

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

**FENOTIPS TUMORALS INDUÏTS PER MUTACIÓ
PUNTUAL AL CODÓ 12 O 13 DEL GEN K-RAS HUMÀ**

TESI DOCTORAL

Sílvia Guerrero Caballero

Novembre 2002

Fenotips tumorals induïts per mutació puntual al codó 12 o 13 del gen *K-ras* humà

Memòria presentada per

Sílvia Guerrero Caballero

per optar al grau de

Doctora en Bioquímica i Biologia Molecular

Tesi realitzada sota la direcció del Dr. Ramon Mangues i del Dr. Gabriel Capellà al
Laboratori d'Investigació Gastrointestinal de l'Institut de Recerca de l'Hospital de la
Santa Creu i Sant Pau, Barcelona

Tesi adscrita al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Ciències,
Universitat Autònoma de Barcelona
Programa de Bioquímica Clínica i Patologia Molecular
Tutor: Francesc González

Ramon Mangues

Gabriel Capellà

Francesc González

Sílvia Guerrero

Barcelona, novembre de 2002

Un viatge de mil milles comença amb un sol pas
(Lao Tse, filòsof xinès)

Amb el coneixement s'acreixeren els dubtes
(Goethe, poeta alemany)

Agraïments

Ha arribat el moment dels agraïments. He finalitzat la presentació d'un treball que ha ocupat cinc anys de la meua vida i ha arribat el moment en que començo a rumiar en tota aquella gent que m'ha ajudat en tot aquest temps. És molt difícil intentar recordar-me de tothom perquè si començo a pensar, és molta la gent que en algun moment determinat ha influït en la meua vida i m'ha condicionat a l'hora d'afrontar els reptes i els problemes. Però sempre hi ha aquelles persones més properes a tu que deixen una empremta molt més profunda en la teua persona. Segur que d'aquests no em deixo ningú, de la resta de persones que d'una manera o altre m'han ajudat a superar-me, encara que sigui perquè m'han posat entrebancs, voldria expressar per ells un agraïment general; moltes gràcies.

Seguidament, realitzaré un agraïment particular a aquelles persones més properes a mi i a les que més m'han ajudat en el desenvolupament de la meua tesi doctoral perquè crec que s'ho mereixen. Encara que moltes coses es donin per sabudes, sempre és bo recordar-les amb paraules de tant en tant, a tots ens agrada escoltar-les.

Primer de tot, voldria agrair al Llorenç Puig i l'Adela Cirera, dos professors de l'Institut que van ser els primers que van fer que m'interessés per la ciència, sense potser ni adonar-se. Agrair al Dr. Joan Ramon Daban i la Dra Àngels Fabra que em permetessin fer els meus primers passos en aquest món.

Seguiré per la gent que em vaig trobar en endinsar-me de ple en la investigació al Laboratori d'Investigació Gastrointestinal, nom ampul·lós que normalment has de repetir dues vegades perquè et comencin a entendre. Gràcies a la Pali, la Gemma, la Nadina i la Sara, per la seva paciència en ensenyar-me i per fer-me sentir de seguida bé al laboratori, sense que em costés gens l'adaptació a un lloc nou.

A la gent que ha estat quasi bé tots aquests anys amb mi i encara estan al Laboratori o l'han deixat fa poc, i apart de feina, hem compartit amistat. A l'Ester, que haig de dir de l'Ester...gràcies per tot. Per les xerrades dels divendres, per estar sempre que et necessito, per les vacances inoblidables, per aconsellar-me en les decisions

importants, per escoltar-me... Al Carlos, l'únic noi del laboratori, de vegades mimat, de vegades atacat per tota la part femenina, per les bones hores passades, sobretot a l'hora de dinar on rèiem i arreglàvem el món. Aquestes estones són impagables i em permetien desconnectar dels problemes del dia a dia. A la Judith, per la seva important aportació tècnica al desenvolupament d'aquests experiments, per la seva meticulosa manera de treballar, per la seva alegria i bon humor permanent que fan veure totes les coses des del seu costat positiu.

També gràcies a la resta de gent del laboratori la Isolda, la Lourdes, la Matilde, la Mireia i la Cristina, sobretot per les seves sessions de música en directe.

A la gent d'altres laboratoris de l'Hospital que m'han ofert el seu ajut desinteressat i alguns fins i tot la seva valuosa amistat. Agrair especialment a l'Eugènia les hores passades en llargues i interessants xerrades i a l'Eduard, per moltes coses, tan professionals com personals. Pels seus consells científics, la seva continua disponibilitat, les tardes de futbol, i per la seva comprensió i gran capacitat per escoltar, de la que espero poder continuar gaudint.

A la gent d'altres centres amb la que he tingut ocasió de col·laborar en diferents moments del desenvolupament del meu treball, l'Adela Mazo, la Belen Lloveras i l'Agnès Figueres.

Gràcies al Gabi que va confiar en mi per desenvolupar aquest projecte sense tenir cap mena de referència i posteriorment ha col·laborat amb nosaltres en el desenvolupament dels articles i és una part molt important d'aquest treball. I gràcies al Ramon que gràcies al seu suport científic, personal i a la generositat mostrada a l'hora de continuar aquesta línia d'investigació, ha fet possible la realització d'aquesta tesi.

A tots els meus amics que han escoltat pacientment els meus problemes i mal de caps científics encara que no entenguessin de que estava parlant. Sobretot al Sergi, per tantes hores compartides, per les confidències, per les nits de marxa, per saber compartir penes i alegries. També agrair a tota aquella gent de tot arreu del món que he anat coneixent al llarg dels meus viatges i amb les que encara estic en contacte. Amb la seva manera diferent de veure la vida, m'han anat transformant poc a poc i m'han enriquit com a persona. Gràcies a la gent d'Argentina, de Mèxic i de Cuba, van fer que la meua vida prengué un caire diferent, més obert a tothom.

Per últim, i no per això menys important voldria donar un gràcies enorme a la meua família. És complicat concretar els agraïments a la teua família perquè influeixen

en tots els aspectes de la teva vida i han forjat la base més important de la teva persona. Gràcies a ells em trobo on estic en aquests moments.

Gràcies als meus pares per haver-me facilitat totes les eines per poder arribar fins aquí, la paciència que han tingut en els moments difícils i el deixar-me dedicar al que m'agrada, recolzant-me en tot moment. Agrair també als meus avis; sempre han estat al nostre costat i ens han ajudat en el que calia.

Als meus germans, part molt important de la meva vida. A la Glòria, per totes les estones compartides i els viatges que hem realitzat; crec que serà la continuadora de la meva vocació científica en la família. Al Xus, que malgrat que és el petit de la família, ja raona com tot un home. Per tots els bons moments que hem passat junts en la multitud d'afeccions que compartim, sobretot el Barça. A la Laura, per tantes i tantes coses. Hem compartit tants episodis de les nostres vides que és difícil concretar. Per la seva alegria, per la seva bondat, per la seva generositat... i al "cuñao", el Xavi, per ser tan bona persona i tan divertit. I a la resta de la família. Tots ells han fet la meva vida més amena i m'han ajudat a relativitzar els entrebancs i continuar endavant amb més força.

I per finalitzar, moltes gràcies al Tom. Compartir la vida amb una persona tan especial, fa que les coses siguin més fàcils. Gràcies per tenir la capacitat de fer-me oblidar els mals de cap en un instant, gràcies per aguantar els moments difícils amb un somriure, gràcies per saber entendre les tensions que comporta la realització d'un treball tan important... Gràcies per tot en general.

Arribar a la finalització d'aquest treball és molt important per mi, i m'agradaria compartir aquest moment tan especial amb tots vosaltres.

Moltes gràcies a tots!!!

ÍNDIX

INTRODUCCIÓ	1
1. GENS <i>RAS</i>	1
1.1. Activitat bioquímica	1
1.2. Estructura de la proteïna Ras	3
1.3. Vies de transducció de senyal	4
1.3.1. Via de Raf i MEK/Erk	5
1.3.2. RalGDS i la via de Ral	5
1.3.3. Via de fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)	5
1.3.4. MEKK1 i la via de JNK.....	6
1.3.5. GAPs	6
1.3.6. Altres efectors de Ras	6
1.3.7. Senyalització via integrines	6
2. EL CÀNCER	7
2.1. Tipus de tumors	7
2.2. El procés tumoral	7
2.3. Alteracions de la fisiologia cel·lular que porten al creixement tumoral	9
2.3.1. Desregulació de la proliferació	9
2.3.2. Adquisició de resistència a l'apoptosi	11
2.3.3. Adquisició de potencial replicatiu il·limitat	13
2.3.4. Adquisició d'angiogènesi sostinguda	13
2.3.5. Adquisició de capacitat d'envair teixits i de metàstasi	13
3. TRANSFORMACIÓ PRODUÏDA PELS GENS <i>RAS</i>	14
3.1. Estudi de la transformació cel·lular in vitro	14

3.2. Efectes de la transformació in vitro per <i>ras</i>	15
3.2.1. Augment de la proliferació cel·lular	15
3.2.2. Resistència a l'apoptosi	16
3.2.3. Canvis en la morfologia cel·lular	17
3.2.4. Pertorbació dels contactes cèl·lula-cèl·lula	17
3.2.5. Augment de la capacitat de créixer en suspensió	18
3.3. Estudi de la tumorogènesi in vivo	19
3.4. Capacitat tumorogènica de <i>ras</i>	20
3.5. Activació de <i>ras</i> en tumors humans	20
4. ASPECTES DIFERENCIALS SEGONS EL CODÓ MUTAT EN ELS GENS RAS O LA SOBREEXPRESSIÓ DE LA PROTEÏNA NORMAL	21
4.1. Diferències fenotípiques associades a mutacions en un codó específic de <i>ras</i> o a la sobreexpressió de la proteïna normal	22
4.1.1. Les mutacions al codó 12 del gen <i>ras</i> són més transformants que al codó 13 en sistemes in vitro	22
4.1.2. Les mutacions al codó 12 del gen <i>ras</i> estan associades amb increment de l'agressivitat tumoral en carcinomes humans	23
4.1.3. Relació entre la transformació i el nivell d'expressió de Ras	24
4.2. Diferències estructurals i funcionals induïdes per les mutacions activants de <i>ras</i>	24
5. SARCOMES DE PARTS TOVES (STS)	26
5.1. Tipus histològics	26
5.1.1. Fibrosarcoma	26
5.1.2. Histiocitoma fibrós maligne (MFH)	27
5.2. Grau de malignitat	28
5.2.1. Implicacions clíniques	28
5.2.2. Criteris patològics per determinar el grau	29
5.2.3. Reproductibilitat del diagnòstic	29

5.3. Factors de pronòstic	29
5.4. Biologia molecular dels sarcomes humans	30
5.4.1. Alteracions cromosòmiques	30
5.4.2. Anàlisi molecular dels oncogens	30
Mutacions puntuals en <i>ras</i>	30
Amplificacions	31
5.4.3. Anàlisi molecular dels gens supressors de tumors	31

OBJECTIUS

RESULTATS

ESTUDI DEL FENOTIP TRANSFORMANT IN VITRO	34
Canvis funcionals i moleculars comuns dels transfectants respecte les cèl·lules wild type	34
Canvis funcionals i moleculars entre els transfectants segons la posició del codó mutat (12 o 13) o la proteïna normal sobreexpressada	35
ESTUDI DEL FENOTIP TUMORAL IN VIVO	36
<i>K-ras</i> codon 12 mutation induces higher level of resistance to apoptosis and predisposition to anchorage-independent growth than codon 13 mutation or proto-oncogene overexpression	37
Codon 12 and codon 13 mutations at the <i>K-ras</i> gene induce different soft tissue sarcomas types in nude mice	45
DISCUSSIÓ	69

ESTUDI DEL FENOTIP TRANSFORMANT IN VITRO	69
-------------------------------------------------------	----

Diferències funcionals i moleculars entre els transfectants	69
La base estructural responsable de les diferències funcionals: una hipòtesi	71
Implicacions clíniques de les troballes en el model in vitro	73
ESTUDI DEL FENOTIP TUMORAL IN VIVO	74
Diferent tipus histològics segons la localització de la mutació en <i>K-ras</i> ...	75
Diferències funcionals entre els tumors generats segons la mutació en <i>K-ras</i>	75
Diferències en apoptosi	76
Diferències en índex mitòtic i apoptòtic	78
Marcadors d'agressivitat	79
Implicacions clíniques de les troballes en el model in vivo	81
CONCLUSIONS.....	84
APÈNDIX.....	85
BIBLIOGRAFIA.....	89

INTRODUCCIÓ

1. GENS *RAS*

Els gens *ras* es van identificar com els elements genètics transformants de dos retrovirus que indueixen la ràpida formació d'un tumor en els animals infectats: les soques Harvey i Kirsten del virus del sarcoma de rata (1-5). Treballs posteriors van demostrar que aquests principis transformants (oncogens *ras*) eren versions mutades de gens cel·lulars (proto-oncogens) transduïts pels virus durant la seva replicació (4). Més tard els oncogens *ras* van ser aïllats d'humans (6). Aquests oncogens humans van induir experimentalment tumors en animals (7,8) i van ser capaços de transformar línies cel·lulars immortalitzades de manera dominant després de la transfecció (7,9).

S'han identificat en mamífers tres gens *ras* funcionals (*H-ras*, *K-ras* i *N-ras*; aquest últim aïllat d'una línia de neuroblastoma i no trobat en virus) que codifiquen proteïnes similars (tota la seqüència és pràcticament idèntica, menys un domini hipervariable a la zona C-ter) de 21 Kda, que s'expressen ubiquament sota un promotor *housekeeping*. El gen *K-ras* codifica dues proteïnes isomòrfiques; *K-ras A* (c-DNA 687 pb) i *K-ras B* (c-DNA 565 pb) que són generades per splicing alternatiu del quart exó codificant (10); només varien també en la zona C-ter. *K-ras B* s'expressa ubiquament (com *H-ras*,*N-ras*), en canvi *K-ras A* només s'expressa en l'embriogènesi (11).

Aquestes proteïnes es troben ancorades a la part interna de la membrana plasmàtica, la hidrofobicitat els hi ve donada per una prenilació post-translacional; la unió de les proteïnes *ras* a la membrana és indispensable per la seva funció.

1.1. Activitat bioquímica

Les proteïnes codificades pels gens *ras* són GTPases petites implicades en la transmissió de senyals de tirosin quinases de la membrana cel·lular a una cadena de serin-treonin quinases citoplasmàtiques que transmeten la senyal al nucli cel·lular (12,13). La funció de *ras* està regulada per vàries proteïnes que controlen les fluctuacions entre les formes actives i inactives d'aquesta, depenent de la unió al

nucleòtid de guanina (GTP activa i GDP inactiva) (13,14). Aquesta via de transducció de senyals regula la proliferació cel·lular i la diferenciació (15,16) i ras seria l'interruptor molecular d'aquestes vies.

Les proteïnes Ras uneixen GTP i GDP amb una afinitat molt elevada (17,18) i tenen una activitat GTPàsica (d'hidròlisi de GTP) intrínseca molt baixa (19,20). La forma unida a GTP (Ras-GTP) és activa en la senyalització, mentre que unida a GDP (Ras-GDP) és inactiva. Aquesta activació s'associa a un canvi de conformació en la regió efectora que porta a la transducció de senyal a una diana per sota de Ras (21). Ras-GTP és transformat a Ras-GDP per l'activitat hidrolítica de ras i les seves proteïnes reguladores (Figura 1). Ras-GDP és transformat en Ras-GTP per un procés de canvi controlat per la velocitat de dissociació de GDP de Ras. La raó entre Ras-GTP i Ras-GDP està determinada per la concentració relativa intracel·lular de nucleòtids de guanina (la de GTP és molt més alta que la de GDP) i l'activitat catalítica de dues classes de proteïnes que regulen Ras; les proteïnes activadores de l'activitat GTPàsica (GAPs), com GAP o NF1 (22,23) i els factors intercanviadors de nucleòtids de guanina (GEFs ó GDS) com SOS o Ras-GRF (24,25) (Figura 1).

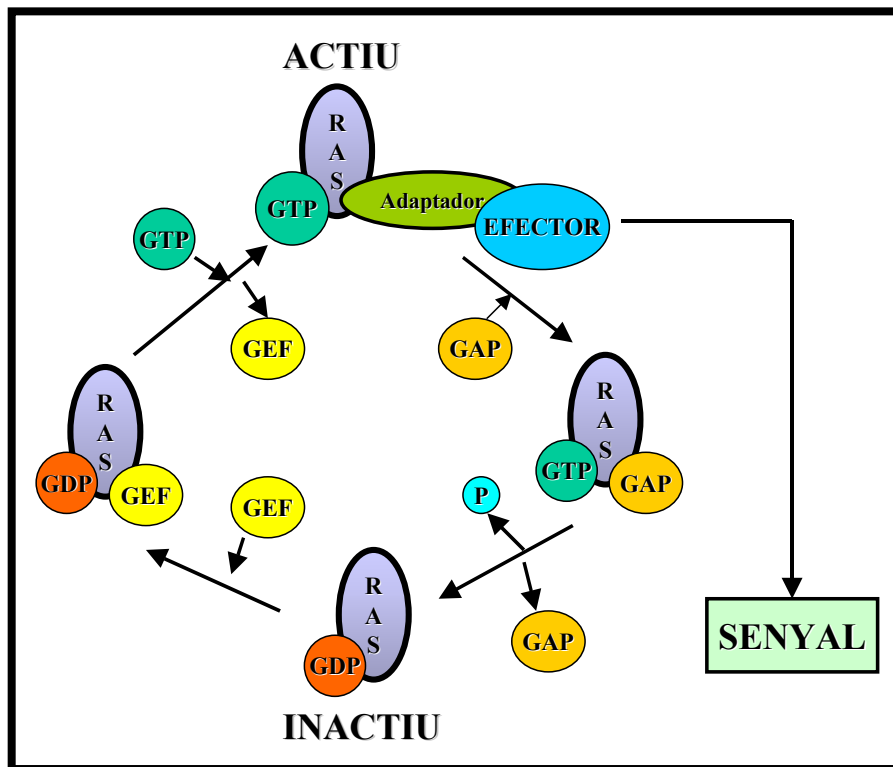


Figura 1. Activació de la proteïna Ras

1.2. Estructura de la proteïna Ras

La proteïna Ras està formada per 188 aminoàcids. S'han identificat un mínim de tres dominis funcionals diferents de Ras:

1) El *domini d'unió a nucleòtid* de guanina, que inclou un motiu d'aminoàcids característic que comparteixen les proteïnes que uneixen el γ -fosfat del nucleòtid de guanina, el llaç P. En Ras el llaç P compren els residus 10-17 i en ell es troben els residus de Gly (glicina) 12 i Gly 13, importants en la transformació neoplàsica. 2) Un *domini catalític*, que s'encarrega de la hidròlisis del GTP. 3) Un *domini efector*, que comprèn els aminoàcids amb els que interaccionen els diferents efectors de la proteïna, donant pas a les activitats biològiques de Ras (26). L'estudi de Ras unit a un anàleg no hidrolitzable de GTP o unit a GDP, revela que l'estat actiu i no actiu de la proteïna mostren diferències conformacionals induïdes per la interacció amb el γ -fosfat. Les diferències més significatives es localitzen en dues regions anomenades Switch I i II que interaccionen amb els efectors downstream (per sota) de Ras. Es van anomenar switch perquè serien com els interruptors que fan possible, amb el seu canvi de conformació, que s'activin les vies de senyalització mediades per Ras. La regió **Switch I** inclou els residus 30 a 38, al segon llaç de la proteïna i la regió **Switch II** comprèn els residus 60 a 76 que inclou el llaç L4 de la proteïna on es troba el residu Gln 61 (27), també important en la transformació neoplàsica (Figura 2).

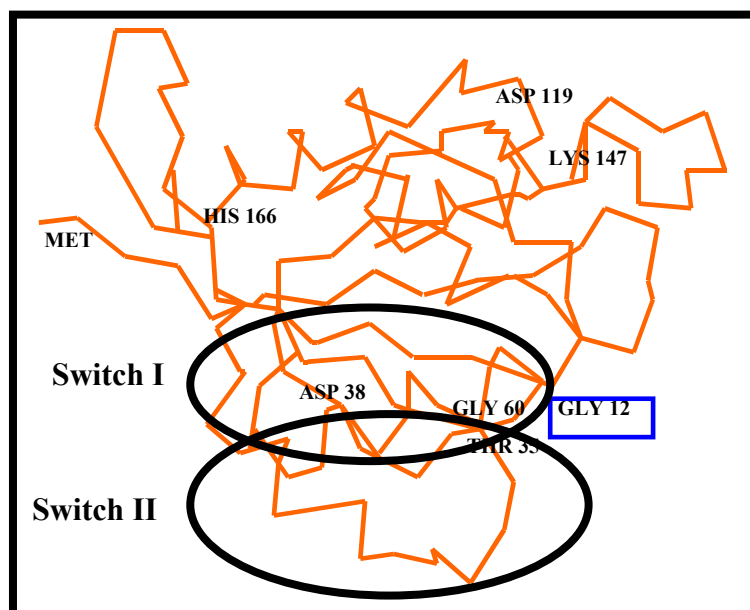


Figura 2. Estructura de la proteïna Ras wild type; figura adaptada de Monaco R. et al, J Protein Chem 1995; 14(6):457-466.

1.3.Vies de transducció de senyal

Ras és un punt de convergència de moltes vies de senyalització que provenen de diverses senyals extracel·lulars com factors de creixement, citoquines, hormones i neurotransmissors que estan mediades per diferent tipus de receptors de tirosin quinasa (PDGFr, EGFr, receptors de citoquina...)

El complex activat Ras-GTP transmet aquest senyal interaccionant amb les proteïnes diana o efectors de Ras (28), aquestes inicien vies bioquímiques que regulen diversos processos cel·lulars com la progressió del cycle cel·lular, l'apoptosi, canvis en el citoesquelet i l'adhesió cel·lular, unions cèl·lula-cèl·lula, transcripció i translació (Figura 3).

