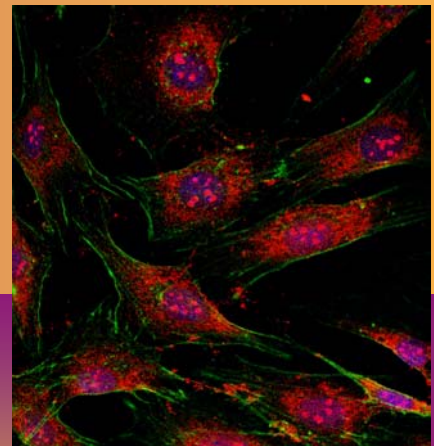
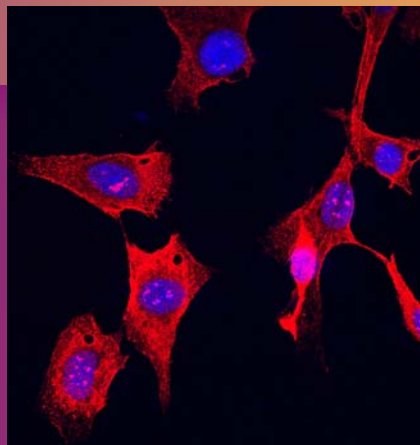
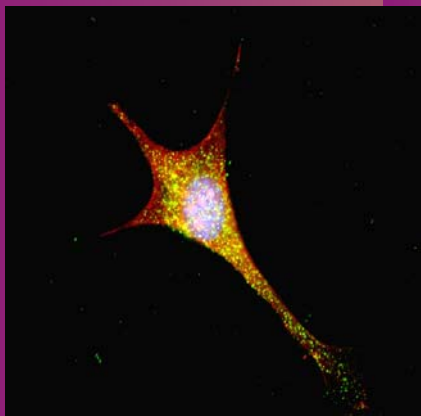




Departamento de Fisiología y Farmacología

# MODULACIÓN POR LAS ISOFORMAS DE RAS DE LA SÍNTESIS DE MATRIZ EXTRACELULAR Y PROLIFERACIÓN EN FIBROBLASTOS



Isabel Fuentes Calvo  
Junio 2009

**Memoria presentada por  
Dña. Isabel Fuentes Calvo para la obtención  
del Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca**

**Salamanca, de Abril de 2009**

**Fdo. Isabel Fuentes Calvo**





VNIVERSIDAD  
D SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y  
FARMACOLOGÍA

DR. D. RAFAEL JIMÉNEZ FERNÁNDEZ, DIRECTOR DEL  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA DE LA  
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

**CERTIFICA:**

Que el presente trabajo, elaborado por la **Lda. Dña. Isabel Fuentes Calvo** para optar al Grado de Doctor de la Universidad de Salamanca, con el título: **“MODULACIÓN POR LAS ISOFORMAS DE RAS DE LA SÍNTESIS DE MATRIZ EXTRACELULAR Y PROLIFERACIÓN EN FIBROBLASTOS”**, ha sido realizado bajo la dirección de los Doctores D. Carlos Martínez Salgado y D. José Miguel López Novoa, en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Salamanca, a      de Abril de 2009

Fdo: Dr. Rafael Jiménez Fernández





UNIVERSIDAD  
DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y  
FARMACOLOGÍA

D. CARLOS MARTÍNEZ SALGADO, Investigador del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) del Instituto de Salud Carlos III, y D. JOSÉ MIGUEL LÓPEZ NOVOA, Catedrático de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca

**CERTIFICAN:**

Que el presente trabajo, titulado **“MODULACIÓN POR LAS ISOFORMAS DE RAS DE LA SÍNTESIS DE MATRIZ EXTRACELULAR Y PROLIFERACIÓN EN FIBROBLASTOS”** presentado por **Dña. Isabel Fuentes Calvo** para optar al Grado de Doctor de la Universidad de Salamanca, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, y considerando que cumple las condiciones necesarias autorizan su presentación a fin de que pueda ser defendido ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expiden y firman el presente certificado en Salamanca, a      de Abril de 2009

Fdo: Dr: Carlos Martínez Salgado

Fdo: Dr. José Miguel López Novoa



Este trabajo ha sido realizado siendo Dña. Isabel Fuentes Calvo beneficiaria de una beca de la JCYL para la formación de personal investigador (BOECYL 14 de Junio de 2004) y financiado por el Ministerio de Sanidad (Instituto de Salud Carlos III) a través de los proyectos CP03/00094 y PI041817, y por la Junta de Castilla y León del a través de los proyectos SA001/C05, SA029A05 y GRS 167/A/07.





## Agradecimientos

Miguel de Unamuno se preguntó: *“¿se hizo el hombre para la ciencia o se hizo la ciencia para el hombre?”*. No conozco su respuesta pero para mí, el hombre necesita de la ciencia para avanzar, para sentirse importante y para dar respuesta a todo aquello que se pregunta.

En este laboratorio he aprendido muchas cosas, la mayoría de las veces por el camino fácil, gracias a la dirección de Carlos (una de las personas más pacientes que conozco, que escucha y deja hacer, a pesar que no siempre estemos de acuerdo), de José Miguel (“el coordinador” que no “jefe” por mucho que nos empeñemos, que sabe la respuesta fácil y te ayuda a encontrarla) y de Alejandro, (gracias al cual empecé esta aventura y que me ayuda cada día a aprender una cosa más).

Gracias a mis compañeros del S-18 (Neli, Annette, Ana, Lucas, Lucía y los que estuvieron de paso) y del S-18B (también llamado S-20: Fran, Omar, Yaremi, Rebe y Sandra) por hacer la convivencia fácil y por vuestra disposición a ayudar siempre, y al resto de los becarios y no becarios del grupo (los que están y los que estuvieron, demasiados para nombrarlos a todos) con los cuales he pasado momentos buenos (por cultivos, en alguna que otra cena, por los pasillos y en las charlas del S17) y otros no tan buenos (recordad limpieza, reposición y reconocer las equivocaciones) que también me han enseñado a seguir para delante siguiendo la frase de Aristóteles *“la más necesaria de todas las ciencias es la de olvidar el mal que una vez se aprendió”*.

Gracias a Neil, mi ayuda en Dublin, y al resto del laboratorio del Conway Institute con los que aprendí independencia, otro saber hacer y algo de EMT. Y a los de fuera del laboratorio (Natalia, Oda, Vero y Ana), por la parte más divertida de la estancia.

Gracias al resto del Departamento, a la parte de Farmacia (por seguir confiando en mí y darme nuevas oportunidades), a Maribel (la secretaria que te soluciona la vida con una llamada), a María José (por su ayuda técnica) y a Luisa (después de ésta, ya ordeno la mesa).

Gracias a mis amigos, sufridores de la ciencia, con los que he compartido los mejores años y los que nos quedan: Abi, Patri y Lore (las tres marías), Rosario (la próxima), Ángel (la estrella del momento), Javi (ya sabes, los últimos son los primeros), Paço (sufridor sin ser científico), Sandra (vale salimos, pero sólo un ratito...) y Patri bis (a por tu oscar). Y a mis otros amigos, los biólogos, los del pueblo y los de Chemical, por su apoyo en los buenos y malos momentos.

Por último, gracias a mi familia, a mi madre (la que siempre me apoya), a mi padre (lo más parecido a mí, el que me presiona y por el que he conseguido tantas cosas), a mi hermano (mi alegría) y a todos los demás por darme lo mejor de cada uno.

*Quizás "El mundo del hombre contemporáneo se funda sobre los resultados de la ciencia: el dato reemplaza al mito, la teoría a la fantasía, la predicción a la profecía" (Mario Bunge). Me gustaría pensar que en estos años he puesto un poquito de ciencia en el mundo.*

***A mi familia  
y a Carlos***



# INDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>MATRIZ EXTRACELULAR</b>	<b>5</b>
<b>1. Composición de la MEC</b>	<b>5</b>
A. Proteínas	6
♦ Fibras elásticas	6
♦ Colágenos	7
B. Glicosaminoglicanos	8
C. Glicoconjugados	8
♦ Proteoglicanos	8
♦ Glicoproteínas	9
<b>2. Tipos de MEC</b>	<b>10</b>
<b>3. Interacciones de la MEC</b>	<b>10</b>
<b>4. Degradación de la MEC</b>	<b>11</b>
A. Metaloproteasas de matriz	12
B. Cascada plasminógeno-plasmita	13
<b>PROLIFERACIÓN CELULAR</b>	<b>14</b>
1. Etapas del ciclo celular	14
2. Proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular	15
3. Regulación del ciclo celular	17
<b>FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE <math>\beta</math></b>	<b>19</b>
1. Síntesis del TGF- $\beta$ 1	20
2. Receptores de TGF- $\beta$	20
A. Señalizantes	20
B. No señalizantes: betaglicano y endogлина	21
3. Rutas de señalización	22
4. Efectos del TGF- $\beta$ 1 sobre la MEC	23
5. Efectos del TGF- $\beta$ 1 sobre la proliferación celular	24
<b>LAS PROTEÍNAS RAS</b>	<b>25</b>
1. Los genes <i>ras</i>	25
2. Estructura proteica	27
3. Modificaciones post-traduccionales: prenilación y palmitoilación	29
4. Transporte y localización en la membrana	31

<b>5. Regulación de Ras</b>	<b>32</b>
A. Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs)	33
B. Proteínas activadoras de GTPasas (GAPs)	34
<b>6. Efectores de Ras</b>	<b>34</b>
A. Proteínas cinasas reguladas por señales extracelulares (Ruta de MEK/Erk)	35
B. Fosfatidil inositol 3 cinasa (Ruta de PI3K/Akt)	37
<b>7. Relevancia clínica de Ras</b>	<b>39</b>

## **OBJETIVOS** **41**

## **MATERIALES Y MÉTODOS** **45**

<b>MATERIALES</b>	<b>47</b>
1. Reactivos y material de plástico	47
2. Aparatos y programas	48
3. Anticuerpos	49
4. Oligonucleótidos	50
<b>MÉTODOS</b>	<b>51</b>
1. Cultivo celular	51
A. Tripsinización	51
B. Congelación y descongelación de células	51
C. Recuento del número de células	52
D. Grupos experimentales	53
2. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo	53
3. Medida del tamaño celular	55
A. Microscopía óptica	55
B. Citometría de flujo	55
4. Cuantificación del número de células mediante la tinción con cristal violeta	56
5. Inmunofluorescencia	56
6. Western-blot	57
7. Incorporación de [3H] prolina a proteínas colágenas	59
8. Estudio de la expresión de genes por RT-PCR	62
9. Estudio de la movilidad celular	66
A. Migración a través de <i>transwell</i>	66
B. Cierre de heridas in <i>vitro</i>	66
10. Análisis estadístico	67

<b>FIBROBLASTOS H-<i>ras</i><sup>-/-</sup></b>	<b>71</b>
<b>1. Caracterización de las células</b>	<b>71</b>
A. Expresión de las isoformas de Ras	71
B. Expresión de marcadores de miofibroblastos	72
C. Tamaño celular	72
D. Ciclo celular	74
<b>2. Expresión de Ras activado (Ras-GTP)</b>	<b>74</b>
<b>3. Activación de los efectores de Ras</b>	<b>75</b>
A. Ruta de las MAPK: activación de Erk	76
B. Ruta de PI3K: activación de Akt	76
<b>4. Expresión y síntesis de proteínas de MEC</b>	<b>77</b>
A. Efecto del tratamiento con TGF- $\beta$ 1	77
B. Papel de la vía de Erk	79
C. Papel de la vía de Akt	81
<b>5. Estudios de proliferación celular</b>	<b>83</b>
A. Efecto del tratamiento con TGF- $\beta$ 1	83
B. Papel de la vía de Erk	85
C. Papel de la vía de Akt	85
<b>6. Estudios de migración celular</b>	<b>88</b>
A. Condiciones basales (0,5% SBF)	88
B. Papel de la vía de Erk	89
C. Papel de la vía de Akt	91
<b>FIBROBLASTOS N-<i>ras</i><sup>-/-</sup></b>	<b>93</b>
<b>1. Caracterización de las células</b>	<b>93</b>
A. Expresión de las isoformas de Ras	93
B. Expresión de marcadores de miofibroblastos	93
C. Ciclo celular	94
<b>2. Expresión de Ras activado (Ras-GTP)</b>	<b>95</b>
<b>3. Activación de los efectores de Ras</b>	<b>95</b>
A. Ruta de las MAPK: activación de Erk	95
B. Ruta de PI3K: activación de Akt	96
<b>4. Expresión y síntesis de proteínas de MEC</b>	<b>96</b>
A. Efecto del tratamiento con TGF- $\beta$ 1	96
B. Papel de la vía de Erk	99
C. Papel de la vía de Akt	101
<b>5. Estudios de proliferación celular</b>	<b>103</b>
A. Efecto del tratamiento con TGF- $\beta$ 1	103
B. Papel de la vía de Erk	104



C. Papel de la vía de Akt	106
<b>6. Estudios de migración celular</b>	<b>108</b>
A. Condiciones basales (0,5%)	108
B. Papel de la vía de Erk	110
C. Papel de la vía de Akt	110

## **DISCUSIÓN**

**113**

1. Efecto de la ausencia de H y N-Ras sobre la activación de Ras y sus efectores	116
2. Efecto de la ausencia de H y N-Ras sobre acumulación de MEC	119
3. Efecto de la ausencia de H y N-Ras sobre la proliferación celular	123
4. Efecto de la ausencia de H y N-Ras sobre la migración celular	129

## **CONCLUSIONES**

**131**

## **BIBLIOGRAFÍA**

**135**

## **ABREVIATURAS**

**157**

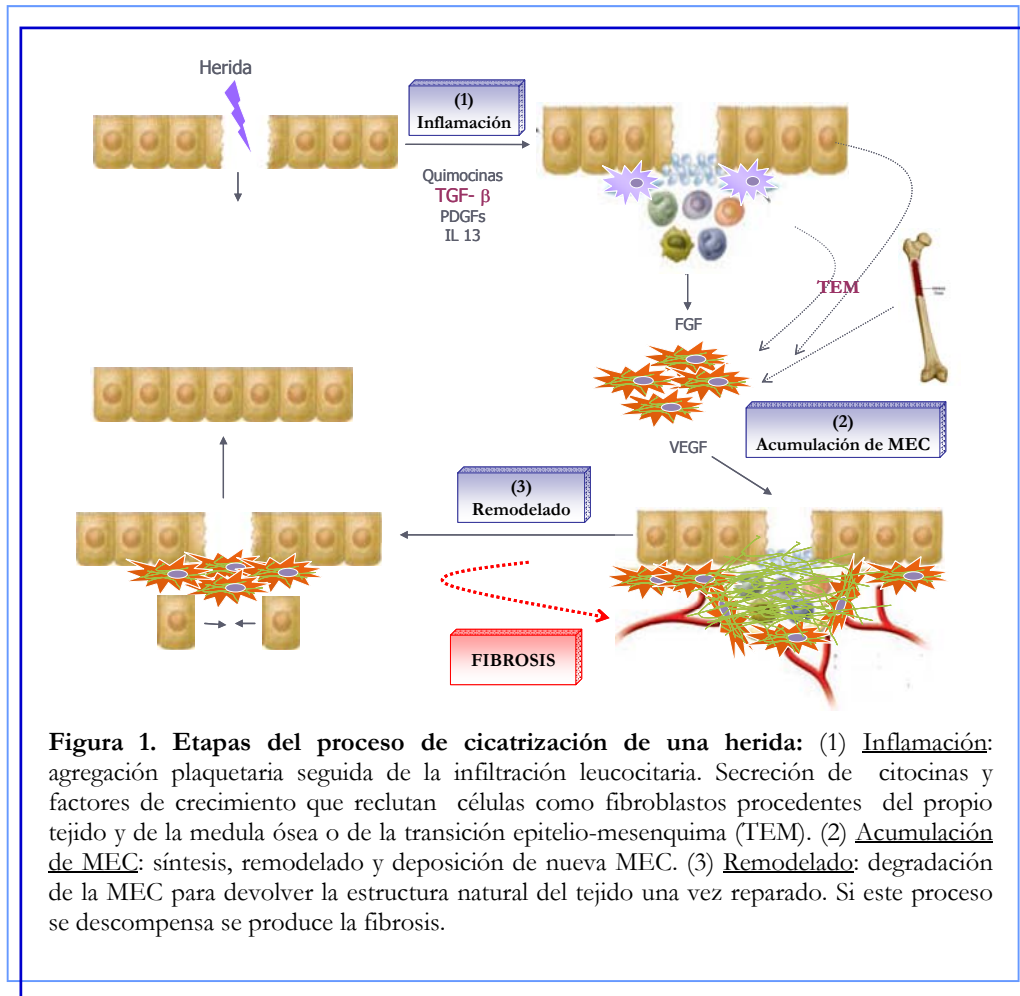
# INTRODUCCIÓN



La fibrosis es un proceso común a numerosas patologías que se desarrolla durante varios años y que puede desembocar en el fallo del órgano afectado y en la muerte si no se trata a tiempo. La cirrosis hepática, fibrosis pulmonar, artritis reumatoide, fibrosarcomas, esclerosarcomas, pancreatitis crónica, aterosclerosis de los vasos e insuficiencia renal crónica son algunos ejemplos de enfermedades en las que los procesos fibróticos son muy importantes. La patogénesis de la fibrosis renal es un proceso progresivo que desemboca en la última etapa del fallo renal, una enfermedad muy grave que requiere diálisis ó transplante renal.

La fibrosis se puede definir como una cicatrización defectuosa con una gran acumulación de matriz extracelular (MEC), producida por un aumento en su producción y deposición y por un déficit en su degradación. Cuando se produce una herida, se activa el mecanismo de reparación necesario para la formación de nuevo tejido conectivo que la repare (figura 1). Durante este proceso, células del propio tejido y fibroblastos procedentes de diferentes lugares, son capaces de proliferar y migrar hacia la herida y activarse en un proceso que se denomina transición epitelio-mesenquima. Una vez allí, los fibroblastos especializados o miofibroblastos producen una mayor cantidad de proteínas de MEC generando una cicatriz. Tan importante es la cicatrización de la herida como la eliminación de esta cicatriz cuando la herida está reparada (remodelado), ya que si no se produce correctamente se desarrolla la fibrosis. Debe existir un balance entre la síntesis y la degradación de la MEC para la correcta reparación del tejido, y por ello existe una regulación precisa de todo el proceso mediante citocinas y factores de crecimiento profibróticos como el factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) y antifibróticos como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Un desequilibrio en la proliferación, migración y acumulación de MEC desemboca en una cicatrización incorrecta, que si se mantiene da lugar a la fibrosis (Wynn, 2008).

Los fibroblastos son las principales células productoras de MEC, aunque dependiendo del tejido podemos encontrar otros tipos celulares residentes, como por ejemplo los osteoblastos en el tejido óseo y los condrocitos en el tejido cartilaginoso, con gran capacidad de secreción de matriz. Las agresiones a los tejidos inducen la liberación de citocinas y factores de crecimiento que promueven la diferenciación en células de tipo miofibroblasto y en ocasiones, todo este proceso se ve acompañado de un aumento en la proliferación celular. Los fibroblastos producen grandes cantidades de MEC y de esta forma, inducen la sustitución de los componentes habituales del tejido por material fibroso.



**Figura 1. Etapas del proceso de cicatrización de una herida:** (1) Inflamación: agregación plaquetaria seguida de la infiltración leucocitaria. Secreción de citocinas y factores de crecimiento que reclutan células como fibroblastos procedentes del propio tejido y de la médula ósea o de la transición epitelio-mesénquima (TEM). (2) Acumulación de MEC: síntesis, remodelado y deposición de nueva MEC. (3) Remodelado: degradación de la MEC para devolver la estructura natural del tejido una vez reparado. Si este proceso se descompensa se produce la fibrosis.

El conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan la deposición y degradación de la MEC en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas puede ser de gran utilidad para diseñar estrategias preventivas y para reducir la progresión de estos procesos patológicos que cursan con fibrosis. En nuestro laboratorio hemos descrito la activación de la ruta de la GTPasa Ras en un modelo de fibrosis túbulo- intersticial en ratón inducida mediante obstrucción ureteral unilateral (Rodríguez-Pena y cols., 2005). Además, hemos demostrado que los fibroblastos dobles knock-out (KO) de N y H-Ras presentan una mayor acumulación de MEC y una menor proliferación en respuesta a TGF-β1 (Martínez-Salgado y cols., 2006). Con estos precedentes, en el presente trabajo hemos abordado el estudio del papel individual de las isoformas H-Ras y N-Ras sobre la producción de MEC, la proliferación y la capacidad de migración, todos ellos mecanismos implicados en la fibrosis. Para ello hemos empleado fibroblastos KO para las isoformas H- y N-Ras.

## LA MATRIZ EXTRACELULAR

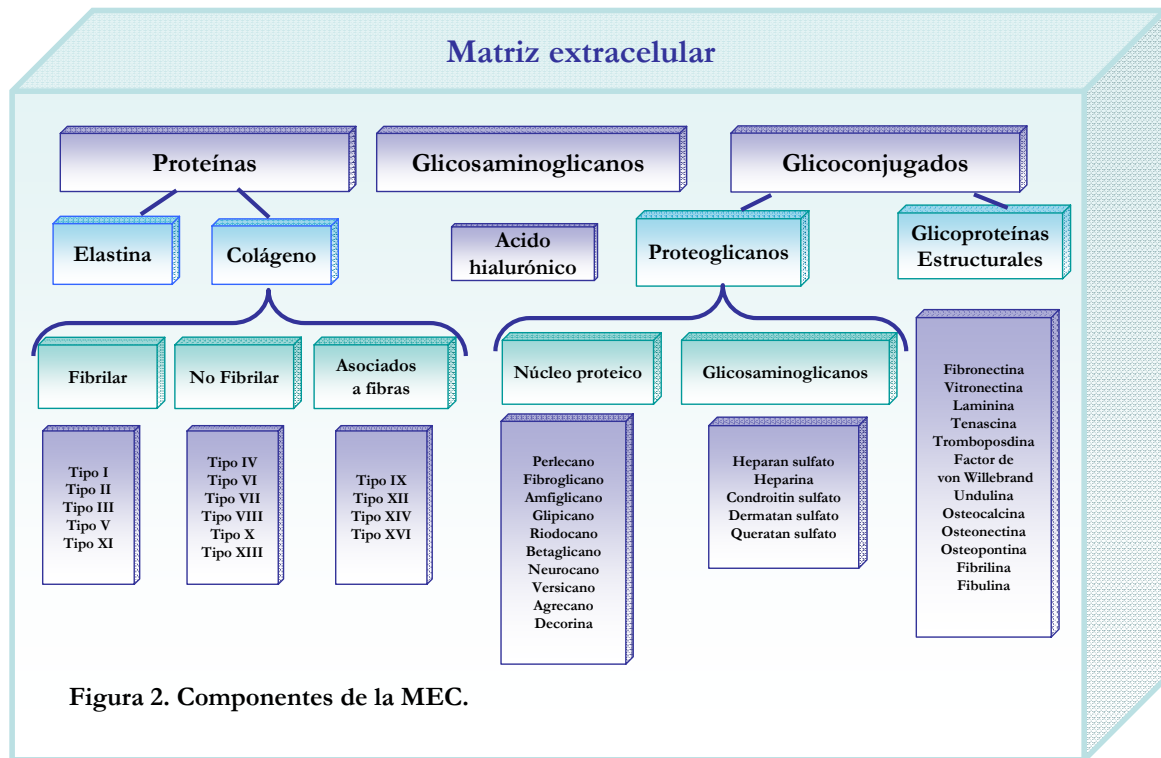
La matriz extracelular (MEC) es un entramado de moléculas, proteínas y carbohidratos que se disponen en el espacio intercelular y que son sintetizadas y secretadas por las propias células. En un principio se creía que la MEC de vertebrados era una estructura inerte que servía de soporte a las células y daba consistencia a los tejidos. Ahora, sabemos que la MEC es muy activa y con un papel muy complejo que puede regular el comportamiento de las células que contactan con ella y que influye en la supervivencia, desarrollo, migración, proliferación, forma de la célula y su función (Alberts, 2002).

La MEC tiene múltiples funciones: aporta propiedades mecánicas a los tejidos (tanto en animales como en vegetales), mantiene la forma celular, permite la comunicación intercelular y la adhesión de las células para formar tejidos, forma vías por las que se mueven las células, modula la diferenciación celular y la fisiología celular, secuestra factores de crecimiento, etc (Alberts, 2002).

### 1. Composición de la MEC

La cantidad, la composición y la disposición de la matriz extracelular varían para adaptarse a los requerimientos funcionales de cada tejido en particular.

Las principales macromoléculas que componen la matriz extracelular son: **colágeno, elastina, glicosaminoglicanos, proteoglicanos y glicoproteínas** (figura 2). Es la cantidad, la proporción y el tipo de cada una de estas macromoléculas lo que distingue a unas matrices extracelulares de otras (Alberts, 2002). La composición de la MEC varía en función del tipo celular que la genera. Por ejemplo, la MEC sintetizada por los fibroblastos activos está fundamentalmente formada por colágeno tipo I, fibronectina, condroitin y dermatan sulfato, pero si los fibroblastos están quiescentes el colágeno es de tipo V y VI.



### A. Proteínas

Las proteínas estructurales de la MEC son principalmente la elastina y el colágeno.

#### ◆ Fibras elásticas

La **elastina** es el principal componente de las fibras elásticas y parece ser exclusiva de vertebrados, puesto que no se ha encontrado en invertebrados; posee una larga cadena de aminoácidos en la que hay numerosas secuencias con aminoácidos hidrófobos, separadas por otras secuencias que contienen parejas de glicinas y otros aminoácidos pequeños como lisina. Esta composición de aminoácidos es la que le confiere las propiedades elásticas, puesto que los aminoácidos hidrófobos permiten la disposición en estructuras enrolladas y la lisina facilita la formación de hélices donde se enlazan dos moléculas de elastina próximas (Kielty, 2006).

Las fibras elásticas son agregados insolubles de proteínas que tienen la capacidad de estirarse en respuesta a las tensiones mecánicas y de contraerse para recuperar su longitud inicial en reposo. Se encuentran sobre todo en la dermis, en las paredes de las arterias, en el cartílago elástico y en el tejido conectivo de los pulmones. Además de la elastina, que representa el 90 % de las proteínas totales, las fibras elásticas están formadas por microfibrillas de fibrilina y por otras glicoproteínas y proteoglicanos en menor proporción. Las funciones de las fibras elásticas son aportar sostén a los tejidos o regular la actividad de los factores de crecimiento (Kielty, 2006).

## ◆ Colágenos

Los **colágenos** son los componentes mayoritarios de la MEC y pueden representar del 25 al 30 % de todas las proteínas corporales. En los vertebrados hay más de 40 genes que sintetizan unas cadenas de aminoácidos denominadas cadenas  $\alpha$ , las cuales se asocian de tres en tres para formar hasta 28 tipos de moléculas de colágeno diferentes (Myllyharju y Kivirikko, 2004). Las cadenas  $\alpha$  contienen secuencias repetidas glicina-X-Y, donde X e Y son dos aminoácidos cualquiera, en general prolina o lisina. Las características de los colágenos también se deben a modificaciones postranscripcionales, como por ejemplo la hidroxilación de prolina que se encuentra en posición Y (Ezer y cols., 1999).

La organización de las moléculas de colágeno en estructuras macromoleculares tridimensionales es variada. Dependiendo de su organización y su función los colágenos se pueden clasificar en varios tipos:

- **Colágenos que forman fibras** : son los más abundantes. El colágeno se sintetiza en el interior celular en forma de procolágeno, formado por 3 subunidades  $\alpha$  inmaduras, que posteriormente es exocitado. Tras la liberación sufre una modificación enzimática que elimina unas secuencias terminales de cada cadena  $\alpha$ , transformando el procolágeno en colágeno. Tras ello las moléculas de colágeno se ensamblan automáticamente para formar fibrillas de colágeno, que a su vez se unen para formar fibras de colágeno (Kadler y cols., 1996). El más frecuente es el tipo I, que abunda en huesos, cartílago y piel, y que representa el 90 % de todo el colágeno del organismo.
- **Colágenos que forman mallas** : se encuentran rodeando los órganos o formando la base de los epitelios. Uno de los más abundantes es el colágeno tipo IV, que abunda en la lámina basal, localizada entre el epitelio y el tejido conectivo (Than y cols., 2002)
- **Colágenos que establecen conexiones** : forman puentes de unión entre moléculas de la matriz extracelular y el colágeno fibrilar o el colágeno que forma mallas. Por ejemplo, el colágeno tipo IX forma uniones entre los glicosaminoglicanos y las fibras de colágeno tipo II (Wu y cols., 1992).
- **Colágenos con dominios transmembrana** : poseen secuencias de aminoácidos hidrofóbicos que pueden internarse en la membrana plasmática. Por ejemplo, el colágeno tipo XVII forma parte de la estructura de los hemidesmosomas (Maertens y



cols., 2007).

Debido a su estructura, la función principal de estas proteínas es proporcionar a los tejidos resistencia a la distensión, pero además están implicados en procesos de adhesión y migración celular, cáncer, angiogénesis, morfogénesis y reparación tisular. También están localizados en la membrana basal, como por ejemplo en el glomérulo renal, donde es importante para la filtración (Saarela y cols., 1998; Timpl y Aumailley, 1989). Actualmente, la identificación de colágenos transmembrana que son precursores de péptidos bioactivos con funciones paracrinas es una nueva fuente de estudio (Kadler y cols., 2007).

El colágeno es sintetizado mayoritariamente por fibroblastos, miofibroblastos, osteoblastos y condrocitos. Algunos tipos de colágenos, como el colágeno IV de las membranas basales, también son sintetizados por células sobre las que se encuentran depositados, como son las epiteliales, endoteliales y mesoteliales (Brown y Timpl, 1995; Kadler y cols., 2007; Shaw y Olsen, 1991; van der Rest y Garrone, 1991).

### **B. Glicosaminoglicanos**

Son polímeros no ramificados de azúcares que pueden formar cadenas muy largas. Están formados por repeticiones de parejas de azúcares donde uno de ellos tiene un grupo amino (N-acetilgalactosamina o N-acetilglucosamina) y el otro es normalmente la galactosa o el ácido glucurónico. Estos azúcares poseen grupos carboxilo (COO-) y grupos sulfato (SO<sub>3</sub>-), cuyas cargas negativas permiten una fuerte y abundante asociación con moléculas de agua, hidratando así a la MEC. Los glicosaminoglicanos son poco flexibles por lo que ocupan un gran volumen y gracias a su fuerte hidratación hacen que la MEC se comporte como un gel. Esta propiedad de los glicosaminoglicanos capacita a la matriz para resistir a las fuerzas de compresión, de manera que constituyen un soporte mecánico para los tejidos y al mismo tiempo facilitan la difusión de moléculas hidrosolubles y la migración celular. Los tipos más comunes de glicosaminoglicanos son el ácido hialurónico y los glicosaminoglicanos sulfatados: condroitín sulfato, dermatán sulfato, queratán sulfato y heparán sulfato (Gandhi y Mancera, 2008).

### **C. Glicoconjugados**

#### **◆ Proteoglicanos**

Son moléculas compuestas por la unión covalente entre una cadena de aminoácidos y uno o varios glicosaminoglicanos sulfatados. Los proteoglicanos son sintetizados en el interior celu-

lar, y la mayoría son excitados al espacio intercelular, pero algunos pueden localizarse en la membrana plasmática gracias a que su parte proteica contiene secuencias de aminoácidos hidrófobos que se insertan entre las cadenas de ácidos grasos de la membrana (Ruoslahti, 1988).

Los proteoglicanos se diferencian sobre todo en la secuencia y en la longitud de la cadena de aminoácidos (desde 100 a 4000 aminoácidos). También se diferencian en el número y en el tipo de moléculas de glicosaminoglicanos que tienen unidos, variando desde la decorina que tiene una sola molécula hasta el agregano que contiene más de 200 (Hardingham y Fosang, 1992).

La función de los proteoglicanos es la misma que tienen sus moléculas de glicosaminoglicanos: hidratación, resistencia a presiones mecánicas, lubricantes, afectan la diferenciación, la movilidad y la fisiología celular, etc (Kresse y Schonherr, 2001; Tumova y cols., 2000). Su acción mecánica es esencial en los cartílagos y en las articulaciones, pero además son puntos de anclaje de las células a la MEC que le rodea, bien por su acción directa por ser moléculas integrales de la membrana plasmática, bien porque forman uniones con fosfolípidos de la membrana o bien porque son reconocidos por moléculas de adhesión presentes en las membranas plasmáticas (Iozzo, 2001).

Los proteoglicanos y los glicosaminoglicanos forman grandes polímeros que se asocian con proteínas fibrosas como el colágeno y con redes proteicas como la lámina basal creando estructuras muy complejas. En principio los proteoglicanos son muy heterogéneos y es difícil agruparlos, aunque pueden dividirse en varias subfamilias atendiendo a la homología del núcleo proteico (Iozzo y Murdoch, 1996). La mayoría de las funciones de los proteoglicanos se deben a las cadenas de glicosaminoglicanos, gracias a las cuales pueden formar geles de tamaño de poro y densidad de carga variables, de forma que pueden actuar seleccionando el tráfico de moléculas y de células. Además, algunos proteoglicanos unen moléculas de señalización extracelular. Un claro ejemplo lo constituyen la decorina y el biglicano, que se unen a TGF- $\beta$  impidiendo la unión a sus receptores celulares (Yamaguchi y cols., 1990).

#### ◆ Glicoproteínas

Son moléculas compuestas por una proteína unida a uno o varios hidratos de carbono, simples o compuestos. A este grupo pertenece la fibronectina, tenascina, laminina y otras glicoproteínas de adhesión presentes en la matriz extracelular como el fibrinógeno, que une receptores de superficie de las plaquetas y permite la coagulación sanguínea, la osteopontina presente en el hueso o el riñón, etc.

La **fibronectina** está compuesta por dos subunidades polipeptídicas muy largas unidas mediante dos enlaces disulfuro cerca del extremo carboxilo terminal. Esta glicoproteína tiene un papel importante en la adhesión de las células a la matriz; posee varios dominios de unión a otras proteínas de la MEC y a receptores de la superficie celular. En su estructura se ha identificado el dominio RGD (arginina-glicina-ácido aspártico), una secuencia tripeptídica específica que interviene en la unión de proteínas de la MEC con receptores de membrana como las integrinas (Dickinson y cols., 1994; Hynes, 1986; Main y cols., 1992). Las moléculas de fibronectina pueden aparecer formando fibras insolubles como en los tejidos conectivos o solubles como en el plasma. Tienen un papel muy importante durante el desarrollo embrionario creando vías por las que pueden migrar las células de un lugar a otro del embrión.

Las **tenascinas** son una familia de proteínas de gran tamaño que aparecen en tejidos embrionarios, en heridas y en tumores. Son capaces de unirse a integrinas, a proteoglicanos y a receptores del tipo de las inmunoglobulinas.

La **laminina** es la glicoproteína más típica y abundante de las membranas basales. Está formada por tres cadenas polipeptídicas largas dispuestas en forma de cruz. Su estructura presenta dominios de unión a otras proteínas de la MEC como colágeno IV y entactina, y a receptores de la superficie celular. La laminina junto con el colágeno tipo IV, nidogen y perlacano es uno de los principales componentes de la membrana basal (Aumailley y Krieg, 1996).

## 2. Tipos de MEC

Los tipos de MEC se diferencian según la cantidad y el tipo de moléculas que la componen (tabla 1). En general, los principales tipos de MEC son la lámina basal y la MEC del tejido conectivo, del cartílago y del hueso. Además, algunos autores consideran el suero sanguíneo como una MEC tremendamente especializada.

## 3. Interacciones de la MEC

Las interacciones entre las células y la MEC están mediadas principalmente por integrinas, aunque, como hemos descrito anteriormente, algunos proteoglicanos también pueden realizar esta función.

Las **integrinas** son una gran familia de proteínas cuyos miembros se expresan según los tipos de tejidos y las necesidades fisiológicas de éstos o de las células (Eckes y cols., 1999; Ruoslahti, 1991). Son heterodímeros transmembrana formados por cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  unidas de forma

Tipo de Matriz	Composición principal	Localización	Función
Lamina basal	Colágeno IV Laminina Perlecana Nidogen	Base de los epitelios	Soporte Barrera de permeabilidad selectiva
Tejido conectivo laxo	Hialuronato y proteoglicanos Poco colágeno y fibras elásticas		Rellenado e hidratación de espacios Medio de transporte de células
Tejido conectivo denso	Colágeno en fibras paralelas	Tendones, dermis, sistema digestivo, pared arterial	
Cartílago	Colágeno II, IX y XI Hialuronato y agregano		
Hueso	Colágeno I, proteoglicanos y glicoproteínas		

Tabla 1. Composición, localización y función de los diferentes tipos de MEC.

no covalente con un dominio intracelular que contacta con el citoesqueleto y otro extracelular globular que es capaz de unir colágeno, otras integrinas y lamininas (Hynes, 1992). Este enlace entre MEC y citoesqueleto es fundamental para modificar el comportamiento de la célula en función de las moléculas presentes en la MEC provocando respuestas celulares relacionadas con la adhesión, la migración y la proliferación. Suelen aparecer asociadas a la membrana plasmática formando las denominadas adhesiones focales. La interacción de las integrinas con los componentes de la MEC hace que se activen mecanismos de señalización intracelular (Hynes, 1992). La unión de un ligando a las integrinas hace que se agrupen, se recluten moléculas de unión al citoesqueleto dentro de los complejos de adhesión y se anclen a fibras de estrés de actina reorganizándose el citoesqueleto y produciéndose una cascada de fosforilaciones que trasmite la señal por la activación de proteínas de señalización celular, entre las que se incluyen pequeñas GTPasas (Clark y Hynes, 1996; Price y cols., 1998), proteínas cinasas (Ferrell y Martin, 1989; Golden y Brugge, 1989; Lipfert y cols., 1992) y cinasas lipídicas (King y cols., 1997).

#### 4. Degradación de la MEC

La composición de la MEC determina una estructura que además de ayudar al mantenimiento de la integridad del tejido, regula la migración celular y constituye un reservorio de citoquinas y factores de crecimiento. Sin embargo, la MEC está sometida a una remodelación continua, un proceso que implica la degradación de los componentes existentes y la síntesis y deposi-

ción de nuevas proteínas (Stetler-Stevenson, 1996; Waller y Nicholson, 2001). Es probable que los procesos fibróticos sean debidos a un déficit en la degradación de la MEC, aunque se ha demostrado que la acumulación anormal de MEC está precedida por un aumento en la expresión de enzimas encargadas de degradar esta matriz ya que probablemente sea necesario un incremento en la actividad proteolítica para reemplazar los componentes de la MEC normal por moléculas que aparecen en situaciones patológicas (Stetler-Stevenson, 1996).

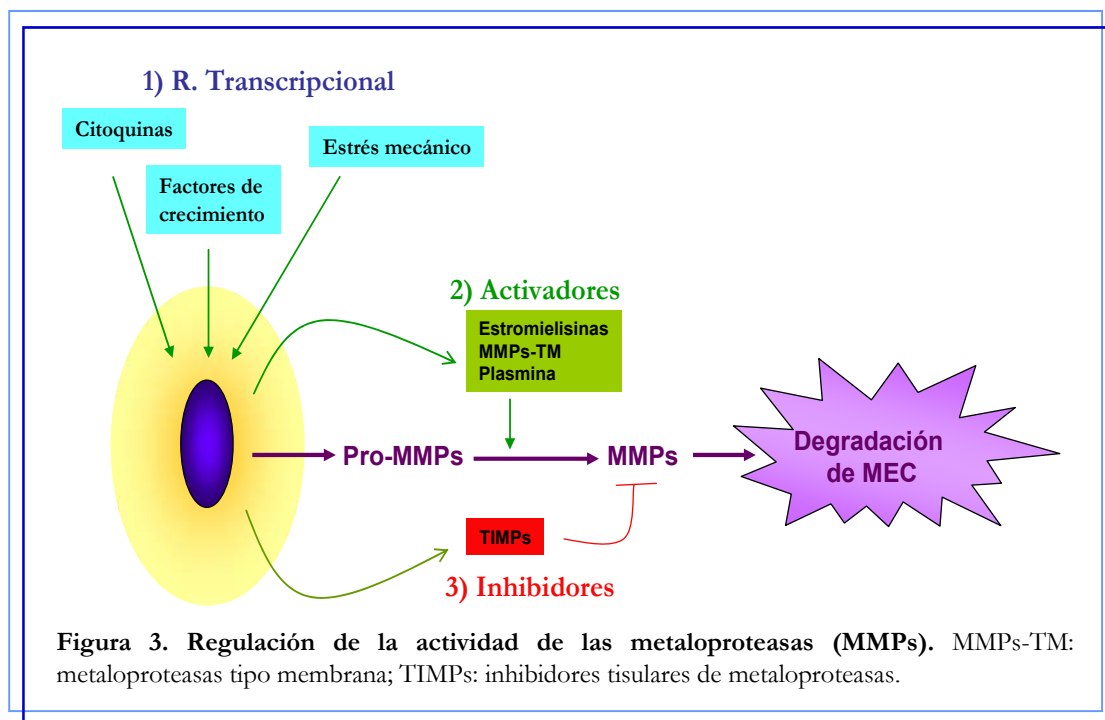
La degradación de la MEC está mediada por proteasas específicas que son secretadas localmente por las células. Estas proteasas pertenecen fundamentalmente a dos familias: metaloproteasas de la matriz (MMPs) y plasminógeno/plasmina (Ye y cols., 1998).

### A. Metaloproteasas de la matriz (MMPs)

Las MMPs pertenecen a una familia de metaloendopeptidasas que necesitan unirse a iones cinc ( $Zn^{2+}$ ) o calcio ( $Ca^{2+}$ ) para poder actuar. Se han identificado más de 20 miembros diferentes y todos presentan especificidad de sustrato. En base a esto podemos dividirlos en 5 subgrupos: colagenasas, gelatinasas, estromielisinas, elastasas y metaloproteasas tipo membrana (MMPs-TM). Estas últimas permanecen unidas a la membrana celular y además de degradar proteínas de la MEC, son capaces de activar a otras MMPs (Nagase y Woessner, 1999).

La actividad de las MMPs está estrictamente controlada ya que influyen de manera importante en la integridad del tejido. Este control se produce a tres niveles (figura 3):

1. **Transcripcional:** las MMPs tienen una baja expresión constitutiva en la mayoría de los tejidos. Numerosas citocinas y factores de crecimiento como interleucina 1 (IL-1), TGF- $\beta$  y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF, *platelet derived growth factor*) pueden inducir su expresión (Katsura y cols., 1989; Marti y cols., 1994; Martin y cols., 1994; Matrisian, 1990).
2. **Activación extracelular:** a excepción de las MMPs-TM, todas las demás MMPs son secretadas en forma inactiva. Su activación requiere la liberación proteolítica de un péptido por la acción de una proteasa plasmática y un cambio conformacional de un motivo Cys- $Zn^{2+}$  (Nagase, 1997). Existen varias enzimas proteolíticas encargadas de la activación de las MMPs, como el activador del plasminógeno tipo urocinasa (u-PA, *urokinase-type plasminogen activator*), la plasmina y la catepsina G (Carmeliet y cols., 1997). Una vez activadas, las MMPs son capaces de activar otras MMPs (Crabbe y cols., 1994).



3. **Inhibición por inhibidores endógenos:** los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs, *Tissue Inhibitors of Metaloproteases*) son los inhibidores endógenos de la actividad de las MMPs más estudiados; se han descrito 4 TIMPs diferentes (Gomez y cols., 1997; Murphy y Willenbrock, 1995). Estos inhibidores son específicos de determinadas proteasas y se unen fuertemente a la enzima en forma latente o activada bloqueando su actividad (Imai y cols., 1996).

## B. Cascada plasminógeno/plasmina

La plasmina es una proteasa de serina sintetizada como un precursor que recibe el nombre de plasminógeno. El paso de plasminógeno a plasmina es estimulado por los activadores del plasminógeno: activador tisular del plasminógeno, t-PA (*tisular type plasminogen activator*), y u-PA. A su vez la actividad de estas dos enzimas, t-PA y u-PA, es inhibida por el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 y tipo 2 respectivamente (PAI-1 y 2). La plasmina degrada directamente la fibrina, los colágenos tipo IV y V, la fibronectina, la laminina y proteoglicanos (Roldan y cols., 1990), e indirectamente es capaz de activar ciertas MMPs (MMP-3, MMP-9, MMP12 y MMP-13) que degradan otros componentes de MEC (McLennan y cols., 1999; Sternlicht y Werb, 2001; Waller y Nicholson, 2001).

## PROLIFERACIÓN Y CICLO CELULAR

La proliferación es un proceso complejo, ordenado y muy regulado en el que se desarrollan una serie de acontecimientos que constituyen el ciclo celular, durante los cuales se produce la división de una célula en dos células hijas. Además, las células eucariotas pueden abandonar el ciclo celular y dejar de proliferar. Así, las células pueden estar en otros estados: fase de quiescencia (G0), senescencia, diferenciación o apoptosis.

La quiescencia es una etapa reversible en la que las células interrumpen el ciclo celular en la etapa G1 (Gap 1) y pueden regresar a ella de nuevo tras la estimulación con factores mitogénicos. En general, en esta etapa las células tienen un menor tamaño y un metabolismo más lento (Yusuf y Fruman, 2003).

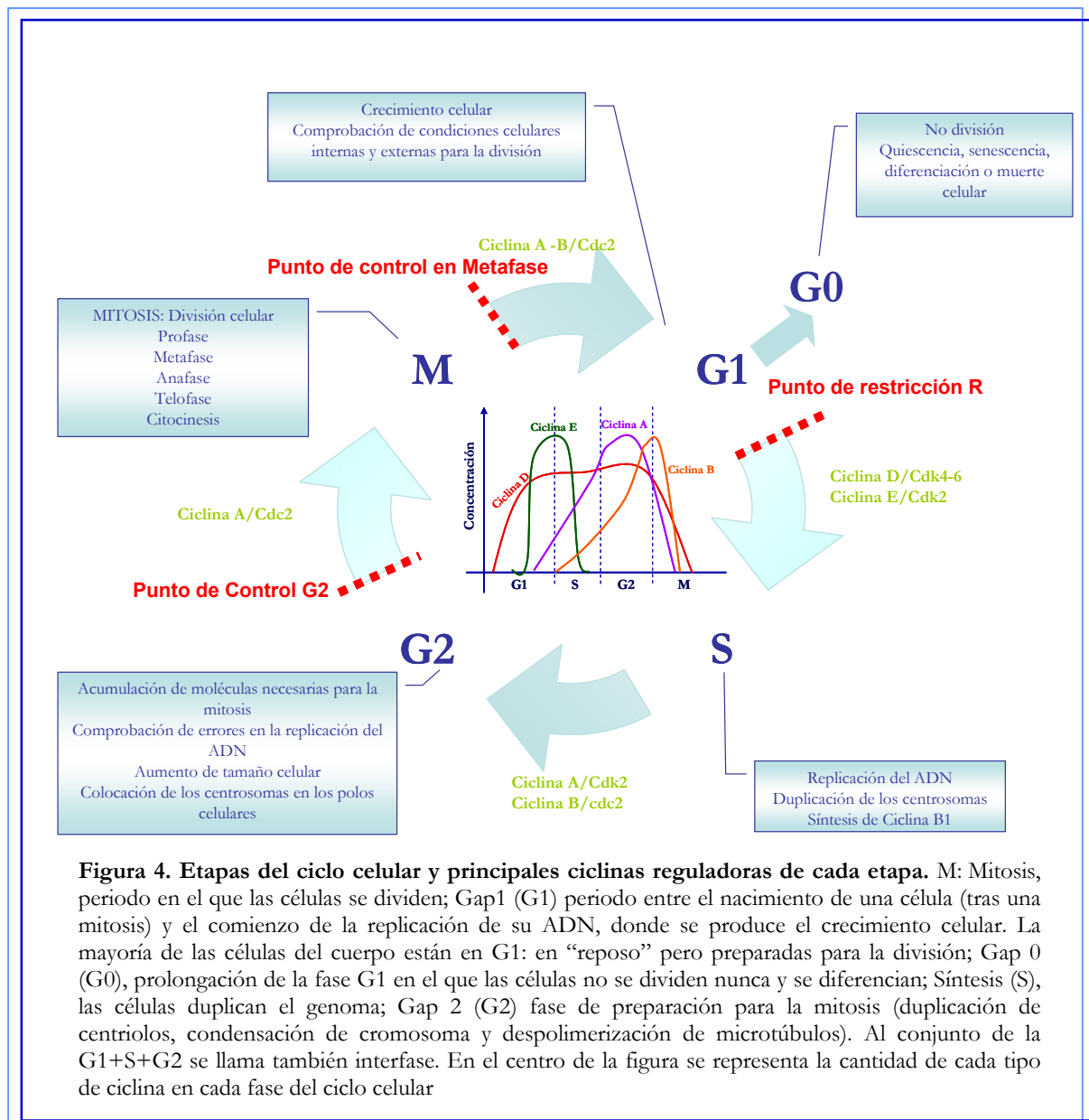
La senescencia es una etapa irreversible en la que las células interrumpen permanentemente el ciclo celular (Beausejour y cols., 2003). A diferencia de la quiescencia, las células en este estado son metabólicamente activas y tienen un tamaño mayor (Cristofalo y cols., 2004). Esta etapa está muy relacionada con la edad celular (Smith y Pereira-Smith, 1996).

La diferenciación también es un proceso casi siempre irreversible que permite a las células especializarse para realizar determinadas funciones.

Por último, la apoptosis es la muerte celular programada, en la que las células desencadenan un programa determinado que provoca su muerte.

### 1. Etapas del ciclo celular

El ciclo celular está dividido en cuatro fases fundamentales: fase G1 (o Gap 1), fase de síntesis (S), fase G2 (o Gap 2) y fase de mitosis (M), las cuales se detallan en la figura 4.



**Figura 4. Etapas del ciclo celular y principales ciclinas reguladoras de cada etapa.** M: Mitosis, periodo en el que las células se dividen; Gap1 (G1) periodo entre el nacimiento de una célula (tras una mitosis) y el comienzo de la replicación de su ADN, donde se produce el crecimiento celular. La mayoría de las células del cuerpo están en G1: en “reposo” pero preparadas para la división; Gap 0 (G0), prolongación de la fase G1 en la que las células no se dividen nunca y se diferencian; Síntesis (S), las células duplican el genoma; Gap 2 (G2) fase de preparación para la mitosis (duplicación de centriolos, condensación de cromosoma y despolimerización de microtúbulos). Al conjunto de la G1+S+G2 se llama también interfase. En el centro de la figura se representa la cantidad de cada tipo de ciclina en cada fase del ciclo celular

## 2. Proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular

El ciclo celular está regulado por un grupo de proteínas cinasa heterodiméricas, que contienen una subunidad reguladora (ciclina) y otra subunidad catalítica (Cdks, cinasas dependientes de ciclinas, *cyclin-dependent kinases*). Las concentraciones de las ciclinas varían según la fase del ciclo celular en la que se encuentre la célula y las Cdks carecen de actividad cinasa a no ser que estén unidas a una ciclina. Cada Cdk puede asociarse con diferentes ciclinas y es el complejo ciclina-Cdk el que determina que proteínas son fosforiladas y en que sitios, induciendo así la activación o la inhibición de proteínas participantes en la replicación del ADN y en la mitosis (Alberts, 2002).



Las **Cdks** son enzimas de la clase serina-treonina cinasas que necesitan estar unidas a las ciclinas y además ser activadas por fosforilación para poder realizar su función (Bird y cols., 2003; Blomen y Boonstra, 2007). Se han encontrado 9 diferentes en eucariotas (Johnson y Walker, 1999). Una vez activadas son las responsables de fosforilar numerosos sustratos, entre ellos los represores del ciclo celular.

Las **ciclinas** son moléculas que se sintetizan de forma periódica durante el ciclo celular; se han encontrado hasta 16 ciclinas diferentes en las células eucariotas (Johnson y Walker, 1999) siendo las más importantes para el avance del ciclo celular las ciclinas A, B, D y E. Las ciclinas D y E son importantes para el avance de la fase G1, la ciclina A es crucial en la fase S y las ciclinas B y A son muy importantes en la fase G2 y M (Boonstra, 2003).

Otras proteínas importantes en la regulación del ciclo celular son las **proteínas “pocket”** que incluyen la proteína del retinoblastoma (Rb), p107 y p130. Actúan como supresores de tumores. Cuando están hipofosforiladas están activas y reprimen la progresión del ciclo celular mediante la unión a los factores de transcripción E2F necesarios para la entrada en la fase S (Cobrinik, 2005).

Además existen otros reguladores negativos del ciclo celular que son los **inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas** (CKIs: *cyclin kinase inhibitors*), que inhiben la actividad de los complejos Cdk/ciclina y la hiperfosforilación de Rb y por tanto la progresión de la fase G1. Hay dos familias: INK4 y CIP/KIP (Nakayama y Nakayama, 1998; Sherr y Roberts, 1999). Las proteínas INK4 se unen solamente a las subunidades catalíticas de la Cdk4 y 6, previniendo la transición desde G1 a S (Jeffrey y cols., 2000), mientras que la familia de proteínas CIP/KIP son capaces de unirse a un amplio rango de proteínas entre los que se encuentran los complejos de ciclinas D, E, A y B/Cdks (Sherr y Roberts, 1999).

Por último, otra proteína importante en la parada del ciclo celular es la **proteína p53**. p53 está presente en niveles basales en las células en proliferación y tiene una vida media corta debido a su ubiquitinación. Bajo determinados estímulos como el daño en el ADN, cambios de pH, shock térmico o la activación de oncogenes, se estabiliza y activa el CKI p21CIP produciendo una parada del ciclo celular (Stewart y Pietenpol, 2001; Finlan y Hupp, 2005; Giono y Manfredi, 2006).

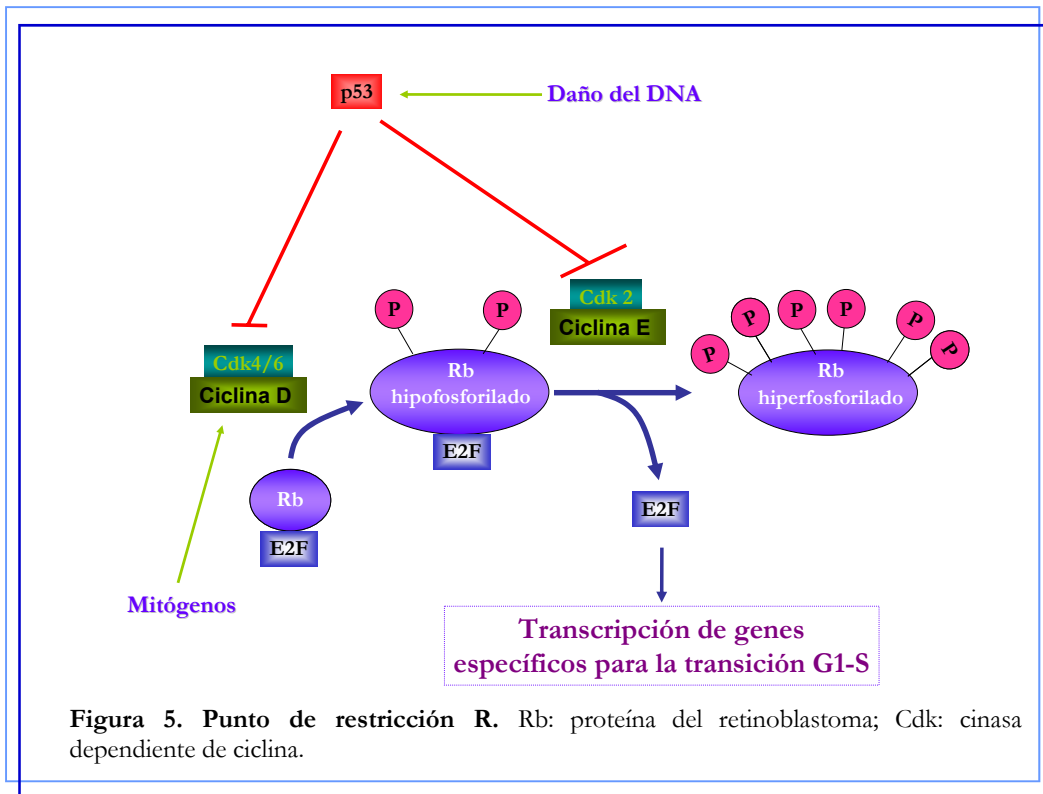
### 3. Regulación del ciclo celular

La regulación del ciclo celular es un proceso muy complejo y variable según el tipo celular y el entorno en el que se encuentre la célula. Está determinada por numerosas señales extracelulares que dirigen a la célula a proliferar o diferenciarse. El principal punto de regulación está en la etapa G1, se conoce con el nombre de punto de restricción (R) y una vez superado las células entran irreversiblemente en la fase S (Zetterberg y cols., 1995). Además existen otros dos puntos de regulación del ciclo celular, uno al final de la fase G2 y otro durante la fase de mitosis en la etapa de la metafase.

**Punto de restricción R:** Situado en la fase G1. La célula comprueba que ha generado la masa necesaria para seguir adelante y comenzar la síntesis de ADN y, también, que las condiciones ambientales, como la temperatura y la presencia de nutrientes, sales y de factores de crecimiento son favorables. Los elementos centrales de este punto de restricción son los complejos Cdk-ciclina, la molécula Rb y el factor E2F (figura 5). La expresión de la ciclina D1 aumenta tras la estimulación con mitógenos, se asocia con Cdk 4 o 6 dependiendo del tipo celular, y este complejo fosforila la proteína Rb. A continuación, en la fase G1 tardía, se induce la expresión de ciclina E, la cual se une a la proteína Cdk 2 y ambas fosforilan a la proteína Rb. Cuando la proteína Rb es hiperfosforilada, se desactiva y libera los factores de transcripción a los que está unida, entre los que se encuentra la familia de E2F, facilitando la transcripción de los genes de la fase G1 tardía y de la fase S (Shafer, 1998) implicados en la replicación del ADN, así como en la duplicación del centrosoma (en células animales).

Otro gen importante en la regulación de este punto de restricción es el de la proteína p53. Así, ante la presencia de un daño en el ADN, p53 se acumula induciendo la expresión de p21 CIP/WAF1, lo que conlleva el bloqueo de este punto de control R a través de la inhibición de los complejos ciclina D-Cdk 4/6 y los complejos con Cdk2. Una vez reparado el daño, p53 reinicia el ciclo mediante la sobreexpresión de la proteína Mdm2. Si el daño no es reparado, p53 induce la muerte celular aumentando entre otros la expresión del gen proapoptótico Bax (Sebastian y Johnson, 2006).

