

TRANSFORMACION CELULAR Y MECANISMOS DE SOBREVIDA REGULADOS
POR LA GTPASA RAL[#]ELISA BAL DE KIER JOFFE^{1,*}, ALEJANDRO ADAM²*Area Investigación, Instituto de Oncología «Angel H. Roffo», Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires*

Numerosas evidencias experimentales indican que la diferencia fundamental entre células normales y tumorales reside en la regulación diferencial e inapropiada expresión de moléculas involucradas en procesos normales como la proliferación y la invasión celular. Dado que la expresión génica está sujeta a la regulación por vías de señalización intracelular, el estudio de las vías activadas o inactivadas en la célula maligna permitiría identificar nuevos blancos moleculares para la prevención de la transformación maligna y la intervención terapéutica sobre el crecimiento y la diseminación tumoral.

Se conoce que la activación de los oncogenes Ras contribuye a la formación de alrededor del 30% de las neoplasias humanas. Asimismo existen numerosos datos que avalan la participación de las vías reguladas por Ras en los complejos procesos involucrados en la transformación maligna y la progresión tumoral. Estas evidencias han determinado el interés creciente en la elucidación de dichas vías^{1,2}.

Superfamilia Ras

La familia Ras, o de GTPasas monoméricas, juega un rol primordial en la integración de la gran complejidad de las señales que las células reciben sobre sus receptores en la membrana plasmática de modo de responder en forma apropiada^{1,2}. Estas proteínas deben el nombre de GTPasas a su mecanismo de regulación intrínseco. Ante un estímulo, liberan una molécula de GDP previamente unida a ellas para dejar su lugar a una molécula de GTP. Unidas a GTP, estas proteínas se encuentran en su for-

ma activa y son capaces de interactuar con las proteínas efectoras río abajo en las cascadas de señalización. El fin de la señal se debe a la hidrólisis de la molécula de GTP a GDP y regreso al comienzo del ciclo de activación/inactivación. El mecanismo es muy parecido al mecanismo de activación de las proteínas G acopladas a receptores serpentina (7 pasos transmembrana). Sin embargo, una gran diferencia radica en que estas últimas son proteínas triméricas. Al ser monoméricas, las proteínas de la familia Ras necesitan de proteínas auxiliares para ejecutar los pasos de activación e inactivación. Estas proteínas, que poseen una importantísima función en la regulación de los procesos de transducción de señal, pueden clasificarse, según su función, en tres tipos principales: GAPs, GDSs y GEFs. Las GAPs son proteínas inhibitorias ya que promueven la hidrólisis de la molécula de GTP; las GDSs actúan desestabilizando la unión a la molécula de guanina; y, por último, las proteínas GEFs son las encargadas directas de activar a la proteína G promoviendo el intercambio de GDP por GTP. Un sencillo esquema se muestra en la Figura 1.

El proto-oncogén *Ras* es el miembro fundador de esta familia que ha crecido vertiginosamente en los últimos años^{2,3}. Hoy se pueden encontrar cientos de secuencias con alta homología con *Ras* en las bases de datos. Para simplificar el análisis, esta superfamilia ha sido dividida en familias y subfamilias en función del grado de homología de sus integrantes. En la actualidad se aceptan dos familias principales, la familia Ras y la familia Ran. Entre los miembros de la familia Ras encontramos a las GTPasas citosólicas, mientras que la familia Ran está compuesta por los miembros con expresión nuclear.

A su vez, la familia Ras se divide en las subfamilias Ras, Rho y Rab. Los miembros de la familia Rab controlan el transporte vesicular. La familia Rho, compuesta por las proteínas Rho, Rac y CDC42 (incluyendo todas las isoformas de estas tres proteínas), regula principalmente el citoesqueleto, la matriz extracelular y la morfología y migración celulares. Recientemente, esta subfamilia ha sido también implicada en el control de la

¹Miembro de la Carrera del Investigador del CONICET.²Becario de Formación de Postgrado de CONICET.[#]Los resultados originales presentados en este trabajo fueron financiados por subsidios de la Universidad de Buenos Aires, CONICET y Agencia Nacional para la Promoción de la Ciencia y la Técnica otorgados a E.B.K.J.