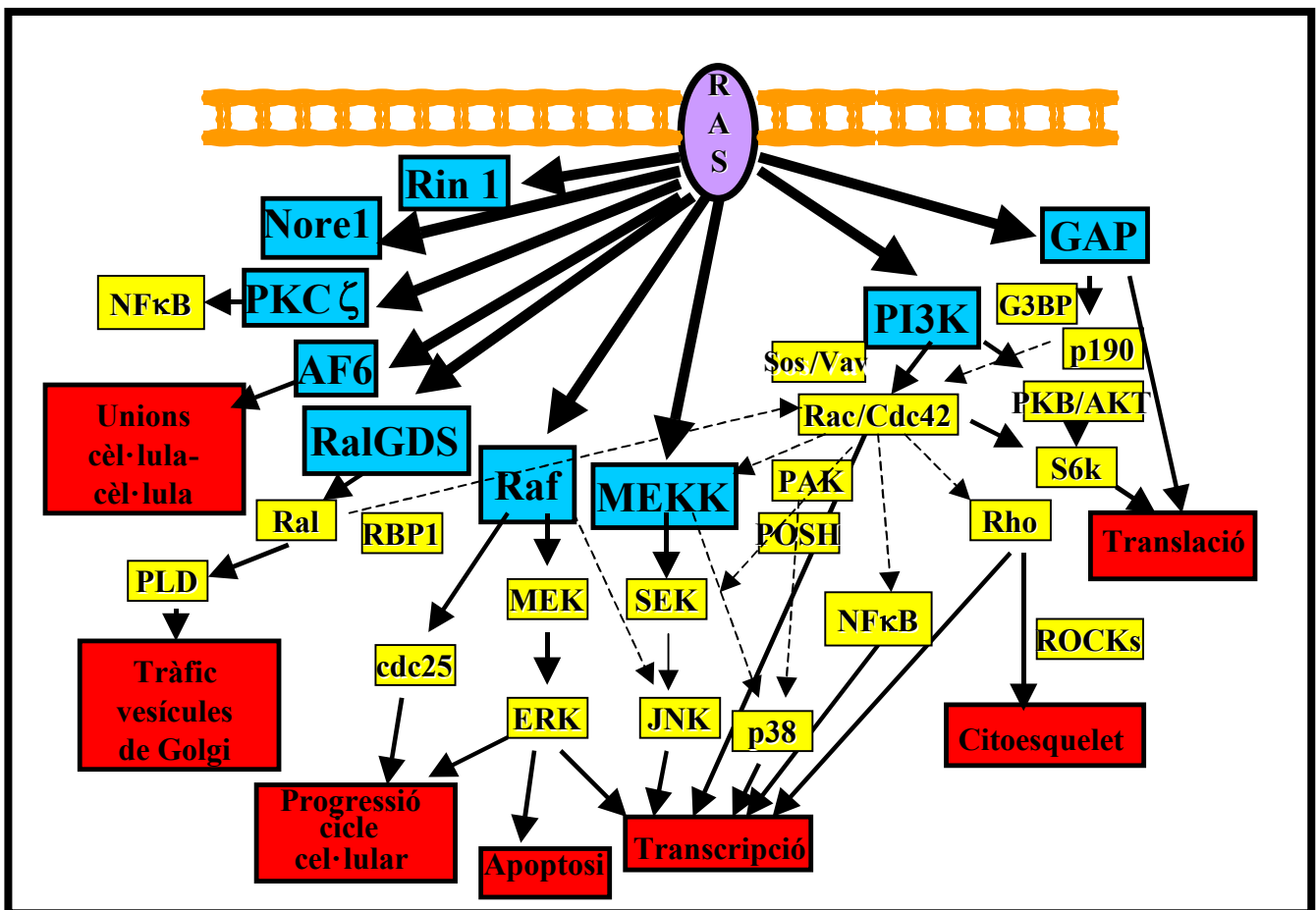


Fig 3. Vies de senyalització intracel·lular mediades per Ras i els seus efectors; adaptat de Malumbres M et al. Frontiers in Bioscience 1998; 3, d887-912.

1.3.1. Via de Raf i MEK/Erk

La via iniciada per Raf és una de les rutes bioquímiques distals a Ras més estudiades perquè Raf va ser la primera proteïna identificada com a efectora de Ras (29-32). Ras-GTP uneix Raf-1 que s'activa fosforilant MEK (33,34) que a la vegada activa les quinases p42 i p44 MAPK/Erk (35-38) (Figura 3). Aquestes a diferència de la resta, tenen diversos substrats: p90ribosomal S6quinasa, cPLA2, PHAS-1 (39) i Rsk (40) un altre Ser/Thr quinasa que té com a substrats moltes quinases i factors de transcripció com Elk1 (ó TCF), la seva fosforilació permet la seva activitat transcripcional que porta a la inducció de la transcripció del proto-oncogen c-fos (41).

Aquesta via, molt ben caracteritzada, està involucrada en varis processos cel·lulars dependents de Ras com ara la progressió del cicle, la regulació de l'apoptosi i la transcripció de gens (28).

1.3.2. RalGDS i la via de Ral

RalGDS es un efector de Ras (42-45) i a la vegada un factor intercanviador de nucleòtids de guanina de Ral. Possibles dianes de Ral són les GAPs de cdc42/Rac i la fosfolipasa D (Figura 3), lligant així aquesta via amb el tràfic de vesícules a Golgi i amb el control del citoesquelet.

1.3.3. Via de fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)

PI3K catalitza la fosforilació de fosfatidilinositol (4,5)-bifosfat (PtdIns[4,5]P₂) per esdevenir fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfat (PtdIns[3,4,5]P₃) en resposta a varis factors de creixement i citoquines. Ras uneix i activa la subunitat catalítica p110 α de PI3K. PI3K i els seus productes actuen en vies de control de proliferació cel·lular, supervivència cel·lular i canvis metabòlics. A través de PKB/AKT transmet un potent senyal de supervivència (28). També PI3K pot ser un lligand entre Ras i les GTPases Rho a través de Rac tot induint canvis al citoesquelet (46) (Figura 3).

1.3.4. MEKK1 i la via de JNK

MEKK1 és un altre efector de Ras. Activa a la JNKK que a la vegada activa les JNK/SAPKquinases (47,48) (Figura 3). Les JNKs regulen c-Jun i ATF-2 (CRE-BP1), que resulta en un augment de transcripció de diversos gens diana (49). No està clar com regula Ras a MEKK1.

L'activitat de JNK també està estimulada per Raf, produint un entrecreuament entre les vies de diferents efectors de Ras (50). Recentment s'ha vist que Ras i Raf activen al factor de transcripció NF- κ B (51), probablement a través de la estimulació de les JNKs dependent de Raf (51).

1.3.5. GAPs

Algunes observacions impliquen les proteïnes activadores de GTPases (GAPs), com a efectors del sistema de Ras a la vegada que actuen com a reguladors negatius (52,53) (Figura 3).

1.3.6. Altres efectors de Ras

S'han identificat altres possibles efectors perquè s'uneixen a la forma activa de Ras però la seva funció encara no està ben estudiada. Entre ells PKC ζ que sembla lligada amb la inhibició de l'apoptosi mitjançant Ras a través de NF- κ B (54) (Figura 3). AF6 i Canoe semblen lligats amb les interaccions específiques cèl·lula-cèl·lula i per últim Rin1 i Nore1, no se sap quina funció tenen (55,56) (Figura 3).

1.3.7. Senyalització via integrines

Les integrines són una família de receptors d'adhesió de proteïnes de matriu extracel·lular. Les integrines a la vegada generen senyals que influencien en una gran varietat de funcions cel·lulars com la migració, la proliferació i l'apoptosi. S'han caracteritzat moltes vies de senyalització downstream de les integrines, entre elles la de la quinasa d'adhesió focal (FAK). S'ha descrit que les vies de senyalització de les

integrines comparteixen elements en comú amb la cascada de transducció de senyal de Ras (57).

Un cop introduïts l'estructura, l'activitat bioquímica, vies de transducció de senyal i processos en els que s'implica la proteïna Ras, es passa a descriure el procés tumoral i el paper dels gens ras en tumorogènesi mitjançant l'estudi de models in vitro, in vivo i en tumors humans.

2. EL CÀNCER

2.1. Tipus de tumors

El càncer és un grup de malalties caracteritzades pel creixement excessiu i descontrolat de cèl·lules que invaeixen teixits i òrgans, provocant finalment, sinó s'eradica, la mort de l'individu (58).

La majoria dels tumors (85%) deriven de cèl·lules epitelials i s'anomenen carcinomes (colon, pulmó, mama, pàncreas...). A un tumor benigne epitelial se l'anomena adenoma i al corresponent tumor maligne adenocarcinoma. El prefixi adeno es refereix a l'epiteli secretor, mentre que escamós es refereix a l'epiteli de recobriment (58). Un 5% són leucèmies, (medul·la òssia) i un altre 5% són limfomes (ganglis, melsa), tots dos originats en cèl·lules de la sang i per últim neuroblastomes i gliomes originats en cèl·lules del sistema nerviós. El 2% restant el componen els sarcomes, derivats del teixit mesenquimàtic (teixit ossi, cartílag, múscul...).

2.2. El procés tumoral

A continuació es descriu el procés tumoral fent èmfasi en l'alteració dels processos de proliferació i d'apoptosi i el paper que els gens *ras* juguen en aquests processos.

La tumorogènesi en humans és un procés de múltiples passos que reflexen alteracions genètiques que porten a la progressiva transformació de les cèl·lules humanes normals en altament malignes. En principi, totes les cèl·lules d'un tumor deriven d'una sola cèl·lula, els tumors tenen origen *monoclonal*; tot i que és possible que això no sigui cert en tots els casos.

El procés de formació a partir d'una cèl·lula implica l'acumulació successiva d'alteracions als gens durant anys, fins que es fan aparents. Una sola mutació no provoca l'aparició d'un tumor, es necessita l'acumulació de varies mutacions en diferents gens, perquè una cèl·lula pugui créixer formant un tumor. Durant aquest procés evolutiu, aquelles cèl·lules que van adquirint alteracions al seu material genètic que els proporciona avantatge de creixement, van sent seleccionades i seran finalment majoritàries. Això és possible perquè malgrat el seu origen monoclonal les cèl·lules canceroses són inestables genèticament i, això els permet acumular més alteracions tot induint la posterior heterogeneïtat que es troba als tumors. Aquesta inestabilitat començaria quan no funcionen adequadament les senyals d'alarma interna que indiquen la presència d'errors en la duplicació i segregació de la informació genètica que encara augmenten més, en crear clons més agressius, la malignitat de les cèl·lules (59).

El càncer és el resultat de dos processos successius: el creixement descontrolat d'un grup de cèl·lules denominat *tumor* o *neoplàsia* i la posterior adquisició per aquestes cèl·lules de capacitat invasiva que les permet escapar del seu lloc natural a l'organisme i colonitzar i proliferar en altres teixits o òrgans, procés conegut com *metàstasi*. (58)

2.3. Alteracions de la fisiologia cel·lular que porten al creixement tumoral

Existeixen alteracions essencials en la fisiologia de la cèl·lula que, quan es donen conjuntament, porten al creixement tumoral (60):

2.3.1. Desregulació de la proliferació

Adquisició d'independència als senyals mitogènics exògens de creixement.

Les cèl·lules normals requereixen de senyals de creixement mitogènics exògens abans de passar d'un estat quiescent a un estat proliferatiu actiu. En canvi, les cèl·lules tumorals redueixen molt aquesta dependència dels estímuls exògens, probablement generant els seus propis senyals de proliferació. Aquest fet, provoca el creixement descontrolat del teixit. Un exemple de mecanisme per aquesta adquisició, seria l'activació dels oncogens, com *ras* o la sobreexpressió de receptors per a factors de creixement, com el EGFr.

Adquisició d'insensibilitat als senyals antiproliferatius. En un teixit normal, hi ha múltiples senyals antiproliferatius que intenten mantenir la quiescència cel·lular i l'homeòstasi del teixit. Aquests senyals poden bloquejar la proliferació mitjançant dos mecanismes. Les cèl·lules poden ser forçades a sortir del cicle proliferatiu actiu per entrar en Go, estat del que pot tornar a sortir quan els senyals extracel·lulars ho indiquin. Alternativament, es pot evitar la proliferació cel·lular induint l'entrada en estats postmitòtics, usualment associats a l'adquisició de trets específics de diferenciació.

La resposta de la cèl·lula a aquest senyals antiproliferatius està mediada pels mecanismes de control del cicle cel·lular. Les cèl·lules tumorals evadeixen aquesta resposta perquè es produeixen canvis en la regulació del cicle que fan que s'ignorin els controls que s'encarreguen de la restricció de la proliferació. Un exemple de mecanisme per aquesta adquisició, seria la manca de resposta cel·lular al senyal antiproliferatiu de TGF β per la pèrdua i/o mutació d'alguns dels seus mediadors en la transmissió de senyals (mutacions truncants a TGFbeta R-II o pèrdua en homozigosis de Smad4).

Cicle cel·lular

El procés de reproducció de la cèl·lula es denomina cicle cel·lular. Es troba dividit en quatre fases (Figura 4).

La **Fase G1**, és la fase d'interval que segueix a una divisió cel·lular, prèvia a la replicació de DNA. La cèl·lula augmenta de volum degut a la síntesis continua de components. Existeix un punt de control anomenat *punt de restricció R*, on decideix si es donen les condicions adequades per començar la síntesis de DNA.

La **Fase G0**, és la fase on es troben les cèl·lules que paren la progressió del cicle a G1 i resten en repòs sense augment de massa per un temps indefinit.

La **Fase S**, és la fase de síntesi de DNA.

La **Fase G2**, és la fase d'interval que precedeix a la fase de divisió cel·lular. Existeix el segon punt de *control G2-M*, on la cèl·lula comprova si la replicació ha estat correcta.

La **Fase M**, és la fase de Mitosi, els cromosomes es separen i la cèl·lula es segrega en les dues cèl·lules filles. Es troba l'últim punt de *control M*, on es comprova l'alineació correcta dels cromosomes que precedeix a la separació (58).

Reguladors del cicle cel·lular

Les ciclines són proteïnes que regulen a les quinases que coordinen els processos de control del cicle cel·lular (CDKs). Les regulen per associació reversible, que fa que la concentració de ciclines sigui crítica en el desenvolupament del cicle.

La **Ciclina D1**, és la ciclina de l'etapa G1, està implicada en la regulació del punt de restricció.

La **Ciclina B1**, és la ciclina mitòtica, està implicada en el punt de control mitòtic.

El **PCNA** (Proliferating Cell Nuclear Antigen), és una subunitat de la DNA polimerasa δ a la que s'uneixen inhibidors de cicle per regular la síntesis de DNA (58) (Figura 4).

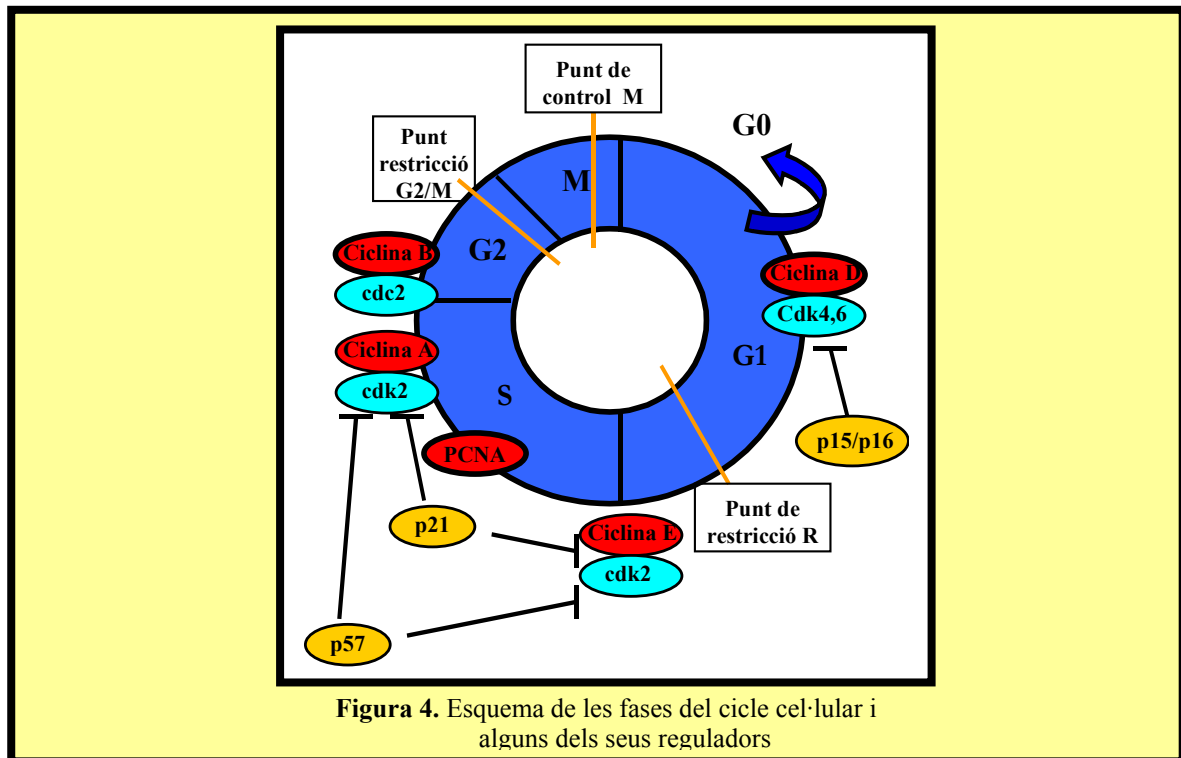


Figura 4. Esquema de les fases del cicle cel·lular i alguns dels seus reguladors

2.3.2. Adquisició de resistència a l'apoptosi

L'habilitat de la població de cèl·lules tumorals per expandir-se no només està determinada per la velocitat de proliferació cel·lular sinó també per la velocitat de mort cel·lular. L'apoptosi, mort cel·lular programada, representa la principal causa de mort cel·lular en organismes normals. L'**homeòstasi** en qualsevol població cel·lular o teixit requereix un equilibri entre la proliferació cel·lular i la mort cel·lular, que la velocitat de mort i creixement siguin iguals.

Al llarg dels darrers anys ha quedat clar que l'adquisició de resistència a aquesta mort apoptòtica és essencial per la formació dels tumors. Un exemple de mecanisme per aquesta adquisició, seria la pèrdua d'expressió del gen supressor de tumors p53.

L'acumulació d'una població de cèl·lules anormals (neoplàsia), pot estar originada per una proliferació descontrolada o una inhibició de la mort, que fa que l'homeòstasi es desequilibri i es produeixi un augment de la població.

Malgrat això, l'estudi dels tumors humans induïts per *ras*, es centren fonamentalment en la proliferació i no es té en compte l'apoptosi, quan veiem que aquesta és molt important en el procés tumoral i en la predicció de com evolucionarà el tumor. Així, el càncer s'origina perquè es dona una anormalitat en la proliferació i/o mort cel·lular que provoca un creixement tissular descontrolat.

Apoptosi

Apoptosi és un terme descriptiu pel fenotip que presenten les cèl·lules on es dona mort cel·lular programada. La mort cel·lular per apoptosi té dues fases: a la primera, les cèl·lules reaccionen davant un estímul (o a la seva absència) decidint iniciar el procés de mort, a la segona o execució, les cèl·lules pateixen una sèrie d'alteracions estructurals que condueixen a la mort. En aquesta fase es produeix una disminució de l'adhesió cel·lular i els contactes intercel·lulars, reducció del volum cel·lular i condensació de la cromatina. La membrana cel·lular no esclata, sinó que es formen els *cossos apoptòtics*, constituïts per trossos de citoplasma rodejats de membrana. Per l'execució de l'apoptosi és essencial l'activació d'uns enzims que degraden proteïnes (*caspases*) (Figura 5), que es sintetitzen com proenzims inactius, les principals són les caspases 8, 9, 7 i 6. També cal l'activació d'uns altres enzims que produeixen talls al DNA (*nucleases*). Com no es produeix alliberació de material cel·lular al medi, no es dona resposta inflamatòria (58).

La família de Bcl-2, és important en la regulació del procés apoptòtic (Figura 5). La constitueixen un conjunt de proteïnes entre les que destaquen les anti-apoptòtiques Bcl-2 i Bcl-XL i les pro-apoptòtiques Bax, Bad, Bak i Bid (61,62). Formen homo i heterodímers entre ells i regulen l'alliberació del citocrom C de la mitocondria al citoplasma, que activa les procaspasa 9 i inicia el procés apoptòtic (63).

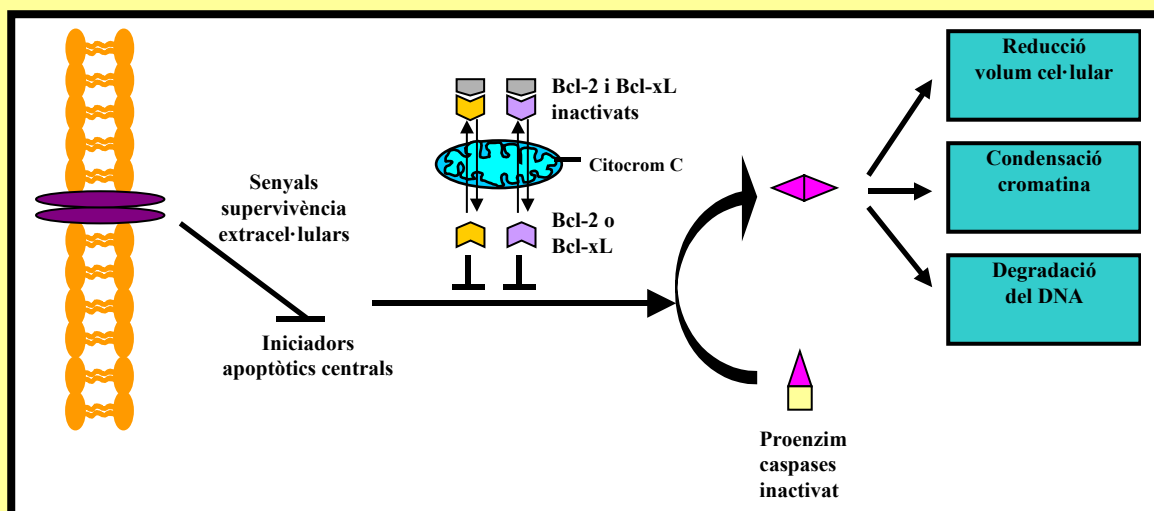


Figura 5. Model del mecanisme central de l'apoptosi; adaptat de Vogelstein B et al. The genetic basis of human cancer; 1998:196.

2.3.3. Adquisició de potencial replicatiu il·limitat

Degut a l'origen monoclonal dels tumors, aconseguir les grans poblacions de cèl·lules que els constitueixen no seria possible si aquestes cèl·lules no poguessin créixer il·limitadament. Les cèl·lules normals tenen un programa autònom que limita la seva multiplicació. En arribar a cert nombre de passis les cèl·lules deixen de créixer, en un procés anomenat **senescència**.

En els últims anys s'ha descobert que pel desenvolupament d'aquest procés és limitant la llargada dels telòmers, la part final dels cromosomes. En cèl·lules normals els telòmers es van escurçant a mesura que les cèl·lules es van multiplicant. El tamany d'aquests telòmers és fonamental per provocar el procés de senescència. Les cèl·lules tumorals evadeixen aquest procés mantenint la llargada dels telòmers (anòmals però viables); i això les permet dividir-se il·limitadament.

2.3.4. Adquisició d'angiogènesi sostinguda

El procés de creixement de nous vasos sanguinis s'anomena **angiogènesi**. Les cèl·lules tumoral cal que adquireixin aquesta habilitat si volen aconseguir un creixement tridimensional identificable. La vascularització de les masses de cèl·lules canceroses és essencial per la seva supervivència, perquè a través dels vasos sanguinis arriben els nutrients i l'oxigen necessaris per mantenir la funció cel·lular. Un exemple de mecanisme per aquesta adquisició seria la elevada expressió de molècules proangiogèniques com VEGF (vascular endotelial growth factor) per part de la cèl·lula tumoral que indueix la proliferació i la motilitat de les cèl·lules endotelials.

2.3.5. Adquisició de capacitat d'envair teixits i de metàstasi

Durant el desenvolupament de la majoria dels càncers humans, el tumor primari envaeix els teixits adjacents i després colonitza llocs distants a l'òrgan d'origen. Aquests assentaments distants, anomenats metàstasi, són la principal causa de mort en els càncers humans. El mecanisme d'adquisició de la capacitat d'invasió i metàstasi està relacionat amb l'adquisició de determinats circuits de regulació i mecanismes moleculars que governen aquests complicats processos.

L'adquisició d'aquestes propietats és essencial creixement tumoral i el desenvolupament de la malaltia (Figura 6).