**Punto de restricción G2-M:** ocurre al final de la fase G2. En él, la célula debe comprobar antes de dividirse que ha duplicado la masa de modo que puede dar lugar a dos células hijas, y que ha completado la replicación del ADN sin errores, y sólo lo ha hecho una vez. Durante las fases G2 y M se produce un incremento en los niveles de la ciclina B y una acumulación progresiva del complejo ciclina B-Cdk1 cuando la célula se aproxima a la mitosis. En el momento en el



que la célula alcanza el final de la fase G2 hay un stock del complejo ciclina B/Cdk que está reprimido por la presencia de dos grupos fosfato que bloquean el sitio activo de la cinasa. En la fase G2 tardía se produce la activación de la fosfatasa Cdc25 que defosforila el complejo ciclina B/Cdk1 y lo activa iniciando la mitosis (Nilsson y Hoffmann, 2000; Dunphy, 1994). Si el ADN no está replicado o si la replicación no ha terminado la célula activa una proteína cinasa que inhibe a la proteína Cdc25, evitando la defosforilación del complejo ciclina B/Cdk e inactivándolo hasta que la replicación del ADN esté completada (Elledge y cols., 1996). Otra forma de detener el ciclo en este punto es mediante la actuación de inhibidores de Cdk1 (Gray y cols., 1999).

**Punto de restricción M:** ocurre en mitosis al final de la metafase, y sólo permite continuar con la división celular si todos los cromosomas están alineados sobre el huso mitótico (Boonstra, 2007).

## FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE $\beta$

El factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ : *transforming growth factor  $\beta$* ) forma parte de una superfamilia de factores de crecimiento y diferenciación que se encuentran presentes en una gran variedad de organismos. Dentro de la superfamilia del TGF- $\beta$  se incluyen más de 30 proteínas de mamíferos (tabla 2), siendo los componentes de la familia del TGF- $\beta$  los miembros prototipo.

El TGF- $\beta$  fue caracterizado por primera vez en 1983 en un extracto de placenta humana (Frolik y cols., 1983). Hasta ahora se han identificado 3 isoformas diferentes en mamíferos, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3, aunque el TGF- $\beta$ 1 es la isoforma más abundante y la más relacionada con los procesos fibróticos (Roberts y Sporn, 1993). La principal diferencia entre ellas es la regulación de la expresión y la especificidad de los tejidos donde se expresan; así, el TGF- $\beta$ 1 se expresa en células endoteliales, hematopoyéticas y el tejido conectivo, el TGF- $\beta$ 2 en células epiteliales y neuronales y el TGF- $\beta$ 3 en células mesenquimales (Yu y cols., 2003).

El TGF- $\beta$  está implicado en la regulación de numerosas funciones celulares y fisiológicas entre las que se encuentran los procesos de diferenciación celular y apoptosis (Alliston y cols.,

Subfamilia	Componentes
BMP2	BMP2, BMP4
BMP5	BMP5, BMP6/Vrgl, BMP7/OP1, BMP8/OP2
GDF5	GDF5/CDMP1, GDF6/CDMP2, GDF7
BMP3	BMP3/osteogenina, GDF10
Miembros intermedios	Nodal, dorsalina, GDF8, GDF9
Activina	Activina bA, activina bB, activina bC, activina bE
TGF- $\beta$	TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3
Miembros distantes	MIS/AMH, inhibina a, GDNF

**Tabla 2. Familia del TGF- $\beta$ .**

Todos los miembros de la tabla han sido identificados en humanos y/o en ratón. BMP: *bone morphogenetic protein*, proteína morfogénica ósea. CDMP: *cartilage-derived morphogenetic protein*, proteína morfogénica derivada del cartilago. GDF: *growth and differentiation factor*, factor de crecimiento y diferenciación. GDNF: *glial cell-derived neurotrophic factor*, factor neurotrófico derivado de células gliales. MIS/AMH: *Müllerian inhibiting substance/anti-Müllerian hormone*, sustancia inhibidora de Müller / hormona anti-Mülleriana. OP: *osteogenic protein*, proteína osteogénica. Adaptado de Massagué, 1998.

2001; Brown y cols., 2000; Massague y cols., 2000), la síntesis de MEC y la expresión de moléculas de adhesión (Dokic y Dettman, 2006; Zhang y cols., 1998).

## 1. Síntesis del TGF- $\beta$ 1

El TGF- $\beta$ 1 es secretado como un complejo latente, constituido por un homodímero de 25 kDa, unido al péptido asociado de latencia (LAP, *Latency Associated Peptide*) de forma no covalente. Esta asociación recibe el nombre de “complejo latente pequeño” (Miyazono y cols., 1993). El péptido LAP es requerido para una secreción eficiente del TGF- $\beta$ 1, lo previene de su unión a los receptores de membrana y mantiene su disponibilidad como un reservorio en la MEC. En ocasiones, el complejo latente pequeño se une a la proteína de unión al TGF- $\beta$  latente (LTBP, *Latency TGF- $\beta$  Binding Protein*) mediante un puente disulfuro y al complejo resultante se le conoce como “complejo latente largo”. El LTBP se une de forma covalente a la MEC proporcionando un importante reservorio de TGF- $\beta$ 1 inactivo. En la liberación del TGF- $\beta$ 1 van a intervenir numerosos factores relacionados con el entorno de la célula como son el pH, estrés, temperatura y las enzimas proteolíticas (Munger y cols., 1997). La liberación del TGF- $\beta$ 1 es un fenómeno muy importante ya que la desregulación de este paso puede generar grandes cantidades de TGF- $\beta$ 1 activo en puntos muy concretos (Koli y cols., 2001).

## 2. Receptores de TGF- $\beta$

En la señalización celular del TGF- $\beta$  intervienen varios tipos de receptores, divididos en dos grupos: receptores señalizantes, encargados de transmitir las señales y comenzar la cascada de señalización intracelular, y no señalizantes, que modulan la respuesta del ligando que se une a los receptores señalizantes.

### A. Receptores señalizantes

Una vez liberado, el TGF- $\beta$  activo ejerce su efecto biológico a través de una familia de receptores serina-treonina cinasas clasificados como receptores tipo I y tipo II. En mamíferos se han identificado siete tipos de receptores tipo I (Alk-1-7) y cuatro tipos de receptores tipo II (T $\beta$ R-II, ActRII, ActRIIB, BMPRII) (Derynck y Zhang, 2003). Cada ligando perteneciente a la superfamilia del TGF- $\beta$  se une a un tipo específico de ambos receptores; en el caso del TGF- $\beta$  los receptores más abundantes son T $\beta$ R-I (ó Alk-5) y T $\beta$ R-II (Derynck y Feng, 1997). La vía de señalización se inicia con la unión del ligando al receptor tipo II, que está constitutivamente acti-

vo; esta unión recluta al receptor tipo I dando lugar a la formación de un complejo de receptores heteromérico. El receptor tipo II fosforila al receptor tipo I en una región rica en residuos serina-treonina que se encuentra en un dominio yuxtamembrana altamente conservado conocido como “dominio GS” (Wieser y cols., 1995; Wrana y cols., 1994). A continuación se combinan dos complejos de receptores heteroméricos formando un tetrámero, que es el encargado de activar las proteínas que van a transmitir la señal hasta el núcleo (Massague, 2000).

En los procesos fibróticos se ha observado un aumento en la expresión de los receptores señalizantes de TGF- $\beta$  (Ihn y cols., 2001; Kawakami y cols., 1998; Kubo y cols., 2001; Roulot y cols., 1999). La sobreexpresión de los receptores de TGF- $\beta$  en fibroblastos induce un aumento en la transcripción del gen de colágeno (Kawakami y cols., 1998). Por otra parte, se ha comprobado que la sobreexpresión de un dominante negativo del receptor tipo II de TGF- $\beta$  mejora la fibrosis hepática (Qi y cols., 1999).

## **B. Receptores no señalizantes: betaglicano y endoglina**

Además de los receptores tipo I y tipo II el sistema de receptores de TGF- $\beta$  incluye los receptores no señalizantes betaglicano (conocido también como receptor tipo III) y endoglina. Ambos receptores presentan una estructura similar con un 63% de homología en las regiones transmembrana y citoplasmática (Letamendia y cols., 1998b; Miyazono, 1997).

El **betaglicano** es un proteoglicano con un peso molecular de entre 200 y 300 kDa que se encuentra en la membrana celular en forma de homodímero unido de manera no covalente. Une las 3 isoformas de TGF- $\beta$ , aunque tiene una mayor afinidad por el TGF- $\beta$ 2. En muchos tipos celulares se ha comprobado que este receptor potencia los efectos del TGF- $\beta$ , por lo que se ha sugerido la posibilidad de que actúe presentando el ligando a los receptores señalizantes (Derynck y Feng, 1997). Además se ha demostrado que las células que expresan los receptores señalizantes de TGF- $\beta$  pero no expresan el betaglicano tienen una respuesta más pobre a TGF- $\beta$ 2 (Massague y Chen, 2000).

La **endoglina** o CD105 es una glicoproteína homodimérica de membrana identificada en el endotelio vascular humano con un peso molecular de 180 kDa compuesta por dos subunidades unidas por puentes disulfuro (Gougos y Letarte, 1988). Une con alta afinidad las isoformas TGF- $\beta$ 1 y 3 en presencia de los receptores señalizantes tipo I y II (Barbara y cols., 1999; Letamendia y cols., 1998a). Se ha descrito que la endoglina interacciona con otros componentes de la

superfamilia de TGF- $\beta$  como activina-A, BMP-7 y BMP-2 (Cheifetz y cols., 1992; Yamashita y cols., 1994; Zhang y cols., 1996). Existen dos isoformas de la endoglina generadas por un splicing alternativo, la L-endoglina y otra isoforma con un dominio citoplasmático más corto, denominada S-endoglina (Bellon y cols., 1993; Gougos y Letarte, 1990). El dominio citoplásmico de ambas isoformas está constitutivamente fosforilado, lo que sugiere un posible papel en la señalización celular o una asociación con otras proteínas del citoplasma (Lastres y cols., 1994). Además, se ha identificado una forma soluble de la endoglina procedente de alelos mutados del gen (Venkatesha y cols., 2006) y que podría secuestrar al TGF- $\beta$  y a otros ligandos evitando su unión a moléculas de endoglina ancladas a la membrana (Lopez-Novoa, 2007; Luft, 2006).

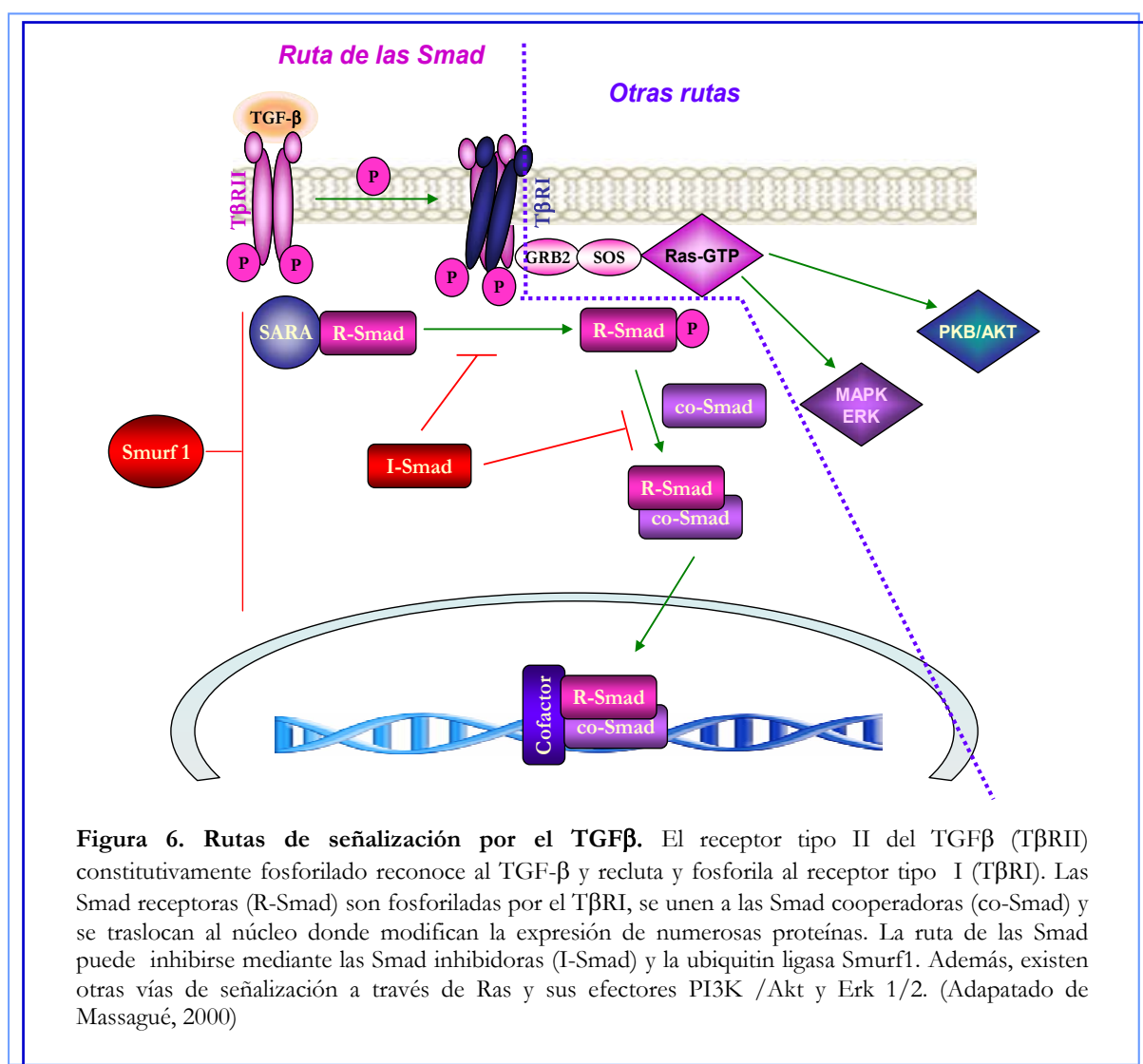
### 3. Rutas de señalización

La principal vía de señalización es la constituida por las proteínas Smad (*Small mothers against decapentaplegic*) (Attisano y Wrana, 1998; Christian y Nakayama, 1999; Derynck y cols., 1998; Heldin y cols., 1997; Massague, 1998; Whitman, 1998). Una vez activado el sistema de receptores de TGF- $\beta$  por la unión del ligando, las proteínas SARA (*Smad/receptor anchor protein*) ponen en contacto a las R-Smad (*Receptor-activated Smad*) con el receptor tipo I. El receptor tipo I fosforila a las R-Smad, las libera de la proteína SARA y permite su unión a la co-Smad (*common-mediator Smad*) produciéndose la traslocación del complejo al núcleo (Wrana y Attisano, 2000; Xu y cols., 2000) donde es capaz de modular la expresión de determinados genes de dos formas, bien mediante unión directa de las proteínas Smad al ADN (Chen y cols., 1996; Zhang y cols., 1998) o mediante la unión a co-activadores (Massague y Wotton, 2000) y co-represores (Wotton y cols., 1999) que regulan a su vez la transcripción de otros genes (figura 6).

Además de las R-Smad y de las co-Smad existen un grupo de Smad que inhiben las respuestas de TGF- $\beta$ , denominadas Smad inhibitoras o I-Smad (Imamura y cols., 1997). Las I-Smad pueden competir con las R-Smad por el receptor tipo I activado (Imamura y cols., 1997) o bien competir por las co-Smad evitando la formación del complejo (Hata y cols., 1998). Otra forma de inhibir la señalización del TGF- $\beta$  es mediante la ubiquitin ligasa Smurf-1 que interactúa con las Smad, las inactiva por ubiquitinización y regula así su abundancia en el citoplasma de células que no son estimuladas (Zhu y Burgess, 2001).

Aparte de la señalización a través de las proteínas Smad, el TGF- $\beta$  puede señalizar por otras vías entre las que se encuentra la ruta de la GTPasa Ras mediante la fosforilación de los receptores tirosina cinasa (RTK: *receptor tyrosine-kinase*). El tratamiento con TGF- $\beta$  induce la acti-

vación rápida de la proteína Ras en células epiteliales de pulmón e intestino (Mulder y Morris, 1992; Yue y Mulder, 2000), y también activa la vía de Erk1/2 en células epiteliales (Hartsough y Mulder, 1997) y en otros tipos celulares (Bellis y cols., 1999; Han y Holtzman, 2000; Hu y cols., 1999; Mucsi y cols., 1996). El TGF- $\beta$ 1 potencia los efectos mitogénicos de Ras (Kretzschmar y cols., 1999; Park y cols., 2000) y Ras puede contrarrestar la señalización por TGF- $\beta$ , alterando la expresión del receptor tipo II de TGF- $\beta$ 1 (Alcock y cols., 2002). Por otro lado, la activación de la vía de Ras/Erk inducida por TGF- $\beta$ 3 puede inducir una mayor expresión de TGF- $\beta$ 1 (Yue y Mulder, 2000).

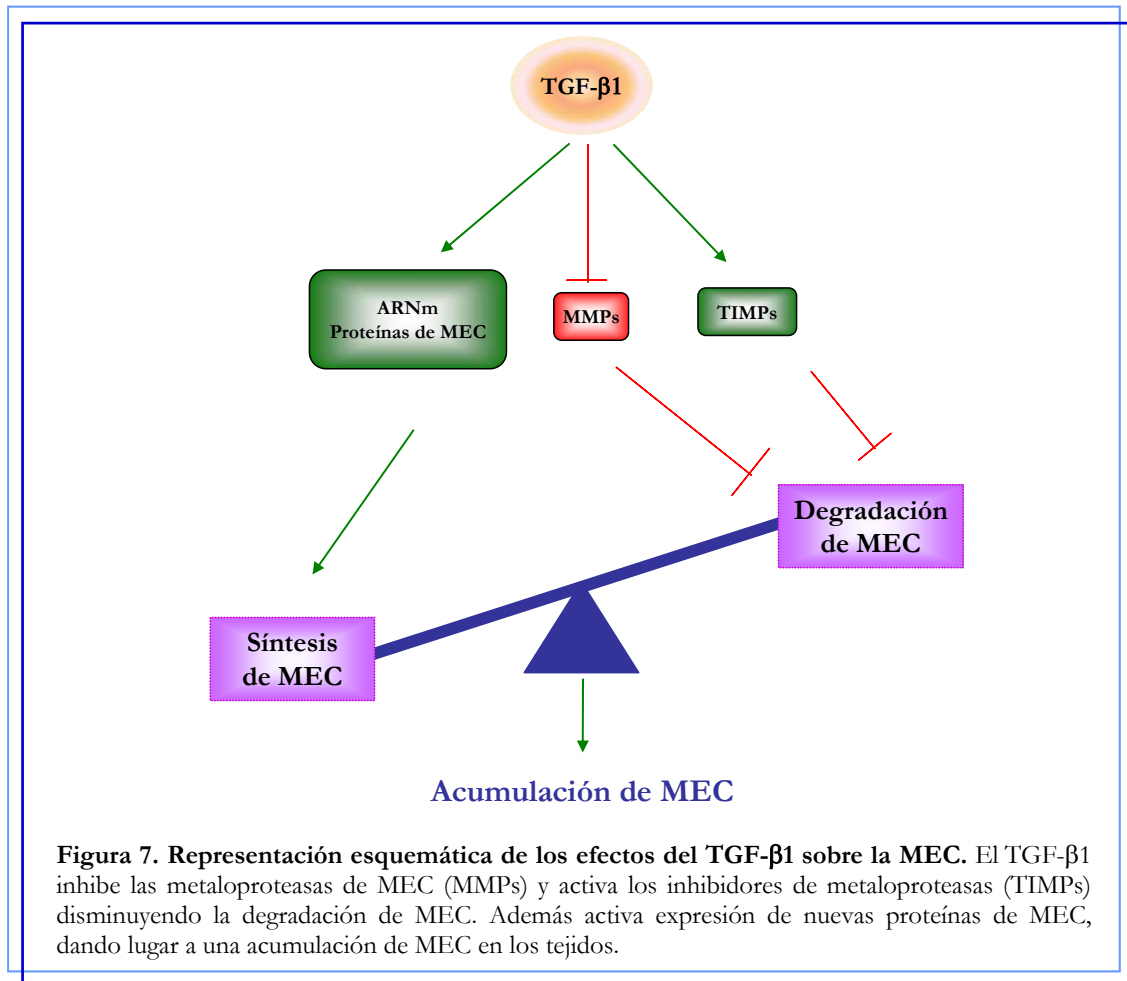


#### 4. Efectos del TGF- $\beta$ 1 sobre la MEC

El TGF- $\beta$ 1 induce un aumento en la transcripción, síntesis y secreción de proteínas de MEC incluidas colágeno I, colágeno III, colágeno IV, fibronectina, laminina, y también glicoproteínas como osteopontina, osteonectina, tenascina, biglicano y decorina (Eikmans y cols.,



2003). Por otro lado, el TGF- $\beta$  disminuye la degradación de la matriz a través de dos mecanismos: inhibiendo la MMPs y estimulando la síntesis de TIMPs. El TGF- $\beta$  también actúa sobre el sistema plasminógeno/plasmina estimulando la expresión de PAI, lo que se traduce en la inhibición del paso de plasminógeno a plasmina (figura 7). Además el TGF- $\beta$  incrementa la transcripción y la expresión en la membrana de receptores de adhesión celular como las integrinas que regulan el ensamblaje de proteínas de MEC (Border y cols., 1992; Roberts y cols., 1992).



## 5. Efectos del TGF- $\beta$ 1 sobre la proliferación celular

El TGF- $\beta$  tiene un efecto dual sobre la proliferación celular. Por un lado, se le atribuye un papel como supresor de tumores, ya que es capaz de inhibir la proliferación en numerosos tipos celulares (Alexandrow y Moses, 1997; Hanahan y Weinberg, 2000; Markowitz y Roberts, 1996). Por otro lado, el TGF- $\beta$  estimula la proliferación en fibroblastos (Cunliffe y cols., 1996; Kay y cols., 1998; Martinez-Salgado y cols., 2006) y puede inducir una transdiferenciación de células epiteliales de mama y piel en células de tipo fibroblasto con un fenotipo altamente invasivo y metastásico (Miettinen y cols., 1994; Piek y cols., 1999; Portella y cols., 1998).

## LAS PROTEÍNAS RAS

Las proteínas Ras pertenecen a una superfamilia de pequeñas proteínas G monoméricas con actividad GTPasa intrínseca que se activan en respuesta a numerosos estímulos extracelulares, con una masa molecular entre 20 y 40 kDa, y que se unen al GTP (guanosina trifosfato). Son más de 150 miembros muy conservados a lo largo de la evolución de todos los organismos eucariotas, incluyendo levaduras de fusión (*Saccharomyces cerevisiae*) y fisión (*Schizosaccharomyces pombe*), insectos (*Drosophila melanogaster*), nemátodos (*Caenorhabditis elegans*) y el hombre. Este alto grado de conservación sugiere que desempeñan papeles esenciales en la célula (Colicelli, 2004; Lowy y Willumsen, 1993; Wennerberg y cols., 2005; Macara y cols., 1996; Santos y Nebreda, 1989).

La clasificación de las proteínas Ras es muy controvertida. Algunos autores, como Colicelli (2004) clasifican a la superfamilia Ras en 5 subfamilias: Ras, Rho, Rab, Arf y las subunidades G $\alpha$  de las proteínas G heterotriméricas. Por otro lado, Der y cols. no incluyen a la subunidad G $\alpha$  en la superfamilia y asignan a las proteínas Ran una subfamilia diferente de Ras (Wennerberg y cols., 2005). Dentro de la subfamilia de Ras también existen dificultades para encontrar unanimidad en su clasificación. En general, la subfamilia Ras se caracteriza por tener una gran similitud en el dominio efector o región switch 1. Está formada por las proteínas Ras clásicas o familia p21 (H-Ras, K-Ras4A, K-Ras4B, y N-Ras), cuatro proteínas Rap (Rap1A, Rap1B, Rap2A y Rap2B), tres proteínas similares a R-Ras (R-Ras, TC21, R-Ras23), dos proteínas Ral (RalA y RalB) y otras dos proteínas identificadas: Rheb y M-Ras (Bos, 1997; Kimmelman y cols., 1997; Matsumoto y cols., 1997). Como podemos ver, la clasificación de la superfamilia Ras basada en su homología y su función tiene muchas discrepancias y posiblemente será modificada en el futuro.

En este estudio nos hemos centrado en la familia p21 o proteínas Ras clásicas.

### 1. Los genes *ras*

Los genes *ras* se identificaron por primera vez en los años 60 como oncogenes en el genoma de la cepa Harvey y Kirsten del virus del sarcoma de rata (Ras: *RAt Sarcoma*) (Harvey, 1964; Kirsten y Mayer, 1967). Por otro lado, en 1981, Robert Weinberg, Michael Wigler y Geoffrey Cooper descubrieron pequeños fragmentos de ADN en células cancerosas humanas que podían

transformar fibroblastos normales de ratón en células malignas (Lane y cols., 1981; Perucho y cols., 1981; Shih y cols., 1981). Un año después, Barbacid y cols. establecieron que el elemento transformador era un homólogo de H-*ras*, el oncogen encontrado en el retrovirus causante del sarcoma de Harvey en ratas (Santos y cols., 1982).

Los genes que codifican a los distintos miembros de la familia de proteínas Ras están muy conservados evolutivamente, lo que sugiere que los productos de estos genes juegan un papel muy importante en los procesos celulares. En las células de mamíferos hay tres genes: H-*ras*, K-*ras* y N-*ras*, cuya estructura y función es muy parecida. En humanos los loci H-*ras*, N-*ras* y K-*ras* se localizan en el brazo corto de los cromosomas 11 (11p15.1-p15.5), 1 (1p22-p32) y 12 (12p12.1-pter) respectivamente. En ratón los genes para H-*ras*, N-*ras* y K-*ras* se localizan en los cromosomas 7 (7 F5; 7 72mC), 3 (3 F2.2; 3 48.5 cM) y 6 (6 G2; 6 71.2 cM) respectivamente.

Los 3 genes *ras* están compuestos por cinco exones codificantes y un exón 5' no codificante (exón  $\Phi$ ), y difieren en el tamaño y la secuencia de los intrones. Los genes K-*ras* tienen dos ensamblajes alternativos en el cuarto exón codificante (4A y 4B) dando lugar a dos proteínas que divergen únicamente en los 25 aminoácidos del extremo carboxilo terminal (Barbacid, 1987; Lowy y Willumsen, 1993). Todos los genes *ras* poseen promotores con un alto contenido en nucleótidos GC y carecen del motivo TATA, lo cual es característico de genes que se expresan en todas las células del organismo y codifican para proteínas que son esenciales para el funcionamiento general de las células, también llamados genes housekeeping. Algunas regiones que controlan la expresión de los genes *ras* se encuentran en el extremo 5', en concreto en el primer intrón (Jeffers y Pellicer, 1994; Paciucci y Pellicer, 1991). Se han descrito otros elementos reguladores en el extremo 3' de H-*ras* que podrían contribuir también a su expresión (Lowy y Willumsen, 1993).

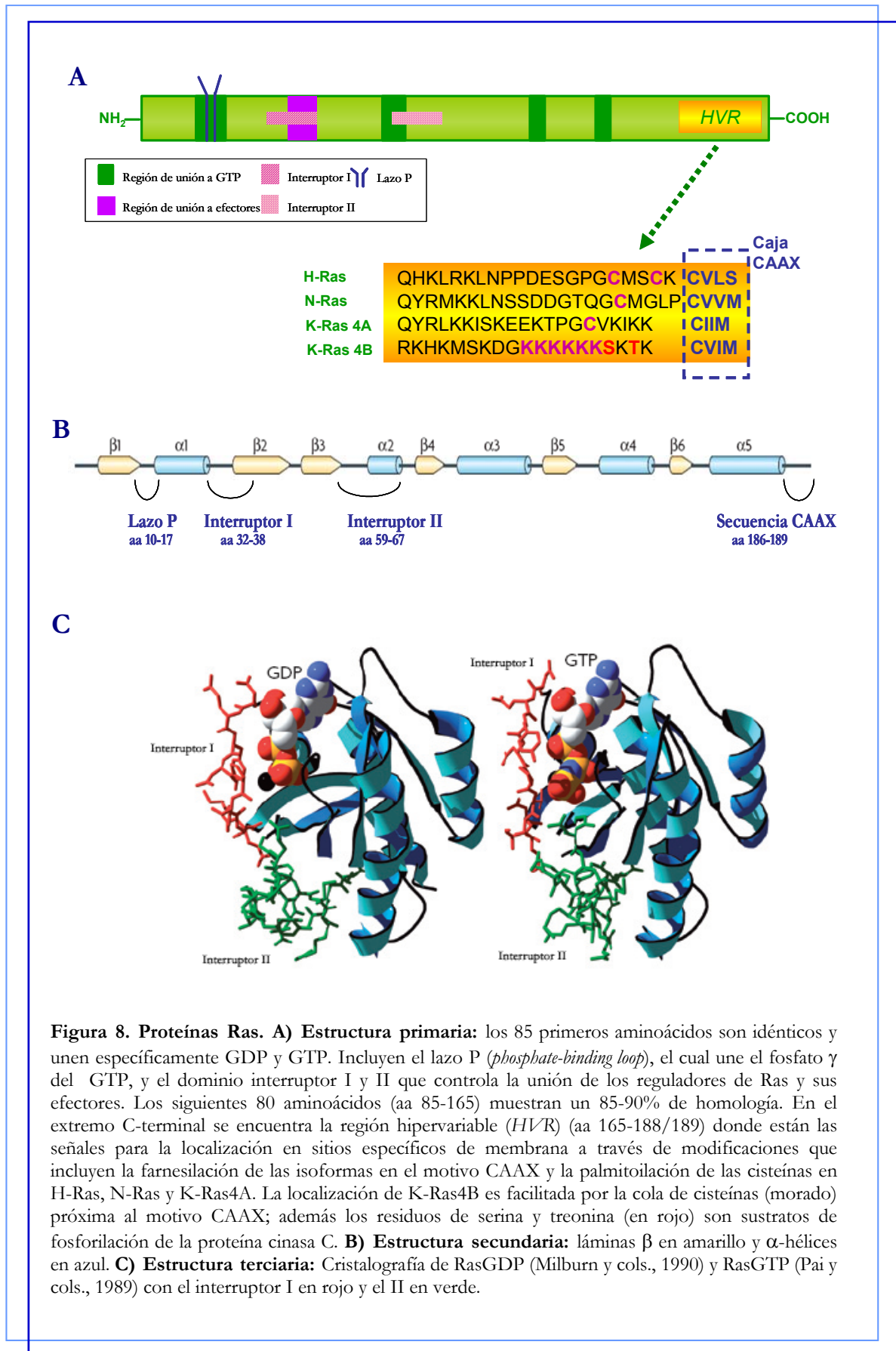
Los genes *ras* se expresan en todos los tipos celulares y órganos, aunque existen diferencias entre tejidos y durante el desarrollo pre- y postnatal. Durante el desarrollo embrionario del ratón, la expresión de N-*ras* es alta en el día 10 de gestación y la expresión de K-*ras* se reduce al final de la gestación (Muller y cols., 1983). Además, estudios en ratones KO muestran que la proteína K-Ras4B es esencial en el desarrollo embrionario, y su ausencia provoca la muerte del embrión entre los días 12 y 14 de gestación por fallos en el hígado y por anemia (Esteban y cols., 2001; Johnson y cols., 1997; Umanoff y cols., 1995).

## 2. Estructura proteica

Los genes *ras* codifican para proteínas de aproximadamente 21 kDa con 189 aminoácidos en el caso de H-Ras, K-Ras4A y N-Ras y de 188 aminoácidos en el caso de K-Ras4B. Las proteínas Ras son homólogas en sus primeros 164 aminoácidos: los 86 residuos N-terminales son idénticos, y los 78 residuos siguientes comparten un 79% de homología. Sin embargo, estas proteínas son completamente diferentes en los 25 residuos C-terminales con la única excepción de la cisteína 186 que da comienzo a la secuencia Cys-A-A-X-COOH, también llamada motivo CAAX (donde C es cisteína, A es un aminoácido alifático y X un aminoácido cualquiera), que está presente en todas las isoformas de Ras. A esta zona comprendida entre los aminoácidos 160 y 185 se la conoce con el nombre de región heterogénea o hipervariable (HVR) como puede observarse en la figura 8 (Santos y Nebreda, 1989). La estructura de la HVR no está muy bien caracterizada, aunque se cree que es muy flexible y está bastante conservada entre distintas especies, por lo que debe tener algún efecto funcional (Ellis y Clark, 2000). Las diferencias en la secuencia primaria de la HVR de las proteínas Ras determinan distintas modificaciones post-traduccionales y diferencias en el tráfico y la localización en la membrana plasmática y por tanto diferencias en su actividad biológica.

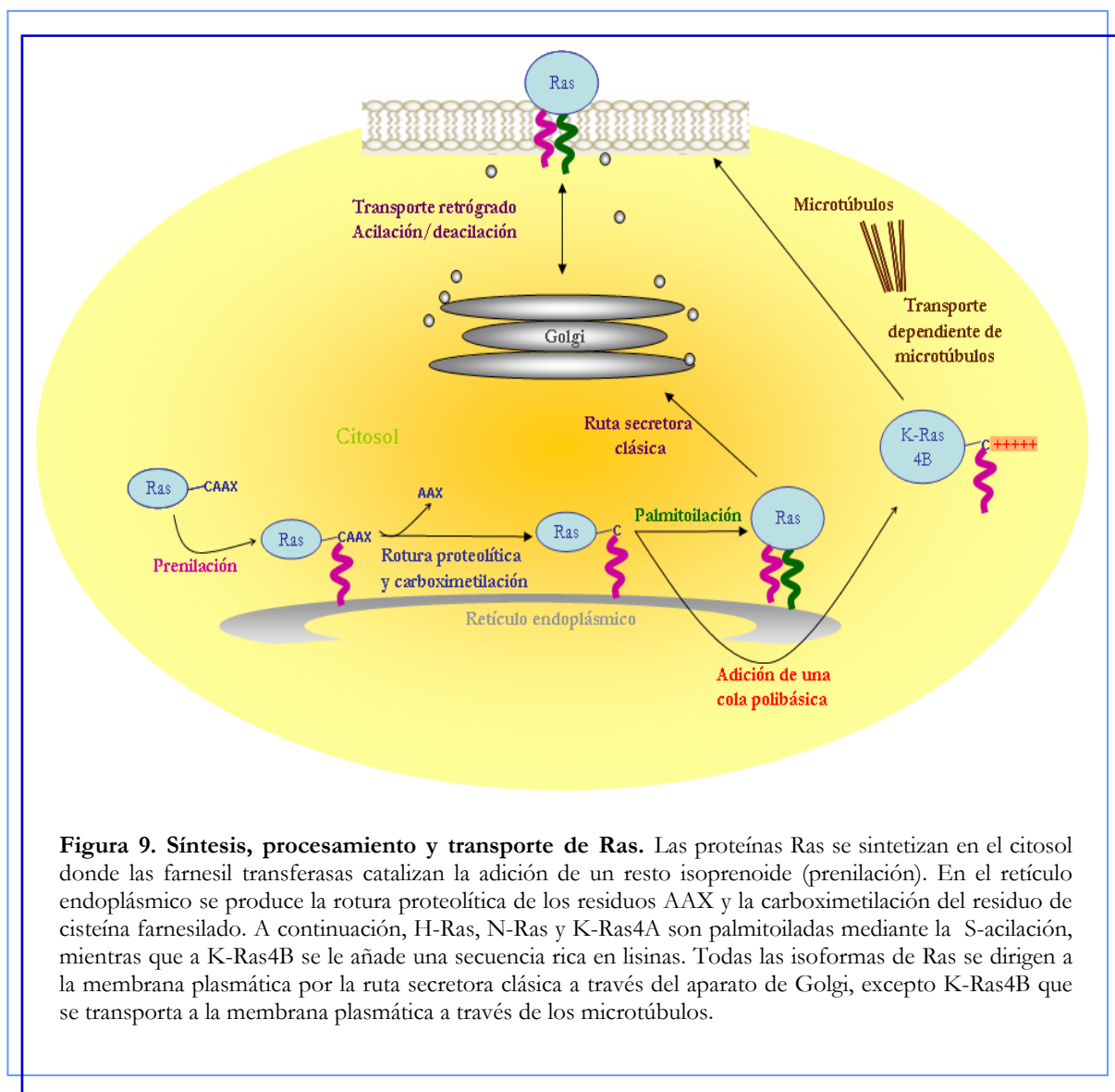
Estas proteínas están formadas por 6 laminas  $\beta$  encadenadas y cinco  $\alpha$ -hélices que están interconectadas por una serie de 10 lazos (Pai y cols., 1989; Schlichting y cols., 1990) (figura 8). Cinco de estos lazos conectores tienen un papel esencial para determinar la alta afinidad de Ras por los nucleótidos de guanina y para regular la hidrólisis de GTP. En concreto, el fosfato  $\gamma$  del GTP interacciona con residuos de los lazos 1, 2 y 4 (Lowy y Willumsen, 1993).

La proteína Ras tiene dos regiones importantes para su activación y para su función llamadas interruptores I y II o switch I y II (Wittinghofer y Pai, 1991; Ma y Karplus, 1997) (figura 8). Estas regiones contienen residuos hidrofílicos localizados en la cara externa de la molécula. El interruptor I es el principal sitio de unión del efector y también es el responsable, en parte, de la interacción con las proteínas activadoras de GTPasas (GAPs: *GTPase activating proteins*). El interruptor II se encarga, en parte, de la interacción con las proteínas intercambiadoras de nucleótidos de guanina (GEFs: *Guanine nucleotide exchange factors*). Estas dos regiones están cercanas al fosfato  $\gamma$  del GTP y exhiben distintas conformaciones según Ras esté unido a GTP o GDP (guanosina difosfato). De este modo, los cambios conformacionales de estas regiones durante el ciclo del GTP están implicados en la unión a las proteínas reguladoras y en la transmisión de la señal a los efectores de Ras (Malumbres y Pellicer, 1998).



### 3. Modificaciones post-traduccionales: prenilación y palmitoilación

Las proteínas Ras de mamíferos son sintetizadas en los ribosomas del citoplasma celular. Tienen una vida media de aproximadamente 24 horas (Ulsh y Shih, 1984) y para su completa actividad necesitan asociarse a la cara interna de la membrana plasmática como homodímeros o heterodímeros (Santos y cols., 1988). La ruta por la cual Ras se dirige a la membrana plasmática viene determinada por una serie de modificaciones post-traduccionales que además señalan su localización en ella, bien en islotes lipídicos (rafts o caveolas, regiones ricas en colesterol) o en zonas desorganizadas de la membrana (Hancock y Parton, 2005)(figura 9).



**Figura 9. Síntesis, procesamiento y transporte de Ras.** Las proteínas Ras se sintetizan en el citosol donde las farnesil transferasas catalizan la adición de un resto isoprenoide (prenilación). En el retículo endoplásmico se produce la rotura proteolítica de los residuos AAX y la carboximetilación del residuo de cisteína farnesilado. A continuación, H-Ras, N-Ras y K-Ras4A son palmitoiladas mediante la S-acilación, mientras que a K-Ras4B se le añade una secuencia rica en lisinas. Todas las isoformas de Ras se dirigen a la membrana plasmática por la ruta secretora clásica a través del aparato de Golgi, excepto K-Ras4B que se transporta a la membrana plasmática a través de los microtúbulos.

### **A. Prenilación**

El motivo CAAX sirve como sustrato de una serie de modificaciones post-traduccionales que crean un dominio lipídico hidrófobo que favorece la unión a la membrana. Estas modificaciones incluyen la unión de un resto isoprenoide no esteroideo (farnesil pirofosfato o geranilgeranilo pirofosfato) a la cisteína del motivo CAAX mediante prenilación (farnesilación o geranilgeranilación respectivamente) (Zhang y Casey, 1996). Cuando el dominio CAAX termina en cualquier aminoácido excepto leucina las proteínas Ras son farnesiladas mediante la catálisis de la farnesiltransferasa; la geranilgeranilación ocurre cuando la secuencia CAAX termina en leucina y es catalizada por la geraniltransferasa I (Reid y cols., 2004). Todas las isoformas de Ras pueden ser preniladas, pero la isoforma H-Ras sólo es farnesilada.

### **B. Rotura proteolítica**

Las proteínas Ras preniladas se dirigen al retículo endoplásmico donde se produce una rotura proteolítica de los residuos AAX catalizada por la enzima convertidora de Ras I y una carboxi-metilación del extremo C-terminal catalizada por la isoprenilcisteína carboximetiltransferasa (Casey, 1995). Estas modificaciones incrementan la hidrofobicidad, aunque son insuficientes para el anclaje funcional a la membrana (Hancock y cols., 1990).

### **C. Palmitoilación**

A continuación, H-Ras, N-Ras y K-Ras4A son palmitoiladas mediante la S-acilación en los residuos de cisteína presentes en la HVR (Hancock y cols., 1989; Hancock y cols., 1990). Recientemente se han encontrado dos enzimas asociadas al aparato de Golgi, ZDHHC9 y GCP16, con gran homología a las palmitoiltransferasas de *S. cerevisiae*, que pueden ser las responsables de la palmitoilación de Ras (Swarthout y cols., 2005). Sin embargo, considerando que la expresión de las proteínas Ras es ubicua y que, por el contrario, estas enzimas tienen unos patrones de expresión muy limitados, es posible que existan otras enzimas que posean actividad palmitoiltransferasa para Ras.

### **D. Adición de una cola polibásica**

En el caso de K-Ras4B no es necesaria la palmitoilación ya que se une a la membrana mediante una cola polibásica rica en lisina localizada en la región HVR (Chen y cols., 2000; James y cols., 1995).

#### 4. Transporte y localización en la membrana

Las diferencias post-traduccionales que existen entre las distintas isoformas de Ras, marcan también diferencias en el transporte y la localización de estas proteínas en la membrana plasmática. El mecanismo a través del cual llegan a la membrana plasmática no está del todo claro, aunque se sabe que todas atraviesan el sistema de endomembranas.

La palmitoilación de H-Ras, N-Ras y K-Ras4A permite su transporte hacia la membrana plasmática a través del aparato de Golgi (Apolloni y cols., 2000; Chiu y cols., 2002; Choy y cols., 1999). Sin embargo, la isoforma K-Ras4B probablemente se dirige a la membrana mediante la unión con microtúbulos aunque esto todavía está poco estudiado (Plowman y Hancock, 2005; Plowman y cols., 2005)

Por otro lado la localización de Ras en la membrana también depende de estas modificaciones post-traduccionales y cambia según el estado activo o inactivo de la molécula. Así se sabe que H-Ras en su forma inactiva (unida a GDP) está localizada predominantemente en las caveolas de los islotes lipídicos, y que su activación (unión a GTP) la redirige a zonas desorganizadas de la membrana (Prior y cols., 2001); N-Ras también se localiza en los islotes lipídicos, pero no se asocia con caveolas (Matallanas y cols., 2003), y además existen evidencias de que N-Ras se acumula también en la membrana mitocondrial (Rebollo y Martínez, 1999; Wolfman, 2001); por otro lado, K-Ras se localiza en zonas desorganizadas de la membrana (Roy y cols., 1999), pero cuando los residuos de serina y treonina presentes también en la cola polibásica son fosforilados, se produce la internalización de K-Ras4B hacia diferentes endomembranas (Bivona y cols., 2006).

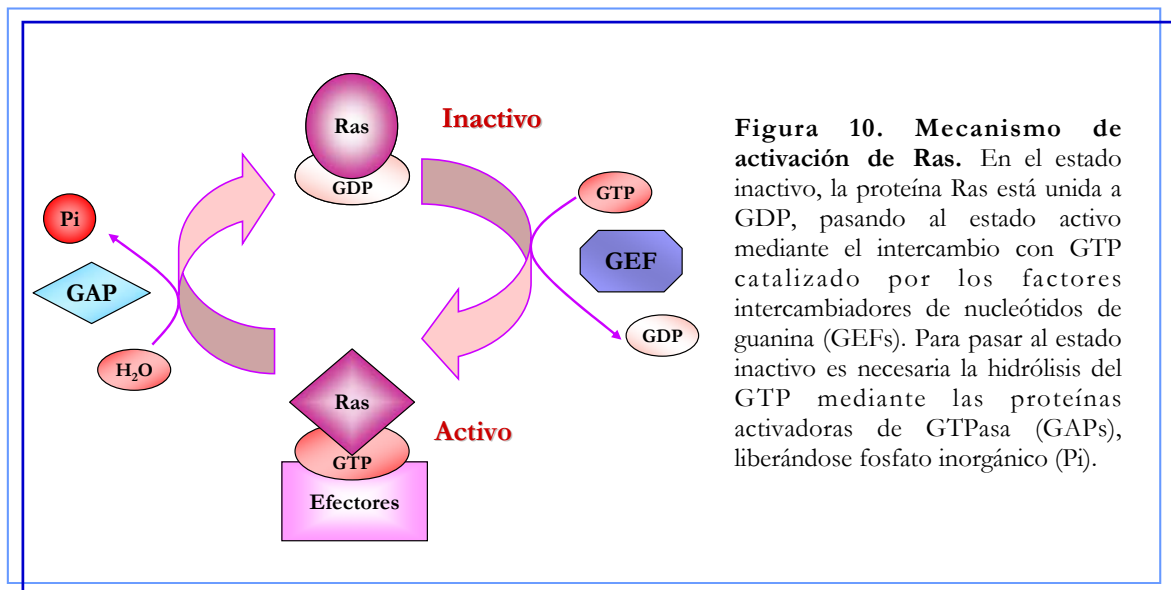
Esta localización de Ras puede regular su proximidad a diferentes tipos de receptores y de GEFs, provocando que existan diferencias en la susceptibilidad de activación por distintos estímulos (Cheng y cols., 2001; Xavier y cols., 1998). Por otra parte, en el caso de la estimulación por factores de crecimiento, la diferente localización de Ras también determina la activación de distintos efectores. Por ejemplo, se ha observado que la localización de H-Ras en islotes lipídicos es esencial para la activación de efectores como Raf-1 y fosfatidilinositol 3- cinasa (PI3K) (Jaumot y cols., 2002; Roy y cols., 1999). Además de su localización en la membrana plasmática se ha descubierto su presencia en el sistema de endomembranas, incluyendo el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (Chiu y cols., 2002). La farnesilación es una señal insuficiente para el anclaje de las proteínas Ras a la membrana y recientemente se ha sugerido un modelo de regulación de la proteína Ras en el cual se asigna un papel fundamental a la reversibilidad de la



señal de palmitoilación que sufren H-Ras y N-Ras (Hancock y cols., 1990; Rocks y cols., 2006; Rocks y cols., 2005). Cuando las proteínas Ras palmitoiladas unidas a la membrana plasmática pierden los restos palmitato, se transportan de forma retrógrada desde la membrana plasmática al aparato de Golgi, donde encuentran palmitoiltransferasas que le permiten recuperar los grupos palmitato y regresar a la membrana plasmática por la vía exocítica (Goodwin y cols., 2005). La tasa de pérdida de la palmitoilación determina la permanencia de la proteína Ras en la membrana y por tanto afecta a su disponibilidad a moléculas efectoras y reguladoras de su activación. Además, la posibilidad de que moléculas de Ras activado se localicen en el aparato de Golgi daría lugar a complejos de señalización activos en endomembranas celulares (Plowman y Hancock, 2005).

### 5. Regulación de Ras

La función de las proteínas Ras como interruptores moleculares viene determinada por su unión a GDP en su estado inactivo, o a GTP en su estado activo (Bourne y cols., 1990; Field y cols., 1987; Rebollo y Martinez, 1999) (figura 10) .



Las proteínas Ras poseen actividad GTPasa e intercambiadora de GDP/GTP intrínseca, pero estas actividades son tan lentas que serían insuficientes para realizar su función (Santos y cols., 2002). Por eso es necesaria la actuación de diversas proteínas que estimulen tanto la hidrólisis del GTP unido a Ras para pasar del estado activo al inactivo, como el intercambio de GDP por GTP para su activación. Estas proteínas son las proteínas activadoras de GTPasa o GAPs (*GTPase activating proteins*) (Trahey y McCormick, 1987) y las proteínas intercambiadoras de nu-

cleótidos de guanina GDP/GTP o GEFs (*Guanine nucleotide Exchange Factors*)(Wolfman y Macara, 1990).

### A. Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs)

Los GEFs promueven el paso al estado activo de Ras (Ras-GTP) aumentando la velocidad de intercambio de GDP por GTP, al provocarse un cambio alostérico en dos regiones clave de la GTPasa, interruptor I e interruptor II, y permitiendo la unión de proteínas efectoras al interruptor I (Boriack-Sjodin y cols., 1998).

En células de mamíferos se han encontrado numerosas proteínas que muestran actividad intercambiadora de nucleótidos de guanina hacia Ras: Sos (*Son of sevenless*), Ras-GRF, Ras-GRP y CNrasGEF (Boguski y McCormick, 1993; Boriack-Sjodin y cols., 1998; Ebinu y cols., 1998; Pham y cols., 2000). Todos los RasGEF están compuestos por dominios modulares conservados y secuencialmente organizados. Hay dos tipos de dominios que siempre están presentes en los GEFs activadores de Ras: el motivo de intercambio de Ras (REM, *Ras Exchange Motif*) y la región con actividad catalítica o dominio homólogo a CDC25 (CDC25-H). La actividad de ambos dominios, junto con la presencia de otra serie de dominios presentes en otros GEFs, determina la especificidad de la activación de Ras mediada por GEFs en función de los diferentes estímulos. Mientras que algunos RasGEFs se expresan ubicuamente, otros son específicos de determinadas etapas del desarrollo o de diferentes tejidos (Cen y cols., 1992; Fam y cols., 1997; Smith y cols., 2000; Wei y cols., 1994).

El principal GEF activador de Ras es Sos. En mamíferos la familia de Sos tiene dos miembros, Sos 1 y Sos 2, que se expresan ubicuamente y comparten un 70% de homología (la menor homología corresponde a la región C-terminal) (Chardin y cols., 1993). A pesar de sus similitudes, la funcionalidad de las dos isoformas es muy diferente: mientras los animales KO de Sos 1 mueren en el útero a mitad de la gestación debido a una malformación en la placenta (Qian y cols., 2000), los KO de Sos 2 son perfectamente viables (Esteban y cols., 2000). Además de los dominios REM y CDC25-H, en el extremo C-terminal existe una región rica en prolina que se une a los dominios SH3 (Src homology 3) de las proteínas adaptadoras, como por ejemplo Grb2.

El mecanismo por el cual la proteína Sos activa a la proteína Ras está muy bien caracterizado (Boriack-Sjodin y cols., 1998; Quilliam y cols., 2002). En células en reposo, Sos 1 está asociada de forma estable al dominio SH3 de la proteína adaptadora Grb2. Tras la estimulación, el

complejo Sos-Grb2 es secuestrado hacia la membrana plasmática e interacciona con el receptor RTK activado mediante los dominios SH2 de Grb2, que se unen específicamente a residuos de tirosina fosforilados; así se produce la translocación de Sos a la membrana plasmática, donde está más cercano a Ras y puede activarlo estimulando el intercambio de GDP por GTP mediante un dominio catalítico de 200 aminoácidos situado en la región central de la proteína, con actividad intercambiadora de nucleótidos de guanina (Bar-Sagi y Hall, 2000; Schlessinger, 1993; Schlessinger y Bar-Sagi, 1994). Existe otro mecanismo para la activación de Ras por el complejo Grb2-Sos mediante la activación de la tirosina cinasa PYK2 por proteínas G reguladas por  $Ca^{2+}$ . La tirosina cinasa PYK2 activa se une a la tirosina cinasa Src y la fosforila pudiéndose unir a Grb2-Sos y activar Ras (Avraham y cols., 2000).

## **B. Proteínas activadoras de GTPasas (GAPs)**

Las GAPs son reguladores negativos de la proteína Ras que estimulan la hidrólisis del GTP unido a la molécula, provocando un cambio de conformación que inactiva Ras (Wittinghofer y cols., 1997). Aunque se cree que existe una activación constitutiva de estas proteínas, no se conoce muy bien el mecanismo que las regula. Estudios recientes muestran que las GAPs tienen también un papel como efectores de Ras (Apolloni y cols., 2000; Bar-Sagi, 2001).

En mamíferos se han encontrado al menos seis GAPs diferentes siendo los dos primeros los más importantes: p120-GAP, la proteína de la neurofibromatosis tipo I o NF1 (Ballester y cols., 1990; Martín y cols., 1990), GAP1m, GAP1IP4BP (Maekawa y cols., 1994), IQGAP1115 (Weissbach y cols., 1994) y SynGAP (Chen y cols., 1998). Todos los RasGAP tienen un núcleo común de unos 250 aminoácidos, denominado dominio catalítico. Este dominio tiene un motivo invariable Phe-Leu-Arg en la región más conservada cuya mutación da lugar a una proteína que puede unirse a Ras, pero es deficiente en el proceso de catálisis para inactivar a Ras. (Bernards y Settleman, 2004).

## **6. Efectores de Ras**

En un principio se pensó que tras su activación, Ras iniciaba una cascada lineal de señalización mediante cinasas citoplasmáticas que comunicaban la membrana celular con el núcleo. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que hay una gran variedad de vías de señalización de Ras (Herrmann, 2003; Rodríguez-Viciano y cols., 2004)(figura 11). Las proteínas efectoras de Ras tienen gran afinidad por Ras-GTP; sin embargo, la idea de que Ras-GDP no tiene ningún papel funcional está cambiando, ya que también puede interaccionar con varios efectores

y modular distintas cascadas de señalización intracelular (Singh y cols., 2005). Por ejemplo, Ras-GDP puede unir el factor transcripcional Aiolos, modulando su translocación al núcleo y la expresión del factor anti-apoptótico BCL-2 (Romero y cols., 1999). Recientemente se ha descrito la posibilidad de que la proteína Ras pueda señalizar en otros compartimentos celulares aparte de la membrana plasmática como pueden ser el retículo endoplásmico (Arozarena y cols., 2004; Goetz y cols., 2007; Mor y Philips, 2006), el aparato de Golgi (Chiu y cols., 2002), los endosomas (Sorkin, 2001) y la mitocondria (Goetz y cols., 2007; Mor y Philips, 2006; Rebollo y Martinez, 1999).

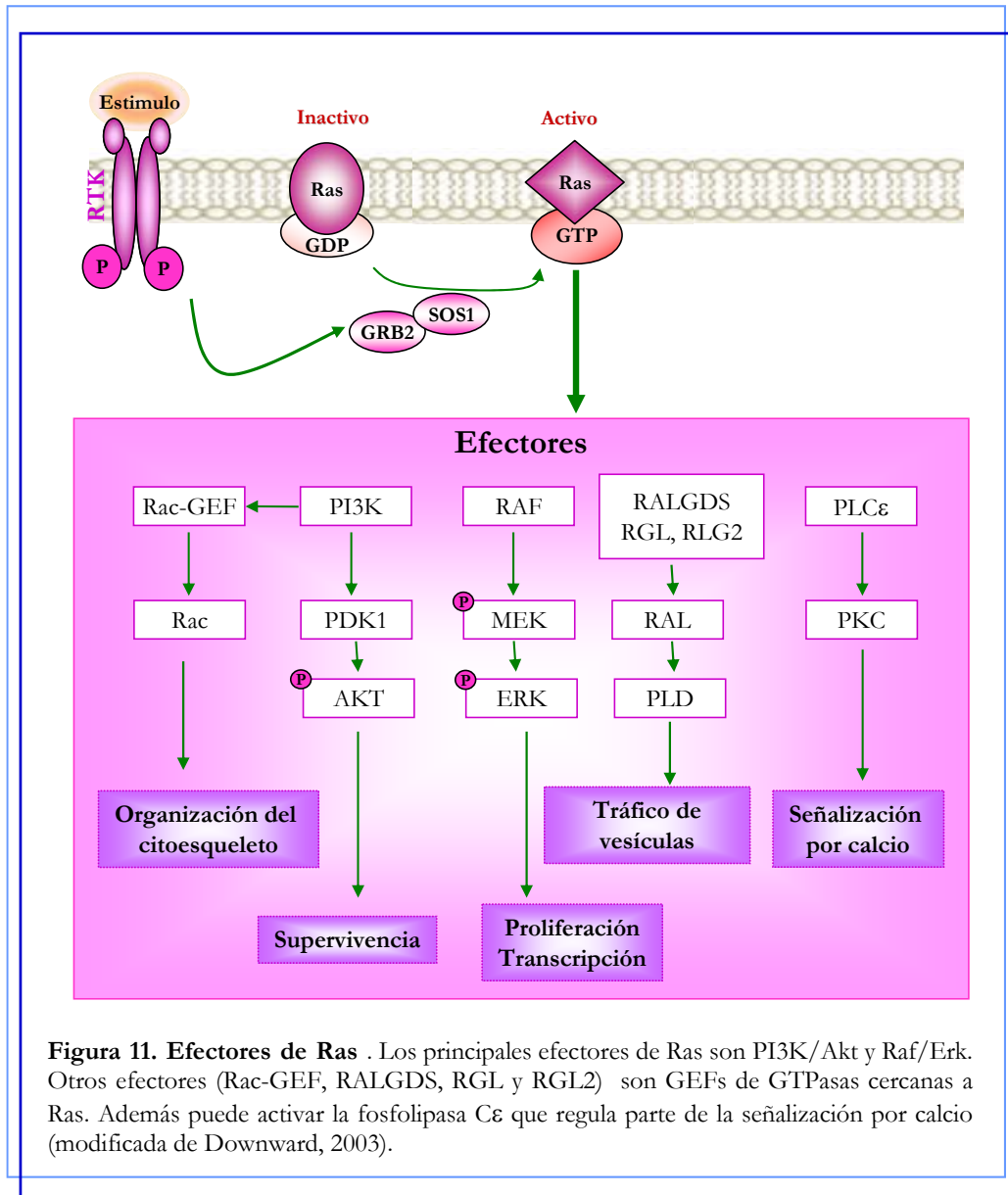
Los efectores de Ras se caracterizan por presentar un dominio de unión a Ras (RBD: *Ras-binding domain*), formado por unos 100 aminoácidos con una estructura terciaria del tipo  $\beta\alpha\beta\alpha\beta$  (Herrmann, 2003), que explica el modo similar de interacción de Ras con los diferentes dominios RBD. Hasta la fecha se han descrito tres tipos diferentes: el dominio de unión a Ras de Raf o Tiam1, el dominio de unión a Ras de la subunidad catalítica de la PI3K tipo I y los dominios de asociación a Ras encontrados en los demás efectores (Ponting y Benjamin, 1996).