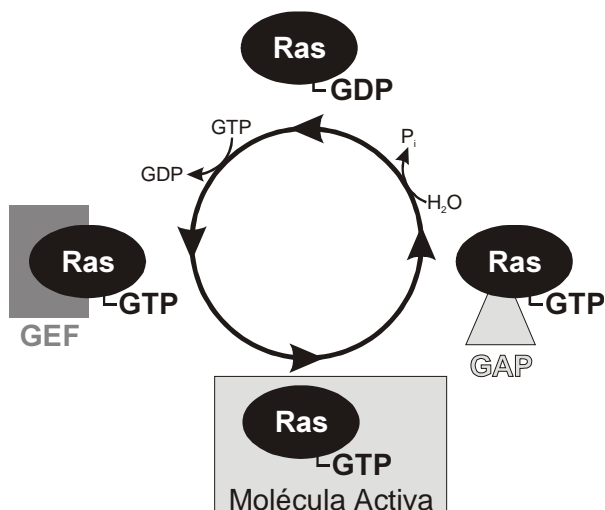


Fig. 1.- Esquema del ciclo de activación e inactivación de las GTPasas monoméricas. GEF: Factor de intercambio de GTP; GAP: Proteína activadora de la actividad GTPasa.

respuesta al stress celular y en la regulación de la apoptosis⁴. La subfamilia Ras incluye a Ras, Ral y Rap, entre otras³. Sus funciones son muy variadas e incluyen desde el control de la proliferación y supervivencia celulares hasta la regulación de la diferenciación, la arquitectura del citoesqueleto y el tráfico vesicular.

Ya con este pequeño resumen de las actividades de cada subfamilia puede observarse un importante solapamiento entre ellas, rasgo fundamental de esta familia. Por último, para añadir mayor complejidad al sistema, la activación de cada una de estas proteínas no es en absoluto independiente de las otras, ya que poseen un alto grado de interrelación (*cross-talk*), principalmente a nivel de la regulación de las proteínas auxiliares GEFs, GAPs y GDSs.

Para ejercer sus efectos biológicos, una vez activada, Ras se asocia con una docena de blancos moleculares. De ellos tres clases de efectores de Ras han demostrado tener funcionalidad *in vivo*: las proteínocinasas de la familia Raf, la subunidad catalítica de la fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K) y los factores de intercambio activadores de Ral (Ral-GEFs) (Figura 2A). Mientras que los dos primeros constituyen los efectores más conocidos, sólo recientemente ha surgido el interés en el estudio de la participación de la vía Ral-GEFs/Ral en la transmisión de señales desde Ras y en el conocimiento de sus posibles funciones^{5, 6}.

Estructura y función de Ral

Por simplicidad, nos referiremos a esta proteína como Ral, si bien se trata de una subfamilia integrada por dos proteínas: RalA y RalB, cuyos genes están localizados en los

loci 7p22-p15 y 2cen-q13, respectivamente. Poco se sabe de las diferencias fisiológicas entre estas dos isoformas. Estas proteínas contienen todos los dominios conservados en la familia, los cuales incluyen un sitio de unión a GTP (o GDP), un sitio efector (el cual es responsable de las interacciones con las moléculas río abajo en la vía de transducción de la señal) y un sitio de anclaje a membrana por isoprenilación CAAX. Estos sitios son indispensables para la función de Ral, y mutando cualquiera de ellos se obtiene una forma inactiva o sobreactivada, dependiendo de la mutación, de la misma⁵.

Como toda proteína de esta familia, se activa por acción de una GEF responsable del intercambio de GDP por GTP. La más conocida, por ser la primera en ser descubierta, es RalGDS. Esta proteína cataliza el intercambio en respuesta a la activación de Ras por unión directa (Figura 2B)^{5, 6}.