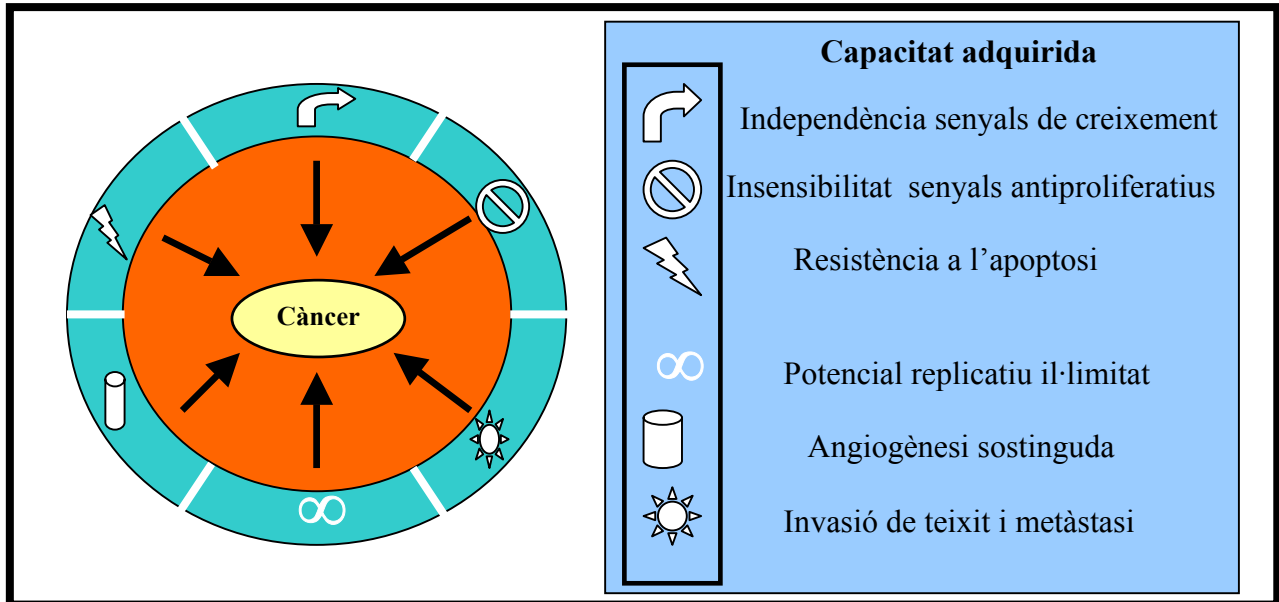


Figura 6. Alteracions de la fisiologia cel·lular que porten al creixement tumoral; adaptat de Hanahan D et al. Cell 2000;100:57-70.

3. TRANSFORMACIÓ PRODUÏDA PELS GENS *RAS*

3.1. Estudi de la transformació cel·lular *in vitro*

La sensibilitat i facilitat de transformació de les línies cel·lulars de fibroblast de rosegadors, fa que sigui el sistema triat per l'anàlisi de les alteracions del fenotip transformant produït per diversos oncogens. En particular, la gran sensibilitat de la línia cel·lular de fibroblast de ratolí NIH3T3 per la transformació per l'activació de la via de transducció de senyal de Ras i la seva facilitat per ser transfectades ha fet d'aquest sistema cel·lular una de les eines més valuoses per la investigació dels gens *ras* (64).

L'expressió de formes oncogèniques de les proteïnes Ras, a la vegada que la sobreexpressió de la proteïna Ras normal, porta aquestes conseqüències a les cèl·lules NIH3T3. La transformació maligna, s'associa en aquest sistema, a l'adquisició d'algunes o totes de les següents propietats: alteracions en la morfologia cel·lular, augment de la velocitat de creixement, disminució de la dependència a factors de

creixement, augment de l'activitat metabòlica tal com el consum de glucosa, pèrdua de la inhibició del creixement depenent dels contactes cèl·lula-cèl·lula, alteració de l'expressió de gens relacionats amb la proliferació, adquisició de potencial de creixement independent d'ancoratge i l'habilitat de formar tumors en animals experimentals (65).

Com aquesta línia cel·lular preestablerta és immortal, en comptes de completament normal, pot transformar-se com a conseqüència de la introducció d'un únic oncogen perquè conté cert número de mutacions d'origen. Aquesta característica té, com a contrapartida, una alta tendència a la transformació espontània (sobretot si es deixen arribar a confluència), que pot tant emascarar com sobreestimar els resultats obtinguts (66). Per minimitzar aquest problema cal limitar el número de passis, per no deixar temps a què es produeixi la transformació espontània; a més cal evitar que arribin a confluència. Això optimitza la reproductibilitat dels resultats d'assaigs independents.

Una limitació d'aquest model és que aquestes cèl·lules són d'origen fibroblast i la majoria de càncers humans tenen origen epitelial. Cal doncs, tenir precaució a l'hora d'extrapol·lar les observacions en els assaigs amb NIH3T3 transformades a la situació en tumors humans (67,68).

3.2. Efectes de la transformació in vitro per *ras*

La majoria d'estudis de la transformació in vitro per *ras*, s'han fet transfectant el gen transformant, estudiant els canvis que provoca a la cèl·lula i com s'afecten determinades vies, lligades amb l'adquisició de les propietats de la transformació maligne. A continuació es descriuen els fenotips observats per activació a diferents nivells de les vies downstream de Ras. L'activació d'aquestes vies per separat no provoca la transformació completa sinó que és la cooperació entre totes la que porta al fenotip de transformació per Ras:

3.2.1. Augment de la proliferació cel·lular

L'activació de **Raf** juga un paper molt important en la transformació per Ras (69,70). En activar-se constitutivament les ERKs es produeix una desregulació de la senyal mitogènica, augmentant la proliferació cel·lular. Es produeix un escurçament del

cicle cel·lular a la fase G1, associat a un augment d'expressió de la ciclina D1 (71). L'activació de **RalGDS** contribueix a mediar la transformació per Ras, estimulant la proliferació cel·lular (72,73). Aquests efectes necessiten de cèl·lules prèviament immortalitzades ja que Ras oncogènic pot tenir efectes antiproliferatius i induir parada cel·lular i senescència quan es transfecta en cultius primaris de fibroblast (74,75).

3.2.2. Resistència a l'apoptosi

L'activació de Ras s'ha relacionat amb la inhibició de l'apoptosi. L'activitat antiapoptòtica de Ras està relacionada amb l'activació constitutiva de **PI3K**. La senyal de supervivència de PI3K estaria mediada per AKT/PKB (76-78) que donaria protecció fosforilant i inactivant Bad, una proteïna proapoptòtica, produint-se un alliberament de Bcl-2, proteïna antiapoptòtica (79,80) o bé activant el factor de transcripció NF-κB que també té efectes antiapoptòtics (81)

Supervivència cel·lular: l'AKT.

Una de les alteracions fisiològiques cel·lulars que porten al creixement tumoral, és l'adquisició de resistència a l'apoptosis (60). La proteïna AKT és clau en la supervivència cel·lular mediada per factors de creixement. S'activa per fosforil·lació per un mecanisme dependent de la PI3K. Aquesta, s'activa per l'acció de varis estímuls com els factors de creixement i la unió a substrat. L'AKT promou la supervivència cel·lular i bloqueja l'apoptosi. Regula directament la maquinària apoptòtica a varis nivells que inclouen els membres de la família del Bcl-2, les caspases i la integritat de la mitocondria. L'activació constitutiva de la via PI3K/AKT és un dels principals mecanismes d'adquisició de resistència a l'apoptosi en tumors humans.

3.2.3. Canvis en la morfologia cel·lular

L'activació constitutiva de **PI3K** està relacionada (82) amb l'augment de volum cel·lular i formació de filopòdia i lamelipòdia. La filopòdia és l'adquisició de diversos apèndix estrets i la lamelipòdia l'adquisició d'una sol apèndix més gran tots dos relacionats amb el moviment cel·lular;. Aquest canvis, quan estan provocats per Ras, (83) estan associats a canvis en els nivells de cdc42, Rac i Rho (84-87).

3.2.4. Pertorbació dels contactes cèl·lula-cèl·lula

L'efector **AF6** sembla relacionat amb la pertorbació dels contactes cèl·lula-cèl·lula produïda per la transformació per Ras (88).

Contactes cèl·lula a cèl·lula.

En condicions normals, les cèl·lules epitelials estan fortament interconnectades a través de diferents estructures d'unió. Actualment s'accepta que la formació i preservació adequada de les unions intercel·lulars es imprescindible per al manteniment de la diferenciació de les cèl·lules epitelials i que la seva desestabilització facilita la desdiferenciació i la adquisició de capacitat invasiva (89).

La ***E-cadherina***, que es troba en la unions adherents de les cèl·lules epitelials, és essencial per el manteniment de les unions cèl·lula a cèl·lula. Es tracta d'una glicoproteïna transmembrana d'adhesió que estableix unions amb molècules de E-cadherina de cèl·lules veïnes (90,91). Per tal de que la E-cadherina estableixi unions cèl·lula a cèl·lula fermes ha de formar un complex, a través del seu domini citoplasmàtic, amb la α o β -catenina. Aquestes la connectaran amb els microfilaments d'actina via la β -catenina (90). La disrupció dels complexos E-cadherina-catenina causen la pèrdua d'adhesió cel·lular.

3.2.5. Augment de la capacitat de créixer en suspensió

Les cèl·lules transformades per Ras poden sobreviure en absència d'adhesió a substrat. Ras, inhibeix l'anoikis provocada per l'absència d'adhesió. FAK és una peça clau en aquesta senyal aberrant de supervivència a través de via **PI3K/AKT** (92-94).

Contactes cèl·lula-matriu extracel·lular

Les cèl·lules no transformades necessiten la unió a la matriu extracel·lular, en condicions fisiològiques normals, per poder sobreviure. La pèrdua de contacte de la cèl·lula amb la matriu extracel·lular pot desencadenar mort cel·lular per apoptosi, que quan es produeix per la pèrdua d'adhesió s'anomena *anoikis*.

La majoria de cèl·lules transformades poden sobreviure en absència d'adhesió a substrat, això els confereix un fenotip més agressiu, perquè adquireixen la capacitat de poder circular pel vasos sanguinis, crucial en el proses metastàsic.

L'expressió constitutiva de FAK, permet evadir aquesta dependència al substrat, tot donant capacitat de creixement en suspensió a les cèl·lules a través d'un senyal de supervivència (95,96).

Senyal de supervivència de FAK

Les unions focals uneixen la matriu extracel·lular amb el citoesquelet de filaments d'actina a través d'unes proteïnes situades a la membrana cel·lular, les integrines. Una de les proteïnes associades a les integrines és la FAK (Focal adhesion Kinase), una tirosina quinasa que regula les adhesions focals. La unió de les integrines a proteïnes de la matriu extracel·lular provoca l'activació de FAK per fosforilació en tirosina (97), i la consegüent activació de vies mitogèniques de les MAPK a través de ras, de les JNK quinases i de vies de supervivència i prevenció de l'apoptosi (98). En aquest sentit, s'ha descrit que FAK és un dels principals reguladors upstream de la via PI-3K/AKT. La unió de les cèl·lules a la matriu extracel·lular indueix l'associació de la subunitat p85 de la PI3K a la FAK, activant l'AKT (92), i per tant el seu senyal de supervivència cel·lular.

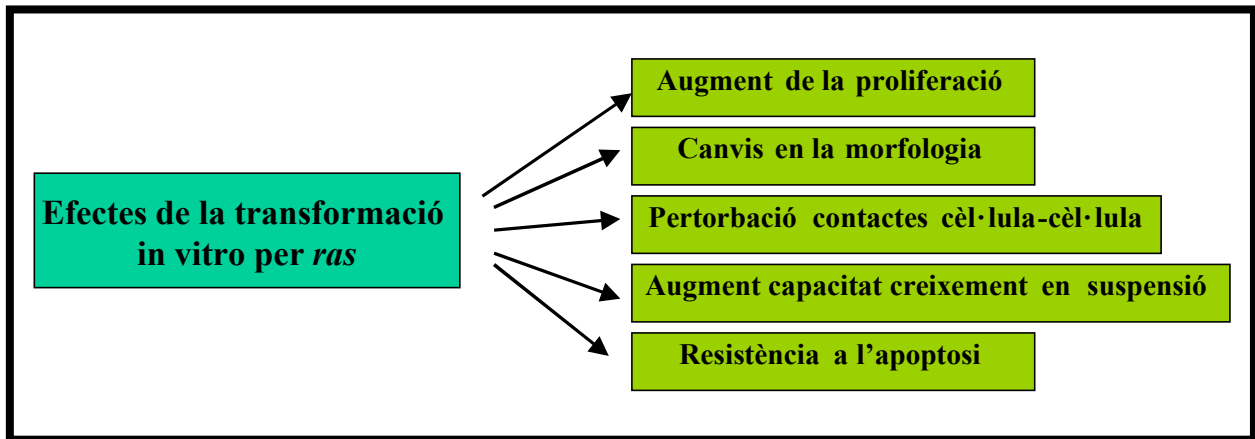


Fig 7. Efectes de la transformació in vitro per *ras*

Encara manca el coneixement de com influeix l'activació dels altres possibles efectors en la transformació per Ras i a través de quines dianes.

3.3. Estudi de la tumorigènesi in vivo

Usualment, per fer estudis de capacitat tumorigènica de cèl·lules transformades s'utilitzen animals immunodeficients com els ratolins atímics (99). Els ratolins atímics o immunodeprimits (Swiss/Nu/Nu) presenten una mutació autosòmica recessiva amb efectes pleotròpics entre els que destaca la immunodepressió (100). Presenten una falta de resposta immune secundària mitjançant anticossos, que fa que puguin acceptar cèl·lules tumorals heteròlogues en alguns casos.

El mètode més utilitzat per avaluar la capacitat tumorigènica de cèl·lules és la injecció subcutània. Aquesta consisteix en injectar les cèl·lules tumorals en l'espai que hi ha entre la pell i el dors muscular de l'animal. Permet estudiar la capacitat de formar tumors sòlids i seguir la seva cinètica, però no la capacitat metastàsica, perquè en creixement subcutani aquest procés està inhibit (101-104).

A l'hora d'extrapolar resultats s'ha de tenir en compte que aquest és un model animal i a més, ectòpic: el tumor creix en un entorn que no és el del seu òrgan d'origen natural. En el model d'implantació ortotòpica es disposen les cèl·lules en l'òrgan del que deriva el tumor però presenta més complexitat tècnica i s'utilitza molt menys per estudis de tumorigènesi.

3.4. Capacitat tumorogènica de *ras*

La transfecció de fibroblast amb el gens *K-ras* (105), *N-ras* (106) i *H-ras* (107) mutats i la seva posterior injecció subcutània produeix tumorogènesi en ratolins atímics. La tumorogènesi provocada per la sobreexpressió del proto-oncogen *ras* no ha sigut gaire estudiada en ratolins atímics. Però en alguns treballs s'ha vist que la sobreexpressió del gen *ras* wild type també produeix tumorogènesi però amb un grau de malignitat més baix que l'oncogen (108). Injectant les cèl·lules transformades per *ras* en la vena de la cua, s'indueixen tumors amb un patró de metàstasi al pulmó (108-110).

3.5. Activació de *ras* en tumors humans

L'activació de les diferents formes de *ras* en tumors humans succeeix a través de mutacions puntuals en els codons 12, 13 o 61 que porten a un canvi d'aminoàcid en una regió crítica de la proteïna (llaç P i llaç L4) que fa que la proteïna quedi constitutivament activa (111,112). Aquest canvi altera la funció reguladora de la proteïna i predisposa a la cèl·lula a un creixement descontrolat.

Tenen una gran importància en patologia humana ja que la mutació en el gen *ras* és l'alteració més freqüent trobada en oncogens (gens que al mutar originen proteïnes amb funció alterada que estimulen el creixement o la invasivitat cel·lular). Aproximadament el 30% dels tumors humans contenen al·lels mutants de *ras*. La prevalència de les mutacions i el gen *ras* activat varia molt segons el tipus de tumor analitzat (113) (Taula 1).

Les mutacions en el gen *K-ras* són les més importants clínicament. Hi ha una alta freqüència d'alteracions a tumors del pàncreas exocrí i de via biliar. Aquesta incidència també és important a tumors de colon i seminomes. El gen *N-ras* es troba mutat en leucèmies agudes i el gen *H-ras* en carcinoma de bufeta (113) (Taula 1). També s'ha trobat sobreexpressió de la proteïna Ras wild type en diferents tumors humans (114-116) però aquest ha estat un tema molt menys estudiat.

Tipus tumoral	Gen <i>ras</i> activat	Incidència (%)
Adenocarcinoma pancreàtic	K-<i>ras</i>	90%
Colangiocarcinoma	K-<i>ras</i>	90%
Carcinoma tiroïdal	H-,N-,K-<i>ras</i>	60%
Carcinoma colorectal	K-<i>ras</i>	40%
Seminoma	N-,K-<i>ras</i>	40%
Carcinoma endometrial	K-<i>ras</i>	40%
Adenocarcinoma pulmonar	K-<i>ras</i>	30%
Queratoacantoma de pell	H-<i>ras</i>	30%
Síndrome mielodisplàsic	N-<i>ras</i>	25%
Leucèmia mieloide aguda	N-<i>ras</i>	25%
Leucèmia limfoide aguda	N-<i>ras</i>	20%
Melanoma	N-<i>ras</i>	15%
Carcinoma de bufeta	H-<i>ras</i>	10%

Taula 1. Freqüència d'activació dels gens *ras* en diferents tipus de tumors; adaptat de Rodhenius S. Cancer biology 1992;3:241-247.

4. ASPECTES DIFERENCIALS SEGONS EL CODÓ MUTAT EN ELS GENS *RAS* O LA SOBREXPRESSIÓ DE LA PROTEÏNA NORMAL

Molts estudis de la transformació oncogènica de *ras* tracten de manera equiparable les diferents mutacions puntuals (siguin localitzades al codó 12, 13, 59 o 61), atribuint-les, de fet, propietats similars (117,118). També es comparen les alteracions en els gens H-, N- o K-*ras* de forma indistinta. Però hi ha moltes línies d'evidència que suggereixen que el potencial maligne de les cèl·lules tumorals pot estar

influenciat no només per la presència o absència de mutacions a *ras*, sinó també per la naturalesa molecular d'aquestes i el gen en el qual estan.

4.1. Diferències fenotípiques associades a mutacions en un codó específic de *ras* o a la sobreexpressió de la proteïna normal

4.1.1. *Les mutacions al codó 12 del gen ras són més transformants que al codó 13 en sistemes in vitro*

Les mutacions puntuals al codó 12 dels gens *ras* són més transformants que al codó 13 en experiments de transfecció en fibroblast de ratolí. La capacitat transformant *in vitro* es determina per la diferent capacitat de formació de focus que tenen els oncogens. La transformació de cèl·lules NIH3T3 amb el gen H-*ras* (119), K-*ras* (120) o N-*ras* (121) mutats al codó 12 confereix a les cèl·lules un fenotip més transformant que els corresponents mutats al codó 13 (Taula 2).

En el cas d'H-*ras*, els estudis es van realitzar per mutagènesi del gen H-*ras* humà, amb la seva posterior transfecció. Es va observar que la capacitat d'induir focus del gen mutat al codó 13 era fins a cinc cops més baixa que la mutació al codó 12 (119). Pels estudis de K-*ras*, es van transformar les cèl·lules amb DNA de ratolí atímic amb mutació al codó 12 o 13 i es va observar un augment de la formació de focus quan el gen es trobava mutat al codó 12 (120). Per últim, per N-*ras*, es va realitzar la transfecció de DNA de tumors de leucèmia aguda mieloide amb mutació al codó 13 i van veure que tenien molt poca capacitat de formar focus, en comparació a la mutació al codó 12 (121). Així podem veure, que els estudis més exhaustius respecte la diferent capacitat transformant dels gens *ras* segons la posició del codó mutat, s'han realitzat més extensament amb el gen H-*ras*, probablement per la més gran disponibilitat del plàsmid del gen H-*ras* en el moment (finals anys 80) en que es van realitzar la majoria d'aquests experiments. El gen K-*ras*, va ser un dels que va costar més de clonar degut a que és el gen *ras* més gran.

4.1.2. Les mutacions al codó 12 del gen *ras* estan associades amb increment de l'agressivitat tumoral en carcinomes humans

La mutació al codó 12 és més prevalent en estadis avançats de la malaltia i està associada amb fenotips tumorals més agressius, mentre la mutació al codó 13 és més prevalent en lesions benignes o preneoplàsiques (122-127). L'agressivitat tumoral, referida a invasivitat local i capacitat metastàsica, també està relacionada amb la posició del codó afectat de *ras* en tumors humans (128) (Taula 2).

En l'adenoma colorectal coexisteixen múltiples clons neoplàsics diferents genèticament, portant mutacions tant al codó 12 com 13. Els carcinomes, que acostumen a ser genèticament més homogenis en el que es refereix a les mutacions en *K-ras*, presenten una prevalença més elevada de la mutació al codó 12. És possible especular que la capacitat transformant més elevada d'aquesta mutació porta a l'exitosa expansió i selecció dels clons que la contenen (127).

L'agressivitat més elevada de la mutació de *K-ras* al codó 12 s'ha estudiat bàsicament en carcinomes. Però, l'agressivitat relativa de les mutacions al codó 12 i 13 és més difícil de determinar en tumors derivats de mesènquima, perquè en aquest tumors les mutacions al codó 12 rarament ocorren. La presència de mutacions al codó 13 en tumors mesenquimals agressius (129,130), suggereix que la capacitat transformant de *ras* varia segons el tipus cel·lular en el que ocorre. Així, les observacions clíniques suggereixen que la mutació al codó 12 de *K-ras* indueix un fenotip tumoral més agressiu que les mutacions al codó 13 (Taula 2).

	Fenotips	Referències
In vitro	Increment de la formació de focus	119-121
Clínica	Augment del grau de malignitat Augment de la invasivitat local	122-128

Taula 2. La mutació al codó 12 de *ras* presenta un fenotip més transformant en sistemes in vitro i carcinomes humans que la mutació al codó 13

4.1.3. Relació entre la transformació i el nivell d'expressió de Ras

L'augment d'expressió de la proteïna Ras activada o wild type, augmenta la seva capacitat transformant *in vitro*, conferint a la cèl·lula un fenotip més agressiu. Així, és important tenir en compte el nivell d'expressió de la proteïna Ras per estudiar la seva transformació. Les mutacions poc transformants de *ras*, requereixen més expressió de la proteïna per aconseguir uns nivells de transformació similar al de les formes altament transformants. En el cas de l'oncogen H-*ras*, que és el més estudiat, existeix un llindar d'expressió per sobre del qual qualsevol mutació o el mateix wt pot transformar les cèl·lules NIH3T3 (131-133). Les formes poc transformants (134) només poden produir un fenotip plenament transformant quan s'aconsegueixen nivells molt elevats d'expressió. Així, en totes aquestes observacions, les mutacions al codó 12 del gen *ras* presenten fenotips més transformants *in vitro* i en la clínica que les mutacions al codó 13, o que la sobreexpressió del proto-oncogen.

4.2. Diferències estructurals i funcionals induïdes per les mutacions activants de *ras*

Les mutacions que activen els gens *ras*, no afecten les modificacions posttranslacionals, ni canvien la seva localització subcel·lular i la proteïna continua ancorada a la membrana (135). Per contra, es produeixen diferències estructurals en el domini efector entre les formes oncogèniques i la salvatge. Les proteïnes salvatges Ras respecte els mutants presenten diferències significatives al llaç L4 (Switch II) i en la proximitat de la unió a γ -fosfat (136) (Figura 8). Afinant més es veuen diferències substancials en regions concretes que estan incloses al Switch I i Switch II, i es troben a llaços exposats, alguns dels quals estan involucrats en la funció de la proteïna Ras (137-141) (Figura 8).

S'ha vist que espontàniament la forma salvatge de Ras podria adoptar la conformació de la forma activada però, en ser inestable, es veu en baixa proporció. Aquesta conformació, però, explicaria perquè la sobreexpressió de la proteïna salvatge donaria transformació (141).