Los principales efectores de Ras se muestran en la figura 11, y pueden agruparse en: GEFs, GAPs, proteínas cinasas, cinasas de lípidos, y otros. En nuestro estudio nos hemos centrado en las rutas de señalización de MEK1/2 - Erk1/2 y de PI3K - Akt.

#### **A. Proteínas cinasas reguladas por señales extracelulares (Ruta de MEK 1/2 y Erk 1/2)**

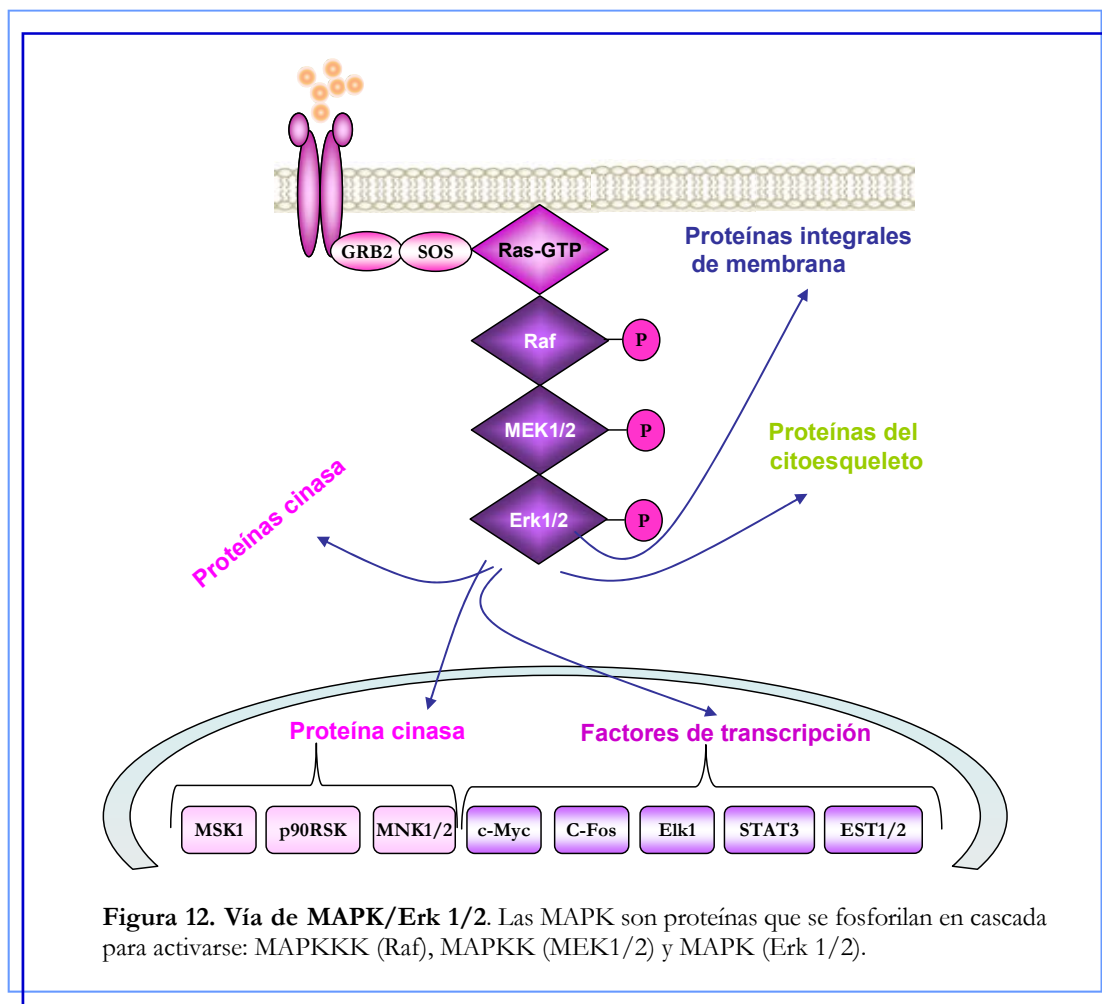
Erk 1/2 (*Extracellular signal-regulated kinases*) pertenece a la familia de las MAPK y su ruta es activada por una gran variedad de receptores, entre los que figuran los RTKs, integrinas y canales iónicos. Tienen un peso molecular de 44 y 42 kDa respectivamente, por lo que también se les conoce con el nombre de p44/p42 MAPK. Los componentes específicos de la cascada, sobre todo los primeros pasos que suceden después de la estimulación, pueden variar dependiendo del estímulo. Estas proteínas están implicadas en procesos de proliferación y diferenciación celular, reorganización del citoesqueleto de actina y migración celular, y también participan en la respuesta al estrés y a la muerte celular (Johnson y Lapadat, 2002).

La proteína Ras unida a GTP puede activar a la serina- treonina cinasa Raf (Geyer y Wittinghofer, 1997) por un mecanismo complejo y poco conocido que produce la traslocación de Raf a la membrana de la célula. Una vez localizada en la membrana plasmática, la actividad de Raf se regula por fosforilación (Chong y cols., 2003). Entre las proteínas que pueden fosforilar Raf se encuentran la proteína cinasa C (PKC) (Kolch y cols., 1993), la proteína cinasa A (PKA)



(Yamazaki y Yazaki, 2000) y Akt (Guan y cols., 2000). Raf activo se une y fosforila a las cinasas de especificidad dual MEK1/2, las cuales a su vez fosforilan a Erk1/2 en residuos de treonina y tirosina que se encuentran entre los dominios VII y VIII del lazo de activación de la cinasa (Hallberg y cols., 1994). Los sustratos de Erk1/2 se encuentran en diferentes compartimentos celulares, entre ellos se encuentran proteínas integrales de membrana (receptor de TNF $\alpha$  CD120A, la tirosina cinasa Syk, el receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR y la proteína calnexina) (Roux y Blenis, 2004), sustratos nucleares (factores de transcripción Elk1, MEF2, c-Fos, c-Myc y STAT3) (Frodin y Gammeltoft, 1999) y proteínas del citoesqueleto (MAP2 y paxilina)(Ku y Meier, 2000), y algunas proteínas cinasas (RSK, MSKs y otras MAPK o MNKs) (Roux y cols., 2004) (figura 12).

Además, Erk 1/2 ejerce otras acciones fuera del núcleo que pueden contribuir a las respuestas proliferativas. Gran parte del Erk 1/2 activado se encuentra unido al citoesqueleto, lo cual puede ayudar a la regulación de la estructura celular (Reszka y cols., 1995). También se ha visto que es necesaria una actividad basal de Erk 1/2 para el mantenimiento de las interacciones celulares con la matriz extracelular (Lu y cols., 1998) (Reszka y cols., 1995; Seger y Krebs, 1995).

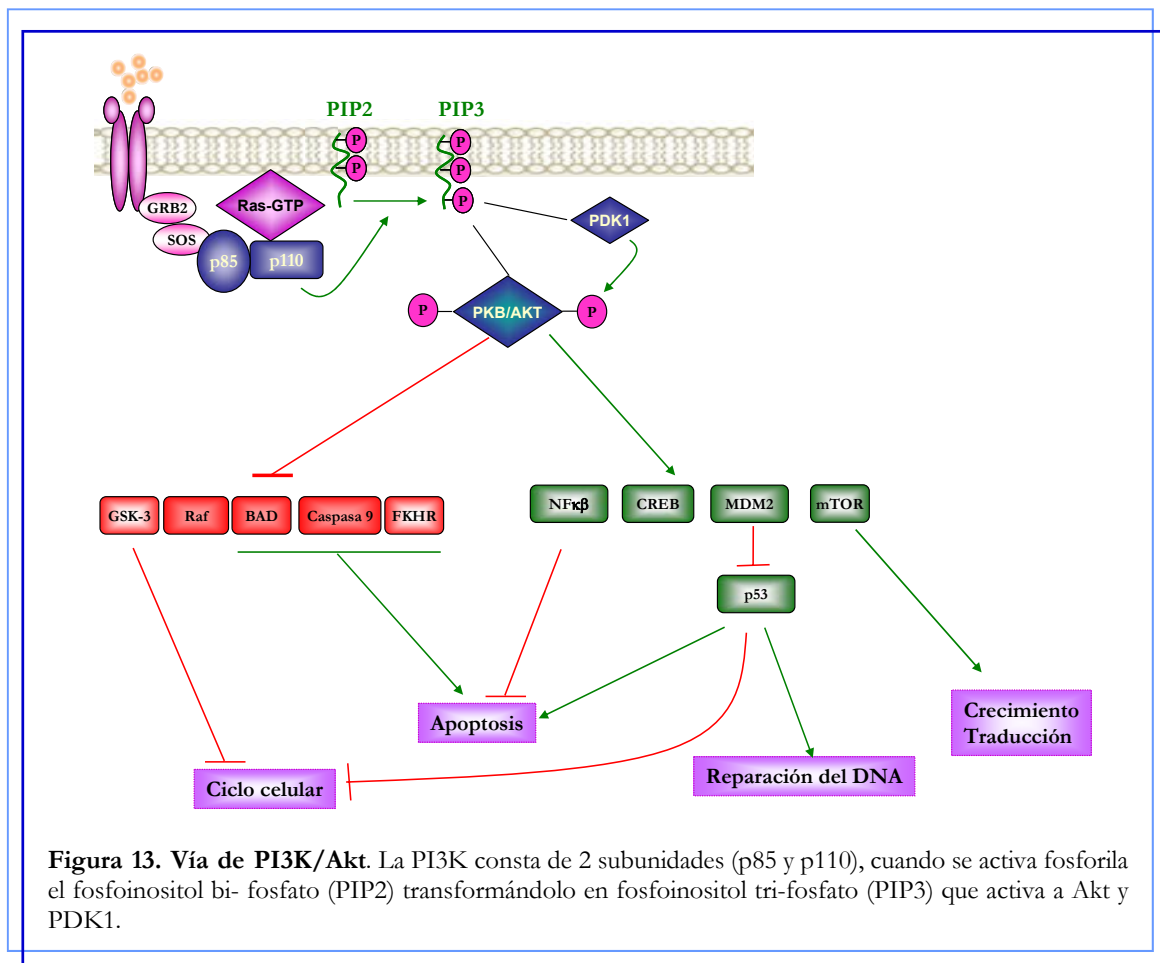


Finalmente, la vía de Ras-MEK-Erk puede disminuir la expresión de los receptores de TGF- $\beta$ , inhibiendo la acumulación de Smads en el núcleo (Kretzschmar y cols., 1999).

## B. Fosfatidil inositol 3-cinasa ( Ruta de PI3K/ Akt)

Las PI3Ks son cinasas de lípidos que fosforilan la posición 3'-OH del anillo inositol de los fosfatidil inositoles (PtdIns) y de algunos fosfoinosítidos (PI). Todos los miembros de la familia de PI3K presentan un dominio cinasa homólogo-PI3K y una cola carboxilo terminal altamente conservada (Kuruvilla y Schreiber, 1999). Estructuralmente, la PI3K presenta dos subunidades de diferente peso molecular, p85 o reguladora y p110 o catalítica. En células de mamíferos, la

familia de PI3K está dividida en 3 clases de acuerdo con su homología de secuencia y su preferencia de sustrato (Fruman y cols., 1998; Vanhaesebroeck y Waterfield, 1999). La clase I de PI3Ks es activada por RTK (clase Ia) y receptores acoplados a proteínas G (clase Ib) y además es la única que puede ser activada por Ras mediante interacción directa con el dominio RBD de la subunidad catalítica (Downward, 1998). Genera fosfoinositol 3-fosfato (PI3P), fosfoinositol 3,4-bisfosfato (PI3,4P<sub>2</sub>) y fosfoinositol 3,4,5-trifosfato (PI3,4,5P<sub>3</sub>) (Wymann y cols., 2003). Estos lípidos especiales dirigen a la membrana plasmática proteínas con dominios homólogos a pleckstrina (PH), como por ejemplo Akt y PDK1 (cinasa 1 dependiente de fosfoinositol) (Rameh y cols., 1997; Vanhaesebroeck y Waterfield, 1999) pudiendo modificar alostéricamente la actividad de la proteína o inducir su recolocación en zonas localizadas de la membrana para inducir su activación. Además, las PI3Ks de clase I son serina- treonina cinasas capaces de fosforilar residuos localizados de otras proteínas regulando su actividad (Vanhaesebroeck y cols., 1997). Un gran número de receptores de membrana, citocinas y uniones celulares con la matriz extracelular pueden activar la PI3K de clase I, lo cual muestra su implicación en numerosos procesos celulares, tales como el crecimiento, la motilidad, la adhesión y la supervivencia celular (Coelho y Leever, 2000) (figura 13).



**Figura 13. Vía de PI3K/Akt.** La PI3K consta de 2 subunidades (p85 y p110), cuando se activa fosforila el fosfoinositol bi- fosfato (PIP2) transformándolo en fosfoinositol tri-fosfato (PIP3) que activa a Akt y PDK1.

El principal efector de la PI3K es Akt, identificado en 1991 bajo 3 nombres diferentes: PKB, RACPK y Akt (Marte y Downward, 1997). Akt es una serina treonina cinasa con un dominio PH amino terminal de unión a fosfoinositoles fosforilados en posición D3, un dominio cinasa y un dominio regulador C-terminal hidrofóbico (HM), que parece que proporciona un sitio de unión para la cinasa PDK1 (Scheid y Woodgett, 2003). Para la completa activación de la proteína es necesaria la fosforilación de los residuos Thr308 en el dominio cinasa, y Ser473 en el extremo C-terminal (Vanhaesebroeck y Waterfield, 1999). El proceso de activación de Akt conlleva dos pasos importantes: la unión a la membrana plasmática y la fosforilación. Después de la activación de la PI3K y la producción de PI3,4,5P<sub>3</sub> y PI3,4P<sub>2</sub>, Akt es llevado a la membrana plasmática donde se une a los fosfoinositoles a través del dominio PH (Franke y cols., 1997). El residuo Thr308, situado en el lazo de activación del dominio catalítico, es fosforilado por otra proteína que contiene otro dominio PH, PDK1 (Alessi, 2001). Para una máxima activación es necesaria una segunda fosforilación en el residuo de Ser473, situado en el dominio HM (Vanhaesebroeck y Alessi, 2000); no se conoce muy bien quién lleva a cabo esta fosforilación, aunque se cree que podría ser PDK1, o bien una integrina ligada a cinasa, o bien un proceso de autofosforilación por el propio Akt o la cinasa mTor (Coffer y cols., 1998; Datta y cols., 1999; Galetic y cols., 1999; Hresko y Mueckler, 2005; Kandel y Hay, 1999; Sarbassov y cols., 2005). La fosforilación de Akt en la Ser473 conduce a su activación total; Akt puede fosforilar un gran número de sustratos, tanto en el citoplasma como en el núcleo, implicados en la regulación de funciones celulares como el crecimiento celular y la supervivencia, el metabolismo de la glucosa y la traducción de proteínas (figura 13) (Altiock y cols., 1999; Datta y cols., 1999; Galetic y cols., 1999; Montagnani y cols., 2001; Zhou y cols., 2001; Zimmermann y Moelling, 1999).

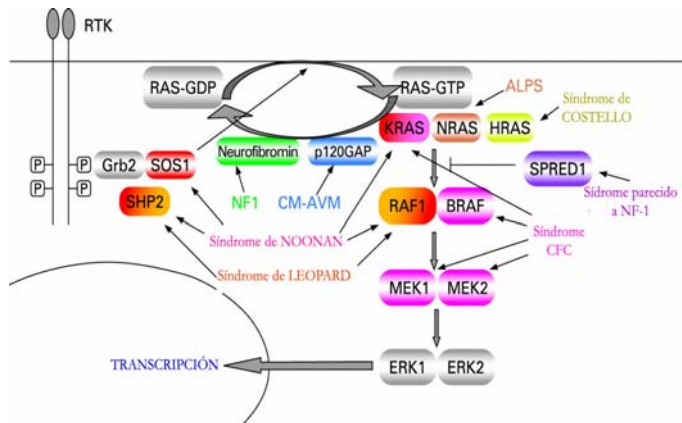
## 7. Relevancia clínica de Ras

Desde el descubrimiento en los años 80 de los genes *ras* como protooncogenes, han sido numerosos los avances en el conocimiento de su función normal y patológica. Además de su implicación en diferentes tipos de cánceres en los que existen mutaciones en las distintas isoformas de Ras, en los años 90 se han descubierto numerosos desordenes del desarrollo relacionados con una señalización defectuosa de Ras, agrupados bajo el nombre de síndromes cardio-facio-cutáneos (Aoki y cols., 2008)(figura 14).

La vía de señalización de Ras está implicada en la patogénesis renal ya que a través de ella se puede inducir la proliferación de las células mesangiales y los fibroblastos, células implicadas en la síntesis de MEC bajo condiciones fisiológicas y fisiopatológicas. Recientemente, en



Tipo de cáncer	H-Ras	K-Ras	N-Ras
Tracto biliar	0%	33%	1%
Vejiga	11%	4%	3%
Mama	0%	4%	0%
Cervical	9%	9%	1%
Colon	0%	32%	3%
Endometrial	1%	15%	0%
Riñón	0%	1%	0%
Hígado	0%	8%	10%
Pulmón	1%	19%	1%
Melanoma	6%	2%	18%
Leucemia mieloide	0%	5%	14%
Ovario	0%	17%	4%
Páncreas	0%	60%	2%
Tiroides	5%	4%	7%



**Figura 14. Enfermedades producidas por mutaciones de Ras y sus vías de señalización.** ALPS: síndrome linfoproliferativo autoinmune; CFC: síndrome cardio-facio-cutáneo; CM-AVM: malformación capilar-malformación arterio venosa; NF1: neurofibromatosis tipo I. Tabla procedente de Karnoub y Weinberg (2008). Esquema modificado de Denayer y cols. (2008).

nuestro grupo de investigación hemos observado un aumento en la activación de Ras, Erk y Akt tras la inducción de fibrosis túbulo-intersticial mediante obstrucción ureteral unilateral en ratones (Rodríguez-Pena y cols., 2008). Por otro lado, en fibroblastos dobles KO de H y N-Ras hemos observado una mayor producción de MEC (Martinez-Salgado y cols., 2006).

## OBJETIVOS



---

El objetivo general de este Proyecto de Tesis Doctoral es el estudio del papel de las isoformas H-Ras y N-Ras en diferentes procesos implicados en la fibrosis: producción de MEC, proliferación y migración celular.

Para ello nos hemos planteado los siguientes objetivos concretos:

- Analizar si la ausencia de las isoformas H y N-Ras modifica la acumulación de MEC y la proliferación celular mediada por TGF- $\beta$ 1.
- Evaluar si la movilidad de los fibroblastos *in vitro* se modifica en ausencia de H y de N-Ras.
- Estudiar si la posible participación de las vías de MAPK/Erk y PI3K/Akt en la síntesis de MEC, la proliferación celular y en la migración de fibroblastos *in vitro* es dependiente de las isoformas H- y N-Ras.



# MATERIALES Y MÉTODOS



# MATERIALES

## 1. Reactivos y material de plástico

CASA COMERCIAL	PRODUCTO
<b>American radiolabelled chemical</b> (St. Louis, MO, USA)	[ <sup>3</sup> H] prolina (actividad específica 40 Ci/mmol, 1mCi/ml)
<b>BioRad</b> (Madrid, España)	Acrilamida y bis-acrilamida Kit colorimétrico de determinación de proteínas (Bio-Rad D <sub>c</sub> protein assay) Membranas de nitrocelulosa (0,45 μm de tamaño de poro)
<b>Bio Whittaker Laboratorios</b> (Barcelona, España)	Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Solución tripsina-EDTA Penicilina Sulfato de estreptomina
<b>Cambrex Bio Science</b> (Milan, Italia)	Agarosa
<b>Chemicon Internacional</b> (Barcelona, España)	RE-Blot Plus western blot recycling kit
<b>Fermentas</b> (Madrid, España)	Marcador de peso molecular para western-blot
<b>Fuji photo film</b> (Barcelona, España)	Película para autorradiografía (Fuji Photo Film Super RX)
<b>Gibco Invitrogene</b> (Barcelona, España)	Suero bovino fetal (SBF) Marcador de peso molecular para ADN
<b>Knittel Glaser</b> (Braunschweig, Alemania)	Cubreobjetos (20 X 20) Portaobjetos
<b>Merck</b> (Madrid, España)	Acido ascórbico Acido perclórico β-mercaptoetanol Glutaraldehido Isopropanol Metanol
<b>Millipore corporation</b> (Madrid, España)	Filtros de esterilización Stericup Solución de revelado (ECL) Membrana de PVDF
<b>Molecular Research Center Inc.</b> (Madrid, España)	Tri-Reagent
<b>Nacional Diagnostics</b> (Atlanta, Georgia)	Líquido de centelleo Ecoscint A Viales de polietileno
<b>Nestlé</b> (Barcelona, España)	Leche en polvo desnatada
<b>Nunc</b> (Roskilde, Dinamarca)	Raspador de células de 25 cm Tubos de centrifuga de diferentes volúmenes Acido acético
<b>Panreac</b> (Barcelona, España)	Cristal violeta Glicina Acido tricloroacético
<b>Prolabo</b> (Paris, Francia)	Glicerol
<b>Promega</b> (Madrid, España)	Retrotranscriptasa, M-MLV Reverse transcriptase Inhibidor de RNAasas, RNasin Ribonuclease inhibitor
<b>R&amp;D Systems</b> (Madrid, España)	Factor de crecimiento transformante (TGF β 1) recombinante humano
<b>Roche Applied Science</b> (Barcelona, España)	Taq polimerasa, Taq FastStart DNA polymerase



<p><b>Sigma- Aldrich Química SA</b> (Madrid, España)</p>	ADN de timo de ternera
	Albumina sérica bovina fracción V (BSA)
	Anfotericina B
	Aprotinina
	Azida sódica
	Azul de bromofenol
	Azul tripán
	$\beta$ -aminopropionitrilo
	Cloruro sódico
	Cloruro cálcico
	Difenilamina
	Dimetilsulfóxido (DMSO)
	Dodecil sulfato sódico (SDS)
	Espermina
	Etilén-diamino-tetraacético (EDTA)
	Fluoruro sódico
	Hoestch 33258
	Igepal CA-630
	Ioduro de propidio
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
Leupeptina	
L-glutamina	
Paraformaldehido	
Persulfato sódico	
Persulfato amónico (APS)	
Peroxido de hidrógeno	
Fenilmetanosulfonilo (PMSF)	
NaCl	
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	
N-etilmaleimida	
N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED)	
Ortovanadato sódico	
Suero de cabra	
Sulfato magnésico	
Tris base (Trizma®)	
Tritón X-100 (NP40)	
Tween-20	
Yoduro de propidio	
<p><b>Upstate Biotechnology</b> (Barcelona, España)</p>	<p>Raf-1 RBD conjugado con agarosa</p> <p>Tampón MLB 5X</p>

El resto de los reactivos de laboratorio utilizados eran de grado analítico y se obtuvieron de Sigma (Madrid, España) y Merck (Madrid, España).

## 2. Aparatos y programas

CASA COMERCIAL	APARATO/PROGRAMA
<p><b>Amersham - GE Healthcare</b> (Valladolid, España)</p>	Hypercassette™
<p><b>Benton-Dickinson</b> (Madrid, España)</p>	<p>Citometro de flujo FacSort</p> <p>Programa Cell QUEST</p> <p>Programa Paint-A-gate</p>
<p><b>BioRad</b> (Madrid, España)</p>	<p>Equipo de western blot Mini-Protean®II</p> <p>Fuente de alimentación para electroforesis y transferencia Power Pac 3000</p> <p>Programa Quantity One</p> <p>Termociclador MyCycler™</p> <p>Transiluminador de luz ultravioleta Gel Doc</p>

<b>BIO-TEK Instrument</b> (Bedfordshire, Reino Unido)	Lector de placas de ELISA ELx800 Programa KC Junior
<b>Cultek S.L.</b> (Madrid, España)	Campana de flujo laminar TC-48 Gelaire Campana de flujo laminar vertical Microflow Laminar Flow Workstation
<b>Kodak</b> (Madrid, España)	Máquina de revelado M35 X-OMAT Processor
<b>NanoDrop Technologies</b> (Wilmington, DE, EEUU)	Nanodrop R Spectrophotometer ND-1000
<b>Nikon</b> (Tokio, Japón)	Microscopio óptico invertido de contraste de fases 2 EL WD 0.3
<b>Scion corporation</b> (Frederick, Maryland, EEUU)	Programa Scion Image
<b>SPSS Inc.</b> (Chicago, Illinois, EEUU)	Programa SPSS
<b>Thermo</b> (Madrid, España)	Incubador celular Forma Scientific 3111
<b>Zeiss</b> (Madrid, España)	Microscopio de fluorescencia invertido Axiovert 200 M Programa AxioVision Rel. 4.6

### 3. Anticuerpos

CASA COMERCIAL	ANTICUERPO	PROCEDENCIA	ESPECIFICIDAD
<b>Abnova</b> (Heidelberg, Alemania)	Anti-K-Ras monoclonal	Ratón	Hombre
<b>Calbiochem-Merk</b> (Barcelona, España)	Anti-p53 monoclonal	Ratón	Hombre
<b>Cell Signalling Technology</b> (Barcelona, España)	Anti-fosfo-Akt policlonal	Conejo	Hombre
<b>BioRad</b> (Madrid, España)	Anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano	Cabra	Conejo
		Cabra	Ratón
<b>Chemicon Internacional</b> (Temecula, CA, USA)	Anti-fibronectina policlonal	Conejo	Ratón
	Anti-colágeno I policlonal	Conejo	Ratón
<b>Santa Cruz</b> (Madrid, España)	Anti-Akt policlonal	Conejo	Ratón
	Anti-Erk policlonal	Conejo	Rata
	Anti-fosfo-Erk monoclonal	Ratón	Hombre
	Anti-H-Ras policlonal	Conejo	Hombre
	Anti-N-Ras policlonal	Conejo	Hombre
<b>Sigma-Aldrich</b> (Madrid, España)	Anti- $\alpha$ -SMA monoclonal	Ratón	Ratón
<b>Upstate Biotechnology</b> (Barcelona, España)	Anti-Ras monoclonal	Ratón	Hombre

## 4. Oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos provienen de la casa comercial Isogen (Barcelona, España) y se reconstituyeron en tampón Tris-EDTA (TE, Tris 10mM pH=8, EDTA 1mM) autoclavado y filtrado a una concentración de 1 µg/µL.

Proteína	Oligo 3' (directo)	Oligo 5' (inverso)
<b>H-Ras</b>	5'-AAGCTTGTGGTGGTGGGCGCTAAAGGC-3'	5'-CTTTCACCCGCTTGATCTGCTCCCTGTACT-3'
<b>K-Ras4A</b>	5'-AGTACGACCCTACGATAGAGGACTCCT-3'	5'-CAATCTGTACTGTCCGATCTCTCACC-3'
<b>K-Ras4B</b>	5'-AGTACGACCCTACGATAGAGGACTCCT-3'	5'-CTAATGTATAGAAGGCATCGTCAACACCC-3'
<b>N-Ras</b>	5'-CCAGGATTCITACCGAAAGCAAGTGGTG-3'	5'-CCTGTAGAGGTTAATATCTGCAAATG-3'
<b>Colágeno I</b>	5'-TGTTGCTGAAAGAC ACC TCG T-3'	5'-CCTCCCATGTTAAATAGCACC T-3'
<b>GAPDH</b>	5'- TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTG GC -3'	5'-CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC-3'
<b>Fibronectina</b>	5'-ATG TGG ACC CCT CCT GAT AGT-3'	5'-GCC CAG TGA TTT CAG CAA AGG-3'

## MÉTODOS

### 1. Cultivo celular

Se utilizaron fibroblastos inmortalizados procedentes de embriones de ratones KO de H-Ras (H-*ras*<sup>-/-</sup>) y N-Ras (N-*ras*<sup>-/-</sup>), y sus respectivos controles (WT). Estos fibroblastos han sido generados por el equipo de investigación del Dr. Eugenio Santos, Director del Centro de Investigación del Cáncer (CIC) de Salamanca (Castellano y cols., 2007).

Los fibroblastos se sembraron en placas de cultivo de 100 mm de diámetro, con medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) inactivado a 56 °C durante 30 minutos, L-glutamina 1 mM, penicilina 500 U/ml, estreptomicina 50 mg/ml y anfotericina B 2,5 mg/ml. Las células se mantuvieron en un incubador a una temperatura de 37 °C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> /95% aire. Las manipulaciones que requirieron ambiente estéril se realizaron en campanas de flujo laminar vertical.

#### A. Tripsinización

Cuando las placas alcanzaron un 80-90% de confluencia, se retiró el medio de cultivo y se añadió a cada placa 10 ml de solución salina tamponada (PBS, *phosphate buffered saline*: NaCl 139 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5,17 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,6mM) a 37 °C para eliminar los restos de medio de cultivo; a continuación se retiró el PBS y se despegaron las células de la placa de cultivo tras un tratamiento con 2 ml de tripsina-EDTA (0,5 g/L tripsina- 0,2g/L EDTA) durante 2 minutos a 37°C; seguidamente, se añadieron 10 ml de medio de cultivo frío para inactivar la tripsina, se recogió todo en un tubo falcon y se centrifugó a 600g durante 3 minutos. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado celular en el volumen deseado, dependiendo del tipo de experimento a realizar.

#### B. Congelación y descongelación de células

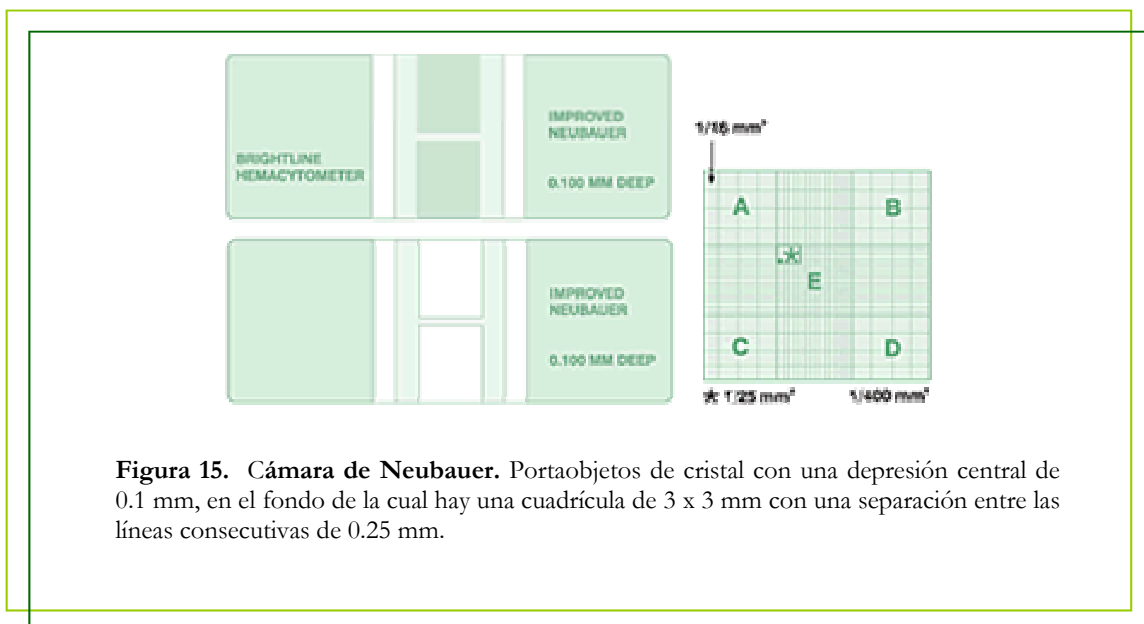
Las células que no se utilizaron inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido en un criogenizador a -190 °C. Cuando las placas de cultivo de 100 mm alcanzaron un 80-90% de confluencia se tripsinizaron como se ha descrito anteriormente. Después de la centrifugación, las células se resuspendieron en un medio de cultivo con 20% de SBF y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) y se trasladaron a un criovial. Antes de introducir las células en el criogenizador, las células su-

fren una congelación paulatina (2 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , 12 horas a  $-80^{\circ}\text{C}$ ) para evitar la formación de cristales intracelulares que dañen a la célula durante el proceso de congelación.

La **descongelación** de las células se realizó en un baño a  $37^{\circ}\text{C}$ , y fue lo mas rápida posible, ya que el DMSO es tóxico para las células. Las células se trasladaron a un tubo falcon con 20 ml de medio DMEM suplementado con un 20% de SBF y se centrifugaron a 600 g durante 3 minutos. El precipitado celular se resuspendió en medio DMEM con 20% de SBF y se volvió a centrifugar. Finalmente, resuspendimos el precipitado en medio DMEM con 10% de SBF y sembramos una placa de 100 mm de diámetro por cada vial descongelado.

### C. Recuento del número de células.

Para la realización de algunos experimentos se cuantificó el número de células antes de la siembra. Para ello utilizamos una cámara de Neubauer (figura 15). Después de tripsinizar y resuspender las células en medio de cultivo, se recogieron 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular y se mezclaron con 100  $\mu\text{L}$  de azul trypan (0,4% en PBS) durante 5 minutos. El azul trypan, utilizado para determinar la viabilidad celular, es un colorante que se introduce en las células que presentan roturas en su membrana. Las células que aparecen claramente de color azul son consideradas no viables. Se colocó una gota de la suspensión celular mezclada con el colorante en la cámara de Neubauer y se contaron las células vivas. Se realizaron los cálculos correspondientes para obtener finalmente el número de células por mililitro de suspensión celular y se calculó el volumen de suspensión celular necesario para sembrar el número de células deseadas para cada experimento.



**Figura 15. Cámara de Neubauer.** Portaobjetos de cristal con una depresión central de 0.1 mm, en el fondo de la cual hay una cuadrícula de 3 x 3 mm con una separación entre las líneas consecutivas de 0.25 mm.

## D. Grupos experimentales

Para la caracterización de las células, los fibroblastos se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de SBF. Cuando alcanzaron el 80-90% de confluencia se procedió a la extracción de ARN mensajero (ARNm) o proteínas, según se describe más adelante.

Para el resto de los estudios, las células se sembraron en medio DMEM con 10% de SBF. Al llegar a subconfluencia, se deplectaron de SBF: se retiró el medio de cultivo con 10% de SBF, se lavó con PBS y se añadió medio con 0,5% de SBF durante 24 horas. Posteriormente, se trataron con TGF- $\beta$ 1 1 ng/ml o se mantuvieron en medio con 0,5% de SBF durante 24 horas (condiciones basales). Para comprobar la implicación de las rutas PI3K-Akt y MAPK-Erk se realizó, previamente al tratamiento con TGF- $\beta$ 1, una preincubación durante 30 minutos con un inhibidor de la PI3K, LY294002 20 $\mu$ M, o con un inhibidor de MEK, U0126 20 $\mu$ M (tabla 3).

<b>Basal</b>	DMEM 0.5% SBF 24h
<b>T1</b>	TGF- $\beta$ 1 1ng/ml en DMEM 0.5% SBF 24h
<b>U0</b>	U0126 20 $\mu$ M en DMEM 0.5% SBF 24h
<b>U0 + TGF-<math>\beta</math>1</b>	Pre-incubación con U0126 20 $\mu$ M 30min y TGF- $\beta$ 1 1ng/ml 24h en DMEM 0.5% SBF
<b>LY</b>	LY294002 20 $\mu$ M en DMEM 0.5% SBF 24h
<b>LY + TGF-<math>\beta</math>1</b>	Pre-incubación con LY294002 20 $\mu$ M 30min y TGF- $\beta$ 1 1ng/ml 24h en DMEM 0.5% SBF

Tabla 3. Resumen de los diferentes tratamientos utilizados en este estudio.

## 2. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo

La preparación y tinción del ADN se realizó mediante la técnica de Vindelov y cols (1983). Los fibroblastos se cultivaron en placas de 100 mm de diámetro con medio DMEM como se describió en el apartado 1. Cuando las placas alcanzaron entre un 80 y un 90% de confluencia se retiró el medio de cultivo y se lavaron dos veces con PBS. Posteriormente, las células se despegaron mediante tripsinización y se lavaron varias veces con PBS para eliminar los restos de medio de cultivo. Finalmente las células se resuspendieron en PBS a una concentración de unas 10<sup>6</sup> células/ml.

### Adquisición y análisis de los datos

Los tubos con las células se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con 1,8 ml de una solución A (tabla 4), que contenía tripsina y el detergente Nonidet p40 (NP40), con el fin de romper la membrana citoplasmática y digerir el contenido proteico de la célula. Posteriormente, se realizó una nueva incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente con 1,5 ml de solución B (tabla 4), que contenía un inhibidor de tripsina y ARNasas, con el fin de romper el ARN. A continuación, se añadieron 1,5 ml de solución C (tabla 4), compuesta por yoduro de propidio a una concentración de 0,416 g/l que se une a la doble hélice de ADN y se incubó de nuevo durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Terminadas estas incubaciones las células fueron introducidas en un citómetro de flujo *FacSort*. Tanto la adquisición de los datos como el análisis de los resultados se llevaron a cabo empleando los programas informáticos *Cell QUEST* y *Paint-A-gate* respectivamente.

Solución	Composición	Concentración
<b>Solución A*</b>	Tripsina	60 mg/l
<b>Solución B*</b>	ARNasa	1 g/l
	Inhibidor de tripsina	0,2 g/l
<b>Solución C*</b>	Yoduro de propidio	0,416 g/l
<b>Solución madre (pH 7.6)</b>	Trishidroximetilaminometano	0,5 mM
	Citrato trisódico	3,4 mM
	NP40	0,1%
	Espermina	1,5 mM

Tabla 4. Composición de las soluciones empleadas en la tinción del DNA para la detección de las diferentes fases del ciclo celular. (\*) diluido en solución madre.

### 3. Medida del tamaño celular

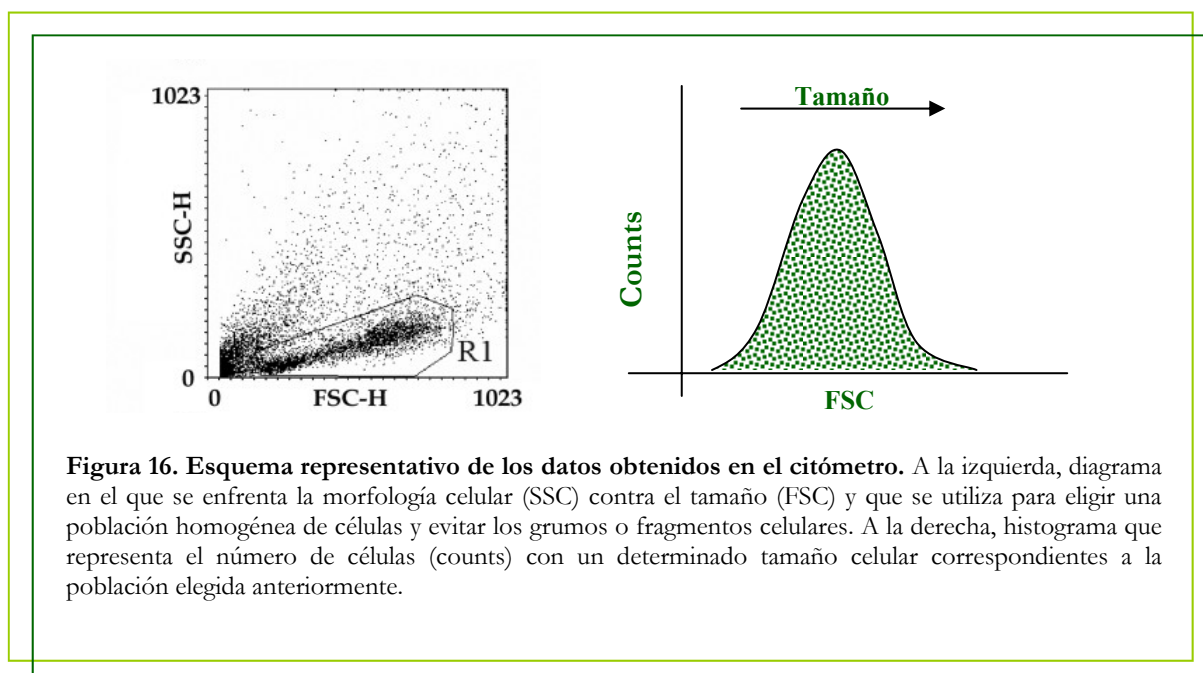
Para medir el tamaño de las células se utilizaron dos técnicas diferentes:

#### A. Microscopia óptica

Los fibroblastos se cultivaron en placas de 60 mm de diámetro a baja densidad celular, para permitir observar células individualizadas. Mediante un microscopio de contraste de fases termostaticado a 37°C y una concentración de CO<sub>2</sub> del 5%, se realizaron varias microfotografías con un aumento de 200X. Una vez realizadas las microfotografías, se cuantificó la superficie plana de cada célula utilizando el programa *AxioVision Rel. 4.6*.

#### B. Citometría de flujo

Las células se sembraron como habitualmente en placas de 100 mm de diámetro. Cuando estuvieron semiconfluentes, se tripsinizaron como se menciona en el apartado 1A, recolectándose en un tubo falcon de 50 ml. Se lavaron varias veces con PBS 1X y finalmente el pellet se re-suspendió en 1 ml de PBS 1X, evitando la formación de grumos. A continuación las células se introdujeron en el citómetro de flujo y los datos obtenidos fueron analizados mediante los programas *Cell QUEST* y *Paint-A-gate*. Para analizar el tamaño celular medimos el “Forward Scatter” (FSC) que es una medida proporcional al tamaño de la partícula que produce la dispersión (figura 16).





#### 4. Cuantificación del número de células mediante la tinción con cristal violeta.

La técnica se basa en la capacidad del colorante cristal violeta de teñir los núcleos celulares, pudiendo establecerse una relación directa entre la cantidad de núcleos existentes y la cantidad de cristal violeta fijado según el método descrito por Drysdale y cols. (1983).

Los experimentos se llevaron a cabo en placas de 24 pocillos. Los fibroblastos se sembraron a una densidad de 9000 células/pocillo en medio DMEM con 10% de SBF. Al día siguiente se deplectaron de SBF. Posteriormente, se trataron con TGF- $\beta$ 1 1ng/ml ó con los inhibidores de Erk y Akt durante 24 horas como se detalló anteriormente.

##### Fijación de las células y tinción de los núcleos

Una vez finalizado el tratamiento las células se lavaron con PBS y se fijaron con glutaraldehído al 10% durante 10 minutos. Después de la fijación se lavó con PBS y se tiñeron los núcleos con 300  $\mu$ l de cristal violeta al 0,2% durante 30 minutos en oscuridad. A continuación, se lavaron las placas repetidas veces con PBS hasta eliminar completamente el exceso de cristal violeta. Las placas se dejaron secar durante una noche en oscuridad, y por último se añadieron 2 ml de ácido acético al 10%, se homogeneizó cada pocillo y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro de placas de ELISA a 595 nm y los resultados se analizaron con el programa *KC-Junior*. La absorbancia es directamente proporcional al número de células de cada pocillo.

#### 5. Inmunofluorescencia

La técnica de la inmunofluorescencia se utiliza para determinar la localización intracelular de las moléculas de interés mediante su detección con anticuerpos específicos unidos a un fluorocromo fluorescente.

Aproximadamente unos 8000 fibroblastos se sembraron sobre cubreobjetos colocados a su vez en placas de 35 mm con medio DMEM suplementado con 10% SBF. A las 24 horas se deplectaron de SBF durante 24 horas y se trataron con TGF- $\beta$ 1 y con los inhibidores de Erk y Akt durante 24 horas más, como se describe en la tabla 3.

##### ◆ Fijación e incubación con los anticuerpos

Tras el tratamiento, se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS. A continuación se añadió 1 mL de paraformaldehído (PFA) al 4% para fijar las células durante 15 minu-

tos. Los fibroblastos se permeabilizaron para facilitar la entrada de los anticuerpos en la célula durante 5 minutos con un tampón que contenía 0,1% Tritón X-100, 0,2% BSA y 0,05% azida disueltos en PBS con calcio y magnesio (PBS Ca-Mg:  $\text{CaCl}_2$  1 mM,  $\text{MgSO}_4$  1 mM,  $\text{ClNa}$  0,81%,  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  2,6 mM,  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$  4,1 mM). Posteriormente, se neutralizaron los posibles restos de PFA con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50 mM y se bloqueó con una solución que contenía 10% de suero de cabra. Transcurridos 30 minutos de bloqueo, las células se tiñeron con el anticuerpo primario. Para este estudio, se utilizó un anticuerpo que reconoce el antígeno de proliferación nuclear Ki67 localizado en el núcleo de todas las células que no estén en fase G0. Se sintetiza en la mitad de la fase G1 y sus niveles aumentan en las fases S y G2 alcanzando un pico en la fase M y siendo catabolizado rápidamente al final de la fase M. El porcentaje de células teñidas con Ki67 indica la fracción celular en estado proliferativo (Bryant y cols., 2006). Las células se incubaron con una dilución 1/50 del anticuerpo primario durante 3 horas y después durante 30 minutos con un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón unido al fluorocromo rodamina. Por último, los núcleos se tiñeron con el colorante Hoechst 33258 1  $\mu\text{M}$  durante 5 minutos. Los cubreobjetos se montaron sobre un portaobjetos utilizando *Prolong Gold antifade reagent* y se mantuvieron en oscuridad hasta su visualización en el microscopio de fluorescencia.

#### ◆ Cuantificación

Para la cuantificación de la inmunofluorescencia se realizaron 5 microfotografías de cinco campos diferentes por cada cubreobjetos con un objetivo de 50 aumentos con un microscopio de fluorescencia *Zeiss Axiovert 200M* utilizando una luz de excitación de 543 nm para la rodamina y una de 365 nm para el Hoechst. En cada campo se contaron el número de células teñidas con Hoechst (células totales) y el número de células teñidas con Ki67 (células en proliferación) y se extrapó el porcentaje de células positivas para Ki67.

## 6. Western-blot

La técnica del western blot (Towbin y cols., 1979) la hemos utilizado para ver la expresión de distintas proteínas participantes en la vía de señalización de Ras, en la proliferación y algunas proteínas características de la MEC. Los fibroblastos se cultivaron en placas de 100 mm con medio DMEM como se describió anteriormente; cuando las placas alcanzaron un 80-90% de confluencia se procedió a la extracción de las proteínas totales de las células o bien se deplectaron de SBF durante 24 horas, se trataron con  $\text{TGF-}\beta 1$  con los inhibidores de Erk y Akt durante 24 horas como se indicó anteriormente.

◆ **Obtención de extractos proteicos a partir de lisados celulares**

Las células se lavaron dos veces con PBS a temperatura ambiente y se lisaron con tampón de lisis a 4°C (NaCl 140 mM; EDTA 10 mM; glicerol 10%; NP40 1%; Tris base 20 mM pH 7,5), al que se añadió inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM; leupeptina 1 µg/ml; aprotinina 1 µg/ml). Para el análisis de la expresión de proteínas fosforiladas, los fibroblastos se lisaron con tampón *Mg Lysis Buffer* (MLB) (HEPES 25 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM; Igepal CA-630 1%; desoxicolato sodico 0,25%, EDTA 1 mM) al que se añadió glicerol 10%, inhibidores de fosfatasa (NaF 25 mM; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM) e inhibidores de proteasas (leupeptina 1 µg/ml; aprotinina 1 µg/ml; PMSF 1 mM). Para facilitar su lisis, se incubaron durante 15 minutos a 4°C en estos tampo- nes. La mezcla se centrifugó durante 20 minutos a 15000g y 4°C. Los precipitados se desecha- ron, conservándose únicamente los sobrenadantes del lisado celular. Para la cuantificación de la cantidad de proteínas totales en los extractos celulares se utilizó el kit comercial *DC Protein Assay*, basado en el método de Lowry (Lowry y cols., 1951), según las recomendaciones del fabri- cante, se midió la absorbancia a 720 nm en un espectrofotómetro de placas, y los resultados se analizaron con el programa *KC-Junior*.

◆ **Precipitación de Ras-GTP por afinidad de Raf (“pull-down” de Ras)**

Para analizar la expresión de la proteína Ras activada (Ras-GTP) es necesario realizar, an- tes de la electroforesis, una precipitación por afinidad (“pull-down”) con la proteína Raf, a la cual se une específicamente sólo el Ras unido a GTP. Para ello, entre 0,5-1 mg de proteína del lisado celular obtenido con tampón de lisis MLB se incubó con 10 µg de Raf conjugado con agarosa, en rotación orbital a 4 °C durante 30 minutos; se centrifugó a 14000g durante 5 segundos a 4°C y retiramos el sobrenadante. Las moléculas de Ras activado se unen a Raf, mientras que el resto de proteínas quedan en el sobrenadante que se desecha. El precipitado se lavó varias veces con tampón de lisis MLB y finalmente se resuspendió en tampón de carga Laemmli 2x (β- mercaptoetanol 2%; SDS 40 g/L; glicerol 20% y azul de bromofenol 0,1 mg/L en Tris 0,5M mM pH 6,8). La mezcla se incubó a 100°C durante 5 minutos, y se cargó en la electroforesis.

◆ **Electroforesis y transferencia**

Las proteínas (20-30 µg por carril) se separaron mediante electroforesis en condiciones reductoras a un voltaje constante de 100 V en geles de poliacrilamida-SDS (Laemmli, 1970) con un grosor de 1-1,5 mm y un porcentaje en acrilamida/bis-acrilamida variable según la proteína a

detectar (tabla 5), utilizando un tampón que contenía glicina 192 mM, SDS 0,1% y Tris base 25 mM, pH 8,3; después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa o de PVDF, utilizando un tampón compuesto por Tris 20 mM y glicina 190 mM, pH 8,4 -8,8. La transferencia se realizó a un amperaje constante de 300 mA durante 90 minutos.

#### ◆ Incubación con los anticuerpos

Una vez transferidas las proteínas a la membrana, ésta se bloqueó al menos una 1 hora con el tampón *Tween-Tris buffered saline* (TTBS, Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM y Tween-20 0,1%, pH 7,5-8) al que se añadió leche en polvo desnatada o albúmina sérica bovina a la concentración indicada en la tabla 5. Después del bloqueo, la membrana se incubó en agitación con los diferentes anticuerpos a la dilución óptima en TTBS (tabla 5). Seguidamente, se hicieron 4 lavados de 7 minutos con TTBS en agitación. A continuación, se añadió el anticuerpo secundario correspondiente marcado con peroxidasa de rábano y se incubó a temperatura ambiente en agitación durante 30-60 minutos (Tabla 6). Se hicieron otros 4 lavados durante 7 minutos con TTBS en agitación. Los tiempos de bloqueo e incubación así como las diluciones adecuadas se muestran en la tabla 6. La membrana del western se reveló con una película fotográfica utilizando el método no radiactivo ECL. Finalmente, la película se digitalizó con un escaner utilizando el programa de tratamiento de imágenes *Adobe Photoshop* y se cuantificó la densidad óptica de las bandas obtenidas con el programa *Scion Image*.

#### ◆ Stripping

Es posible reutilizar las membranas que ya han sido incubadas con un anticuerpo para la detección de una proteína diferente. Esto se conoce como “*stripping*” de la membrana. Para ello, previamente se incubó dicha membrana con una solución de stripping (*RE-Blot Plus Western blot recycling Kit*) durante 15 minutos para desprender los anticuerpos que estaban previamente unidos a la membrana. Posteriormente, esta membrana se bloqueó e incubó con los anticuerpos primarios y secundarios según las características de la nueva proteína que se quiera detectar.

## 7. Incorporación de [<sup>3</sup>H] prolina a proteínas colágenas

La incorporación de prolina exógena marcada con tritio se utilizó para valorar la síntesis y acumulación de proteínas colágenas, siguiendo una modificación del método descrito por Riser y cols. (1998). Esta técnica se llevó a cabo sembrando los fibroblastos en placas de 24 pocillos a una densidad de 20000 células/pocillo. Tras 24 horas de deplección sin SBF, se reemplazó el

Molécula (P.M)	Porcentaje de acrilamida	Bloqueo (en TTBS)	Anticuerpo 1° (diluido en TTBS)	Anticuerpo 2° (diluido en TTBS)
<b>Akt (60 kDa)</b>	8%	2% BSA, 60 min.	Conejo contra humano 1:1000 2% BSA Toda la noche	Cabra contra conejo 1:10000 60 min.
<b>Fosfo Akt (60 kDa)</b>	8%	2% BSA, 60 min.	Conejo contra humano 1:1000 2% BSA Toda la noche	Cabra contra conejo 1:10000 60 min.
<b>Colágeno I (180 kDa)</b>	6-8%	5% BSA Toda la noche	Conejo contra ratón 1:20000 5% BSA 90 min.	Cabra contra conejo 1:20000 5% BSA 30 min.
<b>Erk 1/2 (42-44 kDa)</b>	12%	2% BSA 60 min.	Conejo contra rata 1:5000 2% BSA Toda la noche	Cabra contra conejo 1:10000 60 min.
<b>Fosfo Erk (44 kDa)</b>	12%	2% BSA 60 min.	Ratón contra humano 1:2500 2% BSA Toda la noche	Cabra contra ratón 1:10000 60 min.
<b>Fibronectina (220 kDa)</b>	6%	3% BSA Toda la noche	Conejo contra ratón 1:30000 3% BSA 60 min.	Cabra contra conejo 1:20000 30 min.
<b>K-Ras (21 kDa)</b>	15%	5% leche en polvo desnatada 120 min.	Ratón contra ratón 1:500 5% leche en polvo desnatada Toda la noche	Cabra contra ratón 1:5000 5% leche en polvo desnatada 60 min.
<b>N-Ras (21 kDa)</b>	15%	5% leche en polvo desnatada 120 min.	Conejo contra ratón 1:1000 5% leche Toda la noche	Cabra contra conejo 1:5000 5% Leche 60 min.
<b>H-Ras (21 kDa)</b>	15%	5% leche en polvo desnatada 120 min.	Conejo contra ratón 1:1000 5% leche Toda la noche	Cabra contra conejo 1:5000 5% Leche 60 min.
<b>Ras total (21 kDa)</b>	15%	5% leche en polvo desnatada 60 min.	Ratón contra humano 1:1000 5% leche en polvo desnatada Toda la noche	Cabra contra ratón 1:10000 60 min.
<b>p-53 (53 kDa)</b>	10%	2% BSA, 60 min.	Ratón contra humano 1:500 2% BSA Toda la noche	Cabra contra ratón 1:5000 60 min.
<b>PCNA (36 kDa)</b>	12%	2% BSA, 60 min.	Ratón contra humano 1:5000 2% BSA Toda la noche	Cabra contra ratón 1:10000 60 min.

**Tabla 5. Condiciones de incubación de los anticuerpos 1° y 2° para western-blot.** Tanto el bloqueo como las incubaciones de los diferentes anticuerpos primarios y secundarios se hicieron en agitación y a temperatura ambiente, excepto aquellas que requirieron toda la noche que se realizaron a 4 °C . P.M: peso molecular; min.: minutos; kDa: kiloDalton; TTBS: tampón de lavado; BSA: albumina sérica bovina.

medio de las células por DMEM con 0,5% SBF suplementado con  $\beta$ -aminopropionitrilo 0,148 mM (impide que el colágeno forme fibrillas y se deposite sobre la monocapa de células, y de esta manera favorece que el colágeno permanezca en suspensión en el medio de cultivo), ácido ascórbico 0,222 mM, prolina 0,183 mM y 2  $\mu$ Ci/pocillo de [ $^3$ H] prolina (actividad específica 40 Ci/mmol, 1mCi/ml). Se añadió la concentración correspondiente de TGF- $\beta$ 1 al medio suplementado y se incubó durante 24 horas.

#### ◆ Recogida de las muestras

Tras el periodo de marcaje, se recogió el medio de cultivo de cada pocillo en un tubo eppendorf de 1,5 ml sobre hielo (4 °C) al cual se había añadido previamente 165  $\mu$ l de Inhibidor Universal de Proteasas frío (IPU: PMSF 3 mM; N-etilmaleimida 40 mM; EDTA 0,1 mM). Las muestras obtenidas se congelaron a -20°C hasta su utilización, o bien se procedió al procesamiento de las mismas.

#### ◆ Procesamiento de las muestras

Las proteínas del medio de cultivo se precipitaron añadiendo 165  $\mu$ l de ácido tricloroacético (TCA) al 50% (concentración final en el medio: 10%), al que previamente se añadió 20 $\mu$ l de BSA 66,4 mg/ml para favorecer la precipitación de las proteínas. A continuación, se centrifugó a 3000 g durante 10 minutos a 4°C y se lavó el precipitado exhaustivamente con 1 ml de TCA frío al 10% para retirar el exceso de prolina marcada que no se incorpora al colágeno. Después de otro lavado, el precipitado se solubilizó añadiendo 1 ml de NaOH 0,1 N a 60°C, y se agitó hasta su total disolución. El contenido de cada tubo fue transferido a viales de polietileno a los cuales se añadió 3,5 ml de líquido de centelleo *Ecoscint A*. Los viales se agitaron y se dejaron aproximadamente 12 horas en oscuridad. Por último, se midió la radiactividad de los viales en un contador  $\beta$  de centelleo acoplado a un ordenador, y mediante el programa *Wallac 1400 DSA LSC* se analizaron los resultados.

La corrección de los resultados por la cantidad de células sembradas en cada pocillo se hizo midiendo la cantidad de ADN de las células presentes en los pocillos mediante la reacción de la difenilamina.

