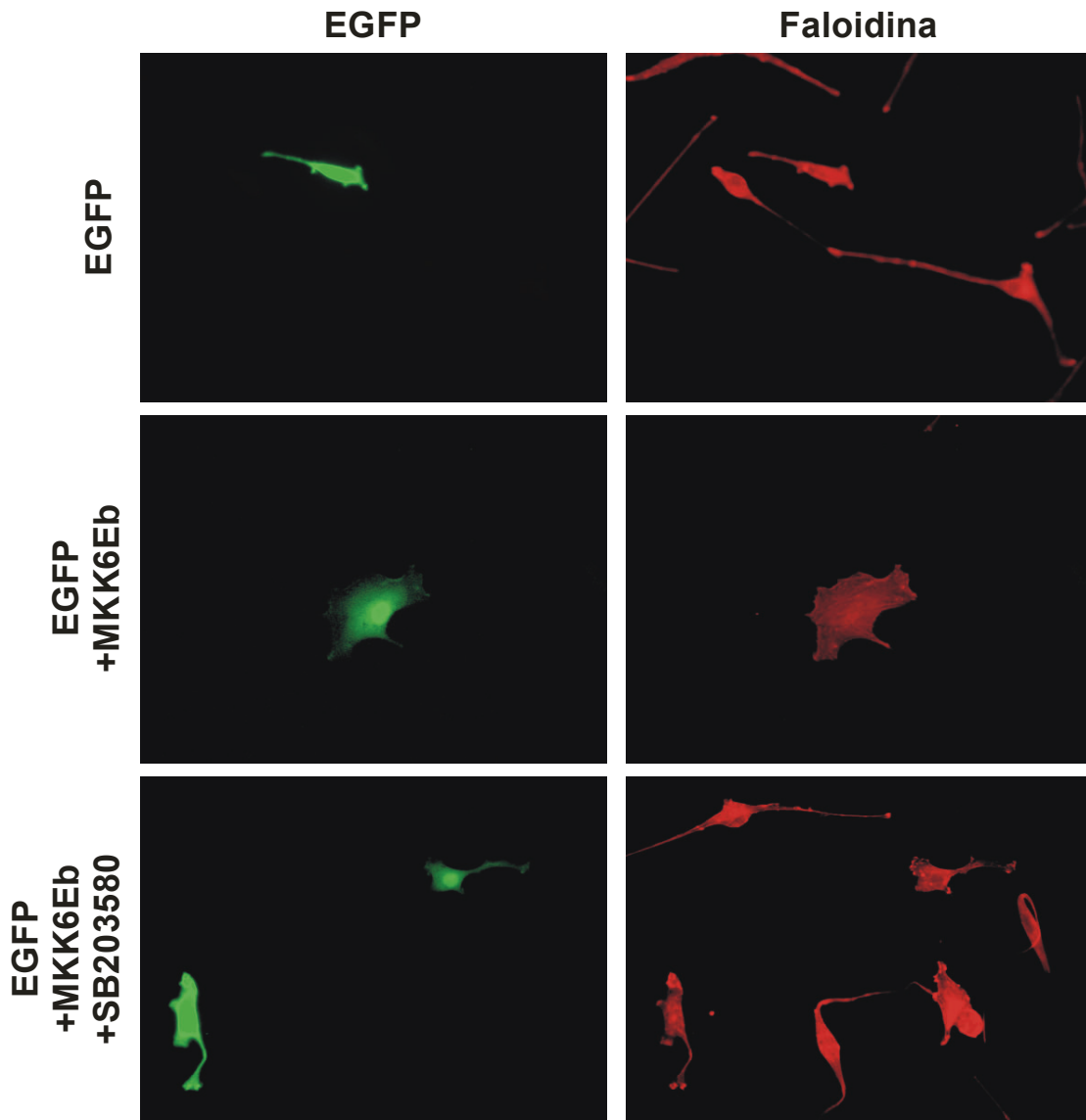


Figura 24 – A. Ensayos de tinción con faloidina en células NIH3T3-v-Ras expresando o no eGFP y una variante dominante negativa de p38 $\alpha$ . Las flechas marcan las células expresando eGFP como indicador de transfección. Nótese que el la pérdida de las SF por expresión de la dominante negativa de p38 sólo se observa en las células que expresan también eGFP y no en las células vecinas no transfectadas. B. Ensayo de Western blot para la determinación de la expresión de TMs en células transfectadas de forma transiente con la misma construcción dominante negativa o con una construcción constitutiva de MKK6, MKK6Eb. Resultados representativos de dos experimentos independientes.



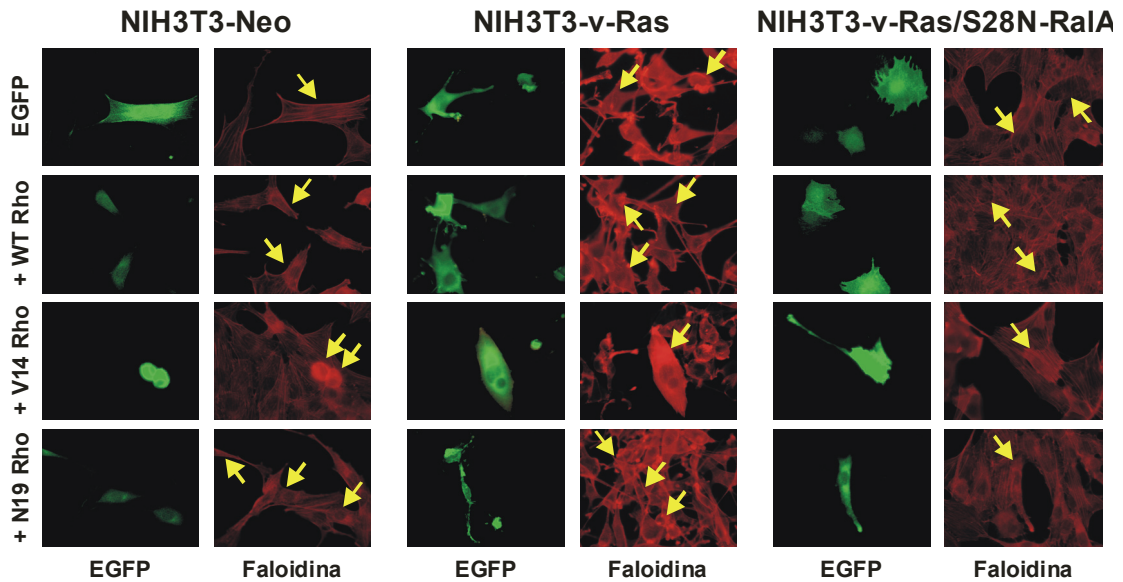
**Figura 24 – Continuación. C. Fluorescencia contra actina (verde) y TMs (rojo). Nótese la pérdida de las fibras de stress y colocación de actina y TMs inducida en las células Neo y en las doble transfectantes por tratamiento durante 24 hs. con 10  $\mu$ M SB203580. Resultados representativos de dos experimentos independientes en duplicado. A y C, 1000X.**



**Figura 25 – Ensayos de tinción con faloidina en células NIH3T3-v-Ras expresando o no eGFP y una variante constitutiva de MKK6, MKK6Eb. Nótese que la sobreactivación de MKK6 indujo la reaparición de las fibras de stress en estas células en ausencia, pero no en presencia de un inhibidor farmacológico de p38. Resultados representativos de dos experimentos independientes en duplicado. 400X**

## **RhoA es capaz de modular la formación de fibras de stress y la contractilidad celular aún en presencia de v-Ras en forma paralela o río debajo de Ra1A**

RhoA es el principal regulador de la conformación del citoesqueleto de actina en múltiples tipos celulares. Dado el alto grado de interacción entre las distintas GTPasas y que tanto Ras como Ra1A pueden regular la actividad de proteínas de la familia Rho, se decidió estudiar si RhoA mantenía su capacidad de regular la formación de fibras de stress en el contexto de la sobreexpresión del oncogén v-Ras y/o de la expresión de la dominante negativa S28N-Ra1A. Como se muestra en la Figura 26, una variante constitutiva de RhoA, V14-RhoA (182), incapaz de hidrolizar la molécula de GTP, pero no Rho Wt, fue capaz de inducir en ensayos de transfecciones transientes, una muy pronunciada contracción y formación de gruesas fibras de stress en las células NIH3T3, aún en la presencia del oncogén v-Ras. Asimismo, la formación de fibras de stress se vio reducida, tanto en las células NIH3T3-Neo como en las células NIH3T3-v-Ras/S28N-Ra1A por la sobreexpresión transiente de N19-RhoA (una mutante dominante negativa de esta molécula similar a la mutación S28N en Ra1A) (182), incapaz de unir GTP (Figura 26). Estos resultados sugieren que RhoA sería una vía paralela o río abajo de la vía Ras/Ra1A.

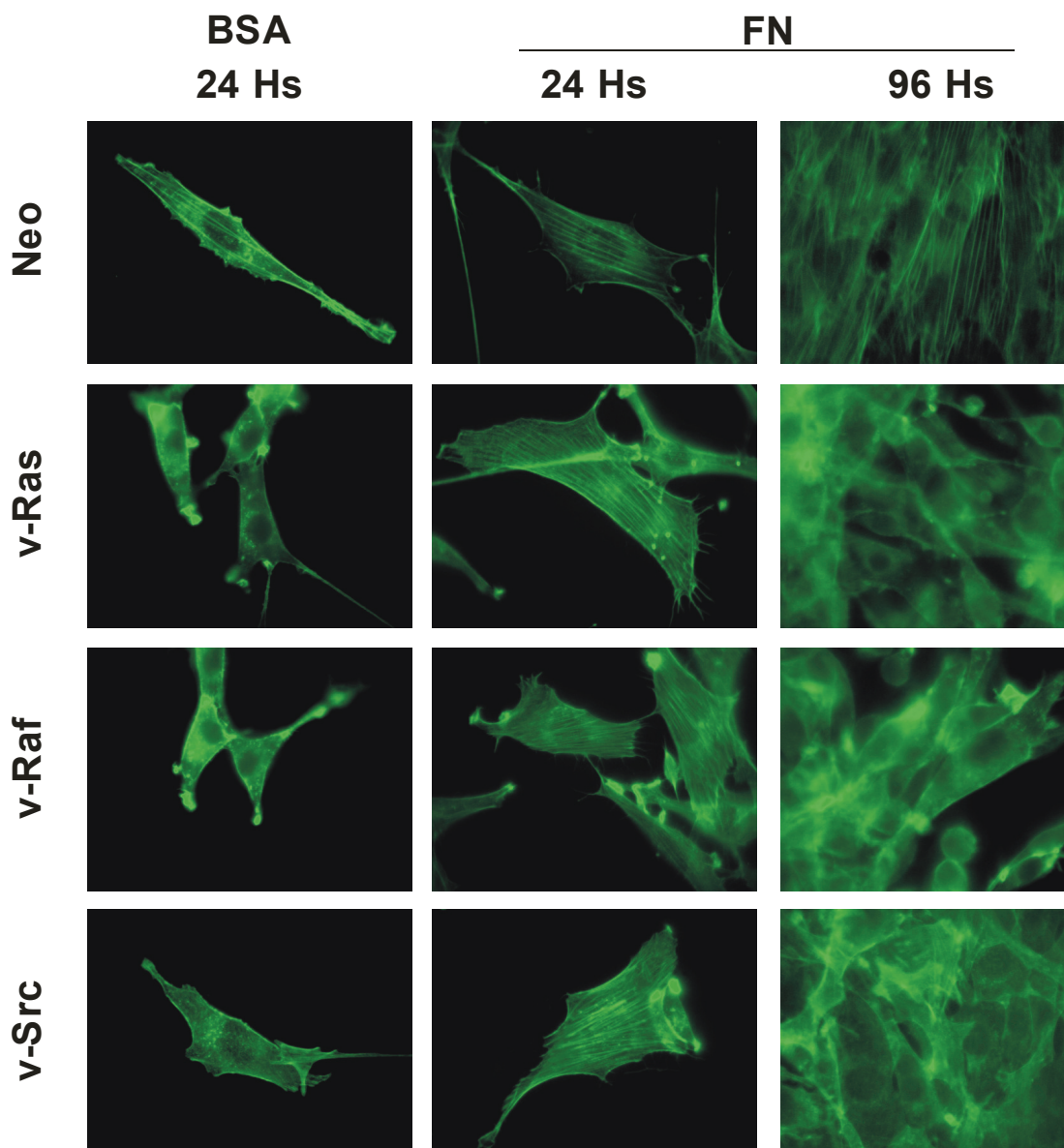


**Figura 26 – Estructura de los microfilamentos según tinción con faloidina-TRITC (rojo) en células expresando EGFP (verde) y un vector vacío (EGFP), RhoA (WT-Rho), una variante constitutiva (V14-Rho) ó una dominante negativa de RhoA (N19-Rho). Las flechas marcan las células transfectadas. Nótese la inducción de gruesas fibras de stress por la sobreexpresión de V14-Rho en las células NIH3T3-v-Ras y de una gran contracción en las células NIH3T3-Neo. Obsérvese también el aspecto más relajado con ausencia de fibras de stress en células Neo y v-Ras/S28N-Ra1A sobreexpresando N19-Rho. Resultados representativos de dos experimentos independientes en duplicado. 1000X**

## **Relación entre la capacidad de formación de fibrillas de fibronectina y la configuración del citoesqueleto de actina**

Se conoce que existe tanto regulación “outside-in” (regulación del citoesqueleto por la MEC a través de la formación de FACs) como “inside-out” (activación de la integrina  $\beta_1$  en los FACs por la polimerización de actina y, como consecuencia, fibrillogénesis) (53). Habiendo mostrado que los oncogenes v-Ras, v-Raf y v-Src en una vía dependiente de RalA, inducen profundos cambios tanto en la MEC como en la conformación de los microfilamentos y en la distribución de los FACs en fibroblastos NIH3T3, se realizaron ensayos para determinar a cuál de los dos mecanismos (“outside-in” ó “inside-out”), si a alguno de ellos, se debían los efectos observados en este modelo.

En primer lugar, se determinó si la ausencia de FN era la responsable de la desaparición de los FACs y de las fibras de stress inducida por la sobreexpresión de los oncogenes. Para ello, fibroblastos NIH3T3 sobreexpresando los oncogenes v-Ras, v-Raf ó v-Src se cultivaron sobre cubreobjetos a los que se les adhirió previamente FN (ensayo de coating) y se comparó la estructura del citoesqueleto luego de 24 h de incubación con la de fibroblastos crecidos sobre vidrio desnudo o recubierto con una proteína inespecífica (albúmina sérica bovina, BSA). Las células transformadas por los oncogenes y crecidas sobre BSA mostraron una relocalización de la actina de fibras de stress a actina cortical similar a la de las mismas crecidas sobre vidrio desnudo. En cambio, estas células, crecidas sobre fibronectina, mostraron una rica trama de fibras de stress, similar a la de las células control NIH3T3-Neo (Figura 27), sugiriendo que la sola presencia de FN es suficiente para inducir la formación de fibras de stress y

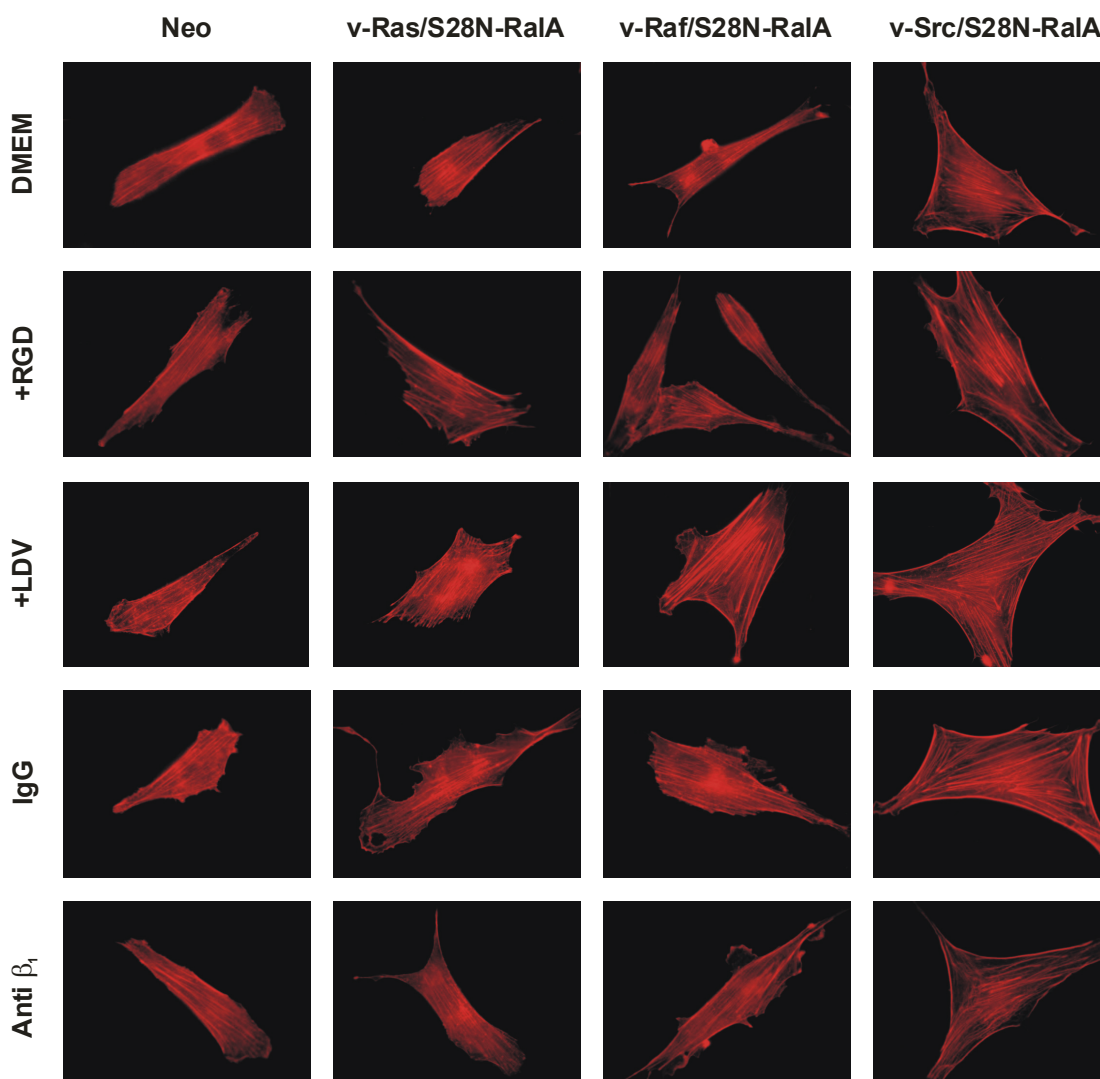


**Figura 27 – Organización de los microfilamentos en células NIH3T3 transformadas por los distintos oncogenes en cubreobjetos pretratados o no con fibronectina (FN) e incubados por 24 ó 96 hs. Nótese la reaparición de las fibras de stress luego de 24 hs de incubación sobre FN, pero no BSA y su desaparición luego de 96 hs. Resultados representativos de dos experimentos independientes en triplicado. 1000X**

la existencia de un mecanismo de regulación “outside-in”. La presencia de FN exógena indujo asimismo la formación de complejos de adhesión focal en los fibroblastos transformados (datos no mostrados). A las 96 h de incubación las células que expresaban los oncogenes volvieron a su fenotipo anterior, sugiriendo que la FN ejerce su efecto de forma transitoria y que al desaparecer la FN exógena derivada del coating por actividad de proteasas, este efecto desaparece.

Luego, se realizó el ensayo opuesto, es decir, se bloqueó la activación de las integrinas por la fibronectina endógena, producida por las propias células NIH3T3 control o por las células NIH3T3 transformadas con los oncogenes v-Ras, v-Raf ó v-Src y cotransfectadas con la dominante negativa de RalA (Figura 15). Se cultivaron las células sobre vidrio desnudo (para estudiar sólo la FN producida por las mismas células) en presencia o ausencia de péptidos antagonistas (conteniendo las secuencias RGD ó LDV) o anticuerpos bloqueantes de la unión FN-integrina  $\beta_1$ . Ningún tratamiento impidió la formación de fibras de stress o de los complejos de adhesión focal en estas células (Figura 28 y datos no mostrados), indicando que, si bien la presencia de FN es suficiente para la organización de los microfilamentos en fibras de stress y para la formación de los FACs, a la vez la fibronectina no sería necesaria para estos efectos, sugiriendo que otros mecanismos deben estar jugando un rol importante.



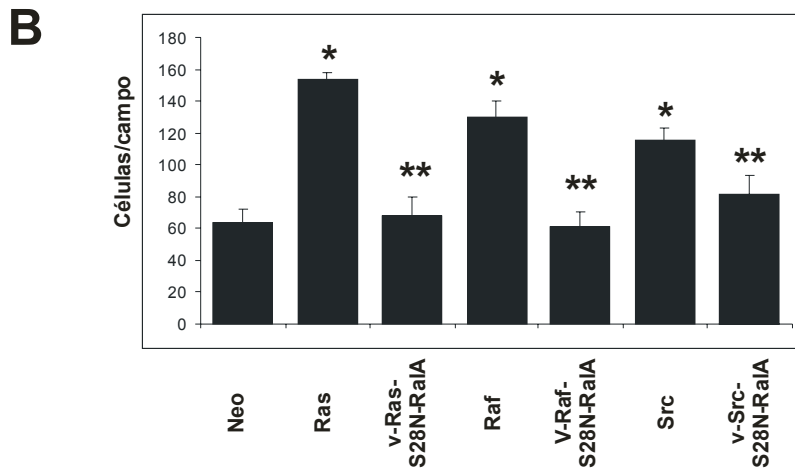
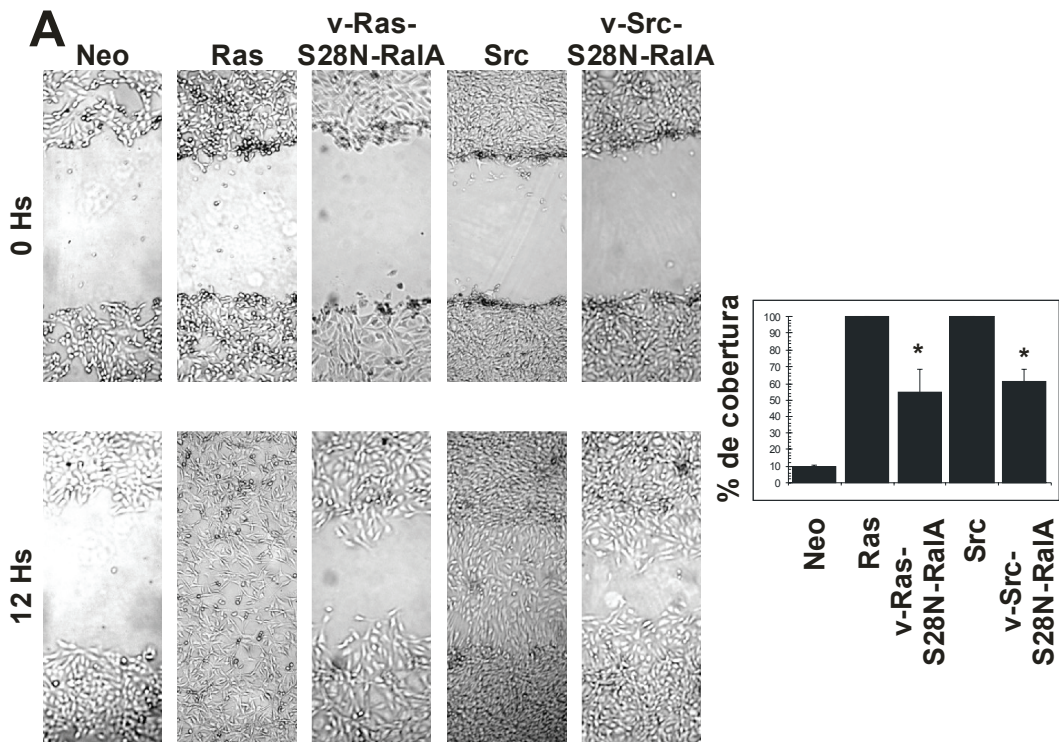


**Figura 28 – Conformación del citoesqueleto de actina en presencia de péptidos antagonistas (conteniendo las secuencias RGD ó LDV) o un anticuerpo bloqueante de la función integrina  $\beta_1$  en células NIH3T3-Neo ó expresando un oncogén y S28N-RalA. Nótese la ausencia de cambios por estos tratamientos. Resultados representativos de dos experimentos independientes en triplicado. 1000X**

### **RalA es necesaria para el aumento de la migración celular inducido por v-Ras, v-Raf y v-Src**

La migración celular depende en gran medida de la conformación del citoesqueleto y de la matriz extracelular (43,56,57). Dado que ambas estructuras se hallan modificadas en las células NIH3T3 transformadas por los oncogenes y que ello depende de la actividad de RalA, se investigó si los oncogenes inducían la migración celular por una vía de transducción dependiente de la actividad RalA. Para ello, se realizó un ensayo de migración en herida utilizando las células transformadas con v-Ras ó v-Src y sus doble transfectantes con S28N-RalA. Como puede observarse en la Figura 29A, la expresión de estos oncogenes induce un marcado aumento en la capacidad migratoria, llegando a cubrir toda la superficie de la “herida” en menos de 12 hs. En cambio, la coexpresión de S28N-RalA reduce notoriamente la capacidad de migración celular, observándose solamente una cobertura del 50% de la zona en el mismo lapso.