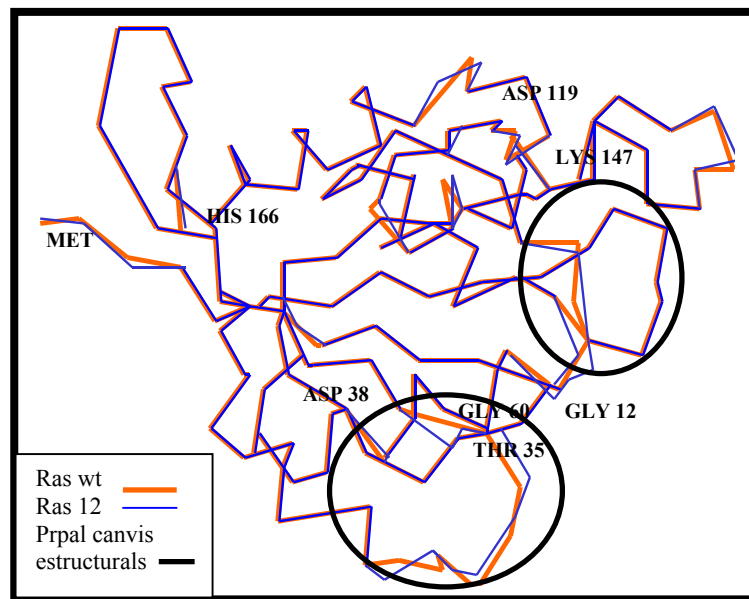


Figura 8. Comparació de l'estructura de la proteïna Ras wt i Ras mutada al codó 12 (Ras 12); figura adaptada de Monaco R. et al, J Protein Chem 1995; 14(6):457-466.

Els canvis estructurals que afecten les diferents oncoproteïnes de Ras alteren l'afinitat d'interacció de Ras amb els seus moduladors positius i negatius. Els mutants de Ras deguts als canvis que presenten, violen els requeriments estèrics o electrònics que calen per aconseguir la interacció amb GAP, per tant es tornen insensibles a GAP (142-144). GAP, accelera varis ordres de magnitud la baixa activitat GTPàsica intrínseca (145) de Ras. Els mutants insensibles a la seva acció no hidrolitzen GTP i la proteïna queda constitutivament activa. A més GAP, també s'ha descrit com un possible efector de Ras (52,53). Per raons similars les proteïnes oncogèniques de Ras són també insensibles a altres GAP específiques com la neurofibromina (NF1) (146,147). Les alteracions estructurals de les oncoproteïnes Ras també produeixen canvis en la interacció amb els seus activadors, els factors intercanviadors de nucleòtids de guanina, com Sos i Ras-GRF (148-151).

Malgrat això, els diferents efectes fisiològics observats entre els diferents mutants de Ras, no es poden explicar només amb la insensibilitat als seus reguladors positius o negatius. L'estudi de quines vies downstream de Ras s'activen diferencialment segons el codó mutat portarà a una millor comprensió del diferents fenotips tumorals que presenten. I així, el coneixement del codó alterat podrà millorar l'estadiatge i la teràpia dels tumors humans amb mutació en *ras*.

*En aquest estudi hem emprat fibroblasts de ratolí per estudiar diferències de transducció de senyal i regulació del cicle i de l'apoptosi per diferents mutacions en *K-ras*. A continuació introduïm les característiques histològiques, patològiques i moleculars dels sarcomes de teixits tous que tenen rellevància clínica ja que la transformació de fibroblast per *ras* indueix aquest tipus tumoral en el nostre model in vivo.*

5. SARCOMES DE TEIXITS TOUS (STS)

Els sarcomes de teixits tous engloben un grup molt heterogeni de neoplàsies que deriven del teixit connectiu o muscular (teixits no epitelials extraesquelètics). Són tumors poc freqüents, representant un 2% dels tumors humans i que presenten una gran heterogeneïtat. La supervivència als cinc anys en els no viscerals és d'un 60% (152). Les mutacions en el gen *K-ras* juguen un paper en el desenvolupament dels sarcomes.

5.1. Tipus histològics

Segons la histologia; hi ha descrites més de 100 entitats diferents (153). Entre els subtipus histològics de sarcomes de teixits tous més comuns es troben el fibrosarcoma i l'histiocitoma fibrós maligne.

5.1.1. Fibrosarcoma

És un tumor invasiu i maligne, molt comú en nens. Presenta una histologia de cèl·lules fusiformes amb patró de creixement uniforme, marcada atípia cel·lular, col·lagen abundant i pseudocàpsules distingibles (153). Presenta la característica de ser un tumor desdiferenciat (154) (Figura 9).

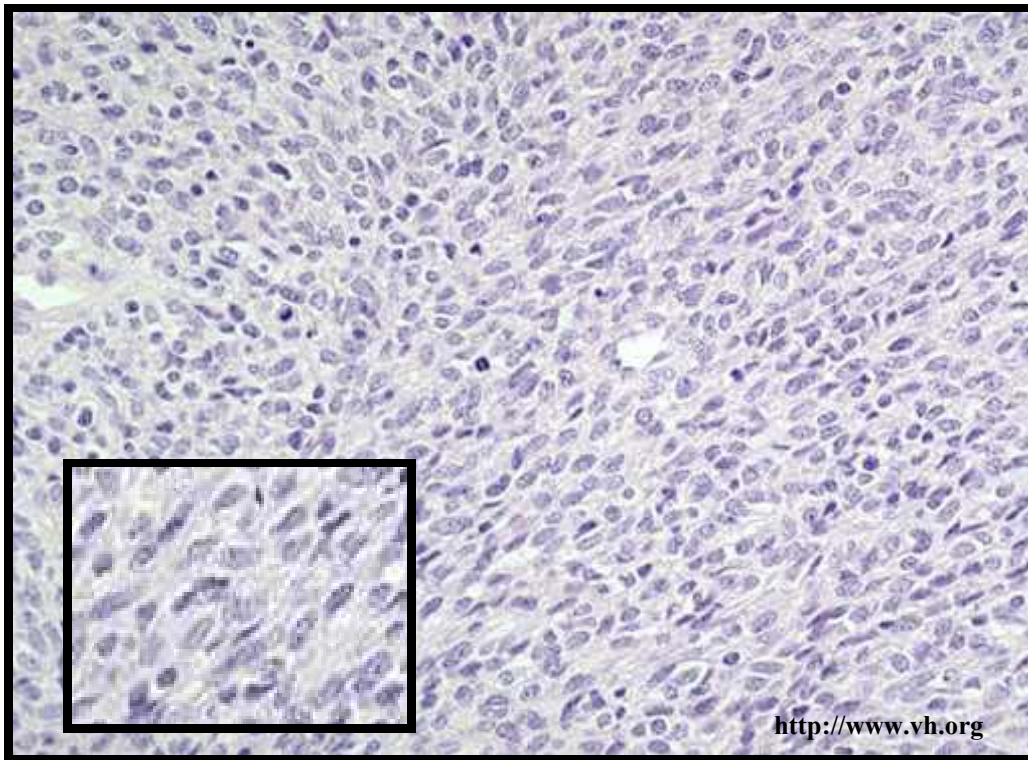


Figura 9. Histopatologia del fibrosarcoma humà

5.1.2. *Histiocitoma fibrós maligne (MFH).*

És el sarcoma de teixit tou més comú en adults, és molt heterogeni en morfologia i pronòstic. Són sarcomes de cèl·lules fusiformes però presenten molt pleomorfisme. El llinatge d'aquestes cèl·lules neoplàsiques s'ha discutit durant molts anys, en un principi es pensava que derivaven d'histiòcits. Darrerament hi ha evidències que en realitat són fibroblasts.

Generalment, les cèl·lules estan reordenades en forma *estoriforme* o patró "d'eixos radials" distribuïnt-se en radis curvats des d'un punt central. Les mitosi són molt nombroses i també les zones amb necrosi (155-157) (Figura 10).

El MFH humà inclou tota una sèrie de tumors que després de meticulosos estudis es poden classificar en tipus específics, per la diferent expressió de marcadors de diferenciació (158).

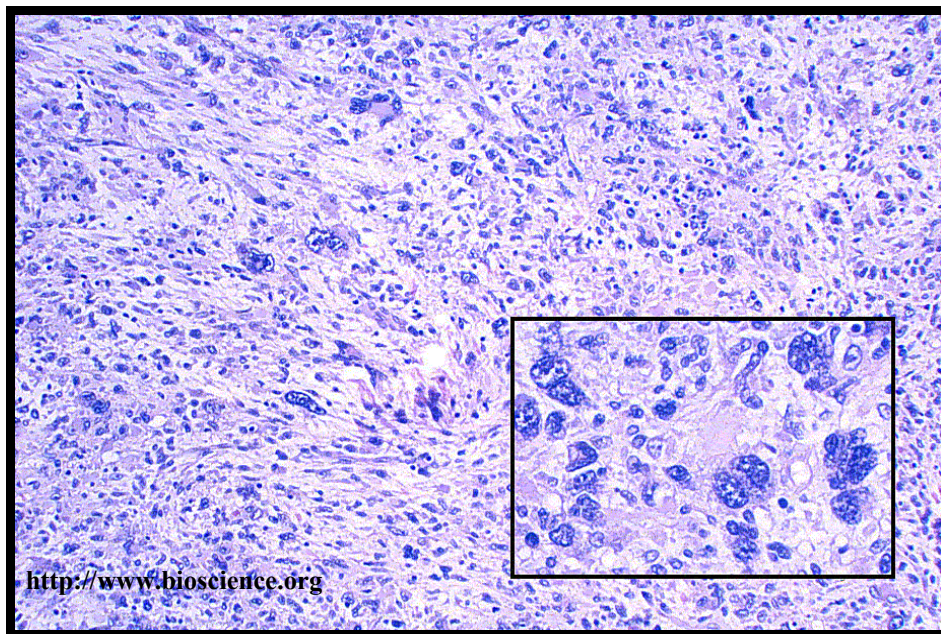


Figura 10. Histopatologia de l'histiocitoma fibrós maligne

5.2. Grau de malignitat

5.2.1. Implicacions clíniques

Els diferents sarcomes classificats segons la histologia es poden presentar com d'alt o de baix grau. Globalment els sarcomes d'alt grau són més freqüents que els de baix grau. El grau de malignitat ajuda a distingir als pacients amb pitjor pronòstic; de fet, tipus histològics diferents amb el mateix grau de malignitat tenen similar comportament clínic. Així el tipus histològic és menys útil pels clínics que el grau d'un sarcoma determinat i és el grau el que ajuda a seleccionar el tractament. Es fa servir un sistema de classificació de tres graus, els sarcomes de baix grau són els de **grau 1**, mentre els tumors de **grau 2** són de grau intermedi i els de **grau 3** són d'alt grau. Els de grau 3 tenen més risc de recidiva distant que els de grau 2 i aquests que els de grau 1 (159). El 80% dels pacients amb sarcomes d'alt grau presenten metàstasi pulmonar.

5.2.2. Criteris patològics per determinar el grau

Actualment s'utilitza més d'un sistema per determinar el grau d'un tumor. Els més importants són l'americà de Costa et al (160) i l'europeu de Trojani et al (161). Els dos distingeixen tres graus de malignitat. El primer basa la classificació en la histologia i el grau de necrosi, el segon en el **grau de necrosi**, el **grau de diferenciació morfològica** i l'**índex mitòtic**.

5.2.3. Reproductibilitat del diagnòstic

El diagnòstic dels sarcomes de teixits tous és difícil degut a la gran varietat de tipus histològics que presenten i a la seva baixa incidència que dificulta l'adquisició d'experiència específica. En el 5-20% dels casos una segona opinió patològica canvia el diagnòstic de sarcoma a no sarcoma (162). La reproductibilitat respecte el tipus histològic diagnosticat concret segons el patòleg que l'estudia és d'un 45-60%. I la reproductibilitat respecte el grau de malignitat és d'un 75% (163). En aquesta situació, l'ús d'alta tecnologia pot ser de gran utilitat. La citogenètica i la microscopia electrònica poden permetre especificar el tipus histològic en alguns casos, tot ajudant al seu diagnòstic diferencial. Més recentment, utilitzant la tècnica de microarrays d'expressió, s'han identificat grups de gens que definirien a nivell molecular un determinat tipus de sarcoma i això facilitarà la seva classificació (164). Seran necessaris més estudis per confirmar aquestes expectatives.

5.3. Factors de pronòstic

El principal factor de pronòstic en els sarcomes de teixits tous és el grau de malignitat però també s'utilitzen com a factor pronòstic el diàmetre del tumor, el grau d'invasió local de la lesió, la localització del tumor i la presència de metàstasi.

S'han utilitzat també diferents marcadors moleculars com a factor de pronòstic. La sobreexpressió de **Ki-67**, **p53** i **c-myc**, s'ha relacionat amb alt grau tumoral, increment de potencial metastàtic, mal pronòstic clínic i reduïda supervivència del pacient en sarcomes humans de teixits tous (STS) (165-170) però la utilitat clínica d'aquests marcadors no ha estat validada.

5.4. Biologia molecular dels sarcomes humans

L'anàlisi molecular dels sarcomes, s'ha trobat amb molts obstacles degut a la baixa incidència i al gran nombre d'entitats que els componen. Es troben limitacions i discrepàncies en els resultats moleculars degut a que habitualment s'han analitzat diferents tipus de sarcomes de manera conjunta, el que porta a una gran variabilitat de resultats.

5.4.1. Alteracions cromosòmiques

S'han identificat translocacions cromosòmiques específiques segons el tipus histològic del sarcoma que també serveixen pel seu diagnòstic diferencial (171,172).

Per exemple, entre d'altres, la translocació t(11-22)(q24;q12) en sarcomes de Ewing o la translocació t (X;18) (p11;q11) en sarcomes sinovials (153).

5.4.2. Anàlisi molecular dels oncogens

Mutacions puntuals en *ras*

Les mutacions en *ras* juguen un paper en el desenvolupament dels sarcomes. Les mutacions en *K-ras* s'han referenciat amb freqüència variable en aquest tipus de tumors, i s'ha descrit una associació entre tipus específics de sarcomes i mutacions al codó 13 (129,130) i al codó 12 (173,174) de *K-ras*. El 80% dels casos d'angiosarcoma de fetge estudiats per DeVivo I et al (129), presentaven mutació al codó 13 i el 44% dels sarcomes estudiats per Yoo J et al (130), el 90% dels quals havien sigut classificats com MFH també presentaven aquesta mutació. En canvi, en els leiomiomes (fibrosarcomes) quan s'ha trobat *K-ras* mutat, només s'ha trobat mutat al codó 12 (173). En el 14% dels leiomiomes estudiats per Hill MA et al (174) s'ha trobat mutació a *K-ras* al codó 12, no s'ha trobat una alta incidència de mutació, però els pacients que presentaven mutació a *K-ras* al codó 12 presenten menys supervivència que els que no tenien aquesta mutació (174). Malgrat això, cap estudi s'ha dirigit a estudiar la relació entre la posició del codó mutat a *ras* i l'agressivitat del sarcoma.

Amplificacions

En alguns sarcomes es troben amplificats els oncogens c-myc (175) i MDM2 (176-181), també es troben sobreexpressats receptors de factors de creixement com EGF-R, IGF-1R (182,183) i factors de creixement com TGF α , PDGF-B, IGF-1, IGF-2 (182-184).

5.4.3. Anàlisi molecular dels gens supressors de tumors

S'observa pèrdua d'heterozigositat, deleció, mutació puntual o sobreexpressió de p53 (185-191) i pèrdua d'heterozigositat, deleció, mutació puntual o disminució de l'expressió de pRB (185,192-198).

L'escassa freqüència i la gran heterogeneïtat que presenten els sarcomes de teixits tous dificulten l'obtenció de dades que permetin conèixer millor les seves característiques biològiques i el seu tractament clínic. Actualment l'impacte de la quimioteràpia en sarcomes de teixits tous avançats és molt limitat. Per això, s'han de valorar una sèrie de factors relacionats amb el pacient i el comportament biològic del tumor abans de decidir el tractament més adequat per un pacient concret. Qualsevol model que millori el seu coneixement a nivell molecular, portarà a una millora substancial des de el punt de vista terapèutic.

OBJECTIUS

OBJECTIU GENERAL

Trobar una explicació molecular al diferent comportament clínic prèviament descrit pels tumors humans segons el tipus de mutació activant al gen *K-ras*.

Hem emprat el model de transformació de fibroblasts de ratolí immortalitzats (NIH3T3) per estudiar el fenotip tumoral induït pel gen *K-ras* amb mutació al codó 12 o al codó 13 o pel gen wild type (normal) sobreexpressat tant en cèl·lules en cultiu, model *in vitro*, com en ratolins atòmics, model *in vivo*. S'ha triat el gen *K-ras* perquè és el més important clínicament. El coneixement d'aquestes diferències moleculars podria ajudar a definir millor el pronòstic i a determinar el tractament segons la mutació en *K-ras* que presenti el pacient.

Aquest objectiu general s'ha desglossat en els següents objectius concrets:

OBJECTIUS CONCRETS

- 1) Estudi *in vitro* i *in vivo* de les diferències en fenotip transformant i tumoral, induïdes pel gen *K-ras* segons la posició del codó mutat (12 o 13) o la sobreexpressió de la proteïna normal.**

Per estudiar les diferències en el fenotip transformant *in vitro* s'han estudiat diferents característiques; com ara: la morfologia cel·lular, la velocitat de creixement, la dependència a factors de creixement, la inhibició del creixement per contacte i la capacitat de creixement independent d'ancoratge.

Per estudiar les diferències en el fenotip tumoral *in vivo* s'ha estudiat l'habilitat de formar tumors en animals experimentals i s'han observat aquells paràmetres que influeixen en el grau de malignitat d'un tumor: temps de latència, histologia,

proliferació, índex mitòtic i índex apoptòtic. Aquest últim és particularment interessant d'examinar perquè la implicació de l'apoptosi en el fenotip tumoral per Ras no ha sigut gaire estudiada.

2) Estudi *in vitro* i *in vivo* de les diferències induïdes a nivell de les vies de transducció de senyal associades a K-*ras*, segons la posició del codó mutat (12 o 13) o la sobreexpressió de la proteïna normal.

Hem centrat l'estudi molecular a dos nivells:

Avaluació de la implicació de la **diferent activació de vies de inhibició i inducció d'apoptosi** en el diferent fenotip transformant de Ras. Apart de la via antiapoptòtica de PI3K/AKT hem estudiat altres molècules relacionades amb la inducció (Bax, Rho A) o la inhibició de l'apoptosi: FAK, Stat-3, NFκ-B per veure si la seva activació o expressió estan afectades.

Avaluació de les **vies de transmissió de senyal dels principals efectors** de Ras (Raf, PI3K, MEKK), per veure si es produeix activació diferencial d'aquestes vies segons el codó mutat. També hem estudiat d'altres de les que encara no es sap la connexió amb Ras però que estan implicades en l'adquisició d'algunes de les propietats de la transformació maligna (FAK, E-cadherina, β-catenina, GAPDH).

3) Desenvolupament de models animals de sarcomes humans.

Hem estudiat si els diferents transfectants podrien ser utilitzats com a models de sarcomes humans ja que tenen el mateix origen mesenquimàtic i les mutacions en K-*ras* juguen un paper en el desenvolupament dels sarcomes.

Aquests models podria facilitar l'estudi molecular dels sarcomes. L'escassa incidència i gran heterogeneïtat d'aquest tipus de tumor dificulten l'obtenció de dades que permetin conèixer millor les seves característiques biològiques i, per tant, millorar el seu diagnòstic i tractament.

RESULTATS

ESTUDI DEL FENOTIP TRANSFORMANT IN VITRO

Es confirma que en un sistema in vitro la mutació al codó 12 del gen *K-ras* té més capacitat transformant que la mutació al codó 13 o la sobreexpressió del gen normal (Guerrero S et al, 2000). Els tres tipus de transfectants presenten algunes alteracions funcionals i moleculars comuns mentre que d'altres són clarament diferents. Aquesta diferència es basa en la diferent capacitat d'inducció de les vies relacionades amb l'apoptosi entre les distintes mutacions.

Canvis funcionals i moleculars comuns

1) *Alteracions de la morfologia cel·lular.* Tots els transfectants presenten un augment en la formació de filopòdia i lamelopòdia i s'observa un important percentatge de cèl·lules gegants i polinucleades quan creixen adherits a substrat.

2) *Augment de la velocitat de creixement.* Els transfectants presenten idèntica reducció en el temps de duplicació respecte les cèl·lules control que fa que proliferin més ràpid. Això es correspon amb un mateix nivell d'activació de les ERKs, més elevat que en les cèl·lules control. A la vegada, presenten igual augment de l'expressió de la proteïna metabòlica GAPDH. Aquest resultat suggereix un augment simimlar de l'activitat metabòlica entre els transfectants.

3) *Disminució de la dependència a factors de creixement.* Tots els transfectants de *K-ras* tenen la capacitat de créixer en un medi al 0.5% de sèrum.

Canvis funcionals i moleculars diferents entre els transfectants segons la posició del codó mutat (12 o 13) o la proteïna normal sobreexpressada

1) *Diferències en la capacitat de creixement independent d'ancoratge.* Els transfectants K12 presenten espontàniament capacitat de creixement en suspensió. Es desfà espontàniament la unió al substrat d'agregats multicel·lulars que passen a créixer en suspensió formant esferoïds, patint els típics canvis morfològics associats al creixement en suspensió. En canvi en els transfectants K13 o Kwt-oe, no s'observa aquest tipus de creixement de forma espontània. En canvi, quan es força el creixement independent d'ancoratge, recobrint la placa amb polihema, els transfectants de K13 i Kwt-oe són capaços de créixer sense adhesió. Això està lligat amb un augment més important de l'expressió de FAK en els transfectants K12 que en els K13 o Kwt-oe.

2) *Diferències en inhibició del creixement dependent del contacte cèl·lula-cèl·lula.* Els transfectants presenten diferent capacitat d'inhibició del creixement dependent de la densitat cel·lular. Els transfectants K13 o Kwt-oe mostren una desregulació dels contactes cèl·lula-cèl·lula ja que poden créixer formant colònies denses. Però la desregulació en els de K12 és més important. Les colònies tenen una densitat cel·lular a saturació més elevada i són més grans, fins que arriba un punt que passen a formar els esferoïds. Degut a això, mai s'obté una monocapa de cèl·lules confluents de transfectants K12. Aquests canvis estan relacionats amb un augment de l'expressió d'E-cadherina i β -catenina més important en els transfectants de K12 que en els de K13 o Kwt-oe.

3) *Diferències en activació de vies relacionades amb la regulació de l'apoptosi.* La diferència més important que presenten els transfectants entre ells és la diferent capacitat d'inducció d'apoptosi. Els transfectants de K13 i Kwt-oe presenten una inducció d'apoptosi dependent de l'arribada a confluència, que provoca una mort sincronitzada de totes les cèl·lules. En els transfectants K12 aquesta inducció no s'observa. Aquesta diferència en la inducció de l'apoptosi entre els transfectants està relacionada amb la diferent activació de molècules de vies proapoptòtiques JNK, RhoA i antiapoptòtiques AKT, Bcl-2.

ESTUDI DEL FENOTIP TUMORAL IN VIVO

La injecció subcutània als ratolins atímics dels transfectants K12 i K13 (Guerrero S. et al, 2002), donen lloc a dos sarcomes de teixits tous diferents que difereixen en la histologia, velocitat de creixement, nivells d'apoptosi i mitosi i perfil molecular.

Els transfectants K12 originen tumors amb característiques histològiques similars al fibrosarcoma humà. Presenten baixa taxa apoptòtica, baix nivell mitòtic i la expressió dels marcadors moleculars d'agressivitat per sarcomes de parts toves és elevada en aquest tumor. Aquests marcadors són Ki67, p53 i c-myc, que s'acostumen a associar a agressivitat als sarcomes de teixits tous.