#### ◆ Cuantificación de ADN: reacción de la difenilamina

Este método se basa en un ensayo colorimétrico en el que la difenilamina reacciona con la ribosa del ADN dando lugar a un compuesto de color azul (Wyllie y cols., 1980). Las células sembradas en las placas de 24 pocillos se lisaron con 100 µl de tampón de lisis de ADN (EDTA 20 mM pH 8; Tritón X-100 0,5%; Tris 10 mM pH 8) en agitación constante durante 15 minutos. Se añadió la misma cantidad de ácido perclórico (PCA) 20% al lisado que de tampón de lisis y se hidrolizaron las muestras en una estufa a 80 °C durante 15 minutos. Al mismo tiempo se preparó una curva de calibrado de concentraciones entre 0 y 2 µg/ml de ADN de timo de ternera en PCA al 10% y se procesó de la misma manera que las células. Transcurrido el tiempo de hidrólisis, se dejaron enfriar las placas a temperatura ambiente durante 15 minutos. Por último se añadió la misma cantidad de reactivo difenilamina (paraldehído 0,01% (v/v); difenilamina 240 mM en ácido acético glacial) que el volumen total que había en los pocillos de las muestras y de la recta de calibrado, se mezcló bien con una punta de pipeta y se incubó durante toda la noche a 30 °C en oscuridad.

Después de la incubación los pocillos adquieren una tonalidad azul cuya intensidad depende del contenido en ADN. Para la cuantificación se transfirieron 200 µl del contenido de cada pocillo a placas de 96 pocillos y se leyó la absorbancia a 595 nm y 700 nm con un espectrofotómetro de placas de ELISA (la absorbancia a 595 nm indica la cantidad relativa de ADN en la muestra, la lectura a 700 nm se utiliza para corregir la turbidez de la muestra).

## 8. Estudio de la expresión de genes por RT-PCR

La RT-PCR es una técnica semicuantitativa que permite determinar la expresión de genes mediante transcripción inversa (RT, acrónimo del término inglés *reverse transcription*) del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) celular al ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc), y posterior amplificación de una determinada región de éste mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés de *Polymerase Chain Reaction*) con cebadores específicos (Saiki y cols., 1988). De esta manera, se consigue obtener rápidamente una cantidad de material biológico observable (ADNc) a partir de cantidades muy pequeñas. La presencia o ausencia, o la mayor o menor cantidad del ARNm de un determinado gen se corresponde con una mayor o menor expresión, que se determina por la cuantificación de su ADNc amplificado por la PCR. En este trabajo se utiliza la técnica de la RT-PCR para estudiar la expresión de genes que codifican para las isoformas de Ras y para las proteínas de la MEC colágeno tipo I y fibro-

nectina. Como control interno se utilizó la expresión del ARNm de la gliceraldehido 3- fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Para ver la expresión de las isoformas de Ras, los fibroblastos se cultivaron en placas de 100 mm de diámetro con medio DMEM como se describió anteriormente; cuando las placas alcanzaron un 80-90% de confluencia se procedió a la extracción del ARNm. Para analizar la expresión de proteínas de MEC, los fibroblastos se deplectaron de SBF durante 24 horas y se trataron con TGF- $\beta$ 1 1ng/ml durante 24 horas (tabla 3).

#### ◆ Extracción del ARN total.

La extracción del ARN celular está basada en el método desnaturizante del tiocianato de guanidinio y la extracción con fenol/cloroformo (Chomczynski y Sacchi, 1987; Chomczynski, 1993). Una vez finalizado el tratamiento se retiró el medio de cultivo de cada placa, se añadió 1 ml del reactivo comercial TriReagent y se homogeneizó con la micropipeta hasta que la solución se volvió viscosa. La mezcla se incubó durante 15 minutos para permitir la completa disociación de los complejos de nucleoproteínas. A continuación, se añadieron 200  $\mu$ L de cloroformo. La mezcla se agitó vigorosamente y se dejó reposar 15 minutos, agitando cada 5 minutos. Posteriormente se centrifugó a 12000 g y 4 °C, durante 15 minutos. Se obtuvieron 3 fases: una fase orgánica roja (inferior), una interfase blanquecina y una fase acuosa incolora (superior). El ARN queda en la fase acuosa superior, mientras que las proteínas quedan en la inferior y el ADN queda retenido en la interfase. Se recogió la fase acuosa y se precipitó el ARN con 500  $\mu$ L de isopropanol durante 15 minutos a -20°C. Se centrifugó a 12000 g y 4 °C durante 10 minutos. El ARN precipitado se lavó con 500  $\mu$ L de etanol al 70%. Acto seguido se centrifugó todo a 7500 g y 4° C durante 5 minutos. El precipitado se disolvió en 20-30  $\mu$ L (dependiendo del tamaño del precipitado) de agua autoclavada con el inhibidor de ARNasas dietil-pirocarbonato (DEPC), y se incubó a 65° C durante 10 minutos en un baño húmedo con temperatura regulable, para asegurar la completa disolución del ARN.

La cantidad de ARN obtenido se determinó por espectrofotometría utilizando el aparato *NANODROP-1000 Spectrophotometer*. La determinación se basa en la medida de la densidad óptica teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40  $\mu$ g/mL de ARN. Se aseguró la ausencia de contaminación proteica, de fenol o ADN, considerando que la relación entre las absorbancias a 260 nm / 280 nm y 260 nm / 230 nm estaba comprendida entre 1,6-1,9 y 1,8-2,2 respectivamente.



#### ◆ Retrotranscripción del ARNm a ADNc

A partir del ARNm obtenido anteriormente se sintetizó el ADNc mediante un cebador complementario de la cola de poliadenina (poli-A) que contiene el ARNm en el extremo 3' (y que está ausente en el resto del ARN celular). Esta secuencia complementaria es la polidesoxitimidina (poli-dT).

Se desnaturalizaron 2 µg de ARN de cada muestra en 27,5 µL de agua DEPC a 65° C durante 3 minutos. A 4 °C añadimos 12,5 µL de una mezcla de reacción compuesta por 2 µl de dNTPs (mezcla equimolar de desoxinucleótidostrifosfato –dATP, dCTP, dGTP y dTTP- 10 mM), 8 µL de tampón *M-MLV* 5X (Tris-HCl 50 mM pH 8,3; KCl 75 µM; MgCl<sub>2</sub> 3 µM; 10 mM DTT), 1 µL de oligo-dT 1µg/µL (oligonucleótido formado por 16 desoxitimidinas que permite “retrotranscribir” únicamente el ARNm), 0,5 µL del inhibidor de ARNasas “RNAsin”, 1µL de la enzima retrotranscriptasa (RT *M-MLV*, 200 unidades/µL). Finalmente se llevó a cabo la reacción de retrotranscripción a 42° C durante 90 minutos en un termociclador. Una vez obtenido el ADNc correspondiente a cada muestra se almacenó a –20° C hasta su análisis.

La concentración de ADNc, que debe ser similar en todas la muestras, se determinó por espectrofotometría utilizando el *NANODROP-1000 Spectrophotometer*. Éste basa su determinación en la medida de la densidad óptica teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 50 µg/mL de ADNc.

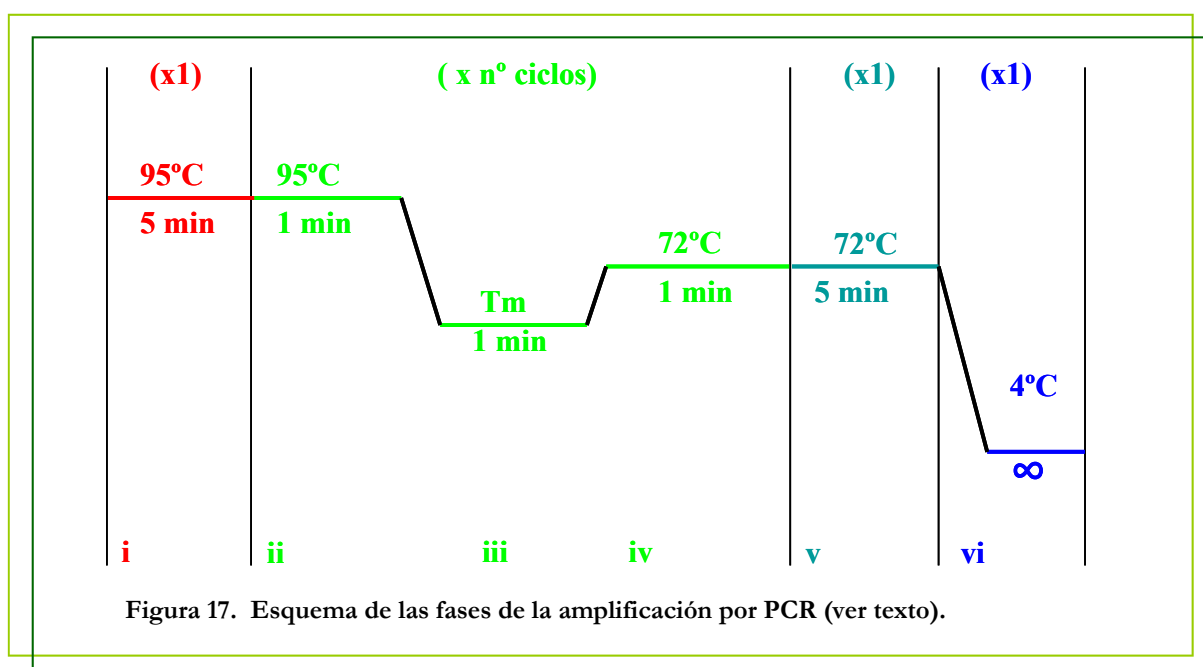
#### ◆ PCR (amplificación de secuencias específicas de ADNc).

Para la amplificación de secuencias específicas de ADNc se utilizó el kit comercial *FastStart Taq DNA polymerase* de Roche. A 1 µL de cada muestra de ADNc se añadieron 49 µL de la mezcla de reacción formada por los siguientes componentes: 5µL de tampón con Mg 10 x, 1 µL de oligonucleótido 3' (cebador directo) y 1 µL de oligonucleótido 5' (cebador inverso) a una concentración de 100 ng/µL en un tampón TE con las secuencias específicas de los genes que se deseaba amplificar (tabla 6), 1 µL de dNTPs 10 mM, 41,6 µL de H<sub>2</sub>O miliQ estéril y 0,4 µL de la enzima polimerasa *Taq Fast Start* 5 unidades/µL.

Las muestras se incubaron en un termociclador *MyCycler™*. Se seleccionó el programa adecuado para cada par de oligonucleótidos añadidos (figura 17). Todos los programas utilizados tenían en común: i) una primera fase de desnaturalización del ADNc utilizado como molde (95°

C durante 5 minutos); ii) una segunda fase de desnaturalización con la que comienza cada ciclo de amplificación (95° C durante 1 minuto); iii) la fase de hibridación de los oligonucleótidos a una temperatura específica para cada par de oligonucleótidos ( $T_m$ , véase la tabla 6), durante 1 minuto); iv) una fase de extensión de la hebra de DNA por la Taq polimerasa (a 72° C durante 1 minuto); y v) una última fase de extensión final que permitía a la enzima sintetizar las hebras inacabadas (72° C durante 5 minutos).

Las fases de la hibridación de los oligonucleótidos y la fase de extensión se repitieron un número de ciclos específico (tabla 6) de cada amplificación entre la primera y la última fase. Lo que varió entre unos programas y otros fue la  $T_m$  y el número de ciclos (tabla 6).



Proteína	$T_m$	Ciclos	Tamaño (pares de bases)
H-Ras	62	35	300
K-Ras4B	62	35	386
K-Ras4A	62	35	412
N-Ras	62	35	183
Colágeno I	52	35	303
GAPDH	60	28	983
Fibronectina	61,5	35	124

Tabla 6. Condiciones de la RT-PCR.  $T_m$  (temperatura de melting, temperatura de fusión), ciclos de amplificación y tamaño del amplicón de cada uno de los genes estudiados.

◆ **Electroforesis en gel de agarosa.**

Una vez realizada la PCR, se añadió a cada muestra amplificada 10  $\mu$ L de tampón de carga (SB) 6x (60% TBE (Tris 0,05 M, ácido bórico 0,05 M, y EDTA 1mM); 40% glicerol; ~0,25% azul de bromofenol). Se cargaron 20  $\mu$ L de la mezcla en pocillos de un gel de agarosa al 2% en TBE pH=8,1-8,3 con bromuro de etidio (0,1  $\mu$ g/mL de gel de agarosa) como colorante intercalante, que permitió visualizar el ADNc a la luz ultravioleta. En uno de los pocillos, se cargó 5  $\mu$ L de marcador de pesos moleculares (100bp *DNA ladder*). La electroforesis se efectuó aplicando al gel un voltaje constante de 110 V en una cubeta llena de TBE.

Para observar las bandas a la luz ultravioleta se colocaron los geles en un transiluminador. Se tomaron fotografías de los geles con el programa *Quantity one 4.6.3*. Las imágenes obtenidas se cuantificaron con el programa *Scion image*.

## 9. Estudio de la movilidad celular

Para estudiar la capacidad de movimiento de los fibroblastos se utilizaron dos técnicas diferentes: medida de la migración de los fibroblastos a través de un *transwell* con un poro de 8  $\mu$ m (migración a través de *transwell*), y medida de la velocidad de los fibroblastos en cerrar heridas realizadas sobre una placa de cultivo confluyente (ensayos de *wound-healing*).

### A. Migración a través de *transwell*

Esta técnica se basa en la capacidad de las células de moverse desde un medio con menor cantidad de suero (DMEM 2% SBF) a un medio con 10% de SBF. En placas de 24 pocillos se colocaron unos recipientes especiales, denominados *transwell*, que tienen en la parte inferior una membrana de policarbonato con un poro de 8  $\mu$ m. Se añadió 1 mL de medio DMEM 10% a cada pocillo y en el *transwell* se sembraron 100000 células en 200  $\mu$ L de DMEM 2% SBF con los inhibidores de Erk o de Akt. Transcurridas 12, 24 y 48h se retiraron los *transwell* y se eliminaron las células de la parte de la membrana en contacto con el interior del *transwell* (células que no han migrado). A continuación se cuantificó el número de células que han migrado (pegadas en la parte exterior de la membrana) mediante la tinción con cristal violeta de la forma descrita en el apartado 4.

## B. Cierre de heridas “*in vitro*” (*wound healing*)

Los fibroblastos se sembraron en placas de 100mm hasta alcanzar la confluencia. Se deplectaron de SBF y tras 24 horas se realizaron varias incisiones en línea recta con una punta de pipeta esteril para simular una herida. Se renovó el medio de cultivo en ausencia o presencia de los inhibidores de Erk y Akt, añadidos 30 minutos antes de realizar las heridas, y se monitorizó el área de las heridas usando un microscopio termostatzado a 37°C con atmósfera de CO<sub>2</sub> del 5%, con el cual se realizaron microfotografías de 100 aumentos de cada sección hasta el cierre total de las mismas. Cada 4 horas medimos el área de la herida y realizamos una curva del cierre de las heridas con respecto al tiempo.

## 10. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Los resultados son la media de al menos 3 experimentos; en los experimentos de proliferación celular y los de síntesis de proteínas colágenas, cada valor aislado corresponde a la media de un triplicado. Los cambios porcentuales se obtuvieron en cada experimento con respecto a su propio valor basal.

Cuando se compararon exclusivamente dos medias se utilizó el test de la *t de Student*, distribución de variable continua apropiada para calcular el intervalo de confianza de la media de la población cuando no se conoce la varianza de ésta, y el tamaño de muestra es tan pequeño que no permite una buena estimación de la varianza de la población (también es muy empleado en la teoría del contraste de hipótesis). Se consideró la existencia de resultados significativos si  $p < 0,05$ .

Cuando se trataba de comparar varias distribuciones de valores, se utilizó el análisis de la varianza, que nos permite contrastar la igualdad entre dos o más medias poblacionales utilizando muestras diferentes; estudia la variación entre medias, lo cual se mide por una varianza. Este análisis de la varianza se hizo de doble vía, ya que tenemos dos variables a comparar: el tipo celular (WT y KO) y el tratamiento (células control y tratadas); además, este análisis nos da información sobre el efecto del tratamiento en cada tipo celular (interacción).



## RESULTADOS



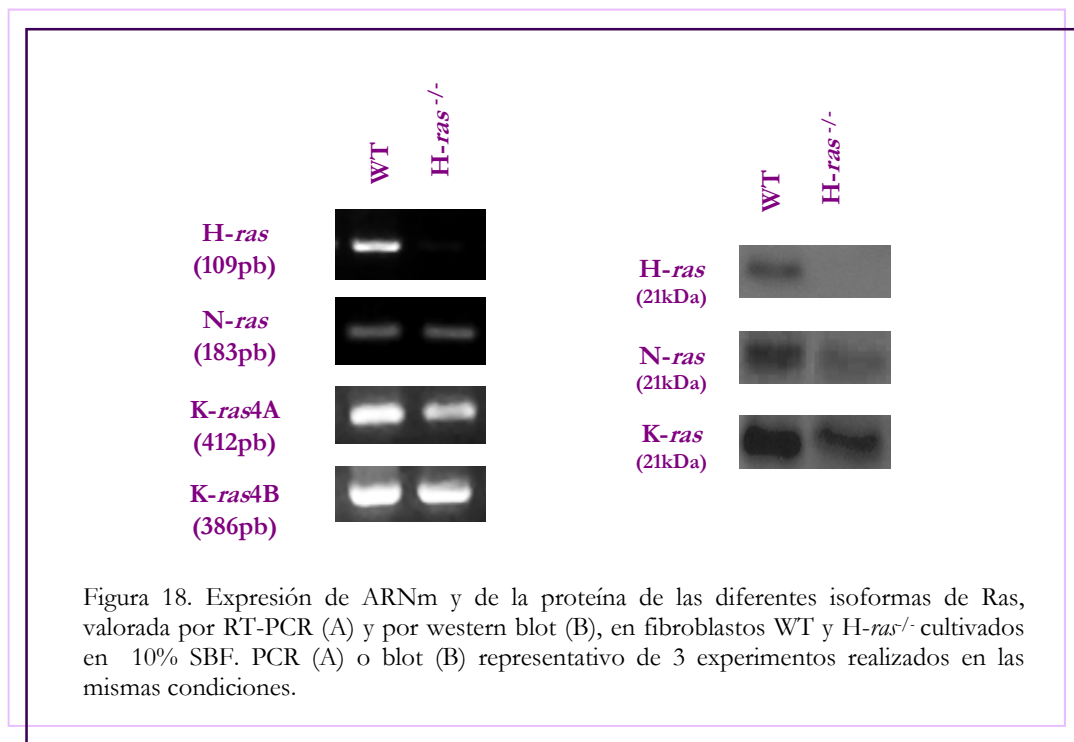
## FIBROBLASTOS *H-ras*<sup>-/-</sup>

### 1. Caracterización de las células

Las fibroblastos KO de H-Ras (*H-ras*<sup>-/-</sup>) utilizados en este estudio son fibroblastos inmortalizados procedentes de embriones de ratones KO para el gen de *H-ras*. Como controles (WT) hemos utilizado fibroblastos embrionarios inmortalizados que expresan las 3 isoformas de Ras. Para los experimentos de caracterización celular, hemos cultivado los fibroblastos en un medio DMEM con 10% de SBF hasta que alcanzaron una confluencia de un aproximadamente 80% .

#### A. Expresión de las isoformas de Ras

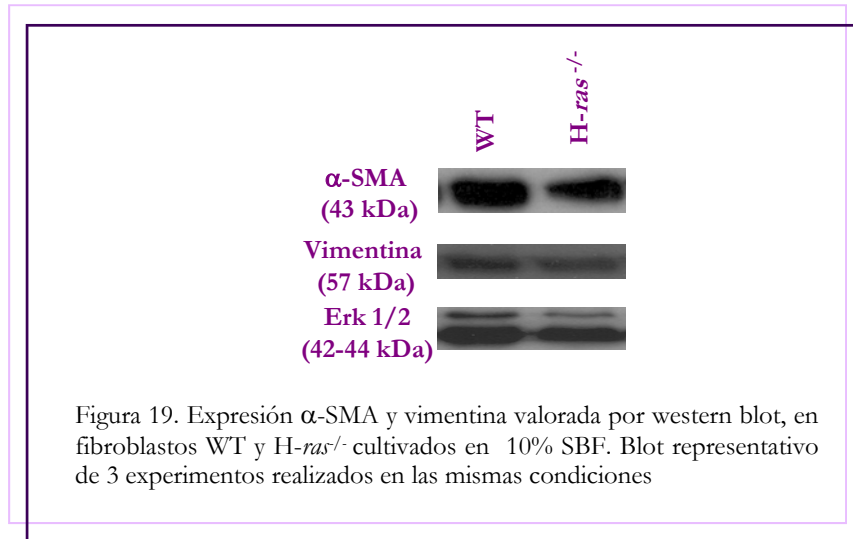
Valoramos la expresión de las 3 isoformas de Ras, H-Ras, N-Ras y K-Ras - en sus dos variantes de ensamblaje alternativo, 4A y 4B - tanto por PCR como por western blot (figura 18). Como cabía esperar, la isoforma H-Ras no se expresa en los fibroblastos procedentes de embriones *H-ras*<sup>-/-</sup>; además, no encontramos diferencias significativas en la expresión ni de K-Ras, ni de N-Ras, por lo que no parece existir una sobreexpresión destacable de las otras isoformas de Ras para suplir la ausencia de H-Ras.





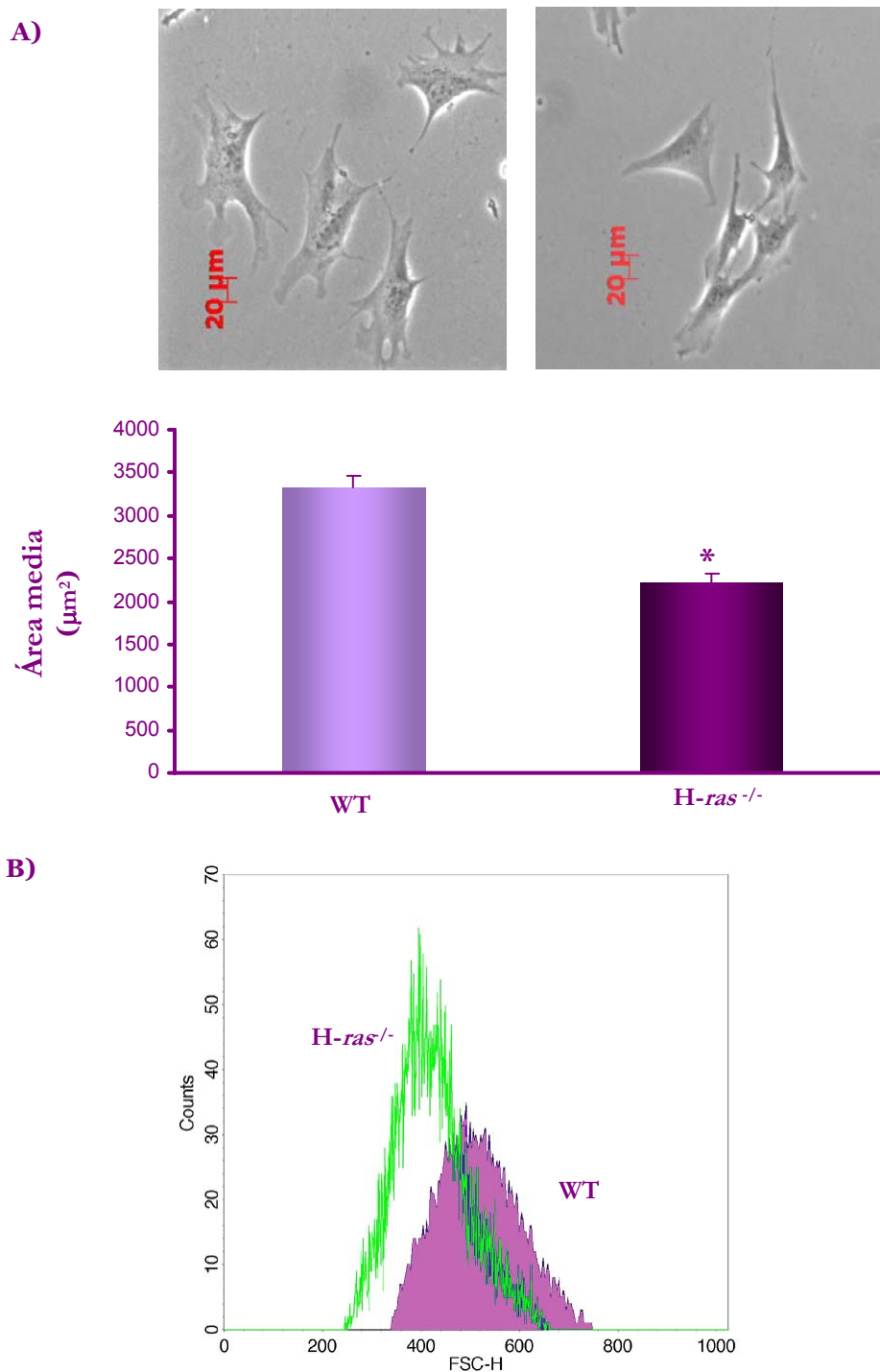
## B. Expresión de marcadores de miofibroblastos

Analizamos mediante western-blot la expresión de vimentina y  $\alpha$ -actina de músculo liso vascular ( $\alpha$ -SMA) como marcadores de miofibroblastos (figura 19). Tanto los fibroblastos *H-ras*<sup>-/-</sup> como los WT expresan ambos marcadores en cantidades similares.



## C. Tamaño celular

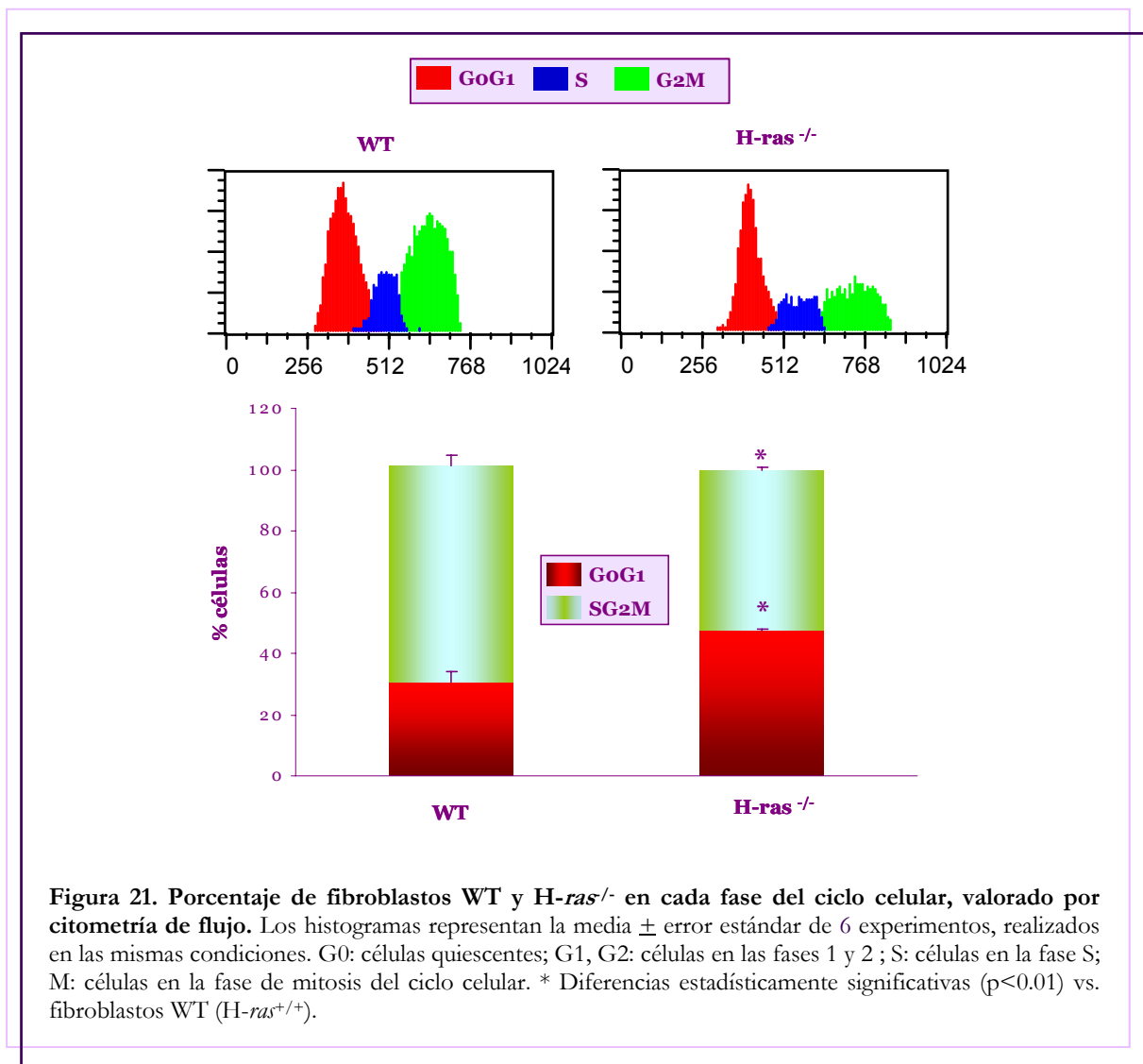
Durante el desarrollo del trabajo de investigación, hemos observado que los fibroblastos KO de H-Ras tienen un menor tamaño que los fibroblastos controles. Para comprobarlo, realizamos microfotografías con un microscopio termostatzado, en el que mantenemos la temperatura a 37°C para evitar la contracción celular, y medimos la superficie plana aparente de las células. Como se observa en la figura 20A, los fibroblastos WT son más grandes que los fibroblastos KO de H-Ras. Además, mediante citometría de flujo comprobamos que la ausencia de H-Ras produce una disminución en el tamaño celular de los fibroblastos en cultivo (figura 20) ya que se observa un desplazamiento hacia la izquierda de la población de células correspondiente a los fibroblastos *H-ras*<sup>-/-</sup>, indicativo de un menor tamaño celular. Estos datos están de acuerdo con resultados previos de nuestro laboratorio donde observamos que miocardiocitos y células de músculo liso procedentes de las arterias extraídas de ratones *H-ras*<sup>-/-</sup> tienen un tamaño también menor (resultados no mostrados). Por tanto, la ausencia de H-Ras parece producir “hipotrofia celular”, que podría estar asociada a una disminución en la síntesis de proteínas en cada ciclo celular.



**Figura 20. Tamaño celular valorado por microscopía óptica (A) y mediante citometría de flujo (B).** (A) Área promedio de 20 células cultivadas en 10% SBF; el panel superior muestra una microfotografía representativa de cada tipo celular (aumentos 200X). (B) Esquema representativo del tamaño celular (FSC-H: forward scatter) frente al número de células (counts). \* Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) vs. fibroblastos WT.

## D. Ciclo celular

Analizamos la existencia de alteraciones en el ciclo celular de fibroblastos KO de H-Ras mediante citometría de flujo (figura 21). Nuestros resultados muestran una reducción significativa en el porcentaje de células en las fases S, G2 y M en los fibroblastos *H-ras*<sup>-/-</sup> con respecto a los fibroblastos WT.

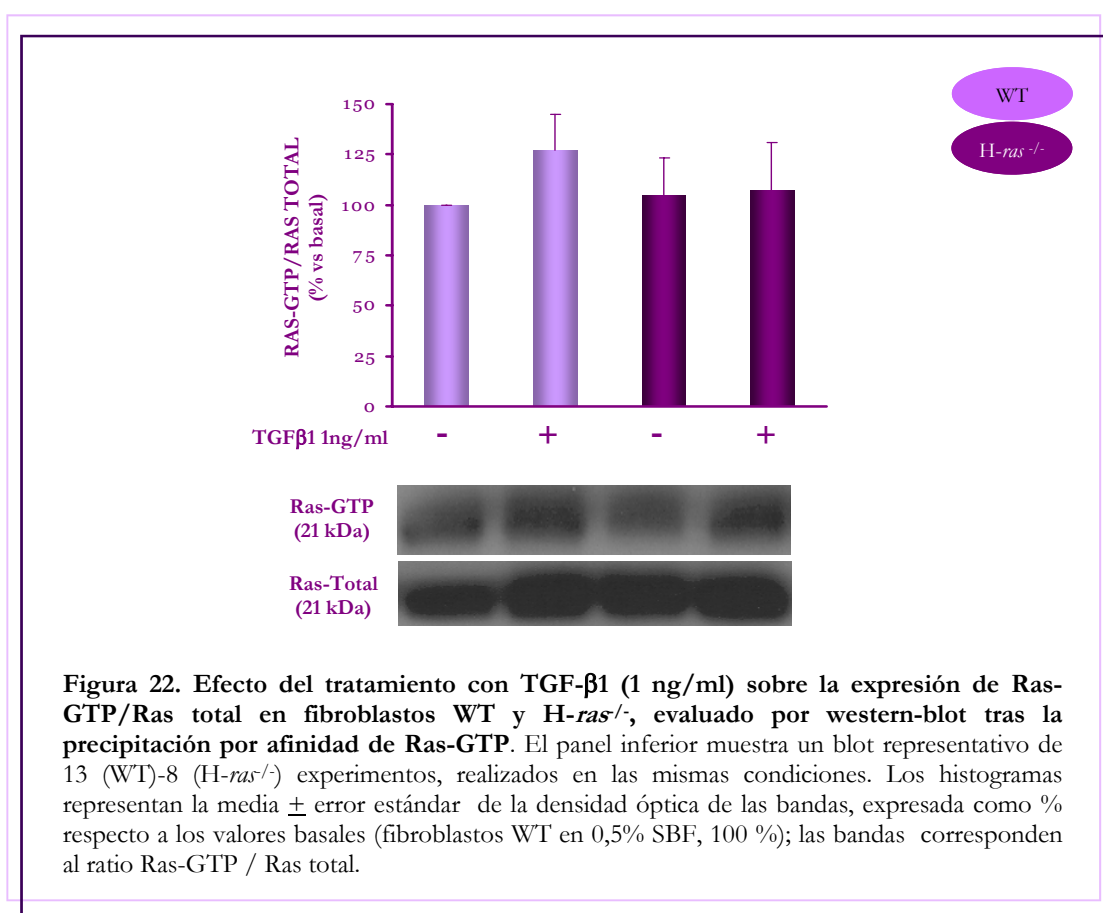


## 2. Expresión de Ras activado (Ras-GTP)

Para estudiar la activación de Ras realizamos una precipitación por afinidad de Ras-GTP con Raf (pull-down de Ras) en fibroblastos KO de H-Ras y en sus controles; los extractos celulares obtenidos por precipitación se analizaron por western blot. También hemos analizado el efecto del tratamiento con TGF- $\beta$ 1 sobre la expresión de Ras activado. Estudios previos de

nuestro grupo de investigación mostraron que una concentración de 1 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 induce un efecto profibrogénico y proliferativo significativo en fibroblastos dobles KO para N y H-Ras a las 24 horas de tratamiento (Martínez-Salgado y cols., 2006); por ello hemos elegido esta concentración y este tiempo de estimulación para el presente estudio.

No se observan diferencias significativas ni en la expresión ni en la activación de Ras en los fibroblastos KO de H-Ras con respecto a los fibroblastos controles. El tratamiento con TGF- $\beta$ 1 no produce efectos significativos sobre la activación de Ras en los dos tipos celulares (figura 22).

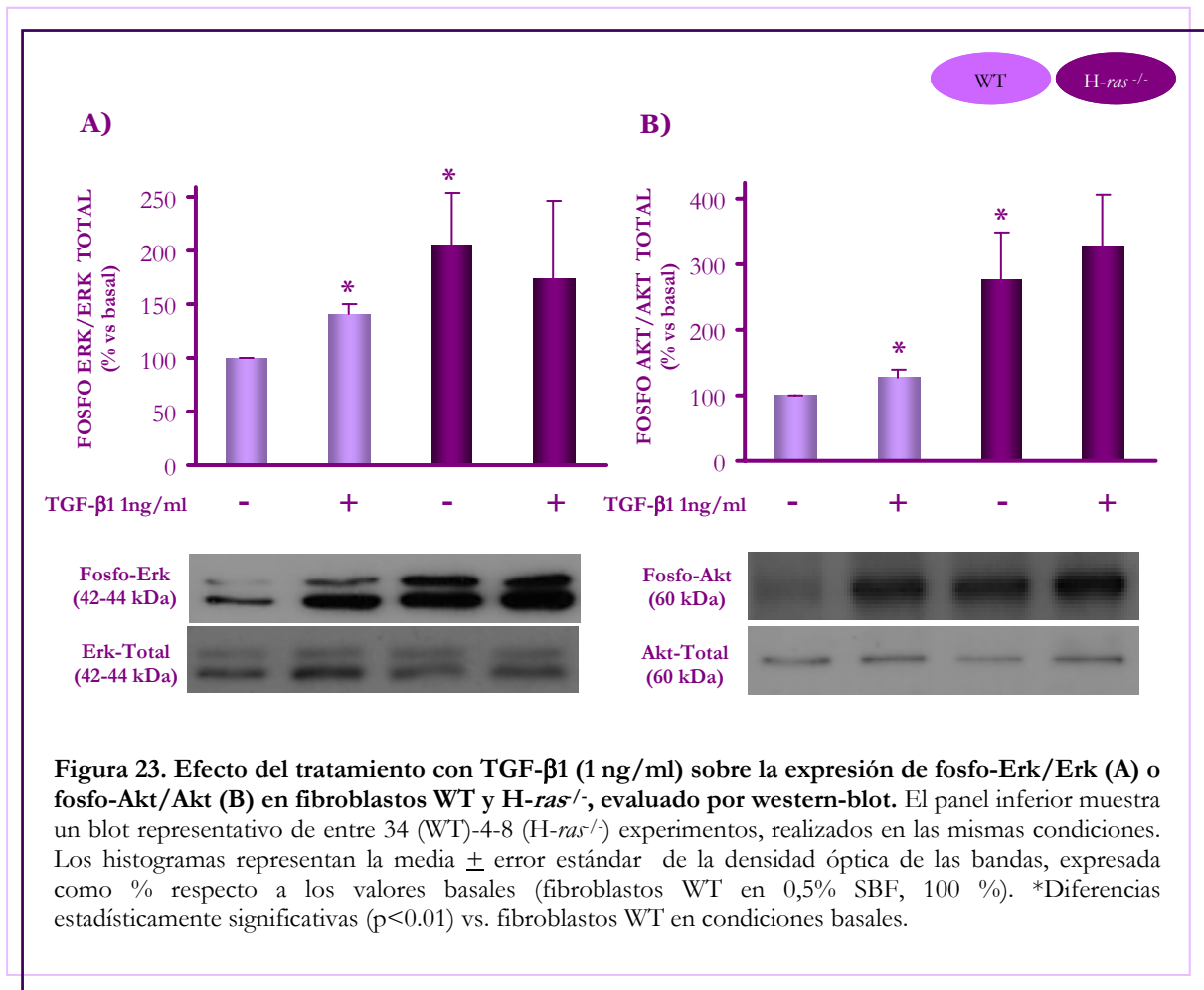


### 3. Activación de los efectores de Ras

Dos de los efectores más importantes de Ras son la ruta de las MAPKs/Erk y la ruta de PI3K/ Akt. Por ello, hemos analizado mediante western-blot la expresión de las formas fosforiladas de Erk, fosfo-Erk, y de Akt, fosfo-Akt, en fibroblastos KO de H-Ras, así como el efecto del tratamiento con TGF- $\beta$ 1 a las 24 horas.

### A. Ruta de MAPKs: activación de Erk

Aunque la proporción de Ras-GTP no varía en los fibroblastos *H-ras*<sup>-/-</sup>, la expresión de fosfo-Erk es significativamente mayor en los fibroblastos KO de H-Ras que en los fibroblastos WT en condiciones basales; por otro lado, el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 produce un aumento significativo en la fosforilación de Erk en los controles, pero no en las células KO (figura 23).



### B. Ruta de PI3K: activación de fosfo-Akt

También observamos un aumento significativo de la expresión de fosfo-Akt en los fibroblastos KO de H-Ras en condiciones basales con respecto a los controles. Además, el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 induce un incremento en la expresión de fosfo-Akt en los fibroblastos WT, pero no en los fibroblastos KO (figura 23).

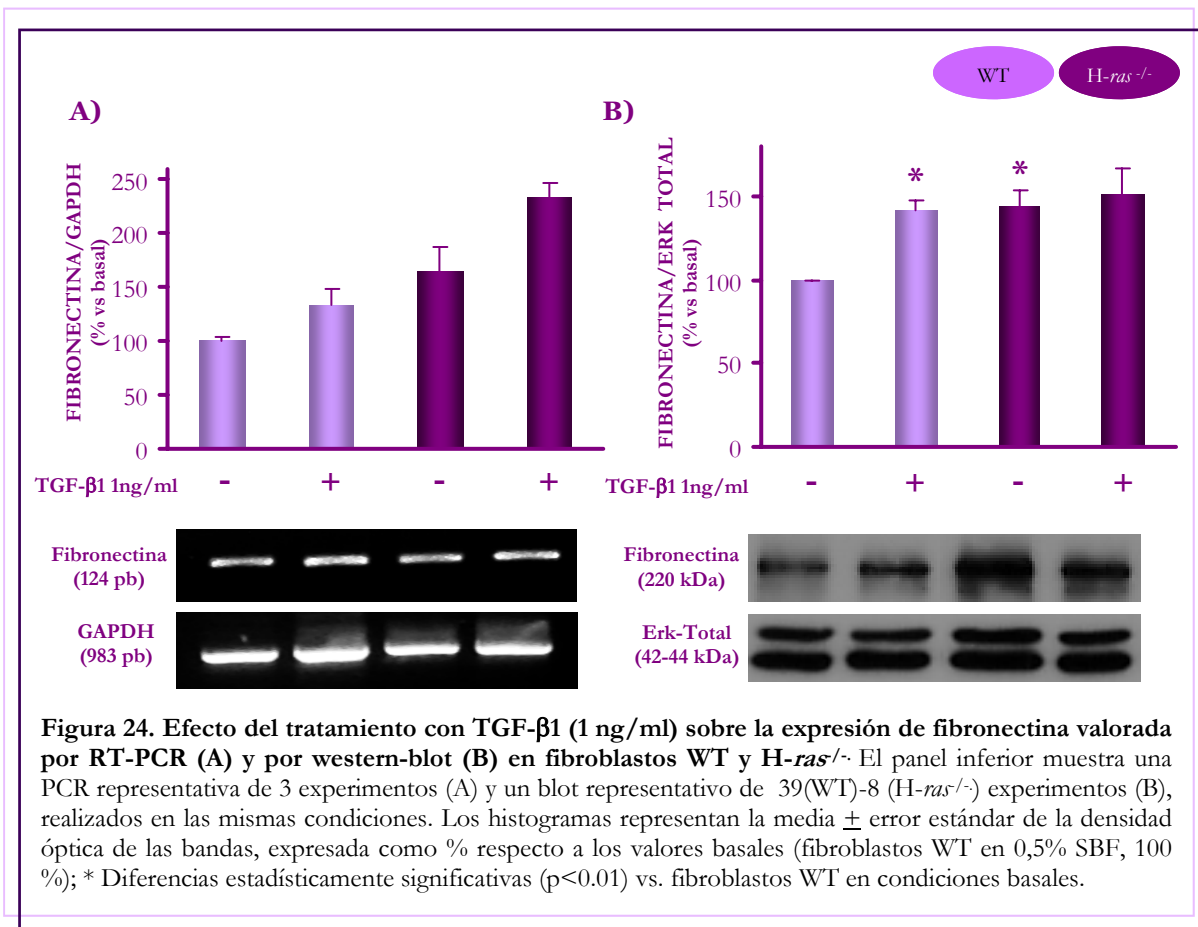
## 4. Expresión y síntesis de proteínas de MEC

### A. Efecto del tratamiento con TGF- $\beta$ 1 sobre la expresión de proteínas de MEC.

Hemos estudiado la expresión de 2 proteínas características de MEC, como son la fibronectina y el colágeno tipo I, así como la síntesis de proteínas colágenas totales, en fibroblastos KO de H-Ras y en sus respectivos controles tipo silvestre; también hemos analizado el efecto del tratamiento con TGF- $\beta$ 1 1ng/ml sobre la expresión de estas proteínas de MEC para comprobar si la ausencia de H-Ras altera su acumulación.

#### ◆ Fibronectina

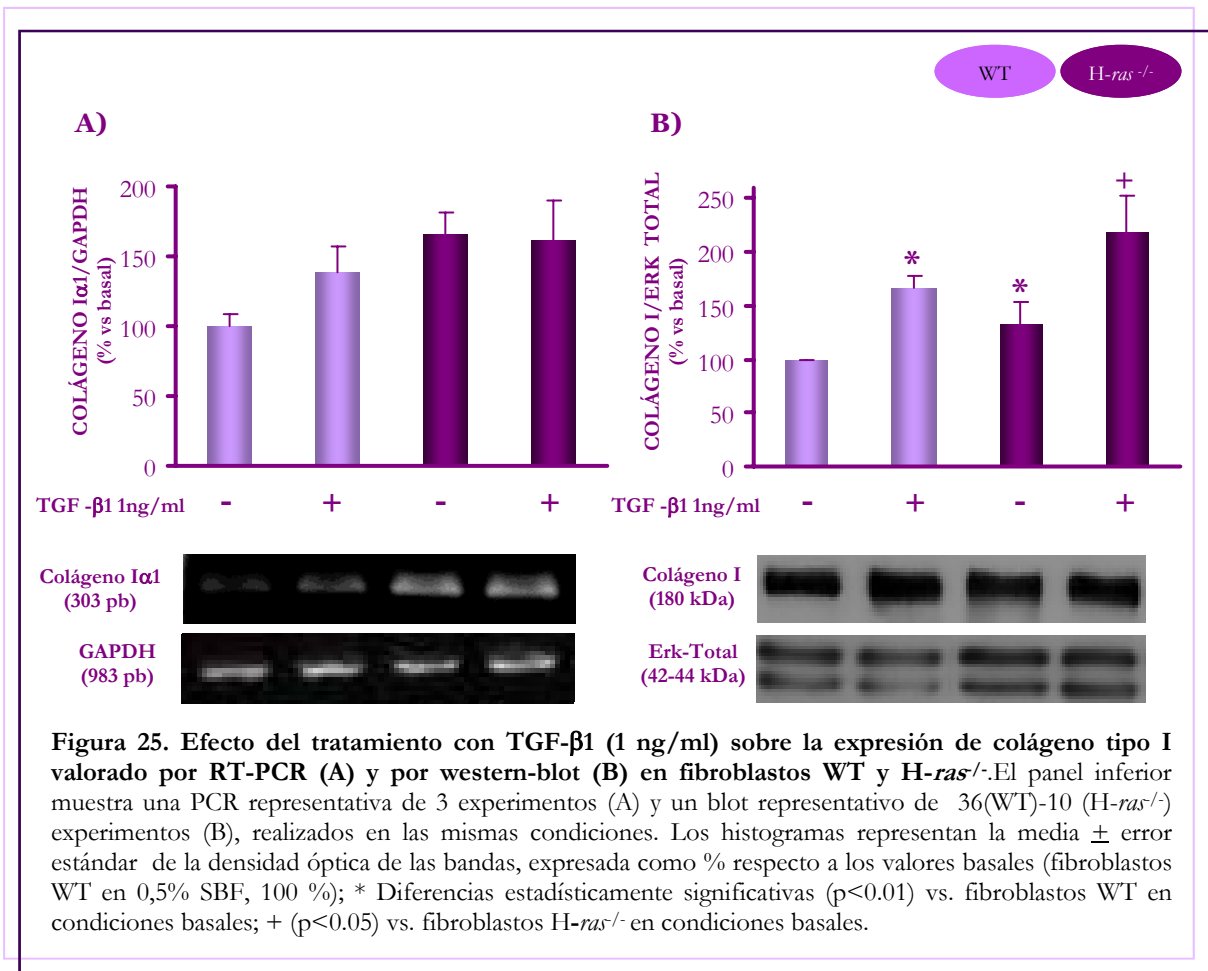
La expresión de fibronectina la hemos valorado por RT-PCR y por western blot en fibroblastos mantenidos en un medio sin suero (condiciones basales) y en fibroblastos tratados con TGF- $\beta$ 1 1 ng/ml durante 24 horas (figura 24). La expresión del ARNm es mayor en condiciones basales en los fibroblastos KO de H-Ras con respecto a los controles WT y se corresponde con una mayor expresión de fibronectina. Por otro lado, el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 produce un incremento en la expresión de fibronectina sólo en los fibroblastos WT.



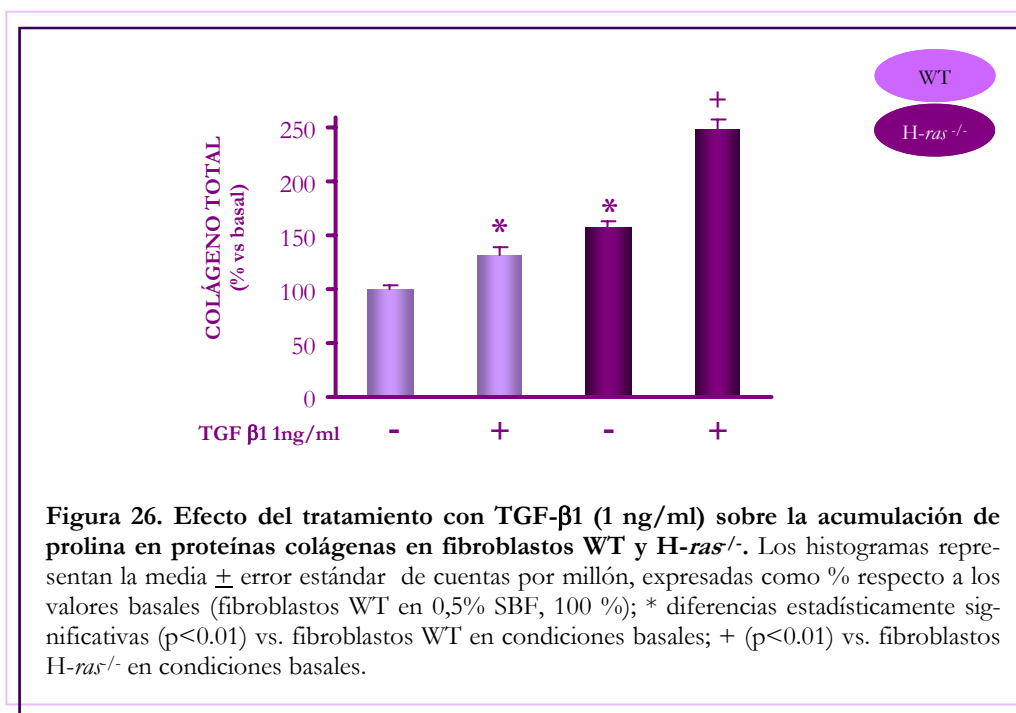
### ◆ Colágeno

La expresión de colágeno se analizó de dos formas diferentes: por un lado, se cuantificó por RT-PCR y western blot la expresión de colágeno tipo I y por otra parte, se valoró la síntesis de colágeno total mediante la medida de la incorporación de prolina tritiada a proteínas colágenas en el medio de cultivo.

En condiciones basales, la expresión de colágeno tipo I es significativamente mayor en los fibroblastos KO que en los fibroblastos WT. Además, el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 estimula la síntesis de colágeno tipo I en ambos tipos celulares (figura 25), aunque esta estimulación no se corresponde con una mayor expresión del ARN mensajero de colágeno tipo I en las células KO.



La síntesis de proteínas colágenas es mayor en células KO que en células WT. Además, el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 estimula la síntesis de colágeno total, siendo este incremento significativamente mayor en los fibroblastos KO (figura 26).



Los resultados obtenidos parecen indicar una regulación por parte de la isoforma H-Ras de la síntesis de MEC, ya que en ausencia de H-Ras existe una sobreexpresión de proteínas de MEC. El tratamiento con TGF- $\beta$ 1 estimula la síntesis de MEC en ambos tipos celulares; sin embargo el aumento en la expresión de fibronectina inducida por TGF- $\beta$ 1 no se produce en ausencia de H-Ras, lo cual parece sugerir la implicación de dicha isoforma en la expresión de fibronectina inducida por TGF- $\beta$ 1.

A continuación quisimos estudiar el papel de los efectores de Ras: MAPK/Erk y PI3K/Akt sobre la producción de estas proteínas en ausencia de la isoforma H-Ras.

## B. Papel de la vía de Erk en la expresión de proteínas de MEC

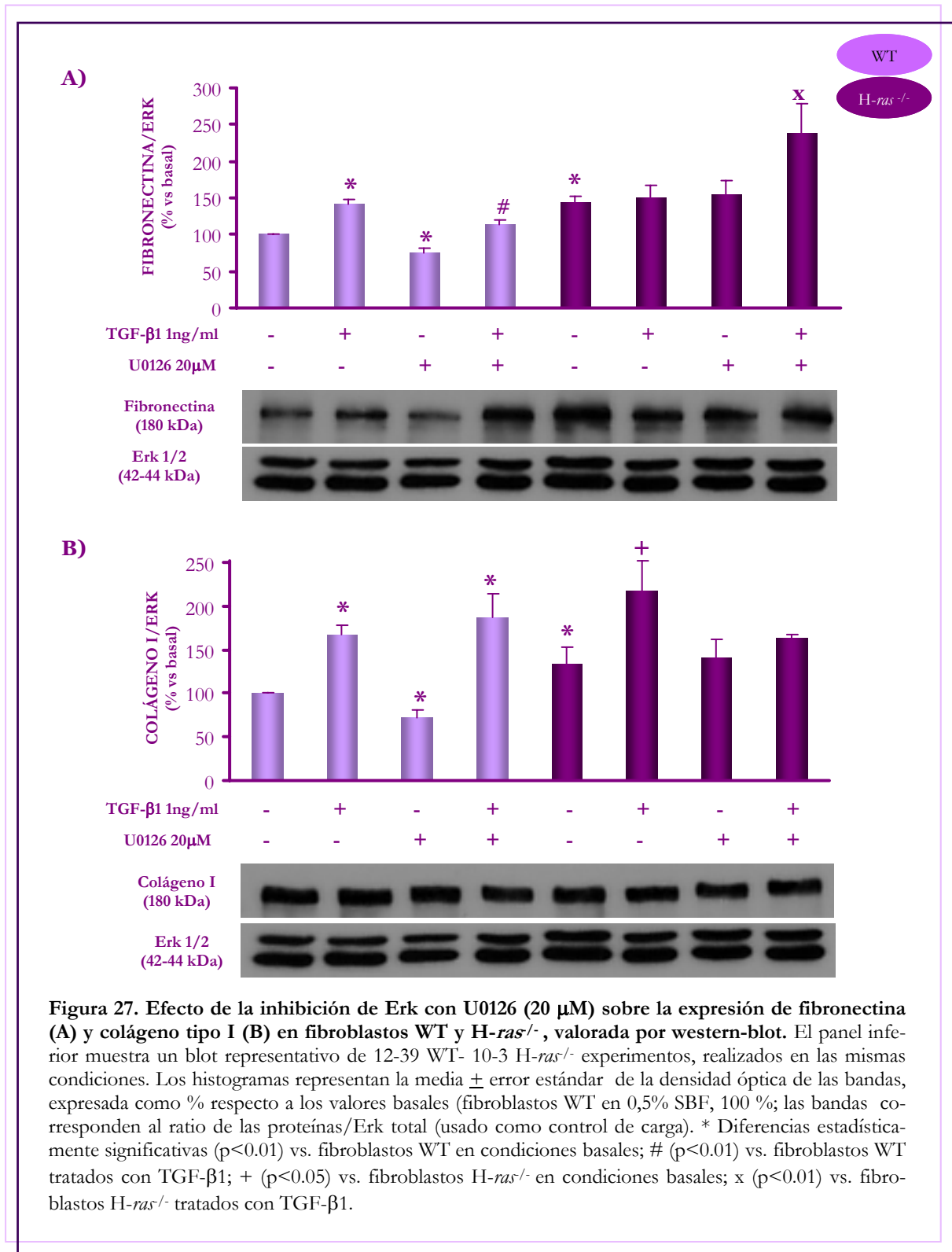
Comprobamos el efecto de la inhibición de fosfo-Erk sobre la expresión de fibronectina y colágeno tipo I añadiendo, 30 minutos antes del tratamiento con TGF- $\beta$ 1 1 ng/ml, el inhibidor de MEK U0126 a la concentración de 20  $\mu$ M durante 24 horas.

### ◆ Fibronectina

Anteriormente hemos descrito que el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 produce un aumento en la expresión de fibronectina en las células WT que no se observa en las células KO de H-Ras. La co-incubación de TGF- $\beta$ 1 con el inhibidor de Erk durante 24h produce una disminución signifi-



cativa en la expresión de fibronectina en fibroblastos WT, mientras que en fibroblastos KO produce un aumento en la expresión de fibronectina inducida por TGF- $\beta$ 1 (figura 27).



Estos datos sugieren que la expresión de fibronectina inducida por TGF- $\beta$ 1 podría ser en parte dependiente de H-Ras y de la vía de Erk; en ausencia de la isoforma H-Ras el TGF- $\beta$ 1 induce una mayor expresión de fibronectina cuando la fosforilación de Erk se encuentra inhibida.

#### ◆ Colágeno tipo I

El inhibidor de MEK U0126 solamente inhibe la expresión de colágeno tipo I inducida por TGF- $\beta$ 1 en los fibroblastos H-*ras*<sup>-/-</sup> (figura 27). Sin embargo, la expresión basal de colágeno tipo I se reduce al inhibir la ruta Erk en fibroblastos WT, pero no en ausencia de H-Ras. Por tanto, la expresión de colágeno tipo I inducida por TGF- $\beta$ 1 es dependiente de fosfo-Erk sólo en ausencia de H-Ras, mientras que esta isoforma de Ras es necesaria para la regulación de la expresión de esta proteína en condiciones basales a través de Erk.

### C. Papel de la vía de Akt en la expresión de proteínas de MEC

Determinamos el efecto de la inhibición de fosfo-Akt sobre la expresión de fibronectina y colágeno tipo I inducida por TGF- $\beta$ 1 co-incubando esta citocina con el inhibidor de la PI3K, LY294002 20 $\mu$ M durante 24 horas, añadiendo este inhibidor 30 minutos antes del tratamiento con TGF- $\beta$ 1.