Dado que este experimento requiere de la formación previa de una monocapa y que las células NIH3T3-v-Raf son incapaces de formar una monocapa entera, se decidió estudiar también la capacidad migratoria mediante ensayos de migración en cámaras Transwell de poro de 8  $\mu\text{m}$ . Este ensayo consiste



**Figura 29 – Determinación de la capacidad migratoria de las distintas líneas celulares. A. Ensayo de herida en monocapa. Monocapas confluentes en placas de 6 wells fueron “heridas”, generando líneas sin células con la punta de un tip. Luego de lavados con PBS para eliminar las células no adheridas, se fotografiaron zonas de la herida (10X) y se incubaron por 12 hs en medio completo. Las mismas zonas se fotografiaron nuevamente (10X) y por medio de análisis de imágenes se**

en sembrar células en un lado de una membrana porosa y contar, luego de la incubación, células que atravesaron la membrana a través de sus poros. Para ello, se agrega medio de cultivo a ambos lados del filtro y las células se siembran en la cámara superior y se incuban por el tiempo deseado. En este experimento en particular, tanto el medio de cultivo de la parte superior como el medio de la parte inferior fueron idénticos y contenían sólo 10% SFB. Luego de 16 h de incubación, las células se fijaron en formol neutro y se contaron las células del lado inferior del filtro. La Figura 29B muestra que todos los oncogenes indujeron un marcado aumento de la capacidad migratoria celular, que fue notoriamente inhibido en las células que coexpresaban la dominante negativa S28N-RalA, apoyando la idea de que RalA, a través de la regulación de la configuración del citoesqueleto, media el aumento de la migración celular inducido por los oncogenes.

**Figura 29 (Continuación) – determinó el porcentaje de cobertura de cada “herida” (derecha). B. Ensayo de migración en cámara de Boyden. Las células se inocularon en la zona superior de un filtro de 8  $\mu$ m, se incubaron por 16 hs en medio completo y luego se cuantificó el número de células del lado inferior del filtro. Se grafica la media  $\pm$  SD del número de células por campo. \*,  $p < 0.05$  vs Neo; \*\*,  $p < 0.05$  vs oncogén sólo (n=3). Resultados representativos de al menos tres experimentos independientes**

### ***RALÁ EN LA MODULACIÓN DE LA SOBREVIDA CELULAR***

La señalización oncogénica implica más que un aumento de las capacidades migratoria y proliferativa. Para ser capaz de generar tumores, una célula debe poder sobrevivir frente a diversas situaciones y estímulos que provocarían la muerte a células no transformadas. Estos estímulos incluyen la ausencia de una matriz adecuada, interacciones inadecuadas entre células, falta de factores de crecimiento o supervivencia o inclusive la presencia de factores inductores de muerte, así como también hipoxia, bajos niveles de nutrientes, etc. Los oncogenes promueven la resistencia a estos estímulos mediante cascadas intracelulares de señalización, que derivan en la inhibición o represión de moléculas proapoptóticas y en la expresión y activación de moléculas antiapoptóticas. Esto implica que la célula transformada activa mecanismos generales de supervivencia que luego promoverán la resistencia a drogas quimioterápicas y radiación terapéutica

Por ello, es de suma importancia reconocer las señales de supervivencia celular con todo detalle, de forma de poder en el futuro cercano inhibir dichas vías, ya sea mediante la utilización de drogas, terapia génica o cualquier otra estrategia, y así promover la sensibilidad de las células tumorales al tratamiento anticanceroso utilizado.

### **La actividad RalA es necesaria para la supervivencia celular *in vivo***

Como ya se mencionó, en nuestro laboratorio y en otros se ha demostrado previamente que RalA es necesaria para la producción de tumores por

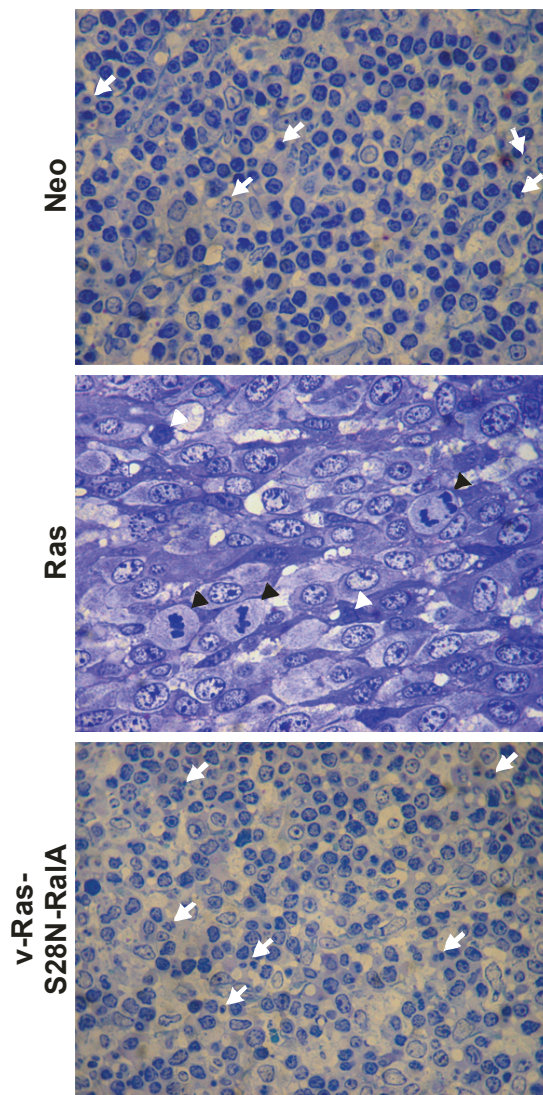
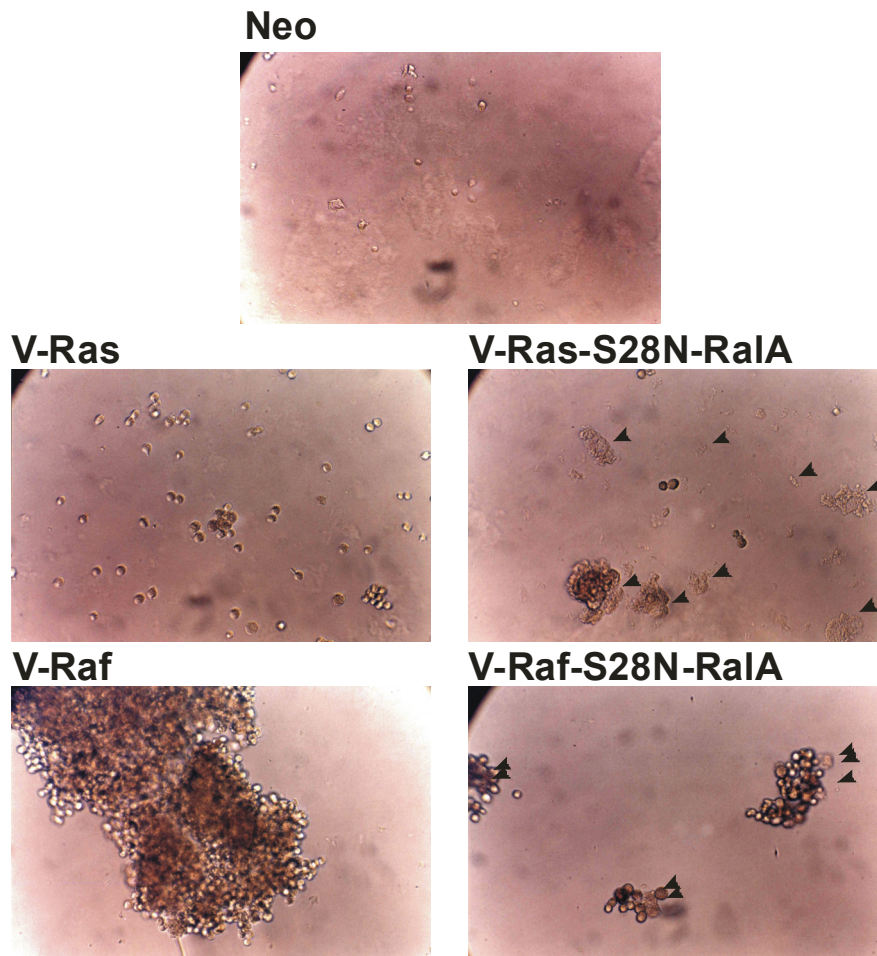


Figura 30 – Sobrevida *in vivo* a corto plazo.  $10^6$  células fueron inoculadas en la dermis de ratones singeneicos BALB/c en 50  $\mu$ l de PBS con tripán blue como marcador del sitio de inyección. Luego de 7 días, se recuperó el sitio de inoculación y fijó con glutaraldehído 3,5%. Cortes de  $<1 \mu$ m de espesor se tiñeron con azul de metileno. Nótese que la mayoría de las células Neo o S28N-Ra1A presentan indicadores morfológicos de apoptosis (flechas blancas), mientras que las células v-Ras se mantienen viables, observándose además numerosas mitosis (puntas de flecha negras) y casi ninguna apoptosis. Resultados representativos de cuatro experimentos independientes. 40X.

células transformadas con distintos oncogenes (163,164). Dado que un requisito indispensable para la oncogenicidad es la adquisición de la capacidad de sobrevivir *in vivo*, se investigó si la actividad RalA es necesaria para la inducción de la resistencia a la apoptosis *in vivo*. Particularmente, se estudió si la inhibición de la actividad RalA por la coexpresión de la dominante negativa impide la supervivencia a corto plazo (3-7 días) de fibroblastos NIH3T3 transformados con las variantes virales de los oncogenes Ras, Raf ó Src. Se encontró que los fibroblastos control (Neo) fueron incapaces de sobrevivir en estos plazos en la dermis de ratones singéneos (BALB/c), observándose un alto número de células en apoptosis. En cambio, los fibroblastos transformados por los oncogenes no sólo fueron capaces de sobrevivir, sino que se encontraron numerosas imágenes de mitosis en los sitios de inoculación. Por el contrario, la cotransfección con S28N-RalA restauró la muerte celular en este plazo, sugiriendo que un mecanismo por el cual RalA mediaría la adquisición de un fenotipo maligno es la promoción de la capacidad de sobrevivir *in vivo* (Figura 30 y datos no mostrados).

### **RalA regula asimismo la supervivencia *in vitro***

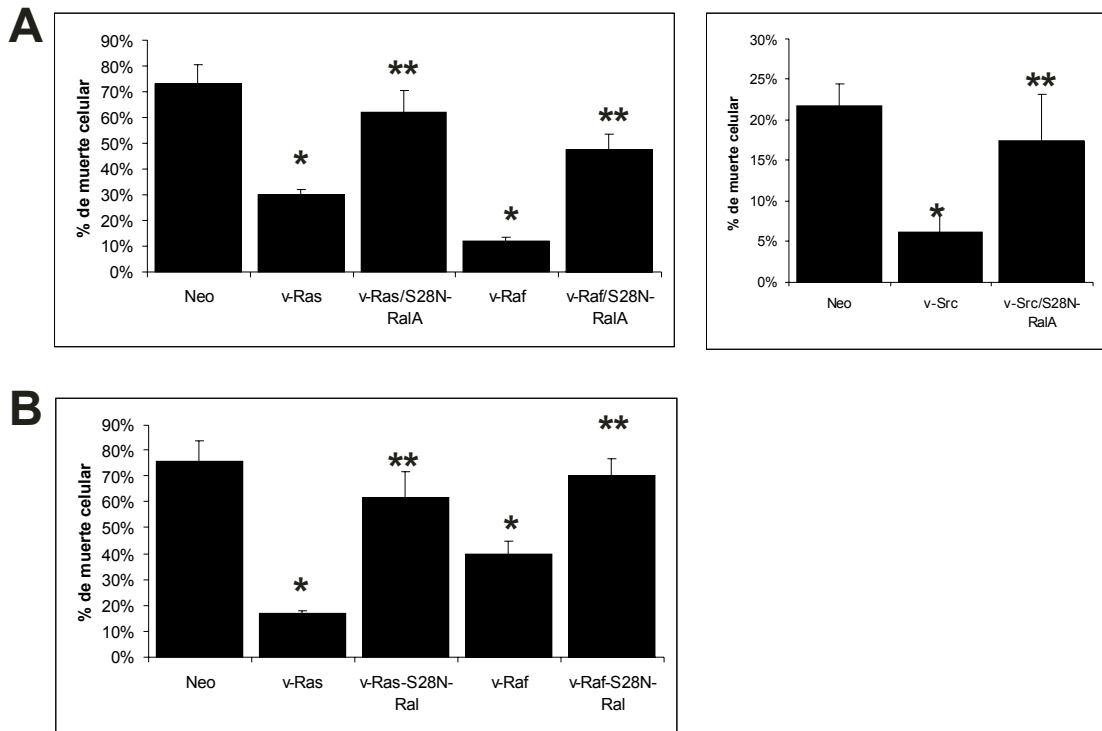
A fin de investigar los mecanismos moleculares que median la adquisición de supervivencia dependiente de RalA, se estudió en primer lugar si este efecto se observa también *in vitro*. Para ello, se realizaron tratamientos proapoptóticos en las distintas líneas transfectadas a fin de inducir el proceso apoptótico y se analizó la capacidad de cada una de ellas de sobrevivir a estos tratamientos. Las células control NIH3T3-Neo fueron altamente sensibles frente a tres tratamientos proapoptóticos ensayados, sin relación entre sí: privación de anclaje



**Figura 31 – Sobrevida in vitro frente a la privación de anclaje (anoikis). Células NIH3T3 expresando los distintos oncogenes en presencia o ausencia de la expresión de S28N-RalA fueron incubadas en medio completo en placas previamente recubiertas con un gel de agar 1.5% para impedir el anclaje. Luego de 72 hs, los cultivos se fotografiaron y la viabilidad de los mismos se analizó por medio del ensayo de exclusión de azul Tripán. Las flechas marcan la presencia de muerte celular. 10X. Campos representativos de ensayos por triplicado en cuatro experimentos independientes.**



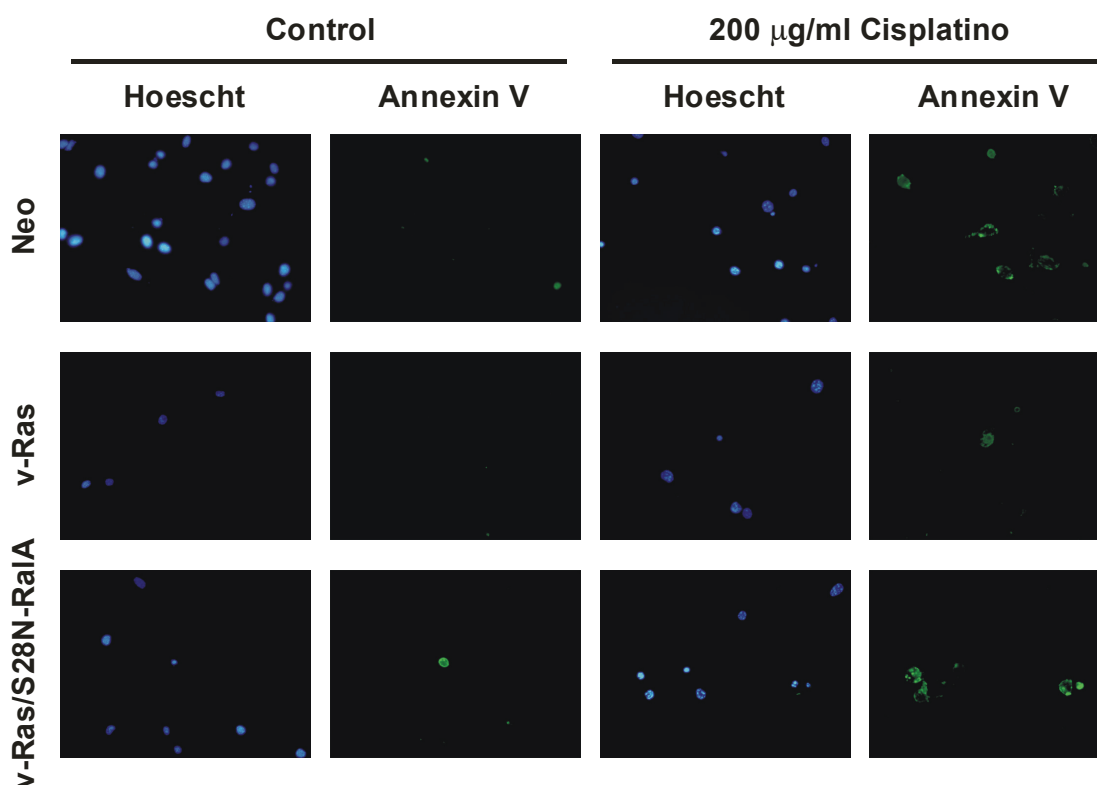
(Figura 31), privación de suero (Figura 32A) y tratamiento con cisplatino (Figura 32B), observándose la aparición de células con una morfología característicamente apoptótica, es decir, disminución del citoplasma, redondeamiento, compactación y fragmentación nuclear y aparición de cuerpos apoptóticos. La viabilidad celular fue confirmada por tinción con azul Tripán (datos no mostrados) y



**Figura 32 – Sobrevida in vitro frente a la privación de suero (A) o tratamiento con cisplatino (B).** Las células creciendo sobre cubreobjetos fueron incubadas por 24 hs en DMEM sólo (A) ó DMEM + 10% SFB + 100  $\mu$ M cisplatino (B). Luego, las células fueron fijadas y teñidas con Hoechst. Se grafica la media  $\pm$  SD del porcentaje de núcleos con morfología apoptótica (recuento mínimo de 250 células en duplicado por tratamiento). \*,  $p < 0.05$  vs Neo; \*\*,  $p < 0.05$  vs oncogén (test de Chi cuadrado,  $n=2$ ). Representativo de al menos cinco experimentos independientes.

el carácter apoptótico de la muerte celular fue confirmado por tinción con Annexina V-FITC (Figura 33).

La sobreexpresión de los oncogenes indujo un muy marcado aumento de la supervivencia celular frente a los tres estímulos proapoptóticos estudiados, observándose pocas diferencias en cuanto al efecto de cada uno de los oncogenes entre sí (Figura 31 y Figura 32). En cambio, la coexpresión de S28N-



**Figura 33 – Morfología nuclear según Hoechst (Azul) y tinción con Annexina V-FITC (verde) de células NIH3T3 creciendo sobre cubreobjetos y tratadas o no por 24 hs con 100  $\mu$ M Cisplatino. Obsérvese que la mayoría de las células con marcación para Annexina V muestran condensación y/o fragmentación nuclear características de la apoptosis. Campos representativos de dos cubreobjetos en dos experimentos independientes. 400X.**

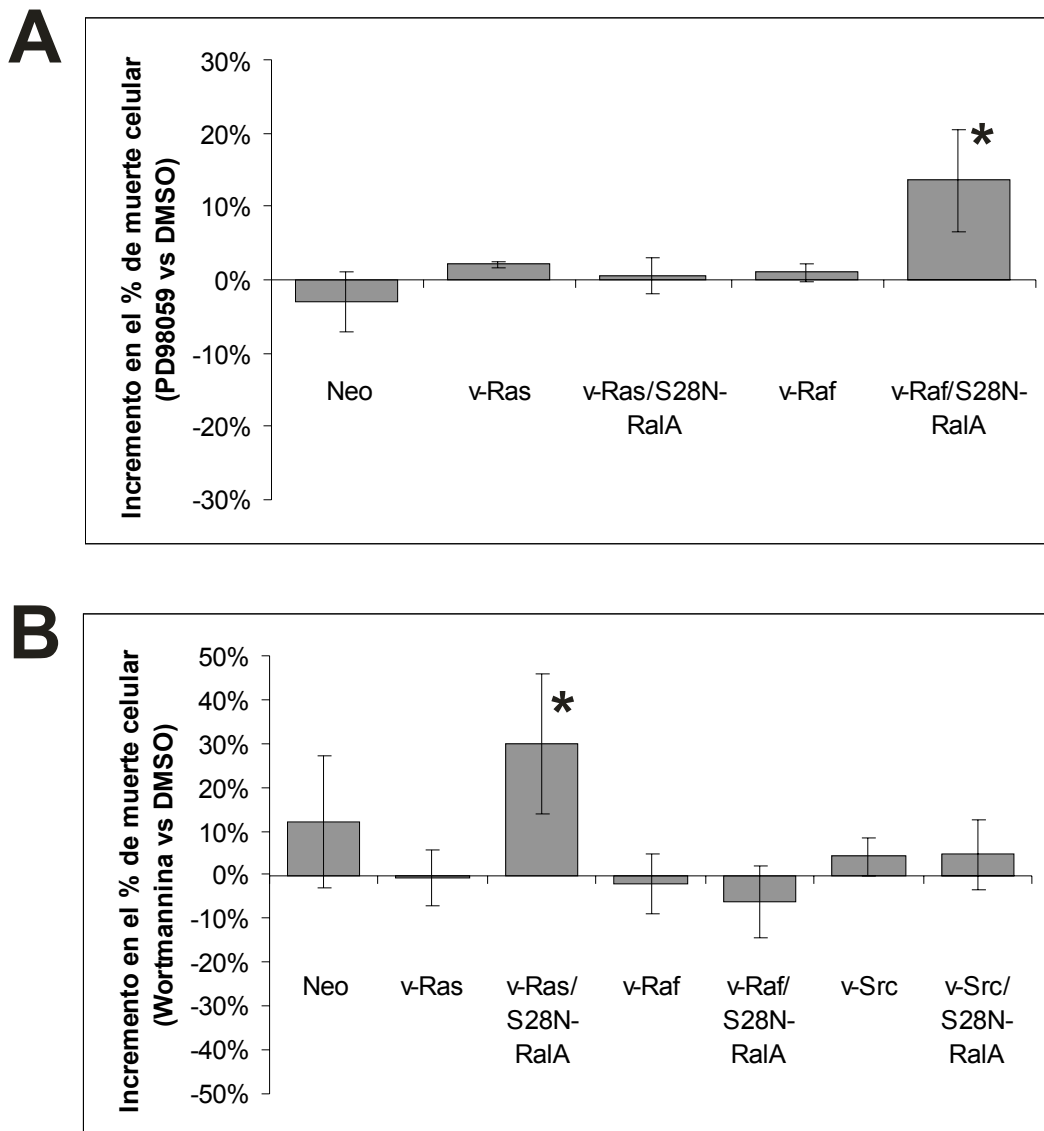
RalA redujo significativamente la resistencia inducida por los oncogenes en los tres ensayos realizados, sugiriendo que RalA media un mecanismo de supervivencia general y no la respuesta a un estímulo proapoptótico particular.

### **La regulación de la supervivencia celular *in vitro* sería independiente de la expresión de proteínas de la familia Bcl-2**

Dado que los miembros de la familia Bcl-2 juegan un rol crucial en la regulación de la supervivencia celular y que existen múltiples mecanismos de regulación de la expresión de estas moléculas, se realizaron estudios de Western blot contra Bax, Bad (dos miembros proapoptóticos), Bcl-x y Bcl-2 (miembros antiapoptóticos). Mientras que no se detectó expresión de Bad, sí se pudo detectar expresión de los restantes tres miembros. Sin embargo, ni la expresión de los oncogenes ni la coexpresión de S28N-RalA fueron capaces de modular dicha expresión (datos no mostrados), sugiriendo que la regulación de la expresión de estas moléculas no sería un mecanismo de promoción de supervivencia en este sistema.