Totes aquestes característiques ens fan pensar que els transfectants de K12 ofereixen un model de sarcoma altament agressiu, similar al fibrosarcoma humà.

Per una altra banda, els transfectants K13 originen tumors amb característiques histològiques similars a l'histiocitoma fibrós maligne humà. Presenten una taxa apoptòtica elevada, un alt nivell mitòtic (associat a una elevada expressió de ciclina B1) i una baixa expressió dels marcadors moleculars d'agressivitat en sarcomes de teixits tous.

Totes aquestes característiques dels tumors originats pels transfectants de K13 ofereixen un model de sarcoma moderadament agressiu, similar a l'histiocitoma fibrós maligne humà.

Els transfectants Kwt-oe són molt poc tumorogènics, només són capaços de generar tumors microscòpics en alguns dels animals, mentre que en la resta no són capaços de mantenir-se i desapareixen.

***K-ras* codon 12 mutation induces higher level of resistance to apoptosis and predisposition to anchorage-independent growth than codon 13 mutation or proto-oncogene overexpression**

Sílvia Guerrero, Isolda Casanova, Lourdes Farré, Adela Mazo, Gabriel Capellà, and Ramon Manges

Cancer Research 2000; 60: 6750–6756.

Codon 12 and codon 13 mutations at the *K-ras* gene induce different soft tissue sarcoma types in nude mice

Sílvia Guerrero, Agnès Figueras, Isolda Casanova, Lourdes Farré, Belen Lloveras, Gabriel Capellà, Manuel Trias, and Ramon Manges

The FASEB Journal express article 2002; 10.1096/fj.02-0050fje (versió on line*); FASEB Journal 2002;16(12):1642-1644 (versió paper*).

*Aquest article ha estat publicat ha través del mètode FJ Express. Quan l'article és acceptat, es publica la versió completa d'aquest on line. Dos mesos més tard apareix un resum de tres pàgines en la versió de paper de la revista Faseb Journal.

DISCUSSIÓ

ESTUDI DEL FENOTIP TRANSFORMANT IN VITRO

En el primer treball teníem com a objectiu l'estudi de les possibles diferències funcionals i en l'activació de les vies downstream de *K-ras* segons el codó mutat o la sobreexpressió de la proteïna wild type, per intentar trobar una explicació al diferent comportament clínic dels tumors segons la mutació activant (122-128), com s'ha introduït prèviament.

Diferències funcionals i moleculars entre els transfectants.

Vam passar a estudiar les diferències a nivell funcional i molecular que es produïen entre els transfectants estables generats. Les diferències són atribuïbles a l'alteració del codó mutat perquè tots els transfectants presenten igual nivell d'expressió de K-Ras. Aquest punt és molt important perquè la capacitat transformant per Ras és dependent de la concentració de proteïna (131-134).

Vam observar bàsicament tres diferències funcionals entre els transfectants. Els transfectants K12 formaven colònies de més alta densitat cel·lular, creixien espontàniament sense adhesió a substrat i tenien més baixa predisposició a entrar en apoptosi que els de K13 o Kwt-oe.

La diferència més important estava en la distinta regulació de l'apoptosi, mentre els de K12 no presenten mort per apoptosi en condicions de creixement en adhesió a substrat, els transfectants de K13 i Kwt-oe, inesperadament, en arribar a confluència es moren per apoptosi. L'activació oncogènica de Ras en si mateixa, mai s'havia relacionat directament amb mort per apoptosi, només s'havia descrit l'activació de vies downstream de Ras en l'apoptosi provocada per determinats estímuls externs (199-203). En el nostre model la reduïda predisposició a l'apoptosi que presenten els transfectants K12 està lligada molecularment amb un nivell d'activació significatiu de l'activació de la via de supervivència cel·lular d'AKT i l'expressió de bcl-2 i una disminució de l'expressió de RhoA respecte els transfectants de K13 o Kwt-oe. A més, els

transfectants de K13 i Kwt-oe presenten un nivell d'activació molt més elevat de JNK1 respecte els de K12. Aquests resultats són consistents amb que la resistència a l'apoptosi mediada per l'activació de Ras s'ha relacionat amb l'activació d'AKT (76-78) i la sobreexpressió de bcl-2 (204,205). També és consistent amb el paper proapoptòtic de la sobreexpressió de RhoA (206,207) i amb l'associació de l'activació de JNK amb la inducció d'apoptosi (48). El fet d'arribar a confluència activaria una via proapoptòtica en els transfectants de K13 i Kwt-oe que no podria compensar la seva activació més baixa de la via de antiapoptòtica de PI3K/AKT.

També es van trobar diferències en els contactes cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula substrat. Aquí també es produeixen diferències en els nivells de regulació d'aquestes vies per Ras. Els transfectants K13 i Kwt-oe presenten augmentada l'expressió de proteïnes de contacte cèl·lula-cèl·lula (E-cadherina, β -catenina) i de proteïnes de contacte cèl·lula-substrat (FAK) però no tant com els transfectants de K12. Aquesta diferència podria ser la responsable de que els transfectants de K12 assoleixin densitats cel·lulars més altes i presentin capacitat espontània de créixer en suspensió i en canvi els transfectants de K13 o Kwt-oe només presenten la capacitat de créixer en suspensió, si forcem la no adhesió al substrat. Els transfectants K12 presenten una expressió més alta d'E-cadherina i β -catenina, associades amb la regulació dels contactes cèl·lula-cèl·lula, que podria ser la base molecular de la formació de colònies més grans i de més alta densitat cel·lular en els transfectants de K12. Aquests resultats són consistents amb el fet que la sobreexpressió d'E-cadherina i β -catenina funcionals, augmenten els contactes cèl·lula-cèl·lula (208). A més, els de K12 també presenten més expressió de la proteïna FAK, que portaria a la desregulació de l'adhesió amb el substrat que portaria a la espontània capacitat de creixement en suspensió. L'expressió constitutiva de FAK dóna capacitat de creixement en suspensió a les cèl·lules a través d'un senyal de supervivència mediat per la via PI3K/AKT (95,96).

A nivell de proliferació tots els transfectants es comporten de manera similar. S'observa igual activació d'ERK1 i ERK2, amb la corresponent reducció en el temps de duplicació (augment de la proliferació) i presenten similars nivells d'expressió de

GAPDH. Això és consistent amb la reducció de la fase G1 (200) i l'augment d'expressió de la proteïna depenent de la proliferació GAPDH (201) en la transformació mediada per Ras.

En resum, a partir de les nostres observacions podem inferir que el fenotip transformant més agressiu que confereixen les mutacions a *K-ras* al codó 12 en el nostre model és degut a que està augmentat el llindar d'inducció d'apoptosi, no als canvis que es produeixen en proliferació o morfologia. En canvi, les mutacions al codó 13 o la proteïna normal sobreexpressada conferirien una reducció d'aquest llindar d'inducció d'apoptosi.

La base estructural responsable de les diferències funcionals: una hipòtesi

Tots els canvis moleculars que hem trobat associats als canvis funcionals de les diferents mutacions en el gen *K-ras*, són quantitius no qualitius. Això és consistent amb el fet que la mutació al codó 12 o 13 provoca un canvi en la seqüència d'aminoàcids en la regió d'unió del nucleòtid de guanina (211), que provoca que la proteïna es torni insensible a la regulació per GAP (142-144), sense que l'estructura global de la proteïna quedi alterada (136). Així, els diferents efectes observats entre els diferents mutants de Ras, no es poden atribuir a una diferent sensibilitat als seus reguladors positius o negatius.

Però si que s'han trobat petites diferències estructurals en regions concretes situades dintre del Switch I i el Switch II (136, 138-141) entre els diferents mutants de *ras*, que podrien ser consistents amb les diferències quantitatives que observem. La regió **Switch I** que inclou els residus 30 a 38 i la regió **Switch II** que comprèn els residus 60 a 76 (27), formen part del *domini efector* de Ras, que comprèn els aminoàcids amb els que interaccionen els diferents efectors de la proteïna Ras (26).

En el nostre model, la interacció amb l'efector Raf o altres efectors que activen la via de MAPK i de Bax no estaria afectada per la naturalesa molecular de la mutació de *ras* el que és consistent amb la manca de canvis significatius en l'afinitat de Ras per Raf comparant els diferents mutants de Ras (212,213).

Per contra, els mutants 12 de *ras* presentarien un patró d'interacció específic amb els seus efectors PI3K, MEKK, Ras-GAP, o altres efectors no tan coneguts que directe o indirectament produiria un augment de l'activació de les vies d'AKT i bcl-2 i disminuiria la via de RhoA. Aquest patró d'interacció seria diferent dels mutants 13 de *ras* o de la sobreexpressió de la proteïna wild type que activaria la via JNK1.

Es sap que Raf (214,215) o RalGDS (215) interaccionen amb determinades regions del Switch I, mentre PI3Kgamma (216) amb determinades regions del Switch I i II. Així en el nostre model, la naturalesa molecular del codó mutat no provocaria canvis conformacionals diferents en les regions del Switch I amb les que interacciona Raf però sí provocarien canvis conformacionals diferents entre ells, en les regions del Switch I o del Switch II amb les que interacciona PI3K.

Aquests diferents canvis conformacionals en les regions d'interacció amb PI3K, podrien provocar impediments estèrics a la proteïna amb mutació al codó 13 que fessin que la interacció amb el seu efector PI3K fos més feble, consistent amb l'activació més baixa observada d'aquesta via. En canvi, en la proteïna mutada al codó 12 no es produiria aquest canvi conformacional i podria interaccionar amb gran afinitat amb PI3K, el que seria consistent amb la major activació d'aquesta via observada en aquest transfectants (Figura 11).

Segons els nostres resultats, la naturalesa molecular de la mutació en Ras afectarà la interacció amb determinats efectors però no amb d'altres. Això, explicaria les diferències que trobem entre els transfectants a determinades vies downstream de Ras (PI3K, FAK) però no a d'altres (Raf) (Figura 12).

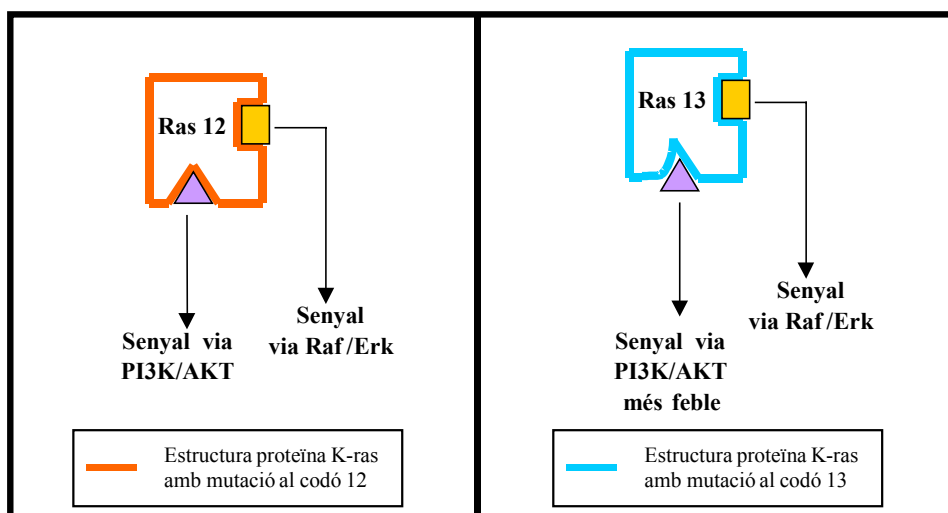


Fig 11. Model dels canvis estructurals entre la proteïna K-*ras* mutada al codó 12 i al codó 13 i els efectes en la interacció amb alguns dels seus efectors

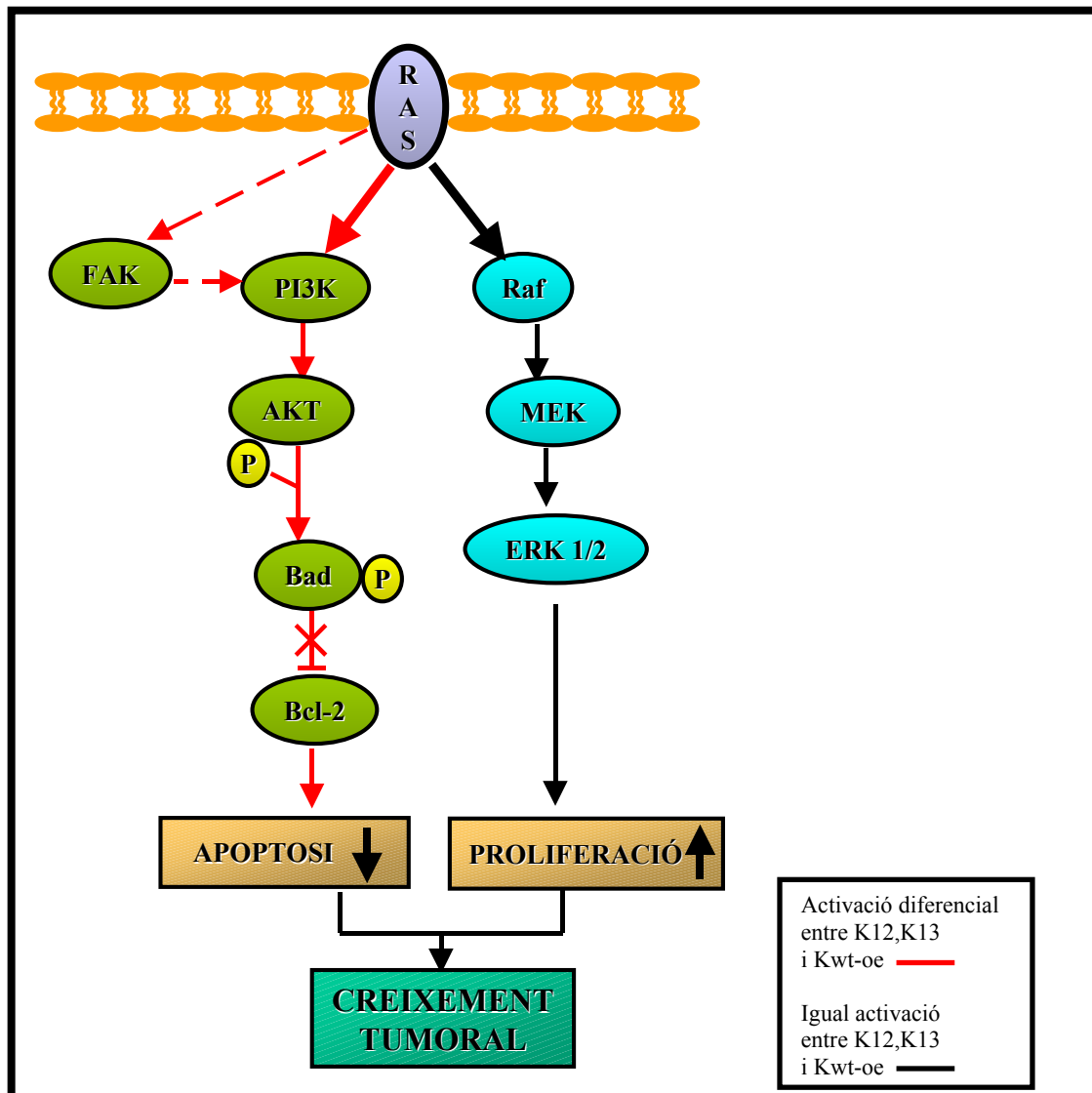


Figura 12. Model d'activació diferencial amb efectors de determinades vies downstream segons la mutació activant o la sobreexpressió del gen *K-ras*

Implicacions clíniques de les troballes en el model in vitro

Els resultats de la més alta transformació conferida per la mutació al codó 12 respecte al codó 13 o la sobreexpressió de la proteïna normal, són consistents amb el que s'havia trobat en d'altres models in vitro o en assaigs de tumorigènesi en ratolins atímics (119,217), o amb el fet que la mutació al codó 12 és més freqüent en carcinomes que en adenomes o en les lesions metastàsiques respecte les no metastàsiques (127,128,218) i en canvi la mutació al codó 13 es troba en tumors que no presenten invasió local, ni metastasi (127). Mai s'havia trobat però que aquest fet pogués estar relacionat amb una diferent capacitat d'induir apoptosi segons la mutació activant.

Els nostres resultats respecte l'apoptosi serien consistents amb el fet que els tumors colorectals amb mutació 12 a *K-ras* presenten un nivell d'apoptosi molt més baix que els tumors que no la tenen (219).

Els nostres resultats ofereixen la base molecular a la falta de selecció dels mutants al codó 13 de *K-ras*, al llarg de la transició d'adenoma a carcinoma, ja que la mutació al codó 13 és més freqüent en adenomes i la mutació al codó 12, és més freqüent en carcinomes colorectals (126).

A més les alteracions a *K-ras* semblen desregular diferencialment les interaccions cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-substrat, afectant la predisposició de les cèl·lules tumorals per la invasió local i la metàstasi, que són importants al determinar l'agressivitat del tumor, relacionat amb desregulació de FAK (98) i d'E-cadherina/ β -catenina (220). La major desregulació observada en els transfectants K12, probablement els hi conferirà més agressivitat tumoral. Això seria consistent amb el pitjor pronòstic observat en els carcinomes de pulmó amb mutació al codó 12 de *K-ras* que resulta en la substitució de glicina per cisteïna (221).

ESTUDI DEL FENOTIP TUMORAL IN VIVO

En la segona part del nostre treball (Guerrero et al, 2002), vam intentar estudiar si hi havia diferències entre el model in vivo o in vitro. En haver utilitzat fibroblasts com a cèl·lula model vam poder discriminar si les diferents mutacions ens oferien un model animal dels sarcomes. La disponibilitat de models per aquests tipus de tumors és important perquè la escassa incidència dels sarcomes de teixits tous i la seva gran heterogeneïtat dificulten el coneixement de les seves característiques biològiques i no permeten millorar el seu diagnòstic i tractament.

Diferents tipus histològics segons la localització de la mutació en *K-ras*

Vam trobar que segons si la mutació es trobava al codó 12 o 13 del gen *K-ras*, s'originaven in vivo dos tipus de sarcoma de teixits tous extremadament diferents a nivell d'histopatologia, latència d'aparició, nivells apoptòtics i mitòtics, marcadors d'agressivitat. Finalment vam observar un patró d'activació molecular específic que explicaria les diferències funcionals observades entre ells.

Els tumors derivats de *K-ras* 13 s'assemblen a l'histiocitoma fibrós maligne (MFH), mentre els derivats de *K-ras* 12 s'assemblen al fibrosarcoma (FS). L'especificitat de tipus histològic que es presenta segons la mutació a *K-ras* en els fibroblasts transformats sembla en concordança amb les troballes clíniques prèvies en sarcomes de teixits tous humans (STS). La major part de mutacions en *K-ras* es donen al codó 13 en els sarcomes de teixits tous de les extremitats, la majoria dels quals es classifiquen com MFH (130). Un 44% dels sarcomes estudiats per Yoo J et al (130) presentaven mutació al codó 13 de *K-ras*, i un 90% dels que presentaven aquesta mutació havien sigut classificats com MFH. En canvi, en els leiomiomes (fibrosarcomes) quan s'ha trobat *K-ras* mutat, només s'ha trobat mutat al codó 12 (173). En el 14% dels leiomiomes estudiats per Hill MA et al (174) s'ha trobat mutació a *K-ras* al codó 12, no s'ha trobat una alta incidència de mutació, però els pacients que presentaven mutació a *K-ras* al codó 12 presenten menys supervivència que els que no tenien aquesta mutació (174).

Diferències funcionals entre els tumors generats segons la mutació en *K-ras*

Encara que els transfectants amb qualsevol de les dues mutacions són tumorogènics, els tumors K13 presenten velocitat de creixement més baixa que els de K12, degut a que tenen un període de latència d'aparició de tumor més llarg. A més malgrat que quan les cèl·lules transformades es cultiven in vitro presenten nivells similars d'expressió de *K-ras*, els tumors que deriven de K13 presenten un nivell d'expressió de *K-Ras* molt més elevat que els tumors derivats de K12. Així sembla que in vivo, en els tumors K13, l'expressió de la proteïna *K-Ras* va augmentant amb el temps, fins que al final es troba sobreexpressada i es necessita aquesta sobreexpressió

per mantenir el fenotip tumoral. En canvi, un nivell d'expressió de K-Ras similar a l'endogen és suficient per induir el fenotip tumoral provocat per l'oncogen K12. Aquest fet recolzaria que la mutació al codó 13 del gen *K-ras* és menys transformant que al codó 12. Prèviament s'havia descrit que les mutacions poc transformants de *K-ras*, necessiten una sobreexpressió de la proteïna per aconseguir uns nivells de transformació similar a les formes altament transformants (131,132).

Els transfectants amb la proteïna normal *K-ras* sobreexpressada presenten una capacitat tumorogènica molt baixa i només es formen tumors microscòpics en alguns dels ratolins, mentre que a la resta no són capaços de mantenir-se i desapareixen.

Diferències en apoptosi

Tant in vitro com in vivo, la diferència més remarcable entre els transfectants és la resistència a l'apoptosi. En els tumors de K13 s'observa una alta prevalència de figures apoptòtiques, concentrades en determinades àrees, que no existeix als tumors K12. Aquesta alta inducció d'apoptosi és similar a l'apoptosi dependent de confluència observada in vitro en els transformants de K13 però no en els de K12. El fet que en els tumors K13 l'apoptosi es centri en determinades zones pot estar generat per l'assoliment d'una determinada densitat cel·lular en aquella zona del tumor que produeixi el mateix senyal apoptòtic que la confluència en el model in vitro. Aquesta troballa és nova ja que mai s'havia relacionat prèviament la menor capacitat tumorogènica de certes formes de *K-ras* amb una diferent inducció de l'apoptosi.

El grau d'apoptosi és inversament proporcional al nivell de senyal antiapoptòtic a través de la via d'AKT. Així, els tumors de K12 presenten una baixa apoptosi i un alt nivell d'activació d'AKT, mentre els de K13 mostren alta apoptosi i baix nivell d'activació d'AKT. A més dintre els tumors de K13, l'heterogeneïtat en el rang d'activació d'AKT correlaciona inversament amb el número de figures apoptòtiques observades. Fins i tot hi ha un tumor que es surt fóra de la distribució normal del grup de tumors de K13 (RK1311), que mostra una elevada activació d'AKT i una baixa apoptosi i serveix per demostrar la estreta associació que es dona entre aquests dos paràmetres.

Dianes de la senyal de supervivència de la via PI3K/AKT en l'adquisició de resistència a l'apoptosi

Tot sembla indicar que la via d'AKT juga un paper clau en la regulació de l'apoptosi en aquest model. Són varies les molècules dianes que podrien tenir un paper en aquesta resistència a l'apoptosi.

Aquesta regulació pot tenir lloc, al menys en part, a través de l'augment en l'expressió de la proteïna antiapoptòtica bcl-2, mediada per Ras a través d'AKT (222-224) i que trobem sobreexpressada en els tumors K12.