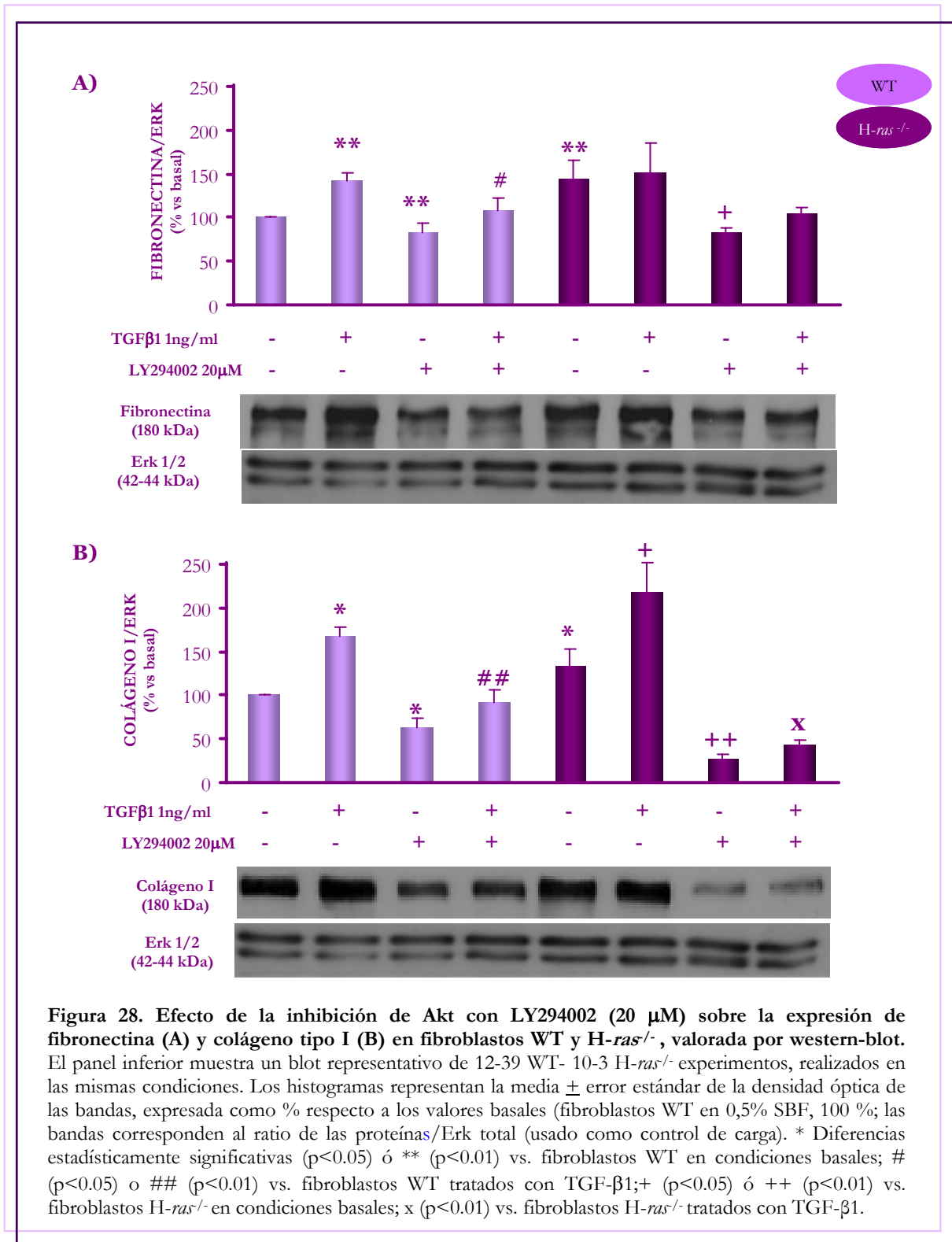
#### ◆ Fibronectina

El aumento de fibronectina producido por el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 en fibroblastos WT se ve afectado por la inhibición de la PI3K, disminuyendo la expresión de esta proteína hasta niveles basales, aunque en los fibroblastos KO de H-Ras esta disminución no es significativa. Además, en ambos tipos celulares observamos una disminución significativa de los niveles basales de fibronectina tras la inhibición de Akt. Estos datos sugieren que la síntesis de fibronectina inducida por TGF- $\beta$ 1 es dependiente de Akt y que la isoforma H-Ras podría participar en la regulación de la expresión basal de fibronectina (figura 28).

#### ◆ Colágeno tipo I

La inhibición de la vía de Akt revierte el efecto inductor del TGF- $\beta$ 1 sobre la síntesis de colágeno tipo I en ambos tipos celulares (figura 28). Al igual que ocurre con la expresión de fibronectina, la activación de la vía de Akt parece jugar un papel importante en la expresión de

colágeno tipo I inducido por TGF- $\beta$ 1, expresión que parece ser independiente de la isoforma H-Ras.

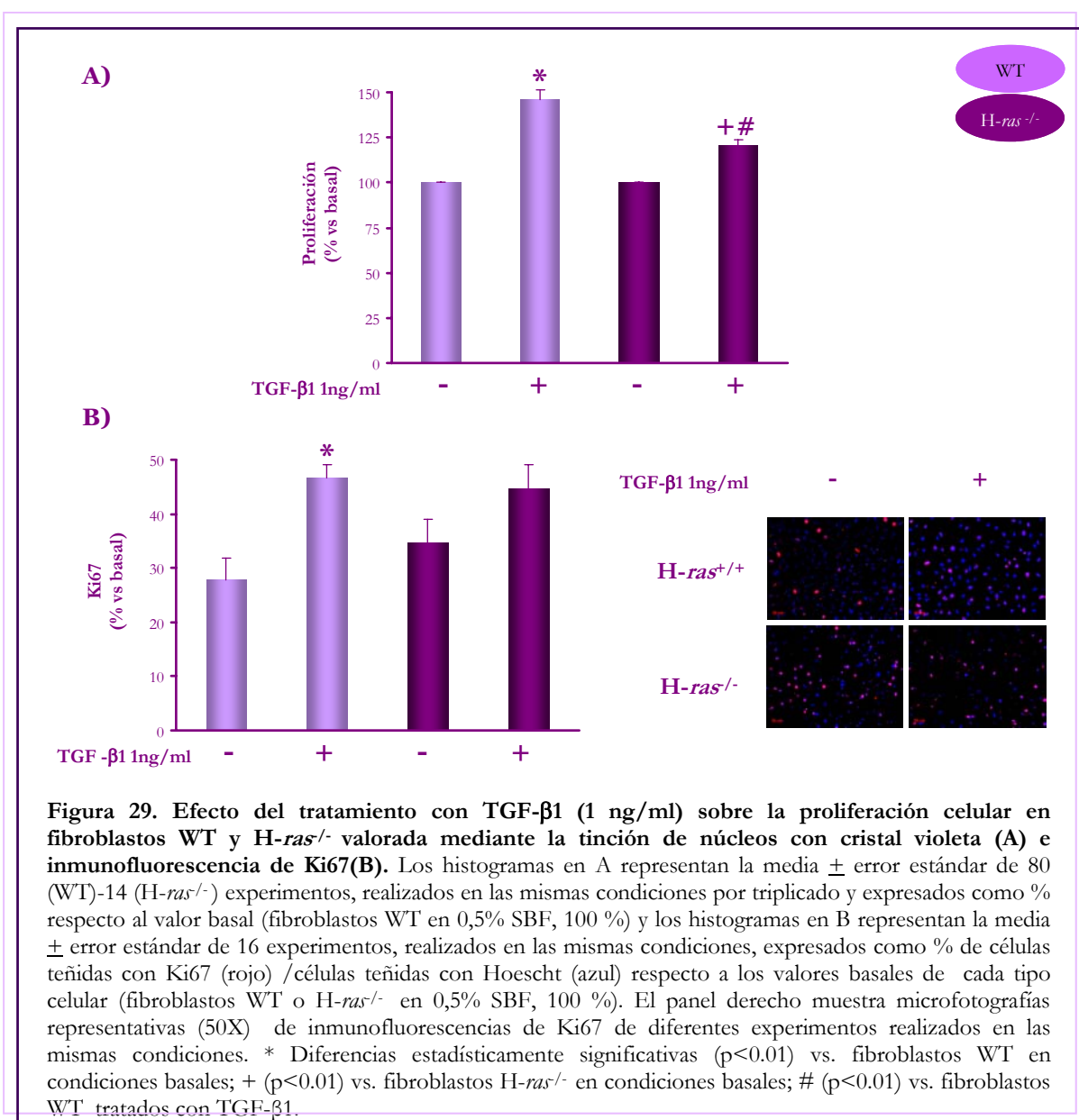


Nuestros datos parecen indicar la participación de la vía de Akt en la expresión de fibronectina y colágeno tipo I en fibroblastos, mientras que la vía de Erk parece participar solamente en la síntesis de fibronectina inducida por TGF- $\beta$ 1, siendo su efecto opuesto dependiendo de que la isoforma H-Ras esté o no presente.

## 5. Estudios de proliferación celular

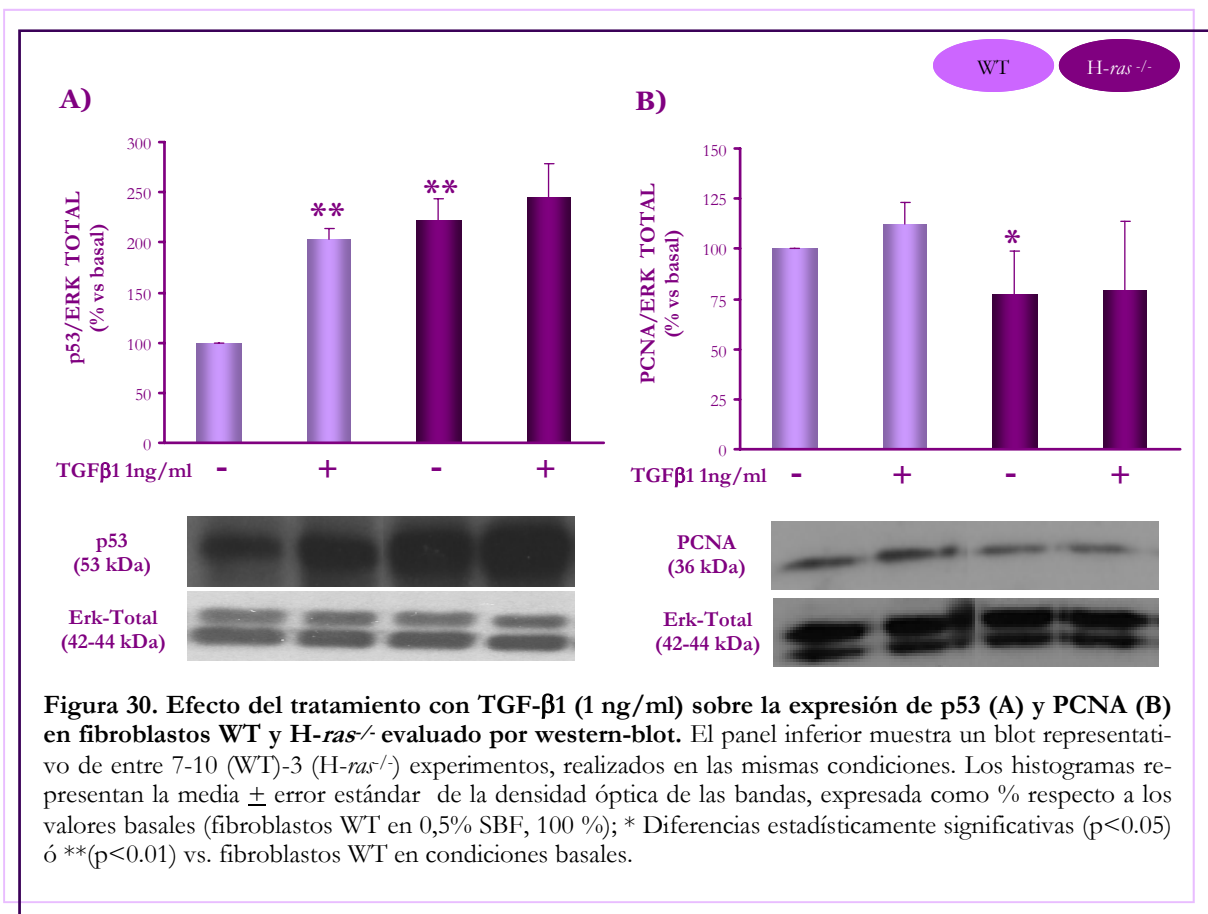
### A. Efecto del tratamiento con TGF- $\beta$ 1 sobre la proliferación celular

El efecto del tratamiento con TGF- $\beta$ 1 sobre la proliferación celular ha sido evaluado por la técnica colorimétrica de tinción de núcleos con cristal violeta y mediante inmunofluorescencia



del antígeno de proliferación nuclear Ki67, que se expresa en el núcleo de las células que están en división. Ambos métodos muestran que el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 induce proliferación en los dos tipos celulares, siendo este incremento significativamente inferior en los fibroblastos KO de H-Ras (figura 29).

Por otro lado, analizamos mediante western blot la expresión de PCNA, proteína marca-dora de proliferación celular y la expresión de p53, proteína implicada en el ciclo celular. La ex-presión del PCNA en los fibroblastos H-*ras*<sup>-/-</sup> es significativamente inferior que en los fibroblas-tos WT, y además, el TGF- $\beta$ 1 no tiene efecto sobre la expresión de PCNA ni en fibroblastos controles ni en fibroblastos KO (figura 30). Sin embargo, la expresión de p53 es notablemente mayor en los fibroblastos KO de H-Ras; además, el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 aumenta la ex-presión de p53 en los fibroblastos controles, pero este efecto desaparece en los fibroblastos H-*ras*<sup>-/-</sup> (figura 30).



Todos los datos obtenidos nos indican una menor proliferación inducida por TGF- $\beta$ 1 en fibroblastos KO de H-Ras. Además la ausencia de H-Ras en condiciones basales provoca una

disminución de PCNA y del número de células viables, así como un aumento en la expresión de p53 que podría inducir una parada del ciclo celular y reducir así la proliferación.

Una vez analizada la participación de H-Ras en la proliferación quisimos comprobar la regulación de fosfo-Erk y fosfo-Akt en estos procesos.

### **B. Papel de la vía de Erk en la proliferación celular**

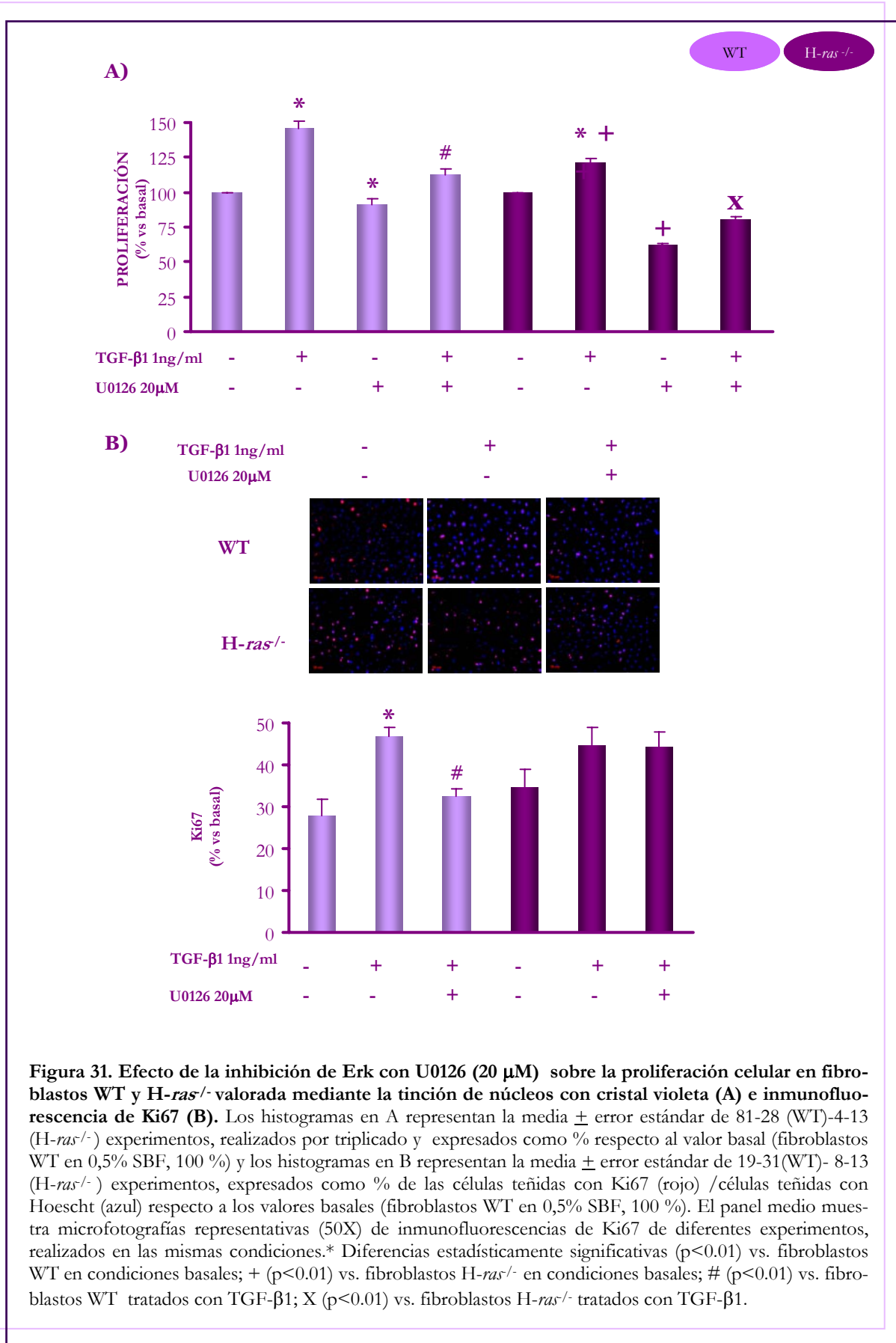
Hemos estudiado la posible implicación de la vía de Erk en la proliferación inducida por TGF- $\beta$ 1. Para ello, repetimos los experimentos anteriores añadiendo el inhibidor de la fosforilación de Erk (U0126) 30 minutos antes del tratamiento con TGF- $\beta$ 1. Cuantificamos la proliferación celular mediante la tinción de núcleos con cristal violeta, observando como la inhibición de la vía de Erk elimina el efecto proliferativo del TGF- $\beta$ 1 tanto en presencia como en ausencia de H-Ras. Sin embargo, la expresión de Ki67 inducida por el TGF- $\beta$ 1 sólo disminuye tras la inhibición de Erk en presencia de H-Ras (figura 31).

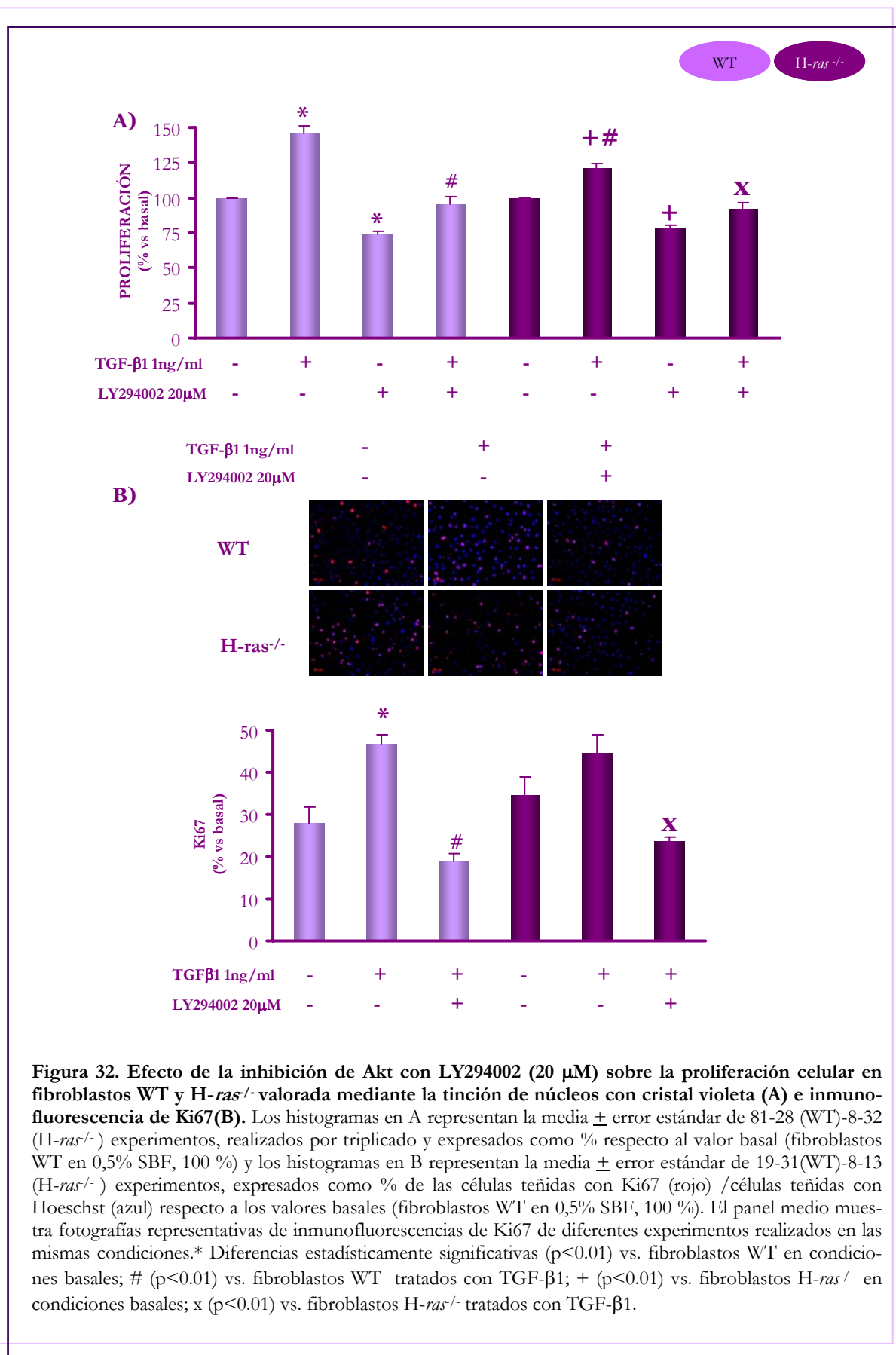
Todos estos datos muestran la participación de la vía de Erk en la proliferación celular inducida por TGF- $\beta$ 1. Además, parecen indicar que H-Ras es necesaria para que Erk regule la expresión nuclear de Ki67.

### **C. Papel de la vía de Akt en la proliferación celular**

Para comprobar si la ruta de PI3K-Akt está implicada en la proliferación celular inducida por el TGF- $\beta$ 1 en fibroblastos, pre-tratamos las células con el inhibidor de PI3K (LY294002) y evaluamos la proliferación celular mediante tinción con cristal violeta e inmunofluorescencia de Ki67; el aumento proliferativo producido por el tratamiento con TGF- $\beta$ 1, observado mediante las dos técnicas utilizadas, desaparece al co-incubar con LY294002 tanto en los fibroblastos WT como los H-*ras*<sup>-/-</sup> (figura 32).

Por tanto, la activación de Akt es crucial para que TGF- $\beta$ 1 induzca un aumento en la proliferación de fibroblastos. Además esta vía parece ser independiente de que H-Ras esté presente.







## 6. Estudios de migración celular

Para determinar si existen deficiencias en la movilidad de los fibroblastos KO de H-ras en cultivo hemos realizado ensayos de cierre de heridas *in vitro* y de migración a través de la cámara de Boyden.

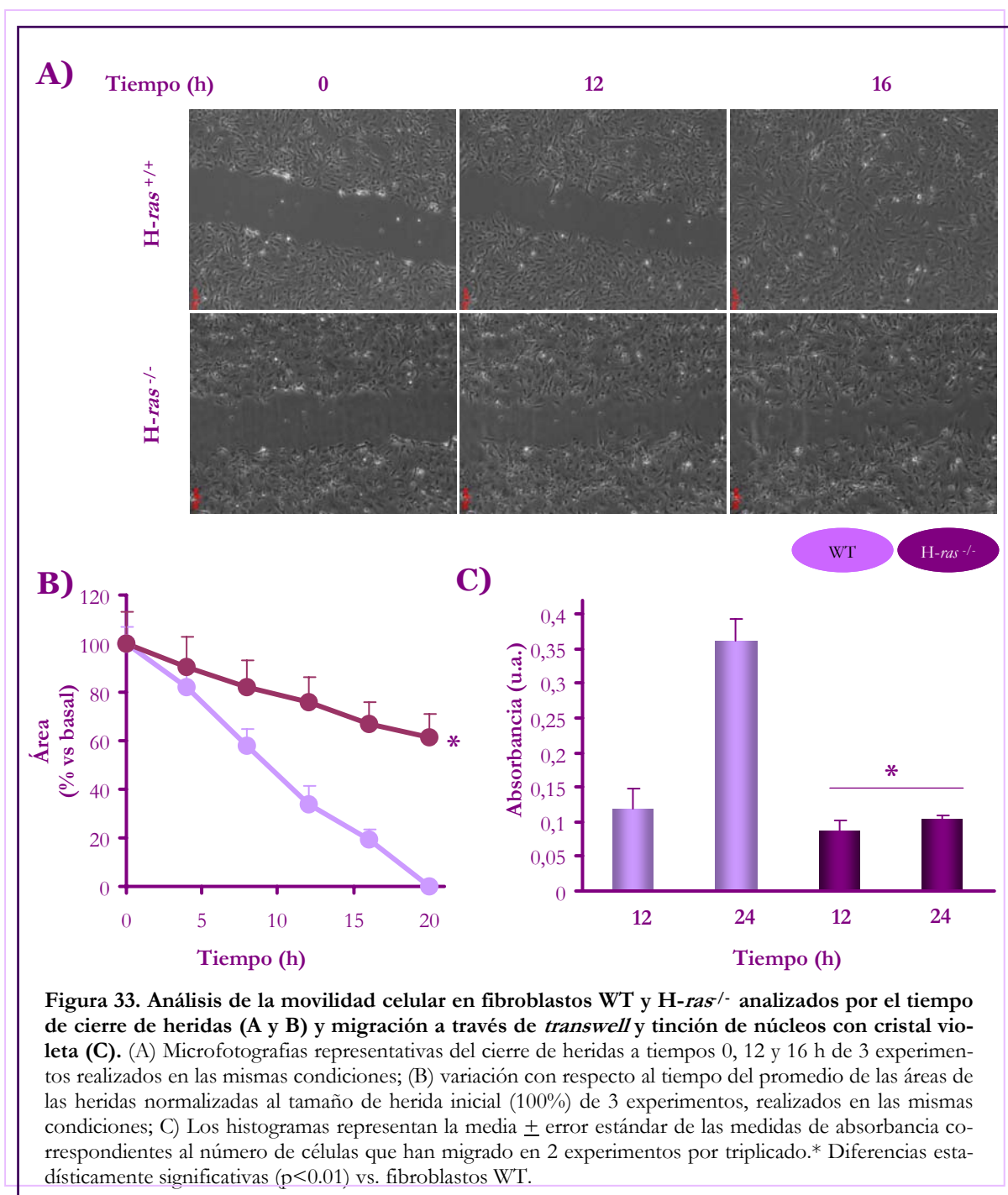
Para los ensayos de cicatrización sembramos fibroblastos KO y WT en placas de 60 mm, de forma que en 24 horas se encontraban en semi-confluencia. Tras otras 24 horas de depleción, añadimos el medio de cultivo con 0,5% de suero (basal) o en combinación con los inhibidores de Erk o de Akt 30 minutos antes de realizar varias líneas (heridas) de unas 250 micras de anchura en la monocapa de células mediante una punta de pipeta estéril; a continuación, en un microscopio termostatzado seguimos el cierre de las heridas capturando imágenes cada 20 minutos.

### A. Condiciones basales (0,5% SBF)

Los fibroblastos KO de H-Ras tardan casi el doble de tiempo que los fibroblastos controles en cerrar heridas del mismo tamaño. Además en la figura 33 podemos ver microfotografías de las heridas realizadas en ambos tipos celulares a distintos tiempos en las que se muestra la notable diferencia que existe entre la movilidad de células controles y KO de H-Ras a las 16 h.

Para confirmar estos resultados, cuantificamos la migración de estos fibroblastos a través de una membrana de 8  $\mu\text{m}$ , migración inducida por una diferencia de concentración de SBF de 2% a 10%. Analizamos el número de células que han migrado a las 12h y a las 24h mediante la técnica colorimétrica del cristal violeta. A las 12 horas no se observan diferencias en la movilidad entre las células KO y los controles WT. Sin embargo, la migración a las 24h de las células H-*ras*<sup>-/-</sup> es significativamente inferior a la de los fibroblastos WT, confirmando los resultados observados en el cierre de heridas *in vitro* (figura 33).

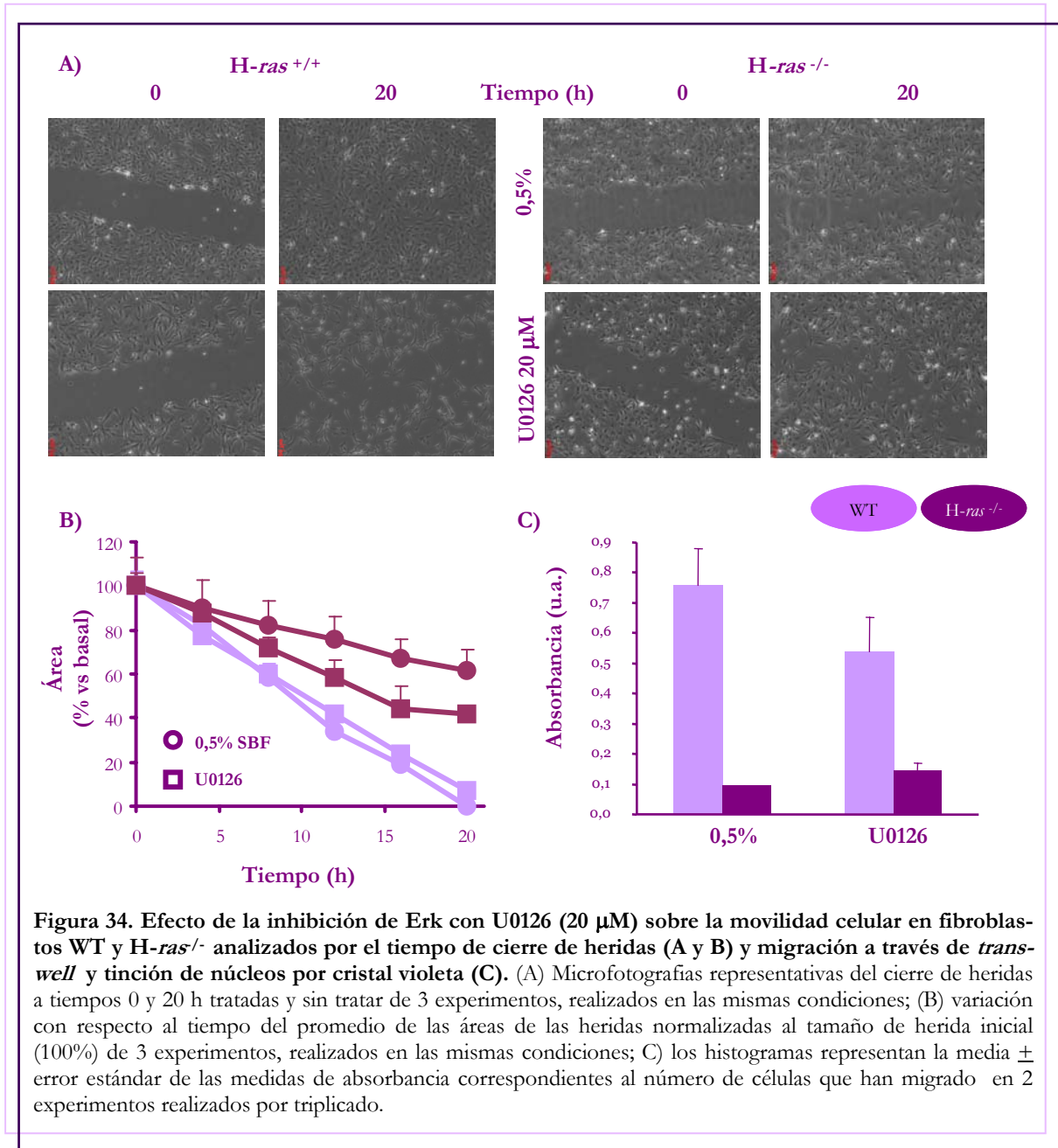
Todos estos datos parecen indicar que la migración celular es dependiente de la isoforma H-Ras, ya que en ausencia de dicha isoforma la movilidad de los fibroblastos se encuentra reducida.



## B. Papel de la vía de Erk en la migración celular

La inhibición de la vía de Erk no afecta a la velocidad de migración de los fibroblastos WT durante el cierre de las heridas, pero en ausencia de H-Ras la movilidad parece aumentar tras la inhibición de Erk sin llegar a alcanzar la observada en fibroblastos WT.

Para verificar estos resultados, cuantificamos la migración de estos fibroblastos a través de una membrana de 8  $\mu\text{m}$ , movimiento inducido por una diferencia de concentración de SBF de



**Figura 34.** Efecto de la inhibición de Erk con U0126 (20  $\mu$ M) sobre la movilidad celular en fibroblastos WT y *H-ras*<sup>-/-</sup> analizados por el tiempo de cierre de heridas (A y B) y migración a través de *transwell* y tinción de núcleos por cristal violeta (C). (A) Microfotografías representativas del cierre de heridas a tiempos 0 y 20 h tratadas y sin tratar de 3 experimentos, realizados en las mismas condiciones; (B) variación con respecto al tiempo del promedio de las áreas de las heridas normalizadas al tamaño de herida inicial (100%) de 3 experimentos, realizados en las mismas condiciones; (C) los histogramas representan la media  $\pm$  error estándar de las medidas de absorbancia correspondientes al número de células que han migrado en 2 experimentos realizados por triplicado.

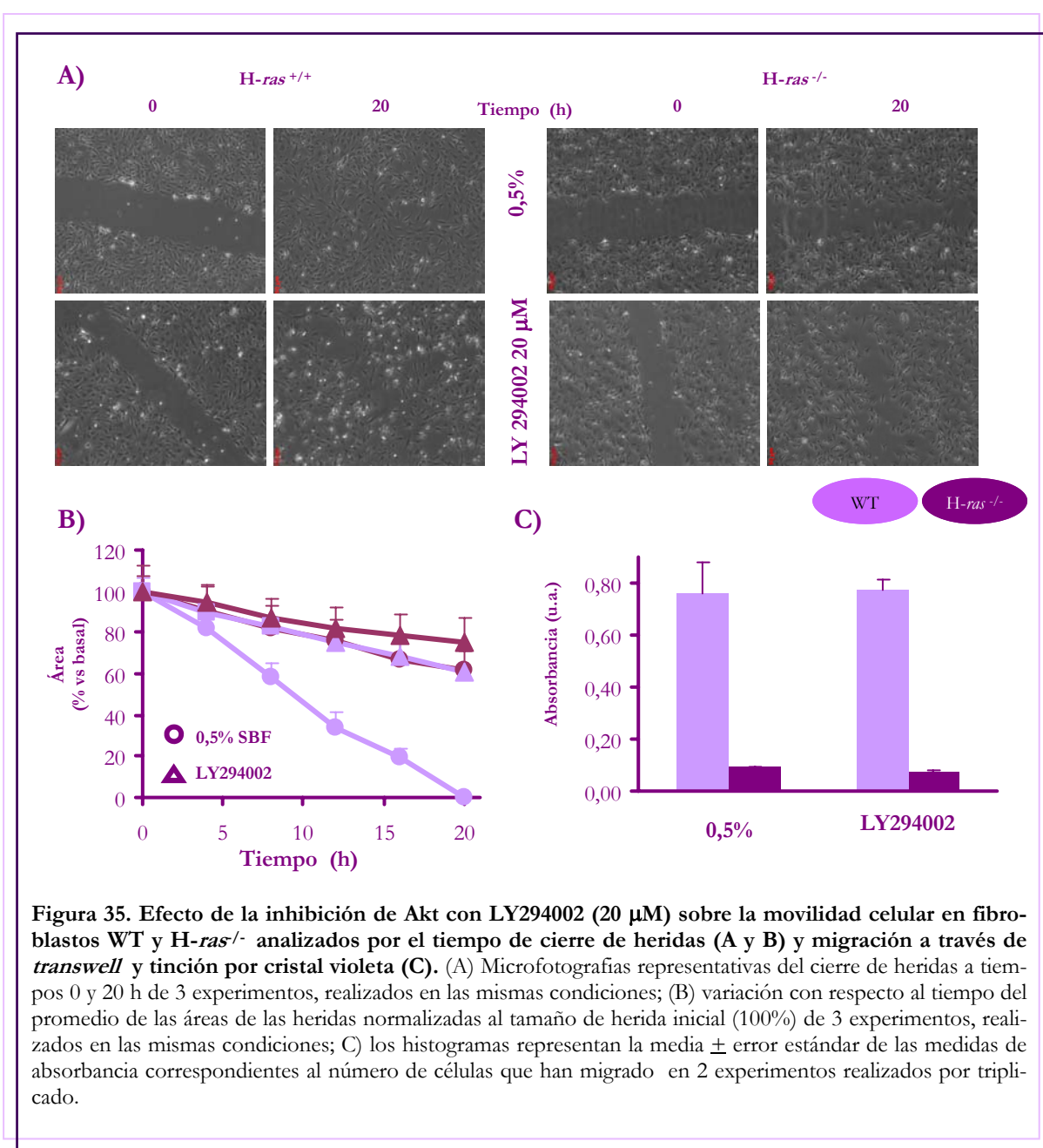
2% a 10%. En el medio con 2% de suero añadimos el inhibidor de Erk U0126 20 $\mu$ M y analizamos el número de células que han migrado a las 24h mediante la técnica colorimétrica de cristal violeta. La inhibición de la vía de Erk provoca una disminución no significativa en el número de células WT que han atravesado la membrana, mientras que no se observan diferencias entre las células KO (figura 34).

Estos resultados indican que la movilidad de los fibroblastos es independiente de la vía de Erk, pero la menor migración observada en ausencia de H-Ras se revierte parcialmente al inhibir la ruta de Erk. Posiblemente H-Ras regule a través de Erk algún proceso relacionado con la

adhesión celular, ya que en los ensayos de migración a través de *transwell*, donde las células no están adheridas, la inhibición de Erk no tiene ningún efecto al igual que sucede en las WT.

### C. Papel de la vía de Akt en la migración celular

La inhibición de la vía de Akt ralentiza significativamente la migración celular tanto en células controles como en células *H-ras*<sup>-/-</sup>: tras el tratamiento con LY294002 tanto los fibroblastos WT como los KO de H-Ras no son capaces de cerrar las heridas efectuadas en monocapas de fibroblastos transcurridas 48h. Además no se observan diferencias entre los dos tipos celulares (figura 35).



En los estudios de migración celular en *transwell*, cuando añadimos el inhibidor de LY294002 20 $\mu$ M en el medio con 2% de SBF, observamos que a las 24 h no hay diferencias en la migración de células WT en presencia o ausencia del inhibidor de Akt, sin embargo en las células KO observamos una pequeña disminución no significativa de su movilidad.

Este último grupo de resultados muestra que la inhibición de la vía de Akt provoca una disminución de la movilidad celular tanto en las células controles como en las células H-*ras*<sup>-/-</sup>, sugiriendo que esta ruta participa directamente en la migración celular de los fibroblastos, migración que parece ser a su vez dependiente de la isoforma H-Ras.

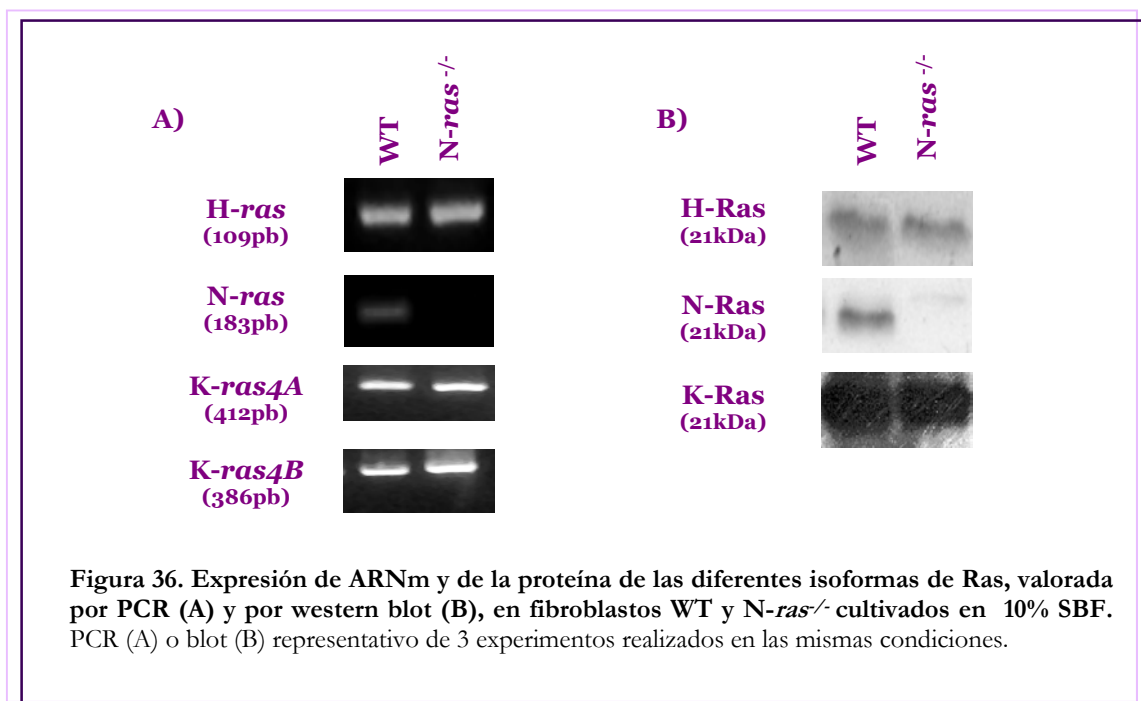
## FIBROBLASTOS *N-ras*<sup>-/-</sup>

### 1. Caracterización de las células

Los fibroblastos KO de N-Ras (*N-ras*<sup>-/-</sup>) usados en este estudio proceden de cultivos de embriones de ratones KO para el gen de N-*ras*. Las células control (WT) son fibroblastos embrionarios procedentes de ratones WT de la misma cepa. Para los experimentos de caracterización celular, hemos cultivado los fibroblastos en un medio DMEM con 10% de SBF hasta que alcanzaron una confluencia de un aproximadamente 80% .

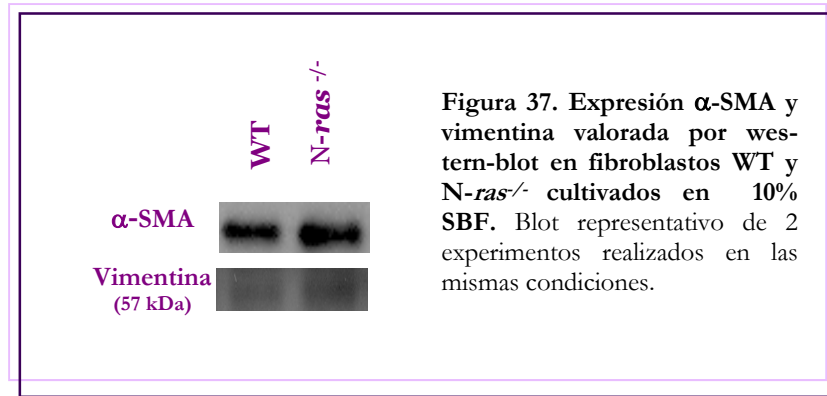
#### A. Expresión de las isoformas de Ras

Mediante RT-PCR y western-blot confirmamos que los fibroblastos KO de N-Ras no expresan ni el ARNm ni la proteína N-Ras; además no se observan diferencias con respecto a los fibroblastos WT en la expresión de las otra isoformas de Ras, K-Ras y H-Ras (figura 36).



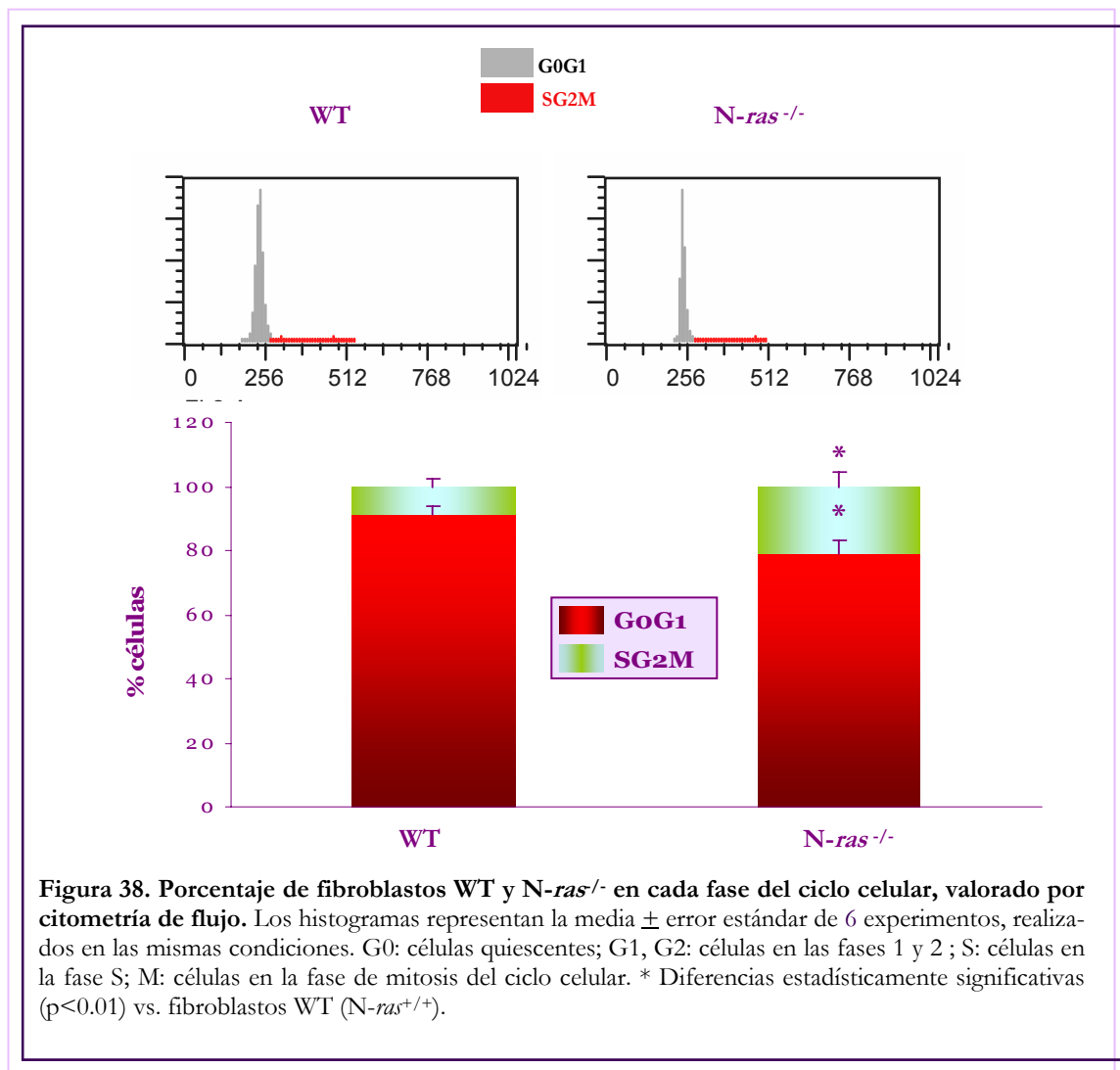
#### B. Expresión de marcadores de miofibroblastos

En ausencia de N-Ras la expresión de los marcadores de miofibroblastos vimentina y  $\alpha$ -SMA analizada por western-blot. es igual que la de los fibroblastos WT (figura 37).



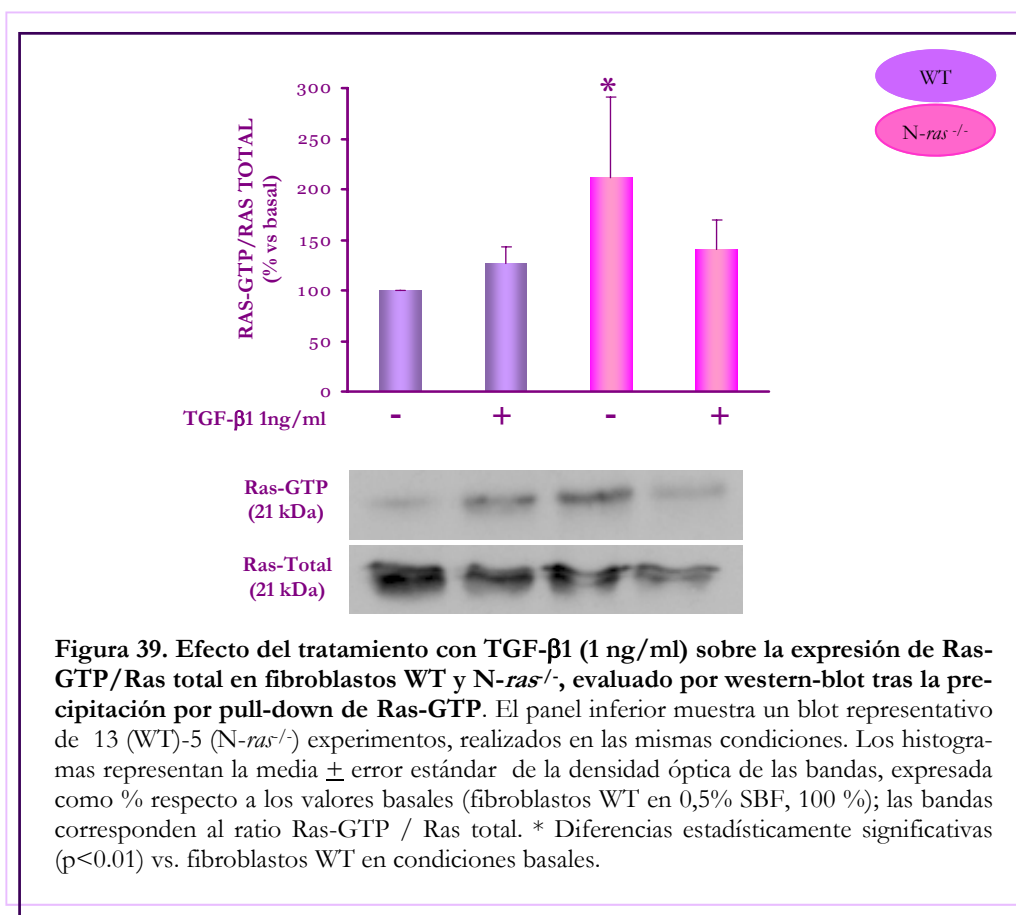
### C. Ciclo celular

Analizamos la existencia de alteraciones en el ciclo celular en los fibroblastos KO de N-Ras mediante citometría de flujo (figura 38). Nuestros resultados muestran una mayor número de células en las fases S, G2 y M en los fibroblastos *N-ras*<sup>-/-</sup> con respecto a los fibroblastos WT.



## 2. Expresión de Ras activado (Ras-GTP)

La activación de Ras en los fibroblastos KO de N-Ras, valorada por western blot, es significativamente mayor en condiciones basales con respecto a los fibroblastos WT. El tratamiento con TGF- $\beta$ 1 no produce cambios importantes sobre la activación de Ras, aunque en los fibroblastos WT hemos observado un aumento no significativo de la expresión de Ras-GTP (figura 39).



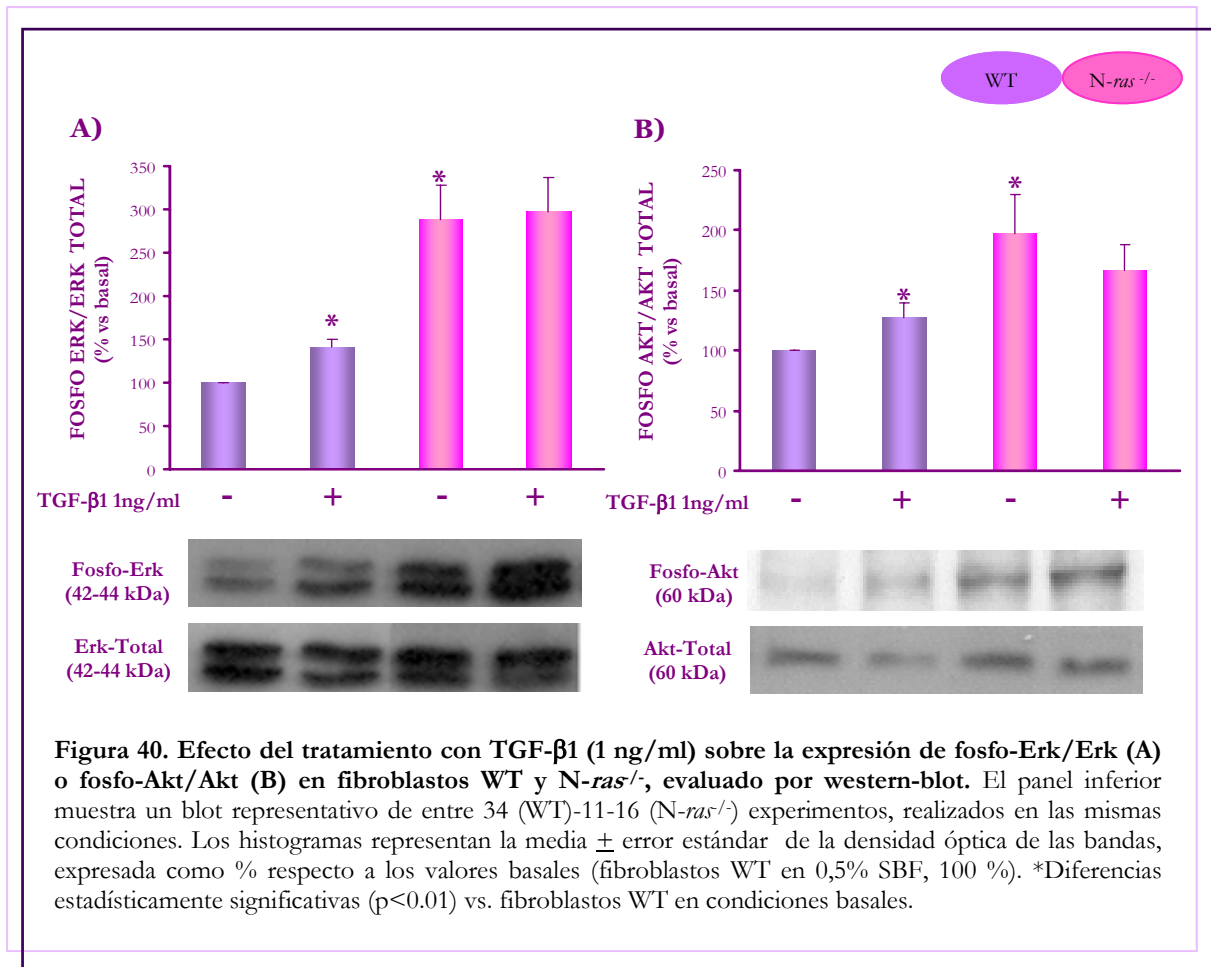
## 3. Activación de los efectores de Ras

Hemos analizado mediante western-blot la expresión de las formas fosforiladas de Erk y de Akt, fosfo-Erk, y fosfo-Akt, en fibroblastos KO de N-Ras, así como el efecto del tratamiento con TGF- $\beta$ 1 a las 24 horas.

### A. Ruta de MAPKs: activación de Erk

Los fibroblastos KO de N-Ras presentan una mayor expresión de fosfo-Erk que los fibroblastos WT en condiciones basales, que podría deberse a la mayor activación de Ras en estas





células; además, la fosforilación de Erk aumenta significativamente con el tratamiento con TGF-β1 sólo en presencia de N-Ras (figura 40).

## B. Ruta de PI3K: activación de Akt

La expresión de fosfo-Akt también es mayor en los fibroblastos KO de N-Ras en condiciones basales, con respecto a los controles. Además, el incremento en la expresión de fosfo-Akt producido tras el tratamiento con TGF-β1 en las células WT no se produce en los fibroblastos N-ras<sup>-/-</sup>.

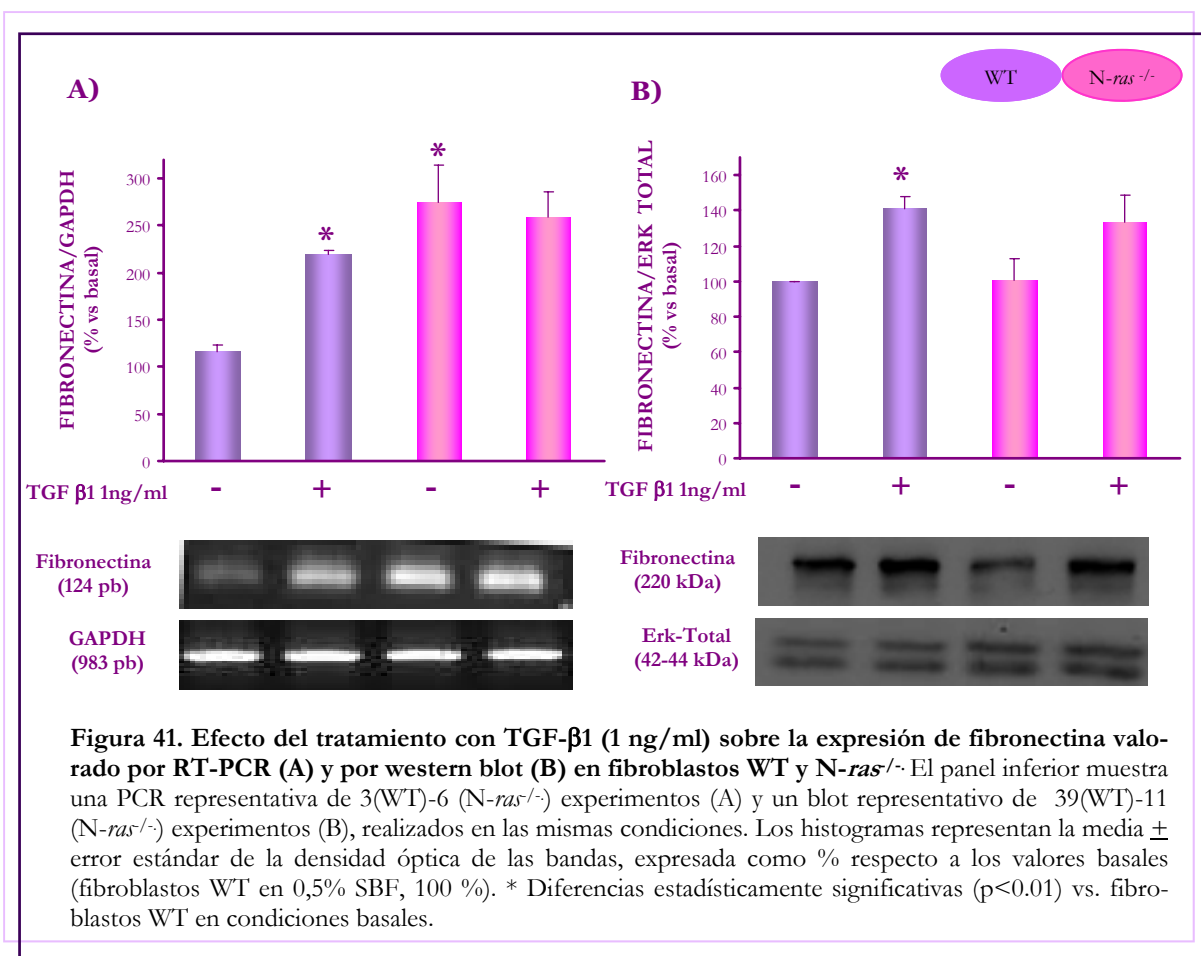
## 4. Expresión y síntesis de proteínas de MEC

### A. Efecto del tratamiento con TGF-β1 sobre la expresión de proteínas de MEC

Analizamos la expresión de fibronectina, colágeno tipo I y síntesis de proteínas colágenas totales en condiciones basales y tras el tratamiento con TGF-β1 en fibroblastos N-ras<sup>-/-</sup> y WT.