Una vez activada Ral, un cambio conformacional en su dominio efector le permite interactuar con diversas proteínas efectoras. Entre ellas, RalBP1 es la más citada en la literatura⁶. La actividad de RalBP1 no es otra que la de una GAP específica para la subfamilia Rho. La activación de Ral, entonces, induce la inactivación de esta subfamilia, más específicamente, de CDC42 y Rac. RalBP1, también denominada citocentrina, RIP1 ó RLIP76, regularía el ensamblaje del aparato mitótico y la endocitosis de receptores tirosina kinasas (RTKs)^{7, 8}.

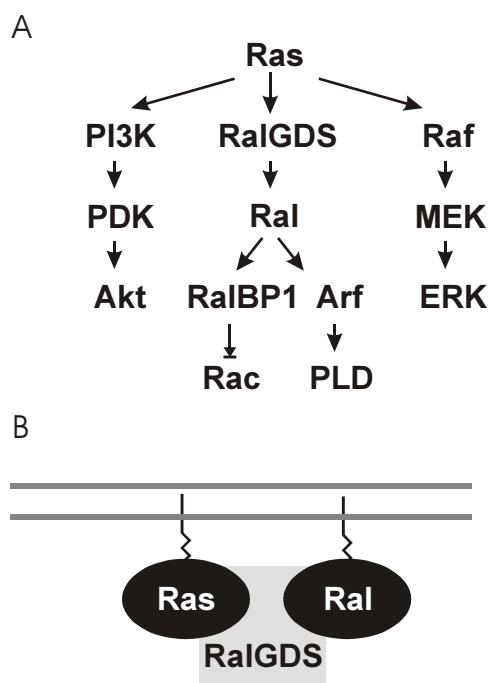


Fig. 2.- A: Las tres vías mejor conocidas inducidas por Ras. B: Esquema de la activación de Ral por Ras, mediada por RalGDS. Ambas GTPasas se encuentran ancladas a la membrana plasmática por una unión a un grupo isoprenoide.

Sin embargo, una de las moléculas más interesantes activada por Ral es la fosfolipasa D1 (PLD1). Esta sería activada a través de la formación de un complejo que involucra a la proteína Arf (otra GTPasa monomérica)⁹.¹⁰. A diferencia de la fosfolipasa C (PLC), que cataliza la conversión de fosfolípidos en diacilglicerol (DAG) y el grupo polar queda unido al fosfato, PLD cataliza la hidrólisis de fosfatidilcolina en ácido fosfatídico (PA) y el grupo polar queda libre. PA puede entonces actuar *per se* como segundo mensajero, como coactivador de numerosas proteínas como Ras, Rac, Arf, PI4K y Raf, o ser convertido en DAG a través de la acción de la enzima ácido fosfatídico fosfohidrolasa. DAG puede entonces actuar como segundo mensajero para activar a las isoformas clásicas y nuevas de la familia de las proteína kinasas C (PKC). Esta forma de activación de PKC tiene la característica de ser más duradera que la activación por el DAG generado por la actividad de PLC¹¹.

Como puede observarse, Ral está íntimamente relacionada con diversas vías de transducción de señal, siendo un importante nodo de interconexión. Pero, ¿cuál es el efecto neto de esta proteína? Siendo directamente activada por Ras, uno ya puede suponer que está involucrada en el control de la proliferación celular, lo cual es correcto. Así, Ral es necesaria para la inducción de la proliferación por variantes constitutivas de Ras, así como por la acción de RTKs^{12, 13}. Una probable vía de activación de la proliferación puede ser la inducción de la expresión de la ciclina D1 a través de la activación del factor de transcripción NF- κ B, así como la inducción de la expresión de c-Fos a través de Rlf^{13, 14}. Además se ha demostrado que un aumento de los niveles intracelulares de Ca²⁺ puede activar Ral de una manera independiente de Ras¹⁵. Ral es también necesaria para la transducción de la señal y la endocitosis del receptor de EGF⁹. Por otra parte, la introducción de una forma constitutivamente activa de Ral inhibe la formación de fibras de stress e induce filopodia, a través de la modulación de la localización intracelular de filamina, sugiriendo que cumple alguna función en la determinación de la morfología y migración celular¹⁶.