També, es produeixen canvis en d'altres molècules que regulen l'apoptosi a través de la via d'AKT, resultats que recolzen la importància d'aquesta via en la senyal antiapoptòtica de Ras. Així, trobem una expressió més baixa d'E-cadherina i FAK en els tumors K13 respecte els K12. Les adhesions intercel·lulars mediades per E-cadherina (225,226) promouen creixement independent d'ancoratge i inhibició d'apoptosi a través de l'activació de la via PI3K/AKT. I les adhesions cèl·lula-matriu extracel·lular mediades per FAK (95,227-229), també promouen creixement independent d'ancoratge i inhibició d'apoptosi a través de l'activació de la via PI3K/AKT. Aquest senyal de FAK, està lligat funcionalment a NFκ-B (230) que trobem sobreexpressat en els tumors K12. En el nostre model s'observa clarament l'estreta relació entre la sobreexpressió de FAK i l'activació d'AKT. El tumor K13 que es sortia de la distribució normal del grup en nivell d'activació d'AKT (RK1311), mostrant una elevada activació d'AKT i una baixa apoptosi, presenta a la vegada uns nivells molt elevats de FAK a diferència de la resta dels tumors K13. Aquest resultat també suggeriria que FAK seria un possible efector de Ras que regularia l'activació d'AKT.

La senyal de supervivència també pot anar a través de Stat-3, molècula antiapoptòtica que es troba asobreexpressada en els tumors K12 o per disminució de l'expressió de la proteïna proapoptòtica Bax, que en els tumors K13 es troba sobreexpressada.

A diferència de la via d'AKT, la via de Erk, un altre regulador de l'apoptosi en molts sistemes (231), no mostra diferències entre els tumors K12 i K13. Aquest resultat són consistents amb els obtinguts in vitro on ja havíem observat que la distinta mutació al gen *K-ras*, deu provocar una interacció diferencial de Ras amb PI3K, amb els conseqüents efectes en la via d'AKT, però no provoca interacció diferencial amb Raf i per això no trobem diferències en l'activació de la via de Erk entre els tumors K12 i K13 però sí en l'activació de la via d'AKT.

Diferències en índex mitòtic i apoptòtic

L'augment de l'índex mitòtic observat en els tumors K13 va ser un resultat una mica inesperat perquè l'índex mitòtic és un dels criteris per determinar el grau de malignitat dels sarcomes de teixits tous (161); i els tumors K13 presenten un fenotip menys agressiu que els tumors K12. L'increment dels nivells de ciclina B1, que és la ciclina mitòtica, suggereix que en els tumors K13 hi ha un augment en la inducció del pas de la fase G2 a M del cicle cel·lular. Per contra, els tumors K12 presenten un índex mitòtic molt més baix junt amb una baix nivell d'expressió de ciclina B1. En canvi, els dos tipus de tumors presenten similar fase G1, com indica l'anàloga expressió de ciclina D1 i activació d'ERK i una similar regulació de la fase S, de síntesi de DNA, com indica la semblant expressió de PCNA. Així les cèl·lules dels tumors K13 presentaran un augment de la proliferació respecte als de K12. Però com el creixement tumoral és el resultat del balanç de dos processos que són la proliferació cel·lular i l'apoptosi, els tumors K12 presenten una velocitat de creixement més elevada que els de K13 perquè malgrat la més alta proliferació dels de K13, també presenten un nivell d'apoptosi molt elevat, el que comporta un alt recanvi cel·lular dins del tumor i a la vegada limita el seu creixement. Entre els dos tipus de tumor varia molt el nivell de recanvi cel·lular degut a les diferències que presenten en regulació del cicle cel·lular i en l'apoptosi.

La desregulació de la proliferació i l'adquisició de resistència a l'apoptosi són les alteracions de la fisiologia cel·lular més importants que porten al creixement tissular descontrolat. Malgrat això, històricament en l'avaluació clínica de l'evolució d'un tumor sempre s'ha estudiat la hiperproliferació, perquè els mètodes d'estudi són tècnicament més senzills i s'ha tingut molt poc en compte l'apoptosi. Però, l'acumulació d'una població de cèl·lules anormals (neoplàsia), pot estar originada per

una proliferació descontrolada o una inhibició de la mort, que fa que l'homeòstasi es desequilibri i es produeixi un augment de la població.

Els nostres resultats recolzan la idea que a més de la proliferació, s'ha d'estudiar també l'apoptosi per aconseguir un pronòstic més acurat de l'evolució del tumor. Perquè si un tumor té una proliferació elevada però també un alt nivell d'apoptosi no tindrà una evolució tan agressiva com es podria inferir només observant la elevada proliferació.

Així, quan en la clínica es considera l'índex mitòtic com a criteri per establir el grau de malignitat tumoral (161), creiem que s'hauria de considerar també l'índex apoptòtic per aconseguir un pronòstic més exacte de l'evolució del tumor.

Marcadors d'agressivitat

A més de les diferències morfològiques i les biològiques que suggerien un grau de malignitat més elevat pels tumors de K12 que pels K13, altres paràmetres van a favor d'una més elevada capacitat tumorogènica dels transfectants K12 respecte els K13, consistent amb la més alta capacitat transformant observada en els resultats in vitro. Així, al contrari dels K13, els tumors K12 sobreexpressen Ki67, p53 i c-myc, marcadors d'alt grau de malignitat, augment del potencial metastàtic, pobre eficàcia de tractament i/o reduïda supervivència del pacient en els sarcomes de teixits tous (165-170).

També recolzant l'agressivitat més elevada dels tumors K12 es troba l'associació de la sobreexpressió de c-myc amb un baix grau de diferenciació, com s'observa en d'altres tipus tumorals (232). El baix grau de diferenciació cel·lular és un dels criteris patològics per considerar un STS d'alt grau de malignitat (161).

A més els fibrosarcomes humans, amb histologia similar als tumors K12, són tumors indiferenciats (154), en canvi el MFH, amb histologia similar als tumors K13, és un grup de tumors que després d'un estudi meticulós es poden classificar en diferents subtipus segons el patró d'expressió de determinats marcadors de diferenciació (158).

La sobreexpressió de FAK observada en els tumors K12 també aniria en aquest sentit. La desregulació diferencial entre els dos tipus de tumors de les interaccions cel·lula-matriu extracel·lular, aniria associada amb una distinta predisposició de les

cèl·lules del tumor a la invasió local i la metastasi que hauria de ser més elevada en els tumors K12. Aquest fet està recolzat per l'associació de la sobreexpressió de FAK amb els STS d'alt grau (233) o amb agressivitat en d'altres tipus tumorals (98,234). Però degut a que en el mètode d'implantació subcutània, que és el que utilitzem pel nostre model, el procés de metastasi es troba inhibit (101-104), no hem pogut observar si el patró metastàtic dels dos tipus de tumors és diferent, com semblen indicar les nostres dades.

Malgrat que els nostres resultats indiquen que la mutació al codó 12 de *K-ras* confereix un fenotip tumoral més agressiu que la mutació al codó 13 o la sobreexpressió de la proteïna normal, aparentment la sobreexpressió de l'E-cadherina que es dona en els tumors K12 aniria en contra del que s'ha observat en tumors epitelials agressius. En tumors epitelials la disminució d'expressió d'E-cadherina correlaciona amb la transició d'adenoma a carcinoma, amb desdiferenciació, invasió i metastasi. En la transició a càncers invasius, les cèl·lules tumorals epitelials han de trencar les unions cèl·lula-cèl·lula per poder envair òrgans veïns (89). Aquesta aparent contradicció podria tenir diferents explicacions:

La via d'APC, proteïna encarregada de controlar els nivells de β -catenina al citosol (235), podria haver patit mutacions secundàries que fessin que la β -catenina no es trobés a la membrana i no pogués formar complex amb la E-cadherina i malgrat la sobreexpressió d'aquesta es produís igualment una disrupció dels contactes cèl·lula-cèl·lula.

El principal mecanisme de la disminució de l'expressió d'E-cadherina és la hipermetilació del seu promotor (236,237) que és un procés reversible. Pot ser que en el moment que nosaltres observem els tumors, hagi una sobreexpressió d'E-cadherina, però en el procés de metastasi perdés per hipermetilació aquesta expressió. La limitació del model subcutani no ens ho permet observar.

La localització subcutània d'aquests tumors no es la seva localització natural. En estudis fets en el nostre laboratori amb tumors epitelials, s'ha observat una major

expressió d'E-cadherina dels mateixos tumors en la localització subcutània respecte la ortotòpica (238).

L'origen mesenquimàtic dels nostres tumors. La majoria dels estudis fets en invasivitat i metastasi, s'han realitzat en tumors epitelials que són els majoritaris clínicament. Pot ser que la pèrdua d'E-cadherina no tingui un paper fonamental en l'adquisició del potencial invasiu i metastàtic dels tumors mesenquimàtics

Implicacions clíniques de les troballes en el model in vivo

Els nostres resultats demostren que les mutacions K12 i K13 generen dos tipus diferents de sarcomes de teixits tous, presentant més característiques d'agressivitat tumoral els de K12, de manera consistent amb els resultats in vitro.

Els tumors K12, presenten una disminució del temps de latència, una velocitat de creixement més elevada degut a que presenten més resistència a l'apoptosi, i una elevada expressió de marcadors d'agressivitat i de molècules relacionades amb la invasió local i la metastasi (Figura 13).

Així, la posició de la mutació en *K-ras* modula la capacitat transformant dels diferents fibroblasts regulant diferencialment determinades vies downstream de *K-ras* que comporta diferències en l'apoptosi, el recanvi cel·lular, la morfologia i l'agressivitat dels distints tumors generats, generant els transfectants K12 tumors amb un fenotip tumoral més agressiu (Figura 13). Això seria consistent amb els comportaments clínics prèviament descrits en s'havia trobat que la mutació al codó 12 és més freqüent en carcinomes que en adenomes o en les lesions metastàsiques respecte les no metastàsiques (127,128,218) i en canvi la mutació al codó 13 es troba en tumors que no presenten invasió local, ni metastasi (127). Mai s'havia trobat però que aquest fet pogués estar relacionat amb la diferent resistència a l'apoptosi segons la mutació activant.

També trobem especificitat de tipus histològic conferida per la presència de la mutació al codó 12 o 13 de *K-ras*. Per les característiques histològiques, els tumors originats en ratolins atímics derivats de la transformació de cèl·lules 3T3 per *K-ras* 13 podrien proporcionar un model per l'histiocitoma maligne fibrós humà, mentre els tumors derivats de K12 podrien proporcionar un model pel fibrosarcoma humà (Figura 13).

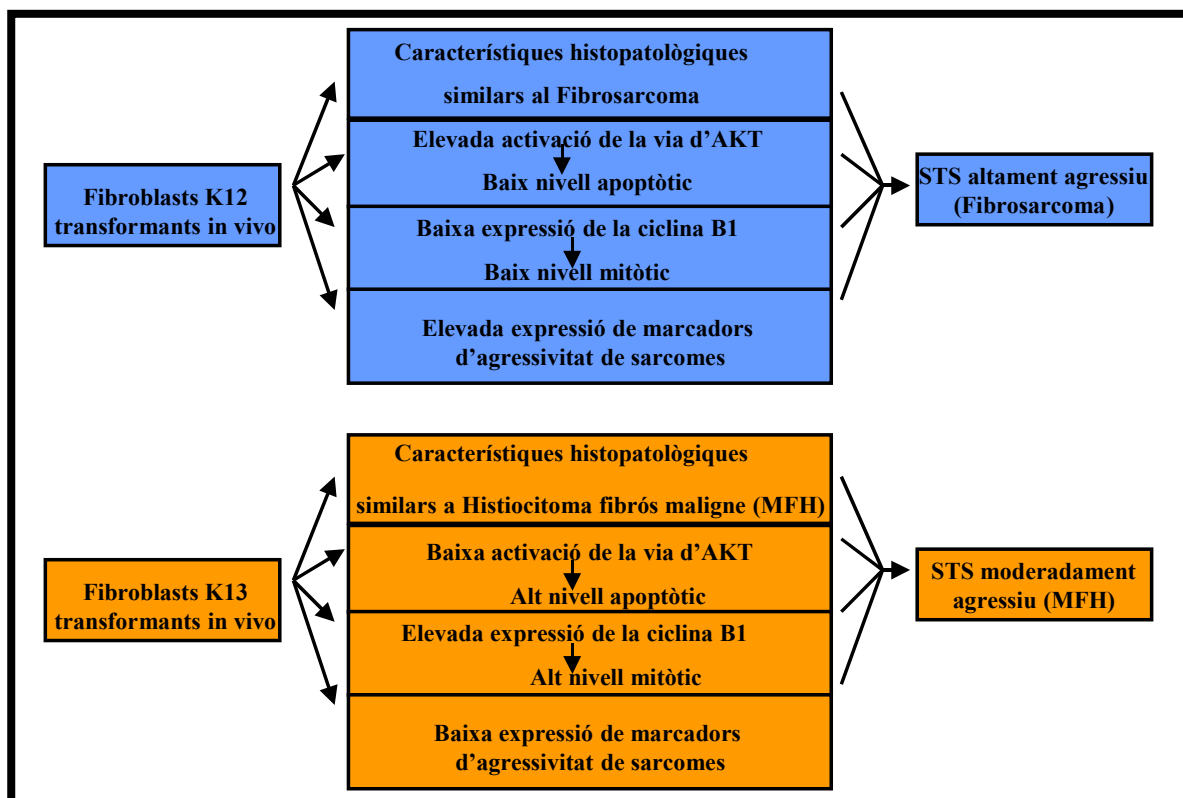


Figura 13. Característiques dels sarcomes de teixits tous (STS) generats en ratolí atímic a partir dels fibroblasts K12 o K13

Acceptant la validesa de l'extrapolació, els nostres resultats suggeririen que el MFH i el fibrosarcoma, malgrat que comparteixen una ontogènia comú (els dos deriven de fibroblast), són entitats diferents. Segons el nostre model aquestes diferències serien atribuïbles a canvis en la naturalesa molecular de la mutació a *K-ras*.

Cal tenir en compte, que aquesta classificació histològica s'està deixant d'utilitzar (239), degut a que la reproductibilitat respecte el tipus histològic diagnosticat concret segons el patòleg que l'estudia és d'un 45-60% (163). En realitat el tractament

dels sarcomes de teixits tous actualment està dictat molt més pel grau de malignitat que pel tipus histològic.

Si es confirmés en sarcomes de teixits tous humans, l'especificitat de tipus histològic conferida per la presència de la mutació al codó 12 o 13, ajudaria a la seva classificació. La mutació trobada a *K-ras* i en un codó concret seria un marcador d'especificitat de tipus tumoral. I si en humans es confirmés també la major agressivitat dels sarcomes amb mutació al codó 12 de *K-ras* també serviria per tenir un millor pronòstic de l'evolució del tumor i permetria una individualització del tractament segons la mutació activant que es presentés al gen *K-ras*.

L'estudi d'aquests models animals, podrien ajudar molt a conèixer les característiques biològiques d'aquests tumors que portaria a una millora terapèutica, la qual és complicada en aquests moments degut a que l'escassa incidència i la gran heterogeneïtat dels STS dificulten l'obtenció de mostres amb característiques biològiques homogènies. Els nostres resultats suggereixen la necessitat de considerar el MFH i el fibrosarcoma humà com a entitats tumorals diferents, per tal de millorar la seva comprensió biològica i avançar en el tractament clínic dels sarcomes de teixits tous.

CONCLUSIONS

- 1) La mutació al codó 12 confereix un fenotip més transformant que la mutació al codó 13 o la sobreexpressió de la proteïna normal en un model de transformació de fibroblast tant in vitro com in vivo.

- 2) La causa principal d'aquestes diferències en transformació es basa en la major resistència a l'apoptosi que presenten els transfectants mutats al codó 12 respecte als mutats al codó 13 o el gen normal sobreexpressat, tant en cultiu cel·lular com en els tumors. Aquesta diferent capacitat d'inducció d'apoptosi ve donada, en els dos models, principalment per la major activació de la senyal de supervivència cel·lular de PI3K/AKT per part dels transfectants mutats al codó 12 de *K-ras*.

- 3) In vivo, segons quin codó de *K-ras* es troba mutat (12 o 13), es confereix especificitat tumoral de tipus histològic. Els tumors generats difereixen en creixement tumoral (taxa apoptòtica, índex mitòtic) i grau de malignitat (marcadors d'agressivitat). Els tumors amb mutacions al codó 12 de *K-ras* són un possible model animal de fibrosarcoma mentre que els tumors amb mutacions al codó 13 de *K-ras* són un possible model animal per l'histiocitoma fibrós maligne.

CONCLUSIÓ FINAL

La naturalesa molecular de la mutació al gen *K-ras* condiciona el fenotip tumoral.

APÈNDIX

A continuació es fa una descripció d'aquells materials i mètodes que penso que cal destacar per entendre millor la generació dels models emprats in vitro i in vivo, bàsics pel desenvolupament posterior dels treballs presentats.

1. GENERACIÓ I ESTUDI DELS TRANSFECTANTS

1.1. Plàsmid

El plàsmid pMLC12 (cisteïna) conté el minigen *K-ras* humà mutat al codó 12, i el pMLD13 (aspàrtic) al codó 13 (Figura 14). El plàsmid pMLG12 (glicina) que conté la seqüència normal del gen *K-ras* humà, es va utilitzar per veure si l'augment de l'expressió del gen normal també tenia efectes funcionals i moleculars. Contenen els 4 exons del gen *K-ras* separats per part de les regions intròniques, així com la senyal menor de poliadenilació fonamental per la traducció de la proteïna. Aquestes construccions a més, contenen el gen neo (resistència a neomicina) sota el control del promotor fort del gen TK (timidin quinasa). El mateix plàsmid sense el gen *K-Ras* s'utilitzarà com control de transfecció (plàsmid neo). Tots aquest plàsmids són derivats del plàsmid pRB i es troben sota el control del propi promotor de *ras* normal, així ens assegurem que els efectes no estan provocats per una gran sobreexpressió del gen transfectat, sinó per un lleuger augment d'expressió de la forma oncogènica i la mutada. Vam poder disposar d'aquests plàsmids inèdits gràcies a que el Dr. Manuel Perucho ens els va proporcionar.

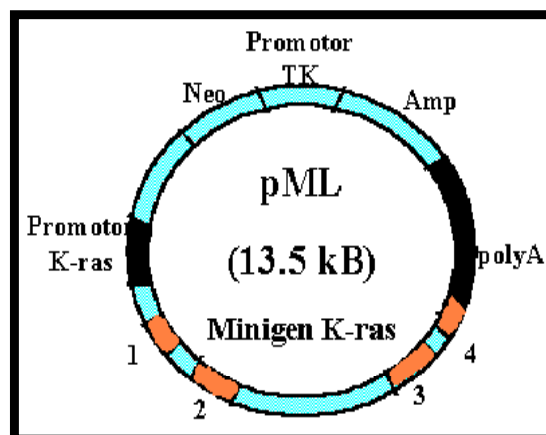


Figura 14. Construcció del plàsmid transfectat pML

Caracterització del plàsmid

Abans de realitzar la transfecció, vam comprovar que els plàsmids tinguessin la mutació esperada, mitjançant la tècnica de SSCP (single strand conformation polymorphism). La tècnica d'SSCP es basa en la diferent mobilitat electroforètica de fragments amplificats i desnaturalitzats de DNA quan difereixen en una o poques bases (240). Permeten identificar un tipus específic de mutacions si ho compares amb un control caracteritzat.

1.2. Cèl·lules

Vam triar els fibroblast NIH3T3 com a model perquè presenten una gran sensibilitat a la transformació per Ras (64).

1.3. Selecció dels transfectants

La selecció dels transfectants es fa amb genèticina (G418). Es realitza una corba de concentracions, per trobar la mínima concentració que resulta letal per les cèl·lules wild type per després poder seleccionar els transfectants. Si la concentració de fàrmac fos massa elevada, només triaríem els clons que haguessin incorporat moltes còpies dels plàsmid i a nosaltres ens interessa una expressió no molt elevada de *K-ras* humana. Un cop triada la concentració de selecció; es realitza la transfecció amb fosfat càlcic (CaPO₄) (Figura 15) i es seleccionen els transfectants amb la concentració de genèticina que hem triat a partir de la corba de fàrmac; així es moriran les wild type i es seleccionaran els transfectants (Figura 15).

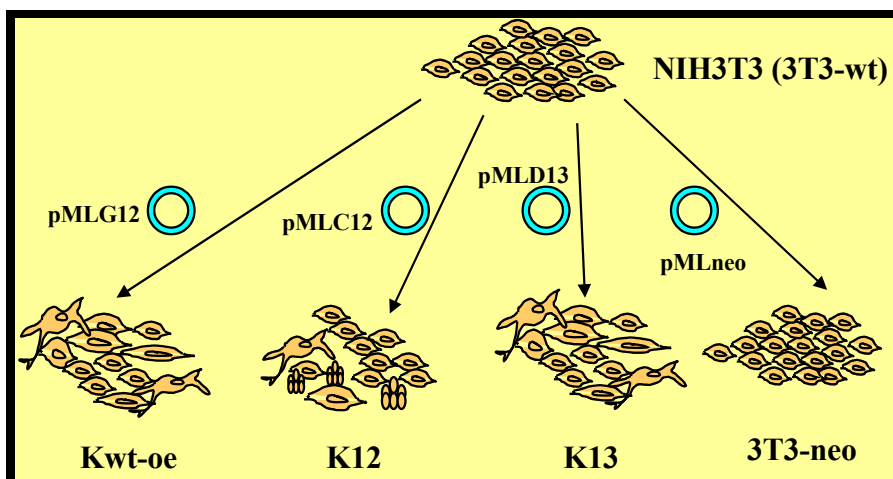


Figura 15. Esquema del mètode de generació de transfectants

Un cop seleccionades les cèl·lules, es clonen i es continuen cultivant amb la selecció de genètica per evitar que perdin el plàsmid.

1.4. Caracterització dels transfectants

S'extreu DNA a partir dels clons dels transfectants i amb la tècnica de SSCP, es comprova que els transfectants realment contenen el gen *K-ras* humà i amb la mutació que ens esperem.

2. GENERACIÓ I ESTUDI DELS TUMORS

Injectem subcutàniament 10^6 cèl·lules de cada clon estudiat (3T3-wt, 3T3-neo, K12, K13) en mascles de quatre setmanes de ratolins atímics Nu/Nu Swiss; cada clon als dos flancs de cinc ratolins (Figura 16). Els ratolins es mantenen en caixes autoclavades, amb menjar i beguda estèrils.