### **RalA promueve la supervivencia celular de forma independiente de MEK ó PI3K**

Asimismo, se realizaron ensayos de supervivencia frente a la privación de suero en los cuales se estudió el sinergismo entre las vías río abajo de los oncogenes. Para ello, fibroblastos NIH3T3 transformados por los oncogenes y sobreexpresando o no la dominante negativa de RalA fueron incubados en ausencia de suero (a fin de inducir apoptosis) y en presencia o no de inhibidores farmacológicos de Mek (50  $\mu$ M PD98059) ó PI3K (20  $\mu$ M LY294002 ó 100 nM

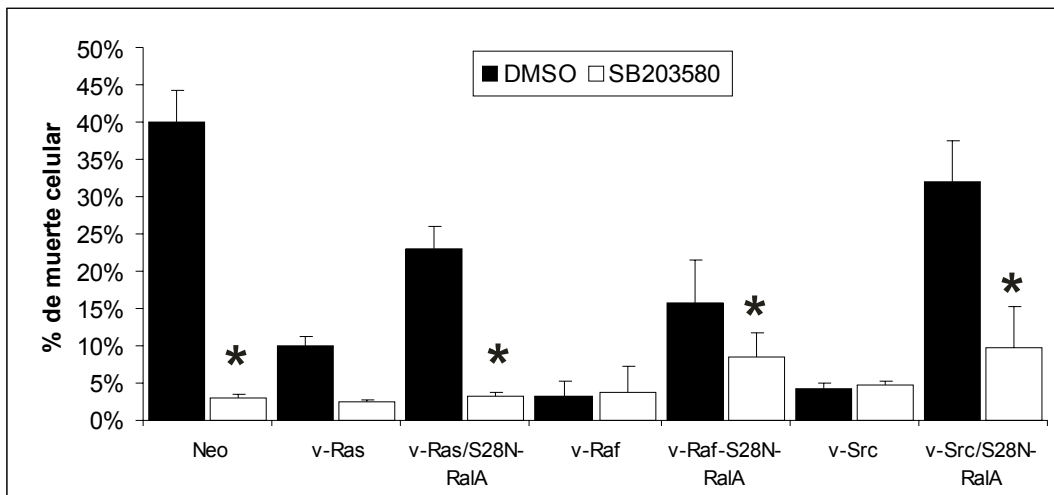


**Figura 34 – Efecto de la inhibición farmacológica de Mek ó PI3K por tratamiento con 50µM PD98059 ó 100 nM Wortmannina en la sobrevivencia frente a la privación de suero en células NIH3T3. El ensayo y la cuantificación se realizó de forma similar a la Figura 32 (mínimo 200 células en duplicado por tratamiento). \*,  $p < 0.05$  vs DMSO (test de Chi cuadrado,  $n=2$ ). Representativo de tres experimentos independientes.**

Wortmannina). Ambos tratamientos inhibieron en algunos experimentos parcialmente la actividad antiapoptótica de los oncogenes (Figura 34 y datos no mostrados). La inhibición conjunta de RalA por la coexpresión de la dominante negativa y de Mek ó PI3K por tratamientos farmacológicos indujo, el caso de las células transformadas con v-raf o v-ras, respectivamente, un mayor grado de muerte celular, sugiriendo la independencia de estas tres vías de transducción de señales (Figura 34). Estos tratamientos fueron suficientes para impedir la activación de Erk y Akt, respectivamente, según ensayos de Western blot contra las formas fosforiladas de estas quinasas (datos no mostrados).

### **La regulación de p38 sería un mecanismo de promoción de la sobrevida celular**

La MAPK p38 está íntimamente involucrada en la respuesta a stress y la inducción de apoptosis en fibroblastos (126,127). Como ya fue mostrado previamente, la expresión de los oncogenes reduce notoriamente la activación de esta quinasa y la coexpresión de S28N-RalA restaura los valores de fosforilación a los de las células control (Figura 23). Dado que en estas células nivel de actividad de esta quinasa parecería correlacionar con la sensibilidad a los tratamientos proapoptóticos, a continuación se determinó si la activación de p38 es necesaria para la aparición de apoptosis en este modelo. Para ello, las distintas líneas transfectadas fueron sometidas a ensayos de privación de suero en presencia o ausencia de un inhibidor farmacológico de p38, SB203580. Se encontró que la inhibición de p38 impidió la muerte celular en todas las líneas celulares, demostrando que la actividad de esta quinasa es necesaria para la inducción de muerte celular en este modelo y apoyando la noción de que RalA



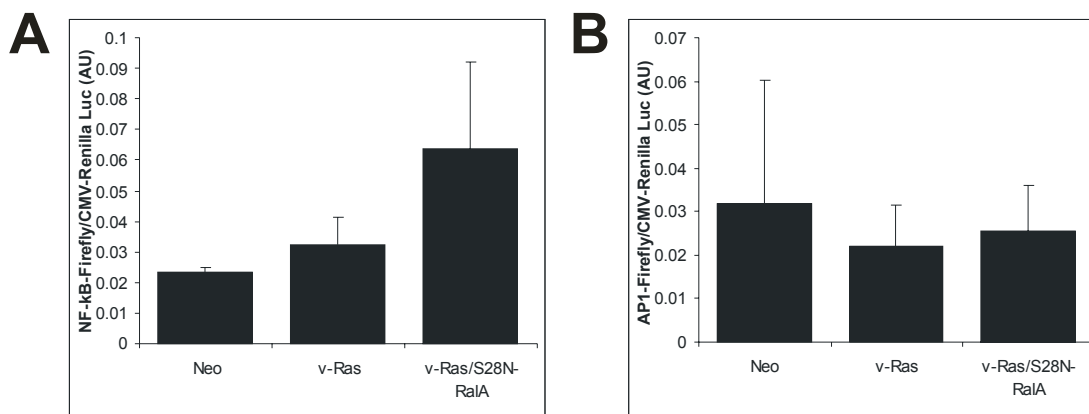
**Figura 35 – Efecto de la inhibición farmacológica de p38 por tratamiento con 10 $\mu$ M SB203580 en la supervivencia frente a la privación de suero en células NIH3T3. El ensayo y la cuantificación se realizó de forma similar a la Figura 32 (mínimo 200 células por cubreobjeto). \*,  $p < 0.05$  vs DMSO (test de Chi cuadrado,  $n=3$ ). Resultados representativos de tres experimentos independientes.**

podría mediar las señales de supervivencia por medio de la modulación de la actividad de p38 (Figura 35).

### **Ni el oncogén v-Ras ni RalA inducirían la activación de los promotores AP1 ó NF- $\kappa$ B**

Tanto AP1 como NF- $\kappa$ B han sido extensamente estudiados en relación con la activación de oncogenes y tumorigénesis. Además, ambos pueden promover señales de supervivencia y serían activados por una vía que involucra RalA (33,34,35,36). Por todo ello, se realizaron ensayos de genes reporteros con el gen de la luciferasa de luciérnaga bajo la regulación de las secuencias de unión

a AP1 ó NF- $\kappa$ B. Sin embargo, contra lo esperado, la activación de Ras por sobreexpresión de v-Ras no fue capaz de inducir un aumento de la actividad AP1 ó NF- $\kappa$ B en estas células. Además, S28N-Ra1A no sólo no disminuyó la actividad NF- $\kappa$ B sino que, en algunos experimentos, indujo su activación, aunque de modo no reproducible.



**Figura 36 – Actividad de los genes reporteros NF- $\kappa$ B-Luc (A) y AP1-Luc (B) en ensayos de transfección transiente en células NIH3T3. Las células fueron transfectadas con 0,5  $\mu$ g de la construcción reportera y 0,1  $\mu$ g de un plásmido constitutivo CMV-Renilla Luc e incubadas por 24 hs. Se muestra la actividad relativizada de ambas construcciones. Resultados representativos de cinco experimentos independientes por triplicado.**



# DISCUSIÓN



La transformación tumoral es un proceso extremadamente complejo, en el cual intervienen múltiples factores y se produce en diferentes etapas. Para mayor dificultad, los actores moleculares que intervienen en la división, la sobrevivencia y la diferenciación de la célula tumoral son en esencia los mismos que participan en estos procesos en las células normales. Sin embargo, pequeñas diferencias en los mecanismos de transducción de señales pueden transformar una señal normal en una señal aberrante y estas pequeñas diferencias son las responsables de la transformación tumoral y los potenciales blancos a atacar con nuevas terapias (1). Tanto los oncogenes como los genes supresores de tumores tienen un rol preponderante en las redes de transducción de señales, siendo la mayoría de ellos parte de más de una vía de transducción. Entender los mecanismos mediante los cuales estos genes regulan la tumorigenicidad, y el entorno de señalización necesario para dicha regulación, aparece entonces como una prioridad para el estudio del cáncer. Dado que las diferencias entre una célula normal y su contraparte tumoral son esencialmente mínimas, sólo un cabal entendimiento de la biología tumoral permitirá la generación de las terapias más eficaces contra el cáncer (1).

Asimismo, es necesario diferenciar entre las características que determinan la tumorigenicidad de aquellas que regulan la progresión tumoral, es decir, aquellos cambios necesarios para la aparición del tumor de los implicados en la malignización del mismo y la invasión del tejido circundante (183).

Finalmente, es reconocido que la causa prioritaria de mortalidad en los pacientes oncológicos no es la portación del tumor primario o su recurrencia local, sino la aparición de metástasis, o diseminación de las células tumorales.

Por ello, es imprescindible entender cabalmente el mecanismo implicado en la formación de metástasis, las moléculas involucradas en cada una de las etapas de la cascada metastásica y qué determina la capacidad de crecer en el órgano secundario (1,183).

### ***EL ROL DE RALA EN LA RED DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES Y SU***

### ***RELACIÓN CON LA TRANSFORMACIÓN MALIGNA. UNA REVISIÓN***

### ***BIBLIOGRÁFICA***

En los últimos años la función de Ral ha sido estudiada con mayor detalle y su rol en la biología celular ha sido descrito en numerosos artículos. Por ello, a continuación se provee una detallada revisión bibliográfica que permitirá comprender mejor algunas de las funciones de esta molécula.

RalA forma parte de la superfamilia de proteínas con actividad GTPasa pequeñas, o superfamilia Ras (3,5). Dicha superfamilia contiene decenas de proteínas y aún sigue creciendo. Son proteínas monoméricas, de alrededor de 21 kDa y cuya única actividad catalítica conocida es la hidrólisis de GTP a GDP más ortofosfato. Su proteína fundadora, Ras, funciona como un nodo en el cual se integran las señales provenientes del exterior celular con las señales que derivan del estado celular interno y desde el cual se transmiten nuevas señales a moléculas río abajo, o efectores, de Ras (3). Distintos miembros de esta familia poseen características únicas, aunque existe también un gran solapamiento (184). Estos efectores forman parte de los mecanismos de regulación de casi todas las funciones celulares, incluyendo sobrevivencia, crecimiento, diferenciación, morfología y migración, así como formación y remodelación de la matriz

extracelular. Los efectores más importantes de Ras son Raf-1, PI3K y RalGDS. Si bien Raf-1 se ha descrito como una molécula involucrada en la regulación de la replicación celular y PI3K como una molécula inhibitoria de la apoptosis, hoy se sabe que ambas pueden ejercer las dos funciones (ver, por ejemplo, 185,186,187,188). Existen en la literatura múltiples reportes de la función de la vía Raf/MEK/Erk en sobrevivencia, así como de la vía PI3K/PDK/Akt en la regulación de la proliferación.

La vía Ral es, históricamente, el tercer efector de Ras en importancia. Sin embargo, los trabajos publicados en el último lustro sugieren fuertemente que Ral es un efector de Ras al menos tan importante como los dos anteriores. Ras activa una serie de factores intercambiadores de guanina (GEFs) específicos para RalA y RalB (189), denominados RalGDS (190), Rgl1 (35), Rgl2 (191) y Rlf (192). Otra molécula de la misma familia, Rgr, fue clonada como un oncogén producto de una fusión con rHR 23A en un carcinoma de células escamosas inducido por DMBA; esta molécula posee el dominio GEF homólogo a RalGDS y es capaz de activar a las proteínas Ral pero carece del sitio de unión a Ras (171,193). Ras serviría para promover la colocalización en la membrana plasmática de Ral con sus activadores (194,195). Sin embargo, este no sería el único mecanismo por el cual Ral puede ser activado. Otra molécula activada por Ras, PDK1 (por medio de la activación de PI3K y la generación de 3-OH PIPs) (196), uniría RalGDS y de esta manera liberaría al sitio catalítico de la autoinhibición del dominio N-terminal (197). Asimismo, Ral puede ser activado por un aumento de  $Ca^{++}$  citoplasmático (39) y ello se debería a la unión directa, dependiente de calcio, de las formas isopreniladas de RalA y RalB a calmoduli-

na (41,42) que induciría la unión a GTP y activación de Ral (40). Sin embargo, este mecanismo implica más de un dominio de unión en las proteínas Ral y ambas isoformas serían diferencialmente reguladas por calmodulina (42). Además, ha sido reportado que la expresión de RalGDS dependería de la actividad JAK/STAT3 (198) y que otra GTPasa de la misma familia, TC21, podría inducir la activación de RalGDS y, por ende, de Ral (199). En *Drosophila*, sin embargo, el mayor activador de RalGDS sería Rap y no Ras (200). En cambio, células Jurkat y en linfocitos T humanos primarios, Ral mediaría la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducida por Ras, un efecto que sería contrarrestado por una vía dependiente de Rap1 y PI3K (201).

Si bien se puede encontrar a Ral en la membrana plasmática (158), mayormente se localiza en la membrana de vesículas intracelulares, particularmente en neuronas y plaquetas (202,203,204,205), sugiriendo un rol en transporte vesicular, endocitosis y exocitosis. Se ha encontrado que Ral promueve la endocitosis de receptores de membrana (27,31,206) a través de la unión mediada por RalBP1 a Reps1 (28), POB1 (29), la cadena  $\mu$ 2 (207) del complejo AP2 (30), Arip2 (31) ó PLD2 (206). Asimismo, Ral regularía la exocitosis y el envío de vesículas a determinadas localizaciones de la membrana plasmática en células polarizadas (205,208) a través del complejo exocyst (205,208,209,210, 211,212,213,214), un complejo proteico (215,216) involucrado en el envío de vesículas derivadas del aparato de Golgi a la membrana basolateral de células epiteliales (217). Asimismo, se demostró, utilizando sinaptosomas derivados de ratones transgénicos que expresan en neuronas la mutante dominante negativa S28N-RalA, que esta GTPasa es necesaria para el

incremento mediado por PKC del pool de vesículas liberables y para el relleno dependiente de calcio de las mismas (210). Recientemente, se ha publicado que RalA y RalB son necesarias para la ramificación de neuritas en cultivos primarios de neuronas de ganglio superior cervical de rata (218), un proceso involucrado en la formación de conexiones interneuronales. Es interesante, sin embargo, que el cerebro de los ratones transgénicos para S28N-RalA no mostró malformaciones visibles, aunque en el artículo no se comenta acerca de la capacidad de aprendizaje u otros parámetros de comportamiento de los ratones (209). Esta observación contradice la hipótesis de que Ral tendría un importante papel durante el desarrollo, basada en estudios genéticos en *Drosophila* (200,219,220,221,222), y en estudios de embriones de *Xenopus* (223). Si bien no existen ratones deficientes en RalA ó RalB, la ausencia de RalGDS no induce malformaciones congénitas (224)

Aunque un papel de Ral en la regulación del desarrollo en mamíferos queda por demostrarse, el rol de Ral no se limita a la regulación del tráfico vesicular. Ral promueve la capacidad proliferativa y la actividad de varios factores de transcripción: induce la expresión de ciclina D1 a través de la activación de NF-κB (33) y promueve el crecimiento a través de la expresión de c-Fos (34,35) y fosforilación de c-Jun (36) en células de mamífero, pero inhibe la fosforilación de Jun en *Drosophila* (219). A través de la modulación de AP1 induciría la expresión, entre otros, de uPAR (225). Ral modula asimismo la actividad de AFX, un miembro de la familia forkhead (también denominada FoxO) de factores de transcripción, de forma independiente pero paralela con Akt (37,38). Estos factores de transcripción están íntimamente involucrados en la regulación de la

proliferación y supervivencia celular (226). Más recientemente, por medio de la utilización del sistema de reclutamiento reverso de Ras, una variante del clásico doble híbrido (227), se encontró que RalA se une al factor de transcripción ZONAB/Ryb A (228). Esta unión es directa y promueve la inhibición de ZONAB (228), un factor de transcripción que reprime la actividad de promotores con secuencias CAAT inversas en condiciones de baja densidad celular y es regulado por ZO-1, una molécula residente de las uniones estrechas (229). ZO-1 colocaliza con ZONAB y RalA en uniones estrechas (228) y contiene un dominio PDZ, al igual que Arip2, otra molécula de membrana capaz de unir RalBP1 (31), sugiriendo que RalA y RalBP1 podrían interactuar con ZONAB en un complejo con ZO-1, aunque esta posibilidad no ha sido explorada.

La regulación de factores de transcripción íntimamente involucrados en la inducción de proliferación y el hecho de que Ral es activado por Ras indujo a estudiar su posible función en la oncogénesis. Si bien la sobreexpresión de Ral no induce la tumorigénesis *per se* (160), varios reportes demuestran un importante papel en la transformación maligna inducida por otros oncogenes. Así, RalA coopera en la transformación por Ha-Ras ó Raf (160), de forma similar a RalGDS ó una variante de Ras que no activa Raf ó PI3K, RasV12G37 (172,230). Ral también coopera con el receptor de EGF para transformar fibroblastos de rata 3Y1 (161). Además, Rlf promueve el crecimiento de fibroblastos NIH3T3 en condiciones de bajo suero (34) y otro GEF para Ral, Rgr, fue clonado por su función como oncogén cuando está fusionado con rHR 23A (171,193). Ral promueve también el crecimiento independiente de anclaje de la línea de fibrosarcoma humano HT1080 a través de la disminución de la expre-

sión de p27 (231). Asimismo, RalGEF mediaría la delocalización de p27 inducida por N-Ras (232) e inhibiría la diferenciación de células PC12 inducida por NGF, un mecanismo mediado por la vía Ras/Raf (233) y promovería el crecimiento independiente de estrógenos mediado por el receptor de EGF de líneas de cáncer de mama (234). Además, la RalA atenuaría el arresto en G2 inducido por p53 luego de stress genotóxico (235). Sorprendentemente, se demostró asimismo que Ral estaría involucrado en el ensamblado y funcionamiento del aparato mitótico, a través de la unión a cytocentrin, una proteína que se asocia de forma transitoria al huso mitótico (236). Además, RalA sería fosforilada en la serina 194 por Aurora Quinasa A (237), una molécula implicada en la regulación del centrosoma, el huso mitótico y la segregación cromosómica (238,239,240).

En nuestro laboratorio, se demostró previamente que la inhibición de RalA por expresión de la dominante negativa S28N-RalA impide la formación de tumores y metástasis experimentales por parte de fibroblastos NIH3T3 transformados por variantes virales de Ras ó Src. Asimismo, se asoció esta pérdida de la capacidad tumorigénica y metastásica a la disminución de la secreción de proteasas (uPA y MMPs -2 y -9) y a la inhibición de la capacidad de crecer en agar blando (163). Todo ello sugiere que Ral cumple un papel trascendental en la tumorigénesis y progresión tumoral inducida por algunos de los oncogenes más comúnmente encontrados en tumores humanos. Más recientemente, se ha demostrado que RasV12G37 y RalGDS-CAAX (una fusión de RalGDS constitutivamente activa) promueve la capacidad metastásica de células NIH3T3 en ensayos de metástasis experimentales (162). RasV12G37 tam-

bién promueve la tumorigénesis de ciertas cepas de la línea NIH3T3 (172). Además, una nueva mutante de H-Ras, V12G34, que retiene la capacidad de unir y activar RalGDS pero no Raf ó PI3K, retiene su capacidad de transformación en fibroblastos NIH3T3; la misma mutación en N-Ras ó R-Ras inhibe la capacidad de activar RalGDS y de promover transformación de las células NIH3T3, sugiriendo un importante rol de RalGDS en la transformación por Ras (241). En el mismo orden, más recientemente se demostró que la sobreexpresión de RalA es suficiente para promover la capacidad metastásica de fibroblastos embrionarios de hámster transformados espontáneamente o por infección con RSV (242,243). RalA, pero no RalB, se encuentra sobreexpresada en carcinomas nasofaríngeos, según un estudio de microdissección por captura láser y expresión génica por gene arrays (244). En células de cáncer de pulmón no pequeñas, el tratamiento con RNAi contra caveolina-1 inhibe el crecimiento, la fosforilación de FAK y la expresión de RalA, pero no RalB (245). En su conjunto, la bibliografía muestra que una mutante de Ras que sólo puede activar Ral induce un completo fenotipo maligno y que la inhibición de Ral impide la transformación por variantes oncogénicas de Ras u otros oncogenes, demostrándose que esta proteína está íntimamente involucrada en la maquinaria de señalización implicada en la transformación maligna.

Mucho resta sin embargo por descubrir en cuanto a los mecanismos por los cuales Ral promueve la transformación celular, la tumorigénesis y la capacidad metastásica, así como cuáles son los mediadores en la modulación de NF- $\kappa$ B, AP1, AFX ó ZONAB. Los primeros efectores de Ral en ser descubiertos fueron PLD1 (165,246,247) y RalBP1 (24). Ral promueve la activación de PLD1



a través de la formación de un complejo ternario con Arf6 (21,22,248), una GTPasa de la familia de factores de ribosilación de ADP (Arf) involucrada en transporte vesicular (249), activación de enzimas modificadoras de lípidos y modulación de estructuras de actina (250). Arf6 induciría la activación de PIP-5K (251), necesaria para la producción de 4,5-PIP<sub>2</sub>, que a su vez es imprescindible para la actividad de PLD (252). 4,5-PIP<sub>2</sub> mediaría asimismo la inhibición, inducida por v-Ras, de la formación del complejo contarctina/actomiosina II y de esta manera promovería la desaparición de las fibras de stress de actina (253). Además, a través de la activación de Rac, Arf6 promovería la formación de estructuras protrusivas y el *spreading* (254,255,256). Estas actividades de Arf6 son reminiscentes de las funciones también observadas en PLD y RalA. ARf6 induce la ramificación de neuritas en neuronas de hipocampo (257), lo que es congruente con el rol de Ral en las neuronas del ganglio cervical superior (218). Sin embargo, al contrario que RalA (233), Arf6 induciría la formación de neuritas en células PC12 (258), sugiriendo la presencia de otros importantes mediadores de la actividad Ral, además del complejo con PLD1 y Arf6.

Existen dos isoformas de PLD, siendo PLD1 parte del complejo activable por Ral (252), aunque Ral también podría unir al menos en algunos casos PLD2 (206). PLD1 se localiza mayoritariamente en membranas perinucleares y en el aparato de Golgi, mientras que PLD2 se encuentra principalmente en la membrana plasmática (252). PLD, junto con RalA, coopera con el receptor de EGF en la transformación de fibroblastos de rata 3Y1 (161), inhibe el arresto celular inducido por sobreexpresión de Raf-1 (259) y sería necesaria para la transformación inducida por v-Ras en fibroblastos Rat-2 (260). PLD media la

inducción de la formación de fibras de stress por PMA en fibroblastos de rata Rat-2 (261) y por SPP ó LPA en células epiteliales de vía aérea humanas (262). En estas células, el efecto pudo ser reproducido por la simple adición de ácido fosfatídico (PA), el producto de la actividad catalítica de PLD (262). Es interesante notar que RalGDS, junto con PI3K, también mediaría la activación inducida por Ras de colina quinasa (263).

RalBP1 (también llamado RLIP) interactúa directamente con RalA y RalB en estado activado y posee actividad GTPasa específica para CDC42 y, en menor medida, Rac1 (24,264). Estas GTPasas de la familia Rho están involucradas en la regulación de la polaridad, la formación de filopodia y lamellipodia y la migración celular, pero también en la modulación de las respuestas a stress (5,25,54,55,74). Específicamente, en fibroblastos NIH3T3, CDC42 estaría involucrado en la inhibición de la progresión G1/S del ciclo celular inducida por suero, en un mecanismo que requeriría de la activación de p38 (265). En células Cos7 y HeLa, CDC42 mediaría la activación de p38 por intermedio de PAK (266,267). En células Cos7, CDC42 y Rac promueven también la activación de otra SAPK, JNK (268). Rac también promovería la activación de p38 a través de un complejo con Tiam1 y JIP2 (269). Como ya se nombró previamente, RalBP1 también interactuaría con Rep1 (28), POB1 (29) y el complejo AP2 (30). Más recientemente, se demostró que RalBP1 formaría un complejo, en células no estresadas, con HSF1, HSP90 y  $\alpha$ -tubulina, que deriva en la represión de la actividad HSF-1 y que se desarmaría con la activación de Ral por stress térmico (270). Ral mediaría asimismo la activación de c-Src por el receptor de EGF y promovería la activación de STAT3 (271).