Finalmente, un conjunto de nuevas evidencias experimentales sugieren que la activación de Ral tiene una notoria participación en la transformación maligna y la progresión tumoral que comprometen a la vía de transducción de señal activada por Ras. En cambio, muy poco se conoce acerca de su participación en la regulación de la supervivencia y la muerte celular.

Participación de la GTPasa monomérica RalA en la transformación maligna.

Se ha demostrado que la expresión constitutiva de los oncogenes v-Src y v-Ras induce la transformación *in vitro*

de las células NIH3T3, y que dicho efecto es dependiente de una señal mediada por la pequeña GTPasa RalA y PLD1¹⁷. Asimismo se demostró que Ral coopera con el receptor de EGF en la transformación de fibroblastos de rata 3Y1¹⁸ y que una forma activa de Ras, que sólo puede transmitir la señal a través de Ral (RasV12G37), fue capaz de transformar a las células NIH3T3 alcanzando un fenotipo tumorigénico completo en ratones desnudos¹⁹.

Las proteasas extracelulares juegan un rol esencial tanto en las primeras etapas de la transformación maligna como durante la progresión tumoral, que abarca el crecimiento, la invasión y la diseminación tumoral. Entre ellas se encuentran las metaloproteasas (MMPs) y el activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA). Tanto las MMPs como el uPA, su inhibidor PAI-1 y/o su receptor uPAR se han encontrado sobreexpresados en numerosos tumores experimentales y humanos, demostrando tener correlación con invasividad y metástasis, y valor predictivo de la evolución de los pacientes²⁰. En trabajos anteriores, estudiamos que las células de un adenocarcinoma de mama murino sobreproducen uPA, y que esta sobreproducción es regulada por una vía dependiente principalmente de PLD y PKC²¹. El complejo proceso de la progresión tumoral involucra también la participación de otras moléculas, como componentes de las matrices extracelulares, incluyendo ácido hialurónico, laminina y fibronectina (FN), y sus receptores CD44 e integrinas²².

Con el objetivo de conocer en mayor detalle las vías de señalización implicadas en la transformación maligna y progresión tumoral, nos propusimos estudiar si la activación de la vía RalA/PLD1 por los oncogenes v-Src, v-Ras y v-Raf participa en la regulación de la expresión de moléculas críticas de la progresión tumoral como las proteasas uPA y MMPs, el receptor de membrana CD44 y la fibronectina (FN), así como en el comportamiento tumorigénico y metastásico. Para ello, se utilizaron las células de estirpe fibroblástica NIH3T3, transformadas mediante la transfección de los oncogenes v-Src y v-Ras y cotransfectadas o no con la mutante negativa de RalA (S28N-Ral), capaz de bloquear específicamente la activación de PLD1 por v-Src o v-Ras⁹.

Demostramos que las células NIH3T3 transformadas por v-Src o por v-Ras sobreexpresan uPA y que la expresión de S28N-Ral bloquea dicha sobreexpresión inducida por ambos oncogenes. Asimismo, la transformación por v-Src o v-Ras también indujo un aumento significativo de la actividad de MMP-2 y MMP-9. Sin embargo, la coexpresión de la mutante negativa de RalA fue capaz de bloquear la sobreexpresión de MMPs inducida por v-Src, pero no por v-Ras, sugiriendo una regulación diferencial de la expresión de estas enzimas por los oncogenes estudiados y por RalA²³. También demostramos que la expresión v-Src, v-Ras y v-Raf indujo la sobreexpresión de CD44, pero disminuyó significativa-