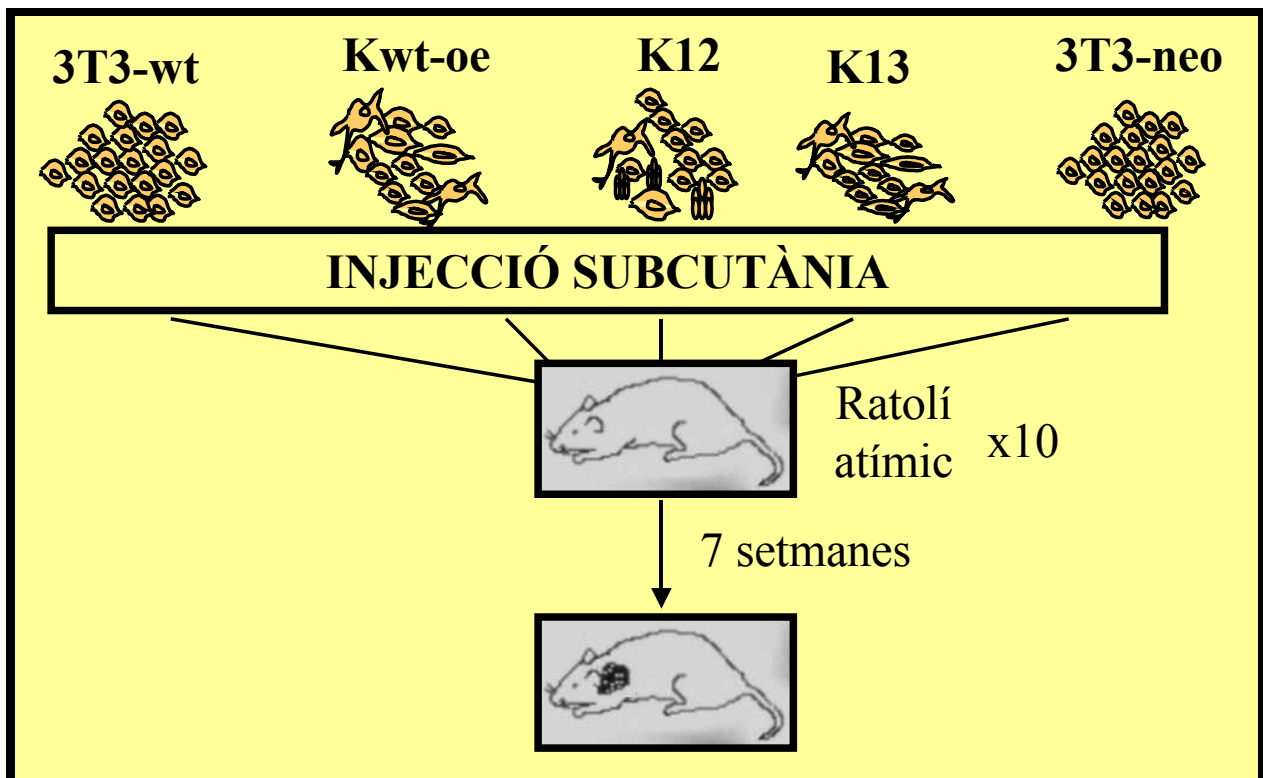


Figura 16. Esquema del mètode de generació dels tumors

Després de la injecció, s'inspeccionen els ratolins dos cops a la setmana i es fa un seguiment del volum del tumor. Quan els tumors assoleixen de 0.5 a 1 cm de diàmetre s'extreuen i els ratolins són sacrificats. Els animals que no desenvolupen tumors macroscòpicament aparents també són sacrificats a les set setmanes i es pren mostra del teixit del lloc on es va realitzar la injecció per fer l'anàlisi histològic. Els tumors són dividits en alíquotes i congelats en nitrogen líquid o fixats amb formalina. Els tumors generats són codificats amb R (right) o amb L (left), descrivint el flanc del ratolí del que provenen, seguit del tipus de cèl·lules injectades i després pel número assignat a cada ratolí. Els ratolins K12 són numerats del 16 al 20 i els K13 de l'11 al 15. Els tumors derivats dels transfectants K12 inclouen; RK1216, RK1217, LK1217, RK1218, RK1219, LK1219, RK1220 i LK1220. Els tumors derivats dels transfectants K13 inclouen; RK1311, LK1311, RK1312, LK1312, RK1313, LK1313, RK1314, LK1314, RK1315 i LK1315.

BIBLIOGRAFIA

1. Harvey JJ. An unidentified virus which causes the rapid production of tumours in mice. *Nature* 1964; 204:1104-1105.
2. Kirsten WH, Mayer LA. Malignant lymphomas of extrathymic origin induced in rats by murine erythroblastosis virus. *J Nat Cancer Inst* 1967; 39:311-335.
3. DeFeo D, Gonda MA, Young HA, Chang EH, Lowy DR, Scolnick EM, Ellis RW. Analysis of two divergent rat genomic clones homologous to the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus. *Proc. Nalt. Acad. Sci* 1981; 78:3328-3332.
4. Ellis RW, DeFeo D, Shih TY, Gonda MA, Young HA, Tsuchida N, Lowy DR, Scolnick EM. The p21 src genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses originate from divergent members of a family of normal vertebrate genes. *Nature* 1981; 292:506-511.
5. Chang EH, Gonda MA, Ellis RW, Scolnick EM, Lowy DR. Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. *Proc. Nalt. Acad. Sci. USA* 1982; 79:4848-4852.
6. Santos E, Tronick SR, Aaronson SA, Pulciani S, Barbacid M. T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes. *Nature* 1982; 298:343-347.
7. Balmain A, Pragnell IB. Mouse skin carcinomas induced in vivo by chemical carcinogens have a transforming Harvey-ras oncogene. *Nature* 1983;303:72-74.
8. Guerrero I, Calzada P, Mayer A, Pellicer A. A molecular approach to leukemogenesis: mouse lymphomas contain an activated c-ras oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81:202-205.
9. Guerrero I, Villasante A, D'Eustachio P, Pellicer A. Isolation, characterization, and chromosome assignment of mouse N-ras gene from carcinogen-induced thymic lymphoma. *Science* 1984; 225:1041-1043.
10. McGrath JP, Capon DJ, Smith DH, Chen EY, Seeburg PH, Goeddel DV, Levinson AD. Structure and organization of the human K_i-ras proto-oncogene and a related processed pseudogene. *Nature* 1985; 304:501-506.

11. Pells S, Divjak M, Romanowski P, Impey H, Hawkins NJ, Clarke AR, Hooper ML, Williamson DJ. Developmentally-regulated expression of murine K-ras isoforms. *Oncogene* 1997; 15:1781-1786.
12. Barbacid M. Ras genes. *Annu Rev Biochem* 1987; 56:779-827.
13. Boguski MS, McCormick F. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 1993; 336:643-654.
14. McCormick F. Ras GTPase activating protein: signal transmitter and signal terminator. *Cell* 1989; 56:5-8.
15. Milburn MV, Tong L, De Vos AM, Brunger A, Yamaizumi Z, Nishimura S, Kim SH. Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science* 1990; 247:939-945.
16. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 1990; 348:125-132.
17. Hoshino M, Clanton DJ, Shih TY, Kawakita M, Hattori S. Interaction of ras oncogene product p21 with guanine nucleotides. *J Biochem* 1987; 102:503-511.
18. Goody RS, Frech M, Wittinghofer A. Affinity of guanine nucleotide binding proteins for their ligands: facts and artifacts. *Trends Biochem Sci* 1991; 16:327-328.
19. Sweet RW, Yokohama S, Kamata T, Feramisco JR, Rosenberg M, Gross M. The product of ras is a GTPase and the T24 oncogenic mutant is deficient in this activity. *Nature* 1984; 311:273-275.
20. Manne V, Bekesi E, Kung HF. H_a-ras proteins exhibit GTPase activity: point mutations that activate H_a-ras gene products result in decreased GTPase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:376-380.
21. Polakis P, McCormick F. Structural requirements for the interaction of p21 ras with GAP, Exchange factors and its biological effector target. *J Biol Chem* 1993; 268:9175-9160.
22. McCormick F, Martin GA, Clark R, Bollag G, Polakis P. Regulation of ras p21 by GTPase activating proteins. *Cold Spring Harbor Sym Quant Biol* 1991; 56:237-241.
23. Hall A. Signal transduction through small GTPases: a tale of two GAPs. *Cell* 1992; 69:389-391.
24. Downward J. Exchange rate mechanisms. *Nature* 1992; 358:282-283.
25. Feig LA. The many roads that lead to ras. *Science* 1993; 260:767-768.

26. Wittinghofer A, Pai EF. The structure of Ras protein: a model for a universal molecular switch. *Trends Biochem Sci* 1991;16(10):382-387.
27. Milburn MV, Tong L, deVos AM, Brunger A, Yamaizumi Z, Nishimura S, Kim SH. Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science* 1990; 247(4945):939-945.
28. Malumbres M, Pellicer A. RAS pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front Biosci* 1998; 3:d887-912.
29. Moodie SA, Willumsen BM, Weber MJ, Wolfman A. Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science* 1993; 260: 1658-1661.
30. Vojitek AB, Hollenbarg SM, Cooper JA. Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* 1993; 74: 205-214.
31. Warne PH, Rodriguez-Viciana P, Downward J. Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 *In vitro*. *Nature* 1993; 364:352-355.
32. Zhang XF, Settleman J, Kyriakis JM, Takeuchi-Suzuki E, Elledge SJ, Marshall MS, Bruder JT, Rapp UR, Avruch J. Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature* 1993; 364:308-313.
33. Kyriakis JM, App H, Zhang X, Banerjee P, Brautigan DL, Rapp UR, Avruch J. Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 1992; 358: 417-421.
34. Cowley S, Paterson H, Kemp P, Marshall CJ. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* 1994; 77: 841-852.
35. Ahn NG, Seger R, Bratlien RL, Diltz CD, Tonks NK, Krebs EG. Multiple components in an epidermal growth factor-stimulated protein kinase cascade. *In vitro* activation of a myelin basic protein/microtubule associated protein 2 kinase. *J Biol Chem* 1991;266:4220-4227.
36. Gómez N, Cohen P. Dissection of the protein kinase cascade by which nerve growth factor activates MAP kinases. *Nature* 1991; 351:69-72.
37. Kosako H, Gotoh Y, Matsuda S, Ishikawa M, Nishida E. Xenopus MAP kinase activator is a serine/threonine/tyrosine kinase activated by threonine phosphorylation. *EMBO J* 1992; 11:2903-2908.
38. Nakielnny S, Cohen P, Wu J, Sturgill TW. MAP kinase activator from insulin-stimulated skeletal muscle is a protein threonine/tyrosine kinase. *EMBO J* 1992; 11:2123-2129.

39. Marshall MS. Ras target proteins in eukaryotic cells. *FASEB J* 1995; 9:1311-1318.
40. Blenis J. Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:5889-5992.
41. Gille H, Sharrocks AD, Shaw PE. Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature* 1992; 358:414-417.
42. Hofer F, Fields S, Schneider C, Martin GS. Activated Ras interacts with the Ral guanine nucleotide dissociation stimulator. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:11089-11093.
43. Kikuchi A, Demo SD, Ye ZH, Chen YW, Williams LT. ralGDS family members interact with the effector loop of *ras* p21. *Mol Cell Biol* 1994; 14:7483-7491.
44. Spaargaren M, Bischoff JR. Identification of the guanine nucleotide dissociation stimulator for Ral as a putative effector molecule of R-ras, H-ras, K-ras and Rap. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:12609-12613.
45. Feig LA, Urano T, Cantor S. Evidence for a Ras/Ral signaling cascade. *Trends Biochem Sci* 1996; 21:438-441.
46. Hawkins PT, Eguinoa A, Qui RG, Stokoe D, Cooke FT, Walters R, Wennstrom S, Claesson-Welsh L, Evans T, Symons M, Stephens L. PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide 3-Kinase. *Curr Biol* 1995; 5:393-403.
47. Yan M, Dai T, Deak JC, Kyriakis JM, Zon LI, Woodgett JR, Templeton DJ. Activation of stress-activated protein kinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1. *Nature* 1994; 372:798-800.
48. Minden A, Lin A, McMahon M, Lange-Carter C, Derijard B, Davis RJ, Johnson G L, Karin M. Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science* 1994; 266:1719-1723.
49. Gupta S, Campbell D, Derijard B, Davis R.J. Transcription factor ATF-2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* 1995; 267:389-393.
50. McCarthy S, Samuels M, Pritchard C, Abraham J, McMahon M. Rapid induction of heparin-binding epidermal growth factor/diphtheria toxin receptor expression by Raf and Ras oncogenes. *Genes Dev* 1995; 9: 1953-1964.

51. Finco TS, Westwick JK, Norris JL, Beg AA, Der CJ, Baldwin AS, Jr. Oncogenic Ha-Ras-induced signaling activates NF- κ B transcriptional activity, which is required for cellular transformation. *J Biol Chem* 1997; 272:24113-24116.
52. Lowy DR, Willumsen BM. Function and regulation of ras. *Ann Rev Biochem* 1993; 62:851-891.
53. Tocque B, Delumeau I, Parker F, Maurier F, Multon MC, Schweighoffer F. Ras-GTPase activating protein (GAP): a putative effector for Ras. *Cell Signal* 1997; 9:153-158.
54. Diaz-Meco MT, Municio MM, Frutos S, Sanchez P, Lozano J, Sanz L, Moscat J. The product of par-4, a gene induced during apoptosis, interacts selectively with the atypical isoforms of protein kinase C. *Cell* 1996; 86:777-786 .
55. Han L, Colicelli J. A human protein selected for interference with Ras function interacts directly with Ras and competes with Raf1. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 1318-1323.
56. Vavvas D, Li X, Avruch J, Zhang XF. Identification of Nore1 as a potential Ras effector. *J Biol Chem* 1998; 273: 5439-5442.
57. Adjei AA. Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(14):1062-1074.
58. Muñoz A. CÁNCER. Genes y nuevas terapias. Editorial Hélice.1997: 6-106.
59. Vogelstein B and Kinzler KW. The genetic basis of human cancer. The McGraw-Hill Companies, Inc. 1998: 186.
60. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70.
61. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 1998;16:395-419.
62. Reed JC. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 1997;387(6635):773-776.
63. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999;15:269-290.
64. Bishop JM. The molecular genetics of cancer. *Science* 1987; 235(4786):305-311. Review.
65. Stanbridge EJ, Wilkinson J. Analysis of malignancy in human cells: malignant and transformed phenotypes are under separate genetic control. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75(3):1466-1469.

66. Jainchill JL, Aaronson A, Todaro GJ. Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J Virol* 1969; 4:549-553.
67. Cox AD, Der CJ. Biological assays for cellular transformation. *Methods in enzymology* 1994; 238:277-294.
68. Clark GJ, Cox AD, Graham SM, Der CJ. Biological assays for ras transformation. *Methods in enzymology* 1995; 255:395-412.
69. Leever SJ and Marshall CJ. MAP kinase regulation-the oncogene connection. *Trends Cell Biol.* 1992; 2:283-286.
70. Roberts TM. Cell biology. A signal chain of events. *Nature* 1992; 360:534-535.
71. Winston JT, Coats SR, Wang YZ, Pledger WJ. Regulation of the cell cycle machinery by oncogenic ras. *Oncogene* 1996; 12:127-134.
72. White MA, Vale T, Camonis JH, Schaefer E, Wigler MH. A role for the Ral guanine nucleotide dissociation stimulator in mediating Ras-induced transformation. *J. Biol. Chem.* 1996; 271:16439-16442.
73. Okazaki M, Kishida S, Hinoi T, Hasegawa T, Tamada M, Kataoka T, Kikuchi A. Synergistic activation of c-fos promoter activity by Raf and Ral GDP dissociation stimulator. *Oncogene* 1997; 14:515-521.
74. Serrano M, Lian AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic Ras provokes premature senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4A. *Cell* 1997; 88:593-602.
75. Olson MF, Paterson HF, Marshall CJ. Signals from Ras and Rho interact to regulate expression of p21cip. *Nature* 1998; 394:295-299.
76. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: Downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 1997;88:435-437.
77. Marte BM, Rodriguez-Viciano P, Wennstrom S, Wartne PH, Downward J. PI3 kinase and PKB/Akt act as an effector pathway for R-Ras. *Curr Biol* 1997; 7:63-70.
78. Cerezo A, Martinez-A C, Lanzarot D, Fischer S, Franke T, Rebollo A. Role of Akt and JNK2 in apoptosis induced by IL-4 deprivation. *Mol Biol Cell* 1998;9:3107-3118.
79. Del Peso L, Gonzalez M, Page C, Herrera R, Nuñez G. IL-3-induced phosphorylation of BAD through the Akt. *Science* 1997; 278:687-689.

80. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples cell survival signals to cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997;91:23-41.
81. Frame S, Balmain A. Integration of positive and negative growth signals during ras pathway activation in vivo. *Curr Opin Genet Dev* 2000;10(1):106-113.
82. Sjolander A, Lapetina EG. Agonist-induced association of the p21ras GTPase-activating protein with phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189:1503-1508.
83. Fuller SJ, Gillespie-Brown J, Sugden PH. Oncogenic src, raf, and ras stimulate a hypertrophic pattern of gene expression and increase cell size in neonatal rat ventricular myocytes. *J Biol Chem* 1998;273:18146-18152.
84. Nobes CD, Hawkins P, Stephens L, Hall A. Activation of the small GTP-binding proteins rho and rac by growth factor receptors. *J. Cell Sci.* 1995;108:225-233.
85. Kozma R, Ahmed S, Best A, Lim L. The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 1995;15:1942-1952.
86. Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 1992;70:401-410.
87. Ridley, A.J. and Hall, A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 1992;70:389-399.
88. Yamamoto T, Harada N, Kano K, Taya S, Canaani E, Matsuura Y, Mizoguchi A, Ide C, Kaibuchi K. The Ras target AF-6 interacts with ZO-1 and serves as a peripheral component of tight junctions in epithelial cells. *J Cell Biol* 1997; 139(3):785-795.
89. Thiery JP. The saga of adhesion molecules. *J Cell Biochem* 1996;61(4):489-492.
90. Aberle H, Schwartz H, Kemler R. Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J Cell Biochem* 1996;61(4):514-523.
91. Takeichi M. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7(5):619-627.

92. King WG, Mattaliano MD, Chan TO, Tschlis PN, Brugge JS. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation. *Mol Cell Biol* 1997;17(8):4406-4418.
93. Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 1994;124:619-626.
94. Khwaja A, Rodriguez-Viciana P, Wennstrom S, Warne PH, Downward J. Matrix adhesion and Ras transformation both activate a PI3 kinase and PKB/Akt cell survival pathway. *EMBO J* 1997;16:2783-2793.
95. Frisch SM, Vuori K, Ruoslahti E, Chan-Hui PY. Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J Cell Biol* 1996;134(3):793-799.
96. Frisch SM, Ruoslahti E. Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9(5):701-706.
97. Schlaepfer DD, Hunter T. Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs? *Trends Cell Biol* 1998;8(4):151-157.
98. Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ. Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol* 1999;71(3-4):435-478.
99. Kerbel RS, Cornil I, Theodorescu D. Importance of orthotopic transplantation procedures in assessing the effects of transfected genes on human tumor growth and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1991;10(3):201-215.
100. Pantelouris EM. Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature* 1968,217(126):370-371.
101. Liotta LA. Tumor invasion and metastases--role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture. *Cancer Res* 1986; 46(1): 1-7.
102. Morikawa K, Walker SM, Nakajima M, Pathak S, Jessup JM, Fidler IJ. Influence of organ environment on the growth, selection, and metastasis of human colon carcinoma cells in nude mice. *Cancer Res* 1988; 48(23):6863-6871.
103. Fodstad O. Tumorigenicity and dissemination of human tumors in congenitally immune-deficient mice. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83(19), 1419-1420.
104. Fidler IJ. New developments in in vivo models of neoplasia. *Cancer Metastasis Rev* 1991;10(3): 191-192.
105. Fry DG, Milam LD, Dillberger JE, Maher VM, McCormick JJ. Malignant transformation of an infinite life span human fibroblast cell strain by transfection with v-Ki-ras. *Oncogene* 1990;5(9):1415-1418.

106. Wilson DM, Yang DJ, Dillberger JE, Dietrich SE, Maher VM, McCormick JJ. Malignant transformation of human fibroblasts by a transfected N-ras oncogene. *Cancer Res* 1990;50(17):5587-5593.
107. McCormick JJ, Fry DG, Hurlin PJ, Morgan TL, Wilson DM, Maher VM. Malignant transformation of human fibroblasts by oncogene transfection or carcinogen treatment. *Prog Clin Biol Res* 1990;340D:195-205.
108. Egan SE, Broere JJ, Jarolim L, Wright JA, Greenberg AH. Co-regulation of metastatic and transforming activity of normal and mutant ras genes. *Int J Cancer* 1989;43(3):443-448.
109. Bradley MO, Kraynak AR, Storer RD, Gibbs JB. Experimental metastasis in nude mice of NIH 3T3 cells containing various ras genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83(14):5277-5281.
110. Radinsky R, Kraemer PM, Raines MA, Kung HJ, Culp LA. Amplification and rearrangement of the Kirsten ras oncogene in virus-transformed BALB/c 3T3 cells during malignant tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(15):5143-5147.
111. Milburn MV, Tong L, De Vos AM, Brunger A, Yamaizumi Z, Nishimura S, Kim SH. Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science* 1990; 247:939-945.
112. Schlichting I, Almo SC, Rapp G, Wilson K, Petratos K, Lentfer A, Wittinghofer A, Kabsch W, Pai EF, Petsko GA. Time-resolved X-ray crystallographic study of the conformational change in H_a-ras p21 protein on GTP hydrolysis. *Nature* 1990; 345:309-315.
113. Rodenhuis S. Ras and human tumors. *Cancer biology* 1992;3:241-247.
114. Slamon DJ, deKernion JB, Verma IM, Cline MJ. Expression of cellular oncogenes in human malignancies. *Science* 1984;224(4646):256-262.
115. Spandidos DA, Kerr IB. Elevated expression of the human ras oncogene family in premalignant and malignant tumours of the colorectum. *Br J Cancer* 1984;49(6):681-688.
116. Tanaka T, Slamon DJ, Battifora H, Cline MJ. Expression of p21 ras oncoproteins in human cancers. *Cancer Res* 1986;46(3):1465-1470.
117. Downward J. Cell cycle: routine role for Ras. *Curr. Biol* 1997; 7: 258-260.

118. Fasano O, Aldrich T, Tamanoi F, Taparowsky E, Furth M, Wigler M. Analysis of the transforming potential of the human *H-ras* gene by random mutagenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1984; 81: 4008–4012.
119. Sloan SR, Newcomb EW, Pellicer A. Neutron radiation can activate K-ras via a point mutation in codon 146 and induces a different spectrum of ras mutations than does gamma radiation. Mol Cell Biol 1990; (1):405-408.
120. Bos JL, Toksoz D, Marshall CJ, Verlaan-de Vries M, Veeneman GH, van der Eb AJ, van Boom JH, Janssen JW, Steenvoorden AC. Amino-acid substitutions at codon 13 of the N-ras oncogene in human acute myeloid leukaemia. Nature 1985;315(6022):726-730.
121. Bartsch D, Bastian D, Barth P, Schudy A, Nies C, Kisker O, Wagner HJ, Rothmund M. K-ras oncogene mutations indicate malignancy in cystic tumors of the pancreas. Ann Surg, 1998; 228(1):79-86.
122. Capella G, Cronauer-Mitra S, Peinado MA, Perucho M. Frequency and spectrum of mutations at codon 12 and 13 of the *c-K-ras* gene in human tumors. Environ. Health Persp 1991; 93: 125–131.
123. Hirai H, Kobayashi Y, Mano H, Hagiwara K, Maru Y, Omine M et al. A point mutation at codon 13 of the N-ras oncogene in myelodysplastic syndrome. Nature 1987; 327(6121):430-432.
124. Nishida J, Hirai H, Takaku F. Activation mechanism of the N-ras oncogene in human leukemias detected by synthetic oligonucleotide probes. Biochem Biophys Res Commun 1987; 147(2):870-875.
125. Yamashita N, Minamoto T, Ochiai A, Onda M, Esumi H. Frequent and characteristic K-ras activation and absence of p53 protein accumulation in aberrant crypt foci of the colon. Gastroenterology 1995; 108(2):434-440.
126. Shibata D, Schaeffer J, Li ZH, Capella G, Perucho M. Genetic heterogeneity of the c-K-ras locus in colorectal adenomas but not in adenocarcinomas. J Natl Cancer Inst 1993; 85(13):1058-1063.
127. Finkelstein SD, Sayegh R, Bakker A, Swalsky P. Determination of tumor aggressiveness in colorectal cancer by K-ras-2 analysis. Arch Surg 1993;128(5):526-531.