El rol de Ral en la promoción de la capacidad metastásica y el hecho de que RalBP1 es una GTPasa para CDC42 sugiere que Ral podría modular la migración y la morfología celular. Recientemente se ha demostrado que RalA es activado en lamellipodia de células tratadas con EGF (272). El mismo artículo propone que RalA sería también necesaria para la formación de lamellipodia, sugiriendo un mecanismo de retroalimentación positiva entre RalA y las lamelas. La sobreactivación de RalA también induciría la formación de filopodia a través de la unión a filamina (18), al tiempo de promover la relocalización de la actina a zonas corticales. RalA sería necesaria para la inducción de migración por EGF de células de carcinoma humano de vejiga T24 (158) y la quimiotaxis de mioblastos esqueléticos C2C12 (273). Más recientemente, se sugirió que RalA mediaría la inducción de la migración por Aurora quinasa A (237). Asimismo, se propuso que RalB mediaría la motilidad celular a través del complejo exocyst (274).

En el presente trabajo, se utilizó un modelo de fibroblastos NIH3T3 transformados por la sobreexpresión de variantes virales de Ras, Raf ó Src a fin de determinar el rol de RalA en la señalización por estos oncogenes. Para ello, la actividad Ral fue inhibida por la coexpresión de la dominante negativa S28N-RalA. De esta forma, se analizó la función de la actividad de RalA en el contexto de una célula transformada por la sobreactivación de diversas vías oncogénicas. El objetivo fue estudiar qué mecanismos serían los responsables del efecto de la expresión de la dominante negativa en la inhibición de la transformación celular y tumorigénesis. Se profundizó el conocimiento de la participación de RalA en la regulación de la matriz extracelular, de la conformación

del citoesqueleto y de la capacidad migratoria, así como en la modulación de la sobrevivencia celular.

### ***RALA EN LA REGULACIÓN DE LA MEC Y DE LA MORFOLOGÍA CELULAR***

Los cambios en la composición del citoesqueleto, matriz extracelular y capacidad migratoria observados en las células transformadas tienen frecuentemente su correlato en amplios cambios morfológicos de las mismas. Particularmente en fibroblastos, la transformación celular induce la pérdida de la bipolaridad (apareciendo células con múltiples polos), el crecimiento en múltiples capas, la formación de largos procesos celulares y, en algunos casos, redondeamiento. Es posible que todos estos cambios sean consecuencia de una desregulación de la adhesividad de la célula normal a la MEC, tanto por variaciones en la composición de los receptores de membrana como de la conformación del citoesqueleto y por cambios en las moléculas y en la polimerización de la MEC misma.

### **Ra1A en la regulación de la morfología de la célula transformada**

La sobreexpresión de los oncogenes v-Ras, v-Raf ó v-Src produjo importantes cambios en la morfología celular *in vitro*, comparables a los reportados por otros laboratorios en la misma línea celular (136,169,170,171,172). Mientras que las células control mostraron la típica morfología de los fibroblastos NIH3T3, es decir, cuerpos alargados, bipolares, con alta adhesión al plástico y ocasionales lamelas, v-Ras y, especialmente, v-Raf, indujeron una marcada disminución de la adhesión al plástico, observándose una gran cantidad de células redondeadas y/o creciendo en suspensión. Asimismo, la expresión de cualquiera de los tres oncogenes indujo la pérdida de la inhibición por contacto celular, esto es, el freno de la replicación al formar una monocapa completa. De

este modo, las células comienzan a sobrecrecer, unas por encima de otras. Esta característica es un marcador clásico de transformación celular. Todos los oncogenes indujeron la pérdida de la bipolaridad, observándose una mayoría de células tripolares a estrelladas. En cambio, las células que coexpresaban la dominante negativa S28N-Ra1A no sólo recuperaron la adhesividad al plástico y la bipolaridad, sino que mostraron una gran inhibición por contacto, observándose muy pocas células creciendo por sobre otras. La recuperación de la inhibición por contacto correlaciona con la incapacidad de crecer en agar blando y, sobre todo, con la pérdida de la tumorigenicidad inducida por la expresión de los oncogenes (163). Además, los tres oncogenes, aunque v-Ras principalmente, indujeron la aparición de estructuras que semejaban podosomas, los cuales fueron raramente observados en las células que coexpresaban la dominante negativa. Estas son estructuras adhesivas que promoverían la degradación de la matriz extracelular en células altamente invasivas (173). Si bien fueron descritas originalmente en macrófagos y otras células de origen monocítico (275,276), han sido luego reportados en fibroblastos transformados por v-src (173,277,278,279). Es notorio que en este trabajo se ha observado que v-Ras fue más eficiente que v-Src en inducir la aparición de estas estructuras. Asimismo, no se han observado las estructuras de "Roseta" que se han descrito en fibroblastos transformados por v-Src (173,277). v-Ras indujo, asimismo, la formación de largos procesos celulares que llegaban a medir varias veces el soma celular. La aparición de estos procesos ha sido descrita en detalle previamente (170).

### **Ra1A está involucrada en la regulación de la formación de la matriz extracelular de fibronectina**

Otra característica típica del fibroblasto transformado es la inhibición de la expresión de fibronectina (FN) y la pérdida de la capacidad de generar fibrillas de FN, o fibrillogénesis (174,175,280). Ensayos de Western blot, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia demostraron que la expresión de los oncogenes v-Ras, v-Raf ó v-Src, como era esperable, fue suficiente para inhibir la expresión de FN endógena y la polimerización de la fibronectina (fibrillogénesis) aportada por el suero. Sin embargo, tanto la pérdida de la expresión de FN como de la capacidad de generar fibrillas en las células transformadas, fueron inhibidas por la coexpresión de S28N-Ra1A, sugiriendo fuertemente que los oncogenes estudiados, al menos en fibroblastos inmortalizados, transducen la inhibición de la expresión de FN y su fibrillogénesis a través de una vía de señalización que depende de la actividad Ra1A. Dado que Ras y Src promueven la inhibición de la síntesis de FN a nivel de la regulación del mensajero (174,175), es interesante especular que la Ra1A podría mediar la actividad transcripcional del gen de fibronectina o la estabilidad del mRNA. Los cambios en la capacidad de formación de fibrillas de FN sugirió la posibilidad de que los oncogenes modularían, de forma dependiente de Ra1A, los niveles de expresión o activación de su principal receptor, la integrina  $\beta 1$ . Si bien los oncogenes no fueron capaces de modificar el nivel de expresión de esta integrina, se encontró que la localización de integrina  $\beta 1$  en los complejos de adhesión focal se pierde en las células transformadas y reaparece al inhibir Ra1A, sugiriendo un posible rol de Ra1A en la regulación de la actividad de dicha integrina.

## **RalA es necesaria para la desaparición de los complejos de adhesión focal y de las fibras de stress, inducidas por los oncogenes**

Se ha sugerido previamente que RalA podría inducir cambios en la conformación del citoesqueleto de actina debido a la observación de que una variante constitutiva de RalA, V23-RalA (homóloga a V12-Ras ó v14-RhoA), induce la formación de filopodia de forma dependiente de la unión a filamina (18), aunque dicha sugerencia no ha sido luego explorada por los autores. Además, el hecho de que RalA induciría a través de RalBP1, la hidrólisis de la molécula de GTP de CDC42 (24,264), una GTPasa de la familia Rho (25,26) permite hipotetizar un rol de RalA en la regulación del citoesqueleto. Asimismo, el hecho de que los cambios inducidos por los oncogenes tanto en la morfología celular como en la expresión de FN y su fibrillogénesis dependen de la actividad RalA, indujo a la hipótesis de que esta GTPasa podría mediar los cambios inducidos por la transformación celular de los complejos de adhesión focal y el citoesqueleto. Para estudiar dicha hipótesis, en esta Tesis se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para elementos que componen los complejos de adhesión focal y para los distintos componentes del citoesqueleto. Además, se utilizó un compuesto con alta afinidad por la actina-F, la faloidina, para estudios más detallados de la composición de los microfilamentos.

En las células control NIH3T3-Neo, la actina se mostró organizada en fibras de stress, en haces perpendiculares que generalmente atravesaban todo el cuerpo celular en el eje principal, obteniéndose tinciones comparables a las encontradas en reportes previos (49,136,241). Sin embargo, en las células



transformadas por cualquiera de los tres oncogenes, la actina adoptó una localización difusa citoplasmática y una acumulación en la membrana plasmática (actina cortical), lo que sumado al notorio efecto en la morfología celular consistió en un dramático cambio en la organización de los microfilamentos, sugiriendo una modificación de la activación o expresión de proteínas asociadas a actina (imágenes similares a las obtenidas en esta Tesis pueden observarse en 136,241). Sólo unas pocas células mostraron haces de actina muy cortos y finos, sobre las puntas de las proyecciones celulares. Del mismo modo, los complejos de adhesión focal observados en las células control en los extremos de las fibras de stress se desorganizaron en la gran mayoría de las células NIH3T3 transformadas con los oncogenes, como lo demuestra la tinción contra vinculina, una molécula estructural de los FACs (281). Tanto la organización de la actina en fibras de stress como la formación de los complejos de adhesión focal fueron restauradas completamente por la coexpresión de S28N-RalA, demostrando que la actividad de esta GTPasa es indispensable para la alteración de la MEC de fibronectina, de los microfilamentos y de los FACs. De forma similar a lo observado en las tinciones contra vinculina, la organización de la integrina  $\beta 1$  en regiones discretas de la membrana plasmática se perdió con la expresión de cualquiera de los oncogenes y la coexpresión de S28N-RalA fue capaz de restaurar la organización de este receptor. Estos resultados mostraron una alta correlación entre la organización de la fibronectina, la localización de vinculina e integrina  $\beta 1$  y la formación de las fibras de stress de actina. La expresión de la dominante negativa S28N-RalA no sólo no inhibió sino que inclusive promovió la aparición de filopodia en estas células, por lo que estos re-

sultados no avalan la noción de que RalA induce la formación de filopodia por unión a filamina (18). Queda por comprobar la posibilidad de que la sobreexpresión de V23-RalA sea suficiente para la inducción de filopodia, mientras que otras vías suplen dicha función en presencia de S28N-RalA.

### **La fibronectina: suficiente, pero no necesaria**

La matriz extracelular es un regulador fundamental de la morfología celular. A través de la unión a integrinas, induce la activación de cascadas de transducción de señales que promueven, entre otros, la reorganización del citoesqueleto de actina y la formación de fibras de stress (51,52,53,54,282,283). Dada la alta correlación observada entre los cambios en el nivel de expresión y capacidad de fibrillogénesis de FN y la formación de fibras de stress y complejos de adhesión focal inducidos por la expresión de v-Ras, v-Raf ó v-Src y la coexpresión de S28N-RalA, se estudió si los cambios observados en ambas estructuras mantenían una relación causal entre sí. El crecimiento de células NIH3T3 sobre una capa (coating) de FN permitió una organización de la actina en fibras de stress que no fue inhibida por la expresión de los oncogenes, sugiriendo que, al menos en parte, la desorganización de los microfilamentos inducida por los oncogenes puede deberse a la pérdida de la expresión y de la capacidad fibrillogénica de FN que ocurre durante el proceso de oncogénesis. El hecho de luego de 96 hs en cultivo los microfilamentos de las células NIH3T3-Ras, -Raf ó -Src se vuelvan a desorganizar demuestra el carácter transitorio de dicha regulación y sugiere que las actividades proteolíticas secretadas por es-

tas células (163) promueven la degradación de la FN agregada y el fin de la formación de fibras de stress.

Sin embargo, la inhibición de la interacción entre FN e integrina  $\beta_1$ , su principal receptor, mediante la incubación con péptidos o anticuerpos bloqueantes no impidió la aparición de fibras de stress ni en las células control ni en las doble transfectantes, lo que sugiere que otros mecanismos deben estar actuando. Se puede hipotetizar la posibilidad de que otros componentes de la matriz extracelular inducirían la formación de fibras de stress en ausencia de señalización por integrina  $\beta_1$ . El hecho de que las células transformadas por estos oncogenes sobreexpresan CD44 (284) sugiere la presencia de otras vías de unión a la matriz extracelular. Otra interesante posibilidad es que la fibronectina podría inducir la activación de la familia Rho (285) de forma independiente de la regulación por la vía Ras/Ral (ver más adelante), induciendo de esta manera la formación de fibras de stress independientemente de la actividad de las vías de transducción oncogénicas estudiadas. En múltiples tipos celulares, incluidos los fibroblastos NIH3T3, RhoA es el principal regulador de la formación de fibras de stress (25,54,55).

### **El rol de las MAPKs y de Akt**

Una de las principales vías de señalización activadas río abajo de las GTPasas de la familia Ras es la de las MAPKs (286). Aunque existe gran solapamiento en la actividad de las GTPasas, Ras induce la activación de las MAPKs mitogénicas Erk 1 y 2 a través de Raf y MEK, mientras que CDC42, Rac y Rho promueven la activación de los miembros activados por stress p38 y

JNK. Además, Ras es capaz de inhibir la activación de p38 inducida por la privación de anclaje o bajo suero (103,126,127,132). Ras induce también la activación de la vía PI3K/PDK1/Akt, necesaria para la desaparición de las fibras de stress inducida por mutantes activadas de Ras en fibroblastos NIH3T3 (287).

En este trabajo, se demuestra que la inhibición de la activación de p38 por la sobreexpresión de los oncogenes v-Ras, v-Raf y v-Src depende de la actividad RalA, ya que la coexpresión de S28N-RalA restauró los niveles de fosforilación de p38 a los valores de las células control.

Existe en la literatura un importante número de reportes de los cuales podría asumirse un rol general promotor de la formación de fibras de stress por parte de p38, mientras que Erk inhibiría la formación de las mismas. p38 está involucrado por ejemplo en la extensión de neuritas inducida por NGF en células PC12 (288), un mecanismo mediado por Rac1 (258) e inhibido por RalA (233). La actividad de p38 en la extensión de neuritas involucraría la fosforilación de paxilina (288), una molécula de unión a vinculina y parte de los complejos de adhesión focal, que funciona como proteína de andamiaje para la organización de complejos de señalización a nivel de los FAC (281,289). PAK, a su vez, es capaz formar un complejo con caldesmon y fosforilar miosina en el contexto de fibroblastos transformados por v-Erb (290). p38 induce por medio de MK2 la fosforilación y activación de HSP27 (291,292,293), una chaperona capaz de unir y modular la polimerización de actina (293,294). La vía PAK/p38/MK2/HSP27 es necesaria para la organización de las fibras de actina y la migración de células de músculo liso (295,296). Además, se demostró que tanto la actividad p38 como HSP27 son necesarias para la inducción del creci-

miento axonal de neuronas sensoriales in vitro, un mecanismo que depende de la polimerización de actina (297). JNK, p38 y, en menor medida, Erk, mediarían asimismo la inducción de fibras de stress en respuesta a 4-hidroxi-2-nonenal en células endoteliales bovinas en cultivo (298), mientras que JNK, pero no p38, mediaría la inducción de fibras de stress en cultivos primarios de queratinocitos por una vía que involucra activina, Rho y MEKK1 (299). p38 es también necesaria para la formación de fibras de stress inducida por KGF en células de próstata DU145 o por la toxina Pertussis en células endoteliales de aorta bovina (300), así como para la reorganización de actina por TGF- $\beta$  en células de carcinoma de próstata PC-3U (301,302,303). p38 sería necesaria para la migración transendotelial de células de carcinoma de colon HT29 (304). De forma inversa en células HUVEC, la inhibición de la fibrillogénesis por tratamiento con el fragmento III-1C de FN inhibió la actividad Rho y estimuló la actividad CDC42 y p38, pero no moduló JNK ni Erk (285).

Es importante destacar aquí que en este trabajo de Tesis la coexpresión de S28N-RalA no modificó los niveles de activación de Erk y Akt inducidos por la sobreexpresión de los oncogenes. Un reporte previo demuestra que, al menos en células epiteliales RIE1, la activación sostenida de K-Ras induce una disminución de la activación de p38 de forma independiente de Raf y PI3K (305). Los resultados obtenidos en esta Tesis sugieren la posibilidad de que RalA podría mediar dicha inhibición. Por otro lado, en contradicción con esta hipótesis, una vía Ras/RalGEF/p38 ha sido sugerida como reguladora de la susceptibilidad a infección con reovirus (306), aunque sorprendentemente en el artículo no se demuestra la activación de p38 por Rlf ó RalA. Una posible vía

por la cual RalA promovería la inhibición de la activación de p38 sería la unión a RalBP1 y la estimulación de la actividad GAP a CDC42 y Rac1 (24,264).

En este trabajo se observó que la inhibición de la vía MEK/Erk por tratamiento con el inhibidor farmacológico PD98059, o de la vía PI3K/PDK/Akt por tratamiento con LY294002, restauró parcialmente las fibras de stress en los fibroblastos transformados, en concordancia con reportes previos sugiriendo un rol de estas quinasas en la regulación de la conformación del citoesqueleto de actina (287). Es notorio, sin embargo, el hecho de que la inhibición de las vías Raf/MEK/Erk ó PI3K/PDK/Akt indujeron una reversión del fenotipo mucho menos importante que la obtenida por inhibición de RalA.

Se ha publicado previamente que Erk promueve la migración celular, a través de un mecanismo que involucraría la activación de MLCK (307,308). La vía Mek/Erk es necesaria para la pérdida de las fibras de stress inducida por Ras-V12 en fibroblastos Rat1 (309) y los cambios morfológicos por Ki-Ras y v-Src en células NRK (310). Además, Erk1, 2 y 5 median la inhibición de la formación de fibras de stress inducida por v-Src en fibroblastos NIH3T3 (178). Src induce la pérdida de las fibras de stress, al menos en parte, mediante la activación de MEK/Erk y la inhibición de la vía RHO/ROCK/LIMK (88,89).

En conjunto, los resultados descriptos soportan el concepto de una multiplicidad de vías río abajo de la señal oncogénica en la regulación del citoesqueleto de actina.

Más importante, sin embargo, fue el efecto observado de la inhibición de p38 por tratamiento con SB203580 ó por la sobreexpresión de una dominante negativa de p38. Por ambos métodos, la inhibición de p38 indujo la pérdida de

las fibras de stress no sólo en las células NIH3T3-Neo sino también en las doble transfectantes v-Ras/S28N-RalA. Asimismo, la activación de p38 en células transformadas por v-Ras por la sobreexpresión transiente de una variante constitutiva del activador de p38 MKK6, MKK6Eb, fue capaz de restaurar las fibras de stress, en forma dependiente de p38. Todo esto sugiere fuertemente que v-Ras, y posiblemente los otros oncogenes, inducen la desaparición de las fibras de stress de actina en células NIH3T3 por medio de una vía que involucra la inhibición, dependiente de RalA, de la vía MKK6/p38.

En este trabajo y en otros anteriores (163,247,284) se ha observado que la señalización inducida por v-Raf depende en parte de la actividad RalA. Asimismo, se ha observado que v-Raf promueve la inhibición de p38, un efecto que se ha atribuido a Ras de forma independiente de Raf (305). Es posible que ello se deba a diferencias en las herramientas utilizadas (v-Raf vs Raf-CAAX, por ejemplo) o a un efecto indirecto del fenotipo transformado sobre moléculas río arriba de Raf. Dicha posibilidad surge del hecho de que v-Raf en este modelo indujo la activación de Akt, una vía supuestamente independiente de Raf (2,3,4,5).

Resta por conocer cuál sería el mecanismo río abajo de p38. Interesantes posibilidades sugeridas por el análisis bibliográfico de la regulación del citoesqueleto de actina por p38 serían la regulación de la actividad HSP27 (292), la regulación de paxilina (288) o la regulación de la expresión de tropomiosinas (181).

### **Un posible intermediario: Tropomiosina**

Varios son los mecanismos que regulan la estabilidad de las fibras de stress. Entre ellos, la tropomiosina (TM) tiene un papel preponderante en la estabilización y funcionalidad de las fibras de stress en células no musculares (63,64,65,66). Se conoce que la transformación por Ras promueve la inhibición de la expresión de TMs (73,92,93), a través de un mecanismo que podría depender del balance Erk/p38 (181). Además, la sobreexpresión de TMs es capaz de inhibir la transformación inducida por Ras (91,92). Aquí se demuestra que la expresión de v-Ras y en menor medida de v-Src, pero no de v-Raf, inhibe la expresión de TM-2. Además, v-Ras disminuyó los niveles de mRNA de *tma*, el gen que codifica para TM-2, entre otras isoformas (63), sugiriendo un mecanismo de regulación transcripcional. Sin embargo, la inhibición de MEK ó PI3K por tratamiento con PD98059 ó LY294002 respectivamente, fue incapaz de restaurar la expresión de TM-2 en las células NIH3T3-v-Ras. Otros resultados preliminares sugieren que PLD1 tampoco mediaría este efecto. Además, en contradicción con reportes previos (181), la inhibición de p38, por expresión transiente de la dominante negativa o por tratamiento farmacológico con SB203580, no disminuyó la expresión de TM-2 ni en las células control ni en las células NIH3T3-v-Ras/S28N-RalA. La activación de p38 por sobreexpresión transiente de MKK6Eb tampoco restauró la expresión de TM-2 en células NIH3T3-v-Ras. La falta de efecto de todos estos tratamientos podría deberse a que la inhibición de la expresión de TM inducida por Ras y RalA sería mediada por un efector distinto a los ensayados, aunque no puede descartarse que la falta de efecto se deba a una inhibición, o sobreactivación, insuficiente de las



vías por los tratamientos farmacológicos o por la expresión transiente de las mutantes. Sin embargo, ensayos control de Western blot contra las formas fosforiladas de estas proteínas en presencia de PD98059 ó LY294002 sugieren que los tratamientos farmacológicos fueron altamente eficaces. En conjunto, estos resultados sugieren que la inhibición de TM-2 inducida por v-Ras y mediada por RalA no sería necesaria para la desaparición de las fibras de stress en células NIH3T3. Es interesante, sin embargo, que los tres oncogenes indujeron una marcada delocalización de las TM restantes. Dicha delocalización mostró ser dependiente de la actividad de RalA, ya que fue completamente abolida por coexpresión de S28N-RalA. Además, de forma similar a la formación de fibras de stress, la colocalización de TMs con actina sería dependiente de p38, ya que la inhibición de su actividad por tratamiento con SB203580 indujo la delocalización de TM tanto en células NIH3T3-Neo como en células NIH3T3-v-Ras/S28N-RalA. Resta saber si la delocalización de las tropomiosinas es al menos en parte responsable de la desorganización de las fibras de stress o si sólo es una consecuencia de la reorganización del citoesqueleto de actina.

### **La GTPasas Rho estaría en una vía paralela o río abajo de RalA**

Dado que uno de los efectores de RalA es una GAP específica para la familia Rho (24,264), se hipotetizó que el efecto de RalA en la regulación de las fibras de stress podría deberse a la regulación de esta familia. La familia Rho de GTPasas monoméricas es la principal reguladora de la morfología celular y de la conformación del citoesqueleto (5,25,54,74,87,311). Rac ha sido propuesto como el principal inductor de la formación de lamellipodia y CDC42 de filo-

podía (55), estructuras que dependen de la polimerización *de novo* de actina e imprescindibles para la motilidad celular (56,57). Rac y CDC42 promoverían la nucleación y polimerización de actina a través de la activación, mediada por N-WASP ó WAVE, de Arp2/3 (55). Sin embargo, el mayor inductor de fibras de stress es Rho. Esta GTPasa induce la activación de la vía ROCK/LIMK y la fosforilación de cofilina, una molécula involucrada en la desestabilización de las SFs (55). Rho induce asimismo la fosforilación de la cadena liviana de miosina a través de la activación de MLCK y de la inhibición de la fosfatasa de miosina (90), promoviendo la contractilidad celular y estabilizando las SFs. Además, como se comentó previamente, la familia Rho puede modular la actividad de p38 y JNK. Ras induce la activación de Rho mediante mecanismos que involucrarían la modulación de p190RhoGAP, CDC42, Rac y Tiam1 (312,313,314).

Se encontró que la sobreactivación de RhoA por medio de la expresión transiente de V14-RhoA, una mutante constitutivamente activada de Rho (182), en concordancia con reportes previos (62,182), induce la formación de una densa trama de fibras de stress y contracción celular tanto de las células control NIH3T3-Neo o doble transfectantes v-Ras/S28N-RalA, como de las células transformadas por v-Ras. Asimismo, la expresión transiente de N19-RhoA (182), una variante dominante negativa análoga a N17-Ras ó S28N-RalA, inhibió la formación de fibras de stress en las tres líneas celulares. Estos resultados sugieren la posibilidad de que RalA podría mediar la inhibición de la formación de las fibras de stress inducida por v-Ras a través de la inhibición de RhoA. Esta posible vía de señalización sería complementaria a la regulación

por la vía Raf/MEK/Erk, la cual inhibiría la formación de las fibras de stress río abajo de Rho (88,89).