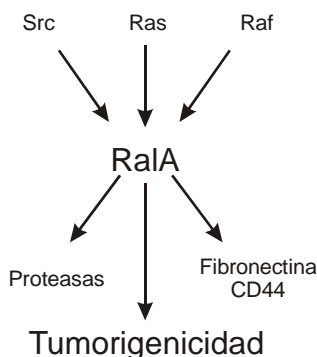


Fig. 3.- Esquema de regulación mediada por RalA de los cambios de expresión de proteasas, elementos de matriz extracelular y capacidad tumorigénica inducidos por la sobreexpresión de las variantes virales de Ras, Raf y Src.

mente la expresión y fibrillogénesis de FN. Ambos efectos fueron revertidos por la expresión de la mutante negativa de RalA, con bloqueo de la expresión de CD44 y restauración tanto de la expresión de FN como de la capacidad de formar una matriz fibrilar extracelular²⁴. Finalmente, los distintos tipos celulares fueron inoculados por vía subcutánea o endovenosa en ratones singéneos a fin de estudiar su capacidad tumorigénica y metastásica experimental, respectivamente. Mientras que aproximadamente el 50% de los ratones inoculados con las células NIH3T3 transformadas por v-Src o v-Ras desarrollaron tumores subcutáneos, ninguno de los inyectados con las células transformadas que coexpresaban la mutante negativa de RalA desarrollaron tumores. Se obtuvo un resultado similar en el ensayo de metástasis experimentales, con una incidencia del 95% de animales con nódulos pulmonares cuando se inyectaron con células NIH3T3 v-Src o v-Ras, versus un 14% en los ratones inoculados con las células que coexpresaban la mutante negativa²³. Un resumen esquemático puede observarse en la Figura 3.

RalA es capaz de mediar en las señales de sobrevida inducidas por los oncogenes v-Src, v-Ras y v-Raf.

La adquisición de inmortalidad es una etapa temprana y necesaria, si bien no suficiente, para que se produzca la transformación maligna. Asimismo, la resistencia a la apoptosis constituye una de las principales diferencias entre las células normales y tumorales. Algunas evidencias experimentales contradictorias sugieren que, al igual que lo que sucede con la regulación de la proliferación celular mediada por Ras, la relación entre la señalización por Ras y la apoptosis es muy compleja. Las vías efectoras de Ras pueden tener efectos promotores de la sobrevida, como PI3K/Akt, o de la apoptosis (a través

del aumento de la expresión de p53), dependiendo en gran medida del tipo y estado de la célula implicada². Si bien mediante estrategias de sobreexpresión de los componentes de la vía de Ral no se ha podido demostrar su participación en la regulación de la sobrevida celular^{2,19}, este punto requiere de mayores estudios.

Mediante el uso del modelo experimental descrito, demostramos que la expresión de los oncogenes v-Ras y v-Raf inhibió la apoptosis inducida por diversos tratamientos, como privación de suero, privación de anclaje (anoikis) y exposición a cisplatino. La co-expresión de la dominante negativa S28N-Ral restauró parcialmente la sensibilidad a estos tratamientos, indicando la participación de esta GTPasa monomérica en la vía que regula la sobrevida celular.

En cuanto al estudio de las vías de transducción de señal río abajo de RalA, mediante un enfoque farmacológico se determinó que RalA coopera en la promoción de la sobrevida celular con PI3K ó Mek, dependiendo si la señal se origina en la activación de Ras ó Raf, respectivamente. Más aún, la adición de ácido fosfatídico, el producto de la actividad enzimática de PLD revirtió el efecto inhibitorio de la dominante negativa S28N-RalA sobre la señal de sobrevida inducida por v-Raf. Esta reversión no se observó cuando la señal de sobrevida fue mediada por la sobreexpresión de v-Ras, sugiriendo que los efectores río abajo de RalA dependen de la molécula activadora.

Un hallazgo interesante fue que la expresión de v-Ras, v-Raf y v-Src redujo el nivel de fosforilación de p38, una quinasa de la familia MAPK involucrada en apoptosis, y que la co-expresión de S28N-RalA restauró la fosforilación a niveles cercanos al control. La inhibición farmacológica de p38 redujo notablemente la apoptosis en todas las células estudiadas, sugiriendo que la inhibición de esta molécula es importante para la promoción de sobrevida por v-Ras, v-Raf y v-Src y que, al menos en parte, está mediada por la activación de RalA.