128. Finkelstein SD, Sayegh R, Christensen S, Swalsky P. Genotypic classification of colorectal adenocarcinoma. Biologic behavior correlates with K-ras-2 mutation type. *Cancer (Phila.)* 1993; 71: 3827–3838.
129. DeVivo I, Marion MJ, Smith SJ, Carney WP, Brandt-Rauf PW. Mutant c-Ki-ras p21 protein in chemical carcinogenesis in humans exposed to vinyl chloride. *Cancer Causes Control* 1994; 5(3):273-278.
130. Yoo J, Robinson RA, Lee JY. H-ras and K-ras gene mutations in primary human soft tissue sarcoma: concomitant mutations of the ras genes. *Mod Pathol* 1999; 12(8):775-780.
131. Chang EH, Furth ME, Scolnick EM, Lowy DR. Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus. *Nature* 1982; 297(5866):479-483.
132. Santos E, Reddy EP, Pulciani S, Feldmann RJ, Barbacid M. Spontaneous activation of a human proto-oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80(15):4679-4683.
133. Der CJ, Finkel T, Cooper GM. Biological and biochemical properties of human rasH genes mutated at codon 61. *Cell* 1986;44(1):167-176.
134. Seeburg PH, Colby WW, Capon DJ, Goeddel DV, Levinson AD. Biological properties of human c-Ha-ras1 genes mutated at codon 12. *Nature* 1984; 312 (5989):71-75.
135. Finkel T, Der CJ, Cooper GM. Activation of ras genes in human tumors does not affect localization, modification, or nucleotide binding properties of p21. *Cell* 1984; 37(1):151-158.
136. Krenkel U, Schlichting L, Scherer A, Schumann R, Frech M, John J. Three-dimensional structures of H-ras p21 mutants: molecular basis for their inability to function as signal switch molecules. *Cell* 1990;62(3):539-548.
137. Monaco R, Chen JM, Chung D, Brandt-Rauf P, Pincus MR. Comparison of the computed three-dimensional structures of oncogenic forms (bound to GDP) of the ras-gene-encoded p21 protein with the structure of the normal (non-transforming) wild-type protein. *J Protein Chem* 1995; 14(6):457-466.
138. Pincus MR, Brandt-Rauf PW. Structural effects of substitutions on the p21 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82(11):3596-3600.

139. Franken SM, Scheidig AJ, Krenzel U, Rensland H, Lautwein A, Geyer M et al. Three-dimensional structures and properties of a transforming and a nontransforming glycine-12 mutant of p21H-ras. *Biochemistry* 1993; 32(33):8411-8420.
140. Brandt-Rauf PW, Carty RP, Carucci J, Avitable M, Lubowsky J, Pincus MR. Conformational effects of the substitution of Arg for Gly 13 in the ras oncogene-encoded P21 protein. *J Protein Chem* 1988; 7(4):349-354.
141. Pincus MR, Brandt-Rauf PW, Carty RP, Lubowsky J, Avitable M, Gibson KD, Scheraga HA. Conformational effects of substituting amino acids for glutamine-61 on the central transforming region of the P21 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84(23):8375-8379.
142. Mittal R, Ahmadian MR, Goody RS, Wittinghofer A. Formation of a transition-state analog of the Ras GTPase reaction by Ras-GDP, tetrafluoroaluminate, and GTPase-activating proteins. *Science* 1996;273(5271):115-117.
143. Ahmadian MR, Stege P, Scheffzek K, Wittinghofer A. Confirmation of the arginine-finger hypothesis for the GAP-stimulated GTP-hydrolysis reaction of Ras. *Nat Struct Biol* 1997;4(9):686-689.
144. Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W, Wiesmuller L, Lautwein A, Schmitz F, Wittinghofer A. The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* 1997; 277(5324):333-338.
145. Wittinghofer A, Scheffzek K, Ahmadian MR. The interaction of Ras with GTPase-activating proteins. *FEBS Lett* 1997;410(1):63-67.
146. Martin GA, Viskochil D, Bollag G, McCabe PC, Crosier WJ, Haubruck H et al. The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21. *Cell* 1990; 63(4): 843-849.
147. Bollag G, McCormick F. Differential regulation of rasGAP and neurofibromatosis gene product activities. *Nature* 1991; 351(6327):576-579.
148. Hall BE, Yang SS, Boriack-Sjodin PA, Kuriyan J, Bar-Sagi D. Structure-based mutagenesis reveals distinct functions for Ras switch 1 and switch 2 in Sos catalyzed guanine nucleotide exchange. *J Biol Chem* 2001;276(29):27629-27637.

149. Chen JM, Friedman FK, Hyde MJ, Monaco R, Pincus MR. Molecular dynamics analysis of the structures of ras-guanine nucleotide exchange protein (SOS) bound to wild-type and oncogenic ras-p21. Identification of effector domains of SOS. *J Protein Chem* 1999; 18(8):867-874.
150. Boriack-Sjodin PA, Margarit SM, Bar-Sagi D, Kuriyan J. The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature* 1998; 394(6691):337-343.
151. Quilliam LA, Hisaka MM, Zhong S, Lowry A, Mosteller RD, Han J, Drugan JK, Broek D, Campbell SL, Der CJ. Involvement of the switch 2 domain of Ras in its interaction with guanine nucleotide exchange factors. *J Biol Chem* 1996; 271(19):11076-11082.
152. Storm HH. Survival of adult patients with cancer of soft tissues or bone in Europe. *Eur J Cancer* 1998;34(14):2212-2221.
153. DeVita V.T. et al. *CANCER. Principles & Practice of Oncology. Volume 2. 5th Edition.* Lippincott- Raven Publishers 1997:1731-1788.
154. Graadt van Roggen JF, Bovee JV, Morreau J, Hogendoorn PC. Diagnostic and prognostic implications of the unfolding molecular biology of bone and soft tissue tumours. *J Clin Pathol* 1999;52(7): 481-489.
155. Wheelless CR. *Wheelless' Textbook of Orthopaedics.* 1996.
<http://www.medmedia.com/o6/124.htm>
156. DeGroot H. <http://www.bonetumor.org/page58.html>
157. Rajan TV. Pathweb, the virtual Pathology Museum.
<http://155.37.5.42/eAtlas/Bone/478.htm>
158. Fletcher CD. Pleomorphic malignant fibrous histiocytoma: fact or fiction? A critical reappraisal based on 159 tumors diagnosed as pleomorphic sarcoma. *Am J Surg Pathol* 1992;16(3): 213-228.
159. Kandel RA, Bell RS, Wunder JS, O'Sullivan B, Catton CN, White LM, Davis AM. Comparison between a 2- and 3-grade system in predicting metastatic-free survival in extremity soft-tissue sarcoma. *J Surg Oncol* 1999;72(2):77-82.
160. Costa J, Wesley RA, Glatstein E, Rosenberg SA. The grading of soft tissue sarcomas. Results of a clinicohistopathologic correlation in a series of 163 cases. *Cancer* 1984;53(3):530-541.

161. Trojani M, Contesso G, Coindre JM, Rouesse J, Bui NB, de Mascarel A, Goussot JF, David M, Bonichon F, Lagarde C. Soft-tissue sarcomas of adults; study of pathological prognostic variables and definition of a histopathological grading system. *Int J Cancer* 1984;33(1):37-42.
162. Presant CA, Russell WO, Alexander RW, Fu YS. Soft-tissue and bone sarcoma histopathology peer review: the frequency of disagreement in diagnosis and the need for second pathology opinions. The Southeastern Cancer Study Group experience. *J Clin Oncol* 1986;4(11):1658-1661.
163. Coindre JM, Trojani M, Contesso G, David M, Rouesse J, Bui NB, Bodaert A, De Mascarel I, De Mascarel A, Goussot JF. Reproducibility of a histopathologic grading system for adult soft tissue sarcoma. *Cancer* 1986;58(2):306-309.
164. Nielsen TO, West RB, Linn SC, Alter O, Knowling MA, O'Connell JX, Zhu S, Fero M, Sherlock G, Pollack JR, Brown PO, Botstein D, van de Rijn M. Molecular characterisation of soft tissue tumours: a gene expression study. *Lancet* 2002;359(9314):1301-1317.
165. Heslin MJ, Cordon-Cardo C, Lewis JJ, Woodruff JM, Brennan MF. Ki-67 detected by MIB-1 predicts distant metastasis and tumor mortality in primary, high grade extremity soft tissue sarcoma. *Cancer* 1998;83(3):490-497.
166. Hoos A, Stojadinovic A, Mastorides S, Urist MJ, Polsky D, Di Como CJ, Brennan MF, Cordon-Cardo C. High Ki-67 proliferative index predicts disease specific survival in patients with high-risk soft tissue sarcomas. *Cancer* 2001;92(4):869-874.
167. Sollazzo MR, Benassi MS, Magagnoli G, Gamberi G, Molendini L, Ragazzini P, Merli M, Ferrari C, Balladelli A, Picci P. Increased c-myc oncogene expression in Ewing's sarcoma: correlation with Ki67 proliferation index. *Tumori* 1999;85(3):167-173.
168. Szadowska A, Olborski B, Harezga-Bal B, Debiec-Rychter M. Expression of P53, MDM2 and Ki-67 antigens in soft tissue sarcomas. *Pol J Pathol* 1999;50(1): 9-16.
169. Toffoli G, Doglioni C, Cernigoi C, Frustaci S, Perin T, Canal B, Boiocchi M. P53 overexpression in human soft tissue sarcomas: relation to biological aggressiveness. *Ann Oncol* 1994;5 (2):167-172.

170. Drobnjak M, Latres E, Pollack D, Karpeh M, Dudas M, Woodruff JM, Brennan MF, Cordon-Cardo C. Prognostic implications of p53 nuclear overexpression and high proliferation index of Ki-67 in adult soft-tissue sarcomas. *J Natl Cancer Inst* 1994;86(7): 549-554.
171. Hibshoosh H, Lattes R. Immunohistochemical and molecular genetic approaches to soft tissue tumor diagnosis: a primer. *Semin Oncol* 1997;24(5):515-525.
172. Slominski A, Wortsman J, Carlson A, Mihm M, Nickoloff B, McClatchey K. Molecular pathology of soft tissue and bone tumors. A review. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123(12):1246-1259.
173. Gill S, Stratton MR, Patterson H, Spurr NK, Fisher C, Gusterson BA, Cooper CS. Detection of transforming genes by transfection of DNA from primary soft-tissue tumours. *Oncogene* 1991;6 (9): 1651-1656.
174. Hill MA, Gong C, Casey TJ, Menon AG, Mera R, Gillespie AT, Giardina JF, Levine EA, Hunt JD. Detection of K-ras mutations in resected primary leiomyosarcoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6 (12):1095-1100.
175. Barrios C, Castresana JS, Ruiz J, Kreichbergs A. Amplification of the c-myc proto-oncogene in soft tissue sarcomas. *Oncology* 1994 ;51(1):13-17.
176. Ladanyi M, Cha C, Lewis R, Jhanwar SC, Huvos AG, Healey JH. MDM2 gene amplification in metastatic osteosarcoma. *Cancer Res* 1993; 53(1):16-18.
177. Leach FS, Tokino T, Meltzer P, Burrell M, Oliner JD, Smith S, Hill DE, Sidransky D, Kinzler KW, Vogelstein B. p53 Mutation and MDM2 amplification in human soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 1993; 53(10 Suppl):2231-2234.
178. Cordon-Cardo C, Latres E, Drobnjak M, Oliva MR, Pollack D, Woodruff JM, Marechal V, Chen J, Brennan MF, Levine AJ. Molecular abnormalities of mdm2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 1994; 54(3):794-799.
179. Florenes VA, Maelandsmo GM, Forus A, Andreassen A, Myklebost O, Fodstad O. MDM2 gene amplification and transcript levels in human sarcomas: relationship to TP53 gene status. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86(17):1297-1302.
180. Nakayama T, Toguchida J, Wadayama B, Kanoe H, Kotoura Y, Sasaki MS. MDM2 gene amplification in bone and soft-tissue tumors: association with tumor progression in differentiated adipose-tissue tumors. *Int J Cancer* 1995; 64(5):342-346.

181. Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 1992; 358(6381):80-83.
182. Garberoglio C, Cordon-Cardo C, Sorvillo J et al. Expression of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha in human myogenic sarcomas. *J Exp Clin Cancer Res* 1992; 11:83-92.
183. Sekyi-Otu A, Bell RS, Ohashi C, Pollak M, Andrulis IL. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptors, IGF-1, and IGF-2 are expressed in primary human sarcomas. *Cancer Res* 1995;55(1):129-134.
184. Wang J, Coltrera MD, Gown AM. Cell proliferation in human soft tissue tumors correlates with platelet-derived growth factor B chain expression: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Cancer Res* 1994; 54(2):560-564.
185. Stratton MR, Moss S, Warren W, Patterson H, Clark J, Fisher C, Fletcher CD, Ball A, Thomas M, Gusterson BA, et al. Mutation of the p53 gene in human soft tissue sarcomas: association with abnormalities of the RB1 gene. *Oncogene* 1990;5(9):1297-1301
186. Mulligan LM, Matlashewski GJ, Scrabble HJ, Cavenee WK. Mechanisms of p53 loss in human sarcomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(15):5863-5867.
187. Toguchida J, Yamaguchi T, Ritchie B, Beauchamp RL, Dayton SH, Herrera GE, Yamamuro T, Kotoura Y, Sasaki MS, Little JB, et al. Mutation spectrum of the p53 gene in bone and soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 1992;52(22):6194-6199.
188. Andreassen A, Oyjord T, Hovig E, Holm R, Florenes VA, Nesland JM, Myklebost O, Hoie J, Bruland OS, Borresen AL, et al. p53 abnormalities in different subtypes of human sarcomas. *Cancer Res* 1993;53(3):468-471.
189. Latres E, Drobnyak M, Pollack D, Oliva MR, Ramos M, Karpeh M, Woodruff JM, Cordon-Cardo C. Chromosome 17 abnormalities and TP53 mutations in adult soft tissue sarcomas. *Am J Pathol* 1994;145(2):345-355.
190. Bartek J, Bartkova J, Vojtesek B, Staskova Z, Lukas J, Rejthar A, Kovarik J, Midgley CA, Gannon JV, Lane DP. Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. *Oncogene* 1991;6(9):1699-1703.

191. Porter PL, Gown AM, Kramp SG, Coltrera MD. Widespread p53 overexpression in human malignant tumors. An immunohistochemical study using methacarn-fixed, embedded tissue. *Am J Pathol* 1992;140(1):145-153.
192. Cordon-Cardo C, Wartinger D, Petrylak D, Dalbagni G, Fair WR, Fuks Z, Reuter VE. Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992;84(16):1251-1256.
193. Logothetis CJ, Xu HJ, Ro JY, Hu SX, Sahin A, Ordonez N, Benedict WF. Altered expression of retinoblastoma protein and known prognostic variables in locally advanced bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992;84(16):1256-1261.
194. Xu HJ, Quinlan DC, Davidson AG, Hu SX, Summers CL, Li J, Benedict WF. Altered retinoblastoma protein expression and prognosis in early-stage non-small-cell lung carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1994;86(9):695-699.
195. Reissmann PT, Simon MA, Lee WH, Slamon DJ. Studies of the retinoblastoma gene in human sarcomas. *Oncogene* 1989;4(7):839-843.
196. Wunder JS, Czitrom AA, Kandel R, Andrulis IL. Analysis of alterations in the retinoblastoma gene and tumor grade in bone and soft-tissue sarcomas. *J Natl Cancer Inst* 1991;83(3):194-200.
197. Cance WG, Brennan MF, Dudas ME, Huang CM, Cordon-Cardo C. Altered expression of the retinoblastoma gene product in human sarcomas. *N Engl J Med* 1990;323(21):1457-1462.
198. Karpeh MS, Brennan MF, Cance WG, Woodruff JM, Pollack D, Casper ES, Dudas ME, Latres E, Drobnjak M, Cordon-Cardo C. Altered patterns of retinoblastoma gene product expression in adult soft-tissue sarcomas. *Br J Cancer* 1995;72(4):986-991.
199. Nikiforov MA, Hagen K, Ossovskaya VS, Connor TM, Lowe SW, Deichman GI, Gudkov AV. p53 modulation of anchorage independent growth and experimental metastasis. *Oncogene* 1996;13(8):1709-1719.
200. McGill G, Shimamura A, Bates RC, Savage RE, Fisher DE. Loss of matrix adhesion triggers rapid transformation-selective apoptosis in fibroblasts. *J Cell Biol* 1997;138(4):901-911.

201. Vater CA, Bartle LM, Dionne CA, Littlewood TD, Goldmacher VS. Induction of apoptosis by tamxifen-activation of a p53-estrogen receptor fusion protein expressed in E1A and T24 H-ras transformed p53^{-/-} mouse embryo fibroblasts. *Oncogene* 1996;13(4):739-748.
202. Trent JC 2nd, McConkey DJ, Loughlin SM, Harbison MT, Fernandez A, Ananthaswamy HN. Ras signaling in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *EMBO J* 1996;15(17):4497-4505.
203. Kauffmann-Zeh A, Rodriguez-Viciano P, Ulrich E, Gilbert C, Coffey P, Downward J, Evan G. Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature* 1997; 385(6616):544-548.
204. Kinoshita T, Yokota T, Arai K, Miyajima A. Regulation of Bcl-2 expression by oncogenic Ras protein in hematopoietic cells. *Oncogene* 1995;10(11):2207-2212.
205. Sanchez-Garcia I, Martin-Zanca D. Regulation of Bcl-2 gene expression by BCR-ABL is mediated by Ras. *J Mol Biol* 1997;267(2):225-228.
206. Esteve P, Embade N, Perona R, Jimenez B, del Peso L, Leon J, Arends M, Miki T, Lacal JC. Rho-regulated signals induce apoptosis in vitro and in vivo by a p53-independent, but Bcl2 dependent pathway. *Oncogene* 1998;17(14):1855-1869.
207. Zohn IM, Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Der CJ. Rho family proteins and Ras transformation: the RHOad less traveled gets congested. *Oncogene* 1998;17(11 Reviews):1415-1438.
208. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 1991;251(5000):1451-1455.
209. Winston JT, Coats SR, Wang YZ, Pledger WJ. Regulation of the cell cycle machinery by oncogenic ras. *Oncogene* 1996;12(1):127-134.
210. Persons DA, Schek N, Hall BL, Finn OJ. Increased expression of glycolysis-associated genes in oncogene-transformed and growth-accelerated states. *Mol Carcinog* 1989;2(2):88-94
211. Gibbs JB, Ellis RW, Scolnick EM. Autophosphorylation of v-Ha-ras p21 is modulated by amino acid residue 12. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81(9):2674-2678.
212. Williams NG, Roberts TM. Signal transduction pathways involving the Raf proto-oncogene. *Cancer Metastasis Rev* 1994;13(1):105-116.

213. Herrmann C, Martin GA, Wittinghofer A. Quantitative analysis of the complex between p21ras and the Ras-binding domain of the human Raf-1 protein kinase. *J Biol Chem* 1995;270(7):2901-2905.
214. Shirouzu M, Koide H, Fujita-Yoshigaki J, Oshio H, Toyama Y, Yamasaki K, Fuhrman SA, Villafranca E, Kaziro Y, Yokoyama S. Mutations that abolish the ability of Ha-Ras to associate with Raf-1. *Oncogene* 1994;9(8):2153-2157.
215. Vetter IR, Linnemann T, Wohlgemuth S, Geyer M, Kalbitzer HR, Herrmann C, Wittinghofer A. Structural and biochemical analysis of Ras-effector signaling via RalGDS. *FEBS Lett* 1999;451(2):175-180.
216. Pacold ME, Suire S, Perisic O, Lara-Gonzalez S, Davis CT, Walker EH, Hawkins PT, Stephens L, Eccleston JF, Williams RL. Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase gamma. *Cell* 2000; 103(6):931-943.
217. George DL, Glick B, Trusko S, Freeman N. Enhanced c-Ki-ras expression associated with Friend virus integration in a bone marrow-derived mouse cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83(6):1651-1655.
218. Capella G, Cronauer-Mitra S, Pienado MA, Perucho M. Frequency and spectrum of mutations at codons 12 and 13 of the c-K-ras gene in human tumors. *Environ Health Perspect* 1991;93:125-131.
219. Ward RL, Todd AV, Santiago F, O'Connor T, Hawkins NJ. Activation of the K-ras oncogene in colorectal neoplasms is associated with decreased apoptosis. *Cancer* 1997;79(6):1106-1113.
220. Vermeulen S, Van Marck V, Van Hoorde L, Van Roy F, Bracke M, Mareel M. Regulation of the invasion suppressor function of the cadherin/catenin complex. *Pathol Res Pract* 1996;192(7):694-707.
221. Siegfried JM, Gillespie AT, Mera R, Casey TJ, Keohavong P, Testa JR, Hunt JD. Prognostic value of specific KRAS mutations in lung adenocarcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6(10):841-847.
222. Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 2000;351 Pt 2:289-305.
223. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev* 1999;13(22):2905-2927.

224. Katak SS, Kramer RH. E-cadherin regulates anchorage-independent growth and survival in oral squamous cell carcinoma cells. *J Biol Chem* 1998;273(27):16953-16961.
225. Pece S, Chiariello M, Murga C, Gutkind JS. Activation of the protein kinase Akt/PKB by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell junctions. Evidence for the association of phosphatidylinositol 3-kinase with the E-cadherin adhesion complex. *J Biol Chem* 1999;274(27):19347-19351.
226. Peluso JJ, Pappalardo A, Fernandez G. E-cadherin-mediated cell contact prevents apoptosis of spontaneously immortalized granulosa cells by regulating Akt kinase activity. *Biol Reprod* 2001;64(4):1183-1190.
227. Xu LH, Yang X, Bradham CA, Brenner DA, Baldwin AS Jr, Craven RJ, Cance WG. The focal adhesion kinase suppresses transformation-associated, anchorage-independent apoptosis in human breast cancer cells. Involvement of death receptor-related signaling pathways. *J Biol Chem* 2000;275(39):30597-30604.
228. Hungerford JE, Compton MT, Matter ML, Hoffstrom BG, Otey CA. Inhibition of pp125FAK in cultured fibroblasts results in apoptosis. *J Cell Biol* 1996;135(5):1383-1390.
229. Sonoda Y, Watanabe S, Matsumoto Y, Aizu-Yokota E, Kasahara T. FAK is the upstream signal protein of the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt survival pathway in hydrogen peroxide-induced apoptosis of a human glioblastoma cell line. *J Biol Chem* 1999;274(15):10566-10570.
230. Sonoda Y, Matsumoto Y, Funakoshi M, Yamamoto D, Hanks SK, Kasahara T. Anti-apoptotic role of focal adhesion kinase (FAK). Induction of inhibitor-of-apoptosis proteins and apoptosis suppression by the overexpression of FAK in a human leukemic cell line, HL-60. *J Biol Chem* 2000;275(21):16309-16315.
231. Peyssonnaud C, Eychene A. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol Cell* 2001;93(1-2):53-62.
232. Klimpfinger M, Zisser G, Ruhri C, Putz B, Steindorfer P, Hofler H. Expression of c-myc and c-fos mRNA in colorectal carcinoma in man. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*;59(3):165-171.
233. Owens LV, Xu L, Craven RJ, Dent GA, Weiner TM, Kornberg L, Liu ET, Cance WG. Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors. *Cancer Res* 1995;55(13):2752-2755.

234. Kornberg LJ. Focal adhesion kinase and its potential involvement in tumor invasion and metastasis. *Head Neck* 1998;20(8):745-752.
235. Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Muller O, Chamberlain SH, Masiarz FR, Munemitsu S, Polakis P. Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science* 1993;262(5140):1731-1734.
236. Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* 1994;1198(1):11-26.
237. Bracke ME, Van Roy FM, Mareel MM. The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;213 (Pt 1):123-161.
238. Farré L. Influència del lloc de implantació en el comportament biològic, transducció de senyals i resposta a fàrmacs en xenografts de càncer de pàncreas i còlon. Tesi doctoral 2002.
239. Brown FM, Fletcher CD. Problems in grading soft tissue sarcomas. *Am J Clin Pathol* 2000;114 Suppl:S82-89.
240. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(8):2766-2770.