### **El efecto de RalA en la capacidad migratoria**

Se ha demostrado previamente que Ral tendría un rol en la inducción de la migración celular inducida por EGF (158) y en la quimiotaxis de mioblastos esqueléticos (273). Además, POB1, una molécula clonada por su capacidad de unir RalBP1, es capaz de promover la migración celular por unión a PAG2, una molécula que une paxilina (315). Más recientemente, se reportó que RalB, pero no RalA, sería necesaria para la migración de dos líneas de carcinoma humano (316). Además, en fibroblastos, la capacidad migratoria suele correlacionar inversamente con la estabilidad de las fibras de stress. Se hipotetizó entonces que RalA podría mediar la inducción de la capacidad migratoria inducida por los oncogenes en los fibroblastos NIH3T3. Como era esperable, se encontró que la expresión de los oncogenes induce un notable aumento en la capacidad migratoria de estas células. Además, se demuestra que este aumento depende de la actividad RalA, ya que fue fuertemente inhibido por la coexpresión de la dominante negativa. El hecho de que una dominante negativa de RalA inhiba la capacidad migratoria no concuerda con el reporte previo en el cual se sugiere que RalB, pero no RalA, sería necesaria la migración celular (316). Varias hipótesis permitirían explicar estas diferencias: en primer lugar, los distintos tipos celulares utilizados, ya que en dicho artículo se utilizaron líneas tumorales en las cuales las mutaciones aparecidas no están por completo caracterizadas; segundo,

el método de inhibición de Ral difiere en ambos trabajos (sobreexpresión de S28N-RalA en este trabajo, *knockdown* por siRNA en dicho artículo).

La modulación de la capacidad migratoria, junto con resultados previos demostrando que media la inducción de uPA y MMPs inducida por los oncogenes (163), propone un interesante modelo para explicar la importancia de la vía Ras/RalGEFs/Ral en la promoción de la capacidad tumorigénica y metastásica (142,163,172,224,206,243,317). Un esquema que resume los resultados obtenidos en la regulación del citoesqueleto se muestra en la Figura 37.

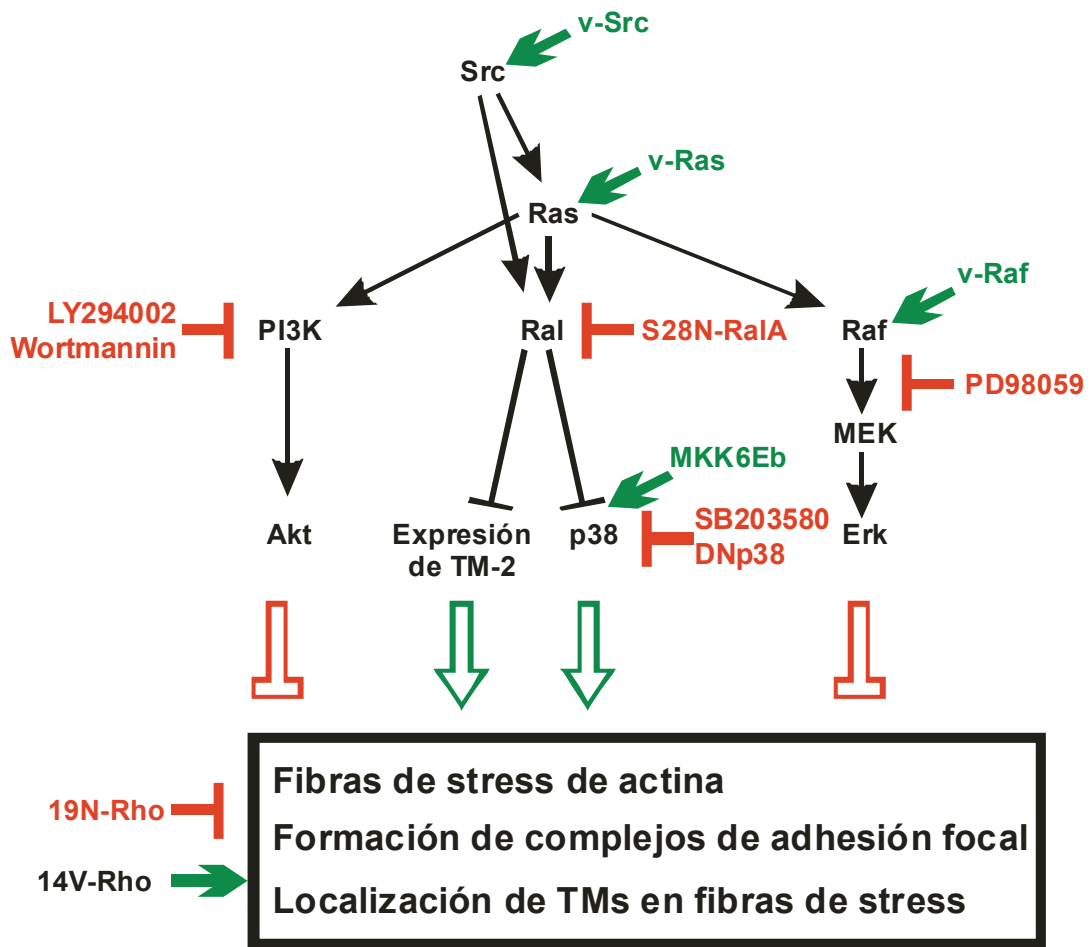


Figura 37 – Modelo esquemático de las vías de señalización descritas en este trabajo involucradas en la regulación de la polimerización de actina. El rol de RalA sería río abajo de Ras y en paralelo a Raf-1 y PI3K. El menos en parte, RalA ejercería su función a través de la regulación de TMs y de p38. Se muestran asimismo las construcciones y las drogas utilizadas para modular la actividad enzimática.

***RALA EN LA SOBREVIDA CELULAR INDUCIDA POR ONCOGENES***

La invasión del tejido circundante o de órganos distantes implica la exposición de la célula tumoral a distintas matrices y a distintos factores de crecimiento, hormonas y demás compuestos solubles. Por ello, una de las principales características que debe adquirir una célula para lograr un fenotipo maligno es la capacidad de sobrevivir en distintos microambientes y frente a distintos estímulos proapoptóticos. El incremento de la capacidad de supervivencia celular es asimismo responsable de la adquisición de resistencia a las terapias antitumorales, por lo que es de principal importancia un entendimiento cabal de las vías de señalización involucradas, a fin de generar nuevas estrategias antitumorales.

Ral ha sido recientemente involucrada en los mecanismos de inducción de supervivencia celular. Ratones deficientes en RalGDS serían más resistentes a la formación de tumores, lo que se debería a un aumento de la apoptosis (224). Además, utilizando la técnica de knock-down por siRNA, se demostró que RalB, pero no RalA, sería necesario para la supervivencia de células HeLa, MCF7 y SW480 (318). Además, la sobreexpresión de POB1 mediaría la acumulación de doxorubicina y la promoción de apoptosis de forma dependiente de la unión a RalBP1 (319).

Dado que en trabajos previos se demostró que la coexpresión de S28N-RalA inhibe la inducción de tumores por v-Ras, v-Raf ó v-Src en células NIH3T3 (163), se decidió investigar si ello se debía a una menor proliferación o

a un aumento de la muerte celular *in vivo*. Se decidió estudiar además la posibilidad de que RalA mediara señales de supervivencia *in vitro* y los mecanismos implicados en esta regulación.

### **La actividad RalA es necesaria para la supervivencia *in vivo* a corto plazo**

En primer lugar, y debido a que la expresión de S28N-RalA inhibe la capacidad tumorigénica inducida por la expresión de v-Ras, ó v-Src, se estudió si ello se debía a una incapacidad de las doble transfectantes de crecer en un medio inhóspito o si se debía a una muerte celular masiva en los primeros días post-inoculación. Se encontró que mientras que las células control mueren al cabo de pocos días de ser inoculadas en la dermis de ratones singéneos, las células transformadas no sólo sobreviven, sino que proliferan en el mismo ambiente. En cambio, la expresión de S28N-RalA restaura una importante mortalidad en las células inoculadas, demostrando que RalA es necesaria para la supervivencia celular *in vivo* en los primeros días post-inoculación y sugiriendo que la adquisición de resistencia *in vivo* inducida por la expresión de los oncogenes sería un prerrequisito para la tumorigénesis. Si bien también se observó una disminución de las figuras mitóticas en el sitio de inoculación, el gran número de células apoptóticas observadas fuerza a la conclusión de que la supervivencia celular mediada por RalA, y no la capacidad proliferativa, sería el factor más importante en el destino de las células inoculadas. Es importante aclarar que, en algunos ensayos, a los 7 días post-inoculación de células NIH3T3-Neo, sólo

se pudo observar la cicatriz del sitio de inoculación, no encontrándose células inoculadas sobrevivientes.

### **Estudios de sobrevida *in vitro***

A fin de estudiar los mecanismos mediante los cuales RaIA promovería la sobrevida celular, se realizaron diversos estudios *in vitro*. En primer lugar, se analizó si RaIA era necesaria para la promoción de la sobrevida celular, inducida por los oncogenes, frente a distintos estímulos proapoptóticos. Se utilizaron métodos de inducción de apoptosis no relacionados entre sí, como la inhibición del anclaje, la privación de suero y el tratamiento con cisplatino. En todos los casos, se encontró que la expresión de cualquiera de los tres oncogenes es suficiente para inducir un marcado aumento de la resistencia a la muerte celular, lo que sugiere que estos oncogenes inducen una señal de sobrevida general y no un mecanismo de protección específico para un determinado estímulo. La expresión de S28N-RaIA restauró significativamente la tasa de muerte celular frente a los tratamientos proapoptóticos mencionados. No se observaron, sin embargo, diferencias significativas en la tasa de muerte celular basal (en condiciones de crecimiento con medio completo y suero fetal bovino). Además, la tasa de crecimiento en condiciones óptimas de cultivo no mostró diferencias entre las líneas celulares estudiadas, por lo que la resistencia diferencial a los estímulos proapoptóticos no se debería a una tasa proliferativa distinta. Los resultados obtenidos en estos ensayos sugieren que los oncogenes v-Ras, v-Raf y v-Src inducen señales de sobrevida celular a través de la actividad RaIA en fibroblastos NIH3T3.



### **La señal inducida por RalA es independiente de Raf ó PI3K**

Es conocido que Ras promueve la sobrevida celular en distintos modelos tumorales, tanto murinos como humanos (2), principalmente a través de la activación de Erk y PI3K (185,320). Dado que Ras promueve la sobrevida celular por medio de distintos efectores, se estudió si el efecto de la inhibición de RalA en la inducción de apoptosis podía deberse a la modulación de otra vía río abajo de Ras.

PI3K induce la producción de 3,4,5-PIP<sub>3</sub>, el cual activa a PDK. PDK entonces fosforila a Akt/PKB, la cual depende tanto de la fosforilación por parte de PDK como de unión directa a 3,4,5-PIP<sub>3</sub> a fin de alcanzar máxima activación (321). Una vez activada, Akt induce la fosforilación de múltiples proteínas involucradas en el control de la sobrevida celular, incluyendo a elementos de la maquinaria apoptótica como Bad (322,323,324) ó caspasa 9 (140) y factores de transcripción como p53 (325,326,327,328), p73 (329), forkheads (37,226,330) ó NF-κB (331,332,333). La vía PI3K/PDK/Akt inhibiría asimismo la activación de p38 (334), o de quinasas implicadas en la activación de p38 (335,336).

En el presente trabajo, los tratamientos con inhibidores de MEK1/2 (PD98059) ó PI3K (Wortmannina y LY294002) synergizaron con la dominante negativa S28N-RalA en la inhibición de la sobrevida celular inducida por los oncogenes en ensayos de privación de suero en una forma compleja y dependiente de la señal río arriba. MEK cooperaría con RalA en la promoción de sobrevida por v-Raf, mientras que PI3K sería importante, junto con RalA, en la señalización antiapoptótica de v-Ras. Se ha publicado previamente el synergismo en las vías efectoras de Ras (HRas61L, KRas12V ó NRas13D) en la pro-

tección de fibroblastos de rata RIE1 frente a anoikis (337). En dicho artículo, se sugiere que la actividad de supervivencia de los oncogenes depende de las vías Raf/Mek/ERK y RalGDS/Ral, mientras que la vía PI3K no estaría involucrada. Es posible que las diferencias entre las mutantes utilizadas en dicho estudio y esta Tesis difieran parcialmente en las vías efectoras requeridas. De todas formas, ambos estudios sugieren fuertemente que la supervivencia mediada por Ras y posiblemente Raf y Src dependan de una compleja red de señalización y no de simples vías únicas.

Como era esperable, la inhibición de RalA por la expresión de S28N-RalA no modificó la inducción de la fosforilación de Erk1/2 y Akt (moléculas activadas por Mek1/2 y PI3K, respectivamente). Esto último, sumado a los resultados obtenidos en los experimentos de inhibición farmacológica de MEK ó PI3K, sugiere que la vía de regulación de la supervivencia celular mediada por RalA sería no sólo independiente de las vías Raf/Mek/Erk y PI3K/PDK/Akt sino también la única que es necesaria para la señalización por los tres oncogenes.

### **El rol de p38 en la supervivencia mediada por RalA**

p38 está involucrada en la inducción de arresto celular (131) o apoptosis (125,126,127,128,130,132). También modularía la supervivencia celular mediante la vía MAPKAK2/HSP27 antes comentada (295,296,338,339). En este trabajo, se observó que la privación de suero en los fibroblastos control indujo un marcado aumento en la fosforilación (activación) de p38, mientras que la expresión de los oncogenes impidió este aumento. Asimismo, se demostró que la expresión de la dominante negativa de RalA restauró la activación de p38 frente a la

privación de suero, sugiriendo que los oncogenes podrían promover la supervivencia, en parte, a través de la inhibición, mediada por RalA, de la activación de p38.

Para demostrar una relación causal entre la activación de p38 y la inducción de apoptosis, se realizaron ensayos de privación de suero en presencia de un inhibidor farmacológico de p38, SB203580. El tratamiento con este inhibidor impidió la muerte celular inducida por privación de suero en todas las líneas, demostrando que la activación de p38 es indispensable para la inducción de apoptosis en este modelo. En experimentos no mostrados, un tratamiento de stress intenso (adición de 0,5 M NaCl) indujo la activación de p38 en las líneas transformadas por los oncogenes, demostrando que las vías de activación de p38 se encuentran funcionales. Otra MAPK activada por stress, JNK1, es fosforilada y activada por la sobreexpresión de estos oncogenes y su activación sería más importante aún en presencia de la dominante negativa S28N-RalA, lo que sugiere que la activación de p38, pero no de JNK, es responsable de la muerte apoptótica, al menos de aquella inducida por la privación de suero.

### **La supervivencia mediada por RalA en el contexto de la red de transducción de señales**

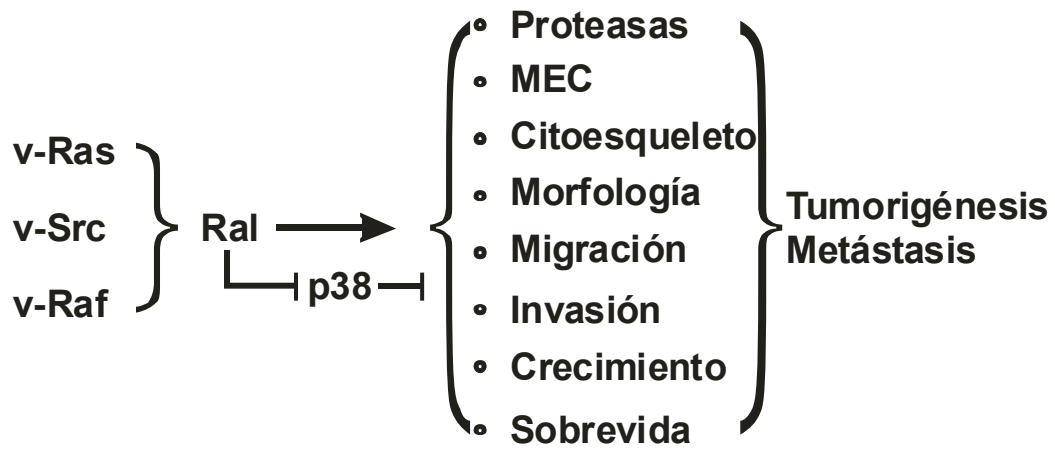
Los ensayos de supervivencia celular, en su conjunto, sugieren que v-Ras, v-Raf y v-Src inducirían un aumento en la supervivencia celular por distintos mecanismos, entre los que se incluyen la activación de Raf-1, PI3K y RalA, que estos mecanismos serían independientes entre sí y que la vía de RalA depende-

ría de la inhibición de la actividad de p38. Sin embargo, es posible que la vía de señalización mediada por RalA no se agote en la inhibición de p38 y que otros mecanismos paralelos posean importancia. En este sentido, es importante recordar que la sobreactivación de RalA induce la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (33) y que Ral estaría involucrada también en la activación de AP1 (35,36,225). No se ha podido, sin embargo, observar una modulación reproducible por la expresión de S28N-RalA en la actividad luciferasa en ensayos de genes reporteros para NF- $\kappa$ B ó AP1 en este sistema, lo que sugiere que la actividad antiapoptótica de la vía Ras/RalGEF/RalA no involucraría una modulación de las actividades NF- $\kappa$ B ó AP1, si bien otros experimentos serían necesarios para descartar completamente estas vías. Tampoco se ha encontrado una modulación de la expresión, según ensayos de Western blot, de los componentes de la maquinaria de regulación de la apoptosis Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> y Bax. No se ha estudiado, sin embargo, la localización o el nivel de fosforilación de estas moléculas, por lo que tampoco puede descartarse un rol de la familia Bcl2 en la regulación de la supervivencia inducida por la vía Ras/RalGEFs/Ral.

***RAL EN LA REGULACIÓN DEL CITOESQUELETO, LA SOBREVIDA Y LA TUMORIGÉNESIS. UNA POSIBILIDAD TERAPÉUTICA?***

En resumen, el presente trabajo y otros anteriores demuestran que la actividad de la GTPasa RalA es necesaria para la modificación de componentes de matriz extracelular, de proteasas, de receptores de la MEC y de la organización del citoesqueleto así como para la promoción de supervivencia celular inducidos por oncogenes en fibroblastos. Estos profundos cambios en el fenotipo celular podrían explicar el hecho de que RalA es necesaria para la adquisición de un fenotipo maligno por distintos oncogenes y sugieren que Ral sería un blanco de elección para la generación de nuevas terapias racionales antitumorales (Figura 38). La hipótesis de que Ral sería un blanco más factible que otras GTPasas más estudiadas como Ras ó Rho, deriva del hecho de la vía Ral no parecería ser imprescindible en células no transformadas. Se ha demostrado que ratones deficientes en RalGDS no muestran un fenotipo patológico evidente y los ratones transgénicos para S28N-RalA en neuronas son asimismo viables (210,224). Existe la posibilidad, sin embargo, de que estos ratones hayan desarrollado mecanismos de adaptación al defecto en la vía Ral-GEFs/Ral, como ser la sobreexpresión de otra RalGEF ó de RalB; estos mecanismos no estarían presentes al momento de tratar a un paciente oncológico. La inhibición específica de Ral por medios farmacológicos, manteniendo la actividad Ras ó Rho, será una tarea difícil de realizar, debido a la importante homología dentro de la familia. Pueden imaginarse moléculas pequeñas que mimeticen el dominio de unión a Ral de RalBP1 ó de sec5 (212) o inhibidores

de la unión Ral a los RalGEFs, que tengan en cuenta las pequeñas pero importantes diferencias estructurales que dan origen a la especificidad de unión y de señalización entre las GTPasas. Se ha publicado asimismo que la sobreexpresión del dominio de unión a Ras de Rgl es capaz de revertir la transformación por v-Ras (340), aunque este efecto parecería ser debido a la inhibición general de Ras, ya que también redujo la activación de Raf (340). Es notorio el hecho de que la inhibición de p38 parecería ser el mecanismo mediante el cual Ral transduce tanto la señal antiapoptótica como la de remodelación del citoesqueleto. Es posible, en este contexto, pensar en estrategias alternativas a la inhibición específica de RalA, como ser el tratamiento con moléculas que induzcan la activación de p38. Ello podría lograrse, por ejemplo, mediante el desarrollo de inhibidores de fosfatasa específicas para dicha quinasa. Son, sin embargo, múltiples las interacciones de RalA y RalB, sus activadores RalGEFs y sus efectores, lo que sugiere que una estrategia que inhiba directamente Ral sería más eficaz que inducir la activación de p38. Por otro lado, es posible que la inhibición de Ral en el paciente oncológico implique efectos secundarios importantes y que el desarrollo de inhibidores selectivos de vías reguladas por Ral sean efectivas, al tiempo que menos deletéreas para el paciente. Sea cual sea la respuesta final, los descubrimientos realizados en los últimos años en cuanto a las vías de señalización reguladas por Ral (189), incluyendo los aportes de nuestro laboratorio (163) y el presente trabajo de Tesis, permiten proponer a RalA como un mediador trascendental de las vías de señalización oncogénicas y, por ende, un importante blanco terapéutico para el desarrollo de nuevas terapias dirigidas contra el cáncer.