Conclusiones

En los últimos años se ha consolidado el concepto de que la vía Ral-GDS/Ral constituye una tercer clase de los efectores activados por Ras. El hecho de que una dominante negativa de RalA bloquee la transformación *in vitro*, así como el crecimiento tumoral y diseminación metastásica inducidas por v-Ras y v-Src, sugiere fuertemente que las proteínas Ral, probablemente a través de una vía dependiente de PLD, deben estar jugando un importante rol en la determinación del fenotipo tumorigénico y de la progresión tumoral, a través de la regulación de moléculas implicadas en diferentes etapas de la cascada metastásica, como proteasas, componentes de la matriz extracelular y receptores de mem-

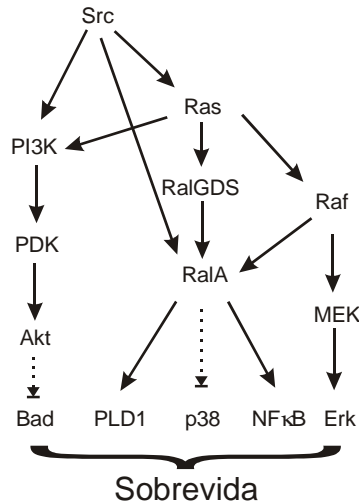


Fig. 4.- Diagrama simplificado de la complejidad de la regulación de la supervivencia celular. Las flechas indican activación, mientras que las líneas punteadas con la punta roma indican inhibición. La actividad de PLD1, NF- κ B y Erk inhiben la apoptosis de fibroblastos NIH3T3, mientras que la actividad de Bad y p38 son promotoras de la muerte celular.

brana (Figura 3). En cuanto a la influencia de esta vía efectora de Ras en la supresión de la apoptosis, que junto con la desregulación de la proliferación constituyen una plataforma mínima para el desarrollo de todos los cánceres, se ha demostrado la participación de RalA en la regulación de la supervivencia inducida por la sobreexpresión de los oncogenes Ras, Src y Raf. Se observó que RalA modula la supervivencia celular en forma paralela a PI3K y Raf, sugiriendo que una compleja red de señales, y no una vía vertical simple, regula la supervivencia celular río debajo de estos oncogenes. Asimismo, se determinó que PLD1 y p38 serían responsables de al menos parte de las señales moduladas por RalA (Figura 4).

La adquisición de un profundo conocimiento acerca de las vías de transducción de señales involucradas en todas las etapas de la transformación maligna es imprescindible para el desarrollo de nuevas terapias racionales para combatir de manera efectiva al cáncer. Nuestro trabajo, junto al de otros, demuestra que RalA está íntimamente involucrada en las señales dependientes de Ras, Raf y Src, tres proto-oncogenes cuya relación con la transformación maligna hoy es indiscutida. El hecho de que RalA sea necesaria para la inducción de proliferación y supervivencia de las células transformadas la ubica como un blanco prometedor de nuevas terapias antineoplásicas. Asimismo, la regulación de proteasas y moléculas de matriz sugiere fuertemente que la inhibición de esta molécula afectará de manera importante el desarrollo de metástasis en los pacientes en estadios avanzados de la enfermedad.