### ◆ Fibronectina

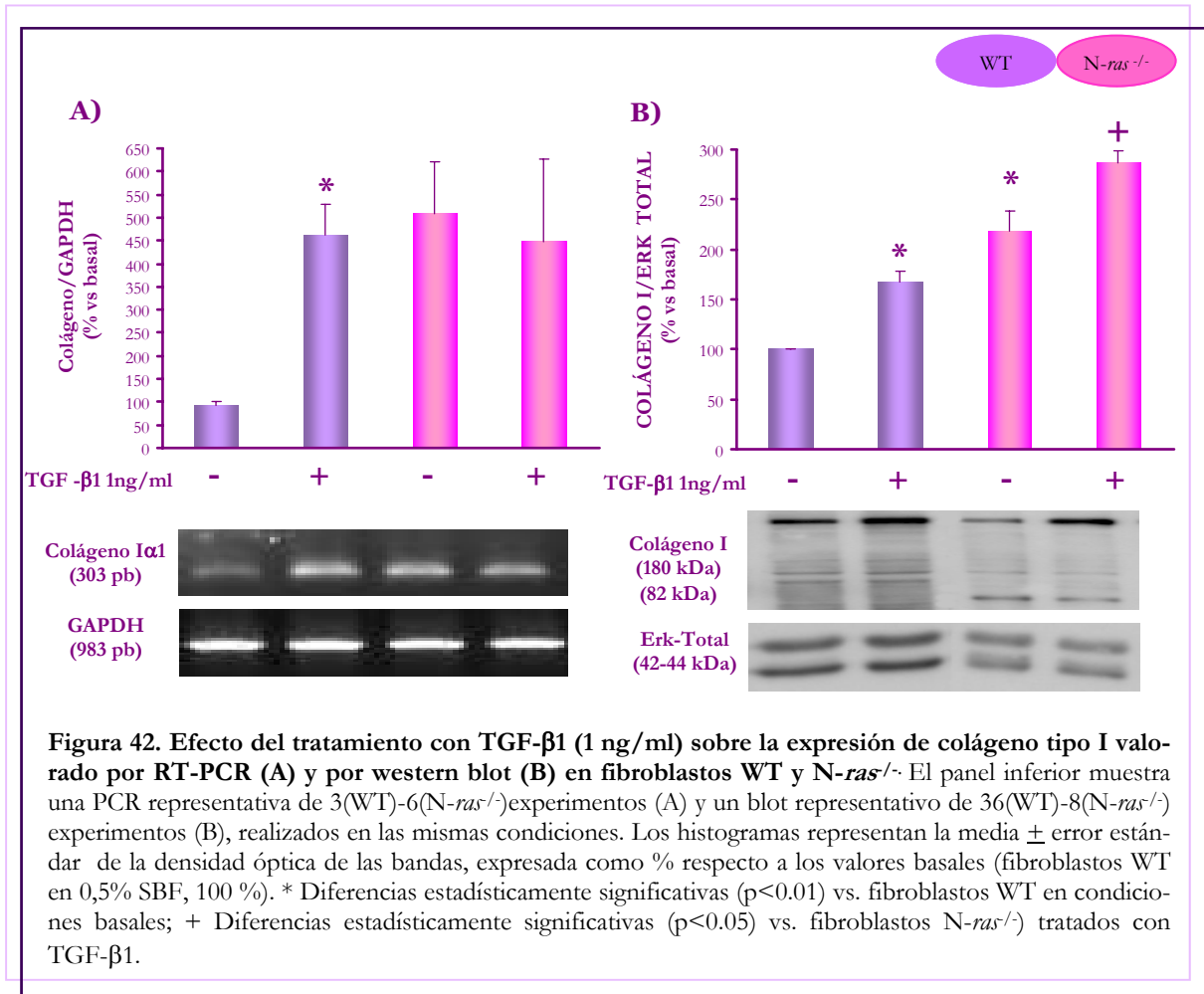
No se aprecian diferencias en la expresión de fibronectina analizada por western blot entre fibroblastos WT y KO de N-Ras en condiciones basales; sin embargo la expresión del ARNm de fibronectina es mayor en las células *N-ras*<sup>-/-</sup> que en las WT. El TGF- $\beta$ 1 aumenta significativamente la expresión de fibronectina (ARNm y proteína) en los fibroblastos controles, mientras que este aumento no es significativo en los fibroblastos KO de N-Ras (figura 41).



### ◆ Colágeno

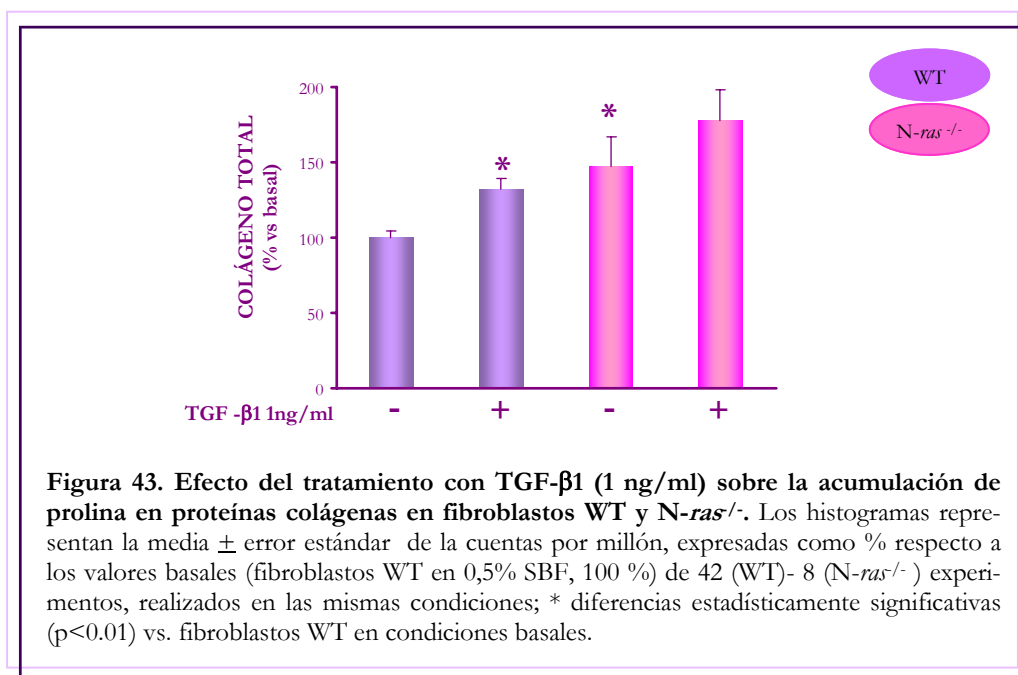
Analizamos la expresión de colágeno tipo I por western- blot y RT-PCR y medimos la incorporación de prolina tritiada durante la síntesis de todos los tipos de colágenos en el medio de cultivo.

En condiciones basales, la expresión del ARNm y de la proteína de colágeno tipo I es significativamente mayor en los fibroblastos KO de N-Ras que en los fibroblastos WT. Además, el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 estimula la expresión de colágeno tipo I, aunque este aumento no corresponde con una mayor expresión del ARNm de colágeno tipo I en los fibroblastos *N-ras*<sup>-/-</sup> (figura 42).



Por otro lado, la síntesis de colágeno total es significativamente mayor en células KO que en células WT; además el TGF- $\beta$ 1 aumenta la síntesis de colágeno total aunque este incremento es menor en los fibroblastos *N-ras*<sup>-/-</sup>.

Según los resultados descritos anteriormente, la isoforma N-Ras parece tener un papel en la regulación de la síntesis y expresión de colágeno tipo I y en la acumulación de proteínas colágenas, tanto en condiciones basales como tras el tratamiento con TGF- $\beta$ 1, mientras que la regulación de la expresión de fibronectina parece ser independiente de esta isoforma sólo en condiciones basales.



## B. Papel de la vía de Erk en la expresión de proteínas de MEC.

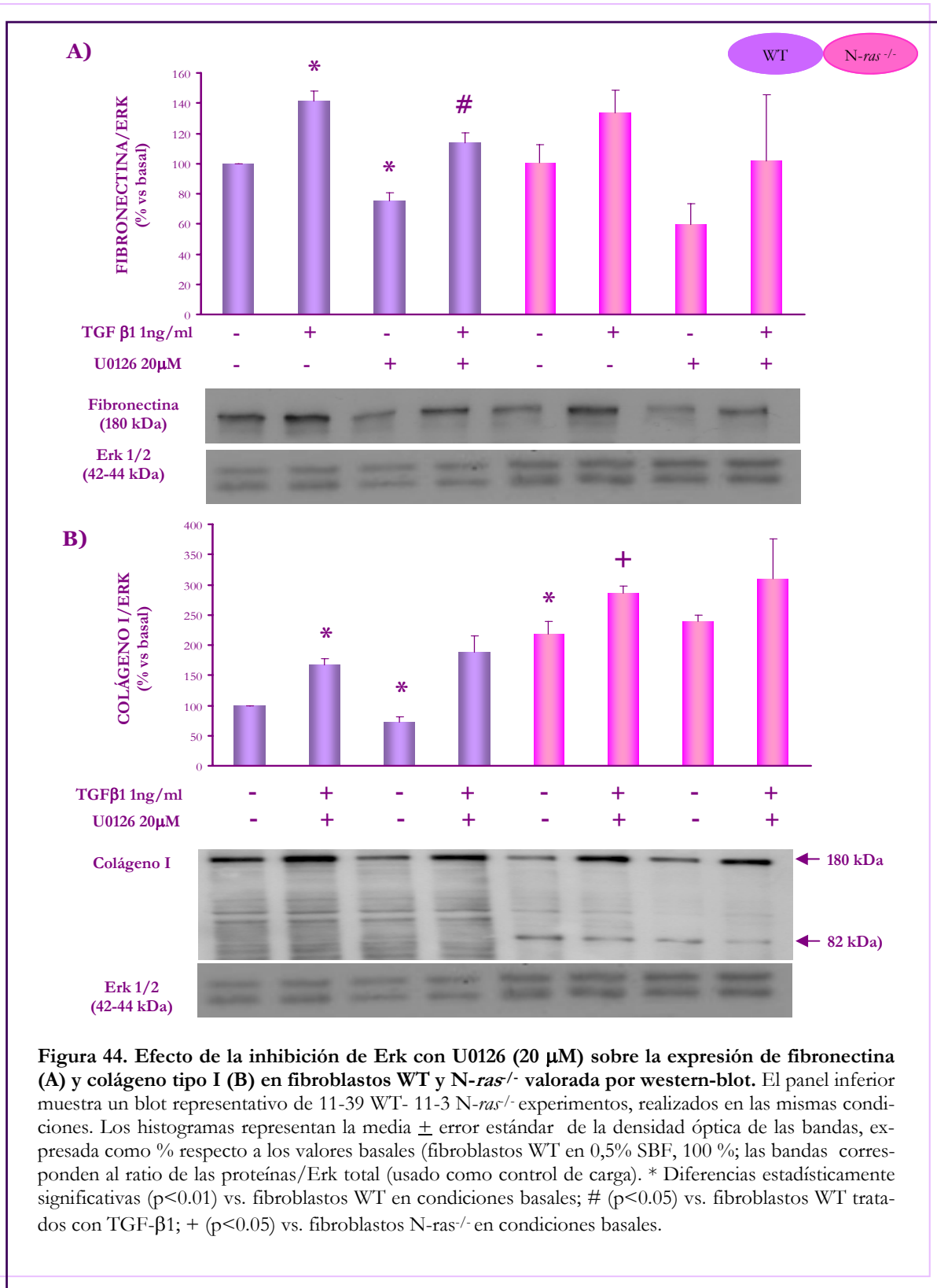
Inhibimos la vía de Erk pre-incubando las células con U0126 30 min. antes del tratamiento con TGF-β1 durante 24 horas. A continuación valoramos por western blot la expresión de fibronectina y colágeno I.

### ◆ Fibronectina

Anteriormente, hemos mostrado que el tratamiento con TGF-β1 produce un aumento en la expresión de fibronectina en las células WT que no es significativo en las células KO de N-Ras. La inhibición de Erk disminuye la expresión de fibronectina tanto en condiciones basales como tras el tratamiento con TGF-β1 en ambos tipos celulares aunque en los fibroblastos N-ras<sup>-/-</sup> esta disminución no es significativa. Estos datos sugieren que la vía de Erk parece estar implicada en la expresión de fibronectina inducida por TGF-β1 en ambos tipos celulares (figura 44).

### ◆ Colágeno tipo I

La inhibición de la vía de Erk no reduce la expresión de colágeno I inducida por TGF-β1 (figura 44). Por tanto, la expresión de colágeno tipo I inducida por TGF-β1 es independiente de N-Ras y de la ruta de Erk, puesto que en ausencia de ambas vías no observamos diferencias significativas en su expresión.



### C. Papel de la vía de Akt en la expresión de proteínas de MEC.

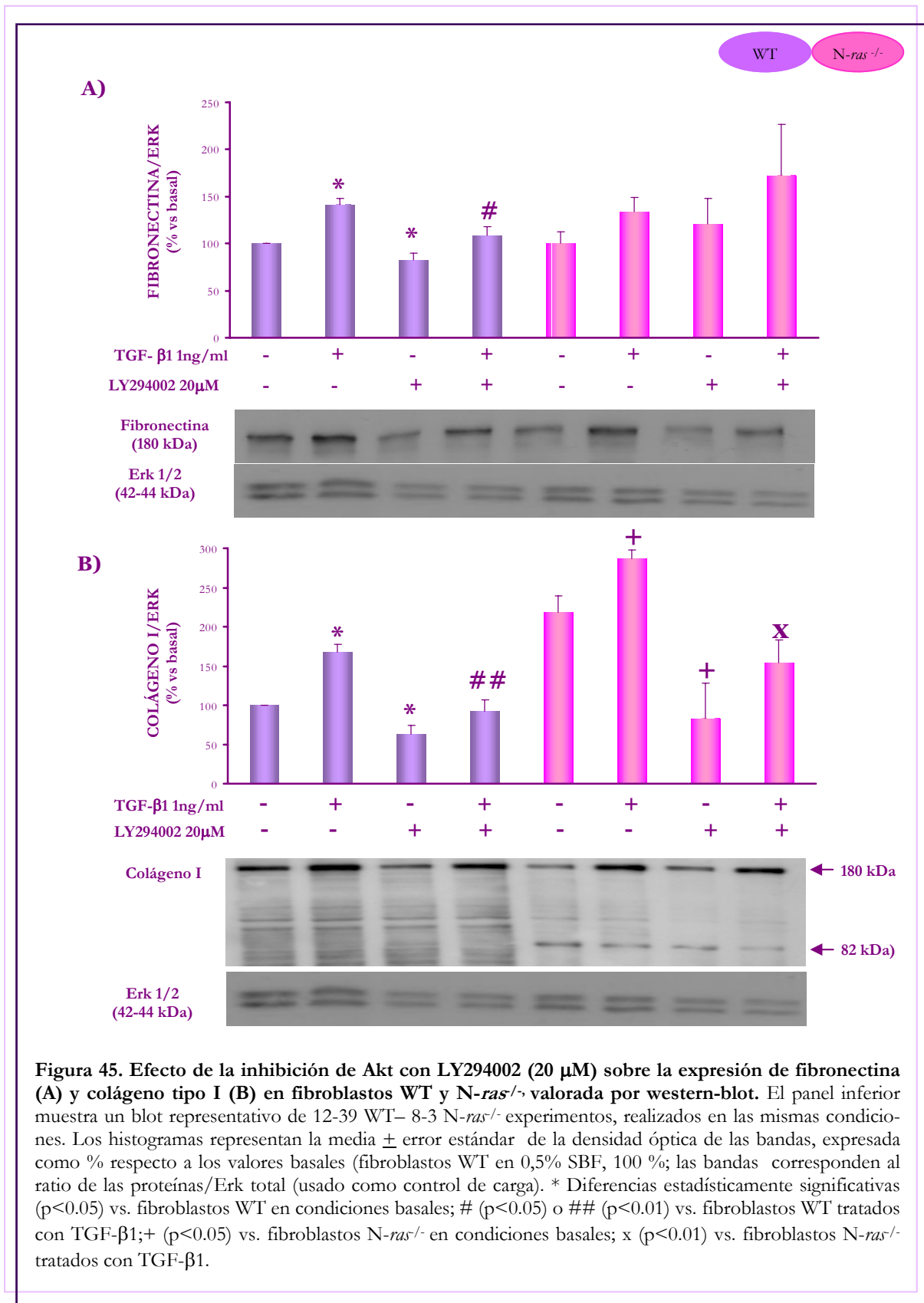
Valoramos el efecto de la inhibición de fosfo-Akt sobre la expresión de fibronectina y colágeno tipo I inducida por TGF- $\beta$ 1, pre-incubando con el inhibidor de la PI3K (LY294002) 30 minutos antes del tratamiento con TGF- $\beta$ 1 durante 24 horas.

#### ◆ Fibronectina

La expresión de fibronectina, tanto en condiciones basales como inducida por TGF- $\beta$ 1, se reduce en presencia del inhibidor de la PI3K/Akt en los fibroblastos WT, pero no en los fibroblastos N-*ras*<sup>-/-</sup>. Estos resultados sugieren que la vía de Akt está implicada en parte en la expresión de fibronectina, siempre y cuando N-Ras se encuentre presente, ya que en ausencia de esta isoforma la inhibición de Akt no afecta a la expresión de fibronectina (figura 45).

#### ◆ Colágeno tipo I

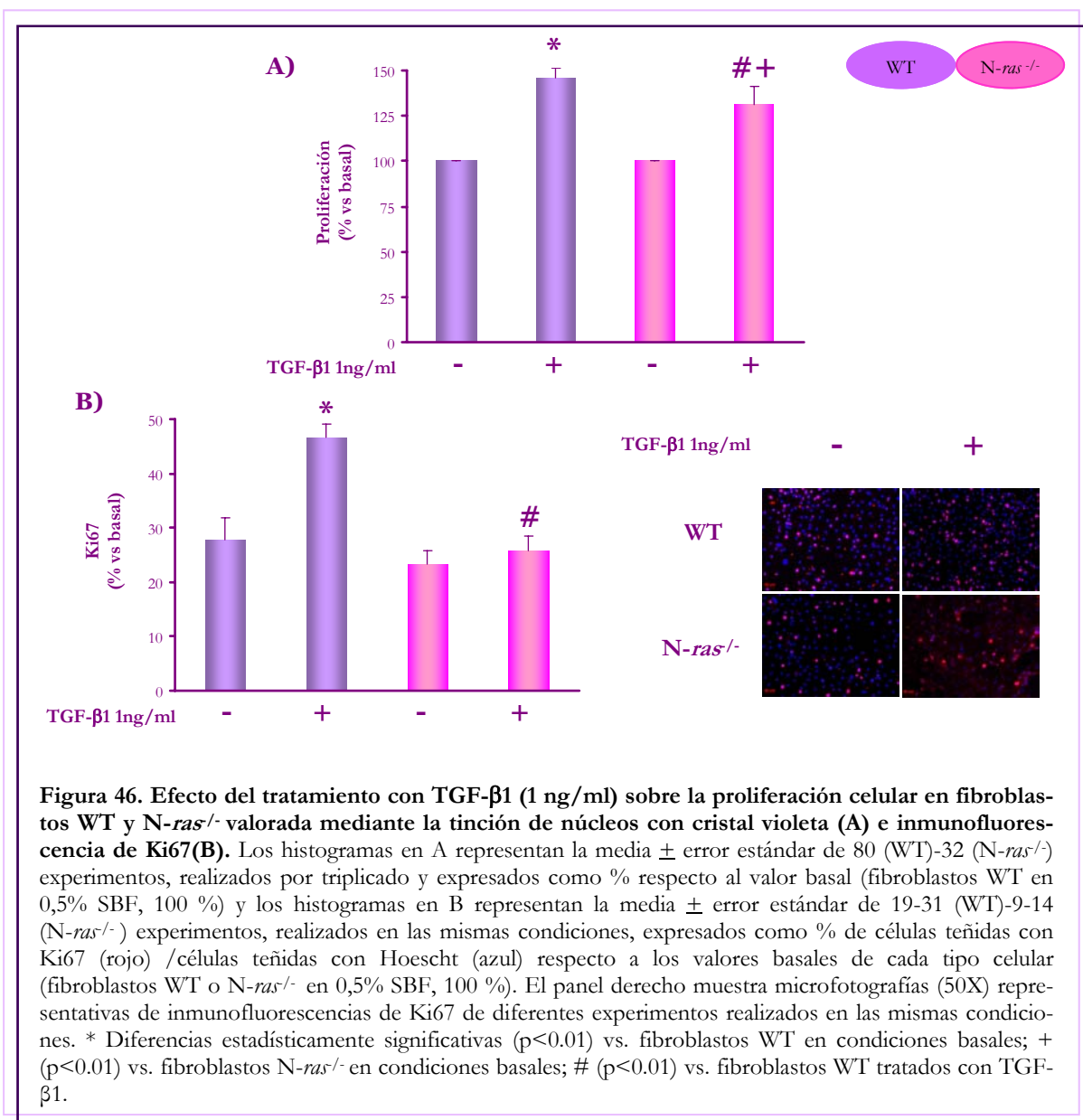
La inhibición de la vía de Akt revierte el efecto inductor del TGF- $\beta$ 1 sobre la síntesis de colágeno tipo I, independientemente de que los fibroblastos tengan o no la isoforma N-Ras. En este caso, la activación de la vía de Akt parece ser la principal ruta empleada por el TGF- $\beta$ 1 para inducir la expresión de colágeno tipo I y parece ser independiente de N-Ras (figura 45).



## 5. Estudios de proliferación celular

### A. Efecto del tratamiento con TGF- $\beta$ 1 sobre la proliferación celular.

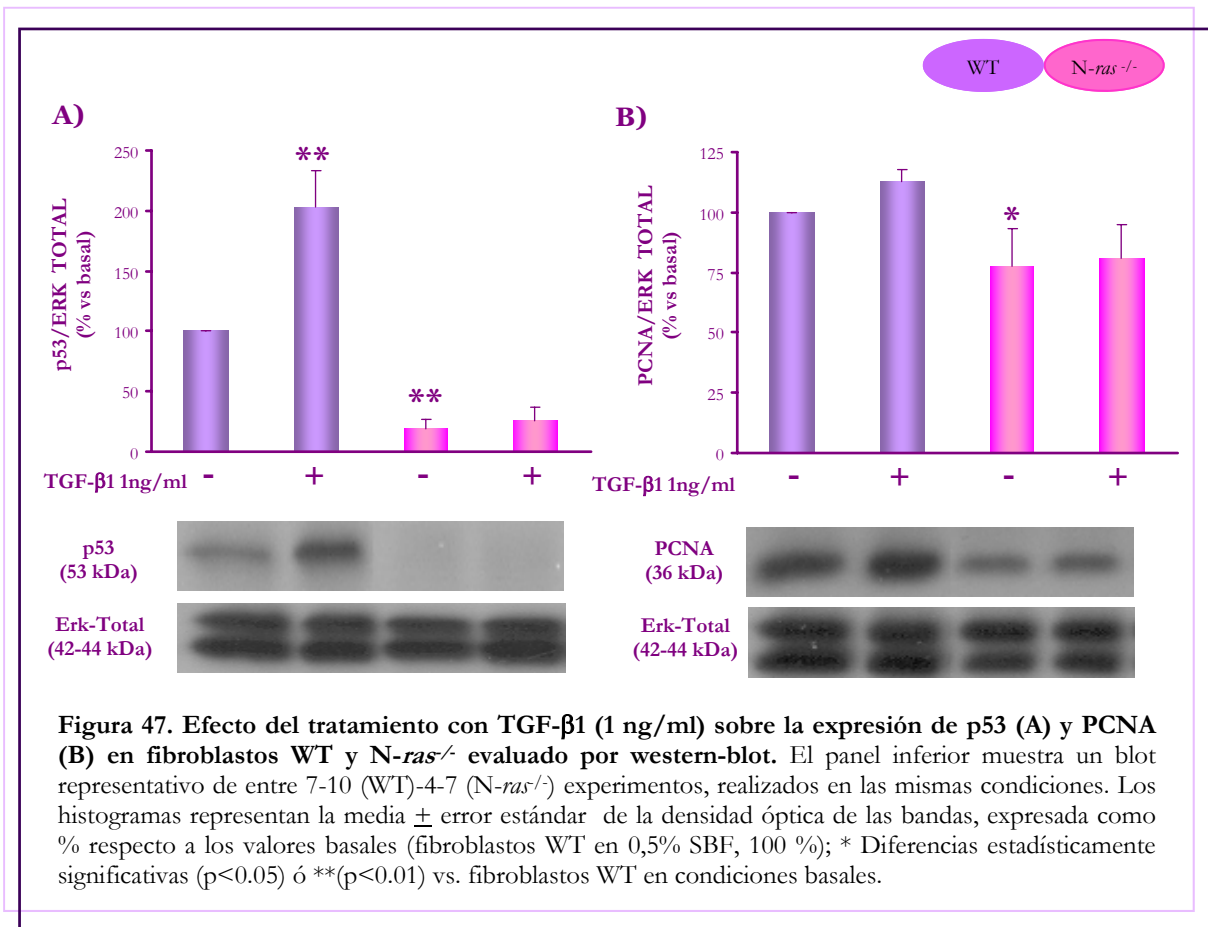
El tratamiento con TGF- $\beta$ 1 estimula la proliferación celular, valorada mediante la tinción de núcleos con cristal violeta, aunque este aumento es menor en fibroblastos KO de N-Ras. Además esta citocina también estimula la expresión nuclear de Ki67, aunque en ausencia de N-Ras la expresión de Ki67 inducida por TGF- $\beta$ 1 está sensiblemente disminuida (figura 46).



Estos datos sugieren que la isoforma N-Ras participa en la proliferación inducida por TGF- $\beta$ 1 y parece tener un papel relevante en la expresión de Ki67 en el núcleo.



Por otro lado la expresión de p53, analizada por western blot, es mucho menor en los fibroblastos KO de N-Ras que en los WT; además, su expresión aumenta con el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 solamente en las células WT. La expresión de PCNA también disminuye significativamente en los fibroblastos *N-ras*<sup>-/-</sup> y tras la estimulación con TGF- $\beta$ 1 aumenta sólo en presencia de N-Ras (figura 47). Estos resultados confirman la importancia de N-Ras en la proliferación celular inducida por TGF- $\beta$ 1.

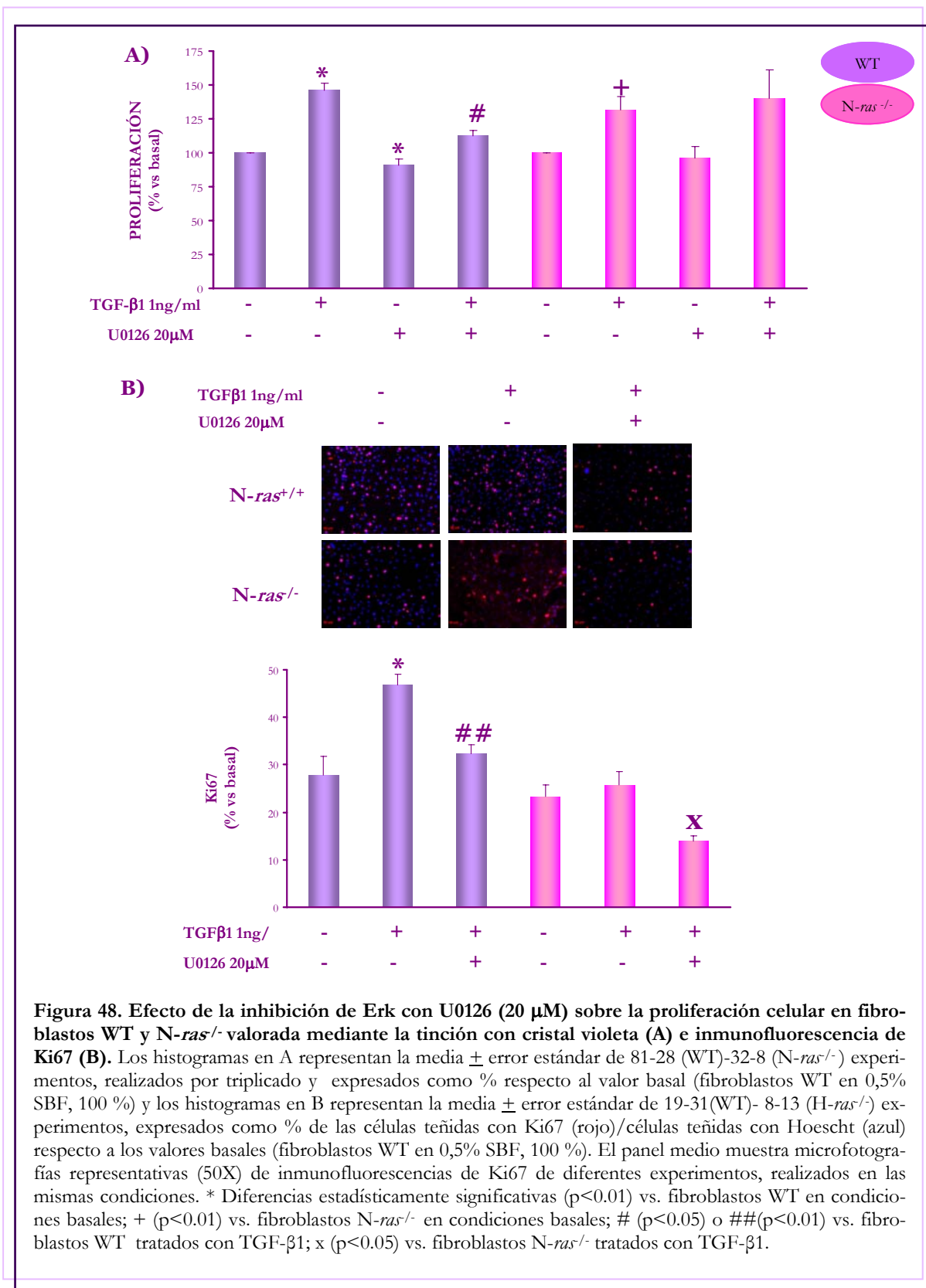


## B. Papel de la vía de Erk en la proliferación celular

Para comprobar si la vía de Erk está implicada en la proliferación celular, tratamos los fibroblastos con el inhibidor de MEK U0126 30 minutos antes del tratamiento con TGF- $\beta$ 1 durante 24 horas y analizamos su efecto proliferativo mediante la tinción de núcleos con cristal violeta e inmunofluorescencia con Ki67.

La inhibición de Erk en los fibroblastos WT reduce significativamente la proliferación inducida por TGF- $\beta$ 1, valorada mediante la tinción de núcleos con cristal violeta; sin embargo,

en ausencia de N-Ras no se produce ningún cambio en la proliferación tras la inhibición de la vía de Erk. Por otro lado, el TGF- $\beta$ 1 aumenta la expresión nuclear de Ki67 solo en fibroblastos



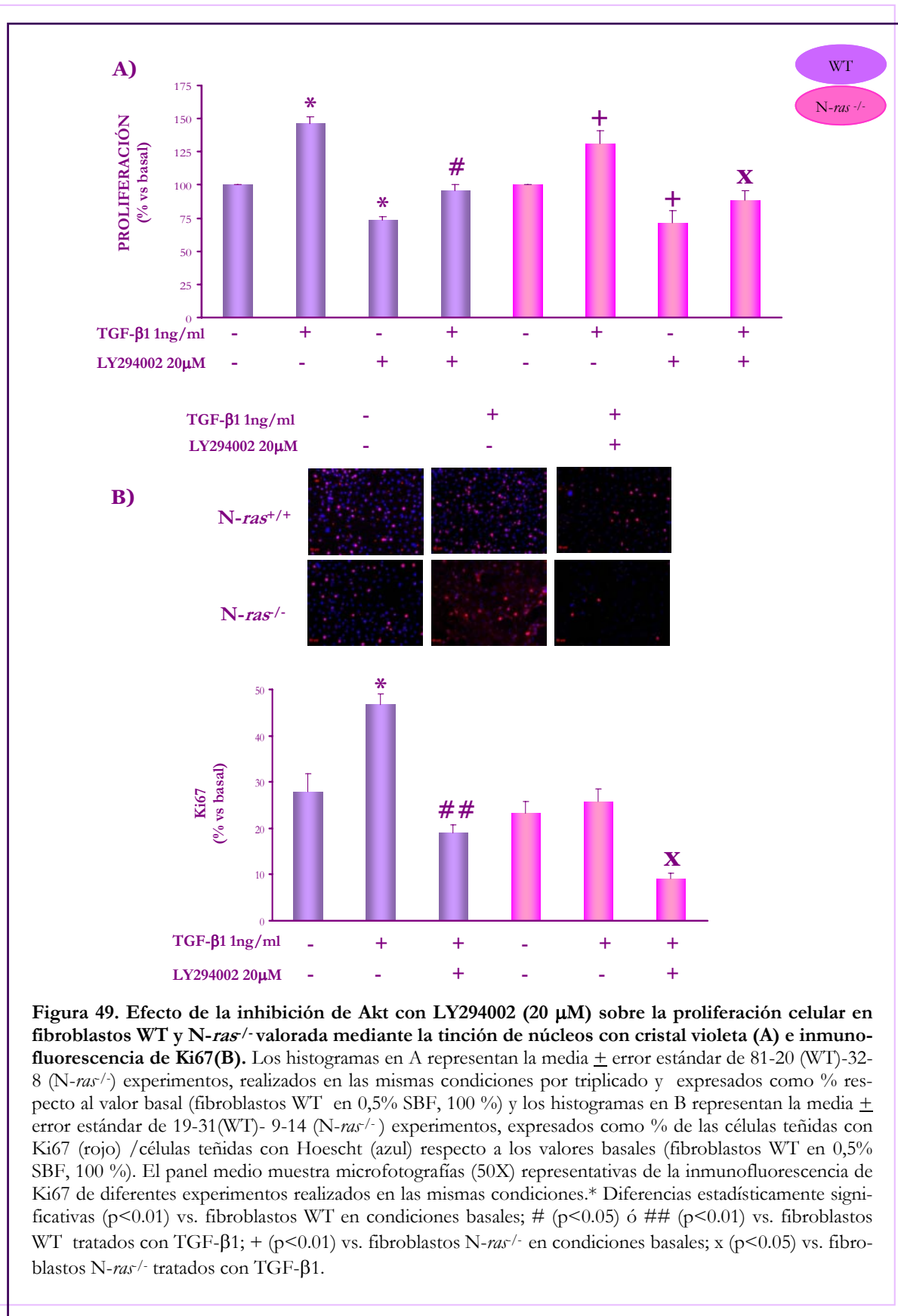
WT, aunque existe una disminución en el número de células positivas para Ki67 en ambos tipos celulares tras la co-incubación del TGF- $\beta$ 1 con el inhibidor U0126 (figura 48).

Por tanto, nuestros datos parecen indicar que la vía de Erk necesita la presencia de N-Ras para modular la proliferación inducida por TGF- $\beta$ 1, pero no para inducir expresión nuclear de Ki67.

### **C. Papel de la vía de Akt en la proliferación celular**

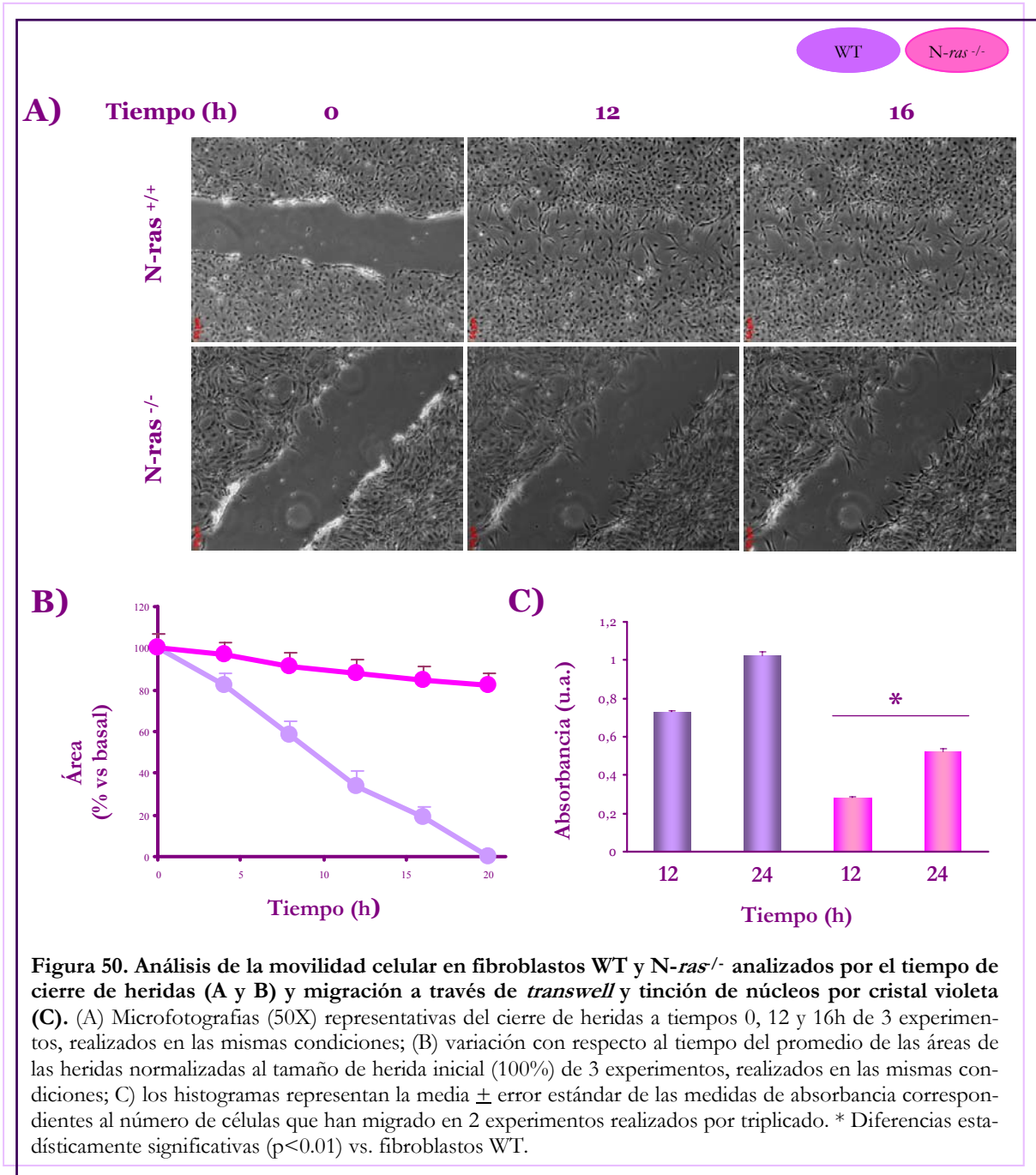
Analizamos la participación de la vía de Akt mediante la co-incubación con TGF- $\beta$ 1 y el inhibidor de PI3K-Akt (LY294002) durante 24 h. La inhibición de Akt disminuye significativamente la proliferación inducida por el tratamiento con TGF- $\beta$ 1, valorado mediante cristal violeta e inmunofluorescencia de Ki67, tanto en los fibroblastos WT como en los N-*ras*<sup>-/-</sup> (figura 49).

Por tanto, la ruta de PI3K/Akt parece estar implicada en la proliferación inducida por TGF- $\beta$ 1, independientemente de la presencia o ausencia de N-Ras.



## 6. Estudios de migración celular

Analizamos la movilidad de los fibroblastos KO de N-Ras en cultivo mediante ensayos de cicatrización y de migración a través de la cámara de Boyden.

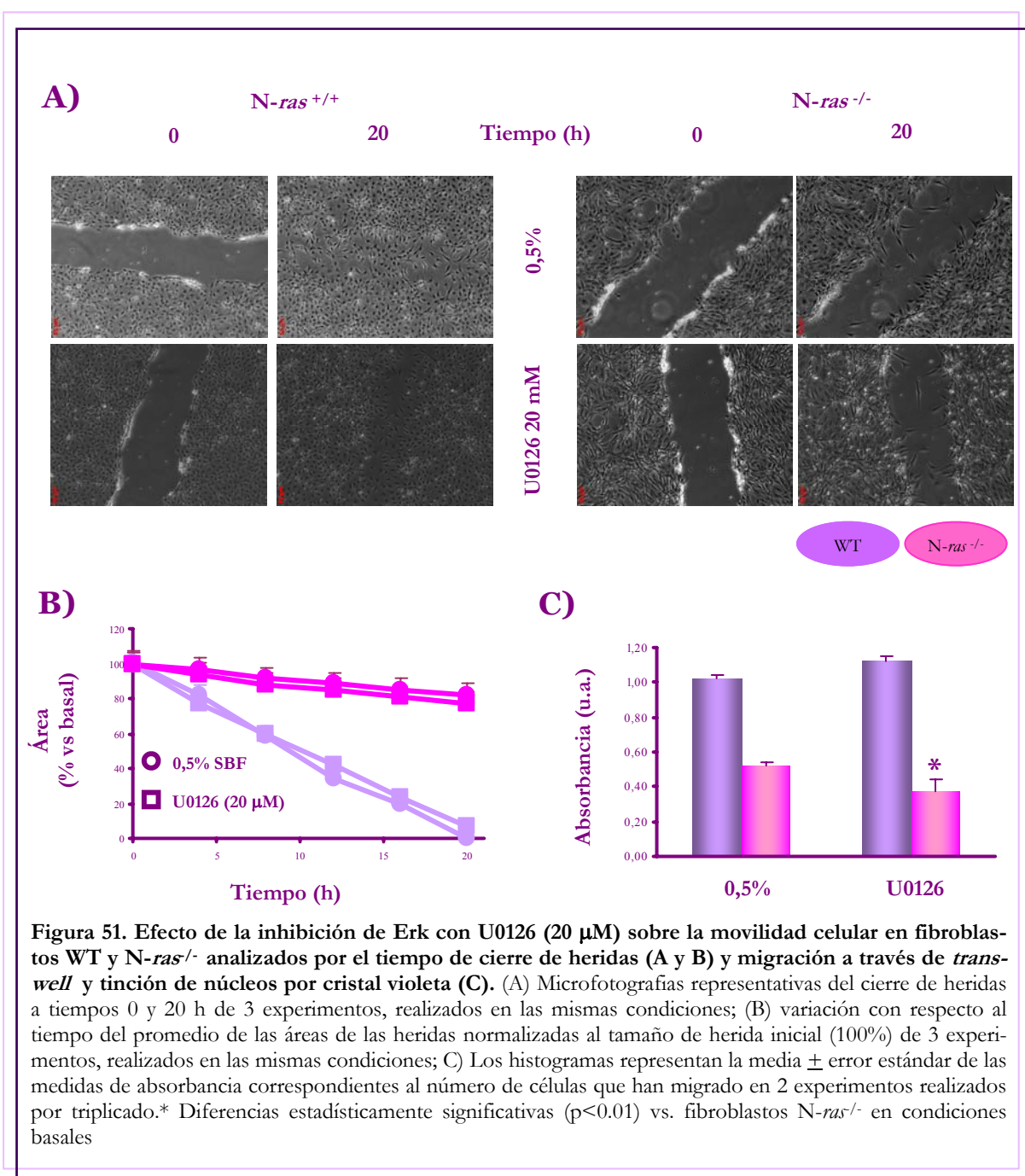


### A. Condiciones basales (0,5% SBF)

Los ensayos de cicatrización muestran que los fibroblastos controles cierran el 50% de la herida en 10 horas aproximadamente, mientras que los fibroblastos KO de N-Ras no pueden

cerrar heridas del mismo tamaño en el mismo período de tiempo. Además, la migración inducida por una diferencia de la concentración de suero de 2% SBF a 10% SBF a través de una membrana de 8  $\mu\text{m}$  es significativamente menor en los fibroblastos KO de N-Ras tanto a las 12 como a las 24h (figura 50).

Todos estos datos parecen indicar que la migración celular es dependiente de la isoforma N-Ras, ya que en ausencia de dicha isoforma la movilidad de los fibroblastos se encuentra claramente reducida.

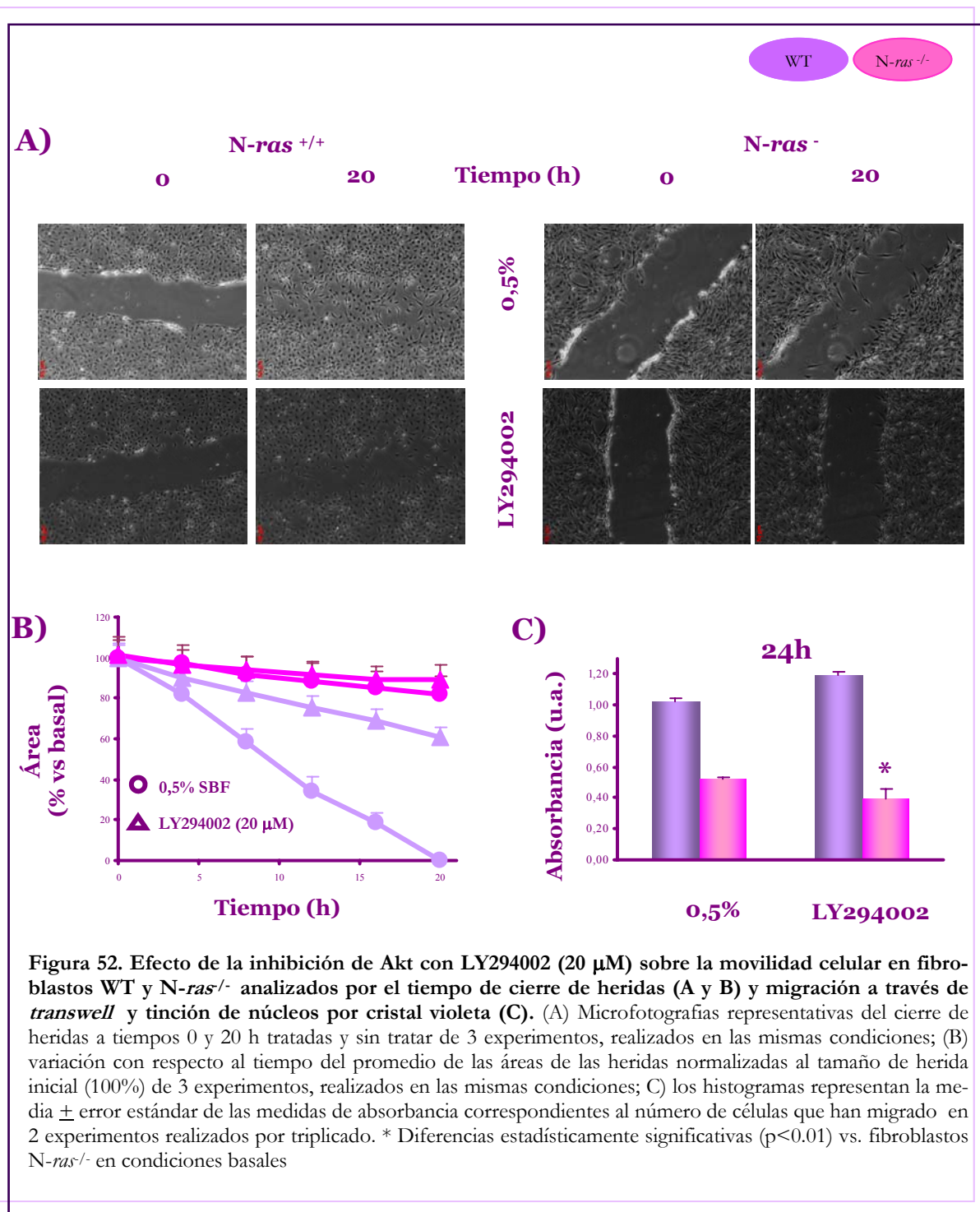


### **B. Papel de la vía de Erk en la migración celular.**

La velocidad de cierre de las heridas realizadas en células WT y KO tratadas con el inhibidor de MEK U0126 es similar a la observada en condiciones basales. Sin embargo, en los ensayos de *transwell* la inhibición de Erk durante 24 h provoca una disminución significativa en el número de células N-*ras*<sup>-/-</sup> que han atravesado la membrana, mientras que en los fibroblastos WT no se observa esa disminución tras la inhibición de Erk (figura 51).

### **C. Papel de la vía de Akt en la migración celular**

La inhibición de Akt disminuye significativamente la capacidad de los fibroblastos WT para cerrar heridas del mismo tamaño, y este efecto es menos claro en fibroblastos KO de N-Ras, posiblemente por la incapacidad de estas células para cerrar las heridas. Sin embargo, en los estudios de migración celular en *transwell* observamos que a las 24 h no hay diferencias en la migración de células WT en presencia o ausencia del inhibidor de Akt, mientras que en células KO se produce una disminución del número de células que atraviesan la membrana tras dicha inhibición (figura 52).







## DISCUSIÓN



El estudio de los mecanismos implicados en el desarrollo de la fibrosis es de gran interés, debido a la irreversibilidad de esta patología una vez es detectada; la posibilidad de identificar marcadores para su diagnóstico precoz en grupos de riesgo (hipertensos, diabéticos, etc.), así como de descubrir posibles dianas sobre las que actuar farmacológicamente e intentar prevenir el proceso fibrótico (o incluso revertirlo, siempre y cuando pudiera detectarse en estadios muy iniciales), es una de las metas de numerosos grupos de investigación que trabajan en el campo de la fibrosis.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido dilucidar la implicación de diferentes isoformas de Ras en los tres de los procesos que participan en el desarrollo de la fibrosis: producción de MEC, proliferación y migración celular (Wynn, 2008), en fibroblastos *in vitro*. Nuestros resultados muestran que tanto la isoforma H-Ras como la N-Ras están regulando dicha producción de MEC, así como la proliferación y la movilidad celular en este modelo experimental.

En nuestro estudio hemos utilizado fibroblastos inmortalizados procedentes de embriones de ratones KO para las isoformas H y N-Ras. Una de las ventajas del uso de una línea celular inmortalizada frente a un cultivo primario es que las células de cultivo primario están sometidas a estrés motivado por la adaptación a un medio diferente al propio, el cual podría enmascarar las verdaderas alteraciones debidas a la falta de alguna isoforma de Ras. Además, los fibroblastos inmortalizados son mejor modelo que otros sistemas complejos como tejidos o animales completos ya que podemos delimitar mejor la respuesta a diversos factores sin que la señalización mediada por células próximas o por moléculas secretadas por ellas interfieran en los resultados. Sin embargo, los resultados obtenidos en este modelo aportan una primera idea o aproximación que debería ser comprobada en un tejido, órgano o animal completo donde existe una mayor interacción entre diferentes tipos celulares y otros factores que intervienen en los procesos biológicos. Un inconveniente del uso de fibroblastos KO es que la ausencia de una proteína podría originar una mayor expresión de otras durante el desarrollo del organismo para compensar su función. No obstante, nuestros resultados nos muestran la importancia de las isoformas H y N de Ras en la señalización celular y la existencia de posibles funciones individuales de cada isoforma que no pueden ser sustituidas por la presencia de las otras dos isoformas de Ras. Este trabajo establece las bases para nuevos estudios sobre el papel de Ras en el desarrollo de la fibrosis. Por otro lado, el uso de fibroblastos KO tiene varias ventajas sobre otras técnicas para inhibir la expresión de Ras como el ARN de interferencia (ARNi), ADN antisense (ADNas) o los anticuerpos neutralizantes: 1) en este modelo todas y cada una de las células tienen la delección del

gen de la isoforma de Ras correspondiente y no expresan la proteína, por tanto los resultados obtenidos se deben a la ausencia de la proteína, mientras que en el caso del ARNi ó del ADNas la eficacia de transfección a veces no supera el 50%; 2) en este modelo sólo inhibimos la proteína correspondiente al gen eliminado, mientras que en los otros casos puede haber interferencias con ARNm o genes con secuencias parecidas a la utilizada para el bloqueo o una inhibición global de todas las isoformas por el anticuerpo neutralizante. Por tanto, con el uso de fibroblastos KO obtenemos una respuesta más clara y exacta que la obtenida con las otras técnicas de interferencia, las cuales tienen la ventaja de que pueden utilizarse en momentos puntuales evitando posibles adaptaciones de la célula para compensar la falta de una proteína.

### 1. Efecto de la ausencia de H y N-Ras sobre la activación de Ras y sus efectores.

En condiciones de crecimiento activo (10% de SBF), la ausencia de una isoforma de Ras no produce una mayor expresión ni del ARNm ni de la proteína de las isoformas restantes. Este resultado está en consonancia con los análisis transcripcionales realizados por Castellano y cols. (2007) en los cuales demuestran que la expresión del gen *ras* correspondiente a cada isoforma parece estar regulada independientemente, ya que la ausencia de H-Ras ó N-Ras no causa ningún cambio compensatorio en la expresión de las otras isoformas de Ras.

Una vez comprobado que no existían diferencias en la expresión de las isoformas de Ras en fibroblastos deficientes en una de ellas, quisimos averiguar si la activación de Ras total y de sus efectores Erk y Akt era distinta en ausencia de H- o de N-Ras (tabla 7). Nuestros resultados muestran una mayor activación de Ras en fibroblastos N-*ras*<sup>-/-</sup> que no se observa en fibroblastos KO de H-*ras* con respecto a los WT en condiciones basales. Además, resultados previos de nuestro grupo de investigación demostraron que en fibroblastos dobles KO de N y H-Ras la activación de Ras era también mayor (Martinez-Salgado y cols., 2006). Estos datos parecen indicar una mayor activación de Ras total en ausencia de N-Ras, presumiblemente correspondiente a una mayor activación de K-Ras.

Por otro lado, al analizar la activación de Erk y de Akt, observamos que, independientemente de que exista o no una mayor activación basal de Ras total, los fibroblastos KO de H-Ras y de N-Ras muestran una mayor expresión de la forma fosforilada de Erk y de Akt. En el caso de los fibroblastos N-*ras*<sup>-/-</sup> la mayor activación de Ras total puede ser la responsable de la mayor activación de Erk y Akt. Sin embargo, en el caso de los fibroblastos KO de H-Ras, en donde la proporción de Ras-GTP es similar a los fibroblastos WT, la activación de estos efectores debe

		WT	H- <i>ras</i> <sup>-/-</sup>	N- <i>ras</i> <sup>-/-</sup>
Ras-GTP	Basal		=	↑
	TGF-β1	↑	=	↓
Fosfo-Erk	Basal		↑	↑
	TGF-β1	↑	=	=
Fosfo-Akt	Basal		↑	↑
	TGF-β1	↑	=	=

Tabla 7. Activación de Ras y sus efectores Erk y Akt en fibroblastos tratados con TGF-β1. Resumen de los resultados descritos anteriormente. = : sin cambios ↑ : aumento ↓ : disminución.

de ser consecuencia de la activación de otras vías.

Está descrito que de las isoformas de Ras, H-Ras es la principal activadora de PI3K/Akt, (Fayard y cols., 2005) mientras que N-Ras y K-Ras ejercen una menor activación de esta proteína (Yan y cols., 1999; Li y cols., 2004). Sin embargo, en nuestras células KO de H-Ras observamos una sobreactivación de Akt. La mayor activación de Akt en fibroblastos H-*ras*<sup>-/-</sup> podría deberse a la sobreexpresión observada a nivel transcripcional del gen de la subunidad β de la proteína G (Gnb-1) (Castellano y cols., 2007) que está implicada en la regulación de la subunidad α de esa misma proteína y de ciertos receptores y efectores entre los que se encuentra la PI3Kγ (Chen y cols., 2008; Yang y Hung, 2009). Además mediante el análisis del transcriptoma de los fibroblastos KO de H-Ras, Castellano y cols. (2007) vieron una sobreexpresión de neuronatina o Nnat, una proteína implicada en la fosforilación del factor de transcripción CREB y en inflamación que además es capaz de fosforilar Erk y Akt (Mzhavia y cols., 2008).

Generalmente las proteínas Ras estimulan la ruta Raf/MEK/Erk, aunque en la literatura científica se describen algunos casos en los que mutaciones en K-Ras ó H-Ras no estimulan la fosforilación de Erk en algunos tipos celulares como astrocitos o fibroblastos Rat-1(Gopalbhai y

Meloche, 1998; Luo y Sharif, 1999); tampoco se ha observado una activación constitutiva de Erk en leucemias mieloides agudas humanas con mutaciones activadoras de N-Ras o K-Ras (Iida y cols., 1999; Yip-Schneider y cols., 1999). La mayor activación de Erk observada en fibroblastos KO de H-Ras es más difícil de explicar y tenemos varias hipótesis que queremos corroborar en el futuro. Sengupta y cols. (2003) (Sengupta y cols., 2003) describieron que la inhibición de la ruta PI3K/Akt con LY294002 inhibía a su vez la fosforilación de Erk1/2 inducida por HGF, sugiriendo una contribución de PI3K en la activación prolongada de las rutas de las MAPK. Resultados similares se obtuvieron anteriormente en células de hepatoma humano estimuladas con HGF que producía un aumento de la fosforilación de Erk mantenido por encima de las 24h y que era dependiente de Akt (Sipeki y cols., 1999). Por ello sugerimos que la mayor activación de Erk en fibroblastos H-*ras*<sup>-/-</sup> puede estar relacionada con una mayor activación de fosfo-Akt en estas células. Por otro lado, otra de las vías que puede activar Erk es la vía de la proteína quinasa C: en fibroblastos intestinales procedentes de pacientes con enfermedad de Crohn se ha descrito un aumento en los efectos fibróticos del TGF-β1 mediante la activación de Erk por la PKC (Mulsow y cols., 2005); sin embargo, este no debe de ser el caso en nuestro modelo ya que experimentos preliminares no han mostrado cambios significativos en la actividad de la PKC en fibroblastos H-*ras*<sup>-/-</sup> (datos no mostrados).