**Figura 38 – Los resultados obtenidos en este trabajo y otros anteriores permiten proponer un rol central de Ral en los mecanismos que median la transformación maligna y la progresión tumoral. La inhibición de p38 podría ser un mecanismo mediante el cual Ral promueve la tumorigénesis.**

10 20 30 40 50 60

RALA\_MOUSE --MAANKPKG-----QNSLALHKVIMVGGVGSALTLQFMYDEFVEDYEPTK-AD  
RASM\_MOUSE --MATSAVP-----SENLPYKLVVVGDDGVGKSALTIQFFQKIFVDPDYDPTI-ED  
RASD1\_MOUSE MKLAAMIKKMCPDSELSIPAKNCRYMVILGSSKVGKTAIVSRFLTGRFEDAYTPTI-ED  
RASL\_MOUSE -----MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHFVDEYDPTI-ED  
RASN\_MOUSE -----MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHFVDEYDPTI-ED  
RAN\_MOUSE -----MAAQGEPPQVQFKLVLVGDDGTGKTTFVKRHLTGEFEKKYVATLGVE  
RASK\_MOUSE -----MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHFVDEYDPTI-ED  
Consensus -- ----- YKLV VG GGVGS SALT Q FV YPTI-ED

70 80 90 100 110 120

RALA\_MOUSE SYRKVVLDGEEVQIDILDTAGQEDYAAIRDNYFRSGEGFLCVFSITEMESFAATADFRE  
RASM\_MOUSE SYLKHTEIDNQWAILDVLDTAGQEEFSAMREQYMRDGDGFLIVYSVTDKASFEHVDRFHQ  
RASD1\_MOUSE FHRKFYSIRGEVYQLDILDTSGNHPPAMRRLSILTGDFVILVFSLDNRDSFEEVQRLKQ  
RASL\_MOUSE SYRKQVVIDGETCLLDILDTAGQEEYSAMRDQYMRGTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHHYRE  
RASN\_MOUSE SYRKQVVIDGETCLLDILDTAGQEEYSAMRDQYMRGTGEGFLCVFAINNSKSFADINLYRE  
RAN\_MOUSE VHPLVFHTNRPPIKFNWDTAGQEKFGGLRDGYYIQACAIIMFDVTSRVTYKNVNWHR  
RASK\_MOUSE SYRKQVVIDGETCLLDILDTAGQEEYSAMRDQYMRGTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHHYRE  
Consensus SYRK IDGE LDILDTAGQE AMRD Y RTG GFL VF SF

130 140 150 160 170 180




RALA\_MOUSE QILRVKED-----NVPFLLVGNKSDLEDKRQVSVEEAKNRADOWN--VNYVETSAK  
RASM\_MOUSE LILRVKDRE-----SFPMILVANKVDLMHLRKVTRDQGKEMATKYN--IPYIETSAK  
RASD1\_MOUSE QILDTKSCLDNIETIVVGGVGGGRDTEETEOREIEQLVGDDPQRCAYFEISAK  
RASL\_MOUSE QIKRVKDS-----LIVMIVGKNGS--VOTKQAQELARSYG--IPFIETSAK  
RASN\_MOUSE QIKRVKDS-----DVPMVLVGNKCDLPT-RTVDTKQAHELAKSYG--IPFIETSAK  
RAN\_MOUSE DLVRVC-----ENIPIVLCGNKVDIKD-RKVKAKSIVFHRKKN--LQYYDISAK  
RASK\_MOUSE QIKRVKDS-----DVPMVLVGNKCDLPS-RTVDTKQAQELARSYG--IPFIETSAK  
Consensus QI RVK ----- VP VLVGNK DL R V A -- ETSAK

190 200 210 220 230 240

RALA\_MOUSE TR--ANVDKVVFFDLMREIRARKME-----DSKEKNGKKRKS-----  
RASM\_MOUSE DPP-LNVDKTFHDLVRVIRQQVPE-----KNQKKKKKTQWRGDR---  
RASD1\_MOUSE KN--SSLDQMFRALFAMAKLPEMSPDLHRKVSQYCDVLHKKALRNKLLRAGSGGGGD  
RASL\_MOUSE TR--QGVDDAFYTLVREIRKHKEK-----MS-KDGKKKKKKS-----  
RASN\_MOUSE TR--QGVEDAFYTLVREIRQYRLK-----KLNSSDDGTQGCM-----  
RAN\_MOUSE S--NYNFEKPFLLWLRKLIQDPNLEFVAMPALAPPEVMDPALAAQYEHDLVAQTTA--  
RASK\_MOUSE TR--QRVEDAFYTLVREIRQYRLK-----KISKEEKTQGCVK-----  
Consensus -- V F L R IR -----

250 260 270 280

RALA\_MOUSE -----LAK-----RIRERCIL-  
RASM\_MOUSE -----ATG-----THKLQCVIL-  
RASD1\_MOUSE HGDAFGILAPFARRPSVHSDLMIYIREKTSVGSQAKDKERCVIS-  
RASL\_MOUSE -----RTRCTVM-  
RASN\_MOUSE -----GSPCVLM-  
RAN\_MOUSE -----LPDEDDL-  
RASK\_MOUSE -----IKKCVIM-  
Consensus ----- C -

-  GTP Binding Domain (P Loop)
-  Effector Domain
-  CAAX (Isoprenylation)

# BIBLIOGRAFÍA



- 
- 1 Hanahan D, Weinberg R. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000, 100:57-70
  - 2 Downward J. Ras signaling and apoptosis. *Curr Op Genes Devel* 1998, 8:49-54.
  - 3 Reuther G y Der C. The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree. *Curr Op Cell Biol* 2000, 12:157-165.
  - 4 Takai Y, Sasaki T y Matozaki T. Small GTP-Binding Proteins. *Physiol Rev* 2001, 81:153-208
  - 5 Bar-Sagi D, Hall A. Ras and Rho GTPases: A family reunion. *Cell* 2002, 103:227-238
  - 6 Scita G, Tenca P, Frittoli E, Tochetti A, Innocenti M, Giardina G y Di Fiore P. Signaling from Ras to Rac and beyond: not just a matter of GEFs. *EMBO J* 2000, 19:2393-2398
  - 7 Osada M, Tolkacheva T, Li W, Chan T, Tsihchlis P, Saez R, Kimmelman A, Chan A. Differential roles of Akt, Rac, and Ral in R-Ras-mediated cellular transformation, adhesion, and survival. *Mol Cell Biol* 1999, 19:6333-6344
  - 8 Rebollo A, Martínez C. Ras Proteins: Recent Advances and New Functions. *Blood* 1999, 94:2971-2980
  - 9 White M, Nicolette C, Minden A, Polverino A, Aelst L, Karin M y Wigler M. Multiple Ras Functions Can Contribute to Mammalian Cell Transformation. *Cell* 1995, 80:533-541.

- 
- 10 Chardin P y Tavitian A. The ral gene: a new ras related gene isolated by the use of a synthetic probe. *EMBO J* 1986, 5:2203-2208
  - 11 Chardin P y Tavitian A. Coding sequences of human ralA and ralB cDNAs. *Nucleic Acids Res* 1989, 17:4380
  - 12 Olofsson B, Chardin P, Touchot N, Zahraoui A y Tavitian A. Expression of the ras-related ralA, rho12 and rab genes in adult mouse tissues. *Oncogene* 1988, 3:231-234.
  - 13 Wildey G, Viggewarapu M, Rim S y Denker J. Isolation of cDNA clones and tissue expression of rat RalA and RalB GTP-binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1993, 194:552-559
  - 14 Spiliotis M y Brehm K. *Echinococcus multilocularis*: identification and molecular characterization of a Ral-like small GTP-binding protein. *Exp Parasitol* 2004, 107: 163-172
  - 15 Lipschutz J y Mostov K. Exocytosis: The Many Masters of the Exocyst. *Curr Biol* 2002, 12: R212-R214
  - 16 Wolthuis R, Bos J. Ras caught in another affair: the exchange factors for Ral. *Curr Op Gen Dev* 1999, 9:112-117
  - 17 Nicely N, Kosak J, de Serrano V y Mattos C. Crystal Structures of Ral-GppNHp and Ral-GDP Reveal Two Binding Sites that Are Also Present in Ras and Rap. *Structure* 2004, 12:2025-2036
  - 18 Ohta Y, Suzuki N, Nakamura S, Hatwig J, Stossel T. The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96:2122-2128

- 
- 19 van der Flier A y Sonnenberg A. Structural and functional aspects of filamins. *Biochim Biophys Acta* 2001, 1538:99-117
  - 20 Feng Y y Walsh C. The many faces of filamin: A versatile molecular scaffold for cell motility and signalling. *Nature Cell Biol* 2004, 6:1034-1038
  - 21 Luo J, Liu X, Frankel P, Rotunda P, Ramos M et al. Functional association between Arf and RalA in active phospholipase D complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95:3632-3637
  - 22 Xu L, Frankel P, Jackson D, Rotunda T, Boshans R, D'Souza-Schorey, Foster D. Elevated phospholipase D activity in H-Ras- but K-Ras-transformed cells by the synergistic action of RalA and ARF6. *Mol Cell Biol* 2003, 23:645-654
  - 23 Aguirre Ghiso J, Alonso D, Farías E, Gómez D, Bal de Kier Joffé E. Deregulation of the signaling pathways controlling urokinase production. Its relationship with the invasive phenotype. *Eur J Biochem* 1999, 263:295-304
  - 24 Cantor S, Urano T, Feig L. Identification and Characterization of Ral-Binding Protein 1, a Potential Downstream Target of Ral GTPases. *Mol Cell Biol* 1995, 15:4578-4584
  - 25 Nobes C, Hall A. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol* 1999, 144:1235-1244
  - 26 Erickson J y Cerione R. Multiple roles for Cdc42 in cell regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2001, 13:153-157

- 
- 27 Nakashima S, Morinaka K, Koyama S, Ikeda M, Kishida M, Okawa K, Iwamatsu A, Kishida S y Kikuchi A. Small G protein Ral and its downstream molecules regulate endocytosis of EGF and insulin receptors. *EMBO J* 1999, 18:3629-3642
- 28 Yamaguchi A, Urano T, Goi T y Feig L. An Eps Homology (EH) Domain Protein That Binds to the Ral-GTPase Target, RalBP1. *J Biol Chem* 1997, 272:31230-31234
- 29 Ikeda M, Ishida O, Hinoi T, Kishida S y Kikuchi A. Identification and Characterization of a Novel Protein Interacting with Ral-binding Protein 1, a Putative Effector Protein of Ral. *J Biol Chem* 1998, 273:814-821
- 30 Jullien-Flores V, Mahé Y, Mirey G, Leprince C, Meunier-Bisceuil B, Sorokin A, Camonis J. RLIP76, an effector of the GTPase Ral, interacts with the AP2 complex: involvement of the Ral pathway in receptor endocytosis. *J Cell Science* 2000, 113:2837-2844
- 31 Matsuzaki T, Hanai S, Kishi H, Liu Z-H, Bao Y-L, Kikuchi A, Tsuchida K y Sugino H. Regulation of Endocytosis of Activin Type II Receptors by a Novel PDZ Protein through Ral/Ral-binding Protein 1-dependent Pathway. *J Biol Chem* 2002, 277: 19008-19018
- 32 Tsuchida K, Nakatani M, Matsuzaki T, Yamakawa N, Liu Z-H, Bao Y-L, Arai K, Murakami T, Takehara Y, Kurisaki A y Sugino H. Novel factors in regulation of activin signaling. *Mol Cell Endocrinol* 2004, 225:1-8

- 
- 33 Henry D, Moskalenko S, Kaur K, Fu M, Pestell R, Camonis J, White M. Ral GTPases contribute to regulation of cyclin D1 through activation of NF- $\kappa$ B. *Mol Cell Biol* 2000, 20:8084-8092
- 34 Wolthuis R, de Ruiter N, Cool R, Bos J. Stimulation of gene induction and cell growth by the Ras effector Rlf. *EMBO J* 1997, 16:6748-6761
- 35 Murai T, Ikeda M, Kishida S, Ishida O, Okazaki-Kishida M, Matsuura Y y Kikuchi A. Characterization of Ral GDP Dissociation Stimulator-like (RGL) Activities to Regulate c-fos Promoter and the GDP/GTP Exchange of Ral. *J Biol Chem* 1997, 272:10483-10490
- 36 De Ruiter N, Wolthuis R, Van Dam H, Burgering B y Bos J. Ras-Dependent Regulation of c-Jun Phosphorylation Is Mediated by the Ral Guanine Nucleotide Exchange Factor-Ral Pathway. *Mol Cell Biol* 2000, 20:8480-8488
- 37 Kops G, de Ruiter N, De Vries-Smits A, Powell D, Bos J y Burgering B. Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* 1999, 398:630-634
- 38 De Ruiter N, Burgering B, Bos J. Regulation of the Forkhead Transcription Factor AFX by Ral-Dependent Phosphorylation of Threonines 447 and 451. *Mol Cel Biol* 2001, 21: 8225-8235
- 39 Hofer F, Berdeaux R, Martin GS. Ras-independent activation of Ral by a Ca (2+)-dependent pathway. *Curr Biol* 1998, 8:839-842
- 40 Wang K y Roufogalis B. Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin stimulates GTP binding to the Ras-related protein Ral-A. *JBC* 1999, 274:14525-14528

- 
- 41 Sidhu S, Elsaraj S, Grujic O, Bhullar P. Calmodulin binding to the small GTPase Ral requires isoprenylated Ral. *BBRC* 2005, 336:105-109
- 42 Clough R, Sidhu R y Bhullar R. Calmodulin binds RalA and RalB and is required for the Thrombin-induced activation of Ral in human platelets. *JBC* 2002, 277:28972-28980
- 43 Ridley A, Schwartz M, Burridge K, Firtel R, Ginsberg M, Borisy G, Parsons J y Horwitz A. Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. *Science* 2003, 302:1704-1709
- 44 Li S, Guan J-L y Chien S. Biochemistry and biomechanics of cell motility. *Annu Rev Biomed Eng* 2005, 7:105-150
- 45 Ossowski L y Aguirre-Ghiso J. Urokinase receptor and integrin partnership: coordination of signaling for cell adhesion, migration and growth. *Curr Op Cell Biol* 2000, 12:613-620
- 46 Chang C y Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* 2001, 11:S37-S43
- 47 Benaud C, Dickson R, Thompson E. Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998, 50:97-116
- 48 Zern M y Reid L, editores. *Extracellular Matrix: chemistry, biology and pathobiology with emphasis on the liver*. Marcel Dekker Ed, New York, 1993, 591 pags.

- 
- 49 Litman P, Amieva M y Furthmayr H. Imaging of Dynamic Changes of the Actin Cytoskeleton in Microextensions of Live NIH3T3 Cells with a GFP Fusion of the F-Actin Binding Domain of Moesin. *BMC Cell Biol* 2001, 1:1
- 50 Cukierman E, Pankov R, Stevens D y Yamada K. Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension. *Science* 2001, 294:1708-1712
- 51 Defilippi P, Olivo C, Venturino M, Dolce L, Silengo L, Tarone G. Actin cytoskeleton organization in response to integrin-mediated adhesion. *Microsc Res Tech* 1999, 47:67-78
- 52 Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M y Zhong C. Focal Adhesion assembly. *Trends Cell Biol* 1997, 7:342-347
- 53 Calderwood D. Integrin activation. *J Cell Sci* 2004, 117:657-666
- 54 Fukata M, Nakagawa M, Kuroda S, Kaibuchi K. Cell Adhesion and Rho small GTPases. *J Cell Sci* 1999, 112:4491-4500
- 55 Bishop A, Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 2000, 348:241-255
- 56 Small J, Rottner K, Kaverina I, Anderson K. Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. *Biochim Biophys Acta* 1998, 1404:271-281.
- 57 Small J, Stradal T, Vignal E, Rottner K. The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol* 2002, 12:112-120
- 58 Goldmann W e Isenberg G. Analysis of filamin and  $\alpha$ -actinin binding to actin by the stopped flow method. *FEBS* 1993, 336:408-410

- 
- 59 Xu J, Wirtz D y Pollard T. Dynamic Cross-linking by  $\alpha$ -Actinin Determines the Mechanical Properties of Actin Filament Networks. *J Biol Chem* 1998, 273:9570-9576
- 60 Goncharovaa E, Shirinskya V, Shevelevb A, Marstonc S y Vorotnikov A. Actomyosin cross-linking by caldesmon in non-muscle cells. *FEBS Lett* 2001, 497:113-117
- 61 Wang Z, Horiuchi K y Chacko S. Characterization of the Functional Domains on the C-terminal Region of Caldesmon Using Full-length and Mutant Caldesmon Molecules. *J Biol Chem* 1996, 271:2234-2242
- 62 Helfman D, Levy E, Berthier C, Shtutman M, Riveline D, Grosheva I, Lachish-Zalait L, Elbaum M y Bershinsky A. Caldesmon Inhibits Nonmuscle Cell Contractility and Interferes with the Formation of Focal Adhesions. *Mol Cell Biol* 1999, 10:3097-3112
- 63 Gunning P, Schevzov G, Kee A y Hardeman E. Tropomyosin isoforms: divining rods for actin cytoskeleton function. *Trends Cell Biol* 2005, 15:333-341
- 64 Ono S y Ono K. Tropomyosin inhibits ADF/cofilin-dependent actin filament dynamics. *J Cell Biol* 2002, 156:1065-1076
- 65 Ishikawa R, Yamashiro S y Matsumura F. Differential Modulation of Actin-severing Activity of Gelsolin by Multiple Isoforms of Cultured Rat Cell Tropomyosin. Potentiation of protective ability of tropomyosins by 83-kDa nonmuscle caldesmon. *J Biol Chem* 1989, 264:7490-7497



- 
- 66 Kostyukova A e Hitchcock-DeGregori S. Effect of the Structure of the N Terminus of Tropomyosin on Tropomodulin Function. *J Biol Chem* 2004, 279:5066-5071
- 67 Kuffe D, Pollock R, Weichselbaum R, Bast R, Gansler T, Holland J y Frei E, editores. *Cancer Medicine* 6. BC Decker eds, London, 2003, 2700 pags.
- 68 Vogelstein B y Kinzler K. *The Genetic Basis of Human Cancer*, 2nd Ed. McGraw-Hill, 2002, 821 pags.
- 69 Rous P. A transmissible avian neoplasm (Sarcoma of the common fowl). *J Exp Med* 1910, 12: 696-705. Facsimil publicado en *J Exp Med* 1979, 150: 729-753.
- 70 Frame M. Newest findings on the oldest oncogene; how activated src does it. *J Cell Sci* 2004, 117:989-998
- 71 Wu X, Groves F, McLaughlin C, Jemal A, Martin J y Chen V. Cancer incidence patterns among adolescents and young adults in the United States. *Cancer Causes and Control* 2005, 16:309-320
- 72 Borden E, Baker L, Bell R, Bramwell V, Demetri G, Eisenberg B, Fletcher C, Fletcher J, Ladanyi M, Meltzer P, O'Sullivan B, Parkinson D, Pisters P, Saxman S, Singer S, Sundaram M, van Oosterom A, Verweij J, Waalen J, Weiss S y Brennan M. *Soft Tissue Sarcomas of Adults: State of the Translational Science*. *Clin Cancer Res* 2003, 9:1941-1956
- 73 Tanaka J, Watanabe T, Nakamura N y Sobue K. Morphological and biochemical analyses of contractile proteins (actin, myosin, caldesmon and

- 
- tropomyosin) in normal and transformed cells. *J Cell Sci* 1993, 104:595-606
- 74 Price L, Collard J. Regulation of the cytoskeleton by Rho-family GTPases: implications for tumour cell invasion. *Semin Cancer Biol* 2001:11-167-173.
- 75 Pawlak, G y Helfman D. Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. *Curr Op Genet Dev* 2001, 11: 41-47
- 76 Collins C. Mammalian telomeres and telomerase. *Curr Op Cell Biol* 2000, 12:378-383
- 77 Stewart S y Weinberg R. Telomerase and human tumorigenesis. *Semin Cancer Biol* 2003, 10:399-406
- 78 Bast R, Kufe D, Pollock R, Weichselbaum R, Holland J, Frei E, editors *Cancer Medicine*, 5ta edición.
- 79 Billingsley K, Lewis J, Leung D, Casper E, Woodruff J y Brennan M. Multifactorial Analysis of the Survival of Patients with Distant Metastasis Arising from Primary Extremity Sarcoma. *Cancer* 1999, 85:389-395
- 80 Van Glabbeke M, van Oosterom A, Oosterhuis J, Mouridsen H, Crowther D, Somers R, Verweij J, Santoro A, Buesa J y Tursz T. Prognostic Factors for the Outcome of Chemotherapy in Advanced Soft Tissue Sarcoma: An Analysis of 2,185 Patients Treated With Anthracycline-Containing First-Line Regimens—A European Organization for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group Study. *J Clin Oncol* 1999, 17:150-157

- 
- 81 van Oosterom A, Judson I, Verweij J, Stroobants S, di Paola E, Dimitrijevic S, Martens M, Webb A, Sciot R, Van Glabbeke M, Silberman S y Nielsen O. Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: a phase I study. *The Lancet* 2001, 358:1421-1423
- 82 Demetri G, von Mehren M, Blanke D, van den Abbeele A, Eisenberg B, Roberts P, Heinrich M, Tuveson D, Singer S, Janicek M, Fletcher J, Silverman S, Silberman S, Capdeville R, Kiese B, Peng B, Dimitrijevic S, Druker B, Corless C, Fletcher C y Joensuu H. Efficacy and safety of Imatinib Mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 2002, 347:472-480
- 83 Rubin P, Schuetze S, Eary J, Norwood T, Mirza S, Conrad E y Bruckner J. Molecular Targeting of Platelet-Derived Growth Factor B by Imatinib Mesylate in a Patient With Metastatic Dermatofibrosarcoma Protuberans. *J Clin Oncol* 2002, 20:3586-3591
- 84 Ben-Ze'ev A. The cytoskeleton in cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1985, 780:197-212
- 85 Akiyama S, Olden K, Yamada K. Fibronectin and integrins in invasion and metastasis. *Cancer Met Rev* 1995, 14:173-189
- 86 Mazzone E, Adam A, Bal de Kier Joffé E, Aguirre Ghiso J. Immortalized Mammary Epithelial Cells Overexpressing Protein Kinase C ; Acquire a Malignant Phenotype and Become Tumorigenic in Vivo. *Mol Cancer Res* 2003, 1:776-787

- 
- 87 Sahai E, Olson M, Marshall C. Cross-talk between Ras and Rho signaling pathways in transformation favours proliferation and increased motility. *EMBO J* 2001, 20:755-766
- 88 Pawlak G y Helfman D. MEK mediates v-Src-induced disruption of the actin cytoskeleton via inactivation of the Rho-ROCK-LIM-kinase pathway. *J Biol Chem* 2002, 277: 26927-26933
- 89 Pawlak G y Helfman D. Post-transcriptional Down-regulation of ROCK1/Rho-kinase through an MEK-dependent Pathway Leads to Cytoskeleton Disruption in Ras-transformed Fibroblasts. *Mol Biol Cell* 2002, 13:336-347
- 90 Totsukawa G, Yamakita Y, Yamashiro S, Hartshorne D, Sasaki Y y Matsumura F. Distinct Roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in Spatial Regulation of MLC Phosphorylation for Assembly of Stress Fibers and Focal Adhesions in 3T3 Fibroblasts. *J Cell Biol* 2000, 150:797-806
- 91 Janssen R y Mier J. Tropomyosin-2 cDNA Lacking the 3' Untranslated Region Riboregulator Induces Growth Inhibition of v-Ki-ras-transformed Fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1997, 8:897-908
- 92 Kim A, Jonasch E, Mosterman B, Mier J y Janssen R. Radicol Suppresses Transformation and Restores Tropomyosin-2 Expression in Both ras- and MEK-transformed Cells without Inhibiting the Raf/MEK/ERK Signaling Cascade. *Cell Growth Differ* 2001, 12:543-550
- 93 Janssen R, Kim P, Mier J y Morrison D. Overexpression of Kinase Suppressor of Ras Upregulates the High-Molecular-Weight Tropomyosin Iso-

- 
- forms in ras-Transformed NIH 3T3 Fibroblasts. *Mol Cell Biol* 2003, 23:1786-1797
- 94 Morgan D. Cyclin-dependent kinases: Engines, Clocks, and Microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997, 13:261-291
- 95 Smits V y Medema R. Checking out the G2/M transition. *Biochim Biophys Acta* 2001, 1519:1-12
- 96 Johnson D y Walker C. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999, 39:295-312
- 97 Bartek J y Lukas J. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Op Cell Biol* 2001, 13:738-747
- 98 Colman M, Afshari C y Barrett J. Regulation of p53 stability and activity in response to genotoxic stress. *Mut Res* 2000, 264:179-178
- 99 Kohn K y Pommier Y. Molecular interaction map of the p53 and Mdm2 logic elements, which control the Off-On switch of p53 in response to DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 331:816-827
- 100 Nurse P. A Long Twentieth Century of the Cell Cycle and Beyond. *Cell* 2000, 100:71-78
- 101 Sherr C. The Pezcoller Lecture: Cancer Cell Cycles Revisited. *Cancer Res* 2000, 60:3689-3695
- 102 Kerr J, Wyllie A y Currie A. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972, 26:239-57

- 
- 103 Resnicoff M, Burgaud J, Rotman H, Abraham D y Baserga R. Correlation between apoptosis, tumorigenesis, and levels of insulin-like growth factor I receptors. *Cancer Res* 1995, 55:3739-3741
- 104 Scotlandi K, Benini S, Sarti M, Serra M, Lollini P, Maurici D, Picci P, Manara M y Baldini N. Insulin-like growth factor I receptor-mediated circuit in Ewing's sarcoma/peripheral neuroectodermal tumor: a possible therapeutic target. *Cancer Res* 1996, 56:4570-4574
- 105 Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis R y Greenberg M. Opposing roles of Erk and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 1995, 270:1326-1331
- 106 Frisch S, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 1994, 124:619-626
- 107 Bates R, Buret A, van Helden D, Horton M y Burns G. Apoptosis induced by inhibition of intercellular contact. *J Cell Biol* 1994, 125:403-415
- 108 Gerchenson L y Rotello R. Apoptosis: a different type of cell death. *FASEB J* 1992, 6:2450-2455
- 109 Saraste A y Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiov Res* 2000, 45:528-537
- 110 Henson P, Bratton D y Fadok V. Apoptotic cell removal. *Curr Biol* 2001, 11:R795-R805
- 111 Maderna P y Godson C. Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2003, 1639:141-151

- 
- 112 van Engeland M, Nieland L, Ramaekers F, Schutte B y Reutelingsperger C. Annexin V-Affinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure. *Cytometry* 1998, 31:1-9
- 113 Williamson P, van den Eijnde S y Schlegel R. Phosphatidylserine exposure and phagocytosis of apoptotic cells. *Methods Cell Biol* 2001, 66:339-364
- 114 Strasser A, Connor L y Dixit V. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 2000, 69:217-45
- 115 Earnshaw W, Martins L y Kaufmann S. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999, 68:383-424
- 116 Cory S y Adams J. The bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer* 2002, 2:647-656
- 117 Coultas L y Strasser A. The role of Bcl-2 protein family in cancer. *Semin Cancer Biol* 2003, 13:115-123
- 118 Liu X, Kim C, Yang J, Jemmerson R y Wang X. Induction of Apoptotic Program in Cell-Free Extracts: Requirement for dATP and Cytochrome c. *Cell* 1996, 86:147-157
- 119 Zou H, Henzel W, Liu X, Lutschg A y Wang X. Apaf-1, a Human Protein Homologous to *C. elegans* CED-4, Participates in Cytochrome c-Dependent Activation of Caspase-3. *Cell* 1997, 90:405-413
- 120 Hengartner M. CED-4 is a stranger no more. *Nature* 1997, 388:714-715