Bibliografía

- Bos JL. Ras Oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989; 49: 4682-4589.
- Downward J. Ras signaling and apoptosis. *Curr Opin Genes Devel* 1998; 8: 49-54.
- Reuther G y Der C. The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12:1 57-165.
- Embade N, Valerón P, Aznar S, López-Collazo E, Lacal J. Apoptosis induced by Rac GTPase correlates with induction of FasL and ceramides production. *Mol Biol Cell* 2000; 11: 4347-4358.
- Wolthuis R y Bos J. Ras caught in another affair: the exchange factors for Ral. *Curr Opin Gen & Dev* 1999; 9: 112-117.
- Feig LA, Urano T, Cantor S. Evidence for a Ras/Ral signaling cascade. *Trends Biochem Sci.* 1996, 21: 438-441.
- Quaroni A, Paul E. Cytoctrin is a Ral-binding protein involved in the assembly and function of the mitotic apparatus. *J Cell Science* 1999; 112: 707-718.
- Nakashima S, Morinaka K, Koyama S, Ikeda M et al. Small G protein Ral and its downstream molecules regulate endocytosis of EGF and insulin receptors. *EMBO J* 1999;18: 3629-3642.
- Jiang H, Luo J, Urano T, Lu Z, Foster DA, Feig L. Involvement of Ral-GTPase in v-Src-induced phospholipase D activation. *Nature* 1995; 378: 409-12.
- Luo J, Liu X, Frankel P, Rotunda P, Ramos M et al. Functional association between Arf and RalA in active phospholipase D complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 3632-3637.
- Singer W, Brown H, Sternweis P. Regulation of eukaryotic phospholipase C and phospholipase D. *Annu Rev Biochem* 1997; 66: 475-509.
- Gille H, Downward J. Multiple Ras effector pathways contribute to G (1) cell cycle progression. *J Biol Chem* 1999; 274: 22033-22040.
- Wolthuis R, de Ruiter N, Cool R, Bos J. Stimulation of gene induction and cell growth by the Ras effector Rlf. *EMBO J* 1997; 16: 6748-6761.
- Henry D, Moskalenko S, Kaur K, Fu M, Pestell R, Camonis J, White M. Ral GTPases contribute to regulation of cyclin D1 through activation of NF- κ B. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 8084-8092.
- Hofer F, Berdeaux R, Martin GS. Ras-independent activation of Ral by a Ca (2+)-dependent pathway. *Curr Biol* 1998; 8: 839-842.
- Ohta Y, Suzuki N, Nakamura S, Hatrwig J, Stossel T. The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2122-2128.
- Urano T, Emkay R, Feig LA. Ral-GTPases mediate a distinct downstream signaling pathway from Ras that facilitates cellular transformation. *EMBO J* 1996; 15: 810-816.
- Lu Z, Hornia A, Joseph T, Sukezane T, Frankel P, Zhong M, Bychenok S, Xu L, Feig L, Foster D. Phospholipase D and RalA cooperate with the Epidermal Growth Factor Receptor to transform 3Y1 rat fibroblasts. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 462-467.
- Webb CP, Van Aelst L, Wigler MH, Woude GF. Signaling pathways in Ras mediated tumorigenicity and metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8873-8878.
- DeClerck YA, Imren S, Montgomery AM, Mueller BM, Reisfeld RA, Laug WE. Protease and protease inhibitors in tumor progression. *Adv Exp Med Biol* 1997; 425: 89-97.

21. Aguirre Ghiso J, Alonso D, Farías E, Bal de Kier Joffé E. Overproduction of urokinase type plasminogen activator is regulated by phospholipase D and protein kinase c-dependent pathways in murine mammary adenocarcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1356: 171-84.
22. Sherbet G, Lakshmi M. The genetics of cancer. Genes associated with cancer invasion, metastasis and cell proliferation. New York: Academic Press, 1997.
23. Aguirre Ghiso J, Frankel P, Farías E, Lu Z, Jiang H, Olsen A et al. RalA requirement for v-Src and v-Ras-induced tumorigenicity and overproduction of urokinase-type plasminogen activator: involvement of metalloproteases. *Oncogene* 1999; 18: 4718-25.
24. RalA mediates v-Src, v-Ras and v-Raf regulation of CD44 and fibronectin expression in NIH3T3 fibroblasts. Virginia Ladeda, Paul Frankel, Elisa Bal de Kier Joffe, Larry A. Feig, Julio A. Aguirre Ghiso, David A. Foster. *Biochem Biophys Res Commun* 283: 854-861.