Hemos comprobado el efecto del tratamiento con TGF-β1 sobre estas vías de señalización. El TGF-β1 estimula la activación de Ras en los fibroblastos tipo salvaje, como ya se ha descrito en otros tipos celulares como células epiteliales (Karnoub y Weinberg, 2008; Kretzschmar y cols., 1999; Mulder y Morris, 1992; Yan y cols., 1994) y células de carcinoma de páncreas (Park y cols., 2000). Sin embargo, esta citocina no es capaz de activar Ras en ausencia de las isoformas H- o N-Ras. Resultados previos de nuestro grupo de investigación han mostrado que el TGF-β1 tampoco puede activar Ras cuando sólo se encuentra presente la isoforma K-Ras (Martínez-Salgado y cols., 2006). Por tanto, esto parece sugerir que es necesaria la presencia conjunta de las isoformas H y N-Ras para que el TGF-β1 induzca la activación de la GTPasa Ras.

Por otro lado, el tratamiento con TGF-β1, además de aumentar la proporción de Ras-GTP en la célula, aumenta la activación de dos de sus principales vías de señalización, la ruta de MAPK-Erk y la ruta de PI3K-Akt (Colicelli, 2004; Downward, 2003) en fibroblastos WT. Sin embargo, en fibroblastos KO de H- y N-Ras el TGF-β1 no induce un aumento notable de la activación de estas proteínas, posiblemente por el hecho de que partimos de una expresión basal

elevada de éstas o por la posibilidad de que sea necesaria la presencia conjunta de ambas isoformas para que TGF- $\beta$ 1 active Ras y por tanto sus efectores.

En resumen, nuestros datos indican que la ausencia de N-Ras origina una mayor activación de Ras total (probablemente debida a una mayor activación de K-Ras), de Erk y de Akt. Además en ausencia de H-Ras se activan otras vías independientes de Ras que activan Erk. Por otro lado, el TGF- $\beta$ 1 necesita la presencia simultánea de H- y N-Ras para activar Ras y sus efectores, Erk y Akt.

## 2. Efecto de la ausencia de H y N-Ras sobre la acumulación de matriz extracelular

La síntesis y degradación de MEC es uno de los procesos cuya desregulación puede ocasionar su acumulación, una de las características de la fibrosis. Por este motivo quisimos comprobar si existen diferencias en la expresión de proteínas de MEC como fibronectina, colágeno I y colágeno total en ausencia de las isoformas H- y N-Ras y en respuesta a TGF- $\beta$ 1. En la tabla 8 mostramos un resumen de los resultados descritos anteriormente.

Los fibroblastos utilizados en este estudio tienen características de miofibroblastos puesto que expresan  $\alpha$ -SMA y vimentina, dos proteínas consideradas como marcadores de este tipo celular. Los miofibroblastos son las principales células productoras de MEC bajo condiciones patológicas (Liu y cols., 2004).

Nuestros resultados muestran una mayor acumulación de MEC en los fibroblastos H-*ras*<sup>-/-</sup> y N-*ras*<sup>-/-</sup>. La ausencia de H-Ras produce una mayor acumulación de fibronectina, colágeno tipo I y colágeno total, mientras que en ausencia de N-Ras sólo es mayor la acumulación de colágeno. Estos datos parecen indicar la implicación por parte de la isoforma H-Ras, y de N-Ras en menor medida, en la regulación de la síntesis de MEC. En un estudio previo observamos que los fibroblastos dobles KO de H-Ras y de N-Ras presentaban una mayor acumulación de fibronectina, colágeno I y colágeno total, lo cual indica que la isoforma K-Ras, o la ausencia de las otras dos isoformas, parece tener un papel relevante en la producción de MEC (Martínez-Salgado y cols., 2006). Otros autores han descrito la participación de isoformas de Ras en la síntesis de colágeno: Slack y cols. (1992) describieron por primera vez la regulación del gen de colágeno I por la expresión de Ras en fibroblastos de ratón; además, observaron que los fibroblastos que sobreexpresan el oncogen N-*ras* (Lys61) o el oncogen H-*ras* (val12), mutaciones activadoras



		WT	H- <i>ras</i> <sup>-/-</sup>	N- <i>ras</i> <sup>-/-</sup>
Fibronectina	ARNm	Basal	↑	↑
		TGF-β1	↑	↑
	Proteína	TGF-β1	↑	=
		Inhibición de Erk	↓	↓
		Inhibición de Akt	↓ ↓	↓
Colágeno I	ARNm	Basal	↑	↑
		TGF-β1	↑	↑
	Proteína	TGF-β1	↑	↑
		Inhibición de Erk	=	↓
		Inhibición de Akt	↓	↓ ↓
Colágeno total	Basal	↑	↑	
	TGF-β1	↑	↑ ↑	

Tabla 8. Acumulación de MEC en fibroblastos tratados con TGF-β1. Resumen de los resultados descritos anteriormente. = : sin cambios ↑ : aumento ↓ : disminución.

de Ras, tienen una menor expresión del ARNm correspondiente a las cadenas α1 y α2 del colágeno tipo I.

El TGF-β1 es una citocina profibrótica que posee un amplio abanico de funciones diferentes: es capaz de inducir la expresión de proteínas de matriz extracelular como colágeno I, fibronectina, tenascina y laminina (Blobe y cols., 2000; Branton y Kopp, 1999) además de inhibir la producción de proteasas e inducir la expresión de TIMPs (Cheng y Grande, 2002). El TGF-β1 aumenta el ARNm de la cadena α1 del colágeno tipo I en fibroblastos *in vitro* y contribuye a la

fibrogénesis *in vivo* (Fine y Goldstein, 1987; Karnoub y Weinberg, 2008). En el presente estudio hemos observado como en fibroblastos WT el TGF- $\beta$ 1 aumenta la expresión de los ARNm y de las proteínas colágeno tipo I y fibronectina, y también induce una mayor acumulación de proteínas colágenas en el medio de cultivo de estas células. Recientemente se ha demostrado que Ras y la señalización por TGF- $\beta$ 1 median efectos antagónicos sobre la expresión de genes de MEC en fibroblastos NIH3T3 transformados con Ras y Raf (Wisdom y cols., 2005). En los fibroblastos KO de N- y de H- el TGF- $\beta$ 1 también aumenta la expresión de colágeno tipo I, aunque no aumenta la expresión de su correspondiente ARNm. Este dato parece indicar que la expresión de colágeno tipo I inducida por TGF- $\beta$ 1 depende de H y N-Ras a nivel transcripcional, pero la menor expresión del ARNm no evita la acumulación de colágeno tipo I inducida por TGF- $\beta$ 1 por lo que esta citocina, en ausencia de H- y N-Ras, podría inducir un aumento en la expresión o activación de proteínas que estabilicen el ARNm, o una mayor inhibición de la expresión de colagenasas que degraden el colágeno tipo I. Apoyando nuestros resultados, Kim y cols. (2004) han observado en células epiteliales de mama humanas transformadas con H-Ras como el TGF- $\beta$ 1 induce una mayor activación de MMP-2 y MMP-9 que degradan la MEC para favorecer la migración de estas células. Más recientemente se ha descrito que H-Ras aumenta la expresión de uPA, la cual promueve directamente la degradación de la MEC, y también activa la cascada de plasminógeno- plasmina en astrocitos humanos (Zhao y cols., 2008). Además, en nuestro estudio, la síntesis de colágeno total inducida por TGF- $\beta$ 1 se reduce significativamente en ausencia de N-Ras; esta es la primera vez que se sugiere la implicación de la isoforma N-Ras en la síntesis total de esta proteína.

Por otro lado, el TGF- $\beta$ 1 no aumenta la expresión de fibronectina en fibroblastos H-*ras*<sup>-/-</sup> (aunque sí aumenta la expresión de su ARNm), por lo que la participación de esta isoforma parece ser necesaria para aumentar la traducción del ARNm o inhibir la degradación de la proteína. Sin embargo, en los fibroblastos KO de N-Ras el TGF- $\beta$ 1 no aumenta la expresión del ARNm de fibronectina pero sí su proteína, por lo que esta isoforma podría regular la transcripción del gen de fibronectina inducida por TGF- $\beta$ 1, y en su ausencia esta citocina podría inducir un aumento en la estabilización de este ARNm o en la inhibición de proteínas que degraden las fibronectina, aumentando así su acumulación. Estos resultados parecen indicar papeles contrapuestos de las isoformas H y N-Ras en la expresión de fibronectina inducida por TGF- $\beta$ 1.

La mayor activación de Erk y Akt anteriormente descrita en los fibroblastos KO de N- y H-Ras podría ser la responsable del aumento de MEC observado en nuestros fibroblastos en con-

diciones basales. La participación de la vía de Akt en la regulación de la síntesis y degradación de la MEC inducida por TGF- $\beta$ 1 está descrita en numerosos tipos celulares (Somanath y cols., 2007; Yano y cols., 2007; Zhang y cols., 2004). En fibroblastos de pulmón la inhibición de la PI3K por LY294002 disminuye la estabilidad del ARNm de la cadena  $\alpha$ 1 de colágeno tipo I y estos cambios no están asociados a variaciones en el nivel de transcripción del gen  $\alpha$ 1(I) de colágeno y tampoco es consecuencia de la toxicidad del LY294002 para la célula; además, esta inhibición es selectiva y no afecta ni al nivel de ARNm de CTGF ni de TGF- $\beta$ 1 (Ricupero y cols., 2001). Por otro lado, la ruta de PI3K/Akt también regula la síntesis de colágeno I inducida por el factor derivado de las plaquetas en fibroblastos en cultivo (Ivarsson y cols., 1998). Rodríguez-Peña y cols. han descrito una disminución en la cantidad de fibronectina y de colágeno I en riñones obstruidos de ratones sometidos a 3 días de OUU cuando se trataban con el inhibidor de la ruta PI3K/Akt LY294002 (Rodríguez-Peña y cols., 2008). Nuestros datos corroboran la participación de la vía de Akt en la expresión de colágeno tipo I y de fibronectina inducidas por TGF- $\beta$ 1, ya que existe una disminución de la expresión de ambas proteínas tras la inhibición de PI3K con LY294002; esta inhibición es menor en el caso de la fibronectina cuando H-Ras está ausente y no se produce si N-Ras está ausente. En nuestro estudio hemos observado una mayor expresión basal de colágeno tipo I en los fibroblastos H-*ras*<sup>-/-</sup> y N-*ras*<sup>-/-</sup> que podría deberse a una mayor expresión de fosfo-Akt, el cual podría estar regulando la estabilización del ARNm de colágeno I ya que al inhibir la PI3K disminuye la expresión de colágeno tipo I. También se ha descrito que la expresión de fibronectina está regulada en parte por Akt. En cultivos primarios de fibroblastos cardíacos también se ha descrito la implicación de la vía de PI3K/Akt dependiente de la activación del factor de necrosis tumoral NF $\kappa$ B en la estimulación de la producción de fibronectina inducida por interleucina 18 (Reddy y cols., 2008). Sin embargo, Zhang y cols. mostraron en células de carcinoma de pulmón una inhibición por LY294002 y por un dominante negativo de Akt del aumento en MMP2 inducido por IGF-1, metaloproteasa que tiene numerosos sustratos entre los que se encuentra la fibronectina (Zhang y cols., 2004).

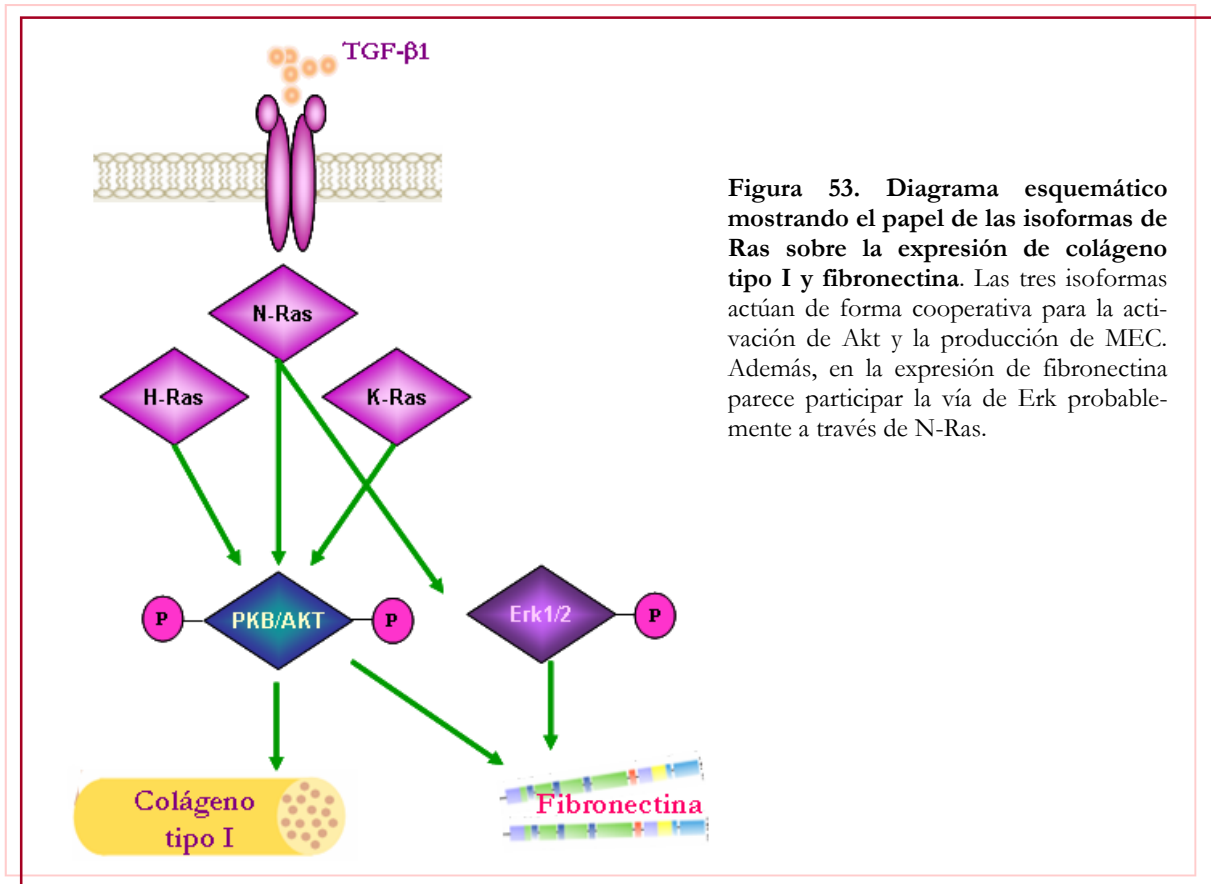
La ruta de MEK/Erk también juega un papel en la síntesis de MEC inducida por TGF- $\beta$ 1. Erk tiene diferentes funciones dependiendo del tipo celular y condiciones (Hayashida y cols., 1999; Mucsi y cols., 1996; Neugarten y cols., 1999; Svegliati-Baroni y cols., 1999; Tharaux y cols., 2000). Se han descrito efectos contrapuestos de la vía de Erk sobre la acumulación de MEC: puede tener un papel inhibitorio, como en fibroblastos de piel humanos y en células mesangiales humanas después de una estimulación mitogénica en los que Erk1/2 inhibe la síntesis de colágeno tipo I (Reunanen y cols., 2000); puede no ejercer ningún efecto, como en el estudio

de Rodríguez-Peña y cols. (2008) donde describieron que la inhibición de la vía de Erk no disminuye ni la expresión de fibronectina ni de colágeno tipo I en un modelo de fibrosis experimental y también se ha descrito un papel inductor de la síntesis de MEC, como en células hepáticas de rata (Jiang y cols., 2008) y en células mesangiales humanas (Hayashida y cols., 1999) en las que la inhibición de Erk por un inhibidor específico o mediante un dominante negativo bloquea el aumento de la síntesis de colágeno I inducido por TGF- $\beta$ 1. Nuestros resultados muestran que la inhibición de Erk origina una disminución de la expresión de fibronectina y colágeno tipo I en condiciones basales. Además, la expresión de fibronectina inducida por TGF- $\beta$ 1 se ve disminuida en presencia del inhibidor de MEK, mientras que la expresión de colágeno tipo I inducida por TGF- $\beta$ 1 no se ve afectada por esta inhibición, excepto en ausencia de H-Ras, donde también se produce un incremento de la expresión de fibronectina tras la inhibición de MEK. Estos resultados permiten sugerir que la expresión de fibronectina inducida por TGF- $\beta$ 1 depende de PI3K/Akt en presencia de N-Ras, y que además el TGF- $\beta$ 1 estimula la síntesis de fibronectina en presencia de H-Ras a través de Erk. Sin embargo cuando esta isoforma no está presente, la ruta de Erk tiene un efecto inhibitorio sobre la expresión de fibronectina tras el tratamiento con TGF- $\beta$ 1. Por otro lado, la expresión de colágeno tipo I inducido por TGF- $\beta$ 1 depende de PI3K/Akt y necesita la presencia de al menos una de las dos isoformas, H- o N-Ras, para que Akt module esta vía. Erk sólo regula también la expresión de colágeno I inducido por TGF- $\beta$ 1 sólo en ausencia de H-Ras.

En resumen, las isoformas N y H-Ras participan en la síntesis de MEC tanto en condiciones basales como tras el tratamiento con TGF- $\beta$ 1; además, nuestros resultados sugieren que la participación de H-Ras es más importante en condiciones basales, mientras que N-Ras parece modular la síntesis de MEC inducida por TGF- $\beta$ 1 (figura 53).

### **3. Efecto de la ausencia de H y N-Ras sobre la proliferación**

El descubrimiento de las proteínas Ras como pro-oncogenes y su implicación en el desarrollo de tumores nos muestra la importancia de estas proteínas en la regulación de la proliferación celular. En el 20% de los tumores humanos las mutaciones activadoras de Ras contribuyen al fenotipo de malignidad, incluyendo la desregulación del ciclo celular, de la muerte celular programada, de la capacidad invasiva y de la formación de nuevos vasos (Downward, 2003). El análisis del ciclo celular de nuestros fibroblastos muestra un menor número de células en etapas



**Figura 53.** Diagrama esquemático mostrando el papel de las isoformas de Ras sobre la expresión de colágeno tipo I y fibronectina. Las tres isoformas actúan de forma cooperativa para la activación de Akt y la producción de MEC. Además, en la expresión de fibronectina parece participar la vía de Erk probablemente a través de N-Ras.

proliferativas en los fibroblastos KO de H-Ras que en los controles, mientras que los fibroblastos *N-ras*<sup>-/-</sup> presentan un mayor número de células en fases S-G2-M que en los controles.

Hemos analizado la expresión de PCNA, Ki67 y p53 para valorar posibles cambios en la proliferación en ausencia de H- y N-Ras. PCNA tiene un papel esencial en el metabolismo de los ácidos nucleicos como componente de la maquinaria de reparación y replicación (Kelman, 1997). Nuestros resultados muestran una menor expresión de PCNA en fibroblastos KO de H y N-Ras, indicativa de una menor proliferación en condiciones basales. Ki67 se expresa en el núcleo de células que se encuentran en las fases G1, S, G2 y M del ciclo celular, mientras que en las fases de quiescencia o G0 no se expresa (Gerdes y cols., 1984). No hemos observado diferencias significativas en la expresión de Ki67 entre fibroblastos WT y KO en condiciones basales, lo cual puede deberse a que a estos fibroblastos se mantienen en un medio de cultivo pobre (0,5% SBF) para mantenerlos en quiescencia. Sin embargo observamos que la expresión de p53 es significativamente mayor en fibroblastos *H-ras*<sup>-/-</sup>, mientras que su expresión casi desaparece en ausencia de N-Ras. El p53 se ha denominado “el guardián del genoma” porque se activa principalmente tras el daño del ADN deteniendo el ciclo celular en la fase G1/S, activando proteínas reparadoras del ADN e iniciando la apoptosis si la reparación es imposible (Levine y cols., 2004). La sobreexpresión de p53 en ausencia de H-Ras podría ser la responsable de la notable reduc-

<p>● vs WT basal ● vs KO basal ● vs TGF-β1</p>		WT	H- <i>ras</i> <sup>-/-</sup>	N- <i>ras</i> <sup>-/-</sup>
Número de células viables	Basal			
	TGF-β1	↑↑	↑	↑
	Inhibición de Erk	↓	↓	=
	Inhibición de Akt	↓	↓	↓
Ki67	Basal		=	=
	TGF-β1	↑	↑	=
	Inhibición de Erk	↓	=	↓
	Inhibición de Akt	↓	↓	↓
p53	Basal		↑↑	↓↓
	TGF-β1	↑	=	=
PCNA	Basal		↓	↓
	TGF-β1	↑	=	=

Tabla 8. Proliferación celular en fibroblastos tratados con TGF-β1. Resumen de los resultados descritos anteriormente. = : sin cambios ↑ : aumento ↓ : disminución.

ción en la proliferación observada en los fibroblastos KO de H-Ras; la casi completa inhibición de su expresión en ausencia de N-Ras podría estar relacionada con el aumento de células en fase S-G2-M que se observa tras el análisis de ciclo celular en fibroblastos N-*ras*<sup>-/-</sup>, aunque necesitaríamos experimentos adicionales para poder identificar el papel de p53 en la regulación de la proliferación en nuestros fibroblastos KO.

Por otro lado, numerosos autores han demostrado que el TGF-β1 estimula la proliferación en fibroblastos (Cunliffe y cols., 1996; Kay y cols., 1998; Martínez-Salgado y cols., 2006) y en células mesangiales (Haberstroh y cols., 1993). Nuestros datos confirman el efecto proliferativo de TGF-β1 en fibroblastos. Es destacable la importancia de Ras en este proceso ya que en

ausencia de H-Ras o de N-Ras la proliferación inducida por TGF- $\beta$ 1 está sensiblemente disminuida. Estos datos están de acuerdo con experimentos realizados anteriormente por nuestro grupo de investigación que demuestran que en fibroblastos dobles KO de N y H-Ras la proliferación inducida por TGF- $\beta$ 1 también es notablemente inferior a la que se observa en fibroblastos WT (Martinez-Salgado y cols., 2006). En cultivos primarios de fibroblastos renales la inhibición de K-Ras o de H-Ras mediante un dominante negativo produce una disminución en la proliferación inducida por EGF (Sharpe y cols., 2000). Recientemente, Rosseland y cols. (2008) demostraron en hepatocitos transfectados con las isoformas H-Ras o K-Ras constitutivamente activadas que la incorporación de timidina al DNA inducida por EGF aumentaba significativamente en células que expresaban H-Ras activo pero no K-Ras. Estos resultados, al igual que los nuestros, ratifican la importancia de Ras no sólo en los procesos proliferativos producidos durante el desarrollo del cáncer, sino también en aquellos que tienen lugar en otras condiciones. Además, hemos observado como en ausencia de H- o N-Ras no hay prácticamente cambios en la expresión de Ki67 y PCNA tras el tratamiento con TGF- $\beta$ 1, lo cual confirma los datos obtenidos anteriormente. Esta reducción en la proliferación observada en los fibroblastos H-*ras*<sup>-/-</sup> y N-*ras*<sup>-/-</sup> en condiciones basales y tras el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 podría estar directamente relacionada con el incremento en la síntesis de MEC observada en estas células. A ese respecto, Weber y cols. (2001) han mostrado previamente como el biglicano, un componente de la MEC, inhibe la proliferación de células cancerígenas pancreáticas tanto en presencia como en ausencia de TGF- $\beta$ 1, induciendo la parada del ciclo celular en G1 y una reducción en la expresión de PCNA, así como una reducción parcial de la activación de Ras y de Erk in vitro.

Una vez comprobada la importancia de Ras en la regulación de la proliferación celular quisimos comprobar si las isoformas de Ras regulaban este proceso a través de las rutas de señalización de Erk y Akt. Tanto la inhibición de la vía de Erk como la de Akt inducen una disminución en la proliferación y en la expresión de Ki67 inducido por TGF- $\beta$ 1 en fibroblastos WT. La activación de MEK/Erk es capaz de promover diferentes procesos celulares muchas veces contrapuestos (Marshall, 1995): se ha descrito que una elevada expresión de fosfo-Erk induce parada en el ciclo celular junto con senescencia, apoptosis y diferenciación, mientras que un nivel de activación bajo pero mantenido es una característica común en muchos sistemas celulares en proliferación (Kahan y cols., 1992; Pumiglia y Decker, 1997; Qui y Green, 1992; Roovers y Assoian, 2000). Además, se ha demostrado que la proliferación inducida por IGF-1 es regulada en parte por la ruta de MEK-Erk (Phan y cols., 2003). La activación de Erk también está relacionada con aumentos en la proliferación de células renales en cultivo (Ishida y cols., 1999). En cé-

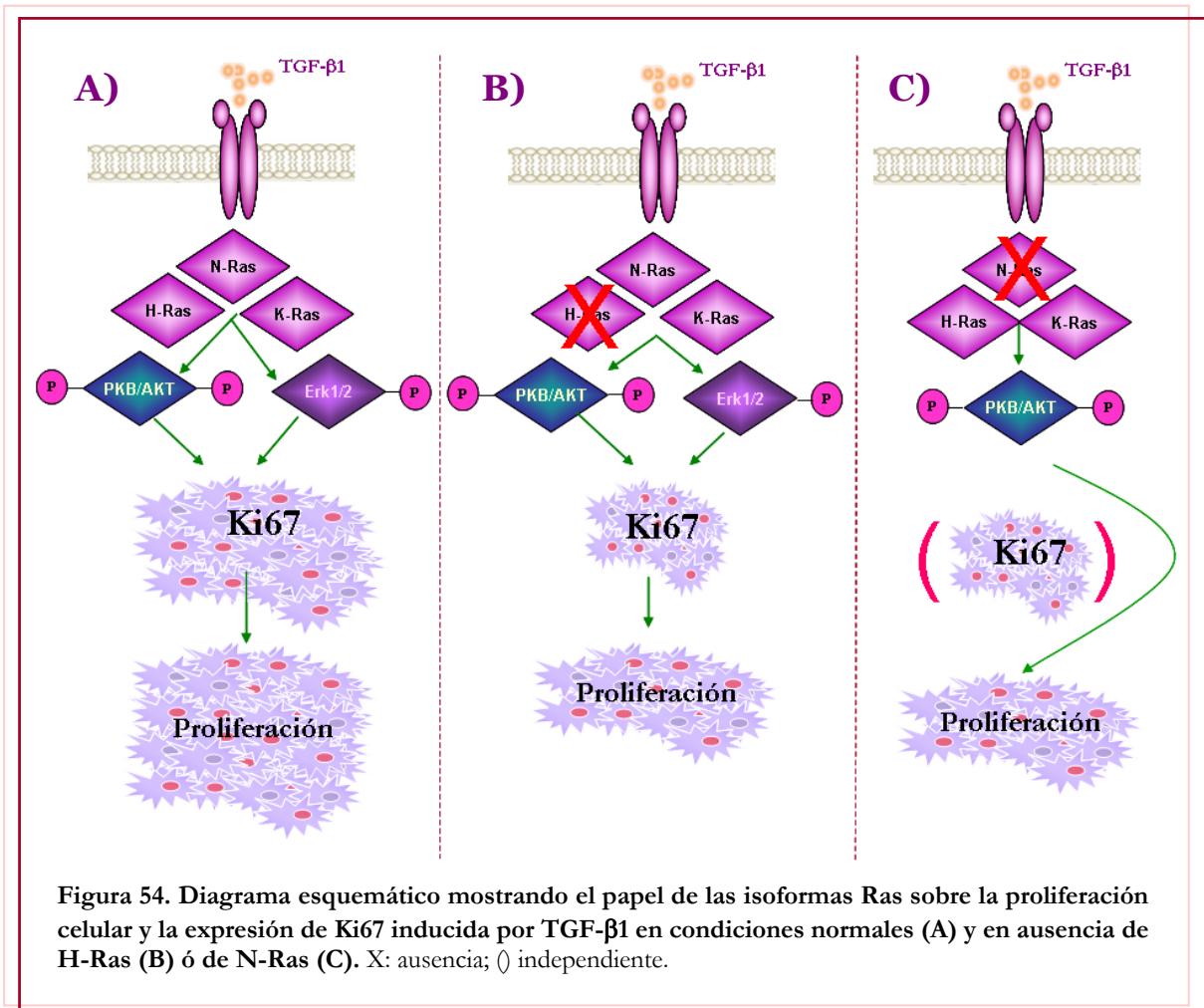
lulas hepáticas estrelladas la inhibición de la vía de Erk con PD98059 provoca una disminución de la proliferación inducida por acetaldehído, mediante una parada en la fase G0-G1 de forma dosis dependiente (Jiang y cols., 2008). La vía de Erk también está implicada en la respuesta proliferativa de fibroblastos de pulmón inducida por la estimulación de los receptores muscarínicos (Matthiesen y cols., 2007). Por otro lado, en fibroblastos procedentes de embriones de ratón dobles KO para dos isoformas de Raf, Raf A y Raf-1, Mercer y cols. (2005) han demostrado una disminución de la expresión de Ki67 tras la inhibición de Erk. Además la inhibición con el inhibidor de MEK PD98059 previene la expresión de Ki67 inducida por el tratamiento con EGF en células pancreáticas (Rescan y cols., 2005). En concordancia con estos datos, nuestros resultados muestran una menor proliferación inducida por TGF- $\beta$ 1 en ausencia de H y de N-Ras, que es inhibida por U0126 en los fibroblastos H-*ras*<sup>-/-</sup>, pero no en los N-*ras*<sup>-/-</sup>; anteriormente habíamos descrito la participación de la vía de Erk en la proliferación inducida por TGF- $\beta$ 1 en fibroblastos dobles KO de H y N-Ras (Martinez-Salgado y cols., 2006). Sin embargo, la expresión de Ki67 tras el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 se inhibe con el inhibidor de MEK U0126, excepto en ausencia de H-Ras, por lo que la isoforma H-Ras podría ser responsable de estimular la expresión de Ki67 a través de MEK/Erk e inducir proliferación. Estos resultados sugieren que la vía de Erk participa en la proliferación celular inducida por TGF- $\beta$ 1 probablemente a través de N y/o K-Ras y que H-Ras también está regulando la proliferación a través de una ruta independiente de Erk, pero dependiente de Ki67. Recientemente, Traynor y cols. (2008) han observado en pacientes con tumores de próstata que un incremento en la expresión de N-Ras en la membrana de células tumorales está asociado a incrementos en la fosforilación de MAPK y en la expresión de Ki67 (Traynor y cols., 2008).

Otros autores han demostrado recientemente la participación de la vía de Akt en la proliferación de fibroblastos. Kim y cols. (2007) han descrito una disminución de la proliferación celular tras la inhibición de la fosforilación de Akt con el inhibidor de PI3K LY294002 tanto en fibroblastos de pulmón estimulados con radiación ionizante como en fibroblastos NIH3T3 tratados con la proteína Wnt3a que modula el crecimiento y la proliferación. Jeon y cols. (2007) mostraron también que la proliferación inducida por EGF en fibroblastos L929 está mediada por Akt, y que los efectos de EGF se suprimen tras la inhibición específica de Akt. Además, la inhibición de PI3K reduce un 68% la proliferación en fibroblastos renales (Winbanks y cols., 2007) y la proliferación inducida por otras citocinas como PDGF, FGF e IGF-1 en células de los discos intervertebrales (Pratsinis y Kletsas, 2007), o en macrófagos estimulados con ceramida-1 fosfato (Gangoiti y cols., 2008). Dan y cols. (2009) han descrito también que la inhibición



de la ruta PI3K/Akt por un nuevo inhibidor de PI3K (ZSTK474) suprime la expresión nuclear de ciclina D1 y Ki67, mediante la parada del ciclo celular en las fases G0/G1. Nosotros hemos observado que la inhibición de PI3K/Akt inhibe la proliferación y la expresión de Ki67 inducida por TGF- $\beta$ 1 en fibroblastos WT, H-*ras*<sup>-/-</sup> y N-*ras*<sup>-/-</sup>; sin embargo, en los fibroblastos dobles KO de N y H-Ras la proliferación inducida por TGF- $\beta$ 1 sólo parece depender de la vía de Erk (Martínez-Salgado y cols., 2006) por lo que las isoformas H- y N-Ras individualmente no parecen ser relevantes para la activación de Akt y la consiguiente estimulación de la proliferación celular inducida por TGF- $\beta$ 1, pero es necesaria la presencia de una de ellas para estimular la proliferación a través de Akt.



Resumiendo, en nuestro modelo experimental el TGF- $\beta$ 1 activa las distintas isoformas de Ras, las cuales actúan de forma complementaria estimulando la vía de MAPK-Erk y PI3K-Akt; solamente en ausencia de N-Ras la proliferación es independiente de la vía de Erk. Sin embargo, en células H-*ras*<sup>-/-</sup> observamos una menor proliferación inducida por TGF- $\beta$ 1, la cual se reduce al inhibir tanto la vía de Erk como de Akt; en este caso, la sobreexpresión de fosfo-Akt que se



observa en condiciones basales en ausencia de H-Ras podría ser la responsable de esta reducción en la proliferación, ya que se ha descrito que una activación constitutiva de Akt puede evitar la traslocación al núcleo de fosfo-Erk y reducir así la proliferación (Gervais y cols., 2006). Por otra parte, mediante la inhibición de GSK3 $\beta$  inducida por Akt se puede estimular la apoptosis (Chambard y cols., 2007; Le Gall y cols., 2003), provocando una reducción del número de células viables (figura 54).

### 3. Efecto de la ausencia de H y N-Ras sobre la migración

La participación de Ras en procesos de migración celular ha sido muy estudiada en relación con la invasividad de los tumores y su capacidad para producir metástasis (Kelly-Spratt y cols., 2004; Reifenberger y cols., 2004; Santini y cols., 2008). En muchos tipos celulares (fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales, melanoma y células epiteliales de mama) la expresión del oncogen H-Ras constitutivamente activado provoca un aumento en la actividad migratoria que contribuye al comportamiento metastático de muchos tumores (Ahn y cols., 2004; Charvat y cols., 1998; Fujita y cols., 1999; Iwamoto y cols., 1993; Munevar y cols., 2001; Shin y cols., 2005). Además en fibroblastos NIH3T3 Schneider y cols. (2008) mostraron que H-Ras regula los cambios en el volumen celular necesarios para aumentar su migración. En células de melanoma la inhibición mediante ARN<sub>i</sub> del oncogen N-Ras inhibe la migración además del crecimiento celular y la invasividad del tumor (Eskandarpour y cols., 2009). Nuestros resultados muestran que en ausencia de H-Ras o de N-Ras la migración de los fibroblastos es menor que lo de los fibroblastos WT, lo cual parece confirmar la necesidad de la presencia de ambas isoformas para que se produzca una migración celular normal. Estos datos están de acuerdo con los de Nobes y Hall (1999) que describieron que la migración de fibroblastos embrionarios de rata era menor cuando se bloqueaba Ras con el anticuerpo neutralizante Y13-259. Por otro lado, Fotiadou y cols. (2007) observaron una menor migración a través de cámara de Boyden de MEFs transformados y deficientes en N-Ras y K-Ras. Estos autores postulan que N y K-Ras tienen un papel complementario que favorece la transformación celular y que la ausencia de una isoforma descompensa la señalización a favor de la de la otra y reduce la transformación. Estos autores creen que N-Ras está implicada en procesos relacionados con la reorganización del citoesqueleto de actina y la formación de uniones focales evitando la migración probablemente a través de Raf y Rho A, mientras que K-Ras está más implicada en los procesos de migración propiamente dicha, favoreciendo la movilidad celular probablemente a través de Akt. En cuanto a la isoforma H-Ras no le asignan ningún papel, debido a que no son capaces de detectar su expresión por western-blot al igual que Wolfman (2000) y por lo tanto consideran que no se expresa en MEF;

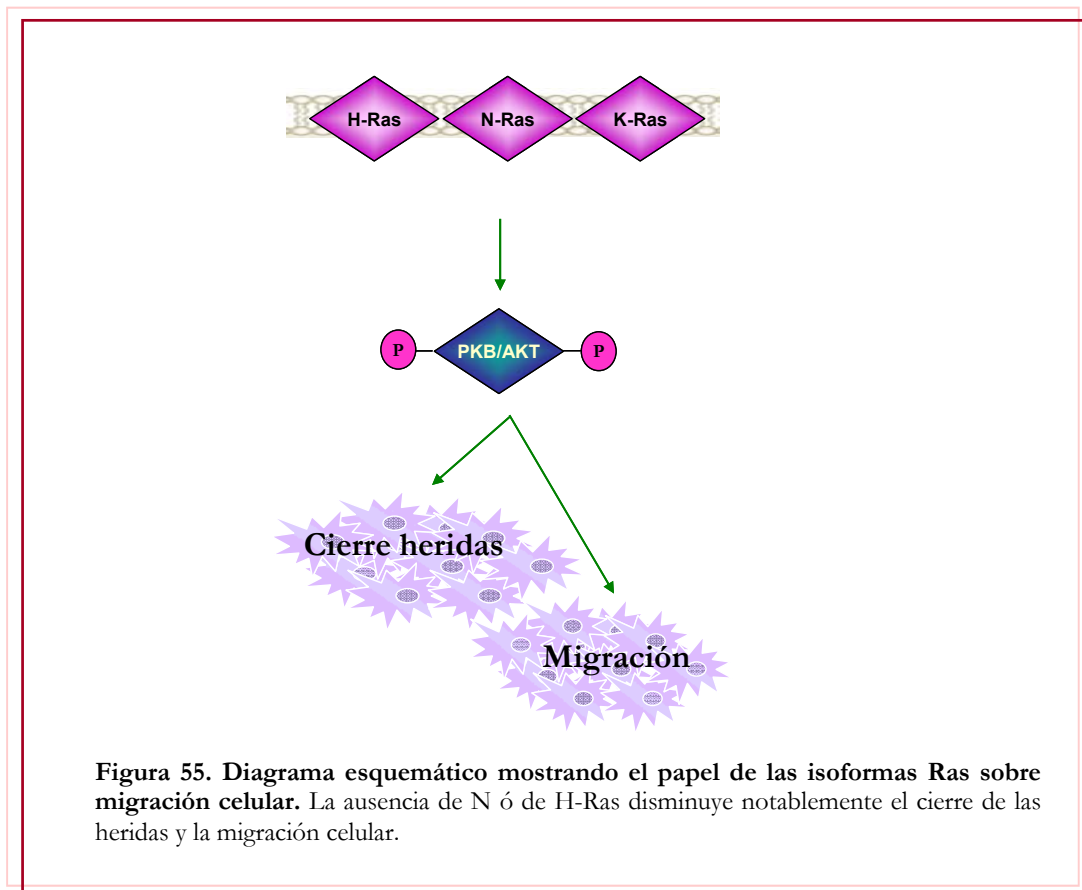
			WT	H- <i>ras</i> <sup>-/-</sup>	N- <i>ras</i> <sup>-/-</sup>
		 vs WT basal  vs KO basal			
Velocidad de cierre de heridas	Basal			↓ ↓	↓ ↓
	Inhibición de Erk	=	=	↑	=
	Inhibición de Akt	↓ ↓	↓ ↓	=	=
Migración a través de <i>transwell</i>	Basal			↓ ↓	↓ ↓
	Inhibición de Erk	=	=	↑	↓
	Inhibición de Akt	=	=	↓	↓

**Tabla 9. Movilidad de fibroblastos crecidos en 0,5% de SBF.** Resumen de los resultados descritos anteriormente. = : sin cambios ↑ : aumento ↓ : disminución

sin embargo, nosotros hemos mostrado previamente la expresión de H-Ras en MEF (Martinez-Salgado y cols., 2006). Nuestros datos muestran una menor migración en ausencia de N-Ras, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Fotiadou y cols. (2007); sin embargo en fibroblastos KO de H-Ras también observamos una disminución en la migración que no se explicaría según el modelo propuesto por estos autores. Por ello, tanto las isoformas H- como N-Ras parecen estar directamente implicadas en la movilidad celular.

Una vez comprobada la participación de las isoformas de Ras en la migración en fibroblastos, hemos querido evaluar también la participación de las vías de Erk y Akt en los procesos de movilidad celular. Hemos observado una clara participación de Akt en la migración celular, puesto que cuando tratamos fibroblastos WT con el inhibidor de PI3K se reduce la migración hasta niveles similares a los fibroblastos KO. En ausencia de las isoformas H- y N-Ras no observamos diferencias en la migración tras el tratamiento con LY294002, probablemente porque la activación de H y N-Ras es necesaria para la activación de Akt o porque la movilidad de estos fibroblastos es ya tan reducida que no se puede reducir más. Liao y cols. (2006) describieron que los fibroblastos K-Ras<sup>-/-</sup>, pero no los N-Ras<sup>-/-</sup> son defectuosos en la activación de Akt inducida por factores de crecimiento y esto está relacionado con un defecto en la migración celular. También hemos indicado anteriormente que K-Ras participa en los procesos de migración, favoreciendo la movilidad celular probablemente a través de Akt (Fotiadou y cols., 2007). La participación de la vía de Erk en la migración celular parece ser menos importante; de hecho sólo en ausencia de H-Ras la migración celular parece ser dependiente de Erk. A ese respecto, se ha descrito que la activación de la vía de señalización Ras/Raf/MAPK estimula la movilidad de los fibro-

blastos de ratón (Glading y cols., 2000). Por otro lado, Fotiadou y cols. (2007) sugieren que la inhibición de la señalización de K-Ras produce una disminución en la migración celular y este efecto es revertido parcialmente tras la inhibición de Raf o de Rho A.



En conclusión, todos estos datos parecen indicar la implicación de las isoformas de Ras, H- y N-Ras, en la acumulación de MEC, proliferación y movilidad celular que tienen lugar durante el desarrollo de la fibrosis, ya que ambas isoformas parecen estar participando, en mayor o menor medida y de forma cooperativa, en estos procesos en fibroblastos embrionarios. H-Ras parece estar más implicada en la síntesis de MEC en condiciones basales, pero en respuesta a TGF- $\beta$ 1, la participación de N-Ras parece ser más relevante en dicha síntesis; en ausencia de ambas isoformas, esta acumulación de MEC parece ser mayoritariamente dependiente de la vía de Akt, y en menor medida de Erk. La acumulación de MEC podría estar asociada a la menor proliferación que se observa en estos fibroblastos, proliferación que parece ser a su vez dependiente de ambas isoformas de Ras. Las vías de Erk y Akt participan en la proliferación y expresión de Ki67 inducida por TGF- $\beta$ 1, excepto en ausencia de N-Ras, en cuyo caso es independiente de Erk y Ki67. Además, este descenso en la proliferación que se observa en ausencia de

estas isoformas de Ras podría ser responsable, al menos en parte, de la menor movilidad celular observada en los fibroblastos KO de H- y N-Ras, donde la participación de Akt parece ser imprescindible.

**CONCLUSIONES**



---

De los resultados anteriormente detallados en esta Memoria de Tesis Doctoral extraemos las siguientes conclusiones:

- La acumulación de MEC está regulada por la presencia de H y N-Ras y parece depender fundamentalmente de Akt, el cual está sobreactivado en ausencia de estas isoformas de Ras. Además, la participación de N-Ras parece ser más relevante que la de H-Ras en el aumento de la expresión de proteínas de MEC inducido por TGF- $\beta$ 1.
- La vía de Erk regula la proliferación celular inducida por TGF- $\beta$ 1, excepto en ausencia de N-Ras, en cuyo caso este proceso es también independiente de Ki67. Además, es necesaria la presencia de al menos una de las dos isoformas para que Akt module este proceso.
- La movilidad de los fibroblastos es dependiente de H y N-Ras y está mediada fundamentalmente por la ruta de PI3K/Akt.
- La mayor producción de MEC en ausencia de H- y N-Ras puede ser responsable de la menor capacidad proliferativa de estos fibroblastos; a su vez, este descenso en la proliferación limita en parte la capacidad de migración de estas células en ausencia de las isoformas de Ras.





## BIBLIOGRAFÍA



- Ahn SM, Jeong SJ, Kim YS, Sohn Y, Moon A (2004). **Retroviral delivery of TIMP-2 inhibits H-ras-induced migration and invasion in MCF10A human breast epithelial cells.** *Cancer Lett* 207: 49-57.
- Alberts B, Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (ed.) (2002) *Molecular biology of the cell.*
- Alcock RA, Dey S, Chendil D, Inayat MS, Mohiuddin M, Hartman G y cols. (2002). **Farnesyltransferase inhibitor (L-744,832) restores TGF-beta type II receptor expression and enhances radiation sensitivity in K-ras mutant pancreatic cancer cell line MIA PaCa-2.** *Oncogene* 21: 7883-90.
- Alessi DR (2001). **Discovery of PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction.** Colworth Medal Lecture. *Biochem Soc Trans* 29: 1-14.
- Alexandrow MG, Moses HL (1997). **Kips off to Myc: implications for TGF beta signaling.** *J Cell Biochem* 66: 427-32.
- Alliston T, Choy L, Ducy P, Karsenty G, Derynck R (2001). **TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation.** *Embo J* 20: 2254-72.
- Altiok S, Batt D, Altiok N, Papautsky A, Downward J, Roberts TM y cols. (1999). **Heregulin induces phosphorylation of BRCA1 through phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT in breast cancer cells.** *J Biol Chem* 274: 32274-8.
- Aoki Y, Niihori T, Narumi Y, Kure S, Matsubara Y (2008). **The RAS/MAPK syndromes: novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders.** *Hum Mutat* 29: 992-1006.
- Apolloni A, Prior IA, Lindsay M, Parton RG, Hancock JF (2000). **H-ras but not K-ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway.** *Mol Cell Biol* 20: 2475-87.
- Arozarena I, Matallanas D, Berciano MT, Sanz-Moreno V, Calvo F, Munoz MT y cols. (2004). **Activation of H-Ras in the endoplasmic reticulum by the RasGRF family guanine nucleotide exchange factors.** *Mol Cell Biol* 24: 1516-30.
- Attisano L, Wrana JL (1998). **Mads and Smads in TGF beta signalling.** *Curr Opin Cell Biol* 10: 188-94.
- Aumailley M, Krieg T (1996). **Laminins: a family of diverse multifunctional molecules of basement membranes.** *J Invest Dermatol* 106: 209-214.
- Avraham H, Park SY, Schinkmann K, Avraham S (2000). **RAFTK/Pyk2-mediated cellular signalling.** *Cell Signal* 12: 123-33.
- Ballester R, Marchuk D, Boguski M, Saulino A, Letcher R, Wigler M y cols. (1990). **The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins.** *Cell* 63: 851-9.
- Barbacid M (1987). **ras genes.** *Annu Rev Biochem* 56: 779-827.
- Barbara NP, Wrana JL, Letarte M (1999). **Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily.** *J Biol Chem* 274: 584-94.
- Bar-Sagi D (2001). **A Ras by any other name.** *Mol Cell Biol* 21: 1441-3.
- Bar-Sagi D, Hall A (2000). **Ras and Rho GTPases: a family reunion.** *Cell* 103: 227-38.
- Beausejour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P y cols. (2003). **Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways.** *Embo J* 22: 4212-22.
- Bellis SL, Newman E, Friedman EA (1999). **Steps in integrin beta1-chain glycosylation mediated by TGFbeta1 signaling through Ras.** *J Cell Physiol* 181: 33-44.
- Bellon T, Corbi A, Lastres P, Cales C, Cebrian M, Vera S y cols. (1993). **Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions.** *Eur J Immunol* 23: 2340-5.
- Bernards A, Settleman J (2004). **GAP control: regulating the regulators of small GTPases.** *Trends Cell Biol* 14: 377-85.

- Bird MA, Black D, Lange PA, Samson CM, Hayden M, Behrns KE (2003). **NFkappaB inhibition decreases hepatocyte proliferation but does not alter apoptosis in obstructive jaundice.** *J Surg Res* 114: 110-7.
- Bivona TG, Quatela S, Philips MR (2006). **Analysis of Ras activation in living cells with GFP-RBD.** *Methods Enzymol* 407: 128-43.
- Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF (2000). **Role of transforming growth factor beta in human disease.** *N Engl J Med* 342: 1350-8.
- Blomen VA, Boonstra J (2007). **Cell fate determination during G1 phase progression.** *Cell Mol Life Sci* 64: 3084-104.
- Boguski MS, McCormick F (1993). **Proteins regulating Ras and its relatives.** *Nature* 366: 643-54.
- Boonstra J (2003). **Progression through the G1-phase of the on-going cell cycle.** *J Cell Biochem* 90: 244-52.
- Boonstra J (2007). **Identification of a restriction point at the M/G1 transition during the ongoing cell cycle.** *Adv Enzyme Regul* 47: 208-21.
- Border WA, Noble NA, Yamamoto T, Harper JR, Yamaguchi Y, Pierschbacher MD y cols. (1992). **Natural inhibitor of transforming growth factor-beta protects against scarring in experimental kidney disease.** *Nature* 360: 361-4.
- Boriack-Sjodin PA, Margarit SM, Bar-Sagi D, Kuriyan J (1998). **The structural basis of the activation of Ras by Sos.** *Nature* 394: 337-43.
- Bos JL (1997). **Ras-like GTPases.** *Biochim Biophys Acta* 1333: M19-31.
- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F (1990). **The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions.** *Nature* 348: 125-32.
- Branton MH, Kopp JB (1999). **TGF-beta and fibrosis.** *Microbes Infect* 1: 1349-65.
- Brown JC, Timpl R (1995). **The collagen superfamily.** *Int Arch Allergy Immunol* 107: 484-90.
- Brown TL, Patil S, Howe PH (2000). **Analysis of TGF-beta-inducible apoptosis.** *Methods Mol Biol* 142: 149-67.
- Carmeliet P, Stassen JM, Van Vlaenderen I, Meidell RS, Collen D, Gerard RD (1997). **Adenovirus-mediated transfer of tissue-type plasminogen activator augments thrombolysis in tissue-type plasminogen activator-deficient and plasminogen activator inhibitor-1-overexpressing mice.** *Blood* 90: 1527-34.
- Casey PJ (1995). **Mechanisms of protein prenylation and role in G protein function.** *Biochem Soc Trans* 23: 161-6.
- Cen H, Papageorge AG, Zippel R, Lowy DR, Zhang K (1992). **Isolation of multiple mouse cDNAs with coding homology to Saccharomyces cerevisiae CDC25: identification of a region related to Bcr, Vav, Dbl and CDC24.** *Embo J* 11: 4007-15.
- Chambard JC, Lefloch R, Pouyssegur J, Lenormand P (2007). **ERK implication in cell cycle regulation.** *Biochim Biophys Acta* 1773: 1299-310.
- Chardin P, Camonis JH, Gale NW, van Aelst L, Schlessinger J, Wigler MH y cols. (1993). **Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2.** *Science* 260: 1338-43.
- Charvat S, Chignol MC, Souchier C, Le Griel C, Schmitt D, Serres M (1998). **Cell migration and MMP-9 secretion are increased by epidermal growth factor in HaCaT-ras transfected cells.** *Exp Dermatol* 7: 184-90.
- Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J y cols. (1992). **Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells.** *J Biol Chem* 267: 19027-30.
- Chen HJ, Rojas-Soto M, Oguni A, Kennedy MB (1998). **A synaptic Ras-GTPase activating protein (p135 SynGAP) inhibited by CaM kinase II.** *Neuron* 20: 895-904.
- Chen S, Lin F, Shin ME, Wang F, Shen L, Hamm HE (2008). **RACK1 regulates directional cell migration by acting on G betagamma at the interface with its effectors PLC beta and PI3K gamma.** *Mol Biol Cell* 19: 3909-22.
- Chen Z, Otto JC, Bergo MO, Young SG, Casey PJ (2000). **The C-terminal polylysine region and methylation of K-Ras are critical**

- for the interaction between K-Ras and microtubules. *J Biol Chem* 275: 41251-7.
- Cheng H, Sukal S, Deng H, Leyh TS, Callender R (2001). **Vibrational structure of GDP and GTP bound to RAS: an isotope-edited FTIR study.** *Biochemistry* 40: 4035-43.
  - Cheng J, Grande JP (2002). **Transforming growth factor-beta signal transduction and progressive renal disease.** *Exp Biol Med (Maywood)* 227: 943-56.
  - Chiu VK, Bivona T, Hach A, Sajous JB, Silletti J, Wiener H y cols. (2002). **Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi.** *Nat Cell Biol* 4: 343-50.
  - Chong H, Vikis HG, Guan KL (2003). **Mechanisms of regulating the Raf kinase family.** *Cell Signal* 15: 463-9.
  - Choy E, Chiu VK, Silletti J, Feoktistov M, Morimoto T, Michaelson D y cols. (1999). **Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi.** *Cell* 98: 69-80.
  - Christian JL, Nakayama T (1999). **Can't get no SMADisfaction: Smad proteins as positive and negative regulators of TGF-beta family signals.** *Bioessays* 21: 382-90.
  - Clark EA, Hynes RO (1996). **Ras activation is necessary for integrin-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 2 and cytosolic phospholipase A2 but not for cytoskeletal organization.** *J Biol Chem* 271: 14814-8.
  - Cobrinik D (2005). **Pocket proteins and cell cycle control.** *Oncogene* 24: 2796-809.
  - Coelho CM, Leever SJ (2000). **Do growth and cell division rates determine cell size in multicellular organisms?** *J Cell Sci* 113 ( Pt 17): 2927-34.
  - Coffey PJ, Jin J, Woodgett JR (1998). **Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation.** *Biochem J* 335 ( Pt 1): 1-13.
  - Colicelli J (2004). **Human RAS superfamily proteins and related GTPases.** *Sci STKE* 2004: RE13.
  - Crabbe T, O'Connell JP, Smith BJ, Docherty AJ (1994). **Reciprocated matrix metalloproteinase activation: a process performed by interstitial collagenase and progelatinase A.** *Biochemistry* 33: 14419-25.
  - Cristofalo VJ, Lorenzini A, Allen RG, Torres C, Tresini M (2004). **Replicative senescence: a critical review.** *Mech Ageing Dev* 125: 827-48.
  - Cunliffe IA, Rees RC, Rennie IG (1996). **The effect of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 on the proliferation of human Tenon's capsule fibroblasts in tissue culture.** *Acta Ophthalmol Scand* 74: 31-5.
  - Dan S, Yoshimi H, Okamura M, Mukai Y, Yamori T (2009). **Inhibition of PI3K by ZSTK474 suppressed tumor growth not via apoptosis but G0/G1 arrest.** *Biochem Biophys Res Commun* 379: 104-9.
  - Datta SR, Brunet A, Greenberg ME (1999). **Cellular survival: a play in three Akts.** *Genes Dev* 13: 2905-27.
  - Denayer E, de Ravel T, Legius E (2008). **Clinical and molecular aspects of RAS related disorders.** *J Med Genet* 45: 695-703.
  - Derynck R, Feng XH (1997). **TGF-beta receptor signaling.** *Biochim Biophys Acta* 1333: F105-50.
  - Derynck R, Zhang Y, Feng XH (1998). **Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses.** *Cell* 95: 737-40.
  - Dickinson CD, Veerapandian B, Dai XP, Hamlin RC, Xuong NH, Ruoslahti E y cols. (1994). **Crystal structure of the tenth type III cell adhesion module of human fibronectin.** *J Mol Biol* 236: 1079-92.
  - Dokic D, Dettman RW (2006). **VCAM-1 inhibits TGFbeta stimulated epithelial-mesenchymal transformation by modulating Rho activity and stabilizing intercellular adhesion in epicardial mesothelial cells.** *Dev Biol* 299: 489-504.
  - Downward J (1998). **Ras signalling and apoptosis.** *Curr Opin Genet Dev* 8: 49-54.
  - Downward J (2003). **Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy.** *Nat Rev Cancer* 3: 11-22.
  - Drysdale BE, Zacharchuk CM, Shin HS (1983). **Mechanism of macrophage-mediated cytotoxicity: production of a soluble cytotoxic factor.** *J Immunol* 131: 2362-7.