- 
- 121 Chinnaiyan A. The Apoptosome: Heart and Soul of the Cell Death Machine. *Neoplasia* 1999, 1:5-15
- 122 Gross A, McDonnell J, Korsmeyer S. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999, 13:1899-1911
- 123 Kidd V. Proteolytic activities that mediate apoptosis. *Annu Rev Physiol* 1998, 60:533-573
- 124 Deveraux Q, Reed J. IAP family proteins—suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999, 13:239-252
- 125 Kyriakis J, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Phys Rev* 2001, 81:807-869
- 126 Wolfman J, Palmby T, Der C y Wolfman A. Cellular N-Ras Promotes Cell Survival by Downregulation of Jun N-Terminal Protein Kinase and p38. *Mol Cell Biol* 2002, 22:1589-1606
- 127 Kummer J, Rao P y Heidenreich K. Apoptosis Induced by Withdrawal of Trophic Factors Is Mediated by p38 Mitogen-activated Protein Kinase. *J Biol Chem* 1997, 272:20490-20494
- 128 Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dyke P, Saitoh M, Moriguchi T, Takagi M, Matsumoto K, Miyazono K y Gotoh Y. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 1997, 275:90-94
- 129 Bulavin D, Saito S, Hollander M, Sakaguchi K, Anderson C, Appella E y Fornace Jr A. Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates



- 
- N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *EMBO J* 1999, 18:6845-6854
- 130 Assefa Z, Vantieghem A, Garmyn M, Declercq W, Vandenabeele P, Vandenheede J, Bouillon R, Merlevede W, Agostinis P. p38 Mitogen-activated Protein Kinase Regulates a Novel, Caspase-independent Pathway for the Mitochondrial Cytochrome c Release in Ultraviolet B Radiation-induced Apoptosis. *J Biol Chem* 2000, 275:21416-21421
- 131 Ranganathan A, Zhang L, Adam A, Aguirre-Ghiso J. Functional Coupling of p38-Induced Up-regulation of BiP and Activation of RNA-Dependent Protein Kinase-Like Endoplasmic Reticulum Kinase to Drug Resistance of Dormant Carcinoma Cells. *Cancer Res* 2006, 66:1702-1711
- 132 Chen G, Hitomi M, Han J y Stacey D. The p38 Pathway Provides Negative Feedback for Ras Proliferative Signaling. *J Biol Chem* 2000, 275:38973-38980
- 133 Zanke B, Boudreau K, Rubie E, Winnett E, Tibbles L, Zon L, Kyriakis J, Liu F y Woodgett J. The stress-activated protein kinase pathway mediates cell death following injury induced by cis-platinum, UV irradiation or heat. *Curr Biol* 1996, 6:606-613
- 134 Butterfield L, Storey B, Maas L y Heasley L. c-Jun NH2-terminal Kinase Regulation of the Apoptotic Response of Small Cell Lung Cancer Cells to Ultraviolet Radiation. *J Biol Chem* 1997, 272:10110-10116
- 135 Davis R. Signal Transduction by the JNK Group of MAP Kinases. *Cell* 2000, 103:239-252

- 
- 136 Rennefahrt U, Illert B, Kerkhoff B, Troppmair J y Rapp U. Constitutive JNK Activation in NIH 3T3 Fibroblasts Induces a Partially Transformed Phenotype. *J Biol Chem* 2002, 277:29510-29518
- 137 Le-Niculescu H, Bonfoco E, Kasuya Y, Claret F-X, Green D y Karin M. Withdrawal of Survival Factors Results in Activation of the JNK Pathway in Neuronal Cells Leading to Fas Ligand Induction and Cell Death. *Mol Cell Biol* 1999, 19:751-763
- 138 Kasibhatla S, Brunner T, Genestier L, Echeverri F, Mahboubi A y Green D. DNA-Damaging Agents Induce Expression of Fas Ligand and Subsequent Apoptosis in T Lymphocytes via the Activation of NF- $\kappa$ B and AP-1
- 139 Lin A. Activation of the JNK signaling pathway: breaking the brake on apoptosis. *Bioessays* 2002, 25:17-24
- 140 Cardone M, Roy N, Stennicke H, Salvesen G, Franke T, Stanbridge E, Frisch S y Reed J. Regulation of Cell Death Protease Caspase-9 by Phosphorylation. *Science* 1998, 282:1318-1321
- 141 Fujita E, Jinbo A, Matuzaki H, Konishi H, Kikkawa U y Momoi T. Akt Phosphorylation Site Found in Human Caspase-9 Is Absent in Mouse Caspase-9. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 264:550-555
- 142 Lazebnik Y. Caspase Phosphorylation, Cell Death, and Species Variability. *Science* 2000, 287:1363
- 143 Kumar A, Commane M, Flickinger T, Horvath C y Stark G. Defective TNF- $\alpha$ -Induced Apoptosis in STAT1-Null Cells Due to Low Constitutive Levels of Caspases. *Science* 1997, 278:1630-1632

- 
- 144 Wang C, Mayo M, Korneluk R, Goeddel D y Baldwin Jr A. NF-B Antia-poptosis: Induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to Suppress Caspase-8 Activation. *Science* 1998, 281:1680-1683
- 145 Wang Q y Green M. EGFR enhances Survivin expression through the phosphoinositide 3 (PI-3) kinase signaling pathway. *Exp Mol Pathol* 2005, 79:100-107
- 146 Cheng E, Kirsch D, Clem R, Ravi R, Kastan M, Bedi A, Ueno K y Hard-  
wick J. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like Death Effector by Caspases. *Science* 1997, 278:1966-1968
- 147 Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C y Wang X. Bid, a Bcl2 Interac-  
ting Protein, Mediates Cytochrome c Release from Mitochondria in Res-  
ponse to Activation of Cell Surface Death Receptors. *Cell* 1998, 94: 481-  
490
- 148 Li H, Zhu H, Xu C-J y Yuan J. Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates  
the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell* 1998,  
94:491-501
- 149 Clem R, Cheng E, Karp C, Kirsch D, Ueno K, Takahashi A, Kastan M,  
Griffin D, Earnshaw W, Veluona M y Hardwick J. Modulation of cell  
death by Bcl-xL through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci* 1998,  
554-559
- 150 Haldar S, Basu A y Croce C. Bcl2 is the guardian of microtubule integrity.  
*Cancer Res* 1997, 57:229-233

- 
- 151 Deng X, Xiao L, Lang W, Gao F, Ruvolo P y Stratford May, Jr W. Novel Role for JNK as a Stress-activated Bcl2 Kinase. *J Biol Chem* 2001, 276:23681-23688
- 152 Poruchynsky M, Wang E, Rudin C, Blagosklonny M y Fojo T. Bcl-xL is phosphorylated in malignant cells following microtubule disruption. *Cancer Res* 1998, 58:3331-3338
- 153 Prehn J, Bindokas V, Marcuccilli C, Krajewski S, Reed J y Miller R. Regulation of neuronal Bcl2 protein expression and calcium homeostasis by transforming growth factor type  $\beta$  confers wide-ranging protection on rat hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci* 1994, 91:12599-12603
- 154 Wilson B, Mochon E y Boxer L. Induction of bcl-2 Expression by Phosphorylated CREB Proteins during B-Cell Activation and Rescue from Apoptosis. *Mol Cell Biol* 1996, 16:5546-5556
- 155 Cox A y Der C. The dark side of Ras. *Oncogene* 2003, 22:8999-9006
- 156 Bos JL. Ras Oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989, 49:4682-4589
- 157 Gille H, Downward J. Multiple Ras effector pathways contribute to G (1) cell cycle progression. *J Biol Chem* 1999, 274:22033-22040
- 158 Gildea J, Harding M, Seraj J, Gulding K, Theodorescu D. The role of RalA in epidermal growth factor receptor-regulated cell motility. *Cancer Res* 2002, 62:982-985
- 159 Min D, Kwon T, Park W, Chang J, Park S, Ahn B, Ryoo Z, Lee YH, Lee YS, Rhie D, Yoon S, Hahn S, Kim M, Jo Y. Neoplastic transformation

- 
- and tumorigenesis associated with overexpression of phospholipase D isozymes in cultured murine fibroblasts. *Carcinogenesis* 2001, 22:1641-1647
- 160 Urano T, Emkay R, Feig LA. Ral-GTPases mediate a distinct downstream signaling pathway from Ras that facilitates cellular transformation. *EMBO J* 1996, 15:810-816
- 161 Lu Z, Hornia A, Joseph T, Sukezane T, Frankel P, Zhong M, Bychenok S, Xu L, Feig L, Foster D. Phospholipase D and RalA cooperate with the Epidermal Growth Factor Receptor to transform 3Y1 rat fibroblasts. *Mol Cell Biol* 2000, 20:462-467
- 162 Ward Y, Wang W, Woodhouse E, Linnoila I, Liotta L, Kelly K. Signal pathways which promote invasion and metastasis: critical and distinct contributions of extracellular signal-regulated kinase and ral-specific guanine exchange factor pathways. *Mol Cell Biol* 2001, 21:5958-5969
- 163 Aguirre Ghiso J, Frankel P, Farías E, Lu Z, Jiang H, Olsen A, Feig L, Balde Kier Joffé E, Foster D. RalA requirement for v-Src and v-Ras-induced tumorigenicity and overproduction of urokinase-type plasminogen activator: involvement of metalloproteases. *Oncogene* 1999; 18:4718-25
- 164 Hamad N, Elconin J, Karnoub A, Bai W, Rich J, Abraham R, Der C, Counter C. Distinct requirements for Ras oncogenesis in human versus mouse cells. *Genes Dev* 2002, 16:2045-2057

- 
- 165 Jiang H, Luo J, Urano T, Frankel P, Lu Z, Foster D y Feig L. Involvement of Ral GTPase in v-Src-induced phospholipase D activation. *Nature* 1995, 378:409-412
- 166 Feig L y Cooper G. Inhibition of NIH 3T3 Cell Proliferation by a Mutant ras Protein with Preferential Affinity for GDP. *Mol Cell Biol* 1988, 8:3235-3243
- 167 Feig L. Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases. *Nat Cell Biol* 1999, 1:E25
- 168 Ladeda V, Adam A, Puricelli L, Bal de Kier Joffé E. Apoptotic cell death in mammary adenocarcinoma cells is prevented by soluble factors present in the target organ of metastasis. *Breast Cancer Res Treat* 2001, 69:39-51
- 169 Welch D, Sakamaki T, Pioquinto R, Leonard T, Goldberg S, Hon Q, Erikson R, Rieber M, Strasberg Rieber M, Hicks D, Bonventre Jy Alessandrini A. Transfection of Constitutively Active Mitogen-activated Protein/Extracellular Signal-regulated Kinase Kinase Confers Tumorigenic and Metastatic Potentials to NIH3T3 Cells. *Cancer Res* 2000, 60:1552-1556
- 170 Shelden E. Major Role for Active Extension in the Formation of Processes by ras-Transformed Fibroblasts. *Cell Motil Cytosk* 1999, 42:12-26
- 171 Hernandez-Muñoz I, Malumbres M, Leonardi P y Pellicer A. The Rgr oncogene (homologous to RalGDS) induces transformation and gene ex-

- 
- pression by activating Ras, Ral and Rho mediated pathways. *Oncogene* 2000, 19:2745-2757
- 172 Khosravi-Far R, White M, Westwick J, SolSKI P, Chrzanowska-Wodnicka M, Van Aelst L, Wigler M y Der C. Oncogenic Ras Activation of Raf/Mitogen-Activated Protein Kinase-Independent Pathways Is Sufficient To Cause Tumorigenic Transformation. *Mol Cell Biol* 1996, 16:3923-3933
- 173 Linder S y Aepfelbacher M. Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol* 2003, 13:376-385
- 174 Chandler L, Ehretsmann C y Bourgeois S. A novel mechanism of Ha-ras oncogene action: Regulation of fibronectin mRNA levels by a nuclear posttranscriptional event. *Mol Cell Biol* 1994, 14:3085-3093
- 175 Gu H y Oliver N. Transcriptional repression of fibronectin gene expression in v-src transformation. *Exp Cell Res* 1995, 217:428-439
- 176 Nakayama Y, Hisano T, Okimoto T, Tanaka Y, Ishikawa T, Himeno M, Ono M y Kuwano M. Microtubule reorganization and lysosome redistribution by a viral v-src oncogene, in mouse Balb/3T3 cells expressing human EGF receptor. *Cell Struct Func* 1994, 19:397-409
- 177 Hoshi M, Ohta K, Gotoh Y, Mori A, Murofushi H, Sakai H, Nishida E. Mitogen-activated-protein-kinase-catalyzed phosphorylation of microtubule-associated proteins, microtubule-associated protein 2 and microtubule-associated protein 4, induces an alteration in their function. *Eur J Biochem* 1992, 203:43-52

- 
- 178 Castro Barros J y Marshall C. Activation of either ERK1/2 or ERK5 MAP kinase pathways can lead to disruption of the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 2005, 118:1663-1671
- 179 DeMali K, Barlow C y Burridge K. Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion. *J Cell Biol* 2002, 159:881-891
- 180 Percival J, Thomas G, Cock T-A, Gardiner E, Jeffrey P, Lin J, Weinberger R y Gunning P. Sorting of Tropomyosin Isoforms in Synchronised NIH 3T3 Fibroblasts: Evidence for Distinct Microfilament Populations. *Cell Motil Cytoskel* 2000, 47:189-208
- 181 Shields J, Mehta H, Pruitt K y Der C. Opposing Roles of the Extracellular Signal-Regulated Kinase and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in Ras-Mediated Downregulation of Tropomyosin. *Mol Cell Biol* 2002, 22:2304-2317
- 182 Qiu R-G, Chen J, McCormick F y Simons M. A role for Rho in Ras transformation. *Proc Natl Acad Sci* 1995, 92:11781-11785
- 183 Mareel M y Leroy A. Clinical, Cellular, and Molecular Aspects of Cancer Invasion. *Phys Rev* 2003, 83:337-376
- 184 Rodriguez-Viciano P, Sabatier C y McCormick F. Signaling Specificity by Ras Family GTPases Is Determined by the Full Spectrum of Effectors They Regulate. *Mol Cell Biol* 2004, 24:4943-4954
- 185 Xue L, Murray J y Tolkovsky A. The Ras/Phosphatidylinositol 3-Kinase and Ras/ERK Pathways Function as Independent Survival Modules Each



- 
- of Which Inhibits a Distinct Apoptotic Signaling Pathway in Sympathetic Neurons. *J Biol chem* 2000, 275, 8817-8824
- 186 Wang H-G, Rapp U y Reed J. Bcl-2 Targets the Protein Kinase Raf-1 to Mitochondria. *Cell* 1996, 87:629-638
- 187 Diehl J, Cheng M, Roussel M y Sherr C. Glycogen synthase kinase-3b regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 1998, 12:3499-3511
- 188 Pene F, Claessens Y-E, Muller O, Viguié F, Mayeux P, Dreyfus F, Lacombe C y Bouscary D. Role of the phosphatidylinositol 3-kinase / Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma. *Oncogene* 2002, 21:6587-6597
- 189 Feig L. Ral-GTPases: approaching their 15 minutes of fame. *Trends Cell Biol* 2003, 13:419-425
- 190 Albright C, Giddings B, Liu J, Vito M y Weinberg R. Characterization of a guanine nucleotide dissociation stimulator for a ras-related GTPase. *EMBO J* 1993, 12:339-347
- 191 Peterson S, Trabalzini L, Brtva T, Fischer T, Altschuler D, Martelli P, Lapetina E, Der C y White II G. Identification of a Novel RalGDS-related Protein as a Candidate Effector for Ras and Rap1. *J Biol Chem* 1996, 271:29903-29908
- 192 Wolthuis R, Bauer B, van't Veer L, de Vries-Smits A, Cool R, Spaargaren M, Wittinghofer A, Burgering B y Bos J. RalGDS-like factor (Rlf) is a novel Ras and Rap1A-associating protein. *Oncogene* 1996, 13:353-362

- 
- 193 D'Adamo D, Novick S, Kahn J, Leonardi P y Pellicer A. rsc: a novel oncogene with structural and functional homology with the gene family of exchange factors for Ral. *Oncogene* 1997, 14:1295-1305
- 194 Kishida S, Koyama S, Matsubara K, Kishida M, Matsuura Y y Kikuchi A. Colocalization of Ras and Ral on the membrane is required for Ras-dependent Ral activation through Ral GDP dissociation stimulator. *Oncogene* 1997, 15:2899-2907
- 195 Matsubara K, Kishida S, Matsuura Y, Kitayama H, Noda N Kikuchi A. Plasma membrane recruitment of RalGDS is critical for Ras-dependent Ral activation. *Oncogene* 1999, 18:1303-1312
- 196 Toker A y Newton A. Cellular signaling: pivoting around PDK-1. *Cell* 2000, 103:185-188
- 197 Tian X, Rusanescu G, Hou W, Schaffhausen B y Feig L. PDK1 mediates growth factor-induced Ral-GEF activation by a kinase-independent mechanism. *EMBO J* 2002, 21:1327-1338
- 198 Senga T, Iwamoto T, Kitamura T, Miyake Y y Hamaguchi M. JAK/STAT3-dependent Activation of the RalGDS/Ral Pathway in M1 Mouse Myeloid Leukemia Cells. *J Biol Chem* 2001, 276:32678-32681
- 199 Rosário M, Paterson H y Marshall C. Activation of the Ral and Phosphatidylinositol 3- Kinase Signaling Pathways by the Ras-Related Protein TC21. *Mol Cell Biol* 2001, 21: 3750-3762
- 200 Mirey G, Balakireva M, L'Hoste S, Rossé C, Voegeling S y Camonis J. A Ral Guanine Exchange Factor-Ral Pathway Is Conserved in *Drosophila*

- 
- melanogaster and Sheds New Light on the Connectivity of the Ral, Ras, and Rap Pathways. *Mol Cell Biol* 2003, 23:1112-1124
- 201 Remans P, Gringhuis S, van Laar J, Sanders M, Papendrecht-van der Voort E, Zwartkruis F, Levarht N, Rosas M, Coffey P, Breedveld F, Bos J, Tak P, Verweij C y Reedquist K. Rap1 Signaling Is Required for Suppression of Ras-Generated Reactive Oxygen Species and Protection Against Oxidative Stress in T Lymphocytes. *J Immunol* 2004, 173:920-931
- 202 Ngsee J, Elferink L y Schellere R. A Family of ras-like GTP-binding Proteins Expressed in Electromotor Neuron. *J Biol Chem* 1991, 266:2675-2680
- 203 Bielinski D, Pyun H, Linko-Stentz K, Macara I y Fine R. Ral and Rab3a are major GTP-binding proteins of axonal rapid transport and synaptic vesicles and do not redistribute following depolarization stimulated synaptosomal exocytosis. *Biochim Biophys Acta* 1993, 1151:246-256
- 204 Mark B, Jilkina O y Bhullar R. Association of Ral GTP-Binding Protein with Human Platelet Dense Granules. *Biochem Biophys Res Commun* 1996, 225:40-46
- 205 Shipitsin M y Feig L. RalA but Not RalB Enhances Polarized Delivery of Membrane Proteins to the Basolateral Surface of Epithelial Cells. *Mol Cell Biol* 2004, 24:5746-5756
- 206 Bhattacharya M, Babwah A, Godin C, Anborgh P, Dale L, Poulter M y Ferguson S. Ral and Phospholipase D2-Dependent Pathway for Consti-

- 
- tutive Metabotropic Glutamate Receptor Endocytosis. *J Neurosci* 2004, 24:8752-8761
- 207 Collins B, McCoy A, Kent H, Evans P y Owen D. Molecular Architecture and Functional Model of the Endocytic AP2 Complex. *Cell* 2002, 109:523-535
- 208 Moskalenko S, Henry D, Rosse C, Mirey G, Camonis J y White M. The exocyst is a Ral effector complex. *Nat Cell Biol* 2002, 4:66-72
- 209 Brymora A, Valova V, Larsen M, Roufogalis B y Robinson P. The Brain Exocyst Complex Interacts with RalA in a GTP-dependent Manner. Identification Of A Novel Mammalian Sec3 Gene And A Second Sec15 Gene. *J Biol Chem* 2001, 276: 29792-29797
- 210 Polzin A, Shipitsin M, Goi T, Feig L y Turner T. Ral-GTPase Influences the Regulation of the Readily Releasable Pool of Synaptic Vesicles. *Mol Cell Biol* 2002, 22:1714-1722
- 211 Sugihara K, Asano S, Tanaka K, Iwamatsu A, Okawa K y Ohta Y. The exocyst complex binds the small GTPase RalA to mediate filopodia formation. *Nat Cell Biol* 2002, 4:73-78
- 212 Fukai S, Matern H, Jagath J, Scheller R y Brunger A. Structural basis of the interaction between RalA and Sec5, a subunit of the sec6/8 complex. *EMBO J* 2003, 22:3267-3278
- 213 Moskalenko S, Tong C, Rosse C, Mirey G, Formstecher E, Daviet L, Camonis J y White M. Ral GTPases Regulate Exocyst Assembly through Dual Subunit Interactions. *J Biol Chem* 2003, 278: 51743-51748

- 
- 214 de Leeuw H, Fernandez-Borja M, Reits E, Romani de Wit T, Wijers-Koster P, Hordijk P, Neefjes J, van Mourik J y Voorberg J. Small GTP-Binding Protein Ral Modulates Regulated Exocytosis of von Willebrand Factor by Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001,21:899-904
- 215 TerBush D, Maurice T, Roth D y Novick P. The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 1996, 15:6483-6494
- 216 Kee Y, Yoo J-S, Hazuka C, Peterson K, Hsu S-C y Scheller R. Subunit structure of the mammalian exocyst complex. *Proc Natl Acad Sci* 1997, 94:14438-14443
- 217 Grindstaff K, Yeaman C, Anandasabapathy N, Hsu S-C, Rodriguez-Boulan E, Scheller R y Nelson W. Sec6/8 Complex Is Recruited to Cell-Cell Contacts and Specifies Transport Vesicle Delivery to the Basal-Lateral Membrane in Epithelial Cells. *Cell* 1998, 93:731-740
- 218 Lalli G y Hall A. Ral GTPases regulate neurite branching through GAP-43 and the exocyst complex. *J Cell Biol* 2005, 171:857-869
- 219 Lee T, Feig L y Montell D. Two distinct roles for Ras in a developmentally regulated cell migration. *Development* 1996, 122:409-418
- 220 Sawamoto K, Winge P, Koyama S, Hirota Y, Yamada C, Miyao S, Yoshikawa S, Jin M-H, Kikuchi A y Okano H. The *Drosophila* Ral GTPase Regulates Developmental Cell Shape Changes through the Jun NH 2-terminal Kinase Pathway. *J Cell Biol* 1999, 146:361-372

- 
- 221 Sawamoto K, Yamada C, Kishida S, Hirota Y, Taguchi A, Kikuchi A y Okano H. Ectopic expression of constitutively activated Ral GTPase inhibits cell shape changes during *Drosophila* eye development. *Oncogene* 1999, 18:1967-1974
- 222 He Y, Fang X, Emoto K, Jan Y-N y Adler P. The Tricornered Ser/Thr Protein Kinase Is Regulated by Phosphorylation and Interacts with Furry during *Drosophila* Wing Hair Development. *Mol Biol Cell* 2005, 16:689-700
- 223 Lebreton S, Boissel L y Moreau J. Control of embryonic *Xenopus* morphogenesis by a Ral-GDS/Xral branch of the Ras signalling pathway. *J Cell Sci* 2003, 116:4651-4662
- 224 González-García A, Pritchard C, Paterson H, Mavria G, Stamp G y Marshall C. RalGDS is required for tumor formation in a model of skin carcinogenesis. *Cancer Cell* 2005, 7:219-226
- 225 Okan E, Drewett V, Shaw P y Jones P. The small-GTPase RalA activates transcription of the urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) gene via an AP1-dependent mechanism. *Oncogene* 2001, 20:1816-1824
- 226 Burgering B y Kops G. Cell cycle and death control: long live Forkheads. *Trends Cell Biol* 2002, 27:352-360
- 227 Hubsman M, Yudkovsky G y Aronheim A. A novel approach for the identification of protein-protein interaction with integral membrane proteins. *Nucl Acids Res* 2001, 29:E18

- 
- 228 Frankel P, Aronheim A, Kavanagh E, Balda M, Matter K, Bunney T y Marshall C. RalA interacts with ZONAB in a cell density-dependent manner and regulates its transcriptional activity. *EMBO J* 2005, 24:54-62
- 229 Balda M y Matter K. The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *EMBO J* 2000, 19:2024-2033
- 230 White M, Vale T, Camonis J, Schaefer E y Wigler M. A Role for the Ral Guanine Nucleotide Dissociation Stimulator in Mediating Ras-induced Transformation. *J Biol Chem* 1996, 271:16439-16442
- 231 Yamazaki Y, Kaziro Y y Koide H. Ral promotes anchorage-independent growth of a human fibrosarcoma, HT1080. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 280:868-873
- 232 Kfir S, Ehrlich M, Goldshmid A, Liu X, Kloog Y y Henis Y. Pathway- and Expression Level-Dependent Effects of Oncogenic N-Ras: p27Kip1 Mislocalization by the Ral-GEF Pathway and Erk-Mediated Interference with Smad Signaling. *Mol Cell Biol* 2005, 25:8239-8250
- 233 Goi T, Rusanescu G, Urano T y Feig L. Ral-Specific Guanine Nucleotide Exchange Factor Activity Opposes Other Ras Effectors in PC12 Cells by Inhibiting Neurite Outgrowth. *Mol Cell Biol* 1999, 19:1731-1741
- 234 Yu Y y Feig L. Involvement of R-Ras and Ral GTPases in estrogen-independent proliferation of breast cancer cells. *Oncogene* 2002, 21:7557-7568

- 
- 235 Agapova L, Volodina J, Chumakov P y Kopnin B. Activation of Ras-Ral Pathway Attenuates p53-independent DNA Damage G2 Checkpoint. *J Biol Chem* 2004, 279:36382-36389
- 236 Quaroni A y Paul E. Cytocentrin is a Ral-binding protein involved in the assembly and function of the mitotic apparatus. *J Cell Sci* 1999, 112:707-718
- 237 Wu J-C, Chen T-Y, Yu C-T, Tsai S-J, Hsu J-M, Tang M-J, Chou C-K, Lin W-J, Yuan C-J y Huang C-Y. Identification of V23RaiA-Ser194 as a Critical Mediator for Aurora-A-induced Cellular Motility and Transformation by Small Pool Expression Screening. *J Biol Chem* 2005, 280: 9013-9022
- 238 Dutertre S, Descamps S y Pringent C. On the role of Aurora-A in the centrosome. *Oncogene* 2002, 21:6175-6183
- 239 Andrews P, Knatko E, Moore W y Swedlow J. Mitotic mechanics: the auroras come into view. *Curr Op Cell Biol* 2003, 15:672-683
- 240 Carmena M y Earnshaw W. The cellular geography of aurora kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, 4:842-854
- 241 Oliva J, Zarich N, Martínez N, Jorge R, Castrillo A, Azañedo M, García-Vargas S, Gutiérrez-Eisman S, Juarranz A, Boscá R, Gutkind S y Rojas J. The P34G Mutation Reduces the Transforming Activity of K-Ras and N-Ras in NIH 3T3 Cells but Not of H-Ras. *J Biol Chem* 2004, 279: 33480-33491



- 
- 242 Tchevkina E, Agapova L, Dyakova N, Martinjuk A, Komelkov A y Tatosyan A. The small G-protein RalA stimulates metastasis of transformed cells. *Oncogene* 2005, 24:329-335
- 243 Feinstein E. Ral-GTPases: good chances for a long-lasting fame. *Oncogene* 2005, 24:326-328
- 244 Sriuranpong S, Mutirangura A, Gillespie J, Patel V, Amornphimoltham P, Molinolo A, Kerekhanjanarong V, Supanakorn S, Supiyaphun , Rangdaeng S, Voravud N y Gutkind S. Global Gene Expression Profile of Nasopharyngeal Carcinoma by Laser Capture Microdissection and Complementary DNA Microarrays. *Clin Cancer Res* 2004, 10:4944-4958
- 245 Sunaga N, Miyajima K, Suzuki M, Sato M, White M, Ramirez R, Shay J, Gazdar A y Minna J. Different Roles for Caveolin-1 in the Development of Non-Small Cell Lung Cancer versus Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res* 2004, 64:4277-4285
- 246 Voß M, Oude Weernink P, Hauptenthal S, Möller U, Cool R, Bauer B, Camonis J, Jakobs K y Schmidt M. Phospholipase D Stimulation by Receptor Tyrosine Kinases Mediated by Protein Kinase C and a Ras/Ral Signaling Cascade. *J Biol Chem* 1999, 274: 34691-34698
- 247 Frankel P, Ramos M, Flom J, Bychenok S, Joseph T, Kerkhoff E, Rapp U, Feig L y Foster D. Ral and Rho-Dependent Activation of Phospholipase D in v-Raf-Transformed Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 255:502-507

- 
- 248 Luo J-Q, Liu X, Hammond S, Colley W, Feig L, Frohman M, Morris A y Foster D. RalA Interacts Directly with the Arf-Responsive, PIP2-Dependent Phospholipase D1. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 235:854-859
- 249 Brown F, Rozelle A, Yin H, Balla T y Donaldson J. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. *J Cell Biol* 2001, 154:1007-1017
- 250 Donaldson J. Multiple Roles for Arf6: Sorting, Structuring, and Signaling at the Plasma Membrane. *J Biol Chem* 2003, 278: 41573-41576
- 251 Honda A, Nogami M, Yokozeki T, Yamazaki M, Nakamura H, Watanabe H, Kawamoto K, Nakayama K, Morris A, Frohman M y Kanaho Y. Phosphatidylinositol 4-Phosphate 5-Kinase  $\alpha$  Is a Downstream Effector of the Small G Protein ARF6 in Membrane Ruffle Formation. *Cell* 1999, 99:521-532
- 252 Foster D y Xu L. Phospholipase D in Cell Proliferation and Cancer. *Mol Cancer Res* 2003, 1:789-800
- 253 He H, Watanabe T, Zhan X, Huang C, Schuurin E, Fukami K, Takenawa T, Kumar C, Simpson R y Maruta H. Role of Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate in Ras/Rac-Induced Disruption of the Cortactin-Actomyosin II Complex and Malignant Transformation. *Mol Cell Biol* 1998, 18:3829-3837

- 
- 254 Radhakrishna H, Klausner R y Donaldson J. Aluminum Fluoride Stimulates Surface Protrusions in Cells Overexpressing the ARF6 GTPase. *J Cell Biol* 1996, 134:935-947
- 255 Song J, Khachikian Z, Radhakrishna H y Donaldson J. Localization of endogenous ARF6 to sites of cortical actin rearrangement and involvement of ARF6 in cell *spreading*. *J Cell Sci* 1998, 111:2257-2267
- 256 Franco M, Peters P, Boretto J, van Donselaar E, Neri A, D'Souza-Schorey C y Chavrier P. EFA6, a sec7 domain-containing exchange factor for ARF6, coordinates membrane recycling and actin cytoskeleton organization. *EMBO J* 1999, 18:1480-1491
- 257 Hernandez-Deviez D, Casanova J y Wilson J. Regulation of dendritic development by the Arf exchange factor ARNO. *Nat Neurosci* 2002, 5:623-624
- 258 Albertinazzi C, Za L, Paris S y De Curtis I. ADP-Ribosylation Factor 6 and a Functional PIX/p95-APP1 Complex Are Required for Rac1B-mediated Neurite Outgrowth. *Mol Biol Cell* 2003, 14:1295-1307
- 259 Joseph T, Bryant A, Frankel P, Wooden R, Kerkhoff E, Rapp U y Foster D. Phospholipase D overcomes cell cycle arrest induced by high-intensity Raf signaling. *Oncogene* 2002, 21:3651-3658
- 260 Buchanan F, McReynolds M, Couvillon A, Kam Y, Holla V, DuBois R y Exton J. Requirement of phospholipase D1 activity in H-RasV12-induced transformation. *Proc Natl Acad Sci* 2005, 102:1638-1642

- 
- 261 Kam Y y Exton J. Phospholipase D Activity Is Required for Actin Stress Fiber Formation in Fibroblasts. *Mol Cell Biol* 2001, 21:4055-4066
- 262 Porcellia A, Ghellia A, Hrelia S y Rugolo M. Phospholipase D stimulation is required for sphingosine-1-phosphate activation of actin stress fibre assembly in human airway epithelial cells. *Cell Signalling* 2002, 14:75-81
- 263 Ramírez de Molina A, Penalva V, Lucas L y Lacal J. Regulation of choline kinase activity by Ras proteins involves Ral-GDS and PI3K. *Oncogene* 2002, 21:937-946
- 264 Jullien-Flores V, Dorseuil O, Romero F, Letourneur F, Saragosti S, Berger R, Tavitian A, Gacon G y Camonis J. Bridging the Ral GTPase to Rho pathways: RLIP76, a Ral effector with CDC42/Rac GTPase activating protein (GAP) activity. *J Biol Chem* 1995, 270:22473-22477
- 265 Molnár Á, Theodoras A, Zon L y Kyriakis J. Cdc42Hs, but Not Rac1, Inhibits Serum-stimulated Cell Cycle Progression at G1/S through a Mechanism Requiring p38/RK. *J Biol Chem* 1997, 272:13229-13235
- 266 Zhang S, Han J, Sells M, Chernoff J, Knaus U, Ulevitch R y Bokoch G. Rho Family GTPases Regulate p38 Mitogen-activated Protein Kinase through the Downstream Mediator Pak1. *J Biol Chem* 1995, 270: 23934-23936
- 267 Bagrodia S, Dérijard B, Davis R y Cerione. Cdc42 and PAK-mediated Signaling Leads to Jun Kinase and p38 Mitogen-activated Protein Kinase Activation. *J Biol Chem* 1995, 270: 27995-27998

- 
- 268 Coso O, Chiariello M, Yu J-C, Teramoto H, Crespo P, Xu N, Miki T y Gutkind S. The Small GTP-Binding Proteins Rac1, and Cdc42 Regulate the Activity of the JNK/SAPK Signaling Pathway. *Cell* 1995, 81:1137-1146
- 269 Buchsbaum R, Connolly B y Feig L. Interaction of Rac Exchange Factors Tiam1 and Ras-GRF1 with a Scaffold for the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade. *Mol Cell Biol* 2002, 22:4073-4085
- 270 Hu Y y Mivechi N. HSF-1 Interacts with Ral-binding Protein 1 in a Stress-responsive, Multiprotein Complex with HSP90 in Vivo. *J Biol Chem* 2003, 278:17299-17306
- 271 Goi T, Shipitsin M, Lu Z, Foster D, Klinz S y Feig L. An EGF Receptor/Ral-GTPase signaling cascade regulates c-Src activity and substrate specificity. *EMBO J* 2000, 19:623-630
- 272 Takaya A, Ohba Y, Kurokawa K y Matsuda M. RalA Activation at Nascent Lamellipodia of Epidermal Growth Factor-stimulated Cos7 Cells and Migrating Madin-Darby Canine Kidney Cells. *Mol Biol Cell* 2004, 15:2549-2557
- 273 Suzuki J, Yamazaki Y, Guang L, Kaziro Y y Koide H. Involvement of Ras and Ral in Chemotactic Migration of Skeletal Myoblasts. *Mol Cell Biol* 2000, 20:4658-4665
- 274 Rossé C, Hatzoglou A, Parrini M-C, White M, Chavrier P y Camonis J. RalB Mobilizes the Exocyst To Drive Cell Migration. *Mol Cell Biol* 2006, 26: 727-734

- 
- 275 Lehto V, Hovi T, Vartio T, Badley R y Virtanen I. Reorganization of cytoskeletal and contractile elements during transition of human monocytes into adherent macrophages. *Lab Invest* 1982, 47:391-399
- 276 Amato P, Unanue e y Taylor L. Distribution of actin in *spreading* macrophages: a comparative study on living and fixed cells. *J Cell Biol* 1983, 96:750-761
- 277 Tarone G, Cirillo D, Giancotti F, Comoglio P y Marchisio P. Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. *Exp Cell Res* 1985, 159:141-157
- 278 Marchisio P, Cirillo D, Teti A, Zambonin-Zallone A y Tarone G. Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts and cells of monocytic origin display a peculiar dot-like organization of cytoskeletal proteins involved in microfilament-membrane interactions. *Exp Cell Res* 1987, 169:202-214
- 279 Mizutani K, Miki H, He H, Maruta H y Takenawa T. Essential role of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein in podosome formation and degradation of extracellular matrix in src-transformed fibroblasts. *Cancer Res* 2002, 62:669-674
- 280 Brenner K, Corbett S y Schwarzbauer J. Regulation of fibronectin matrix assembly by activated Ras in transformed cells. *Oncogene* 2000, 19:3156-3163
- 281 Craig S y Johnson R. Assembly of focal adhesions: progress, paradigms, and portents. *Curr Op Cell Biol* 1996, 8:74-85

- 
- 282 Miao H, Li S, Hu Y-L, Yuan S, Zhao Y, Chen B, Puzon-McLaughlin W, Tarui T, Shyy J, Takada Y, Usami S y Chien S. Differential regulation of Rho GTPases by  $\beta$ 1 and  $\beta$ 3 integrins: the role of an extracellular domain of integrin in intracellular signaling. *J Cell Sci* 2002, 115:2199-2206
- 283 Brakebusch C y Fässler R. The integrin $\pm$ actin connection, an eternal love affair. *EMBO J* 2003, 22:2324-2333
- 284 Ladeda V, Frankel P, Feig L, Foster D, Bal de Kier Joffé E y 163284-Ghiso J. RalA Mediates v-Src, v-Ras, and v-Raf Regulation of CD44 and Fibronectin Expression in NIH3T3 Fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 283:854-861
- 285 Bourdoulous S, Orend G, MacKenna D, Pasqualini R y Ruoslahti E. Fibronectin Matrix Regulates Activation of RHO and CDC42 GTPases and Cell Cycle Progression. *J Cell Biol* 1998, 143:267-276
- 286 Widmann C, Gibson S, Jarpe M y Johnson G. Mitogen-Activated Protein Kinase: Conservation of a Three-Kinase Module From Yeast to Human. *Phys Rev* 1999, 79:143-180
- 287 Rodriguez-Viciana P, Warne P, Khwaja A, Marte B, Pappin D, Das P, Waterfield M, Ridley A y Downward J. Role of Phosphoinositide 3-OH Kinase in Cell Transformation and Control of the Actin Cytoskeleton by Ras. *Cell* 1997, 89:457-467
- 288 Huang C, Borchers, Schaller M y Jacobson K. Phosphorylation of paxillin by p38MAPK is involved in the neurite extension of PC-12 cells. *J Cell Biol* 2004, 164: 593-602

- 
- 289 Mitra S, Hanson D, Schlaepfer D. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005, 6:56-68
- 290 McManus M, Boerner J, Danielsen A, Wang Z, Matsumurai F y Maihle N. An Oncogenic Epidermal Growth Factor Receptor Signals via a p21-activated Kinase-Caldesmon-Myosin Phosphotyrosine Complex. *J Biol Chem* 2000, 275, 35328-35334
- 291 Larsen J, Yamboliev I, Weber L y Gerthoffer W. Phosphorylation of the 27-kDa heat shock protein via p38 MAP kinase and MAPKAP kinase in smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1997, 273:L930-L940
- 292 Guay J, Lambert H, Gingras-Breton G, Lavoie J, Huot J y Landry J. Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J Cell Sci* 1997, 110:357-368
- 293 Dorion S y Landry J. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathways by heat shock. *Cell Stres Chap* 2002, 7:200-206
- 294 Mounier N, Arrigo A-P. Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact? *Cell Stres Chap* 2002, 7:167-176
- 295 Hedges J, Dechert M, Yamboliev I, Martin J, Hickey E, Weber L y Gerthoffer W. A role for p38(MAPK)/HSP27 pathway in smooth muscle cell migration. *J Biol Chem* 1999, 274:24211-24219
- 296 Gerthoffer W y Gunst S. Signal Transduction in Smooth Muscle Invited Review: Focal adhesion and small heat shock proteins in the regulation



- 
- of actin remodeling and contractility in smooth muscle. *J Appl Physiol* 2001,91:963-972
- 297 Williams K, Rahimtula M y Mearow K. Hsp27 and axonal growth in adult sensory neurons in vitro. *BMC Neurosci* 2005, 6:24
- 298 Usatyuk P y Natarajan V. Role of Mitogen-activated Protein Kinases in 4-Hydroxy-2-nonenal-induced Actin Remodeling and Barrier Function in Endothelial Cells. *J Biol Chem* 2004, 279: 11789-11797
- 299 Zhang L, Deng M, Parthasarathy R, Wang L, Mongan M, Molkentin J, Zheng Y y XiaY. MEKK1 Transduces Activin Signals in Keratinocytes To Induce Actin Stress Fiber Formation and Migration. *Mol Cell Biol* 2005, 25:60-65
- 300 Garcia J, Wang P, Schaphorst K, Becker P, Borbiev T, Liu F, Birukova A, Jacobs K, Bogatcheva N y Verin A. Critical involvement of p38 MAP kinase in pertussis toxin-induced cytoskeletal reorganization and lung permeability. *FASEB J* 2002, 16:1064-1076
- 301 Mehta P, Robson C, Neal D y Leung H. Keratinocyte growth factor activates p38 MAPK to induce stress fibre formation in human prostate DU145 cells. *Oncogene* 2001, 20:5359-5365
- 302 Edlund S, Landstrom M, Heldin C y Aspenstrom P. Transforming growth factor-beta-induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA. *Mol Biol Cell* 2002,13:902-914

- 
- 303 Maroni P, Koul S, Meacham R y Koul H. Mitogen Activated Protein kinase signal transduction pathways in the prostate. *Cell Commun Signaling* 2004, 2:5
- 304 Laferrière J, Houle F, Taher M, Valerie K, y Huot J. Transendothelial Migration of Colon Carcinoma Cells Requires Expression of E-selectin by Endothelial Cells and Activation of Stress-activated Protein Kinase-2 (SAPK2/p38) in the Tumor Cells. *J Biol Chem* 2001, 276: 33762-33772
- 305 Pruitt K, Pruitt W, Bilter G, Westwick J y Der C. Raf-independent Deregulation of p38 and JNK Mitogen-activated Protein Kinases Are Critical for Ras Transformation. *J Biol Chem* 2002, 277:31808-32817
- 306 Norman K, Hirasawa K, Yang A-D, Shields M y Lee P. Reovirus oncolysis: The Ras/RalGEF/p38 pathway dictates host cell permissiveness to reovirus infection. *Proc Natl Acad Sci* 2004, 101:11099-11104
- 307 Klemke R, Cai S, Giannini A, Gallagher P, de Lanerolle P y Cheresch D. Regulation of Cell Motility by Mitogen-activated Protein Kinase. *J Cell Biol* 1997, 137:481-492
- 308 Nguyen D, Catling A, Webb D, Sankovic M, Walker L, Somlyo A, Weber M y Gonias S. Myosin Light Chain Kinase Functions Downstream of Ras/ERK to Promote Migration of Urokinase-type Plasminogen Activator-stimulated Cells in an Integrin-selective Manner. *J Cell Biol* 1999, 146:149-164

- 
- 309 Reuveni H, Geiger T, Geiger B y Levitzki A. Reversal of the Ras-induced Transformed Phenotype by HR12, a Novel Ras Farnesylation Inhibitor, Is Mediated by the Mek/Erk Pathway. *J Cell Biol* 2000, 151:1179-1192
- 310 Fukazawa H y Uehara Y. U0126 Reverses Ki-ras-mediated Transformation by Blocking Both Mitogenactivated Protein Kinase and p70 S6 Kinase Pathways. *Cancer Res* 2000, 60:2104-2107
- 311 Hall A. Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton. *Science* 1998, 279:509-514
- 312 Sander E, ten Klooster J, van Delft S, van der Kammen R y Collard J. Rac Downregulates Rho Activity: Reciprocal Balance between Both GTPases Determines Cellular Morphology and Migratory Behavior. *J Cell Biol* 1999, 147:1009-1021
- 313 Zondag G, Evers E, ten Klooster J, Janssen L, van der Kammen R y Collard J. Oncogenic Ras Downregulates Rac Activity, which Leads to Increased Rho Activity and Epithelial–Mesenchymal Transition. *J Cell Biol* 2000, 149:775-781
- 314 Chen J, Zhuang S, Nguyen T, Boss G y Pilz R. Oncogenic Ras Leads to Rho Activation by Activating the Mitogen-activated Protein Kinase Pathway and Decreasing Rho-GTPase-activating Protein Activity. *J Biol Chem* 2003, 278:2807-2818
- 315 Oshiro T, Koyama S, Sugiyama S, Kondo A, Onodera Y, Asahara T, Sabe H y Kikuchi A. Interaction of POB1, a Downstream Molecule of Small

- 
- G Protein Ral, with PAG2, a Paxillin-binding Protein, Is Involved in Cell Migration. *J Biol Chem* 2002, 277:38618-38626
- 316 Oxford G, Owens C, Titus B, Foreman T, Herlevsen M, Smith S y Theodorescu D. RalA and RalB: Antagonistic Relatives in Cancer Cell Migration. *Cancer Res* 2005, 65:7111-7120
- 317 Camonis J y White M. Ral GTPases: corrupting the exocyst in cancer cells. *Trends Cell Biol* 2005, 15:327-332
- 318 Chien Y y White M. RAL GTPases are linchpin modulators of human tumour-cell proliferation and survival. *EMBO Rep* 2003, 4:800-806
- 319 Yadava S, Zajaca E, Singhala S, Singhala J, Drakea K, Awasthib Y y Awasthi S. POB1 over-expression inhibits RLIP76-mediated transport of glutathione-conjugates, drugs and promotes apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 328:1003-1009
- 320 Downward J. PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol* 2004, 15:177-182
- 321 Vanhaesebroeck B y Alessi D. The PI3K–PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 2000, 346:561-576
- 322 Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J y Korsmeyer S. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 1996, 87:619-628
- 323 Datta S, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y y Greenberg M. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997, 91:231-241

- 
- 324 Downward J. How BAD phosphorylation is good for survival. *Nat Cell Biol* 1999, 1:E33-35
- 325 Mayo L y Donner D. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98:11598-11603
- 326 Zhou B, Liao Y, Xia W, Zou Y, Spohn B y Hung M-C. HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol* 2001, 3:973-982.
- 327 Ashcroft M, Ludwig R, Woods D, Copeland T, Weber H, MacRae E y Vousden K. Phosphorylation of HDM2 by Akt. *Oncogene* 2002, 21:1955-1962
- 328 Gottlieb T, Leal J, Seger R, Taya Y y Oren M. Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene* 2002, 21:1299-1303
- 329 Basu S, Totty N, Irwin M, Sudol M y Downward J. Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Mol Cell* 2003, 11:11-23.
- 330 Brunet A, Bonni A, Zigmond M, Lin M, Juo P, Hu L, Anderson M, Arden K, Blenis J y Greenberg M. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999, 96:857-868
- 331 Kane L, Shapiro V, Stokoe D y Weiss A. Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol* 1999, 9:601-604

- 
- 332 Ozes O, Mayo L, Gustin J, Pfeffer S, Pfeffer L y Donner D. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 1999, 401:82-85
- 333 Romashkova J y Makarov S. NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 1999, 401:86-90
- 334 Berra E, Diaz-Meco M y Moscat J. The activation of p38 and apoptosis by the inhibition of Erk is antagonized by the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *J Biol Chem* 1998, 273:10792-10797
- 335 Kim A, Khursigara G, Sun X, Franke T y Chao MV. Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol* 2001, 21:893-901
- 336 Barthwal M, Sathyanarayana P, Kundu C, Rana B, Pradeep A, Sharma C, et al. Negative regulation of mixed lineage kinase 3 by protein kinase B/AKT leads to cell survival. *J Biol Chem* 2003, 278:3897-3902
- 337 Mcfall A, Ülkü A, Lambert Q, Kusa A, Rogers-Graham K y Der C. Oncogenic Ras Blocks Anoikis by Activation of a Novel Effector Pathway Independent of Phosphatidylinositol 3-Kinase. *Mol Cell Biol* 2001, 21:5488-5499.
- 338 Jäättelä M. Escaping Cell Death: Survival Proteins in Cancer. *Exp Cell Res* 1999, 248:30-43
- 339 Garrido C, Schmitt E, Candé C, Vahsen N, Parcellier A y Kroemer G. Spotlight on Heat Shock Proteins. HSP27 and HSP70. Potential oncogenic apoptosis inhibitors. *Cell Cycle* 2003, 2:579-584

- 
- 340 Okazaki M, Kishida S, Murai H, Hinoi T y Kikuchi A. Ras-interacting domain of Ral GDP dissociation stimulator like (RGL) reverses v-Ras-induced transformation and Raf-1 activation in NIH3T3 cells. *Cancer Res* 1996, 56:2387-2392