- Dunphy WG (1994). **The decision to enter mitosis.** *Trends Cell Biol* 4: 202-7.
- Ebinu JO, Bottorff DA, Chan EY, Stang SL, Dunn RJ, Stone JC (1998). **RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs.** *Science* 280: 1082-6.
- Eckes B, Kessler D, Aumailley M, Krieg T (1999). **Interactions of fibroblasts with the extracellular matrix: implications for the understanding of fibrosis.** *Springer Semin Immunopathol* 21: 415-29.
- Eddy AA, Giachelli CM (1995). **Renal expression of genes that promote interstitial inflammation and fibrosis in rats with protein-overload proteinuria.** *Kidney Int* 47: 1546-57.
- Eikmans M, Baelde JJ, de Heer E, Bruijn JA (2003). **ECM homeostasis in renal diseases: a genomic approach.** *J Pathol* 200: 526-36.
- Elledge SJ, Winston J, Harper JW (1996). **A question of balance: the role of cyclin-kinase inhibitors in development and tumorigenesis.** *Trends Cell Biol* 6: 388-92.
- Ellis CA, Clark G (2000). **The importance of being K-Ras.** *Cell Signal* 12: 425-34.
- Eskandarpour M, Huang F, Reeves KA, Clark E, Hansson J (2009). **Oncogenic NRAS has multiple effects on the malignant phenotype of human melanoma cells cultured in vitro.** *Int J Cancer* 124: 16-26.
- Esteban LM, Fernandez-Medarde A, Lopez E, Yienger K, Guerrero C, Ward JM y cols. (2000). **Ras-guanine nucleotide exchange factor sos2 is dispensable for mouse growth and development.** *Mol Cell Biol* 20: 6410-3.
- Esteban LM, Vicario-Abejon C, Fernandez-Salguero P, Fernandez-Medarde A, Swaminathan N, Yienger K y cols. (2001). **Targeted genomic disruption of H-ras and N-ras, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development.** *Mol Cell Biol* 21: 1444-52.
- Ezer S, Bayes M, Elomaa O, Schlessinger D, Kere J (1999). **Ectodysplasin is a collagenous trimeric type II membrane protein with a tumor necrosis factor-like domain and co-localizes with cytoskeletal structures at lateral and apical surfaces of cells.** *Hum Mol Genet* 8: 2079-86.
- Fam NP, Fan WT, Wang Z, Zhang LJ, Chen H, Moran MF (1997). **Cloning and characterization of Ras-GRF2, a novel guanine nucleotide exchange factor for Ras.** *Mol Cell Biol* 17: 1396-406.
- Fan JM, Ng YY, Hill PA, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Atkins RC y cols. (1999). **Transforming growth factor-beta regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in vitro.** *Kidney Int* 56: 1455-67.
- Ferrell JE, Jr., Martin GS (1989). **Tyrosine-specific protein phosphorylation is regulated by glycoprotein IIb-IIIa in platelets.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 2234-8.
- Field J, Broek D, Kataoka T, Wigler M (1987). **Guanine nucleotide activation of, and competition between, RAS proteins from *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol Cell Biol* 7: 2128-33.
- Fine A, Goldstein RH (1987). **The effect of PGE2 on the activation of quiescent lung fibroblasts.** *Prostaglandins* 33: 903-13.
- Finlan L, Hupp TR (2004). **The N-terminal interferon-binding domain (IBiD) homology domain of p300 binds to peptides with homology to the p53 transactivation domain.** *J Biol Chem* 279: 49395-405.
- Fotiadou PP, Takahashi C, Rajabi HN, Ewen ME (2007). **Wild-type NRas and KRas perform distinct functions during transformation.** *Mol Cell Biol* 27: 6742-55.
- Franke B, Akkerman JW, Bos JL (1997). **Rapid Ca<sup>2+</sup>-mediated activation of Rap1 in human platelets.** *Embo J* 16: 252-9.
- Frodin M, Gammeltoft S (1999). **Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction.** *Mol Cell Endocrinol* 151: 65-77.
- Frolik CA, Dart LL, Meyers CA, Smith DM, Sporn MB (1983). **Purification and initial characterization of a type beta transforming growth factor from human placenta.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 3676-80.

- Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC (1998). **Phosphoinositide kinases.** *Annu Rev Biochem* 67: 481-507.
- Fujita M, Norris DA, Yagi H, Walsh P, Morelli JG, Weston WL y cols. (1999). **Overexpression of mutant ras in human melanoma increases invasiveness, proliferation and anchorage-independent growth in vitro and induces tumour formation and cachexia in vivo.** *Melanoma Res* 9: 279-91.
- Galetic I, Andjelkovic M, Meier R, Brodbeck D, Park J, Hemmings BA (1999). **Mechanism of protein kinase B activation by insulin/insulin-like growth factor-1 revealed by specific inhibitors of phosphoinositide 3-kinase--significance for diabetes and cancer.** *Pharmacol Ther* 82: 409-25.
- Gandhi NS, Mancera RL (2008). **The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins.** *Chem Biol Drug Des* 72: 455-82.
- Gangoiti P, Granado MH, Wang SW, Kong JY, Steinbrecher UP, Gomez-Munoz A (2008). **Ceramide 1-phosphate stimulates macrophage proliferation through activation of the PI3-kinase/PKB, JNK and ERK1/2 pathways.** *Cell Signal* 20: 726-36.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H (1984). **Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67.** *J Immunol* 133: 1710-5.
- Gervais M, Dugourd C, Muller L, Ardidie C, Canton B, Loviconi L y cols. (2006). **Akt down-regulates ERK1/2 nuclear localization and angiotensin II-induced cell proliferation through PEA-15.** *Mol Biol Cell* 17: 3940-51.
- Geyer M, Wittinghofer A (1997). **GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins.** *Curr Opin Struct Biol* 7: 786-92.
- Giono LE, Manfredi JJ (2006). **The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints.** *J Cell Physiol* 209: 13-20.
- Glading A, Chang P, Lauffenburger DA, Wells A (2000). **Epidermal growth factor receptor activation of calpain is required for fibroblast motility and occurs via an ERK/MAP kinase signaling pathway.** *J Biol Chem* 275: 2390-8.
- Goetz JG, Genty H, St-Pierre P, Dang T, Joshi B, Sauve R y cols. (2007). **Reversible interactions between smooth domains of the endoplasmic reticulum and mitochondria are regulated by physiological cytosolic Ca<sup>2+</sup> levels.** *J Cell Sci* 120: 3553-64.
- Golden A, Brugge JS (1989). **Thrombin treatment induces rapid changes in tyrosine phosphorylation in platelets.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 901-5.
- Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP (1997). **Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions.** *Eur J Cell Biol* 74: 111-22.
- Goodwin JS, Drake KR, Rogers C, Wright L, Lippincott-Schwartz J, Philips MR y cols. (2005). **Depalmitoylated Ras traffics to and from the Golgi complex via a nonvesicular pathway.** *J Cell Biol* 170: 261-72.
- Gopalbhai K, Meloche S (1998). **Repression of mitogen-activated protein kinases ERK1/ERK2 activity by a protein tyrosine phosphatase in rat fibroblasts transformed by upstream oncoproteins.** *J Cell Physiol* 174: 35-47.
- Gougos A, Letarte M (1988). **Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line.** *J Immunol* 141: 1925-33.
- Gougos A, Letarte M (1990). **Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells.** *J Biol Chem* 265: 8361-4.
- Gray N, Detivaud L, Doerig C, Meijer L (1999). **ATP-site directed inhibitors of cyclin-dependent kinases.** *Curr Med Chem* 6: 859-75.
- Guan KL, Figueroa C, Brtva TR, Zhu T, Taylor J, Barber TD y cols. (2000). **Negative regulation of the serine/threonine kinase B-Raf by Akt.** *J Biol Chem* 275: 27354-9.



- Haberstroh U, Zahner G, Disser M, Thaiss F, Wolf G, Stahl RA (1993). **TGF-beta stimulates rat mesangial cell proliferation in culture: role of PDGF beta-receptor expression.** *Am J Physiol* 264: F199-205.
- Hallberg B, Rayter SI, Downward J (1994). **Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation.** *J Biol Chem* 269: 3913-6.
- Han BH, Holtzman DM (2000). **BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury in vivo via the ERK pathway.** *J Neurosci* 20: 5775-81.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000). **The hallmarks of cancer.** *Cell* 100: 57-70.
- Hancock JF, Magee AI, Childs JE, Marshall CJ (1989). **All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated.** *Cell* 57: 1167-77.
- Hancock JF, Parton RG (2005). **Ras plasma membrane signalling platforms.** *Biochem J* 389: 1-11.
- Hancock JF, Paterson H, Marshall CJ (1990). **A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane.** *Cell* 63: 133-9.
- Hardingham TE, Fosang AJ (1992). **Proteoglycans: many forms and many functions.** *Faseb J* 6: 861-70.
- Hartsough MT, Mulder KM (1997). **Transforming growth factor-beta signaling in epithelial cells.** *Pharmacol Ther* 75: 21-41.
- Harvey JJ (1964). **An Unidentified Virus Which Causes the Rapid Production of Tumours in Mice.** *Nature* 204: 1104-5.
- Hata A, Lagna G, Massague J, Hemmati-Brivanlou A (1998). **Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor.** *Genes Dev* 12: 186-97.
- Hayashida T, Poncelet AC, Hubchak SC, Schnaper HW (1999). **TGF-beta1 activates MAP kinase in human mesangial cells: a possible role in collagen expression.** *Kidney Int* 56: 1710-20.
- Heino J, Igotz RA, Hemler ME, Crouse C, Massague J (1989). **Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor-beta. Concomitant regulation of integrins that share a common beta 1 subunit.** *J Biol Chem* 264: 380-8.
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P (1997). **TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins.** *Nature* 390: 465-71.
- Herrmann C (2003). **Ras-effector interactions: after one decade.** *Curr Opin Struct Biol* 13: 122-9.
- Hresko RC, Mueckler M (2005). **mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes.** *J Biol Chem* 280: 40406-16.
- Hu PP, Shen X, Huang D, Liu Y, Counter C, Wang XF (1999). **The MEK pathway is required for stimulation of p21(WAF1/CIP1) by transforming growth factor-beta.** *J Biol Chem* 274: 35381-7.
- Hynes RO (1986). **Fibronectins.** *Sci Am* 254: 42-51.
- Hynes RO (1992). **Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion.** *Cell* 69: 11-25.
- Ihn H, Yamane K, Kubo M, Tamaki K (2001). **Blockade of endogenous transforming growth factor beta signaling prevents up-regulated collagen synthesis in scleroderma fibroblasts: association with increased expression of transforming growth factor beta receptors.** *Arthritis Rheum* 44: 474-80.
- Iida M, Towatari M, Nakao A, Iida H, Kiyoi H, Nakano Y y cols. (1999). **Lack of constitutive activation of MAP kinase pathway in human acute myeloid leukemia cells with N-Ras mutation.** *Leukemia* 13: 585-9.
- Imai K, Ohuchi E, Aoki T, Nomura H, Fujii Y, Sato H y cols. (1996). **Membrane-type matrix metalloproteinase 1 is a gelatinolytic enzyme and is secreted in a complex with tissue inhibitor of metalloproteinases 2.** *Cancer Res* 56: 2707-10.
- Imamura T, Takase M, Nishihara A, Oeda E, Hanai J, Kawabata M y cols. (1997). **Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily.** *Nature* 389: 622-6.

- Iozzo RV (2001). **Heparan sulfate proteoglycans: intricate molecules with intriguing functions.** *J Clin Invest* 108: 165-7.
- Iozzo RV, Murdoch AD (1996). **Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function.** *Faseb J* 10: 598-614.
- Ishida T, Haneda M, Maeda S, Koya D, Kikkawa R (1999). **Stretch-induced overproduction of fibronectin in mesangial cells is mediated by the activation of mitogen-activated protein kinase.** *Diabetes* 48: 595-602.
- Ivarsson M, McWhirter A, Borg TK, Rubin K (1998). **Type I collagen synthesis in cultured human fibroblasts: regulation by cell spreading, platelet-derived growth factor and interactions with collagen fibers.** *Matrix Biol* 16: 409-25.
- Iwamoto Y, Reich R, Nemeth G, Yamada Y, Martin GR (1993). **Cyclic AMP decreases chemotaxis, invasiveness and lung colonization of H-ras transformed mouse fibroblasts.** *Clin Exp Metastasis* 11: 492-501.
- James GL, Goldstein JL, Brown MS (1995). **Polylysine and CVIM sequences of K-RasB dictate specificity of prenylation and confer resistance to benzodiazepine peptidomimetic in vitro.** *J Biol Chem* 270: 6221-6.
- Jaumot M, Yan J, Clyde-Smith J, Sluimer J, Hancock JF (2002). **The linker domain of the Ha-Ras hypervariable region regulates interactions with exchange factors, Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase.** *J Biol Chem* 277: 272-8.
- Jeffers M, Pellicer A (1994). **Identification of multiple promoters within the N-ras proto-oncogene.** *Biochim Biophys Acta* 1219: 623-35.
- Jeffrey PD, Tong L, Pavletich NP (2000). **Structural basis of inhibition of CDK-cyclin complexes by INK4 inhibitors.** *Genes Dev* 14: 3115-25.
- Jeon SH, Jeong WJ, Cho JY, Lee KH, Choi KY (2007). **Akt is involved in the inhibition of cell proliferation by EGF.** *Exp Mol Med* 39: 491-8.
- Jiang MD, Zheng SM, Xu H, Zeng WZ, Zhang Y, Sun HP y cols. (2008). **An experimental study of extracellular signal-regulated kinase and its interventional treatments in hepatic fibrosis.** *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 7: 51-7.
- Johnson DG, Walker CL (1999). **Cyclins and cell cycle checkpoints.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39: 295-312.
- Johnson GL, Lapadat R (2002). **Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases.** *Science* 298: 1911-2.
- Johnson L, Greenbaum D, Cichowski K, Mercer K, Murphy E, Schmitt E y cols. (1997). **K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras.** *Genes Dev* 11: 2468-81.
- Kadler KE, Baldock C, Bella J, Boot-Handford RP (2007). **Collagens at a glance.** *J Cell Sci* 120: 1955-8.
- Kadler KE, Holmes DF, Trotter JA, Chapman JA (1996). **Collagen fibril formation.** *Biochem J* 316 (Pt 1): 1-11.
- Kahan C, Seuwen K, Meloche S, Pouyssegur J (1992). **Coordinate, biphasic activation of p44 mitogen-activated protein kinase and S6 kinase by growth factors in hamster fibroblasts. Evidence for thrombin-induced signals different from phosphoinositide turnover and adenylylcyclase inhibition.** *J Biol Chem* 267: 13369-75.
- Kandel ES, Hay N (1999). **The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB.** *Exp Cell Res* 253: 210-29.
- Karnoub AE, Weinberg RA (2008). **Ras oncogenes: split personalities.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 517-31.
- Katsura M, Ito A, Hirakawa S, Mori Y (1989). **Human recombinant interleukin-1 alpha increases biosynthesis of collagenase and hyaluronic acid in cultured human chorionic cells.** *FEBS Lett* 244: 315-8.
- Kawakami T, Ihn H, Xu W, Smith E, LeRoy C, Trojanowska M (1998). **Increased expression of TGF-beta receptors by scleroderma fibroblasts: evidence for contribution of autocrine TGF-beta signaling to**

- scleroderma phenotype. *J Invest Dermatol* 110: 47-51.
- Kay EP, Lee MS, Seong GJ, Lee YG (1998). **TGF-beta s stimulate cell proliferation via an autocrine production of FGF-2 in corneal stromal fibroblasts.** *Curr Eye Res* 17: 286-93.
  - Kelly-Spratt KS, Gurley KE, Yasui Y, Kemp CJ (2004). **p19Arf suppresses growth, progression, and metastasis of Hras-driven carcinomas through p53-dependent and -independent pathways.** *PLoS Biol* 2: E242.
  - Kelman Z (1997). **PCNA: structure, functions and interactions.** *Oncogene* 14: 629-40.
  - Kielty CM (2006). **Elastic fibres in health and disease.** *Expert Rev Mol Med* 8: 1-23.
  - Kim CS, Kim JK, Nam SY, Yang KH, Jeong M, Kim HS y cols. (2007). **Low-dose radiation stimulates the proliferation of normal human lung fibroblasts via a transient activation of Raf and Akt.** *Mol Cells* 24: 424-30.
  - Kim HP, Lee MS, Yu J, Park JA, Jong HS, Kim TY y cols. (2004). **TGF-beta1 (transforming growth factor-beta1)-mediated adhesion of gastric carcinoma cells involves a decrease in Ras/ERKs (extracellular-signal-regulated kinases) cascade activity dependent on c-Src activity.** *Biochem J* 379: 141-50.
  - Kimmelman A, Tolkacheva T, Lorenzi MV, Osada M, Chan AM (1997). **Identification and characterization of R-ras3: a novel member of the RAS gene family with a non-ubiquitous pattern of tissue distribution.** *Oncogene* 15: 2675-85.
  - King WG, Mattaliano MD, Chan TO, Tschlis PN, Brugge JS (1997). **Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation.** *Mol Cell Biol* 17: 4406-18.
  - Kirsten WH, Mayer LA (1967). **Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus.** *J Natl Cancer Inst* 39: 311-35.
  - Kolch W, Heidecker G, Kochs G, Hummel R, Vahidi H, Mischak H y cols. (1993). **Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation.** *Nature* 364: 249-52.
  - Koli K, Saharinen J, Karkkainen M, Keski-Oja J (2001). **Novel non-TGF-beta-binding splice variant of LTBP-4 in human cells and tissues provides means to decrease TGF-beta deposition.** *J Cell Sci* 114: 2869-78.
  - Kresse H, Schonherr E (2001). **Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control.** *J Cell Physiol* 189: 266-74.
  - Kretzschmar M, Doody J, Timokhina I, Massague J (1999). **A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras.** *Genes Dev* 13: 804-16.
  - Ku H, Meier KE (2000). **Phosphorylation of paxillin via the ERK mitogen-activated protein kinase cascade in EL4 thymoma cells.** *J Biol Chem* 275: 11333-40.
  - Kubo M, Ihn H, Yamane K, Asano Y, Jinnin M, Tamaki K (2001). **Differential expression of transforming growth factor-beta receptors in squamous cell carcinoma.** *Br J Dermatol* 145: 840-2.
  - Kuruvilla FG, Schreiber SL (1999). **The PIK-related kinases intercept conventional signaling pathways.** *Chem Biol* 6: R129-36.
  - Laemmli UK (1970). **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 227: 680-5.
  - Lane MA, Sainten A, Cooper GM (1981). **Activation of related transforming genes in mouse and human mammary carcinomas.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 5185-9.
  - Lastres P, Martin-Perez J, Langa C, Bernabeu C (1994). **Phosphorylation of the human-transforming-growth-factor-beta-binding protein endoglin.** *Biochem J* 301 ( Pt 3): 765-8.
  - Le Gall M, Chambard JC, Grall D, Van Obberghen-Schilling E (2003). **Adhesion-dependent control of Akt/protein kinase B occurs at multiple levels.** *J Cell Physiol* 196: 98-104.
  - Letamendia A, Lastres P, Almendro N, Raab U, Buhring HJ, Kumar S y cols. (1998a). **Endoglin, a component of the TGF-beta receptor system, is a differentiation marker of human choriocarcinoma cells.** *Int J Cancer* 76: 541-6.

- Letamendia A, Lastres P, Botella LM, Raab U, Langa C, Velasco B y cols. (1998b). **Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan.** *J Biol Chem* 273: 33011-9.
- Levine AJ, Finlay CA, Hinds PW (2004). **P53 is a tumor suppressor gene.** *Cell* 116: S67-9, 1 p following S69.
- Li W, Zhu T, Guan KL (2004). **Transformation potential of Ras isoforms correlates with activation of phosphatidylinositol 3-kinase but not ERK.** *J Biol Chem* 279: 37398-406.
- Liao J, Planchon SM, Wolfman JC, Wolfman A (2006). **Growth factor-dependent AKT activation and cell migration requires the function of c-K(B)-Ras versus other cellular ras isoforms.** *J Biol Chem* 281: 29730-8.
- Lipfert L, Haimovich B, Schaller MD, Cobb BS, Parsons JT, Brugge JS (1992). **Integrin-dependent phosphorylation and activation of the protein tyrosine kinase pp125FAK in platelets.** *J Cell Biol* 119: 905-12.
- Liu BC, Sun J, Chen Q, Luo DD, Ma KL, Ruan XZ (2004). **Effect of irbesartan on angiotensin II-induced hypertrophy of human proximal tubular cells.** *Chin Med J (Engl)* 117: 547-51.
- Lopez-Novoa JM (2007). **Soluble endoglin is an accurate predictor and a pathogenic molecule in pre-eclampsia.** *Nephrol Dial Transplant* 22: 712-4.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *J Biol Chem* 193: 265-75.
- Lowy DR, Willumsen BM (1993). **Function and regulation of ras.** *Annu Rev Biochem* 62: 851-91.
- Lu Q, Paredes M, Zhang J, Kosik KS (1998). **Basal extracellular signal-regulated kinase activity modulates cell-cell and cell-matrix interactions.** *Mol Cell Biol* 18: 3257-65.
- Luft FC (2006). **Soluble endoglin (sEng) joins the soluble fms-like tyrosine kinase (sFlt) receptor as a pre-eclampsia molecule.** *Nephrol Dial Transplant* 21: 3052-4.
- Luo W, Sharif M (1999). **Stable expression of activated Ki-Ras does not constitutively activate the mitogen-activated protein kinase pathway but attenuates epidermal growth factor receptor activation in human astrocytoma cells.** *Int J Oncol* 14: 53-62.
- Ma J, Karplus M (1997). **Ligand-induced conformational changes in ras p21: a normal mode and energy minimization analysis.** *J Mol Biol* 274: 114-31.
- Macara IG, Lounsbury KM, Richards SA, McKiernan C, Bar-Sagi D (1996). **The Ras superfamily of GTPases.** *Faseb J* 10: 625-30.
- Maekawa M, Li S, Iwamatsu A, Morishita T, Yokota K, Imai Y y cols. (1994). **A novel mammalian Ras GTPase-activating protein which has phospholipid-binding and Btk homology regions.** *Mol Cell Biol* 14: 6879-85.
- Maertens B, Hopkins D, Franzke CW, Keene DR, Bruckner-Tuderman L, Greenspan DS y cols. (2007). **Cleavage and oligomerization of gliomedin, a transmembrane collagen required for node of ranvier formation.** *J Biol Chem* 282: 10647-59.
- Main AL, Harvey TS, Baron M, Boyd J, Campbell ID (1992). **The three-dimensional structure of the tenth type III module of fibronectin: an insight into RGD-mediated interactions.** *Cell* 71: 671-8.
- Malumbres M, Pellicer A (1998). **RAS pathways to cell cycle control and cell transformation.** *Front Biosci* 3: d887-912.
- Markowitz SD, Roberts AB (1996). **Tumor suppressor activity of the TGF-beta pathway in human cancers.** *Cytokine Growth Factor Rev* 7: 93-102.
- Marshall M (1995). **Interactions between Ras and Raf: key regulatory proteins in cellular transformation.** *Mol Reprod Dev* 42: 493-9.
- Marte BM, Downward J (1997). **PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond.** *Trends Biochem Sci* 22: 355-8.
- Marti HP, Lee L, Kashgarian M, Lovett DH (1994). **Transforming growth factor-beta 1 stimulates glomerular mesangial cell synthesis of the 72-kd type IV collagenase.** *Am J Pathol* 144: 82-94.

- Martin GA, Viskochil D, Bollag G, McCabe PC, Crosier WJ, Haubruck H y cols. (1990). **The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21.** *Cell* 63: 843-9.
- Martin J, Knowlden J, Davies M, Williams JD (1994). **Identification and independent regulation of human mesangial cell metalloproteinases.** *Kidney Int* 46: 877-85.
- Martinez-Salgado C, Fuentes-Calvo I, Garcia-Cenador B, Santos E, Lopez-Novoa JM (2006). **Involvement of H- and N-Ras isoforms in transforming growth factor-beta1-induced proliferation and in collagen and fibronectin synthesis.** *Exp Cell Res* 312: 2093-106.
- Massague J (1998). **TGF-beta signal transduction.** *Annu Rev Biochem* 67: 753-91.
- Massague J (2000). **How cells read TGF-beta signals.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 169-78.
- Massague J, Blain SW, Lo RS (2000). **TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders.** *Cell* 103: 295-309.
- Massague J, Chen YG (2000). **Controlling TGF-beta signaling.** *Genes Dev* 14: 627-44.
- Massague J, Wotton D (2000). **Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system.** *Embo J* 19: 1745-54.
- Matallanas D, Arozarena I, Berciano MT, Aaronson DS, Pellicer A, Lafarga M y cols. (2003). **Differences on the inhibitory specificities of H-Ras, K-Ras, and N-Ras (N17) dominant negative mutants are related to their membrane microlocalization.** *J Biol Chem* 278: 4572-81.
- Matrisian LM (1990). **Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling.** *Trends Genet* 6: 121-5.
- Matsumoto K, Asano T, Endo T (1997). **Novel small GTPase M-Ras participates in reorganization of actin cytoskeleton.** *Oncogene* 15: 2409-17.
- Matthiesen S, Bahulayan A, Holz O, Racke K (2007). **MAPK pathway mediates muscarinic receptor-induced human lung fibroblast proliferation.** *Life Sci* 80: 2259-62.
- McLennan SV, Death AK, Fisher EJ, Williams PF, Yue DK, Turtle JR (1999). **The role of the mesangial cell and its matrix in the pathogenesis of diabetic nephropathy.** *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 45: 123-35.
- Mercer K, Giblett S, Oakden A, Brown J, Marais R, Pritchard C (2005). **A-Raf and Raf-1 work together to influence transient ERK phosphorylation and G1/S cell cycle progression.** *Oncogene* 24: 5207-17.
- Miettinen PJ, Ebner R, Lopez AR, Derynck R (1994). **TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors.** *J Cell Biol* 127: 2021-36.
- Milburn MV, Tong L, deVos AM, Brunger A, Yamaizumi Z, Nishimura S y cols. (1990). **Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins.** *Science* 247: 939-45.
- Miyazono K (1997). **TGF-beta receptors and signal transduction.** *Int J Hematol* 65: 97-104.
- Miyazono K, Ichijo H, Heldin CH (1993). **Transforming growth factor-beta: latent forms, binding proteins and receptors.** *Growth Factors* 8: 11-22.
- Montagnani M, Chen H, Barr VA, Quon MJ (2001). **Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca<sup>2+</sup> but requires phosphorylation by Akt at Ser(1179).** *J Biol Chem* 276: 30392-8.
- Mor A, Philips MR (2006). **Compartmentalized Ras/MAPK signaling.** *Annu Rev Immunol* 24: 771-800.
- Mucsi I, Skorecki KL, Goldberg HJ (1996). **Extracellular signal-regulated kinase and the small GTP-binding protein, Rac, contribute to the effects of transforming growth factor-beta1 on gene expression.** *J Biol Chem* 271: 16567-72.
- Mulder KM, Morris SL (1992). **Activation of p21ras by transforming growth factor beta in epithelial cells.** *J Biol Chem* 267: 5029-31.
- Muller R, Slamon DJ, Adamson ED, Tremblay JM, Muller D, Cline MJ y cols. (1983). **Transcription of c-onc genes c-rasKi and c-fms during mouse development.** *Mol Cell Biol* 3: 1062-9.
- Mulsow JJ, Watson RW, Fitzpatrick JM, O'Connell PR (2005). **Transforming growth**

- factor-beta promotes pro-fibrotic behavior by serosal fibroblasts via PKC and ERK1/2 mitogen activated protein kinase cell signaling. *Ann Surg* 242: 880-7, discussion 887-9.
- Munevar S, Wang Y, Dembo M (2001). **Traction force microscopy of migrating normal and H-ras transformed 3T3 fibroblasts.** *Biophys J* 80: 1744-57.
  - Munger JS, Harpel JG, Gleizes PE, Mazzieri R, Nunes I, Rifkin DB (1997). **Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation.** *Kidney Int* 51: 1376-82.
  - Murphy G, Willenbrock F (1995). **Tissue inhibitors of matrix metalloendopeptidases.** *Methods Enzymol* 248: 496-510.
  - Myllyharju J, Kivirikko KI (2004). **Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms.** *Trends Genet* 20: 33-43.
  - Mzhavia N, Yu S, Ikeda S, Chu TT, Goldberg I, Dansky HM (2008). **Neuronatin: a new inflammation gene expressed on the aortic endothelium of diabetic mice.** *Diabetes* 57: 2774-83.
  - Nagase H (1997). **Activation mechanisms of matrix metalloproteinases.** *Biol Chem* 378: 151-60.
  - Nagase H, Woessner JF, Jr. (1999). **Matrix metalloproteinases.** *J Biol Chem* 274: 21491-4.
  - Nakayama K, Nakayama K (1998). **Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors: brakes of the cell cycle engine during development.** *Bioessays* 20: 1020-9.
  - Neugarten J, Medve I, Lei J, Silbiger SR (1999). **Estradiol suppresses mesangial cell type I collagen synthesis via activation of the MAP kinase cascade.** *Am J Physiol* 277: F875-81.
  - Nilsson I, Hoffmann I (2000). **Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family.** *Prog Cell Cycle Res* 4: 107-14.
  - Nobes CD, Hall A (1999). **Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement.** *J Cell Biol* 144: 1235-44.
  - Paciucci R, Pellicer A (1991). **Dissection of the mouse N-ras gene upstream regulatory sequences and identification of the promoter and a negative regulatory element.** *Mol Cell Biol* 11: 1334-43.
  - Pai EF, Kabsch W, Krenzel U, Holmes KC, John J, Wittinghofer A (1989). **Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation.** *Nature* 341: 209-14.
  - Park BJ, Park JI, Byun DS, Park JH, Chi SG (2000). **Mitogenic conversion of transforming growth factor-beta1 effect by oncogenic Ha-Ras-induced activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human prostate cancer.** *Cancer Res* 60: 3031-8.
  - Perucho M, Goldfarb M, Shimizu K, Lama C, Fogh J, Wigler M (1981). **Human-tumor-derived cell lines contain common and different transforming genes.** *Cell* 27: 467-76.
  - Pham N, Cheglakov I, Koch CA, de Hoog CL, Moran MF, Rotin D (2000). **The guanine nucleotide exchange factor CNrasGEF activates ras in response to cAMP and cGMP.** *Curr Biol* 10: 555-8.
  - Phan TT, Lim IJ, Bay BH, Qi R, Longaker MT, Lee ST y cols. (2003). **Role of IGF system of mitogens in the induction of fibroblast proliferation by keloid-derived keratinocytes in vitro.** *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C860-9.
  - Piek E, Moustakas A, Kurisaki A, Heldin CH, ten Dijke P (1999). **TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells.** *J Cell Sci* 112 ( Pt 24): 4557-68.
  - Plowman SJ, Hancock JF (2005). **Ras signaling from plasma membrane and endomembrane microdomains.** *Biochim Biophys Acta* 1746: 274-83.
  - Plowman SJ, Muncke C, Parton RG, Hancock JF (2005). **H-ras, K-ras, and inner plasma membrane raft proteins operate in nanoclusters with differential dependence on the actin cytoskeleton.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 15500-5.

- Ponting CP, Benjamin DR (1996). **A novel family of Ras-binding domains.** *Trends Biochem Sci* 21: 422-5.
- Portella G, Cumming SA, Liddell J, Cui W, Ireland H, Akhurst RJ y cols. (1998). **Transforming growth factor beta is essential for spindle cell conversion of mouse skin carcinoma in vivo: implications for tumor invasion.** *Cell Growth Differ* 9: 393-404.
- Pratsinis H, Kletsas D (2007). **PDGF, bFGF and IGF-I stimulate the proliferation of intervertebral disc cells in vitro via the activation of the ERK and Akt signaling pathways.** *Eur Spine J* 16: 1858-66.
- Price LS, Leng J, Schwartz MA, Bokoch GM (1998). **Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading.** *Mol Biol Cell* 9: 1863-71.
- Prior IA, Harding A, Yan J, Sluimer J, Parton RG, Hancock JF (2001). **GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity.** *Nat Cell Biol* 3: 368-75.
- Pumiglia KM, Decker SJ (1997). **Cell cycle arrest mediated by the MEK/mitogen-activated protein kinase pathway.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 448-52.
- Qi Z, Atsuchi N, Ooshima A, Takeshita A, Ueno H (1999). **Blockade of type beta transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2345-9.
- Qian X, Esteban L, Vass WC, Upadhyaya C, Papageorge AG, Yienger K y cols. (2000). **The Sos1 and Sos2 Ras-specific exchange factors: differences in placental expression and signaling properties.** *Embo J* 19: 642-54.
- Qui MS, Green SH (1992). **PC12 cell neuronal differentiation is associated with prolonged p21ras activity and consequent prolonged ERK activity.** *Neuron* 9: 705-17.
- Quilliam LA, Rebhun JF, Castro AF (2002). **A growing family of guanine nucleotide exchange factors is responsible for activation of Ras-family GTPases.** *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 71: 391-444.
- Rameh LE, Arvidsson A, Carraway KL, 3rd, Couvillon AD, Rathbun G, Crompton A y cols. (1997). **A comparative analysis of the phosphoinositide binding specificity of pleckstrin homology domains.** *J Biol Chem* 272: 22059-66.
- Rebollo A, Martinez AC (1999). **Ras proteins: recent advances and new functions.** *Blood* 94: 2971-80.
- Reddy VS, Harskamp RE, van Ginkel MW, Calhoon J, Baisden CE, Kim IS y cols. (2008). **Interleukin-18 stimulates fibronectin expression in primary human cardiac fibroblasts via PI3K-Akt-dependent NF-kappaB activation.** *J Cell Physiol* 215: 697-707.
- Reid TS, Terry KL, Casey PJ, Beese LS (2004). **Crystallographic analysis of CaaX prenyltransferases complexed with substrates defines rules of protein substrate selectivity.** *J Mol Biol* 343: 417-33.
- Reifemberger J, Knobbe CB, Sterzinger AA, Blaschke B, Schulte KW, Ruzicka T y cols. (2004). **Frequent alterations of Ras signaling pathway genes in sporadic malignant melanomas.** *Int J Cancer* 109: 377-84.
- Rescan C, Le Bras S, Lefebvre VH, Frandsen U, Klein T, Foschi M y cols. (2005). **EGF-induced proliferation of adult human pancreatic duct cells is mediated by the MEK/ERK cascade.** *Lab Invest* 85: 65-74.
- Reszka AA, Seger R, Diltz CD, Krebs EG, Fischer EH (1995). **Association of mitogen-activated protein kinase with the microtubule cytoskeleton.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8881-5.
- Reunanen N, Foschi M, Han J, Kahari VM (2000). **Activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 inhibits type I collagen expression by human skin fibroblasts.** *J Biol Chem* 275: 34634-9.
- Ricupero DA, Poliks CF, Rishikof DC, Cuttle KA, Kuang PP, Goldstein RH (2001). **Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent stabilization of alpha1(I) collagen mRNA in human lung fibroblasts.** *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C99-C105.
- Riser BL, Cortes P, Yee J, Sharba AK, Asano K, Rodriguez-Barbero A y cols. (1998). **Mechanical strain- and high glucose-induced alterations in mesangial cell**

- collagen metabolism: role of TGF-beta. *J Am Soc Nephrol* 9: 827-36.
- Roberts AB, McCune BK, Sporn MB (1992). **TGF-beta: regulation of extracellular matrix.** *Kidney Int* 41: 557-9.
  - Roberts AB, Sporn MB (1993). **Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta).** *Growth Factors* 8: 1-9.
  - Rocks O, Peyker A, Bastiaens PI (2006). **Spatio-temporal segregation of Ras signals: one ship, three anchors, many harbors.** *Curr Opin Cell Biol* 18: 351-7.
  - Rocks O, Peyker A, Kahms M, Verveer PJ, Koerner C, Lumbierres M y cols. (2005). **An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms.** *Science* 307: 1746-52.
  - Rodriguez-Pena AB, Grande MT, Eleno N, Arevalo M, Guerrero C, Santos E y cols. (2008). **Activation of Erk1/2 and Akt following unilateral ureteral obstruction.** *Kidney Int* 74: 196-209.
  - Rodriguez-Pena AB, Santos E, Arevalo M, Lopez-Novoa JM (2005). **Activation of small GTPase Ras and renal fibrosis.** *J Nephrol* 18: 341-9.
  - Rodriguez-Viciana P, Sabatier C, McCormick F (2004). **Signaling specificity by Ras family GTPases is determined by the full spectrum of effectors they regulate.** *Mol Cell Biol* 24: 4943-54.
  - Roldan AL, Cubellis MV, Masucci MT, Behrendt N, Lund LR, Dano K y cols. (1990). **Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central molecule in cell surface, plasmin dependent proteolysis.** *Embo J* 9: 467-74.
  - Romero F, Martinez AC, Camonis J, Rebollo A (1999). **Aiolos transcription factor controls cell death in T cells by regulating Bcl-2 expression and its cellular localization.** *Embo J* 18: 3419-30.
  - Roovers K, Assoian RK (2000). **Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery.** *Bioessays* 22: 818-26.
  - Rosseland CM, Wierod L, Flinder LI, Oksvold MP, Skarpen E, Huitfeldt HS (2008). **Distinct functions of H-Ras and K-Ras in proliferation and survival of primary hepatocytes due to selective activation of ERK and PI3K.** *J Cell Physiol* 215: 818-26.
  - Roulot D, Sevcsik AM, Coste T, Strosberg AD, Marullo S (1999). **Role of transforming growth factor beta type II receptor in hepatic fibrosis: studies of human chronic hepatitis C and experimental fibrosis in rats.** *Hepatology* 29: 1730-8.
  - Roux PP, Ballif BA, Anjum R, Gygi SP, Blenis J (2004). **Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 13489-94.
  - Roux PP, Blenis J (2004). **ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions.** *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 320-44.
  - Roy S, Luetterforst R, Harding A, Apolloni A, Etheridge M, Stang E y cols. (1999). **Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains.** *Nat Cell Biol* 1: 98-105.
  - Ruoslahti E (1988). **Structure and biology of proteoglycans.** *Annu Rev Cell Biol* 4: 229-55.
  - Ruoslahti E (1991). **Integrins.** *J Clin Invest* 87: 1-5.
  - Saarela J, Rehn M, Oikarinen A, Autio-Harmainen H, Pihlajaniemi T (1998). **The short and long forms of type XVIII collagen show clear tissue specificities in their expression and location in basement membrane zones in humans.** *Am J Pathol* 153: 611-26.
  - Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT y cols. (1988). **Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.** *Science* 239: 487-91.
  - Santini D, Loupakis F, Vincenzi B, Floriani I, Stasi I, Canestrari E y cols. (2008). **High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice.** *Oncologist* 13: 1270-5.



- Santos E, Nebreda AR (1989). **Structural and functional properties of ras proteins.** *Faseb J* 3: 2151-63.
- Santos E, Nebreda AR, Bryan T, Kempner ES (1988). **Oligomeric structure of p21 ras proteins as determined by radiation inactivation.** *J Biol Chem* 263: 9853-8.
- Santos E, Tronick SR, Aaronson SA, Pulciani S, Barbacid M (1982). **T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes.** *Nature* 298: 343-7.
- Santos TM, Machado CR, Franco GR, Pena SD (2002). **Characterization and comparative functional analysis in yeast of a Schistosoma mansoni Rho1 GTPase gene.** *Mol Biochem Parasitol* 125: 103-12.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005). **Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex.** *Science* 307: 1098-101.
- Scheid MP, Woodgett JR (2003). **Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt.** *FEBS Lett* 546: 108-12.
- Schlessinger J (1993). **How receptor tyrosine kinases activate Ras.** *Trends Biochem Sci* 18: 273-5.
- Schlessinger J, Bar-Sagi D (1994). **Activation of Ras and other signaling pathways by receptor tyrosine kinases.** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 59: 173-9.
- Schlichting I, Almo SC, Rapp G, Wilson K, Petratos K, Lentfer A y cols. (1990). **Time-resolved X-ray crystallographic study of the conformational change in Ha-Ras p21 protein on GTP hydrolysis.** *Nature* 345: 309-15.
- Schneider L, Klausen TK, Stock C, Mally S, Christensen ST, Pedersen SF y cols. (2008). **H-ras transformation sensitizes volume-activated anion channels and increases migratory activity of NIH3T3 fibroblasts.** *Pflügers Arch* 455: 1055-62.
- Sebastian T, Johnson PF (2006). **Stop and go: anti-proliferative and mitogenic functions of the transcription factor C/EBPbeta.** *Cell Cycle* 5: 953-7.
- Seger R, Krebs EG (1995). **The MAPK signaling cascade.** *Faseb J* 9: 726-35.
- Sengupta S, Sellers LA, Li RC, Gherardi E, Zhao G, Watson N y cols. (2003). **Targeting of mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol 3 kinase inhibits hepatocyte growth factor/scatter factor-induced angiogenesis.** *Circulation* 107: 2955-61.
- Shafer RH (1998). **Stability and structure of model DNA triplexes and quadruplexes and their interactions with small ligands.** *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 59: 55-94.
- Sharpe CC, Dockrell ME, Noor MI, Monia BP, Hendry BM (2000). **Role of Ras isoforms in the stimulated proliferation of human renal fibroblasts in primary culture.** *J Am Soc Nephrol* 11: 1600-6.
- Shaw LM, Olsen BR (1991). **FACIT collagens: diverse molecular bridges in extracellular matrices.** *Trends Biochem Sci* 16: 191-4.
- Sherr CJ, Roberts JM (1999). **CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression.** *Genes Dev* 13: 1501-12.
- Shih C, Padhy LC, Murray M, Weinberg RA (1981). **Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts.** *Nature* 290: 261-4.
- Shihab FS, Bennett WM, Tanner AM, Andoh TF (1997). **Angiotensin II blockade decreases TGF-beta1 and matrix proteins in cyclosporine nephropathy.** *Kidney Int* 52: 660-73.
- Shin I, Kim S, Song H, Kim HR, Moon A (2005). **H-Ras-specific activation of Rac-MKK3/6-p38 pathway: its critical role in invasion and migration of breast epithelial cells.** *J Biol Chem* 280: 14675-83.
- Singh A, Sowjanya AP, Ramakrishna G (2005). **The wild-type Ras: road ahead.** *Faseb J* 19: 161-9.
- Sipeki S, Bander E, Buday L, Farkas G, Bacsy E, Ways DK y cols. (1999). **Phosphatidylinositol 3-kinase contributes to Erk1/Erk2 MAP kinase activation associated with hepatocyte growth factor-induced cell scattering.** *Cell Signal* 11: 885-90.

- Slack JL, Parker MI, Robinson VR, Bornstein P (1992). **Regulation of collagen I gene expression by ras.** *Mol Cell Biol* 12: 4714-23.
- Smith CC, Nelson J, Aurelian L, Gober M, Goswami BB (2000). **Ras-GAP binding and phosphorylation by herpes simplex virus type 2 RR1 PK (ICP10) and activation of the Ras/MEK/MAPK mitogenic pathway are required for timely onset of virus growth.** *J Virol* 74: 10417-29.
- Smith JR, Pereira-Smith OM (1996). **Replicative senescence: implications for in vivo aging and tumor suppression.** *Science* 273: 63-7.
- Somanath PR, Kandel ES, Hay N, Byzova TV (2007). **Akt1 signaling regulates integrin activation, matrix recognition, and fibronectin assembly.** *J Biol Chem* 282: 22964-76.
- Sorkin A (2001). **Internalization of the epidermal growth factor receptor: role in signalling.** *Biochem Soc Trans* 29: 480-4.
- Sternlicht MD, Werb Z (2001). **How matrix metalloproteinases regulate cell behavior.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 463-516.
- Stetler-Stevenson WG (1996). **Dynamics of matrix turnover during pathologic remodeling of the extracellular matrix.** *Am J Pathol* 148: 1345-50.
- Stewart ZA, Pietenpol JA (2001). **p53 Signaling and cell cycle checkpoints.** *Chem Res Toxicol* 14: 243-63.
- Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Di Sario A, Casini A, Marucci L, Gaggiotti G y cols. (1999). **Insulin and insulin-like growth factor-1 stimulate proliferation and type I collagen accumulation by human hepatic stellate cells: differential effects on signal transduction pathways.** *Hepatology* 29: 1743-51.
- Swarthout JT, Lobo S, Farh L, Croke MR, Greentree WK, Deschenes RJ y cols. (2005). **DHHC9 and GCP16 constitute a human protein fatty acyltransferase with specificity for H- and N-Ras.** *J Biol Chem* 280: 31141-8.
- Than ME, Henrich S, Huber R, Ries A, Mann K, Kuhn K y cols. (2002). **The 1.9-A crystal structure of the noncollagenous (NC1) domain of human placenta collagen IV shows stabilization via a novel type of covalent Met-Lys cross-link.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6607-12.
- Tharaux PL, Chatziantoniou C, Fakhouri F, Dussaule JC (2000). **Angiotensin II activates collagen I gene through a mechanism involving the MAP/ER kinase pathway.** *Hypertension* 36: 330-6.
- Timpl R, Aumailley M (1989). **Biochemistry of basement membranes.** *Adv Nephrol Necker Hosp* 18: 59-76.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1992). **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.** 1979. *Biotechnology* 24: 145-9.
- Trahey M, McCormick F (1987). **A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants.** *Science* 238: 542-5.
- Traynor P, McGlynn LM, Mukherjee R, Grimsley SJ, Bartlett JM, Edwards J (2008). **An increase in N-Ras expression is associated with development of hormone refractory prostate cancer in a subset of patients.** *Dis Markers* 24: 157-65.
- Tumova S, Woods A, Couchman JR (2000). **Heparan sulfate proteoglycans on the cell surface: versatile coordinators of cellular functions.** *Int J Biochem Cell Biol* 32: 269-88.
- Ullsh LS, Shih TY (1984). **Metabolic turnover of human c-rasH p21 protein of EJ bladder carcinoma and its normal cellular and viral homologs.** *Mol Cell Biol* 4: 1647-52.
- Umanoff H, Edelmann W, Pellicer A, Kucherlapati R (1995). **The murine N-ras gene is not essential for growth and development.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 1709-13.
- van der Rest M, Garrone R (1991). **Collagen family of proteins.** *Faseb J* 5: 2814-23.
- Vanhaesebroeck B, Alessi DR (2000). **The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB.** *Biochem J* 346 Pt 3: 561-76.
- Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Panayotou G, Waterfield MD (1997). **Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers.** *Trends Biochem Sci* 22: 267-72.

- Vanhaesebroeck B, Waterfield MD (1999). **Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases.** *Exp Cell Res* 253: 239-54.
- Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM y cols. (2006). **Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia.** *Nat Med* 12: 642-9.
- Vindelov LL, Christensen IJ, Nissen NI (1983). **A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis.** *Cytometry* 3: 323-7.
- Waller JR, Nicholson ML (2001). **Molecular mechanisms of renal allograft fibrosis.** *Br J Surg* 88: 1429-41.
- Weber CK, Sommer G, Michl P, Fensterer H, Weimer M, Gansauge F y cols. (2001). **Biglycan is overexpressed in pancreatic cancer and induces G1-arrest in pancreatic cancer cell lines.** *Gastroenterology* 121: 657-67.
- Wei W, Das B, Park W, Broek D (1994). **Cloning and analysis of human cDNAs encoding a 140-kDa brain guanine nucleotide-exchange factor, Cdc25GEF, which regulates the function of Ras.** *Gene* 151: 279-84.
- Weissbach L, Settleman J, Kalady MF, Snijders AJ, Murthy AE, Yan YX y cols. (1994). **Identification of a human rasGAP-related protein containing calmodulin-binding motifs.** *J Biol Chem* 269: 20517-21.
- Wells RG (2000). **Fibrogenesis. V. TGF-beta signaling pathways.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G845-50.
- Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ (2005). **The Ras superfamily at a glance.** *J Cell Sci* 118: 843-6.
- Whitman M (1998). **Smads and early developmental signaling by the TGFbeta superfamily.** *Genes Dev* 12: 2445-62.
- Wieser R, Wrana JL, Massague J (1995). **GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex.** *Embo J* 14: 2199-208.
- Winbanks CE, Grimwood L, Gasser A, Darby IA, Hewitson TD, Becker GJ (2007). **Role of the phosphatidylinositol 3-kinase and mTOR pathways in the regulation of renal fibroblast function and differentiation.** *Int J Biochem Cell Biol* 39: 206-19.
- Wisdom R, Huynh L, Hsia D, Kim S (2005). **RAS and TGF-beta exert antagonistic effects on extracellular matrix gene expression and fibroblast transformation.** *Oncogene* 24: 7043-54.
- Wittinghofer A, Pai EF (1991). **The structure of Ras protein: a model for a universal molecular switch.** *Trends Biochem Sci* 16: 382-7.
- Wolfman A (2001). **Ras isoform-specific signaling: location, location, location.** *Sci STKE* 2001: PE2.
- Wolfman A, Macara IG (1990). **A cytosolic protein catalyzes the release of GDP from p21ras.** *Science* 248: 67-9.
- Wolfman JC, Wolfman A (2000). **Endogenous c-N-Ras provides a steady-state anti-apoptotic signal.** *J Biol Chem* 275: 19315-23.
- Wotton D, Lo RS, Swaby LA, Massague J (1999). **Multiple modes of repression by the Smad transcriptional corepressor TGIF.** *J Biol Chem* 274: 37105-10.
- Wrana JL, Attisano L (2000). **The Smad pathway.** *Cytokine Growth Factor Rev* 11: 5-13.
- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J (1994). **Mechanism of activation of the TGF-beta receptor.** *Nature* 370: 341-7.
- Wu JJ, Woods PE, Eyre DR (1992). **Identification of cross-linking sites in bovine cartilage type IX collagen reveals an antiparallel type II-type IX molecular relationship and type IX to type IX bonding.** *J Biol Chem* 267: 23007-14.
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR (1980). **Cell death: the significance of apoptosis.** *Int Rev Cytol* 68: 251-306.
- Wymann MP, Zvelebil M, Laffargue M (2003). **Phosphoinositide 3-kinase signalling--which way to target?** *Trends Pharmacol Sci* 24: 366-76.
- Wynn TA (2008). **Cellular and molecular mechanisms of fibrosis.** *J Pathol* 214: 199-210.
- Xavier R, Brennan T, Li Q, McCormack C, Seed B (1998). **Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation.** *Immunity* 8: 723-32.

- Xu L, Chen YG, Massague J (2000). **The nuclear import function of Smad2 is masked by SARA and unmasked by TGFbeta-dependent phosphorylation.** *Nat Cell Biol* 2: 559-62.
- Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E (1990). **Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin.** *Nature* 346: 281-4.
- Yamashita H, Ichijo H, Grimsby S, Moren A, ten Dijke P, Miyazono K (1994). **Endoglin forms a heteromeric complex with the signaling receptors for transforming growth factor-beta.** *J Biol Chem* 269: 1995-2001.
- Yamazaki T, Yazaki Y (2000). **Molecular basis of cardiac hypertrophy.** *Z Kardiol* 89: 1-6.
- Yan J, Roy S, Apolloni A, Lane A, Hancock JF (1998). **Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase.** *J Biol Chem* 273: 24052-6.
- Yan Z, Winawer S, Friedman E (1994). **Two different signal transduction pathways can be activated by transforming growth factor beta 1 in epithelial cells.** *J Biol Chem* 269: 13231-7.
- Yang JY, Hung MC (2009). **A new fork for clinical application: targeting forkhead transcription factors in cancer.** *Clin Cancer Res* 15: 752-7.
- Yang XM, Wang YS, Zhang J, Li Y, Xu JF, Zhu J y cols. (2009). **Role of PI3K/Akt and MEK/ERK in mediating hypoxia-induced expression of HIF-1alpha and VEGF in laser-induced rat choroidal neovascularization.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50: 1873-9.
- Yano N, Suzuki D, Endoh M, Zhao TC, Padbury JF, Tseng YT (2007). **A novel phosphoinositide 3-kinase-dependent pathway for angiotensin II/AT-1 receptor-mediated induction of collagen synthesis in MES-13 mesangial cells.** *J Biol Chem* 282: 18819-30.
- Ye S, Humphries S, Henney A (1998). **Matrix metalloproteinases: implication in vascular matrix remodelling during atherogenesis.** *Clin Sci (Lond)* 94: 103-10.
- Yip-Schneider MT, Lin A, Barnard D, Sweeney CJ, Marshall MS (1999). **Lack of elevated MAP kinase (Erk) activity in pancreatic carcinomas despite oncogenic K-ras expression.** *Int J Oncol* 15: 271-9.
- Yu L, Border WA, Huang Y, Noble NA (2003). **TGF-beta isoforms in renal fibrogenesis.** *Kidney Int* 64: 844-56.
- Yue J, Mulder KM (2000). **Requirement of Ras/MAPK pathway activation by transforming growth factor beta for transforming growth factor beta 1 production in a Smad-dependent pathway.** *J Biol Chem* 275: 30765-73.
- Yusuf I, Fruman DA (2003). **Regulation of quiescence in lymphocytes.** *Trends Immunol* 24: 380-6.
- Zetterberg A, Larsson O, Wiman KG (1995). **What is the restriction point?** *Curr Opin Cell Biol* 7: 835-42.
- Zhang D, Bar-Eli M, Meloche S, Brodt P (2004). **Dual regulation of MMP-2 expression by the type 1 insulin-like growth factor receptor: the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Raf/ERK pathways transmit opposing signals.** *J Biol Chem* 279: 19683-90.
- Zhang FL, Casey PJ (1996). **Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences.** *Annu Rev Biochem* 65: 241-69.
- Zhang GJ, Ladehoff D, Xu Y, See WA (1998). **Stable overexpression of TGFbeta1 in a transitional carcinoma cell line: impact on fibronectin production.** *J Urol* 160: 230-5.
- Zhang Z, Vuori K, Wang H, Reed JC, Ruoslahti E (1996). **Integrin activation by R-ras.** *Cell* 85: 61-9.
- Zhao Y, Xiao A, Dipierro CG, Abdel-Fattah R, Amos S, Redpath GT y cols. (2008). **H-Ras increases urokinase expression and cell invasion in genetically modified human astrocytes through Ras/Raf/MEK signaling pathway.** *Glia* 56: 917-24.
- Zhou X, Jiang G, Zhao A, Bondeva T, Hirszel P, Balla T (2001). **Inhibition of Na,K-ATPase activates PI3 kinase and inhibits apoptosis in LLC-PK1 cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 285: 46-51.

- Zhu HJ, Burgess AW (2001). **Regulation of transforming growth factor-beta signaling.** *Mol Cell Biol Res Commun* 4: 321-30.
- Zimmermann S, Moelling K (1999). **Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B).** *Science* 286: 1741-4.

## ABREVIATURAS



- ADN:** ácido desoxiribonucleico.
- ADNc:** ácido desoxiribonucleico copia.
- ADNas:** ácido desoxiribonucleico *antisense*.
- ANOVA:** análisis de la varianza.
- Akt:** proteína cinasa B.
- ARN:** ácido ribonucleico.
- ARNi:** ácido ribonucleico de interferencia
- ARNm:** ácido ribonucleico mensajero
- BMP:** proteína morfogénica del hueso (*bone morphogenetic protein*).
- BSA:** albúmina sérica bovina.
- Cdks:** cinasas dependientes de ciclinas (*cyclin-dependent-kinases*)
- CDMP:** proteína morfogenética derivada del cartílago (*cartilage-derived morphogenetic protein*).
- CKI:** inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (*cyclin-kinase inhibitors*)
- Co-Smads:** Smads mediadoras comunes (*common mediator Smads*).
- C-terminal:** carboxilo terminal.
- DDR:** discoidin-domain-receptors.
- DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle's Médium.
- DMSO:** dimetilsulfóxido.
- dNTPs:** desoxinucleótidos trifosfato
- Dominio RGD:** arginina-glicina-ácido aspártico.
- Dominios PH:** dominios homólogos a pleckstrina .
- Dominios SH2 y SH3:** Src homology 2 y 3.
- EEM:** error estandar de la media.
- EDTA:** etilen diamino tetraacético.
- EMT:** transición del epitelio a mesénquima (*epithelial-mesenchymal transition*).
- Erk:** proteína cinasa reguladas por señales extracelulares (*extracellular signal regulated protein kinase*)
- FSP-1:** proteína específica de fibroblastos (*fibroblast-specific protein 1*).
- GAG:** glucosaminoglicanos.
- GAPs:** proteínas activadoras de GTPasas (*GTPase activating proteins*).
- GDF:** factor de crecimiento y diferenciación (*growth and differentiation factor*).
- GDNF:** factor neurotrófico derivado de células gliales (*glial cell-derived neurotrophic factor*).
- GDP:** guanosina difosfato.
- GEFs:** proteínas intercambiadoras de nucleótidos de guanina GDP/GTP (*Guanine nucleotide Exchange Factors*).
- GTP:** guanosina trifosfato.
- IGF:** factor de crecimiento insulínico-1 (*insuline-like growth factor 1*).
- IL-1:** interleucina 1.
- IRC:** insuficiencia renal crónica.
- I-Smads:** Smads inhibidoras (*inhibitory Smads*).
- kDa:** Kilodalton.
- KO:** Knock out.
- LAP:** péptido asociado de latencia (*Latency Associated Peptide*).
- LTBP:** proteína de unión al TGF- $\beta$  latente (*Latency TGF- $\beta$  Binding Protein*).
- MAPK:** proteína cinasa activada por mitógenos (*mitogen activated protein kinase*).
- MEC:** matriz extracelular.
- MEK:** cinasa MAPK/Erk.
- MEKK:** cinasa MEK.
- MIS/AMH:** sustancia inhibidora de Müller / hormona anti-Mülleriana (*Müllerian inhibiting substance/ anti-Müllerian hormona*).
- MLB:** Mg Lysis/Wash Buffer.
- MMPs:** metaloproteasas de la matriz (*matrix metalloproteinases*).
- MMPs-TM:** metaloproteasas de la matriz tipo membrana.
- N-terminal:** amino terminal.
- OP:** proteína osteogénica (*osteogenic protein*).
- PAI:** inhibidor del activador del plasminógeno (*plasminogen activator inhibitor*).
- pb:** pares de bases
- PBS:** solución salina tamponada (*phosphate buffered saline*).
- PCNA:** antígeno nuclear de proliferación (*proliferating cell nuclear antigen*)
- PDGF:** factor de crecimiento derivado de las



plaquetas (*platelet derived growth factor*).

**PDK1:** cinasa 1 dependiente de fosfoinositol.

**Pi:** fosfato inorgánico.

**PI:** fosfoinosítidos.

**PI3,4,5P<sub>3</sub>:** fosfoinositol 3,4,5-trifosfato.

**PI3,4P<sub>2</sub>:** fosfoinositol 3,4-bisfosfato.

**PI3K:** fosfatidil inositol 3 cinasa.

**PI3P:** fosfoinositol 3-fosfato.

**PMSF:** fenilmetanosulfonilo.

**PtdIns:** fosfatidil inositoles.

**Ras:** RAt Sarcoma

**Rb:** retinoblastoma

**RBD:** dominio de unión a Ras (*ras binding domain*)

**R-Smads:** Smads reguladas por receptores (*receptor-regulated Smads*).

**RTKs:** Receptores tirosina cinasa (*Receptor Tyrosine Kinases*).

**SARA:** anclaje de Smad para activación del receptor (*Smad anchor for receptor activator*).

**SBF:** suero bovino fetal.

**SDS:** dodecil sulfato sódico.

**Ser:** serina.

**Smads:** *Small mothers against decapentaplegic*.

**Sos:** *Son of sevenless*.

**TβR-I:** receptor de TGF-β tipo I.

**TβR-II:** receptor de TGF-β tipo II.

**TGF-β:** factor de crecimiento transformante β (*Transforming growth factor β*).

**Thr:** treonina.

**TIMPs :** inhibidores tisulares de las metaloproteasas (*Tissue Inhibitors of Metaloproteases*).

**t-PA:** activador tisular del plasminógeno (*tissue-type plasminogen activator*).

**Tyr:** tirosina.

**TTBS:** tampón *Tween-Tris buffered saline*.

**u-PA:** activador del plasminógeno tipo urocinasa (*urokinase-type plasminogen activator*).